



Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciência e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química

Filmes de Langmuir, nanopartículas e biomembranas para estudos de biomineralização óssea: do modelo biomiméticos às aplicações biotecnológicas

Ana Paula Ramos

Texto sistematizado apresentado à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para o concurso de Livre-Docência, Departamento de Química- Área: **Físico-Química**

RIBEIRÃO PRETO -SP

2021

À Anna Clara, o maior amor do mundo

Agradecimentos

Agradeço a Deus pelo dom da vida, por todas as bênçãos e graças.

Ao Eduardo pelo suporte, amor e companheirismo que me deixam segura para seguir adiante.

Aos meus pais Ana e Carlos, às minhas irmãs, por serem a minha rede de apoio.

Aos alunos que de forma direta permitiram o desenvolvimento dos projetos aqui descritos: Camila, Lucas, Marcos, Gília, Thaís, Larissa e Rafael.

Aos orientandos atuais e aos que passaram pelo Laboratório de Físico-Química de Superfícies e Colóides, que sempre deixam um pouco de si. Agradeço também ao apoio do Dr. Lourivaldo Pereira em todas as ocasiões.

À Profa. Maria Elisabete Zaniquelli pelos ensinamentos além da físico-química de superfícies.

À Profa. Rogéria Rocha Gonçalves pelas oportunidades na caminhada científica.

Ao Prof. Pietro Ciancaglini pela colaboração, por abrir as portas de seu laboratório para nós e, principalmente, pela amizade.

Aos colaboradores da FCFRP, FORP e FMRP.

Às agências FAPESP, CNPq e CAPES pelos financiamentos e bolsas.

Todo caminho da gente é resvaloso.

Mas também, cair não prejudica demais

A gente levanta, a gente sobe, a gente volta!...

O correr da vida embrulha tudo, a vida é assim:

Esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa,

Sossega e depois desinquieta.

O que ela quer gente é coragem.

Ser capaz de ficar alegre e mais alegre no meio da alegria,

E ainda mais alegre no meio da tristeza... (João Guimarães Rosa)

“-Sê forte e corajoso, pois eu, o Senhor teu Deus, estou contigo por onde andares.” (Josué 1:9)

Resumo

A natureza serve como inspiração nas situações mais corriqueiras de nosso dia a dia. As cores, sabores, texturas e estruturas únicas, que culminam em propriedades finamente esculpidas e por nós contempladas, podem servir ainda como modelo no preparo de materiais, dando origem à uma área na ciência de materiais chamada “materiais bioinspirados”. Dentre as inspirações naturais, aqui destaco a formação de estruturas como conchas, exoesqueleto de crustáceos e ossos, resultantes do processo de biomineralização. A biomineralização é a formação de minerais em presença de uma matriz orgânica que contém as informações iniciais para nucleação e posterior crescimento da fase inorgânica. Esta conexão gera materiais com propriedades superiores às observadas nas suas contrapartes individuais. Um exemplo disso é a alta resistência mecânica observada nas conchas marinhas, quando comparadas à natureza frágil do giz de lousa. Ambos os materiais são majoritariamente compostos por CaCO_3 , porém, nas conchas, a presença de macromoléculas orgânicas direciona o crescimento mineral em uma estrutura hierárquica, altamente ordenada, que culmina em resistência aumentada. Ainda, os ossos humanos são um exemplo intrigante de biocompósitos que, além de propriedades mecânicas superiores, apresentam capacidades de renovação e auto-regeneração devido à ação orquestrada de células específicas.

Este texto sistematizado apresenta os projetos desenvolvidos no Laboratório de Físico-Química de Superfícies e Colóides, do Departamento de Química-FFCLP, desde a minha contratação como docente em julho de 2011. Biomineralização é o tema central, que pode ser dividido em temas com objetivos específicos em 4 capítulos. No capítulo 1 faço uma apresentação geral do processo de biomineralização seguido de uma revisão sobre a estrutura e composição dos ossos, foco de todos os projetos de pesquisa até aqui desenvolvidos. Destaco a importância de se conhecer as propriedades físicas e químicas

do material natural que inspira a produção de todos os materiais sintéticos por nós preparados. No capítulo 2 descrevo o uso de monocamadas de Langmuir e filmes de Langmuir-Blodgett como modelos para estudos da interação lipídeos-proteínas e crescimento mineral. Esses materiais, além de serem úteis em estudos básicos sobre precipitação mineral guiada por matrizes orgânicas, servem como modificadores de superfícies de Ti para preparo de materiais potencialmente aplicáveis em implantes ósseos. No capítulo 3 apresento linha de pesquisa focada na investigação de estrutura e composição da fase mineral dos ossos, denominada apatita biológica. Essas apatitas servem como inspiração para a formação de nanopartículas bioativas aptas a serem utilizadas para reparo ósseo. Ainda, descrevo a importância de íons estrôncio (Sr^{2+}) e sua função na regulação da atividade de osteoblastos, células responsáveis pela formação da matriz mineralizada óssea, e de osteoclastos, células responsáveis pela reabsorção óssea. A incorporação destes íons e a liberação controlada a partir de nanopartículas inspiradas nas apatitas biológicas resulta na confecção de biomateriais potencialmente relevantes para tratamento de pacientes osteoporóticos. No capítulo 4, o foco é a matriz orgânica dos ossos, que nos inspirou para o preparo de membranas e moldes tridimensionais contendo colágeno e moléculas não-colágenas capazes de induzir a formação de apatita quando em contato com fluído corpóreo. Por fim, a estas membranas foram adicionadas nanopartículas de HA contendo ou não Sr^{2+} , resultando em materiais porosos, com propriedades mecânicas semelhantes a de ossos trabeculares, potencialmente aplicáveis para reparo de defeitos ósseos com tamanho crítico. Todos os capítulos estão estruturados com uma revisão da literatura descrevendo o estado da arte para cada temática, seguido de uma seção de resultados e discussão no qual trago a contribuição de nosso grupo, seguido por uma conclusão e perspectiva que deixa claro o ponto em que estamos e para onde estamos caminhando.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACAN- agrecanas

ALP- gene relacionado à expressão de TNAP

AMPK- proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina

BMP2- proteína morfogenética óssea 2

BSP- sialoproteína óssea

CaP- fosfato de cálcio

COL- colágeno

COL1- colágeno tipo-I

COL2- colágeno tipo-II

DHP- dihexadecilfosfato

DMP- proteína da matriz dentinária 1

DPPC- dipalmitoilfosfatidilcolina

DPPE- dipalmitoilfosfatidilserina

ECM- matriz extracelular

ERK- proteína quinase extracelular regulada

EVs- vesículas extracelulares

FBN- fibronectina

GAGs- glicosaminoglicanas

HA- hidroxiapatita

hUVEC- células endoteliais de veia umbilical humana

LB- Langmuir-Blodgett

MAP- proteína quinase ativada por mitógenos

MC3T3- linhagem pré-osteoblástica murina

MSCs- células tronco mesenquimais

MVs- vesículas da matriz

TEM- microscopia eletrônica de transmissão

TNAP- fosfatase alcalina não específica de tecido

SBF- fluído corpóreo simulado

OCN- osteocalcina

OPA- octadecilfosfato

OPN- osteopontina

PAA- poli(ácido acrílico)

PEG- poli(etileno glicol)

PLGA- poli(L-ácido láctico-co-ácido glicólico)

PME- proteínas da matriz extracelular

PMMA- polimetilmetacrilato

RUNX-2 fator de transcrição 2 relacionado à runt

SHED- células-tronco primárias de dentes humanos

Sumário

Capítulo 1: Aspectos Gerais da Biomineralização e Formação do Tecido Ósseo 2

1.1 Aspectos gerais da biomineralização	2
1.2 Biomineralização óssea	4
1.2.1 Formação e regulação dos blocos formadores dos ossos	7
1.2.2 Estrutura e função do colágeno	7
1.2.3 Formação da fase orgânica dos ossos	8
1.2.4 Ossificação endocondral e intramembranosa	9
1.2.5 A formação da fase inorgânica dos ossos.....	11
1.3 Engenharia tecidual óssea: caminhando na direção de modelos biomiméticos	12

Capítulo 2- Filmes de Langmuir como matrizes para estudos de biomineralização e o recobrimento de superfícies metálicas..... 16

2.1 Modificação biomimética e o papel das superfícies	16
2.2. Relação entre propriedades de superfície e sucesso de implantes	16
2.3 Por que modificar a superfície de um implante?	17
2.4 Modificações bioinspiradas de superfícies.....	20
2.4.1 Uso de Filmes de Langmuir como modelos biomiméticos.....	21
2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
2.6 Conclusões e Perspectivas.....	28

Capítulo 3- Nanopartículas obtidas a partir de modelos bioinspirados 30

3.1 Nanopartículas obtidas a partir de modelos bioinspirados: o papel do Sr^{2+}	30
3.2 Sr^{2+} e sua versatilidade de aplicações em biomineralização	31
3.2.1 Sr^{2+} e seu papel no tratamento da hipersensibilidade dentária.....	31
3.3 Complexo Flavonóide- Sr^{2+} e seu potencial osteogênico: explorando os mecanismos	34
3.4 Resultados e Discussão.....	36
3.5 Conclusões e perspectivas.....	37

Capítulo 4- Biomembranas e Scaffolds Tridimensionais: de modelos para biomineralização às aplicações biotecnológicas	40
4.1 Materiais 3D biomiméticos contendo colágeno aplicados como reparos ósseos	40
4.2. Interação dos materiais 3D contendo COL1 com células	41
4.3 Hidrogéis no desenvolvimento de materiais biomiméticos.....	44
4.3.1 Hidrogéis à base de COL1 contendo macromoléculas não-colágenas.....	45
4.3.2 Hidrogéis contendo COL1 e macromoléculas sintéticas	48
4.3.3 Poli(metilmetacrilato) na fabricação de <i>scaffolds</i> em biomateriais.....	51
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.5 Conclusões e perspectivas.....	53
REFERÊNCIAS.....	57
ANEXOS	81

Capítulo 1-

Aspectos gerais da biomineralização e a formação do tecido ósseo

Capítulo 1: Aspectos Gerais da Biomineralização e Formação do Tecido Ósseo

1.1 Aspectos gerais da biomineralização

O esqueleto e exoesqueleto de organismos vivos são formados por sistemas químicos complexos que envolvem a interação entre compostos orgânicos e inorgânicos ligados química e/ou fisicamente. O processo por meio do qual ocorre a formação da parte mineral desses organismos é chamado biomineralização.¹ A biomineralização leva à formação de uma grande variedade de biominerais que atravessa todos os cinco reinos animais (Figura 1).² Ossos, conchas e perolas são exemplos de materiais nanoestruturados que têm origem a partir deste processo. No caso dos organismos marinhos, acredita-se que a formação de estruturas mineralizadas ocorra devido à supersaturação causada pela dissolução de rochas e movimento de placas tectônicas em presença de biomacromoléculas.³

Dos diferentes minerais que ocorrem em sistemas vivos associados a matrizes orgânicas, apatitas, em especial a hidroxiapatita (HA) $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ e carbonatos de cálcio (CaCO_3) são os mais abundantes e mais estudados. Fosfatos de cálcio (CaP) são encontrados na forma de apatitas que podem ser naturais ou sintéticas. Dentre as apatitas, a mais abundante no corpo humano é a HA carbonatada, presente nos esmaltes dentários e dentina e o principal componente do material ósseo. A presença de diferentes íons no fluido corpóreo humano tende a modificar a estrutura e composição deste mineral.^{4,5} Por sua vez, CaCO_3 é um mineral vastamente encontrado na natureza em conchas marinhas, cascas de ovos e, no corpo humano, é o quinto mineral em abundância. CaCO_3 pode ser encontrado na forma de três polimorfos cristalinos anidros: calcita (o mais estável), vaterita (o menos estável) e aragonita.⁶ Estes três polimorfos cristalizam com diferentes hábitos cristalinos permitindo distinção por imagens de microscopia entre os mesmos, sendo que a calcita apresenta geometria romboédrica, aragonita estrutura alongada tipo agulha e vaterita estrutura esferulítica.⁷ Ainda, três formas metaestáveis podem ser encontradas: CaCO_3 amorfo e CaCO_3 mono e hexahidratados. Estes três últimos polimorfos além de serem instáveis e facilmente convertidos nos outros polimorfos, são também altamente solúveis em água.⁸

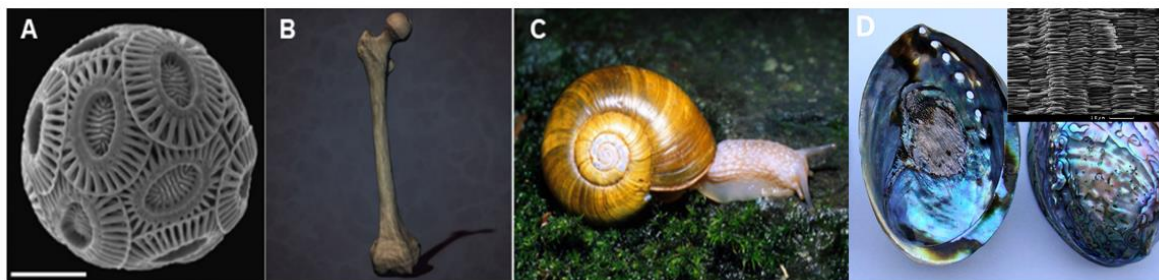


Figura 1. Exemplos de estruturas mineralizadas encontradas na natureza. A) Imagem do cocolítóforo *Emiliana huxleyi* (alga unicelular) obtida por microscopia eletrônica de transmissão, barra de escala igual a 3 μm ;⁹. Sua carapaça é formada por carbonato de cálcio e macromoléculas orgânicas. B) Ilustração de fêmur humano, composto principalmente por apatita biológica (fosfato de cálcio) e colágeno (COL); C) Exemplo de estrutura mineralizada do exoesqueleto de moluscos, composto principalmente por carbonato de cálcio e quitina; D) Madrepérola, composta por carbonato de cálcio na forma de aragonita e proteínas. A imagem de microscopia eletrônica inserida mostra a sua organização microscópica, na qual plaquetas poligonais de aragonita estão arranjadas em camadas, empilhadas em colunas.¹⁰

O processo de biomineralização em organismos vivos ocorre em presença de macromoléculas como proteínas (COL,¹¹ osteopontina (OPN),¹² siaoloproteína óssea (BSP)¹³) e polissacarídeos.¹⁴ Estas biomacromoléculas por si só podem servir como direcionadores do crescimento de minerais, como mostrado na série de estudos publicados por Weiner e colaboradores.^{15–17} Biominerais superam suas contrapartes orgânicas e inorgânicas isoladas em diversos aspectos físico-químicos, como a alta organização hierárquica, que culmina na resistência mecânica excepcional desses materiais. Pode-se citar como exemplo a grande diferença de resistência mecânica entre o giz e as conchas do mar. Ambos são formados por carbonato de cálcio, porém nas conchas a presença da matriz orgânica faz com que sua resistência mecânica seja muito maior quando comparada à natureza friável do giz. No caso das madrepérolas (Figura 1D), a alta resistência mecânica é atribuída à sua microestrutura que consiste em plaquetas minerais (CaCO_3 -aragonita) com diâmetros típicos de 5 a 10 μm e espessura de 0,3 a 0,5 μm . Estas estão arranjadas em camadas, que se ordenam em colunas, conectadas por uma fina camada de aproximadamente 20 nm de biopoímeros. Esta conexão é responsável por manter a estrutura e integridade deste material compósito natural.¹⁸ O ordenamento microscópico destes materiais naturais serve como inspiração para a obtenção de materiais biomiméticos com características peculiares.^{18–20}

Um aspecto chave da biomineralização é que a nucleação mineral geralmente ocorre em meios confinados. Na tentativa de mimetizar estes sistemas naturais por meio da restrição do crescimento da

parte inorgânica, sistemas sintéticos biomiméticos têm sido utilizados como superfícies *templates* ou moldes. Dentre os moldes que vêm sendo estudados podemos citar membranas poliméricas,²¹⁻²³ filmes finos formados por polieletrólitos na forma de géis tridimensionais²⁴⁻²⁷ e lipídeos²⁸⁻³⁴. A nucleação e crescimento de cristais em meios confinados resultando em macroestruturas com geometrias fascinantes e definidas que seguem o formato do molde é um exemplo do uso de moldes, que podem ser naturais ou sintéticos.^{35,36} Meldrum e colaboradores estudaram o crescimento de monocristais de diferentes minerais como SrSO₄ e PbSO₄, utilizando como matrizes membranas poliméricas que permitiram a formação de cristais com macroporos e estruturas tipo esponja, semelhante ao exoesqueleto de espécies marinhas³⁷. O mesmo grupo também já havia estudado o crescimento de cristais de CaCO₃ na forma cristalina calcita utilizando-se moldes naturais obtidos de organismos marinhos³⁵. Recentemente, nosso grupo de pesquisa mostrou que a presença de macromoléculas como poli(ácido acrílico) (PAA), inseridos interior dos poros de membranas de policarbonato pode levar à formação seletiva de nanotubos ou nanocilindros de CaCO₃ e SrCO₃.³⁸ Estes estudos mostram que utilizando-se técnicas adequadas, diferentes macromoléculas com relevância biológica podem ser inseridas em sistemas biológicos modelo para estudos de biomineralização. As dimensões dos moldes podem ser selecionadas e modo a se mimetizar estruturas naturalmente mineralizadas, como fibrilas de COL.^{39,40} Dentre os minerais, fosfatos e carbonatos de cálcio têm sido amplamente estudados devido à sua importância em processos fisiológicos, como a formação do tecido ósseo, e patológicos, como em doenças cardiovasculares, em organismos vivos. Além disso, possuem sua potencial aplicação em biomateriais, devido às suas características osteoindutoras e osteointegradoras⁴¹⁻⁴⁷. Desta forma, estudos do processo de biomineralização *in vitro* auxiliam na ampliação do entendimento de processos que ocorrem *in vivo*, além da fabricação de novos materiais com propriedades peculiares, seja com relação à resistência mecânica ou propriedades biológicas, como as apresentadas pelos ossos.

1.2 Biomineralização óssea

O tecido ósseo pode ser visto tanto como um órgão quanto como um material. Como um órgão, os ossos desempenham funções importantes, como pontos de fixação para apoiar a função da maioria dos músculos esqueléticos.⁴⁸ O osso também é responsável pela proteção de órgãos internos (por exemplo, o cérebro, coração e pulmões), pela produção de células sanguíneas na medula óssea e pela homeostase mineral de íons com funções biológicas fundamentais, como cálcio, fosfato, magnésio e sódio, controlando sua liberação e armazenamento.⁴⁸⁻⁵⁰ Como material, o tecido ósseo consiste em uma matriz tridimensional (3D) orgânica/inorgânica híbrida porosa, composta principalmente por COL e uma fase mineral de CaP, que é formada e regulada pela ação orquestrada de condrócitos,

osteoblastos, osteócitos e osteoclastos.^{49,51-53} Em microescala, o arcabouço 3D híbrido que constitui o tecido ósseo se organiza em um arranjo estrutural complexo que varia de acordo com o tipo e localização do tecido, como o encontrado no osso trabecular compacto (ósteons) e esponjoso (Figura 2).^{25,51} Todos os ossos contêm uma camada externa de osso cortical densamente compactado, que pode variar em espessura, mesmo dentro de um mesmo osso.⁵⁴ A estrutura trabecular esponjosa pode preencher todo o volume interno de alguns ossos, como vértebras, costelas e ossos da calvária, ou pode estar presente apenas em partes específicas de epífises de ossos longos.⁵⁴

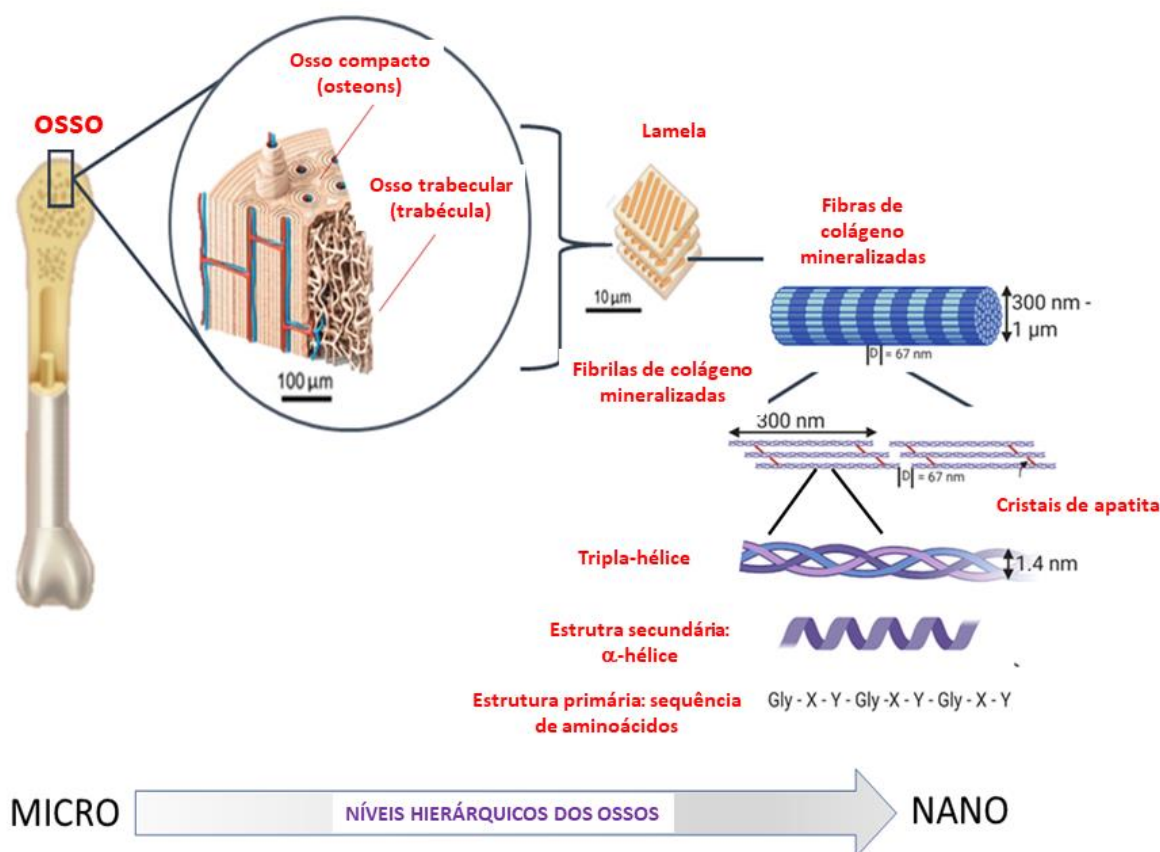


Figura 2. Organização hierárquica do osso de micro- a nano-escala. Todos os ossos são formados por uma camada externa de osso cortical densamente compactado, que é preenchido por uma estrutura óssea trabecular esponjosa. Osteons e trabéculas compartilham uma organização comum baseada em lamelas com diferentes arranjos de fibras de colágeno mineralizadas. Os osteons consistem em lamelas multi-anéis concêntricas. Por sua vez, as estruturas lamelares do osso trabecular esponjoso são interconectadas de maneira heterogênea, resultando em uma estrutura porosa anisotrópica menos compactada. Em nanoescala, o bloco de construção óssea consiste em uma matriz mineralizada formada por um arranjo supramolecular de moléculas de COL fibrilar e apatita biológica. O arranjo supramolecular do COL é caracterizado pela presença de uma tripla hélice que consiste no

entrelaçamento de 3 cadeias- α , compostas por aproximadamente 1000 aminoácidos cada. A sequência de aminoácidos no COL é geralmente organizada em uma unidade repetitiva tripeptídica, Gly-X-Y, onde X é frequentemente prolina (Pro) e Y é frequentemente 4-hidroxiprolina (4-Hyp). Adaptado de Liu et al.⁴⁹, Du et al.⁵¹ e Mansoorifar et al.²⁵

Osteons e trabéculas compartilham uma estrutura comum baseada em lamelas com diferentes arranjos de fibras de COL mineralizadas (Figura 2).^{25,51} No entanto, a estrutura hierárquica dos osteons consiste em lamelas compostas por vários anéis concêntricos, com lamelas paralelas tendo diferentes direções de orientação das fibras de COL.²⁵ Cada ósteon compreende de 5 a 30 estruturas concêntricas, com cada lamela tendo de 3 a 7 μm de espessura e o ósteon inteiro medindo até 100 μm de diâmetro (Figura 2).²⁵ As estruturas lamelares do osso trabecular esponjoso são altamente interconectadas de maneira heterogênea, formando uma estrutura porosa anisotrópica com organização 3D menos compactada (Figura 2). As diferenças no arranjo estrutural do osso cortical e do osso trabecular em microescala influenciam suas propriedades mecânicas. O módulo de Young do osso trabecular está na faixa de 0,1 a 4 GPa, enquanto para o osso cortical valores mais elevados do módulo de Young, na faixa de 10 a 18 GPa, são relatados.⁵⁵ Além disso, a fração do volume ósseo relacionada à estrutura trabecular e o grau de anisotropia desse arranjo podem ser afetados em condições patológicas, levando à redução da resistência mecânica.²⁵

Em nanoescala, o bloco de construção óssea consiste em uma matriz mineralizada formada por um arranjo supramolecular de moléculas de COL fibrilar (fase orgânica) e apatita biológica (fase inorgânica), que representam em peso seco 20-25% e 65-70%, respectivamente, da composição óssea.^{49,52} Assim como no caso dos biominais, a organização supramolecular e a forma como a matriz óssea é mineralizada são responsáveis pelas notáveis propriedades mecânicas deste tecido.⁵² A fase inorgânica, denominada apatita biológica, é semelhante em composição à HA. No entanto, a razão molar Ca/P encontrada na apatita biológica é menor (1,45) do que HA (1,67) devido às substituições de íons de cálcio por outros cátions como sódio e magnésio, bem como a substituição de grupos fosfato e hidroxila por carbonato.^{49,56,57} A fase inorgânica está associada a uma matriz orgânica formada principalmente por COL (90-95% em peso) e macromoléculas não-colágenas (5-10% em peso).^{54,58} Acredita-se que as macromoléculas não-colágenas desempenhem um papel importante na auto-organização, alinhamento e mineralização das fibrilas de COL.^{53,54,58} Dentre elas, as mais importantes são as glicosaminoglicanas (GAGs)⁵⁹ que estão envolvidas na formação e orientação das fibras de COL, osteonectina e osteocalcina (OCN) que estão envolvidas na estabilização e orientação da fase mineral durante sua deposição na matriz de COL fibrilar e outras macromoléculas, como fibronectina

(FBN)⁶⁰, OPN¹² e BSP¹³, que estão envolvidas na fixação de células à matriz extracelular (ECM) óssea.⁵⁰ Compreender o papel da associação entre a ECM e as células na formação óssea é necessário para se tentar fabricar materiais 3D que simulam ossos para estudos básicos que visam compreender os mecanismos bioquímicos que conduzem os processos de biomineralização, bem como para aplicações na regeneração óssea.⁶¹

1.2.1 Formação e regulação dos blocos formadores dos ossos

As células desempenham um papel importante na regulação da organização da ECM óssea, principalmente pela secreção de fatores, como fosfatase alcalina não específica de tecido (TNAP), OCN, OPN, BSP, proteína morfogenética óssea 2 (BMP2) e fator de transcrição relacionado ao runt-2 (RUNX2).^{25,53} Por outro lado, a organização da ECM pode influenciar a atividade celular, como adesão, diferenciação, proliferação e secreção dos fatores já citados, o que implica no processo de produção e reabsorção da ECM pelas células.^{25,53,62} A organização hierárquica do osso é obtida por meio de um processo de remodelação que inclui etapas como o recrutamento e/ou ativação de células progenitoras⁶³, a produção de ECM conduzida por osteoblastos, que é regulada pelos osteócitos⁶⁴, e a reabsorção da matriz mineralizada pelos osteoclastos.^{25,53} A relação entre essas células e a ECM óssea é complexa.⁶⁵ No entanto, a maioria dos estudos usando biomateriais contendo células progenitoras [principalmente células-tronco mesenquimais (MSCs)] para regeneração óssea ou o tratamento de doenças relacionadas aos ossos explorando a diferenciação dessas células em osteoblastos, negligencia a contribuição simultânea de outras células (por exemplo, osteócitos e osteoclastos).^{25,53} Para melhorar a eficiência dos biomateriais e a confiabilidade dos modelos biomiméticos utilizados para reproduzir a complexidade do tecido, é necessário caracterizar e compreender a formação de cada fase do osso e a integração da ECM com a atividade orquestrada das células, recapitulando assim o processo natural de formação e manutenção óssea.

1.2.2 Estrutura e função do colágeno

COL é a proteína mais abundante no corpo humano, sendo responsável por manter a integridade estrutural da ECM em diferentes tecidos.^{11,66,67} Pelo menos 28 tipos de COL com diferentes arranjos supramoleculares foram identificados dependendo de sua estrutura e função.^{11,66,67} Entre eles, o colágeno tipo-I (COL1) é o componente mais abundante da fase orgânica da ECM dos tecidos conjuntivos, como tendão e osso.^{50,66,67} O arranjo supramolecular do COL é caracterizado pela presença de uma tripla hélice que consiste no entrelaçamento de 3 cadeias α , 2 idênticas (denominadas $\alpha 1$) e 1 com uma composição de aminoácidos diferente (denominadas $\alpha 2$), e compostas por aproximadamente 1000 aminoácidos cada.^{11,50,53,66,67}

A sequência de aminoácidos no COL é geralmente organizada em uma unidade repetitiva tripeptídica, Gly-X-Y, onde X e Y são frequentemente prolina (Pro) e 4-hidroxiprolina (4-Hyp), respectivamente.^{66,67} A formação de 4-Hyp foi atribuída à hidroxilação de Pro, catalisada pela enzima prolilhidroxilase, no lúmen do retículo endoplasmático.⁶⁸ A ocorrência de Gly no tripeptídeo é essencial para fornecer estabilidade à estrutura de hélice tripla, favorecendo o entrelaçamento das cadeias α .^{50,66} A estabilização é garantida por ligações de hidrogênio entre o grupo amino do resíduo Gly em uma cadeia α e o grupo carbonila dos outros resíduos de aminoácidos presentes nas outras cadeias α , entrelaçadas na mesma hélice tripla.^{11,66} Nesta estrutura altamente compacta, os resíduos Gly são projetados em direção ao centro, enquanto as cadeias laterais dos outros resíduos de aminoácidos são expostas à superfície da hélice.^{11,66}

A ocorrência de substituições de Gly por aminoácidos com uma cadeia lateral maior (como Cys ou Ser) em uma cadeia α leva a alterações genéticas da tripla-hélice, resultando em matrizes desorganizadas e defeituosas que podem afetar a mineralização óssea.¹¹ Atualmente, pelo menos 40 patologias associadas a substituições de resíduos Gly na molécula de COL foram relatadas.¹¹ A osteogênese imperfeita é um exemplo, caracterizada pela formação óssea anormal em recém-nascidos. Patologias relacionadas a mutações na posição Gly demonstram diretamente a natureza essencial da tripla hélice para a arquitetura, propriedades mecânicas e função do osso como um órgão. Distinguir a estrutura da ECM óssea associada a essas patologias da estrutura do tecido saudável pode ser usada como uma estratégia para desenvolver biomateriais e tratamentos mais eficientes para regeneração e reparo ósseo.⁵³ Para isso, é necessário entender como ocorre a formação e organização da ECM de osso sadio *in vivo* e como ela pode ser reproduzida *in vitro*.

1.2.3 Formação da fase orgânica dos ossos

Os osteoblastos secretam COL1 como procolágeno, nome dado às moléculas de COL que carregam os fragmentos terminais (propeptídeos) nos terminais C e N das cadeias α .^{53,66} Após a secreção, os propeptídeos são clivados por enzimas extracelulares chamadas colagenases, mais especificamente, C- e N-peptidases.⁶⁶ Esse processo resulta na produção de tropocolágeno. Os propeptídeos liberados do procolágeno servem como biomarcadores da síntese de COL.⁶⁶ Além disso, a automontagem do tropocolágeno no ambiente extracelular leva à construção de um arranjo supramolecular fibrilar. Este arranjo é caracterizado por um padrão de banda torcido e escalonado com uma periodicidade de aproximadamente 67 nm, atribuída a uma porção de COL denso de 27 nm, (a sobreposição), e uma porção menos densa de 40 nm (a região de lacuna) (Figura 2).^{53,58,66} Em geral, as microfibrilas são formadas por 4 a 8 hélices triplas.⁶⁶ Múltiplas microfibrilas se auto-organizam

para formar as fibrilas que, por sua vez, são organizadas para formar as fibras de COL.⁵³ Durante a remodelação fisiológica e patológica da ECM óssea, os telopeptídeos presentes nos terminais C e N do tropocolágeno são clivados, resultando na degradação das fibras de COL. Esses telopeptídeos clivados servem como biomarcadores da degradação do COL.⁶⁶

Os osteoblastos também liberam macromoléculas não-colágenas importantes para a montagem e mineralização das fibrilas de COL.^{53,69} Estudos *in vitro* utilizando células progenitoras cultivadas em meio osteogênico revelaram a presença de COL1, TNAP, BSP2, receptor de leptina, decorina e catepsina K nos estágios iniciais de diferenciação.^{70,71} A fibrilogênese descontrolada do COL pode ocorrer se quantidades insuficientes dessas macromoléculas forem produzidas neste estágio.^{53,69}

A maturação e diferenciação dos osteoblastos favorecem a formação e organização da ECM. Os osteócitos são formados quando os osteoblastos ficam incorporados na matriz colágena.⁵³ A atividade dos osteócitos está intimamente relacionada ao controle da formação e reabsorção óssea pela regulação da atividade dos osteoclastos e osteoblastos. Os osteócitos também secretam macromoléculas importantes para a mineralização das fibrilas de COL, como OPN e osteomodulina, influenciando assim a organização da ECM em nanoescala.^{48,53,64} Juntos, esses processos resultam na formação da fase orgânica do osso caracterizada em escala micrométrica por uma rede densa e alinhada de fibras, originada da alta organização das fibrilas de COL em nanoescala. A orientação das fibras e fibrilas na ECM é fundamental para a nucleação e propagação da fase inorgânica (mineral), que se traduz nas propriedades mecânicas do tecido ósseo.^{53,58}

1.2.4 Ossificação endocondral e intramembranosa

A ossificação endocondral é o mecanismo pelo qual os ossos longos (por exemplo, o rádio, o fêmur, a tíbia e o úmero) são desenvolvidos *in vivo*, na qual um molde de cartilagem é inicialmente formado, mineralizado e subsequentemente substituído por osso tecido.⁵³ A ossificação endocondral é um processo de várias etapas (Figura 3), no qual uma cartilagem nascente sofre hipertrofia, infiltração vascular e subsequente formação de osso mineralizado.⁷²⁻⁷⁴ Este é um processo complexo, no qual as MSCs se condensam e se diferenciam em condrócitos imaturos de proliferação rápida, que secretam uma matriz que estabelece a forma do futuro osso longo, além de construir o pericôndrio como reservatório de condrócitos imaturos.^{72,73,75} Essa matriz é então degradada quando os condrócitos sofrem diferenciação hipertrófica, o que acaba levando à apoptose celular. Durante este processo, o pericôndrio torna-se perioste, enquanto a camada interna do perioste sofre ossificação intramembranosa para formar o colar ósseo que dará origem ao osso cortical.⁷³ O núcleo da cartilagem hipertrófica é subsequentemente invadido por vasos sanguíneos juntamente com células osteoprogenitoras e osteoclastos para remover os condrócitos do molde e as MSCs substituem os

condrócitos apoptóticos. Por último, as MSCs se diferenciam em osteoblastos para produzir COL1 e outras proteínas da matriz óssea, como BSP, GAGs e OCN para formar uma matriz osteóide que é mineralizada para formar o osso final (Figura 3).^{73,75} A ossificação endocondral também está envolvida no reparo natural das fraturas ósseas, representando o método primário pelo qual a consolidação da fratura ocorre.⁷³

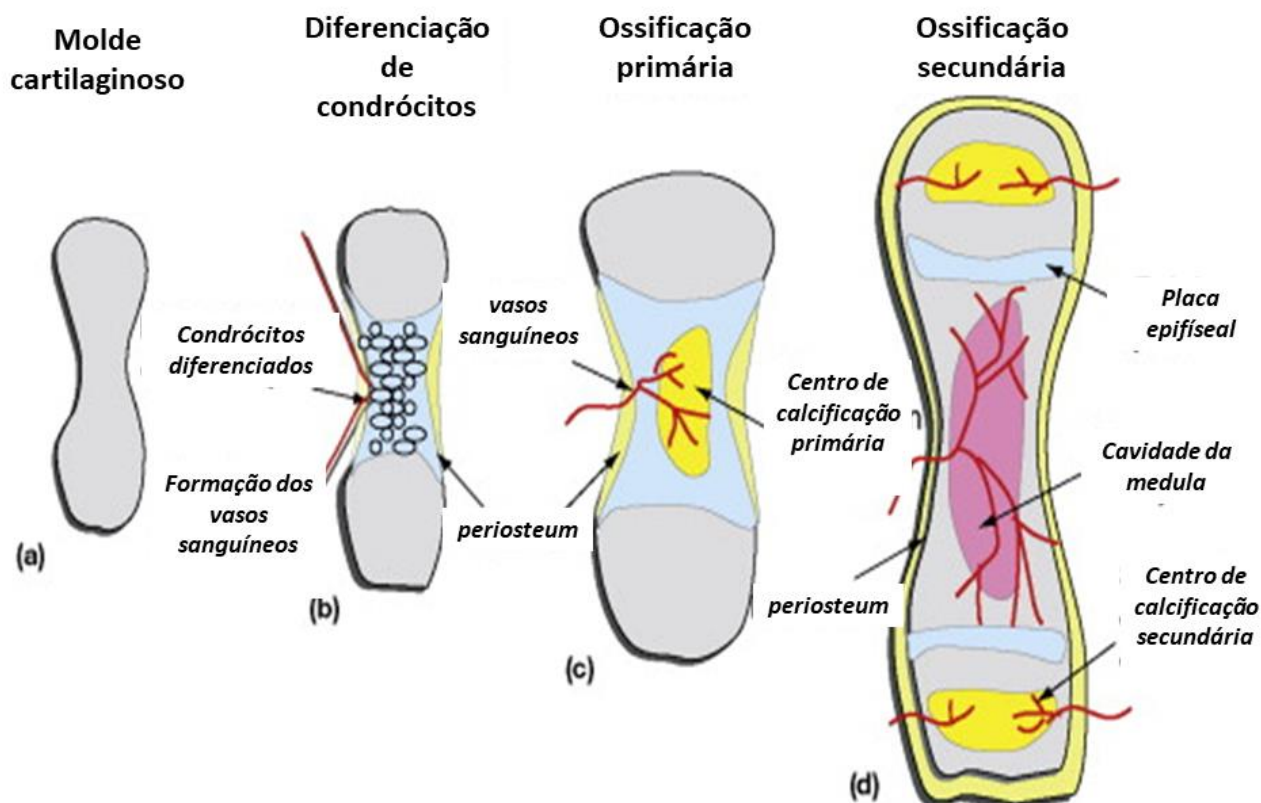


Figura 3. Etapas de ossificação endocondral. A) Cartilagem composta por matriz de COL2 prefigura a forma do futuro esqueleto ósseo; B) As MSCs se diferenciam em condrócitos e constituem tanto o pericôndrio quanto os condrócitos imaturos da diáfise; C) Os capilares penetram na cartilagem e o pericôndrio é convertido em periósteo. O colar periosteal e o centro de ossificação primário se desenvolvem; D) A cartilagem e os condrócitos continuam a crescer nas extremidades do osso e o centro de ossificação secundário se desenvolve. Ossificação das epífises. A cartilagem permanece na placa epifisária (de crescimento) e na superfície articular da cartilagem articular dando origem ao centro de ossificação secundário. Figura extraída da referência⁷⁶.

Ossificação intramembranosa é o segundo mecanismo que ocorre na formação de ossos planos no crânio, mandíbula e clavículas. Este processo não requer um molde de cartilagem, pois o periósteo é formado diretamente por osteoblastos, que são diferenciados das MSCs. Os osteoblastos secretam

COL1 e proteoglicanos para formar uma matriz osteóide, que então se mineraliza para formar o osso. Ossificação intramembranosa também pode curar fraturas ósseas.⁷⁷

1.2.5 A formação da fase inorgânica dos ossos

Além de sua participação na formação da matriz orgânica, os osteoblastos e os condrócitos hipertróficos também estão envolvidos na mineralização da ECM (Figura 4)^{49,53} A mineralização da matriz de COL é mediada por uma classe especial de vesículas extracelulares (EVs), denominadas vesículas de matriz (MVs), que se ligam às fibrilas de COL.⁷⁸ As MVs são secretadas a partir de microvilosidade de membranas de células maduras competentes para mineralização.^{49,79-81} Acredita-se que as MVs desempenhem um papel fundamental na mineralização da cartilagem, do osso, bem como de outros tecidos durante os processos fisiológicos e patológicos.⁸¹ Embora esse processo não tenha sido totalmente elucidado, há evidências microscópicas e espectroscópicas de que a biomineralização conduzida por MVs envolve o acúmulo de fosfato inorgânico e íons Ca^{2+} no lúmen das vesículas por meio da ação de um maquinário enzimático altamente orquestrado, resultando na formação de complexos de CaP, incluindo fosfato de octacálcio e apatitas.^{33,58,82,83} Posteriormente, as MVs se ligam ao COL e liberam apatita, que se infiltra nas lacunas escalonadas e periódicas da matriz de COL, um processo denominado mineralização intrafibrilar.^{33,58} A fase mineral também se infiltra nas fibrilas, induzindo a mineralização interfibrilar. Existe consenso na literatura de que a maior parte da fase mineral no tecido ósseo pode ser encontrada na superfície das fibras de COL ou na zona de lacuna da fibrila de COL (intrafibrilar).^{33,49,53,84-86} A ocorrência de uma sequência de etapas de dissolução e recristalização seguida pela formação de intermediários menos estáveis da fase amorfa metaestável resulta na cristalização da apatita biológica, que dá origem aos blocos de construção do osso.^{33,49,54} A organização e a forma da placa das nanopartículas biológicas de apatita são controladas pela matriz fibrilar. As nanopartículas são depositadas orientadas em paralelo às fibrilas de COL nos interstícios da lacuna, resultando em uma integração homogênea entre as duas fases.⁴⁹⁻⁵⁴ Imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (TEM) evidenciou a ocorrência de um alto nível de alinhamento de minerais intra e extrafibrilares, indicando que esses minerais crescem fora das dimensões de uma única fibrila de COL e formam um padrão contínuo em nanoescala, que se traduz em uma rede interconectada composta por uma matriz de COL altamente mineralizada em microescala.⁵³ Apesar dos avanços recentes, os mecanismos moleculares exatos que conduzem a mineralização do COL no osso ainda não são totalmente compreendidos. O papel significativo do COL na regulação da estrutura da matriz óssea a partir do nível nanoestruturado tem sido explorado por muitos grupos de pesquisa para fabricar enxertos ósseos híbridos, bem como para entender como as células mineralizantes geram e interagem com a ECM durante a formação dos ossos, o que é uma

grande lacuna na biologia óssea.^{11,49,51,55} Portanto, modelos ósseos 3D que se assemelham mais ao osso fisiológico humano beneficiariam a pesquisa sobre a relação estrutura-função do osso.⁵³

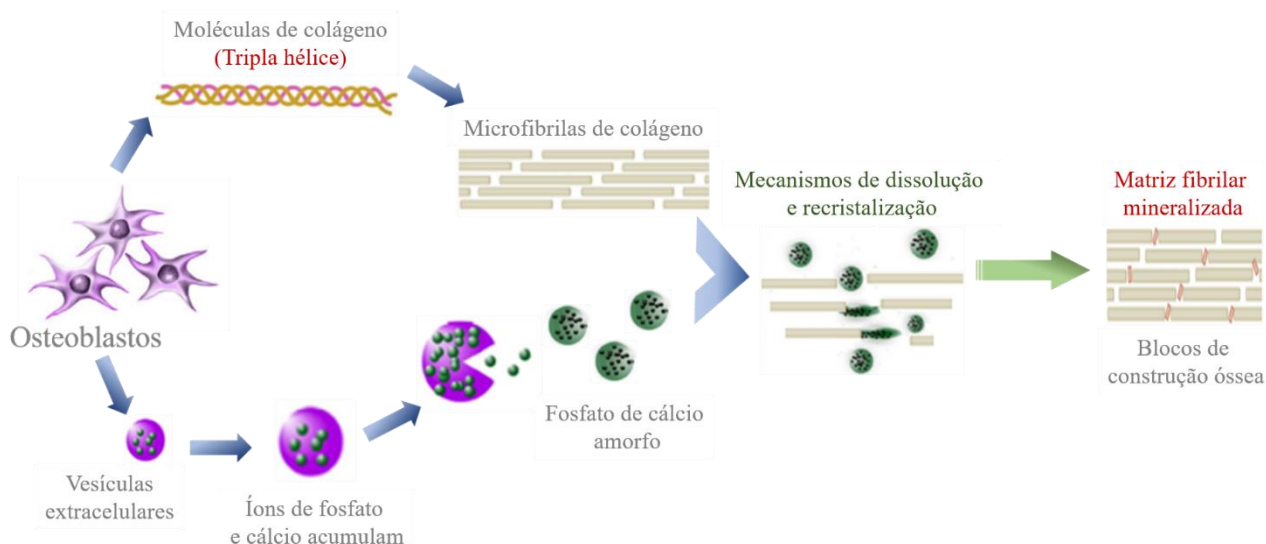


Figura 4. Mineralização do colágeno por vesículas extracelulares. MVs são secretadas pelas microvilosidades de células maduras competentes para mineralização, como osteoblastos e condrócitos. A biomineralização conduzida por MVs começa com o acúmulo de fosfato inorgânico e íons Ca^{2+} no lúmen das vesículas por meio da ação de um maquinário enzimático altamente orquestrado, resultando na formação de núcleos amorfos de CaP. As MVs se ligam às fibrilas de COL e liberam essa fase mineral precursora que se infiltra nas lacunas escalonadas e periódicas da matriz de colágeno, um processo denominado mineralização intrafibrilar. A fase mineral também infiltra nas fibrilas, induzindo a mineralização interfibrilar. A ocorrência de uma sequência de etapas de dissolução e recristalização seguida pela formação de intermediários menos estáveis a partir desta fase amorfa metaestável resulta na cristalização da apatita biológica, que dá origem aos blocos de construção do osso. Adaptado de Lin et al.⁸⁷

1.3 Engenharia tecidual óssea: caminhando na direção de modelos biomiméticos

Os procedimentos de reparo ósseo com base na implantação de enxertos ósseos de fontes autólogas ou alógenas são relatados desde 1913.⁵⁰ Esses materiais naturais, além de preservar a estrutura do tecido nativo em relação ao hospedeiro, carregam células ósseas vivas em seu microambiente bioquímico natural.⁸⁸⁻⁹³ Esse aspecto potencializa o sucesso do implante, uma vez que as células do enxerto mantêm sua capacidade de produzir e reabsorver a ECM de forma controlada, o que favorece a integração final esperada entre o osso hospedeiro e o material implantado.^{49,58} Embora as abordagens usando materiais autólogos e alógenos possuam um certo grau de restauração funcional, elas têm limitações inerentes, como a necessidade de procedimentos cirúrgicos adicionais, morbidade do sítio doador, quantidade e dimensões limitadas do material coletado, risco de transmissão de

doenças e tecido imprevisível reabsorção, que pode desencadear rejeição do implante.^{49,58} Essas limitações estimularam a busca, o desenvolvimento e a produção de materiais sintéticos alternativos para o reparo e regeneração óssea. As vantagens desses materiais estão principalmente relacionadas à sua produção ilimitada e à possibilidade de controlar suas propriedades físicas, químicas, bioquímicas e biológicas.⁵⁰

Os primeiros materiais sintéticos foram feitos de materiais quimicamente inertes, como o titânio, para interagir minimamente com os tecidos ósseos circundantes e inibir reações tóxicas.^{50,94} No entanto, a inércia desses materiais também impede as reações bioquímicas necessárias para a integração adequada ao tecido do hospedeiro, o que pode levar à rejeição do enxerto e danos ao tecido.⁹⁴ Como resultado, o foco mudou para a produção de materiais bioativos capazes de estimular respostas biológicas específicas. Abordagens biomiméticas têm sido utilizadas a fim de manter as propriedades mecânicas dos metais aumentando simultaneamente sua bioatividade por meio de modificações de superfície.^{32,34,39,43,95-99} A adsorção adicional de COL1 a superfícies de titânio usando imobilização biomimética em filmes de Langmuir-Blodgett de fosfolipídios estimulou a precipitação de apatita e proliferação de osteoblastos em comparação com titânio puro.¹⁰⁰

Os materiais usados para regeneração óssea podem ser encontrados como um enxerto permanente ou um conector de tecido temporário. Em geral, esses materiais são compostos de polímeros como poli(ácido lático), poli(álcool vinílico), poli (metilmetacrilato) e poliuretano.^{50,94} A associação desses polímeros em formulações contendo alumina e hidroxiapatita resultou em membranas regenerativas disponíveis comercialmente (por exemplo, Bone Heal®).¹⁰¹ Os problemas relacionados à aplicabilidade desses materiais residem em sua fraca resistência mecânica após a implantação, principalmente durante a biodegradação. A fim de superar essas limitações, esforços têm sido feitos para desenvolver materiais inovadores com melhor desempenho na regeneração óssea, mimetizando a estrutura hierárquica da matriz natural de COL.¹⁰² Nesse contexto, em meados da década de 90, a bioengenharia óssea surgiu inspirada na estrutura do osso natural, buscando estratégias viáveis e funcionais para a produção de materiais biomiméticos.^{49,50,55,94}

Capítulo 2-

*Filmes de Langmuir como matrizes para estudos de biomineralização
e o recobrimento de superfícies metálicas*

Capítulo 2- Filmes de Langmuir como matrizes para estudos de biomineralização e o recobrimento de superfícies metálicas

2.1 Modificação biomimética e o papel das superfícies

O preparo de materiais nanoestruturados altamente ordenados, que ofereçam respostas específicas frente a um determinado estímulo é uma das aplicações da nanotecnologia. A habilidade de investigar substâncias em nível molecular desencadeou a busca por materiais com propriedades aprimoradas para uso em medicina. A aplicação destes materiais controlados molecularmente deu origem a um novo campo de estudo chamado nanobiotecnologia, que possui papel central nas áreas de diagnóstico de doenças, entrega controlada de drogas e materiais implantáveis¹⁰³.

A química (composição)^{104,105}, física (topografia e rugosidade)^{106,107}, e termodinâmica (molhabilidade e energia livre)¹⁰⁸ superficiais, tal como os efeitos toxicológicos¹⁰⁹ ditam as aplicações específicas desses materiais. A interconexão entre estas propriedades direcionam suas respostas frente a diferentes estímulos externos. Neste contexto, distintas modificações superficiais podem originar materiais com diferentes propriedades biológicas e funcionalidades para uma aplicação final específica, baseado, por exemplo, em melhora de solubilidade em meio fisiológico.^{110,111} No caso especial de materiais implantáveis, as propriedades superficiais tornam-se ainda mais importantes, uma vez que o sucesso da aplicação se baseia no contato interfacial implante-tecido hospedeiro. Nestes materiais o contato celular inicial nunca ocorre sobre uma superfície limpa, mas sim com uma superfície condicionada por moléculas de água, íons e proteínas, adsorvidas a partir do plasma sanguíneo. A interação com moléculas de água, adsorção de proteínas e adesão celular são os primeiros eventos que ocorrem na interface tecido-implante.¹¹² Esta superfície condicionada vai ditar o comportamento e adesão celular. Nesse segmento de pesquisa desenvolvido no Laboratório de Físico-Química de Superfícies e Colóides, superfícies bioativas, ou seja, que induzam a formação de HA em contato com meio fisiológico, são depositadas sobre titânio (metal mais utilizado em reparos ósseos) por meio da técnica de Langmuir-Blodgett (LB) utilizando-se lipídeos, esteróis e proteínas osteogênicas.

2.2. Relação entre propriedades de superfície e sucesso de implantes

A relação entre fenômenos interfaciais e a estrutura/organização de organismos vivos, especialmente células e proteínas, foram investigadas pelos primeiros químicos de colóides, no início do século XIX. A ciência dos colóides e o conceito de estado coloidal permitiu as primeiras apreciações dos conceitos de automontagem, relacionados com a minimização de energia interfacial. Reações

biologicamente importantes são frequentemente descritas ocorrendo no interior de soluções, por exemplo, a reação entre uma enzima e seu substrato. Porém, a maior parte dessas reações ocorre em interfaces. A osteointegração de um material utilizado como substitutos ou para reparos ósseos ocorre por meio da adesão, penetração e proliferação de células a partir do contato interfacial implante/tecido hospedeiro. Estímulos bioquímicos provenientes das superfícies são essenciais para o sucesso do processo. Desta forma, as superfícies desses materiais irão controlar as reações biológicas necessárias para implantação.

Atualmente, a área de tecnologia médica e biológica tem adotado conceitos de química de superfícies na confecção de materiais utilizados em implantes, diagnóstico e biosensores, baseadas nas superfícies encontradas na natureza. O uso de reações em superfícies é vantajoso devido à alta acessibilidade, relacionada às elevadas áreas superficiais comandadas pela topografia e tamanho de partícula. Além disso, a energia superficial pode ser controlada por meio da confecção de microambientes únicos que permitem ajustes de molhabilidade e orientação molecular. O papel importante da ciência de superfícies na confecção de biomateriais foi inicialmente evidenciado pela adsorção de proteínas na forma de monocamadas sobre superfícies sólidas³⁹. A manipulação da topografia e composição química em nano-escala por meio de funcionalizações permite controlar a aplicação final de um nanomaterial. Devido ao seu tamanho reduzido, estes materiais podem interagir com o meio fisiológico e permitem o desenvolvimento de sistemas que imitem a complexidade estrutural e função da ECM. Estas propriedades são utilizadas na engenharia de superfícies para obtenção de respostas biológicas específicas¹¹³. Por exemplo, quando Ti metálico é implantado em um organismo para reparo/substituição óssea, de fato o fluido corpóreo faz o primeiro contato com a fina camada de TiO₂ que se forma espontaneamente na superfície metal^{114,115}. Isto tem motivado a aplicação de nanopartículas de TiO₂ na regeneração do tecido ósseo¹¹⁶⁻¹¹⁹. Recentemente ZrO₂ também tem sido utilizado em implantes dentários devido à sua compatibilidade com tecidos duros que assemelha-se à compatibilidade do TiO₂^{120,121}. Entretanto, as interações entre nanomateriais e proteínas osteogênicas, assim como com células envolvidas na osteogênese não estão bem elucidadas e os efeitos do tamanho, forma, morfologia e química superficial sobre os processos celulares merecem especial atenção e avaliação.

2.3 Por que modificar a superfície de um implante?

Titânio e suas ligas são considerados os melhores materiais para reparo e substituição óssea¹²². O uso deste metal está relacionado com suas propriedades mecânicas, alta resistência à corrosão, biocompatibilidade aceitável e baixa reatividade superficial. Porém, esta última vantagem também pode

ser uma desvantagem quando pensamos nas reações biológicas necessárias para integração deste implante no organismo. O tecido vivo, em contato com o metal, pode estimular a formação de camada fina fibrosa, que promove a separação do metal e da matriz óssea, resultando em falha no processo de osteointegração e rejeição do implante, caso respostas específicas não sejam estimuladas. Observações clínicas indicam que a taxa de crescimento ósseo é maior no sentido tecido→implante deixando clara a necessidade de modificação superficial.¹¹² A criação de uma interface que mimetize o tecido ósseo hospedeiro em termos de composição e estrutura deve favorecer o processo de mineralização óssea e, por fim, a osteointegração.^{112,123}

Inicialmente, as modificações superficiais propunham apenas alterações topográficas¹²³ uma vez que o aumento da área superficial de um material por meio de mudanças de rugosidade em escala nanométrica deve resultar em melhores respostas biológicas frente às células osteoblásticas^{124,125} e melhora do contato mecânico tecido-implante.¹²⁶ Entretanto, a adição de compostos bioativos à superfícies aliada à rugosidade em nível manométrico, parece resultar em materiais com performance aprimorada para aplicações biomédicas.^{107,123} Quais são os parâmetros superficiais que podem ou devem ser aprimorados para obtenção de materiais implantáveis de maneira a se obter as melhores respostas frente ao tecido ósseo hospedeiro?

A modificação de superfícies metálicas para implantes visa a melhoria do contato com o tecido ósseo.¹²⁷ O sucesso na osteointegração de implantes ortopédicos relaciona-se com a formação rápida e eficiente de tecido ósseo sobre sua superfície.¹²⁸ Todos os eventos iniciais que ocorrem na interface osso-implante serão guiados pelas propriedades superficiais como topografia, molhabilidade, carga e composição.¹²⁹ A engenharia de superfícies visa à otimizar a ancoragem tecido-implante por meio da manipulação dessas propriedades. No caso de implantes de substituição óssea, a rugosidade governa a área do tecido ósseo que estará em íntimo contato com a superfície do implante.¹³⁰: elementos topográficos como vales, picos e ranhuras atuam como pontos de ancoragem celular e adsorção de proteínas.^{30,31,32} Para materiais com a mesma química superficial, a proliferação celular será guiada pela topografia.¹³⁴ Superfícies mais rugosas promovem maior adesão de osteoblastos^{135,136} e ditam o metabolismo dessas células, regulando a expressão gênica,¹²⁴ síntese de COL,^{137,138} e ativação de integrinas.¹³⁹ A manipulação da topografia em escala nano afeta positivamente o comportamento celular.¹³⁹ O processo de osteogênese inicia-se mais rapidamente em superfícies organizadas em nanoescala compara às superfícies lisas.^{136,140,141} Desta forma, fica claro que a manipulação da nanotopografia de um biomaterial pode estimular e controlar a adesão, migração, proliferação, diferenciação, expressão gênica e excreção de componentes da matriz.¹⁴² A obtenção de materiais nano-organizados consiste em uma estratégia de controle do processo de reconhecimento celular¹⁴³ e

pode afetar a interação entre moléculas de solvente e as superfícies, influenciando então na energia de superfície do material.¹⁴⁴

A molhabilidade e energia livre de superfície determinam como células e fluidos interagirão com a superfície.¹⁴⁵ Este parâmetro refere-se à habilidade de um fluido se espalhar em uma dada superfície e os trabalhos de adesão/coesão, relacionados ao equilíbrio de forças agindo na interface sólido-líquido sendo governado pela topografia e composição da superfície.¹⁴⁶ Na ciência de biomateriais a molhabilidade é avaliada por meio de medidas de ângulo de contato (θ) entre a gota de um líquido e a superfície.¹⁰⁸ Quando este líquido é a água, superfícies que levam ao espalhamento completo da gota ($\theta < 90^\circ$) são consideradas hidrofílicas. Se $\theta > 90^\circ$, a superfície é considerada hidrofóbica. No entanto, este limite clássico entre superfícies hidrofílicas e hidrofóbicas tem sido revisado devido à estruturação específica de moléculas de água na interface;^{147,148} Os valores de θ são matematicamente determinados pela equação de Young-Dupré,¹⁴⁹ $\cos(\theta) = (\gamma_{SG} - \gamma_{SL})/\gamma_{LG}$, em que γ é a tensão interfacial entre as fases sólida (S), líquida (L) e gasosa (G). Em particular, γ_{SG} é chamado de energia livre de superfície de um sólido. A energia livre de superfície total é o somatório da parcela relacionada a forças dispersivas (γ_{SG}^d) e polares (γ_{SG}^p).¹⁴⁹ Este parâmetro irá seletivamente determinar como a parte polar e apolar das proteínas de membrana interagirão com a superfície do biomaterial.

Para obter biomateriais com aplicações específicas, o tipo de proteínas e a forma que as proteínas adsorvem nestes é tão importante quanto a quantidade de proteínas adsorvidas. A bioatividade de um material é ditada principalmente pela substituição de proteínas inicialmente adsorvidas por proteínas que desempenham funções específicas e pela manutenção de sua conformação.¹⁵⁰ A camada de proteína inicialmente adsorvida no biomaterial determinará a forma com que as células se aderirão e espalharão em sua superfície e conseqüentemente a posterior maturação celular. Arima et al.¹⁵¹ mostraram que a albumina liga-se fortemente às superfícies hidrofóbicas bloqueando a troca por outras proteínas da matriz extracelular (PME) diminuindo as interações entre as células e o implante. Por outro lado, quando a albumina se liga por grupos hidrofílicos, ela pode facilmente ser substituída por outras PME, favorecendo os processos de adesão e migração celular.¹⁵¹ As células podem aderir-se de forma não-específica às superfícies dos biomateriais mediadas por interações iônicas e de van der Waals, ou então, especificamente mediadas por grupos específicos das proteínas adsorvidas¹⁵². Nos osteoblastos, os receptores integrinas reconhecem sequências de aminoácidos, tais como Arg-Gly-Asp (RGD) em proteínas como a FBN e vitronectina formando centros de adesão¹⁵³. A adesão celular mediada pelo reconhecimento de integrinas tem inspirado cientistas a modificarem superfícies metálicas por meio da imobilização de peptídeos contendo a sequência RGD.^{154,155} Todavia, modificações superficiais que adicionam outros tipos de coberturas

bioativas alterando não apenas a composição, mas também a topografia e conseqüentemente a energia de superfície, podem ser mais promissoras para estimular o processo de adesão celular. Kilpadi et al.¹⁵⁶ observaram que superfícies recobertas com HA podem adsorver maior quantidade de proteínas a partir da ECM, assim como integrinas e osteoblastos em comparação ao Ti puro, mostrando que a adição de compostos bioativos à superfícies metálicas pode ser uma alternativa para controlar a energia de superfície e o comportamento celular. Osteoblastos fetais humanos expressam níveis mais baixos de subunidades de integrinas $\alpha 5$ e $\beta 3$ sobre superfícies hidrofóbicas em comparação às células cultivadas em superfícies hidrofílicas.¹⁵⁷ Além disso, superfícies contendo grupos polares -COOH e -NH₂, apresentam elevada afinidade por integrinas, levando à adesão e proliferação de fibroblastos.¹⁵⁸ Utilizando culturas de macrófagos Hotchkiss et al.¹⁵⁹ observaram que materiais com elevada molhabilidade produzem um microambiente anti-inflamatório por meio da ativação de macrófagos e produção de citocinas mostrando que o controle da molhabilidade é crucial para aprimorar as respostas biológicas de um biomaterial.

2.4 Modificações bioinspiradas de superfícies

A utilização de minerais bioativos inspirados na estrutura do tecido ósseo tem sido uma das estratégias mais utilizadas na modificação de superfícies metálicas. A biomimética pode levar à formação estruturas com química e física pré-definidas em níveis nanométricos. Desta forma, uso de recobrimentos baseados em CaP é comum na ciência dos biomateriais afetando significativamente os processos de regeneração óssea.¹⁶⁰ As técnicas de plasma-spray¹⁶¹ e sputtering¹⁶² tem sido utilizadas na produção de recobrimentos comerciais baseados em apatitas. No entanto, tais métodos são complexos e requerem a utilização de temperaturas extremamente altas e equipamentos de custos elevados. Além disso, estes métodos clássicos possuem algumas limitações tais como controle da espessura, cristalinidades e adesão do recobrimento.

Inspirado no processo de crescimento de HA *in vivo*, meios fisiológicos têm sido utilizados para produzir recobrimentos baseados neste mineral. Esta metodologia permite a formação de recobrimentos de CaP contínuos com topografia controlada,¹⁶³ no entanto requer longos tempos de exposição.¹⁶⁴ O SBF (*simulated body fluid*) é uma das soluções fisiológicas mais utilizadas^{165,166} e consiste em uma solução supersaturada que simula o pH e composição iônica do fluido corpóreo humano e é um padrão para avaliar a bioatividade de materiais.¹⁶⁷ A utilização de soluções saturadas biomiméticas para crescer recobrimentos de CaP pode auxiliar na imobilização de substâncias multifuncionais tais como agentes terapeuticos e proteínas que podem modular respostas celulares específicas.^{168,169}

2.4.1 Uso de Filmes de Langmuir como modelos biomiméticos

As monocamadas de Langmuir são filmes, com espessura monomolecular, constituídos por moléculas anfifílicas insolúveis, orientadas na interface ar-líquido de uma subfase, geralmente aquosa, contida em um recipiente revestido de material inerte, chamado cuba de Langmuir (Figura 5).¹⁷⁰ A compressão mecânica desta interface resulta em distintos níveis de compactação. Diversos tipos de moléculas anfifílicas são capazes de formar monocamadas na interface ar-água, desde polímeros¹⁷¹, macromoléculas¹⁷² e proteínas^{173,174}, ácidos graxos^{175,176}, mas principalmente os fosfolipídeos, cujos grupos polares podem apresentar carga líquida negativa^{177,178} ou ainda neutra, devido à presença de grupos colina covalentemente ligados ao fosfato¹⁷⁹⁻¹⁸¹.

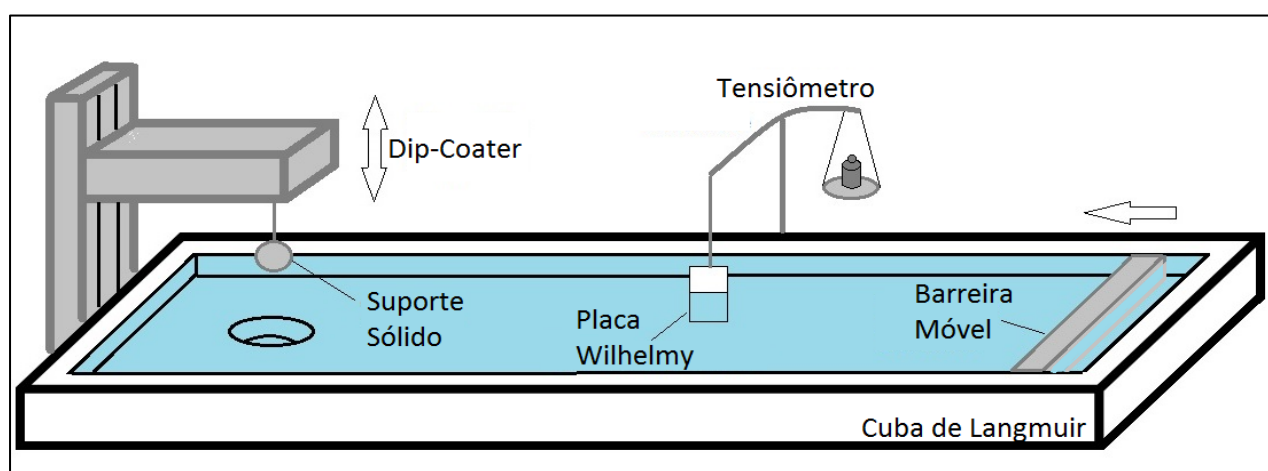


Figura 5. Esquema de uma cuba de Langmuir. Medidas de tensão superficial são realizadas por uma placa de Wilhelmy e um sistema *dip-coater* é acoplado para a confecção de filmes LB.

Experimentalmente, para obtenção das monocamadas, espalha-se na interface líquido-ar um volume devidamente conhecido de uma solução do lipídeo (geralmente em um solvente orgânico imiscível com a água e com alta pressão de vapor) seguido da posterior compressão mecânica da interface, após um intervalo de tempo suficiente para a evaporação do solvente utilizado na solubilização das moléculas anfifílicas. Durante a compressão, são realizadas medidas em tempo real de tensão superficial (γ), que sofre um decréscimo com a presença das moléculas de lipídeos na interface ar-líquido. Este decréscimo é acompanhado por meio do aumento da pressão de superfície (π) (**Equação 1**), que é definida como a diferença da tensão superficial da subfase pura (γ_0) com aquela na presença dos tensoativos (γ):

$$\pi = \gamma_0 - \gamma \quad (1)$$

A monocamada é caracterizada graficamente por meio de sua isoterma π -A, que relaciona os valores de π em função da área ocupada por molécula (na ordem de Å^2 por molécula de lipídeo) (Figura 6). De maneira geral, tais isotermas apresentam aumento progressivo de π (correspondendo a diminuição progressiva de γ) com a diminuição da área disponível por molécula, devido à substituição das forças intermoleculares presentes na interface ar-líquido entre as moléculas da subfase (geralmente do tipo ligação de hidrogênio, no caso de subfases aquosas) por interações tipo dipolo-dipolo e forças de London, com a introdução das moléculas de lipídeos.

Os estágios de compactação da monocamada são representados em analogia ao estado tridimensional da matéria: (I) fase gasosa para o estágio mais expandido da interface (pouca ou quase nenhuma interação entre os lipídeos); (II) fase líquido-expandido, a partir do qual há um início de orientação e interação entre as cadeias apolares; (III) fases condensadas (diminuição dos graus de liberdades internos das moléculas), com diferenças nas orientações das cadeias apolares em relação ao plano da interface (desde inclinados até totalmente verticais) (Figura 6A). As transições entre as diferentes fases são de 1ª ordem em regiões nas quais há coexistência entre elas, caracterizadas por valores constantes de π com diminuição da área ocupada por molécula. Para estágios de alta compressão é possível que a estrutura organizada da monocamada sofra colapso, caracterizado por uma descontinuidade/queda de π em função da diminuição de área. A partir das isotermas π -A obtém-se parâmetros físico-químicos, que são distintos para cada lipídeo (Figura 6B). O módulo compressional (C_S^{-1}) é obtido a partir da taxa de variação de π em função da área molecular normalizada para cada valor de área (Equação 2)¹⁸², indicando qual em qual estágio de compactação a monocamada encontra-se (Tabela 1)¹⁸³, além de indicar a rigidez/fluidez destas (diminuição e aumento no valor de C_S^{-1} indica monocamadas mais fluidas ou mais rígidas, respectivamente).

$$C_S^{-1} = -A \left(\frac{d\pi}{dA} \right)_T \quad (2)$$

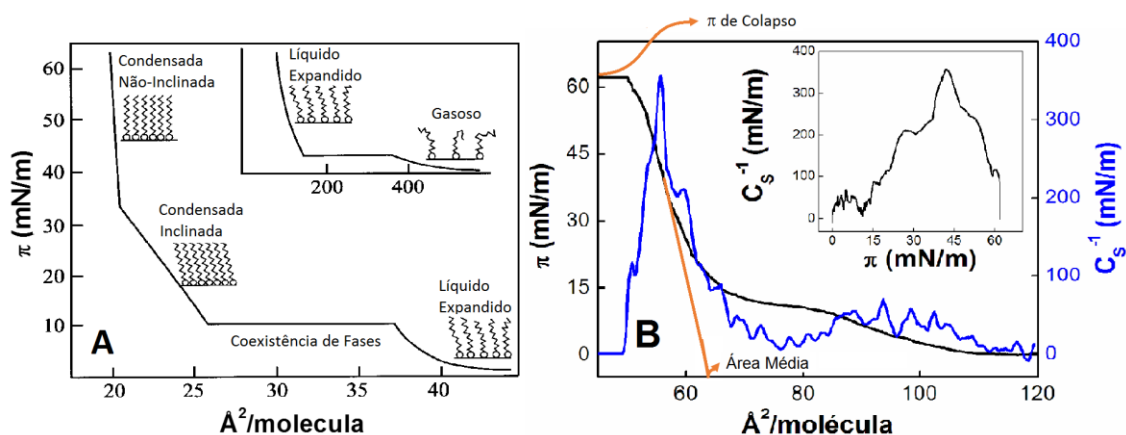


Figura 6. Dados obtidos a partir de monolayers formadas na Cuba de Langmuir. A) Esquema representando isoterma π -A de uma monocamada de Langmuir, destacando os diferentes estados e transições; B) Isotherma π -A e valores de C_S^{-1} para dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), destacando os parâmetros obtidos graficamente. Inserção: representação gráfica dos valores de C_S^{-1} em função de π .

Tabela 1. Valores de C_S^{-1} para os estados de uma monocamada

Estado da Monocamada	C_S^{-1} (mN m^{-1})
Superfície Limpa/gasoso	0
Líquido Expandido	12.5-50
Condensado Inclinado	100-250
Condensado Não-Inclinado	$1-2 \cdot 10^3$

A área média é a área molecular a partir da qual obtém-se fases condensadas para a monocamada. Este valor pode ser obtido graficamente a partir da tangente da região linear de π , a partir da qual a fase condensada é formada, até um valor nulo de π (Figura 6B), sendo um parâmetro de comparação entre diferentes lipídeos para verificar modificações na estrutura ou estágio de compressão de uma mesma monocamada quando exposta a diferentes condições.

Se um suporte é imerso na solução, passando pela interface, filmes de Langmuir-Blodgett (LB) podem ser formados pela deposição desta monocamada em fases condensadas (Figura 7). Diferentes tipos de filmes LB podem ser confeccionados, dependendo das etapas de imersão/emersão em cada transferência. Os filmes do tipo Y são os mais comumente encontrados, uma vez que apresentam um arranjo no qual os grupos de mesma afinidade estão em contato entre si (interações do tipo cabeça-cabeça e cauda-cauda), conferindo maior estabilidade ao filme formado. Filmes LB são conhecidos modelos de biomembranas utilizados para compreender e mimetizar eventos biológicos.¹⁸⁴ O controle

da imersão e emersão do suporte nas monocamadas forma filmes contendo o número desejado de camadas. Escolhendo-se de forma adequada as moléculas anfífilicas e a composição da subfase, filmes molecularmente ordenados, aptos a precipitarem HA podem ser formados. Íons Ca^{2+} podem interagir com a cabeça polar das moléculas dando origem a arranjos altamente organizados de íons Ca^{2+} para posterior crescimento de minerais.^{43,99,185,186} Filmes LB também têm sido utilizados como moldes para o crescimento de recobrimentos baseados em outros biominerais, como CaCO_3 , também amplamente empregado em implantes ósseos.^{42,187-189} A literatura mostra que este mineral é um material biocompatível e osteocondutor.^{187,190}

A modificação superficial de suportes de titânio com os filmes LB para posterior nucleação e crescimento de minerais de CaP é uma via alternativa para o aumento de bioatividade da superfície de Ti de próteses ósseas, potencialmente proporcionando melhor osteointegração destas no tecido hospedeiro.^{28,43,99} Para isso, os filmes LB são construídos a partir de subfases contendo íons Ca^{2+} e, escolhendo um lipídeo que contenha grupos com afinidade por estes íons (como grupos fosfato^{43,99} ou grupos carboxilato²⁸), promove-se a coadsorção desses íons no molde propiciado pelo filme LB. Na sequência é realizada uma exposição do suporte modificado a uma condição propícia para a nucleação e crescimento da fase mineral. Na pré-formação de carbonatos de cálcio, a exposição a uma atmosfera saturada de $\text{CO}_{2(g)}$ induz a precipitação de uma fase de CaCO_3 no filme;⁴³ para a pré-formação de uma CaP, realiza-se ciclos de imersão em tampão fosfato e/ou SBF, induzindo em uma supersaturação de íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} no filme LB.⁹⁹ Desta forma, novos materiais osteointegráveis que estimulem a formação óssea em tempos curtos podem ser confeccionados aliando-se técnicas de modificações de superfícies com a formação biomimética de biominerais e criação de interfaces que favoreçam controle de composição e topografia.¹⁶⁷

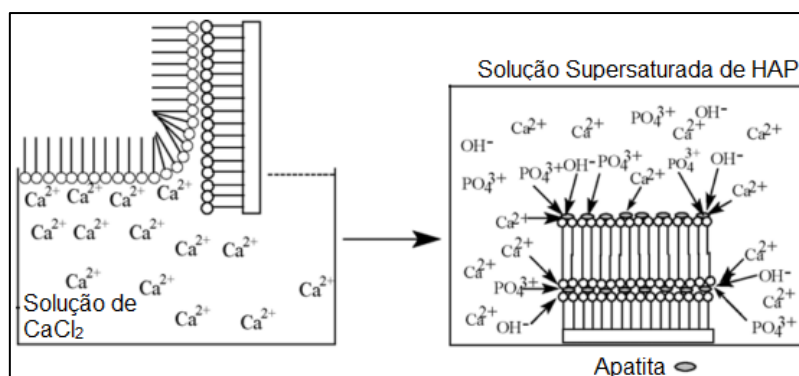


Figura 7. Esquema da formação de filmes LB. Deposição sobre um suporte sólido em subfase aquosa contendo CaCl_2 e a possibilidade de ligação de Ca^{2+} à cabeça polar dos lipídeos, seguida da imersão do filme LB em SBF (Modificado da referência²⁸).

Filmes LB também são úteis para estudo do efeito da organização lipídica na adsorção e atividade de enzimas de interesse, ainda podendo ser potencialmente aplicáveis como biomateriais. No trabalho de Piatteli et al.,¹⁹¹ TNAP foi imobilizada em superfícies de Ti por processo de adsorção simples. Os resultados obtidos mostram que as amostras preparadas em presença da enzima estimularam o crescimento ósseo em torno da superfície metálica de maneira mais eficiente do que o controle na ausência da enzima. A revisão publicada por Puleo et al.¹¹² explicita a importância do processo de ligação utilizado para imobilização superficial de enzimas na indução de respostas celulares específicas. Ainda, o uso de substâncias que estimulem a formação óssea é de grande valia na área de implantes de substituição óssea, pois diminui o tempo de recuperação, o índice de rejeição e desconforto dos pacientes. Uma vez conhecido que a atividade fosfohidrolítica da TNAP, essencial na formação de HA na ECM, é mantida após sua imobilização em filmes LB depositados sobre Ti, esse conjunto pode induzir formação de mineral através da supersaturação de íons fosfato e Ca^{2+} , de maneira biomimética ao ambiente encontrado em tecidos mineralizados.

2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os trabalhos relacionados à deposição de filmes finos molecularmente ordenados, contendo lipídeos e CaP fizeram parte do primeiro projeto aprovado para desenvolvimento durante o período de estágio probatório, também submetidos às agências de fomento FAPESP e CNPq. Até este ponto, todos os estudos de biomineralização realizados durante meu doutoramento visaram analisar a importância da matriz orgânica no relacionamento do crescimento de filmes de CaCO_3 .

No primeiro trabalho (anexo II.1) recobrimentos de HA carbonatada foram depositados de forma homogênea, contínua e nanoestruturada sobre superfícies de Ti utilizando filmes LB de dihexadecilfosfato (DHP) como molde. Este estudo já visava potencial aplicação destas superfícies recobertas como implantes de substituição óssea. A composição química e estrutura cristalina do mineral formado se assemelhou à dos ossos, conforme mostraram os resultados de FTIR e DRX. Além disso, os recobrimentos híbridos apresentaram elevada rugosidade e molhabilidade além de induzirem a proliferação de osteoblastos. A comparação do efeito da rugosidade em superfícies de Ti jateadas e contendo as obtidas com o recobrimento de HA mostrou efeito sinérgico sobre a viabilidade de osteoblastos: a viabilidade foi aumentada em superfícies rugosas, com efeito adicional da composição biomimética. Esse efeito foi correlacionado também com aumento da energia de superfície, que em conjunto com o biomineral, criaram ambiente propício para proliferação celular. Os dados publicados neste estudo embasaram a patente registrada no INPI.

Aa técnica LB permite a imobilização de diferentes moléculas como fármacos e proteínas na matriz orgânica, sendo uma alternativa para a formação de recobrimentos híbridos multifuncionais. No artigo constante no anexo II.2, caminhamos em direção à melhora dos modelos biomiméticos por meio da imobilização de COL1 em filmes LB de DPPC. Fosfatidilcolina é o grupo carregado mais abundante em fosfolipídeos da membrana celular de mamíferos. Estes recobrimentos foram utilizados para a formação de recobrimentos híbridos de HA sobre superfícies de Ti, focando na dependência estrutura-composição. O mineral formado em presença de COL se assemelhou mais em estrutura e composição ao osso, quando comparado com o mineral obtido apenas com DPPC. Este resultado corroborou a literatura sobre a necessidade do direcionamento do molde COL para obtenção de apatita biológica, como ocorre *in vivo*. Estes filmes também promoveram aumento da viabilidade de osteoblastos, quando comparados às superfícies de Ti limpas.

Ainda com intuito de se comparar o relação estrutura-composição e o seu efeito sobre a função de osteoblastos, o anexo II.3 traz artigo no qual estão publicados os resultados de recobrimentos de HA obtidos sobre filmes LB compostos por octadecilfosfato (OPA) e DHP. Enquanto OPA possui área média ocupada por molécula de 22 \AA^2 , o valor obtido para DHP foi 45 \AA^2 . Na prática, estes valores influenciaram a densidade superficial de íons Ca^{2+} e posterior estrutura do mineral depositado. Este estudo consistiu ainda em avanço para os estudos com osteoblastos, por meio da adição de ensaios de mineralização e atividade de fosfatase alcalina, não-realizados nos estudos anteriores. De maneira surpreendente, os filmes depositados sobre OPA que levaram à maior viabilidade celular, não estimularam mineralização dos osteoblastos. Ou seja, nem sempre o ambiente mais viável é o melhor indutor de formação de matriz mineralizada por osteoblastos funcionais. Esta inibição da atividade osteoblástica foi relacionada à diminuição da atividade de TNAP na presença de maior densidade superficial de Ca^{2+} . O efeito inibitório de altas concentrações deste íon sobre TNAP já tinha sido anteriormente reportado.¹⁹²

Indo adiante nos modelos biomiméticos, TNAP foi imobilizada em filmes de ácido dimiristoilfosfatídico (DMPA), depositados sobre Ti. O artigo constante no anexo II.4 mostra que a atividade da enzima foi mantida nos filmes LB. Nestas condições, TNAP foi capaz de hidrolisar ATP, gerando fosfato, que em contato com Ca^{2+} ligado no fosfolipídeo resultou na formação de apatita sobre o metal. Este modelo recria o microambiente encontrado *in vivo*, na membrana externa de MVs. Este estudo abriu portas para uso de monocamadas de Langmuir na reconstrução do ambiente natural encontrado pela TNAP nas MVs. Desta forma, no artigo constante no anexo II.5 foram investigados os efeitos da composição lipídica sobre a atividade dessa enzima. Foram utilizadas monocamadas contendo colesterol, lipídeo presente em concentração maior em MVs, quando comparado com a

membrana celular. A atividade da enzima foi aumentada nas monocamadas contendo o esterol, corroborando sua melhor inserção e orientação em domínios lipídicos com composições específicas.

Os estudos utilizando filmes LB como modelos biomiméticos não se restringiram à formação de CaPs. Nosso grupo reportou o crescimento de filmes finos formados por partículas de CaCO_3 sobre superfícies de Ti utilizando filmes LB de DHP como molde, conforme mostram os resultados publicados no anexo II.6. Estes recobrimentos híbridos são altamente bioativos como observado pelo aumento da proliferação de osteoblastos e curtos tempos necessários para o crescimento de HA após a exposição ao SBF por apenas 36 horas. O crescimento de CaCO_3 em filmes LB contendo tensoativos catiônicos também foi reportado (anexo II.7). A capacidade de Ca^{2+} se ligar às cabeças polares positivamente carregadas de brometo de dioctadecilamônio (DODAB) foi investigada por experimentos na Cuba de Langmuir e química computacional, que mostraram que os contra-íons poderiam agir como pontes carregando Ca^{2+} para as interfaces, durante a transferência do filme LB. Outras matrizes, como filmes LbL de quitosana e poli(ácido acrílico) foram utilizadas como matrizes para crescer CaCO_3 sobre Ti (anexo II.8). Neste estudo, análises de potencial-zeta de superfícies sólidas mostram a inversão de cargas durante a deposição dos polycations e poliânion. Os recobrimentos foram bioativos e estimularam a formação de HA após 48 h de imersão em SBF.

Caminhando no sentido de aprimoramento do modelo biomimético, utilizamos lipídeos extraídos de MVs nativas, isoladas a partir da placa de crescimento ósseo em embriões de galinha, para confecção de monocamadas de Langmuir e posterior mineralização (anexo II.9). Os resultados de mineralização e a estrutura dos minerais formados se comparam aos encontrados em monocamadas contendo DPPC e dipalmitoilfosfatidilserina (DPPS). Na ausência de DPPS, mineralização pobre foi observada. Este estudo suportou a importância do DPPS na biomineralização promovida por MVs.

A confecção de recobrimentos bioativos a partir de filmes de Langmuir, contendo moléculas ou íons com efeitos específicos sobre a formação de tecido mineralizado, foi expandida com a adição de minerais e complexos contendo Sr^{2+} sobre as superfícies. Os efeitos deste íon sobre a atividade de osteoblastos e osteoclastos serão discutidos no capítulo desta tese e é um ponto de intersecção importante entre os estudos de recobrimentos bioativos e a formação de nanopartículas minerais potencialmente aplicáveis como regeneradores/reparadores ósseos. Inicialmente, filmes contendo $\text{CaCO}_3/\text{SrCO}_3$ foram depositados sobre Ti (anexo II.10). Neste estudo mostramos que os filmes LB foram capazes de liberar de maneira controlada íons Sr^{2+} ao meio extracelular. A liberação destes íons em presença de Ca^{2+} estimulou a proliferação de osteoblastos e o aumento da atividade de TNAP. Na sequência, sintetizamos um complexo flavonoide contendo Sr^{2+} , com estrutura similar ao fármaco ranelato de estrôncio, utilizado para o tratamento de osteoporose. A complexação ocorreu tanto na interface líquido/ar mediada por monocamadas de Langmuir (anexo II.11), como em solução (anexo

II.12). Estes estudos foram reveladores e importantes no avanço do entendimento dos efeitos de Sr^{2+} sobre os osteoblastos. Além de aumento de atividade de TNAP, esses íons aumentam a expressão desta enzima nos osteoblastos, o que resultou em aumento da formação de matriz mineralizada (anexo II.XI), conforme revelaram os primeiros estudos de PCR em tempo real realizados em colaboração com a Prof. Sandra Fukada (Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-FCFRP/USP).

Na vertente estudos de interação lipídicos e proteínas importantes na osteogênese, utilizando-se modelos de membrana, desenvolvemos metodologia para medidas simultânea de atividade enzimática e atividade superficial por meio de um espectrofotômetro portátil UV-Vis acoplado a um tensiômetro automático pelo método da gota pendente (anexo II.13). Estes estudos em monocamadas de Langmuir contendo DPPC e TNAP mostraram a importância do empacotamento na enzima, guiado por valores de pressão de superfície, na atividade enzimática acompanhada por meio da absorção em 540 nm, como resultado da hidrólise do substrato para-nitrofenilfosfato. Além das análises simultâneas, sem necessidade de se retirar a enzima do ambiente organizado da monocamada, os volumes na ordem de dezenas de microlitros viabilizam estudos mesmo com pequenas quantidades de enzima.

2.6 Conclusões e Perspectivas

Juntos, os projetos relacionados aos estudos de interação lipídicos-proteínas e composição de monocamadas na formação de apatitas mostram ser possível simular o microambiente compartimentalizado responsável pelo início da biomineralização óssea *in vivo*. Monocamadas simples contendo um único componente fosfolipídico, até monocamadas complexas contendo lipídicos nativos de MVs revelaram a utilidade dos parâmetros físico-químicos obtidos por intermédio de filmes de Langmuir para contribuir com elucidação mecanística da formação mineral. Além dos estudos básicos, estes filmes constituem um sistema importante para confecção de recobrimentos bioativos. Caminhando para as aplicações biotecnológicas, em colaboração com colegas da Faculdade de Odontologia da UNESP-Araçatuba, os primeiros testes em animais estão sendo realizados. Parafusos de Ti recobertos com os filmes LB contendo HA e Sr^{2+} foram implantados em ratos osteoporóticos. Os primeiros resultados (artigo em redação) mostram efeito positivo na formação óssea nas superfícies recobertas, o que nos abre portas na continuidade desses estudos. Com experiência comprovada na formação de recobrimentos bioativos, daremos andamento com esta nova vertente progredindo ainda mais na compreensão e aplicação de superfícies modificadas com lipídicos e proteínas, que estimulem a adesão e proliferação de osteoblastos, favorecendo o processo de biomineralização de forma mimética ao processo natural *in vivo*.

Capítulo 3-

Nanopartículas obtidas a partir de modelos bioinspirados

Capítulo 3- Nanopartículas obtidas a partir de modelos bioinspirados

3.1 Nanopartículas obtidas a partir de modelos bioinspirados: o papel do Sr²⁺

O processo pelo qual biominerais com características únicas são formados pode servir de inspiração natural para a confecção de biomateriais biomiméticos aptos a serem aplicados *in vivo*. Conforme revisão apresentada no Capítulo 1 desta tese, um exemplo clássico do processo de biomineralização é a formação de ossos e dentes em vertebrados. Os ossos são compostos híbridos compostos, principalmente, por HA não-estequiométrica, chamada apatita biológica, e COL1. O processo complexo de formação deste tecido tem sido descrito na literatura sob o ponto de vista biológico considerando o mecanismo enzimático envolvido na formação de MVs a partir de células competentes para mineralização^{80,193-195} e sob o ponto de vista inorgânico que considera o meio fisiológico supersaturado, principalmente em íons cálcio e fosfato. A precipitação de HA seria então iniciada em pontos de nucleação a partir de membranas celulares e macromoléculas não-colágenas, com crescimento guiado por fibrilas de COL¹⁹⁶⁻¹⁹⁸. O ponto comum desses modelos é a necessidade de um meio confinado tridimensional que favoreça nucleação de cristais por supersaturação local guiada por uma matriz orgânica. Este processo complexo está ainda longe de ser completamente elucidado e, além de seu interesse no processo biológico para tratamentos de patologias, fornece informações importantes para a fabricação de novos materiais visando aplicações no reparo e substituição óssea^{199,200} que servem como inspiração aos cientistas de materiais.

Apatita biológica possui baixa cristalinidade e difere da HA sintética também em estequiometria, em especial, devido às possíveis substituições iônicas observadas em meio fisiológico. Wang et al. mostraram que além do efeito do meio confinado gerado pelo ordenamento do COL, características estruturais da apatita biológicas também estão relacionadas com essas substituições.²⁰¹ Dentre as principais substituições temos íons fosfato sendo substituídos por carbonatos (substituição tipo B). Este tipo de substituição está relacionada com propriedades como alta reatividade de ossos recém-formados, aumento na deposição sobre COL a alta reabsorção quando comparada com HA estequiométrica ou substituições tipo-A (nos grupos OH).^{44,202} Substituições catiônicas também são observadas na apatita biológica. Íons Mg²⁺, Zn²⁺ e Sr²⁺ são os principais substitutos de Ca²⁺ nesse biomineral. As características químicas e estruturais da apatita biológica a tornam padrão ouro em regeneração óssea e inspiração para a síntese de biomateriais. Neste ponto, focaremos na síntese bioinspirada de apatitas biomiméticas com foco na importância das substituições por Sr²⁺ e seu papel na confecção de novos biomateriais.

A principal fonte de Sr^{2+} em organismos vivos é a alimentação oral. Uma dieta normal contém 2-4 mg de Sr^{2+} /dia, provenientes principalmente de vegetais e cereais.²⁰³ Como consequência da similaridade de seu raio iônico com Ca^{2+} , este íon, elemento traço no corpo humano, acumula-se principalmente nos ossos. Mais especialmente, Sr^{2+} é encontrado em ossos jovens, o que estimula o estudo da influência deste íon no processo de formação óssea, e, por consequência, sua aplicação em materiais osteocondutores.²⁰⁴ Estudos *in vitro*^{205,206} e *in vivo*^{207,208} evidenciam o papel do Sr^{2+} no aumento da atividade de osteoblastos, principais células formadoras de ossos e redução na atividade de osteoclastos, principais responsáveis pela reabsorção óssea. Mais ainda, a administração deste íon na forma de ranelato de estrôncio, resultou em aumento na densidade óssea e resistência mecânica em pacientes osteoporóticos.^{207,209} Entretanto, o mecanismo que leva aos diferentes estímulos celulares e às alterações nas propriedades do tecido ósseo ainda são pouco exploradas.²⁰⁷ Li *et al.* mostraram por meio de estudos *in vitro* que incorporação de até 1,5 mol% de Sr^{2+} com relação a Ca^{2+} não alterou a cristalinidade de HA sintética, enquanto a adição de 15 mol% causou redução drástica no tamanho de cristalito e cristalinidade do mineral.²¹⁰ Estudo recente de nosso grupo iniciou a investigação da incorporação de Sr^{2+} em apatita biomimeticamente precipitada, mostrando que esse íon está envolvido na formação de estruturas de fosfatos amorfos²¹¹. Desta forma, explorar os efeitos da incorporação de Sr^{2+} em apatitas e os mecanismos pelos quais estes íons estimulam células importantes para formação mineral consiste em um avanço importante na confecção de novos biomateriais voltados a regeneração/reparo de tecidos mineralizados.

3.2 Sr^{2+} e sua versatilidade de aplicações em biomineralização

3.2.1 Sr^{2+} e seu papel no tratamento da hipersensibilidade dentária

Com o envelhecimento da população e aumento da expectativa de vida, associado às mudanças de hábitos alimentares, técnica incorreta de escovação, utilização de dentifrícios abrasivos, desordens oclusais, dentre outros fatores, contribuem para as perdas de estrutura dental^{212,213}. Sabe-se que a dentina humana possui em sua composição aproximadamente 70% de HA, 20% de proteínas e 10% de água, apresentando resistências menor em comparação ao esmalte dentário. Estas estruturas quando perdidas podem dar origem a hipersensibilidade dentária, caracterizada por um episódio de dor de caráter agudo, localizado e de curta duração, associado a regiões com exposição de tecido dentário ao meio bucal, podendo ser desencadeado por estímulos osmóticos, térmicos, químicos, evaporativos ou táteis, e que não pode ser caracterizada como nenhuma outra alteração ou doença dentária^{212,214-217}. O estímulo provocado pode variar entre um pequeno desconforto até dor extrema. Neste caso, o

desconforto pode interferir nos hábitos de alimentação e higiene oral do paciente.²¹⁸ Uma explicação para a ocorrência da hipersensibilidade dentária baseia-se na Teoria Hidrodinâmica apresentada por Brännström na década de 1960. De acordo com a teoria, quando um estímulo é aplicado na dentina, ocorre o deslocamento de fluido dentro dos túbulos. O movimento do fluido em direção à polpa ou em sentido contrário, promove deformação mecânica das fibras nervosas que se encontram no interior dos túbulos ou na interface polpa/dentina, que é transmitida como uma sensação dolorosa^{216,217,219–223}.

Dentre os tratamentos para a hipersensibilidade dentária, podemos citar: aplicação de laser de alta ou baixa intensidade²²⁴, verniz fluoretado²²⁵, oxalato^{225,226}, restaurações com resina composta e cimento de ionômero de vidro²²⁵, além de cirurgias periodontais.²²⁷ Contudo, o uso de dentifrícios dessensibilizantes é a primeira escolha para a maioria dos pacientes.^{223–225,228} Vale ressaltar que esses são dependentes da dose, exigindo aplicações de rotina.²²⁹ Os cremes dentais são os veículos mais comuns para agentes dessensibilizantes. São amplamente indicados, particularmente devido ao seu baixo custo, facilidade de uso e aplicação caseira.²³⁰ Eles apresentam formulações complexas, com vários ingredientes, entre eles agentes dessensibilizantes, como o acetato de estrôncio, nitrato de potássio, fluoreto de sódio, monofluorofosfato e fluoreto estânico. Além disso, vários cremes dentais contêm abrasivos (carbonato de cálcio, alumínio, fosfato de cálcio, silicato, etc.), que também podem causar a obliteração dos túbulos por ação abrasiva ou indiretamente pela formação de uma camada superficial durante a escovação.^{215,216,230–232} Os abrasivos presentes nos dentifrícios são ótimos aliados no polimento dental e controle de manchas extrínsecas,²³³ no entanto, seus efeitos nocivos podem aumentar o desgaste da superfície dos dentes.²³⁴ Embora a escovação dentária pareça causar desgaste mínimo ao esmalte, há preocupações sobre o risco de desgaste da dentina radicular, principalmente em casos de pacientes com recessão gengiva,^{233,235} e que fazem a higienização oral incorreta, com o uso de escovas de cerdas duras e aplicação de forte pressão durante a escovação²³⁶.

Compostos à base de Sr^{2+} são incorporados como ingrediente ativo em dentifrícios comerciais utilizados para o tratamento da hipersensibilidade dentária desde os anos 1960.^{229,237} Inicialmente utilizados na forma de cloreto de estrôncio (SrCl_2), não evidenciaram diferenças significativas no tratamento de hipersensibilidade dentária quando comparados com fluoretos convencionais.²³⁸ Dentre os agentes terapêuticos dessensibilizantes indicados para o tratamento da hipersensibilidade dentária, podemos citar a arginina 8% associada ao carbonato de cálcio (tecnologia Pró-Argin™ presente no dentifrício Colgate® Sensitive Pró-Alívio), e o acetato de estrôncio (presente no dentifrício Sensodyne® Rápido Alívio), que interagem com a dentina e promovem a obliteração e a remineralização dos túbulos expostos ao meio.^{215,216,239} O mecanismo de ação desses compostos difere. Na associação de arginina com carbonato de cálcio ocorre a formação de um material positivamente carregado que interage favoravelmente com a superfície negativamente carregada da dentina, o que

pode levar à obliteração de túbulos e remineralização a partir da disponibilidade de íons Ca^{2+} gerados a partir do equilíbrio de dissolução superficial do carbonato. Ainda, as partículas de carbonato podem agir como abrasivos. O uso de acetato de estrôncio se justifica pela maior solubilidade do sal, quando comparado ao carbonato, que disponibiliza íons Sr^{2+} agentes de obliteração e remineralização por meio da deposição de HA substituída por Sr^{2+} (Sr-HA) na superfície dos dentes. Porém, a alta solubilidade de sais contendo Sr^{2+} deve ser a responsável pelos controversos resultados mostrados na literatura sobre o potencial terapêutico desses íons em odontologia⁵¹. Como forma de aumentar seu potencial de ação, as formulações contendo este material são, geralmente, associadas ao um abrasivo, como sílica (SiO_2). Desta forma, um dos materiais potencialmente aplicável como agente de obliteração de remineralização são os carbonatos de cálcio substituídos por estrôncio ($\text{Ca}_{1-x}\text{Sr}_x\text{CO}_3$). Estes materiais podem ser preparados na forma de partículas esféricas ou nanotubos, que favorecem a precipitação de HA, como descrito nos trabalhos recentes de nosso grupo.^{39,240} Carbonato de estrôncio ainda não é encontrado na formulação de dentifrícios, no entanto é muito estudado e utilizado na forma de biomateriais devido à capacidade de reparação óssea, minimizando os riscos de fraturas, principalmente em casos de osteoporose, e utilizados também como aceleradores da osseointegração de implantes.^{241–248}

O efeito de Sr^{2+} na obliteração de túbulos dentários e remineralização da dentina é descrito na literatura de duas formas: 1) formação de uma camada contínua compacta na superfície e dentro dos túbulos devido à substituição de Ca^{2+} por Sr^{2+} no tecido dentário e formação de Sr-HA^{215,228,229,232,249,250} e 2) precipitação de matriz orgânica e desnaturação odontoblástica, formando uma película de vedação que impede a circulação de líquidos no interior dos túbulos dentários.^{228,230,232} Estudos *in vivo* e de radiodensidade *in vitro* após imersão de discos de dentina em solução aquosa contendo 25% de cloreto de estrôncio foram úteis para mostrar o efeito dessensibilizante de íons Sr^{2+} em pacientes com hipersensibilidade. Os autores relataram um significativo aumento da radiodensidade após imersão de dentina condicionada em solução de aquosa contendo 25% em massa de cloreto de estrôncio, durante 24h. O aumento encontrado ocorreu devido à formação e deposição de apatita contendo Sr^{2+} , e os efeitos positivos sob a hipersensibilidade foram semelhantes ao de outros compostos a base de zinco e estanho, que também são utilizados neste tipo de tratamento.

Além dos compostos minerais, componentes orgânicos contendo cerca de 90% em massa de COL, predominantemente do COL1, fazem parte da composição dental. O mecanismo celular que leva à síntese de COL1 é essencialmente o mesmo em fibroblastos, odontoblastos e osteoblastos. A superfície da dentina é negativamente carregada e COL1 positivamente carregado em pH fisiológico, o que indica alta afinidade das duas superfícies por carga. Desta forma, utilizar COL1 como carreador de íons e/ou partículas de HA (também negativamente carregadas) ao interior dos túbulos dentários

constitui uma estratégia bioinspirada que será desenvolvida no presente projeto. O uso de COL poderá ainda aumentar a afinidade partículas/superfície promovendo maior resistência da aplicação frente à desafio ácido. Assim, sob o ponto de vista de inovação, para além da simples aplicação e uso de Sr^{2+} na forma de acetatos, que são altamente solúveis, já descrita na literatura, os biomateriais aplicáveis em odontologia aqui descritos visam: a) uso de nanopartículas de apatitas biomiméticas contendo Sr^{2+} associado a carbonatos/fosfatos mistos que devem aliar as propriedades abrasivas dos carbonatos às propriedades remineralizadoras de Sr^{2+} e apatitas; b) adição de COL1 à superfície dessas partículas melhorando o modelo biomimético e aumentando o contato com a superfície dentinária e promovendo maior resistência dos recobrimentos à ataque ácido.

3.3 Complexo Flavonóide- Sr^{2+} e seu potencial osteogênico: explorando os mecanismos

O fármaco ranelato de estrôncio é uma das opções mais aceitas clinicamente para o tratamento de osteoporose, seguido por aledronato e por terapias hormonais que fazem uso de paratormônio^{205,251}. Seu efeito parece estar relacionado à função ativadora de osteoblastos, principais células responsáveis pela síntese de HAp *in vivo*, e inibição da diferenciação e atividade de osteoclastos, células responsáveis pela reabsorção óssea.^{203,205,207,209,252,253} Entretanto, em 2017 o uso deste fármaco foi descontinuado na maior parte do mundo devido à efeitos colaterais como diarreia, náusea, formação de coágulos de sangue, perda de memória, dentre outros. Mais grave ainda são relatos de possíveis danos cardíacos causados pelo medicamento, apesar da não diferenciação estatística quando comparado aos pacientes que desenvolveram problemas cardíacos durante administração de outros fármacos para tratamento de osteoporose, como aledronato/risedronato^{254,255}. Desta forma, o desenvolvimento de novas plataformas aptas a entrega controlada de Sr^{2+} como terapias alternativas ao tratamento de osteoporose é emergente. Novos compostos como folato de e sais biliares de estrôncio são reportados na literatura.^{256,257} Recentemente, nosso grupo reportou a síntese de um complexo flavonóide- Sr^{2+} , que apresentou capacidade regulatória frente às atividades de osteoblastos e osteoclastos.²⁵⁸ Flavonóides podem ser naturalmente encontrados em alimentos e extratos de plantas e já são muito explorados na literatura científica devido às suas propriedades antioxidantes atribuídas à desativação de radicais livres. São ainda bons ligantes para íons metálicos como alumínio e cálcio.²⁵⁹⁻²⁶¹ Essas moléculas são investigadas também devido ao seu papel no metabolismo ósseo.^{262,263} O consumo de chá-verde, rico em compostos fenólicos, é utilizado como terapia alternativa ao tratamento de osteoporose nas sociedades orientais.²⁶⁴ Welch e colaboradores mostraram que o consumo diário de flavonóides por mulheres está associado ao aumento de densidade óssea.²⁶⁵ Além disso, resultados positivos no tratamento de osteoporose foram recentemente associados ao consumo de flavonóides.²⁶⁶⁻

²⁶⁸ Quercetina também foi aplicada na redução de inflamação após a inserção de implantes metálicos in vivo ²⁶⁹. O complexo flavonóide-Sr²⁺ sintetizado por nosso grupo mostrou efeito sinérgico entre as propriedades osteogênicas já descritas para os íons Sr²⁺, associado ao benefício do consumo de flavonóides²⁵⁸. Os efeitos osteogênicos do complexo morina-Sr²⁺ descritos por nosso grupo foram associados ao aumento da expressão gênica da enzima fosfatase alcalina, responsável pela síntese de fosfato inorgânico in vivo. Porém, o processo regulatório de osteoblastos e osteoclastos por íons Sr²⁺ esta longe de ser elucidado.

Efeitos positivos do uso de ranelato de estrôncio também foram obtidos no tratamento de osteoartrite, doença caracterizada por degeneração de cartilagem e outras estruturas de junção, incluindo osso subcondral. Esta doença atinge até 40% de pessoas com mais de 65 anos, em especial na região dos joelhos e costelas. Estudos pré-clínicos indicaram inibição da reabsorção óssea subcondral após a administração deste fármaco.²⁷⁰ Ainda, estímulo de formação de cartilagem foram observados em estudos in vitro de condrócitos humanos normais e osteoartríticos.^{271,272} Tratamento com ranelato de estrôncio em pacientes osteoartríticos na dosagem de 1 a 2 g/dia foram associadas a melhoras significativas nos sintomas e na estrutura cartilaginosa de joelhos de maneira eficiente e segura.²⁷³ De maneira interessante, por possuírem atividade anti-inflamatória, flavonoides começaram recentemente a serem explorados para o tratamento de osteoartrite. Alguns mecanismos são propostos para o efeito observado na regeneração de juntas e diminuição de perda óssea em animais e modelos celulares in vitro, inibindo ou estimulando proliferação celular. No caso específico de cartilagens, estes compostos são capazes de modular função citocinas e outras proteínas envolvidas na regulação de respostas inflamatórias em doenças autoimunes.²⁷⁴ Entretanto, dados clínicos e informações sobre a biodisponibilidade de flavonóides em humanos ainda são escassos. Ainda, mecanismos que expliquem e interconectem diferentes efeitos observados sobre os diferentes tipos de células envolvidas no processo de formação de ossos e cartilagens não estão completamente elucidados. Por exemplo, porque esses compostos estimulam diferenciação e atividade de osteoblastos levando à acentuada mineralização, porém esse processo é inibido em se tratando células responsáveis pela formação de cartilagem, como condrócitos? Ainda, quais vias são ativadas na diminuição de osteoclastogênese? Vale ainda destacar que os efeitos positivos de Sr²⁺ sob a regulação da atividade de células osteogênicas e aumento da densidade óssea tem disso descrito em altas concentrações deste íon, o que leva aos seus já escritos efeitos colaterais. Nos estudos preliminares de nosso grupo recentemente publicados,²⁵⁸ concentrações menores de um complexo flavonóide contendo Sr²⁺ comparadas ao fármaco ranelato de estrôncio foram necessárias para ativação de osteoblastos e regulação da atividade de osteoclastos por meio da ativação de genes específicos como ALP, indicando efeito promissor desses compostos naturais em terapia óssea.

3.4 Resultados e Discussão

Os estudos realizados sobre a formação de biominerais em meios confinados iniciaram-se com a precipitação de CaCO_3 em moldes cilíndricos com poros de 200 nm, de membranas de policarbonato (anexo III.1). A metodologia para preparo destes materiais foi desenvolvida durante estágio de doutorado no exterior, realizado na Universidade de Bristol-Inglaterra, sob supervisão da Dra. Fiona Meldrum. O avanço realizado no Brasil consistiu na adição de COL à superfície dos materiais, aprimorando o modelo biomimético. Como resultados, foram obtidas estruturas minerais de CaCO_3 , com formato de nanotubos, contendo COL na superfície. As partículas estimularam a precipitação de HA e a proliferação de osteoblastos, suportando sua bioatividade. Aproveitando-se desta característica, as partículas foram imobilizadas sobre superfícies de Ti, por meio de filmes LbL contendo COL, como polycation, e PAA como poliânion (Anexo III.2). A modificação aumentou a energia de superfície do Ti, por meio de aumento a rugosidade e composição. Estes parâmetros aumentaram a bioatividade do Ti, conforme mostraram os resultados de precipitação de HA e viabilidade de osteoblastos.

A adição de Sr^{2+} aos biominerais de carbonato, precipitados em meio confinado foi realizada. Por meio da colaboração com Dr. Alexandre Gloter, Université Paris-Sud, Orsay, mudanças na estrutura cristalina de CaCO_3 pela incorporação de Sr^{2+} foi acompanhada, mostrando estabilização da fase estronciatina e aumento de cristalinidade (anexo III.3). Testes de bioatividade *in vitro* mostraram que não houve prejuízo deste parâmetro com adição de Sr^{2+} . Este estudo abriu portas para investigação dos mecanismos de incorporação deste íon em minerais ósseos (anexo III.4), além de promover carbonatos de Sr^{2+} como uma nova geração de materiais bioativos para regeneração de tecidos mineralizados. O estudo seguinte comparou o uso de meio confinado e precipitação em meio homogêneo na formação de apatitas em presença de Sr^{2+} (anexo III.5). Seguindo-se a colaboração com grupos franceses, contamos com a experiência da Dra. Nadine Nassif na caracterização de apatitas precipitadas utilizando-se modelos biomiméticos. O estudo constante no anexo III.5 mostra diferenças na cristalinidade das partículas induzidas por confinamento, semelhante ao que acontece *in vivo*. A adição de Sr^{2+} em quantidades superiores a 10% (com relação ao Ca^{2+}) desestabiliza a estrutura cristalina da apatita, levando à formação de mineral amorfo. Estes resultados podem explicar efeitos adversos reportados durante a administração de ranelato de estrôncio, tal como patologias associadas à incorporação desses íons no mineral ósseo. Partículas precipitadas em meio confinado foram investigadas quanto à bioatividade e capacidade de regulação da atividade de osteoblastos e osteoclastos (anexo III.5). Essas partículas mimetizam fibrilas de COL mineralizadas. Além de serem

bioativas, promovendo a precipitação seletiva de HA sobre suas superfícies, as partículas regularam a atividade de osteoblastos e diminuíram a de osteoclastos, evidenciando seu potencial biotecnológico.

O potencial de uso de nanopartículas para simular processos que ocorrem *in vivo* foi ainda investigado utilizando-se partículas de TiO₂, simulando a camada passivadora da superfície de implantes (anexo III.6). Uma limitação para investigação comparativa do efeito de nanopartículas na atividade celular está relacionada com a dificuldade de padronização de tamanho e forma, que também podem influenciar as respostas biológicas. Neste estudo partículas de anatase, rutila e TiO₂ amorfo foram preparadas, mantendo-se tamanho e forma similares. A adsorção de proteínas a partir do meio de cultura mostrou ser o fator primordial na interação partículas/células, mecanismo já descrito na literatura pela adsorção de uma “coroa proteica” sobre as partículas.

3.5 Conclusões e perspectivas

A linha de pesquisa relacionada à síntese de nanopartículas busca unir aspectos básicos relacionados à composição e estrutura na precipitação biomimética de nanopartículas de HA contendo Sr²⁺ e síntese de complexos flavonóides-Sr²⁺ potencialmente aplicáveis como fármacos em terapias ósseas. O potencial tecnológico desta linha de pesquisa relaciona-se à confecção de biomateriais aplicáveis em odontologia e medicina. Para isso, por meio de uma equipe multidisciplinar composta por químicos, dentistas e farmacêuticos, investigamos o efeito desses biomateriais na atividade de células importantes no processo de formação óssea como osteoblastos, osteoclastos e condrócitos. Estamos estudando estes tipos de células sob o ponto de vista de expressão gênica na tentativa de elucidar os mecanismos de ação das nanopartículas, tema ainda pouco explorado em materiais contendo Sr²⁺. Ainda, essas partículas estão sendo estudadas no tratamento de hipersensibilidade e para remineralização dentinária, em colaboração com grupos da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP/USP). Os dados preliminares mostram que a qualidade dos depósitos e penetração intrabular das partículas modificadas com COL superam a de dentifrícios disponíveis comercialmente. Uma vez que a utilização de nanopartículas possibilitará a fácil penetração no interior dos túbulos, atuando como agentes de mineralização que bloqueiam o movimento de fluidos dentro dos túbulos dentários.²⁷⁵ Diversos estudos já avaliaram a eficiência dos dentifrícios dessensibilizantes na obliteração dos túbulos dentários.^{217,230,239,276-280} Porém, não há estudos que tenham avaliado o efeito sinérgico de carbonatos, fosfatos e Sr²⁺ por meio da aplicação de nanopartículas de SrCO₃ e Ca_{1-x}Sr_xCO₃, tal como nanopartículas de HA parcialmente substituídas por Sr²⁺ na remineralização e obliteração tubular da dentina. Não existe descrição na literatura da síntese de carbonatos mistos para tal aplicação. Ainda, a formação de mineral incorporando-se COL1 em sua superfície como facilitador

da penetração de íons no interior dos túbulos dentários, pode ser favorecida de maneira semelhante ao descrito no estudo de nosso grupo Tovani et al.³⁸, no qual moldes contendo nanoporos foram utilizados como modelo de superfícies. A estrutura de poro desses moldes se assemelha ao encontrado na superfície da dentina. A Figura 8 traz uma representação esquemática da formação de carbonatos de fosfatos de cálcio e estrôncio a partir dessa metodologia.

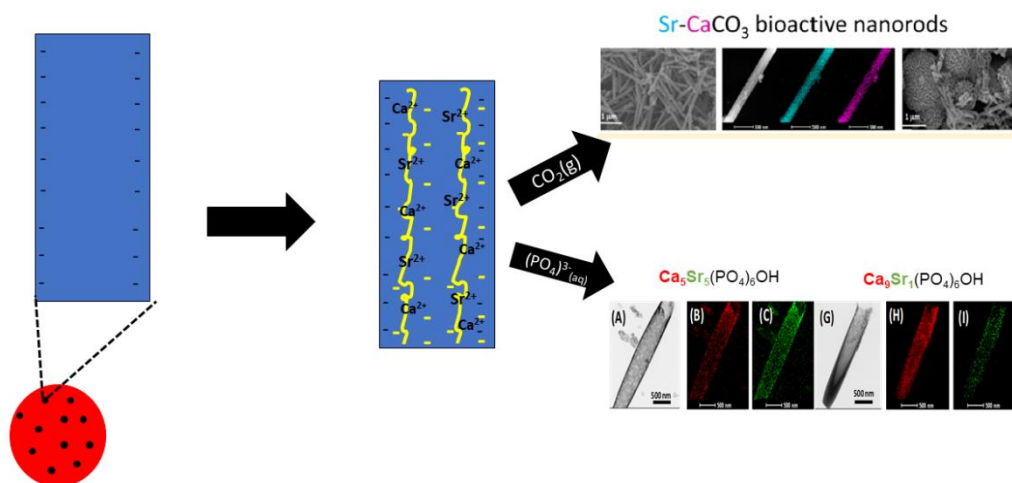


Figura 8. Precipitação em meio confinado. Formação de carbonatos e fosfatos de estrôncio no interior de membranas de policarbonato utilizando-se polieletrólito como facilitador da incorporação e ligação dos íons Ca²⁺ e Sr²⁺ no interior de nanoporos utilizado por nosso grupo.^{38,39}

*Capítulo 4- Biomembranas e Scaffolds Tridimensionais: de
modelos para biomineralização às aplicações biotecnológicas*

Capítulo 4- Biomembranas e *Scaffolds* Tridimensionais: de modelos para biomineralização às aplicações biotecnológicas

4.1 Materiais 3D biomiméticos contendo colágeno aplicados como reparos ósseos

Os ossos são remodelados ao longo da vida para se adaptar ao estresse mecânico e manter o equilíbrio iônico e a integridade do esqueleto.^{49,51-53} Este tecido complexo deve ser resistente, adaptável e multifuncional. Devido à presença de fatores bioquímicos e celulares, o tecido ósseo tem excelente capacidade de autorregeneração quando sujeito a defeitos de tamanho não críticos (<6 mm).²³ No entanto, defeitos críticos causados por patologias ou trauma devem ser revertidos com o auxílio de enxertos ósseos autólogos ou compostos exógenos.⁶¹ A desvantagem dos materiais autólogos está relacionada à necessidade de intervenção cirúrgica para remover tecido de outros locais do indivíduo, complicações pós-operatórias e às dificuldades na obtenção de material em quantidade suficiente para enxertar.⁶¹ Os materiais exógenos são feitos de suportes 3D que imitam a ECM do osso natural e visam replicar o papel complexo do osso em processos mediados por células que equilibram a formação e reabsorção óssea durante as condições fisiológicas e patológicas.^{51,55} A capacidade de incorporar íons inorgânicos como magnésio, estrôncio, silício, cobre e cobalto nesses materiais fornece uma solução econômica e viável para o reparo de defeitos ósseos.^{61,281} Ainda, o desenvolvimento de *scaffolds* (andaimés) 3D também pode contribuir para uma melhor elucidação do processo altamente complexo de formação óssea por meio de estudos *in vitro*.⁷⁴ Para isso, uma vez que a estrutura e a função de um tecido estão intimamente relacionadas, a bioengenharia óssea visa recriar a microarquitetura do tecido, produzindo *scaffolds* 3D que:⁵⁸ (1) imitem a composição química e a organização estrutural da ECM óssea, uma vez que estas ditarão as propriedades da superfície, a taxa de biodegradação e a biocompatibilidade, que são aspectos fundamentais para a resposta celulares em materiais artificiais; (2) favoreçam as interações célula-célula e célula-matriz diretamente ou mediadas por agentes bioquímicos (por exemplo, fatores de crescimento); (3) forneçam resistência mecânica inicial suficiente e rigidez para substituir o osso perdido, apoiar a proliferação e diferenciação de osteoblastos e a liberação dos componentes da ECM imediatamente após a implantação; e (4) possuam uma rede 3D porosa interconectada, uma vez que a presença de poros pode potencializar respostas biológicas, como adesão e penetração celular, e favorecer o crescimento interno dos vasos sanguíneos que é necessário para promover a troca de nutrientes e fatores de crescimento entre as células presentes no enxerto.^{49,55,58}

Compreender a integração complexa entre os componentes orgânicos e inorgânicos em tecidos mineralizados nativos, como o osso, é ímpar no desenvolvimento de novas estratégias para sintetizar materiais híbridos inspirados nestes tecidos. O desafio consiste em recriar matrizes 3D que se

assemelham à composição química, às propriedades físicas e ao comportamento bioquímico em nano e microescala, mimetizando assim as propriedades estruturais e o desempenho biológico dos tecidos nativos. Esses são aspectos essenciais a serem considerados na tentativa de recriar artificialmente o desenho hierárquico do microambiente celular envolvido na manutenção óssea.^{51,55}

Os primeiros estudos sobre a fabricação de *scaffolds* 3D orgânicos/inorgânicos biomiméticos ósseos adotaram uma metodologia simples baseada na mistura de COL1 e HA.^{5,282} Como exemplo, Tampieri et al. compararam a adição de HA pré-sintetizada ou sintetizada *in situ* a géis COL1.²⁸³ Embora ambos os métodos promovam a mineralização de COL1, os mecanismos foram diferentes: o contato entre a HA pré-sintetizada com as fibras de COL1 resultou na deposição de uma matriz mineralizada pouco homogênea e desorganizada, enquanto uma deposição mais ordenada atribuída à nucleação mineral nos interstícios e o crescimento perpendicular à superfície das fibras foi observado usando precipitação *in situ*.²⁸³ Os autores apontaram as limitações para recriar a organização mineral altamente complexa encontrada no tecido ósseo. Outros métodos têm sido propostos para melhorar a mineralização *in vitro* de COL1, na tentativa de produzir materiais cada vez mais próximos da estrutura nativa do osso.^{50,53} No estudo realizado por Ahmed El-Fiqi et al., a mineralização de COL1 foi desencadeada usando um biovidro bioativo.²⁸⁴ O biovidro silanizado foi adicionado a uma solução de COL1 ácida e a mistura resultante foi neutralizada com solução de NaOH até atingir pH 7,4.²⁸⁴ A auto-organização das fibrilas de COL foi observada com o aumento do pH até 9. Por fim, o biovidro foi imerso em fluido corporal simulado por 7 e 14 dias para obtenção de uma estrutura biomimética óssea composta por nano-HA e matriz fibrilar de COL1. A morfologia do *scaffold* mineralizado foi controlada pelo tempo de mineralização resultando em poros interconectados que se assemelham aos do osso trabecular esponjoso.²⁸⁴ No entanto, não foi avaliado como esses *scaffolds* 3D afetaram o crescimento de células osteogênicas.

4.2. Interação dos materiais 3D contendo COL1 com células

A primeira comparação do comportamento de células cultivadas sobre géis de COL e sobre vidro foi publicada em 1956.²⁸⁵ Os autores descobriram que as matrizes COL1 afetaram o crescimento, a morfologia, a migração, a adesão e, em certos casos, a diferenciação das células. A explicação mais provável para esse achado é o reconhecimento do COL1 pelas células por meio de receptores de membrana específicos chamados integrinas.^{286,287} Uma integrina é uma glicoproteína heterodimérica transmembrana composta por duas subunidades α e β , não covalentemente associadas. Sua principal função é facilitar a interação das células com seu ambiente extracelular.²⁸⁸ Existem pelo menos 21 membros da família integrina, entre eles $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$ and $\alpha_3\beta_1$ são as principais integrinas envolvidas na interação das células com COL.²⁸⁹ Receptores de células não-integrinas também foram identificados

como proteínas de ligação ao COL, por exemplo, âncora CII, proteína de choque térmico de 47 kDa e AnxA5.^{290,291} Estudos utilizando modelos biomiméticos de membrana celular contendo AnxA5 e AnxA6 contribuíram para evidenciar a importância dessas proteínas na ligação de MVs a fibrilas de COL.^{291,292}

Apesar do desenvolvimento de várias estratégias usadas para replicar a complexidade da mineralização óssea em nível molecular, um desafio crítico para a bioengenharia óssea funcional é a capacidade limitada de mimetizar e controlar o processo orquestrado de mineralização promovido pelas células.^{25,53} Osteoblastos, osteoclastos e osteócitos controlam a organização da ECM óssea por meio de várias vias de sinalização e comunicação intrínscada entre as células ósseas, que não foram totalmente elucidadas. Recentemente, pesquisadores recriaram matrizes de COL bem alinhadas com base no conceito de que o alinhamento é induzido e promovido pelos osteoblastos durante sua auto-organização para formar a matriz fibrilar.⁵³ Este estudo foi inspirado pelo fato de que a natureza hierárquica da formação do tecido ósseo lamelar é mediada por osteoblastos em ossos de vertebrados normais e também no reparo ósseo.²⁹³ A falta de conhecimento completo sobre o papel das células nas propriedades estruturais das fases orgânica e inorgânica do osso, e as interações entre elas, é um desafio enfrentado na fabricação de materiais 3D biomiméticos ósseos em a micro e nanoescala.^{294,295}

Tanto a diferenciação celular quanto a deposição de ECM foram extensivamente investigadas por meio da cultura de células osteogênicas e condrogênicas em plataformas 2D.²⁹⁶ As culturas de células 2D simplificam excessivamente a complexidade da ECM nativa e estimulam o comportamento das células de forma diferente quando comparadas ao ambiente nativo complexo. Na verdade, as células interagem *in vivo* com outras células adjacentes e a ECM em um microambiente 3D.⁷⁵ Portanto, as culturas de células 2D não são capazes de imitar fielmente a formação de ossos e cartilagem e são preditores fracos de respostas de células específicas.^{198,296} Culturas de células tridimensionais foram implementadas para preencher a lacuna entre a cultura de células 2D e os modelos animais *in vivo*. Um *scaffold* 3D pode ser definido como um suporte artificial que fornece um microambiente para o desenvolvimento da morfologia do tecido nativo.⁷⁴ A modelagem da organização 3D exata da ECM nos níveis macromolecular (nm), fibrilar (mm) e suprafibrilar (mm a cm) é necessária para tentar alcançar as propriedades mecânicas dos tecidos vivos.²⁹⁷

Os mecanismos de sinalização intracelular desencadeados durante a diferenciação condrogênica e osteogênica foram revisados.²⁹⁸⁻³⁰² Vários deles são mediados por membros da família de proteínas quinase ativada por mitógenos (MAP) e proteína quinase extracelular regulada (ERK), que ativam o fator de transcrição Cbfa-1, induzindo assim a regulação do genes específicos dos ossos.³⁰³ Os *scaffolds* 3D baseados em COL1 aumentaram a ativação dessas vias de sinalização em comparação com culturas 2D, que também afetou o fenótipo celular.⁵⁵ Assim, as culturas de células

3D modelam o ambiente fisiologicamente relevante e preveem de forma adequada as interações entre as células osteogênicas e seu microambiente. Além disso, a cultura de condrócitos em culturas 2D é um desafio.³⁰⁴ Os condrócitos cultivados *in vitro* em monocamadas podem facilmente desdiferenciar para um fenótipo mais fibroblástico após um longo tempo de expansão e múltiplas passagens. A desdiferenciação é caracterizada por maior expressão de gene COL1 e diminuição da expressão e produção de proteínas específicas da cartilagem, como COL2, GAGs e agrecanas (ACAN). O perfil de integrina associado à cartilagem também mostrou alteração na cultura em monocamada.³⁰⁵ Para melhor preservar o fenótipo da cartilagem, os condrócitos foram cultivados em suspensões de mídia ou géis.³⁰⁶ É bem aceito que as culturas 3D favorecem a manutenção do fenótipo do condrócito controlando a desdiferenciação.³⁰⁷ Na verdade, os mRNAs condrogênicos (COL2A1, e ACAN) são sobre expressos nas culturas 3D.³⁰⁵ Quando cultivados em géis de alginato, os condrócitos mantiveram seu fenótipo diferenciado e produziram mais proteoglicanos e COL2 em comparação com os condrócitos em monocamada.³⁰⁸ Albrecht et al. revelaram mudanças na expressão gênica associadas às características do *scaffold*, bem como às condições de cultura.³⁰⁹ Os géis de COL estimulam a proliferação de condrócitos. No entanto, os condrócitos se desdiferenciam em células semelhantes a fibroblastos após 6 dias de cultura.³⁰⁸ Isso levou ao desenvolvimento e otimização de novas culturas de células 3D destinadas a reproduzir a cartilagem e a formação óssea durante a ossificação endocondral (Figura 3- Capítulo 1) para elucidar questões relacionadas à fisiologia desses tecidos.^{310,311} Esses materiais também podem ser aplicados para testar drogas que atuam no metabolismo e turnover de células osteogênicas e condrogênicas, limitando assim a necessidade de modelos animais.^{74,296} Além disso, a ossificação endocondral estimulada pela engenharia de tecido pode beneficiar a regeneração óssea, pois pode melhorar a angiogênese e a remodelação *in vivo*.³¹² As co-culturas com uma variedade de MSC podem aliviar a desdiferenciação dos condrócitos, que podem ser usados como uma terapia potencial para regenerar funcionalmente a cartilagem.^{313,314}

Compreender como as células funcionam e produzem a matriz mineralizada é a base da engenharia da cartilagem e do osso para a fabricação de andaimes 3D adequados, fornecendo um ambiente biocompatível, amigável para a fixação, proliferação e diferenciação celular que leva à formação do tecido. Os *scaffolds* baseados na composição nativa e nos papéis fisiológicos da cartilagem e do osso são geralmente projetados para atuar como uma matriz temporária para estimular localmente a síntese de ECM para regeneração de tecidos.⁷⁴ Cultura de MSCs em estruturas 3D pode representar uma abordagem viável para imitar a composição e a complexa estrutura hierárquica da cartilagem e dos tecidos ósseos. Os *scaffolds* carregados com MSC permitem investigar e compreender a sofisticada funcionalidade dos sistemas biológicos, considerando a natureza tanto da fratura quanto do processo de regeneração.^{55,74}

4.3 Hidrogéis no desenvolvimento de materiais biomiméticos

A biocompatibilidade e biodegradabilidade associadas à possibilidade de construir uma matriz 3D semelhante à ECM nativa, rica em células, tornam os hidrogéis candidatos potenciais para a fabricação de esqueletos 3D biomiméticos ósseos.^{55,198,315} Um hidrogel é uma estrutura polimérica hidrofílica reticulada física e/ou quimicamente, que tem uma alta capacidade de retenção de água ou fluido biológico. Devido a essas características, os hidrogéis podem suportar a viabilidade celular melhor do que outros materiais 3D.⁷⁴ *Scaffolds* poliméricos têm sido cada vez mais investigados devido às suas características únicas, tais como: (i) porosidade adequada e interconexão de poros; (ii) biodegradabilidade/bioreabsorvibilidade; (iii) química de superfície adequada para adesão e diferenciação celular.³¹⁶ Hidrogéis feitos de polímeros naturais têm sido extensivamente manipulados para engenharia de tecido ósseo e cartilaginoso.^{74,317,318} A importância de COL1 na ECM óssea e seu papel na cascata de desenvolvimento que leva à formação de um novo osso a partir de células progenitoras, tornam esta molécula uma candidata para abordagens biomiméticas para o design de arcabouços celulares.^{74,296} A primeira preparação de hidrogéis de COL carregados de células foi relatada por Bell et al.³¹⁹ Coyac et al. relataram que *scaffolds* de COL1 pareceram ser suficientes para fornecer sinalização, levando à diferenciação de células-tronco primárias de dentes humanos (SHED) e à secreção de outras proteínas reguladoras da mineralização.³²⁰ Medidas da atividade enzimática da fosfatase alcalina, juntamente com o *imuno-blotting* para marcadores celulares do tecido mineralizado ALP, DMP1 (proteína da matriz dentinária 1) e OPN demonstraram diferenciação celular osteo/odontogênica nas estruturas de COL denso, coincidentes com a mineralização.³²⁰ MSCs cultivadas em estruturas COL1/HA exibiram regulação positiva comparável de fabricantes de genes osteogênicos como RUNX2 e Osterix, mas aumentou a proliferação celular em comparação com COL1 puro.³²¹ Os hidrogéis à base de COL1 são frequentemente fabricados pela adição de outros polímeros naturais à sua composição. A adição dessas macromoléculas não colágenas (incluindo glicosaminoglicanos,³²² poli(L-ácido láctico), poli(ácido glicólico),³²³ alginatos,³²⁴ quitosana,^{324,325} celulose³²⁴, fibroína de seda,³²⁵ ácido hialurônico,³²⁵ frutose³²⁵) visa controlar a absorvibilidade, biodegradabilidade e imunogenicidade, para facilitar a viabilidade celular, adesão, proliferação e migração através dos géis.^{55,74} A biocompatibilidade dos polímeros naturais foi amplamente testada mostrando que componentes colágenos e não-colágenos da ECM são importantes na promoção da osteogênese de MSCs.^{72,322-326} Por esse motivo, combinações de diferentes componentes presentes na ECM têm sido usadas para culturas de células osteogênicas.

4.3.1 Hidrogéis à base de COL1 contendo macromoléculas não-colágenas.

Progresso significativo tem sido realizado no sentido de compreender os mecanismos envolvidos na mineralização dos tecidos colagênicos.^{17,72} É bem sabido que o COL por si só não induz o processo de calcificação *in vitro* com o mesmo compromisso mineral-colágeno encontrado no COL mineralizado nativo.^{69,329} As macromoléculas não-colágenas presentes na ECM, conduzem os íons minerais para as fibras de COL.⁶⁹ Por exemplo, a presença de poliânions proporciona interações eletrostáticas, que contribuem para a inibição da nucleação em solução, estabilização da fase mineral e interações mineral-colágeno.⁶⁹ Por outro lado, a estrutura fibrilar do COL é necessária para orientar a organização e o crescimento da fase mineral.^{5,69,330} Uma estrutura microporosa fibrilar interconectada foi obtida pela adição de um copolímero termo reversível a uma estrutura de COL 3D usada para a proliferação de células pré-osteoblásticas MC3T3.³³¹ Desta forma, a matriz orgânica deve compreender algumas dessas macromoléculas para melhorar as características físicas e químicas de sistemas biomiméticos, e para atingir a organização e composição mais próxima daquela observada no tecido nativo.⁵³ Embora a importância dessas macromoléculas não-colágenas, em especial das GAGs, na mineralização óssea tenha sido relatada e discutida, este ponto geralmente é negligenciado na bioengenharia óssea.

As proteínas da matriz extracelular COL1 e COL4, FBN, laminina e vitronectina melhoram a fixação periodontal e celular à superfície dos materiais, indicando que a adição seletiva dessas proteínas pode ser clinicamente útil para promover o crescimento ósseo.³³² Por exemplo, FBN e a vitronectina além de promover a adesão e proliferação celular, também aumentam a molhabilidade de *scaffolds*.³³³ A BSP estimulou a deposição mineral quando adicionada a *scaffolds* 3D de COL1 por meio da ligação a integrinas $\alpha\beta3$ e $\alpha\beta5$, que mediarão a sinalização celular.³³⁴ Células da medula óssea cultivadas por 3 semanas em suportes COL/BSP foram diferenciadas em osteoblastos. O aumento da atividade de TNAP e a síntese de OCN e BSP foram aumentadas em comparação com células cultivadas em plástico.³³⁵

GAGs são os principais componentes não-colágenos presentes na ECM de cartilagem e osso.^{75,336,337} Constituem uma família de polissacarídeos compostos por resíduos de monossacarídeos alternados. Sua nomenclatura varia em relação à composição do sacarídeo, ligação glicosídica e modificação da unidade de dissacarídeo (por exemplo, o grau de sulfatação). Existem seis tipos diferentes de GAGs: ácido hialurônico, heparina, sulfato de heparana, sulfato de condroitina, sulfato de dermatana e sulfato de queratana^{321,336} (Fig. 9). GAGs estão ligadas ao núcleo do polipeptídeo para conectar duas fibrilas/fibras de COL, contribuindo para melhora das propriedades mecânicas da matriz.³³⁸ Várias formulações de hidrogéis contendo COL1/GAGs foram relatadas e mostraram afetar as propriedades biofísicas dos géis e influenciar o comportamento celular.^{322,339,340} Os *scaffolds*

contendo COL1/GAGs foram clinicamente aprovados para regeneração da pele e apresentam excelente potencial como biomaterial para remodelação óssea.³⁴¹ Eles podem modular a migração, adesão, diferenciação e proliferação de células osteogênicas.³³⁶ Foi relatado que GAGs induzem efeitos positivos no fenótipo osteoblástico em termos de mineralização e atividade de TNAP em MVs.³³⁶ No entanto, ainda não está claro se essas macromoléculas influenciam apenas o comportamento dos osteoblastos ou também a formação, composição, atividade e adesão das MVs à ECM.³³⁶ Ainda, *scaffolds* contendo COL1/GAGs suportam a osteogênese e condrogênese de MSCs através da superexpressão de OCN e COL2.³⁰³ Os mesmos autores compararam o efeito da cultura de células 2D e 3D COL1/GAGs na taxa de diferenciação osteogênica e mineralização de MSCs.³⁴² A resposta inicial das células em 3D parecia ser mais rápida do que as células cultivadas em 2D, conforme evidenciado pela expressão de marcadores osteogênicos anteriores como COL1. No entanto, a diferenciação osteogênica de MSCs, monitorada pela expressão de OCN e BSP, foi mais lenta no ambiente 3D do *scaffold* COL1/GAGs em comparação com a cultura 2D padrão.^{342,343} A mineralização completa após 6 semanas de cultura demonstrou a capacidade das células permear os *scaffolds* auxiliada pela preservação e manutenção da estrutura atribuída à presença de GAGs.³⁴¹

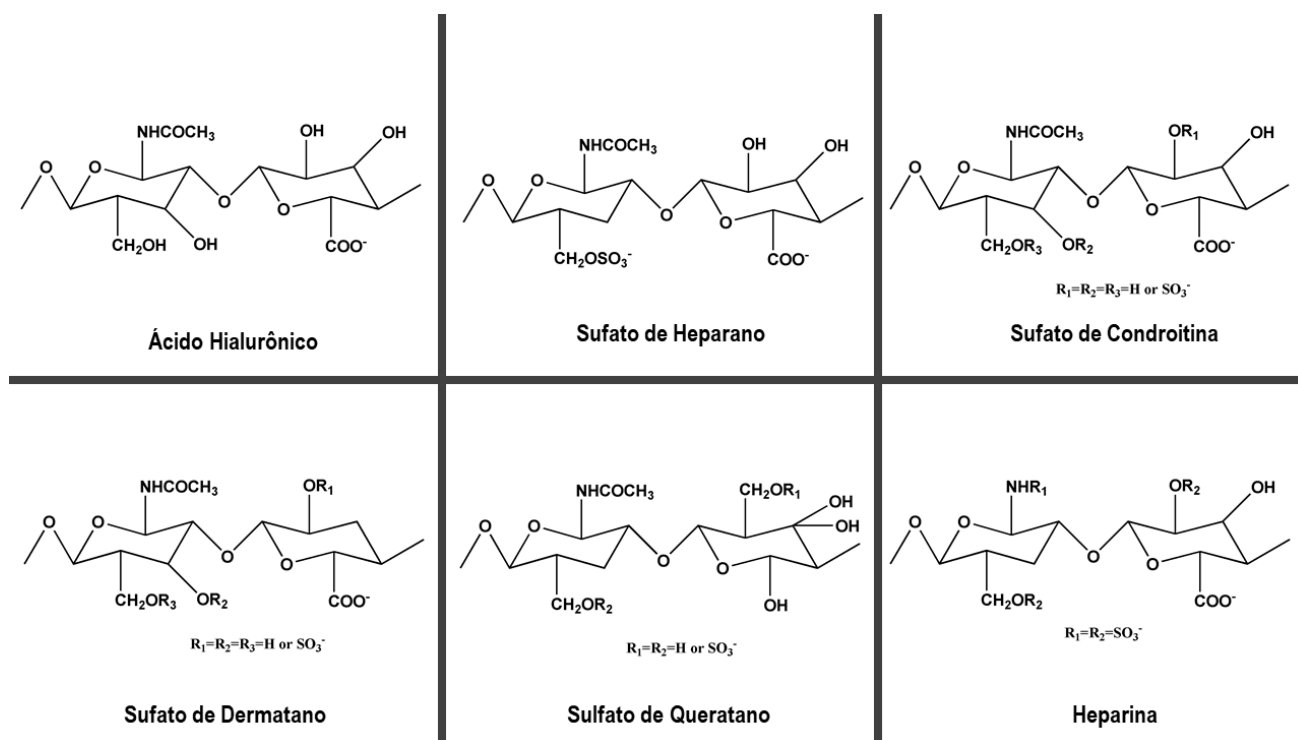


Figure 9. Estrutura molecular das GAGs de acordo com sua principal composição dissacarídica.

As GAGs sulfatadas (sGAGs) promovem a osteogênese, devido à indução das funções dos osteoblastos, interação célula-matriz, diferenciação e mineralização.³³⁶ As sGAGs induzem a

diferenciação de MSCs em um fenótipo de osteoblasto, inibem a degradação óssea pelos osteoclastos e têm propriedades de imunomodulação.³³⁶ No entanto, os mecanismos de resposta celular aos complexos GAG-proteína ainda são pouco compreendidos, e mais estudos nesta área são necessários.³³⁶ A adição de sGAGs com outros componentes da ECM nativo, como o COL, em estruturas biomiméticas 3D pode favorecer respostas celulares osteogênicas.³³⁶ Revestimentos de COL/sGAG levaram a um efeito anti-osteoclastogênico que não poderia ser simplesmente atribuído ao conteúdo de grupos sulfato.³⁴⁴ Além disso, dependendo de sua natureza polieletrólítica, as sGAGs são críticos na promoção da mineralização intrafibrilar por meio da estabilização da fase mineral nas matrizes de fibrilas de COL.^{69,198} Estudos publicados por Harley et al. reportaram a síntese e caracterização de *scaffolds* 3D mineralizados compostos por COL1 e sulfato de condroitina e seus efeitos na diferenciação osteogênica de MSCs.^{345,346} Os *scaffolds* mineralizados exibiram organização semelhante à do osso trabecular.³⁴⁵ As análises de espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDX) indicaram uma distribuição uniforme da fase mineral em toda a matriz orgânica, que foi atribuída à adição de sulfato de condroitina à matriz de COL.³⁴⁵ O potencial osteogênico desses *scaffolds* foi investigado pela modulação das vias de sinalização envolvidas na diferenciação osteoblástica de MSCs humanas.³⁴⁶ O conteúdo mineral foi significativamente maior nos *scaffolds* cultivados com MSCs em comparação com os imersos no meio de cultura na ausência de células.³⁴⁶ A adição de um inibidor que diminuiu a produção de BMPs, reduziu o conteúdo mineral nos *scaffolds*. No entanto, a adição do inibidor de proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina (AMPK), que desempenha papel na homeostase energética celular, reduziu a mineralização dirigida por células apenas nos *scaffolds* não-mineralizados.³⁴⁶ Com base nesses resultados, os autores levantaram a hipótese de que a ativação da via de sinalização do BMP é necessária para a diferenciação osteogênica das MSCs e mineralização dos *scaffolds*.³⁴⁶ Além disso, os resultados mostraram que a mineralização da matriz é crucial para ativar a cascata de sinalização.³⁴⁶ Embora o gatilho específico para a ativação dessas vias de sinalização ainda seja desconhecido, esses achados contribuem para o desenvolvimento de métodos alternativos para a fabricação de materiais 3D carregados de células para a regeneração óssea.³⁴⁶ Esses estudos destacam a importância da interação entre o COL e os polissacarídeos sulfatados para a ativação de marcadores osteogênicos específicos, bem como para o controle da mineralização do COL1.⁶⁹

O ácido hialurônico e vários outros polissacarídeos, em particular os naturais, como os alginatos, são usados para a preparação de hidrogéis devido à sua capacidade de gerar construções 3D porosas, incluindo bioimpressão 3D.³⁴⁷⁻³⁴⁹ Eles são considerados candidatos promissores para imitar o microambiente nativo da ECM que suporta o reparo do osso e da cartilagem.^{296,316} Polissacarídeos sulfatados como carragenanas, que são química e estruturalmente semelhantes às sGAGs (como o

sulfato de condroitina) e apoiam a adesão e proliferação celular, são adequados para o preparo de *scaffolds*, com a vantagem de serem provenientes de fontes renováveis.³⁵⁰⁻³⁵³ κ -Carr é um dos três tipos mais importantes de carragenana, que exibe o menor grau de sulfatação com um grupo sulfato nas unidades da cadeia de galactose/anidrogactose.^{298,332} Na presença de cátions específicos, esse polissacarídeo se organiza em uma estrutura helicoidal, como a do COL. As propriedades do gel, como tempo de gelificação, temperatura de transição sol-gel, dureza e sinérese, dependem do arranjo supramolecular das hélices relacionadas à estrutura do polissacarídeo e sua agregação, geralmente promovida por cátions de metal mono e divalentes.³³¹ Devido à sua biocompatibilidade, hidrofiliabilidade e capacidade de estimular a adesão e proliferação celular, os hidrogéis à base de κ -Carr podem ser aplicados em sistemas carregados de células para a regeneração de cartilagem e ossos.^{351,358,359} A presença de grupos funcionais carregados negativamente pode ligar ou reter fatores de crescimento considerados essenciais para a diferenciação celular, uma característica associada à presença de sulfato de condroitina na ECM nativa.^{317,351,354,355} No entanto, o sulfato de condroitina é caro e tem baixa capacidade de gelificação, então κ -Carr que vem de fontes renováveis, com excelentes propriedades de gelificação, pode ser usada como uma alternativa para substituir o papel da estrutura saturada de dissacarídeo sulfatado na composição de ECM.³⁵¹ Ocampo et al. observaram que os hidrogéis à base de κ -Carr contendo HA provocam adesão e proliferação celular, proporcionando um microambiente osteoindutor para a diferenciação e osteogênese dos osteoblastos.³⁵¹ Popa et al. descreveram que células-tronco humanas derivadas de tecido adiposo encapsuladas em hidrogéis κ -Carr permanecem viáveis, proliferam e se diferenciam em linhagem condrogênica.³⁵⁰ Apesar de seu potencial osteogênico e condrogênico, as vias e mecanismos envolvidos durante o processo de diferenciação e, conseqüentemente, mineralização, ainda não estão claros. No entanto, a presença de carragenana pode desencadear a produção de citocinas pró-inflamatórias de forma dependente da concentração.³⁵³ Por esse motivo, é importante avaliar a citotoxicidade desses compostos antes de serem incorporados aos *scaffolds* 3D.

4.3.2 Hidrogéis contendo COL1 e macromoléculas sintéticas

O poli(L-ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) está entre os polímeros sintéticos mais atraentes usados para fabricar dispositivos para entrega controlada de drogas e engenharia de tecidos, devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e propriedades mecânicas.³⁶⁰ *Scaffolds* de COL1/PLGA também são capazes de estimular a adesão, proliferação e diferenciação de células MSCs e MC3T3-E1, conforme indicado pela atividade aumentada de TNAP e expressão aprimorada de genes osteogênicos específicos como RUNX2, Alpl e OCN comparados a *scaffolds* de COL1 puro.³⁶¹ A

adição de HA aos materiais estimulou as respostas osteogênicas e a expressão do citoesqueleto de actina pelas células,³⁶²⁻³⁶⁴ e parecem não induzir reações inflamatórias nos tecidos *in vivo*.³⁶⁵ Esses *scaffolds* foram aplicados para determinar o efeito da ECM na diferenciação de MSCs humanas em um fenótipo osteoblástico.⁶² Estes estimularam a diferenciação de células por meio da expressão aumentada dos genes RUNX2, SP7, IBSP e SPP1.⁶² Os *scaffolds* COL1/PLGA também são adequados em engenharia de tecido de cartilagem e formação de osso endocondral.^{306,366} Condrócitos bovinos cultivados nesses *scaffolds* e transplantados sub-cutaneamente em camundongos foram capazes de estimular a deposição de ECM cartilaginosa, a síntese de GAGs e a expressão de COL2 e ACAN.³⁶⁷ Outros polímeros sintéticos, como polietilenoglicol (PEG) e copolímero PEO-PPO-PEO (Pluronic F-127) também foram usados como modificadores de *scaffolds* de COL1.^{27,331,368,369}

A Tabela 2 resume as publicações destacadas com matrizes 3D contendo células. Fica claro que COL1 é o tipo de COL mais usado na fabricação destes materiais, cultivados com vários tipos de células, incluindo osteoblastos, condrócitos, MSCs humanas e de rato, células endoteliais de veia umbilical humana (hUVEC) e fibroblastos (Tabela 2). Os condrócitos foram cultivados na presença de COL2 de cartilagem humana, enquanto o COL3 foi utilizado para preferencialmente para cultivar osteoblastos (Tabela 2). Entre as macromoléculas não-colágenas, GAGs, PEG e PLGA foram frequentemente usados para preparar *scaffolds*, enquanto apenas alguns exemplos estão disponíveis com outros compostos, como OPN, BSP e Pluronic® (Tabela 2).

Tabela 2. Resumo dos principais tipos de suportes à base de colágeno carregados de células preparados na presença e ausência de aditivos não-colágenos

<i>Fonte/ Tipo de colágeno</i>	<i>Macromolécula não-colágena</i>	<i>Células</i>	<i>REF</i>
Cauda rato/ COL1	não	SHED	320
		Fibroblastos	319
		Fibroblastos	285
		hMSCs	198
		hUVECs	
		Condrocitos	308
Osteoblastos	197		

	OPN	hMSCs hUVECs	329
	GAGs	Osteoclastos	344
Pele de ovelha/ COL1	X	Osteoblastos	100
Pele de porco/ COL1	PLGA	MC3T3	362
	Pluronic®	MC3T3	331
Cartilagem de porco/ COL11	GAGs	Condrocitos	337
Tendão de porco/ COL1	BSP	BMCs	335
Porco/ COL1	PLGA	Condrocitos	367
	PEG	Fibroblastos	27
Tendão bovino/ COL1	GAGs	MSCs murina	303,322,339,34 0,342,343
Couro bovino/ COL1	PLGA	Osteoblastos	363
	PLGA	MC3T3	364
	PLGA	hMSCs	62
N.A./ COL1	não	Fibroblastos Osteoblastos	282
	GAGs	hMSCs	345
	GAGs	hMSCs	346
	PLGA	MSCs murino	361
	PEG	Osteoblastos	368
Cartilagem humana/ COL2	não	Condrocitos	309
N.A./ COL3	PEG	Osteoblastos	368

N.D. não disponível na referência

4.3.3 Poli(metilmetacrilato) na fabricação de *scaffolds* em biomateriais

O polimetilmetacrilato (PMMA) é um polímero frequentemente utilizado como biomaterial para preenchimento de falhas ósseas devido a sua biocompatibilidade e conferência de estabilidade mecânica imediatamente após o implante.³⁷⁰ No entanto, quando preparado na forma de cimento, possui módulo de elasticidade mais elevado do que os ossos e essa diferença acaba por gerar uma camada de fibrose que envolve o material, tornando-o inerte. Apresenta também reação de polimerização exotérmica e, mais importante ainda, com redução de aproximadamente 3 a 7% de seu volume.³⁷¹ Estas características são responsáveis por ocasionar refraturas em corpos vertebrais adjacentes, pequenas rachaduras na interface osso cimento, desintegração do implante e até necrose do tecido hospedeiro.³⁷¹ A diminuição do volume do cimento ósseo após sua polimerização pode ser controlada por meio da introdução de materiais de enchimento, como nanopartículas, e pela porosidade deste, pois os poros podem expandir-se durante o endurecimento do cimento, ocasionando assim uma tensão para impedir redução de volume.³⁷¹ Nas modificações com nanopartículas destaca-se o uso de HA e demais CaP em cimentos ósseos. Estudos mostram que HA promove adesão, proliferação e diferenciação de osteoblastos.³⁷²⁻³⁷⁵ Desta forma, recentemente, compósitos produzidos a partir de PMMA e nanopartículas de fosfatos e carbonatos de cálcio estão sendo explorados devido às suas propriedades físicas e biológicas semelhantes às da ECM, visando superar as desvantagens e satisfazer os requisitos para um substituto ósseo ideal.³⁷² O aumento da porosidade destes materiais também ocasiona crescimento ósseo acelerado ao redor do substituto.³⁷⁶ Esses resultados indicam que o uso de cimentos porosos, modificados com nanopartículas bioativas podem ter elevado potencial biotecnológico como materiais para reparo de defeitos críticos em ossos.

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fabricação de membranas poliméricas bioativas contendo compostos naturais e nanopartículas é foco de uma das linhas de pesquisa de nosso grupo. Inicialmente, membranas de contendo um único componente orgânico foram preparadas utilizando-se carragenanas com diferentes graus de sulfatação e diferenças na habilidade de ligar Ca^{2+} (anexo IV.1). Neste estudo mostramos que maiores habilidades de ligar Ca^{2+} resultou em menor bioatividade das membranas, uma vez que disponibilizou tais íons para formação de CaCO_3 e posterior precipitação de HA. Este estudo foi um marco importante na linha de pesquisa envolvendo a formação de membranas bioativas, uma vez que comprovou a importância da organização da parte orgânica na precipitação controlada nos interstícios de um hidrogel, com propriedades semelhantes às de macromoléculas não-colágenas encontradas na

ECM, como as GAGs. As propriedades mecânicas das membranas foram investigadas por meio de determinações do módulo de Young. Os hidrogéis organizados na forma de hélices, como nas fibrilas de COL, apresentaram melhores parâmetros mecânicos. De forma a se aumentar a bioatividades das membranas, constructos 3D contendo carragenanas e COL hidrolisado foram preparados e investigados quanto à sua bioatividades (anexo IV.2). Os hidrogéis foram preparados em presença de H_3PO_4 e $CaCl_2$, expostos a atmosfera de $NH_3(g)$, para aumento de pH e precipitação controlada de HA. Esta metodologia levou à formação de membranas bioativas, contendo HA com morfologia acicular, semelhante à fase inorgânica dos ossos. Estes trabalhos destacam a importância de se conhecer a estrutura básica dos ossos, antes do preparo de materiais para regeneração e reparo deste tecido. As informações estruturais geradas pela fase orgânica são essenciais para precipitação mineral e, em consequência, a produção de materiais bioativos bioinspirados.

Dando um passo adiante, materiais porosos 3D contendo uma fase orgânicas, agora formada por PMMA e as nanopartículas descritas no Capítulo 3, foram obtidos. O artigo submetido para publicação (anexo IV.3), tal como a solicitação de patente destacam o potencial biotecnológico deste material. Além de possuírem propriedades mecânicas próximas a de ossos trabeculares, estes materiais promovem a liberação controlada de Sr^{2+} , o que pode auxiliar na rápida osteointegração. A Figura 9A traz de forma esquemática do que se espera quanto à adesão e invasão celular nestes materiais micro e nanoporosos. A Figura 9B traz uma imagem de micro-tomografia dos cimentos modificados em nosso laboratório, onde os pontos brilhantes nas superfícies dos poros evidenciam que as partículas inorgânicas contendo Sr^{2+} localizam-se em pontos acessíveis ao contato celular. A Figura 9C traz uma fotografia representativa dos materiais obtidos, que também deixa evidente sua estrutura de macroporos. Ainda, esses cimentos ósseos modificados com Sr^{2+} são materiais potencialmente aplicáveis também na regeneração de defeitos ósseos em pacientes osteoporóticos.

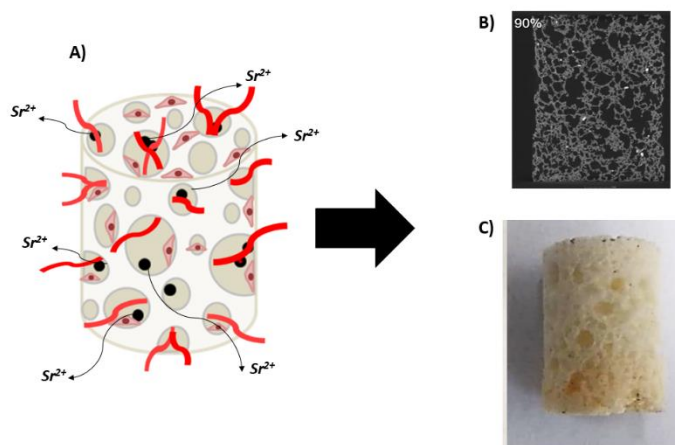


Figura 9. Exemplo de preparo de *scaffold* contendo nanopartículas. A) representação esquemática do cimento poroso de PMMA e sua interação com células osteogênicas, B) imagem de microtomografia dos cimentos modificados em nosso laboratório. Os pontos brilhantes nas superfícies dos poros evidenciam que as partículas inorgânicas contendo Sr^{2+} localizam-se em pontos acessíveis ao contato celular. C) fotografia representativa dos materiais obtidos, que também deixa evidente sua estrutura de macro-poros.

4.5 Conclusões e perspectivas

A inspiração para construir *scaffolds* baseados em COL carregado de células 3D para regeneração óssea deve ser focada nas propriedades deste tecido como um órgão para alcançar a orquestração perfeita de eventos físico-químicos e biológicos que culminam em um dos biomateriais mais inspiradores já conhecidos: o osso. O projeto da organização 3D das fibras de COL mineralizadas é um elemento basal dos materiais para a bioengenharia óssea. Simultaneamente, o efeito desses *scaffolds* sobre células competentes para mineralização como osteoblastos e condrócitos e osteoclastos devem ser considerados. A reconstrução *in vitro* do tecido ósseo usando abordagens biomiméticas que recapitulam a ECM óssea, e o processamento eficiente dessa estrutura hierárquica complexa permanece um desafio. Comparar os mecanismos e vias de sinalização envolvidos na mineralização celular em sistemas 2D e 3D *in vitro* pode ser um passo para a reconciliação da bioengenharia de materiais com a biologia celular. Neste sentido, caminhamos para estudos das respostas celulares de osteoblastos cultivados em presença desses materiais, como forma de se investigar a interconexão estrutura-ativação de caminhos osteogênicos. Por fim, os materiais 3D preparados com nanopartículas de HA contendo Sr^{2+} , que alia duas linhas de pesquisa do grupo, mostraram alto potencial de transposição laboratório-indústria.

Considerações Finais

Este texto sistematizado descreveu o trabalho realizado no Laboratório de Físico-Química de Superfícies e Colóides ao longo dos últimos 10 anos. A cronologia dos estudos iniciasse com a função de matrizes orgânicas contendo lipídeos e polímeros na nucleação e crescimento de biominerais, que permitiu estudos básicos relacionados ao processo de biomineralização, em especial carbonatos de cálcio. Em busca de uma aplicação para os materiais desenvolvidos, estes estudos foram expandidos para mineralização de fosfatos de cálcio sobre suportes de titânio e a resposta celular de osteoblastos cultivados sobre essas superfícies. Modelos mais complexos, com adição de colágeno e estudos aprofundados do comportamento celular por meio de ensaios de atividade de fosfatase alcalina, formação de matriz mineralizada (testes de vermelho de alizarina e quantificação de colágeno sintetizados pelas células) foram desenvolvidos. Além disso, a capacidade de se inserir enzimas em filmes de Langmuir, mantendo-se atividade enzimática após transferências para suportes de titânio, demonstrou a importância da matriz biomimética na obtenção de implantes bioativos e osteocondutores. Neste momento, caminhamos com testes *in vivo* destes materiais. É de suma importância destacar que estes estudos só são possíveis com o apoio de uma equipe multidisciplinar formada por pesquisadores das áreas de química, bioquímica e odontologia. Destaco, portanto, as colaborações nacionais com pesquisadores da área de bioquímica, Prof. Pietro Ciancaglini- USP-Ribeirão Preto, área de odontologia, como o Prof. Felippo Verri- UNESP-Araçatuba e internacionais, como o Prof. José Luís Millán (Sanford Burham Prebys Institute- San Diego- EUA).

O estudo com nanopartículas tubulares iniciou-se durante meu estágio de doutorado no exterior, na Universidade de Bristol- Inglaterra, sob supervisão da Dra. Fiona Meldrum. Após minha contratação como docente, com auxílio regular FAPESP, adquiri um limpador de superfícies por plasma, que permitiram continuar os estudos, no projeto de doutorado direto de Camila Tovani. Estudamos inicialmente a bioatividade e resposta celular de carbonatos de cálcio modificados com colágeno, carbonatos de estrôncio e, mais adiante fosfatos de estrôncio. Durante estágio BEPE, Camila foi orientada pela Dra. Nadine Nassif (Sorbonne Université- Paris), especialista em matrizes de colágeno, e pelo Dr. Alexandre Glotter (Université Paris Sud- Orsay), especialista em análises estruturais de alta-resolução como EXAFS e HR-TEM. Estas colaborações foram primordiais para aumentar o impacto das publicações de nosso laboratório. Os resultados promissores com estrôncio nos permitem, no momento, sintetizar novos complexos contendo este íon como potenciais substitutos do fármaco ranelato de estrôncio, para tratamento de osteoporose, tais como as vias de sinalização ativadas por essas moléculas em culturas de osteoblastos e osteoclastos, com a colaboração da Profa. Sandra Fukada-FCFRP/USP. Também investigamos os efeitos de nanopartículas contendo estrôncio na remineralização dentinária, com foco no tratamento de hipersensibilidade, em colaboração com a

Profa. Alma Catirse-FORP/USP. Esta temática é um dos assuntos investigados no auxílio regular FAPESP vigente.

Por fim, matrizes tridimensionais contendo colágeno e macromoléculas não-colágenas começaram a ser desenvolvidas recentemente em nosso grupo. O uso dessas matrizes para cultura de osteoblastos e condrócitos e as vias de sinalização por elas ativadas estão sendo estudadas em colaboração com Prof. Massimo Bottini (Universidade de Roma Tor Vergata- Itália), por meio da tutela do aluno de doutorado Lucas Nogueira, em convênio de duplo-diploma. Com relação ao desenvolvimento de modelos 3D para cultura celular e potencial aplicação como substitutos ósseos, recentemente aprovamos em colaboração com a Dra. Bianca Maníglia, projeto Jovem Pesquisador-FAPESP, no qual iremos adquirir impressora 3D. Em colaboração com o Prof. Edgard Engel (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP) obtivemos cimentos ósseos porosos constituídos por PMMA e Sr-HA, cujo pedido de patente foi depositado junto ao INPI.

No momento, atuo como Pesquisadora Associada a Projeto Temático FAPESP sob coordenação do Prof. Pietro Ciancaglini. A temática central do projeto é relacionada à função de biogênese de vesículas de matriz. Contribuímos na elucidação de interação entre fosfatases e membranas lipídicas e mineralização guiada por lipídeos. Ainda, o possível envolvimento da mitofagia no processo de mineralização é investigado no projeto de doutorado do aluno Marcos Cruz, que durante estágio BEPE de mestrado na Universidade de Berkeley-Califórnia, aprendeu a isolar e obter colágeno-tipo I fibrilar. O mesmo aluno realizou estágio de doutorado por 2 meses no laboratório do Prof. Rene Buchet, Université Lyon 1-França para aprender a isolar e caracterizar vesículas da matriz. Essa temática é também assunto relacionado ao projeto USP-COFECUB, vigente (2020/2022), em colaboração com a Profa. Saida Mebarek, Université Lyon 1-França, no qual atuo como pesquisadora associada à equipe.

Por fim, destaco a importância do suporte da Universidade de São Paulo e das agências de fomentos, em especial à FAPESP no desenvolvimento desta pesquisa multidisciplinar. Além da possibilidade de formação de recursos humanos, colaborações nacionais e internacionais, o alto potencial aplicado dessas linhas de pesquisa pode beneficiar diretamente a sociedade. Se há 10 anos atrás me perguntassem onde eu queria estar no futuro, eu diria que é exatamente onde estou e que não me falte motivação para continuar!

REFERÊNCIAS

- (1) Mann, S.; Archibald, D. D.; Didymus, J. M.; Douglas, T.; Heywood, B. R.; Meldrum, F. C.; Reeves, N. J. Crystallization at Inorganic-Organic Interfaces: Biominerals and Biomimetic Synthesis. *Science* (80-.). **1993**, *261* (5126), 1286–1292. <https://doi.org/10.1126/science.261.5126.1286>.
- (2) Lowenstam, H. A.; Weiner, S. *On Biomineralization*; Oxford University Press: New York, 1989.
- (3) Murshed, M. Mechanism of Bone Mineralization. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. NLM (Medline) December 2018. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a031229>.
- (4) Wang, Y.; Azais, T.; Robin, M.; Vallée, A.; Catania, C.; Legriél, P.; Pehau-Arnaudet, G.; Babonneau, F.; Giraud-Guille, M. M.; Nassif, N. The Predominant Role of Collagen in the Nucleation, Growth, Structure and Orientation of Bone Apatite. *Nat. Mater.* **2012**, *11* (8), 724–733. <https://doi.org/10.1038/nmat3362>.
- (5) Nudelman, F.; Pieterse, K.; George, A.; Bomans, P. H. H.; Friedrich, H.; Brylka, L. J.; Hilbers, P. a J.; de With, G.; Sommerdijk, N. a J. M. The Role of Collagen in Bone Apatite Formation in the Presence of Hydroxyapatite Nucleation Inhibitors. *Nat. Mater.* **2010**, *9* (12), 1004–1009. <https://doi.org/10.1038/nmat2875>.
- (6) Mozafari, M.; Banijamali, S.; Bairo, F.; Kargozar, S.; Hill, R. G. Calcium Carbonate: Adored and Ignored in Bioactivity Assessment. *Acta Biomater.* **2019**, *91*, 35–47. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.04.039>.
- (7) Dandeu, A.; Humbert, B.; Carteret, C.; Muhr, H.; Plasari, E.; Bossoutrot, J. M. Raman Spectroscopy - A Powerful Tool for the Quantitative Determination of the Composition of Polymorph Mixtures: Application to CaCO₃ Polymorph Mixtures. *Chem. Eng. Technol.* **2006**, *29* (2), 221–225. <https://doi.org/10.1002/ceat.200500354>.
- (8) Addadi, L.; Raz, S.; Weiner, S. Taking Advantage of Disorder: Amorphous Calcium Carbonate and Its Roles in Biomineralization. *Advanced Materials*. 2003, pp 959–970. <https://doi.org/10.1002/adma.200300381>.
- (9) Brownlee, C.; Wheeler, G. L.; Taylor, A. R. Coccolithophore Biomineralization: New Questions, New Answers. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. Academic Press October 2015, pp 11–16. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2015.10.027>.
- (10) Tushtev, K.; Murck, M.; Grathwohl, G. On the Nature of the Stiffness of Nacre. *Mater. Sci. Eng. C* **2008**, *28* (7), 1164–1172. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2007.10.039>.
- (11) Fidler, A. L.; Boudko, S. P.; Rokas, A.; Hudson, B. G. The Triple Helix of Collagens - An Ancient Protein Structure That Enabled Animal Multicellularity and Tissue Evolution. *Journal of Cell Science*. April 2018, p jcs203950. <https://doi.org/10.1242/jcs.203950>.
- (12) Icer, M. A.; Gezmen-Karadag, M. The Multiple Functions and Mechanisms of Osteopontin. *Clin. Biochem.* **2018**, *59*, 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2018.07.003>.
- (13) Ganss, B.; Kim, R. H.; Sodek, J. Bone Sialoprotein. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* **1999**, *10* (1), 79–98. <https://doi.org/10.1177/10454411990100010401>.
- (14) Pereira, L.; Amado, A. M.; Critchley, A. T.; van de Velde, F.; Ribeiro-Claro, P. J. a. Identification of Selected Seaweed Polysaccharides (Phycocolloids) by Vibrational Spectroscopy (FTIR-ATR and FT-Raman). *Food Hydrocoll.* **2009**, *23* (7), 1903–1909. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.11.014>.
- (15) Weiner, S.; Traub, W. Organization of Hydroxyapatite Crystals within Collagen Fibrils. *FEBS Lett.* **1986**, *206* (2), 262–266.
- (16) Haimov, H.; Shimoni, E.; Brumfeld, V.; Shemesh, M.; Varsano, N.; Addadi, L.; Weiner, S. Mineralization Pathways in the Active Murine Epiphyseal Growth Plate. *Bone* **2020**, *130* (September 2019). <https://doi.org/10.1016/j.bone.2019.115086>.
- (17) Weiner, S.; Addadi, L. Crystallization Pathways in Biomineralization. *Annu. Rev. Mater. Res.* **2011**, *41* (1), 21–40.

<https://doi.org/10.1146/annurev-matsci-062910-095803>.

- (18) Liu, H.; Zhu, Y.; Mao, Z.; Ning, C. Nacre-Like Calcium Carbonate Nanoarchitectures. *Nanosci. Nanotechnol. Lett.* **2011**, *3* (3), 446–450. <https://doi.org/10.1166/nnl.2011.1168>.
- (19) Volkmer, D.; Harms, M.; Gower, L.; Ziegler, A. Morphosynthesis of Nacre-Type Laminated CaCO₃ Thin Films and Coatings. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, *44* (4), 639–644. <https://doi.org/10.1002/anie.200461386>.
- (20) Guo, Y. P.; Zhou, Y. Conversion of Nacre Powders to Apatite in Phosphate Buffer Solutions at Low Temperatures. *Mater. Chem. Phys.* **2007**, *106* (1), 88–94. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2007.05.022>.
- (21) Nogueira, L. F. B.; Maniglia, B. C.; Pereira, L. S.; Tapia-Blácido, D. R.; Ramos, A. P. Formation of Carrageenan-CaCO₃ Bioactive Membranes. *Mater. Sci. Eng. C* **2016**, *58*, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.08.021>.
- (22) Qu, H.; Fu, H.; Han, Z.; Sun, Y. Biomaterials for Bone Tissue Engineering Scaffolds: A Review. *RSC Adv.* **2019**, *9* (45), 26252–26262. <https://doi.org/10.1039/c9ra05214c>.
- (23) Pereira, H. F.; Cengiz, I. F.; Silva, F. S.; Reis, R. L.; Oliveira, J. M. Scaffolds and Coatings for Bone Regeneration. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2020**, *31* (3), 27. <https://doi.org/10.1007/s10856-020-06364-y>.
- (24) Lima, A. C.; Batista, P.; Valente, T. A. M.; Silva, A. S.; Correia, I. J.; Mano, J. F. Novel Methodology Based on Biomimetic Superhydrophobic Substrates to Immobilize Cells and Proteins in Hydrogel Spheres for Applications in Bone Regeneration. *Tissue Eng. - Part A* **2013**, *19* (9–10), 1175–1187. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2012.0249>.
- (25) Mansoorifar, A.; Subbiah, R.; Balbinot, G. de S.; Parthiban, S. P.; Bertassoni, L. E. Embedding Cells within Nanoscale, Rapidly Mineralizing Hydrogels: A New Paradigm to Engineer Cell-Laden Bone-like Tissue. *J. Struct. Biol.* **2020**, *212* (3), 107636. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2020.107636>.
- (26) Bai, X.; Gao, M.; Syed, S.; Zhuang, J.; Xu, X.; Zhang, X. Q. Bioactive Hydrogels for Bone Regeneration. *Bioact. Mater.* **2018**, *3* (4), 401–417. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2018.05.006>.
- (27) Sargeant, T. D.; Desai, A. P.; Banerjee, S.; Agawu, A.; Stopek, J. B. An in Situ Forming Collagen-PEG Hydrogel for Tissue Regeneration. *Acta Biomater.* **2012**, *8* (1), 124–132. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.07.028>.
- (28) Zhang, L.-J.; Liu, H.-G.; Zhang, R.-J.; Zhang, L.; Qian, D.-J.; Mu, Y.-D.; Yu, X.-L.; Feng, X.-S. The Mineralization Process of Calcium Phosphate Induced by the LB Films of Porphyrin. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2005**, *257–258*, 307–312. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2004.10.041>.
- (29) Zhang, L.-J.; Liu, H.-G.; Feng, X.-S.; Zhang, R.-J.; Zhang, L.; Mu, Y.-D.; Hao, J.-C.; Qian, D.-J.; Lou, Y.-F. Mineralization Mechanism of Calcium Phosphates under Three Kinds of Langmuir Monolayers. *Langmuir* **2004**, *20* (6), 2243–2249.
- (30) Zhang, L.-J.; Liu, H.-G.; Feng, X.-S.; Qian, D.-J.; Zhang, L.; Yu, X.-L.; Feng, Q.-L. Study on Growth of Hydroxyapatite Induced by Dipalmitoylphosphatidylcholine Langmuir Monolayer. *Thin Solid Films* **2004**, *458* (1–2), 287–291. <https://doi.org/10.1016/j.tsf.2003.11.296>.
- (31) Cruz, M. A. E.; Zanatta, M. B. T.; da Veiga, M. A. M. S.; Ciancaglini, P.; Ramos, A. P. Lipid-Mediated Growth of SrCO₃/CaCO₃ Hybrid Films as Bioactive Coatings for Ti Surfaces. *Mater. Sci. Eng. C* **2019**, *99*, 762–769. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.02.023>.
- (32) Ramos, A. P.; Nobre, T. M.; Montoro, L. A.; Zaniquelli, M. E. D. Calcium Carbonate Particle Growth Depending on Coupling among Adjacent Layers in Hybrid LB/LbL Films. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112* (46), 14648–14654. <https://doi.org/10.1021/jp8023793>.
- (33) Cruz, M. A. E.; Ferreira, C. R.; Tovani, C. B.; de Oliveira, F. A.; Bolean, M.; Caseli, L.; Mebarek, S.; Luis Millán, J.; Buchet, R.; Bottini, M.; Ciancaglini, P.; Paula Ramos, A. Phosphatidylserine Controls Calcium Phosphate Nucleation and Growth on Lipid Monolayers: A Physicochemical Understanding of Matrix Vesicle-Driven Biomineralization. *J. Struct. Biol.* **2020**, *212* (2), 107607. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2020.107607>.

- (34) Andrade, M. A. R.; Derradi, R.; Simão, A. M. S.; Millán, J. L.; Ramos, A. P.; Ciancaglini, P.; Bolean, M. Is Alkaline Phosphatase Biomimetically Immobilized on Titanium Able to Propagate the Biomineralization Process? *Arch. Biochem. Biophys.* **2019**, *663* (January), 192–198. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2019.01.014>.
- (35) Loste, E.; Meldrum, F. C. Control of Calcium Carbonate Morphology by Transformation of an Amorphous Precursor in a Constrained Volume. *Chem. Commun.* **2001**, *1* (10), 901–902. <https://doi.org/10.1039/b101563j>.
- (36) Loste, E.; Park, R. J.; Warren, J.; Meldrum, F. C. Precipitation of Calcium Carbonate in Confinement. *Adv. Funct. Mater.* **2004**, *14* (12), 1211–1220. <https://doi.org/10.1002/adfm.200400268>.
- (37) Yue, W.; Kulak, A. N.; Meldrum, F. C. Growth of Single Crystals in Structured Templates. *J. Mater. Chem.* **2006**, *16* (4), 408–416. <https://doi.org/10.1039/b513802g>.
- (38) Tovani, C. B.; Oliveira, T. M.; Gloter, A.; Ramos, A. P. Sr²⁺-Substituted CaCO₃ Nanorods: Impact on the Structure and Bioactivity. *Cryst. Growth Des.* **2018**, *18* (5), 2932–2940. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.8b00017>.
- (39) Tovani, C. B.; Zancanela, D. C.; Faria, A. N.; Ciancaglini, P.; Ramos, A. P. Bio-Inspired Synthesis of Hybrid Tube-like Structures Based on CaCO₃ and Type I-Collagen. *RSC Adv.* **2016**, *6* (93), 90509–90515. <https://doi.org/10.1039/C6RA18984A>.
- (40) Tovani, C. B.; Oliveira, T. M.; Soares, M. P. R.; Nassif, N.; Fukada, S. Y.; Ciancaglini, P.; Gloter, A.; Ramos, A. P. Strontium Calcium Phosphate Nanotubes as Bioinspired Building Blocks for Bone Regeneration. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020**, *12* (39), 43422–43434. <https://doi.org/10.1021/acsami.0c12434>.
- (41) Liu, Y.; Jiang, T.; Zhou, Y.; Zhang, Z.; Wang, Z.; Tong, H.; Shen, X.; Wang, Y. Evaluation of the Attachment, Proliferation, and Differentiation of Osteoblast on a Calcium Carbonate Coating on Titanium Surface. *Mater. Sci. Eng. C* **2011**, *31* (5), 1055–1061. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2011.03.003>.
- (42) Yukna, R. A.; Yukna, C. N. A 5-Year Follow-up of 16 Patients Treated with Coralline Calcium Carbonate (Biocoral™) Bone Replacement Grafts in Infrabony Defects. *J. Clin. Periodontol.* **1998**, *25* (12), 1036–1040. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.1998.tb02410.x>.
- (43) Cruz, M. A. E.; Ruiz, G. C. M.; Faria, A. N.; Zancanela, D. C.; Pereira, L. S.; Ciancaglini, P.; Ramos, A. P. Calcium Carbonate Hybrid Coating Promotes the Formation of Biomimetic Hydroxyapatite on Titanium Surfaces. *Appl. Surf. Sci.* **2016**, *370*, 459–468. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2015.12.250>.
- (44) Redey, S. A.; Razzouk, S.; Rey, C.; Bernache-Assollant, D.; Leroy, G.; Nardin, M.; Cournot, G. Osteoclast Adhesion and Activity on Synthetic Hydroxyapatite, Carbonated Hydroxyapatite, and Natural Calcium Carbonate: Relationship to Surface Energies. *J. Biomed. Mater. Res.* **1999**, *45* (2), 140–147. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(199905\)45:2<140::AID-JBM9>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(199905)45:2<140::AID-JBM9>3.0.CO;2-I).
- (45) Meldrum, F. C. Calcium Carbonate in Biomineralisation and Biomimetic Chemistry. *Int. Mater. Rev.* **2003**, *48* (3), 187–224. <https://doi.org/10.1179/095066003225005836>.
- (46) Daculsi, G.; LeGeros, R. Z.; Heughebaert, M.; Barbieux, I. Formation of Carbonate-Apatite Crystals after Implantation of Calcium Phosphate Ceramics. *Calcif. Tissue Int.* **1990**, *46* (1), 20–27.
- (47) Vuola, J.; Göransson, H.; Böhling, T.; Asko-Seljavaara, S. Bone Marrow Induced Osteogenesis in Hydroxyapatite and Calcium Carbonate Implants. *Biomaterials* **1996**, *17* (18), 1761–1766.
- (48) Brown, J. L.; Laurencin, C. T. Bone Tissue Engineering. In *Biomaterials Science*; Elsevier, 2020; pp 1373–1388. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816137-1.00085-4>.
- (49) Liu, Y.; Luo, D.; Wang, T. Hierarchical Structures of Bone and Bioinspired Bone Tissue Engineering. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*. September 2016, pp 4611–4632. <https://doi.org/10.1002/smll.201600626>.
- (50) Kołodziejska, B.; Kafalak, A.; Kolmas, J. Biologically Inspired Collagen/Apatite Composite Biomaterials for Potential Use in Bone Tissue Regeneration—A Review. *Materials (Basel)*. **2020**, *13* (7), 1748. <https://doi.org/10.3390/ma13071748>.

- (51) Du, Y.; Guo, J. L.; Wang, J.; Mikos, A. G.; Zhang, S. Hierarchically Designed Bone Scaffolds: From Internal Cues to External Stimuli. *Biomaterials*. Elsevier October 2019, p 119334. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119334>.
- (52) Wegst, U. G. K.; Bai, H.; Saiz, E.; Tomsia, A. P.; Ritchie, R. O. Bioinspired Structural Materials. *Nat. Mater.* **2015**, *14* (1), 23–36. <https://doi.org/10.1038/nmat4089>.
- (53) de Wildt, B. W. M.; Ansari, S.; Sommerdijk, N. A. J. M.; Ito, K.; Akiva, A.; Hofmann, S. From Bone Regeneration to Three-Dimensional in Vitro Models: Tissue Engineering of Organized Bone Extracellular Matrix. *Curr. Opin. Biomed. Eng.* **2019**, *10*, 107–115. <https://doi.org/10.1016/j.cobme.2019.05.005>.
- (54) Reznikov, N.; Shahar, R.; Weiner, S. Bone Hierarchical Structure in Three Dimensions. *Acta Biomater.* **2014**, *10* (9), 3815–3826. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.05.024>.
- (55) Rasheed, T.; Bilal, M.; Zhao, Y.; Raza, A.; Shah, S. Z. H.; Iqbal, H. M. N. Physicochemical Characteristics and Bone/Cartilagene Tissue Engineering Potentialities of Protein-Based Macromolecules — A Review. *International Journal of Biological Macromolecules*. January 2019, pp 13–22. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.009>.
- (56) Liou, S.-C.; Chen, S.-Y.; Lee, H.-Y.; Bow, J.-S. Structural Characterization of Nano-Sized Calcium Deficient Apatite Powders. *Biomaterials* **2004**, *25* (2), 189–196. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00479-4](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00479-4).
- (57) Li, P.; Ducheyne, P. Quasi-Biological Apatite Film Induced by Titanium in a Simulated Body Fluid. *J. Biomed. Mater. Res.* **1998**, *41* (3), 341–348. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(19980905\)41:3<341::AID-JBM1>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(19980905)41:3<341::AID-JBM1>3.0.CO;2-C).
- (58) Griffanti, G.; Nazhat, S. N. Dense Fibrillar Collagen-Based Hydrogels as Functional Osteoid-Mimicking Scaffolds. *Int. Mater. Rev.* **2020**, *0* (0), 1–20. <https://doi.org/10.1080/09506608.2020.1735828>.
- (59) Scott, R. A.; Panitch, A. Glycosaminoglycans in Biomedicine. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology* **2013**, *5* (4), 388–398. <https://doi.org/10.1002/wnan.1223>.
- (60) Kadler, K. E.; Hill, A.; Canty-Laird, E. G. Collagen Fibrillogenesis: Fibronectin, Integrins, and Minor Collagens as Organizers and Nucleators. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2008**, *20* (5), 495–501. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2008.06.008>.
- (61) Wang, W.; Yeung, K. W. K. Bone Grafts and Biomaterials Substitutes for Bone Defect Repair: A Review. *Bioact. Mater.* **2017**, *2* (4), 224–247. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2017.05.007>.
- (62) Chen, Y.; Lee, K.; Yang, Y.; Kawazoe, N.; Chen, G. PLGA-Collagen-ECM Hybrid Meshes Mimicking Stepwise Osteogenesis and Their Influence on the Osteogenic Differentiation of HMSCs. *Biofabrication* **2020**, *12* (2), 1–14. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/ab782b>.
- (63) Ono, N.; Balani, D. H.; Kronenberg, H. M. Stem and Progenitor Cells in Skeletal Development. In *Current Topics in Developmental Biology*; 2019; Vol. 133, pp 1–24. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2019.01.006>.
- (64) Prideaux, M.; Findlay, D. M.; Atkins, G. J. Osteocytes: The Master Cells in Bone Remodelling. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2016**, *28*, 24–30. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2016.02.003>.
- (65) Pajarinen, J.; Lin, T.; Gibon, E.; Kohno, Y.; Maruyama, M.; Nathan, K.; Lu, L.; Yao, Z.; Goodman, S. B. Mesenchymal Stem Cell-Macrophage Crosstalk and Bone Healing. *Biomaterials* **2019**, *196*, 80–89. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.12.025>.
- (66) Radhakrishnan, S.; Nagarajan, S.; Bechelany, M.; Kalkura, S. N. Collagen Based Biomaterials for Tissue Engineering Applications: A Review. In *Lecture Notes in Earth System Sciences*; 2020; pp 3–22. https://doi.org/10.1007/978-3-030-21614-6_1.
- (67) Lin, K.; Zhang, D.; Macedo, M. H.; Cui, W.; Sarmiento, B.; Shen, G. Advanced Collagen-Based Biomaterials for Regenerative Biomedicine. *Adv. Funct. Mater.* **2019**, *29* (3), 1804943. <https://doi.org/10.1002/adfm.201804943>.
- (68) Gorres, K. L.; Raines, R. T. Prolyl 4-Hydroxylase. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2010**, *45* (2), 106–124.

- <https://doi.org/10.3109/10409231003627991>.
- (69) Nudelman, F.; Lausch, A. J.; Sommerdijk, N. A. J. M.; Sone, E. D. In Vitro Models of Collagen Biomineralization. *J. Struct. Biol.* **2013**, *183* (2), 258–269. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2013.04.003>.
- (70) Ilmer, M.; Karow, M.; Geissler, C.; Jochum, M.; Neth, P. Human Osteoblast–Derived Factors Induce Early Osteogenic Markers in Human Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Eng. Part A* **2009**, *15* (9), 2397–2409. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2008.0427>.
- (71) Kmiecik, G.; Spoldi, V.; Silini, A.; Parolini, O. Current View on Osteogenic Differentiation Potential of Mesenchymal Stromal Cells Derived from Placental Tissues. *Stem Cell Rev. Reports* **2015**, *11* (4), 570–585. <https://doi.org/10.1007/s12015-014-9569-1>.
- (72) Liu, Y.; Kuang, B.; Rothrauff, B. B.; Tuan, R. S.; Lin, H. Robust Bone Regeneration through Endochondral Ossification of Human Mesenchymal Stem Cells within Their Own Extracellular Matrix. *Biomaterials* **2019**, *218*, 119336. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119336>.
- (73) Aghajanian, P.; Mohan, S. The Art of Building Bone: Emerging Role of Chondrocyte-to-Osteoblast Transdifferentiation in Endochondral Ossification. *Bone Res.* **2018**, *6* (1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41413-018-0021-z>.
- (74) Qasim, M.; Chae, D. S.; Lee, N. Advancements and Frontiers in Nano-Based 3d and 4d Scaffolds for Bone and Cartilage Tissue Engineering. *Int. J. Nanomedicine* **2019**, *14*, 4333–4351. <https://doi.org/10.2147/IJN.S209431>.
- (75) Breathwaite, E. K.; Weaver, J. R.; Murchison, A. C.; Treadwell, M. L.; Odanga, J. J.; Lee, J. B. Scaffold-Free Bioprinted Osteogenic and Chondrogenic Systems to Model Osteochondral Physiology. *Biomed. Mater.* **2019**, *14* (6), 065010. <https://doi.org/10.1088/1748-605X/ab4243>.
- (76) McNamara, L. M. Bone as a Material. In *Comprehensive Biomaterials II*; Elsevier, 2017; pp 202–227. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803581-8.10127-4>.
- (77) Berendsen, A. D.; Olsen, B. R. Bone Development. *Bone* **2015**, *80*, 14–18. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2015.04.035>.
- (78) Wu, L. N. Y.; Genge, B. R.; Lloyd, G. C.; Wuthier, R. E. Collagen-Binding Proteins in Collagenase-Released Matrix Vesicles from Cartilage. Interaction between Matrix Vesicles Proteins and Different Types of Collagen. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266* (2), 1195–1203. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)35301-2](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)35301-2).
- (79) Engler, A. J.; Sen, S.; Sweeney, H. L.; Discher, D. E. Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. *Cell* **2006**, *126* (4), 677–689. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.044>.
- (80) Bottini, M.; Mebarek, S.; Anderson, K. L.; Strzelecka-Kiliszek, A.; Bozycki, L.; Simão, A. M. S.; Bolean, M.; Ciancaglini, P.; Pikula, J. B.; Pikula, S.; Magne, D.; Volkmann, N.; Hanein, D.; Millán, J. L.; Buchet, R. Matrix Vesicles from Chondrocytes and Osteoblasts: Their Biogenesis, Properties, Functions and Biomimetic Models. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **2018**, *1862* (3), 532–546. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.11.005>.
- (81) Plaut, J. S.; Strzelecka-Kiliszek, A.; Bozycki, L.; Pikula, S.; Buchet, R.; Mebarek, S.; Chadli, M.; Bolean, M.; Simao, A. M. S.; Ciancaglini, P.; Magrini, A.; Rosato, N.; Magne, D.; Girard-Egrot, A.; Farquharson, C.; Esener, S. C.; Millan, J. L.; Bottini, M. Quantitative Atomic Force Microscopy Provides New Insight into Matrix Vesicle Mineralization. *Arch. Biochem. Biophys.* **2019**, *667*, 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2019.04.003>.
- (82) Wuthier, R. E. Mechanism of De Novo Mineral Formation by Matrix Vesicles. *Connect. Tissue Res.* **1989**, *22* (1–4), 653–659. <https://doi.org/10.3109/03008208909114117>.
- (83) Anderson, H. C. Matrix Vesicles and Calcification. *Curr. Rheumatol. Rep.* **2003**, *5* (3), 222–226. <https://doi.org/10.1007/s11926-003-0071-z>.
- (84) Zhang, X.; Wang, Y.; Manh, N.; Wang, H.; Zhong, X.; Li, C. Synergistic Intrafibrillar/Extracellular Matrix Mineralization of Collagen Scaffolds Based on a Biomimetic Strategy to Promote the Regeneration of Bone Defects. *Int. J. Nanomedicine* **2016**, *11*, 2053. <https://doi.org/10.2147/IJN.S102844>.

- (85) Nair, A. K.; Gautieri, A.; Buehler, M. J. Role of Intrafibrillar Collagen Mineralization in Defining the Compressive Properties of Nascent Bone. *Biomacromolecules* **2014**, *15* (7), 2494–2500. <https://doi.org/10.1021/bm5003416>.
- (86) Schwarcz, H. P.; Abueidda, D.; Jasiuk, I. The Ultrastructure of Bone and Its Relevance to Mechanical Properties. *Front. Phys.* **2017**, *5* (SEP). <https://doi.org/10.3389/fphy.2017.00039>.
- (87) Lin, M.; Liu, H.; Deng, J.; An, R.; Shen, M.; Li, Y.; Zhang, X. Carboxymethyl Chitosan as a Polyampholyte Mediating Intrafibrillar Mineralization of Collagen via Collagen/ACP Self-Assembly. *J. Mater. Sci. Technol.* **2019**, *35* (9), 1894–1905. <https://doi.org/10.1016/j.jmst.2019.05.010>.
- (88) Li, J.; Chen, M.; Fan, X.; Zhou, H. Recent Advances in Bioprinting Techniques: Approaches, Applications and Future Prospects. *J. Transl. Med.* **2016**, *14* (1), 271. <https://doi.org/10.1186/s12967-016-1028-0>.
- (89) Shin, K.; Acri, T.; Geary, S.; Salem, A. K. Biomimetic Mineralization of Biomaterials Using Simulated Body Fluids for Bone Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Tissue Eng. Part A* **2017**, *23* (19–20), 1169–1180. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2016.0556>.
- (90) Ho-Shui-Ling, A.; Bolander, J.; Rustom, L. E.; Johnson, A. W.; Luyten, F. P.; Picart, C. Bone Regeneration Strategies: Engineered Scaffolds, Bioactive Molecules and Stem Cells Current Stage and Future Perspectives. *Biomaterials* **2018**, *180*, 143–162. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.07.017>.
- (91) Iaquinta, M.; Mazzoni, E.; Manfrini, M.; D’Agostino, A.; Trevisiol, L.; Nocini, R.; Trombelli, L.; Barbanti-Brodano, G.; Martini, F.; Tognon, M. Innovative Biomaterials for Bone Regrowth. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20* (3), 618. <https://doi.org/10.3390/ijms20030618>.
- (92) Wan, Z.; Zhang, P.; Liu, Y.; Lv, L.; Zhou, Y. Four-Dimensional Bioprinting: Current Developments and Applications in Bone Tissue Engineering. *Acta Biomater.* **2020**, *101*, 26–42. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.10.038>.
- (93) Lopes, D.; Martins-Cruz, C.; Oliveira, M. B.; Mano, J. F. Bone Physiology as Inspiration for Tissue Regenerative Therapies. *Biomaterials* **2018**, *185*, 240–275. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.09.028>.
- (94) Qu, H.; Fu, H.; Han, Z.; Sun, Y. Biomaterials for Bone Tissue Engineering Scaffolds: A Review. *RSC Advances*. Royal Society of Chemistry 2019, pp 26252–26262. <https://doi.org/10.1039/c9ra05214c>.
- (95) Paterlini, T. T.; Nogueira, L. F. B.; Tovani, C. B.; Cruz, M. A. E.; Derradi, R.; Ramos, A. P. The Role Played by Modified Bioinspired Surfaces in Interfacial Properties of Biomaterials. *Biophys. Rev.* **2017**, 683–698. <https://doi.org/10.1007/s12551-017-0306-2>.
- (96) de Faria, A. N.; Cruz, M. A. E.; Ruiz, G. C. M.; Zancanela, D. C.; Ciancaglini, P.; Ramos, A. P. Different Compact Hybrid Langmuir–Blodgett-Film Coatings Modify Biomineralization and the Ability of Osteoblasts to Grow. *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* **2018**, *106* (7), 2524–2534. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34069>.
- (97) Ramos, A. P.; Doro, F. G.; Tfouni, E.; Gonçalves, R. R.; Zaniquelli, M. E. D. Surface Modification of Metals by Calcium Carbonate Thin Films on a Layer-by-Layer Polyelectrolyte Matrix. *Thin Solid Films* **2008**, *516* (10), 3256–3262. <https://doi.org/10.1016/j.tsf.2007.12.047>.
- (98) Cruz, M. A. E.; Soares, M. P. R.; Pazin, W.; Ito, A. S.; Fukada, S. Y.; Ciancaglini, P.; Ramos, A. P. Interface-Driven Sr-Morin Complexation at Langmuir Monolayers for Bioactive Coating Design. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2019**, *181* (March), 856–863. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.06.039>.
- (99) de Souza, I. D.; Cruz, M. A. E.; de Faria, A. N.; Zancanela, D. C.; Simão, A. M. S.; Ciancaglini, P.; Ramos, A. P. Formation of Carbonated Hydroxyapatite Films on Metallic Surfaces Using Dihexadecyl Phosphate–LB Film as Template. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2014**, *118*, 31–40. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.03.029>.
- (100) Ruiz, G. C. M.; Cruz, M. A. E.; Faria, A. N.; Zancanela, D. C.; Ciancaglini, P.; Ramos, A. P. Biomimetic Collagen/Phospholipid Coatings Improve Formation of Hydroxyapatite Nanoparticles on Titanium. *Mater. Sci. Eng. C* **2017**, *77*, 102–110. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.204>.
- (101) ESCH, T. H.; BARBIRATO, D. D. S.; FOGACCI, M. F.; MAGRO, O. D. O.; BARROS, M. C. M. De. Tissue Healing with Polypropylene Membrane Used as Conventional Guided Bone Regeneration and Exposed to the Oral Cavity for

- Post-Dental Extraction: A Case Report. *Rio Janeiro Dent. J. (Revista Científica do CRO-RJ)* **2018**, 3 (2), 52–56. <https://doi.org/10.29327/24816.3.2-10>.
- (102) Zhang, D.; Wu, X.; Chen, J.; Lin, K. The Development of Collagen Based Composite Scaffolds for Bone Regeneration. *Bioact. Mater.* **2018**, 3 (1), 129–138. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2017.08.004>.
- (103) Saji, V. S.; Choe, H. C.; Young, K. W. K. Nanotechnology in Biomedical Applications-A Review. *Int. J. Nano Biomater.* **2010**, 3 (October), 119–139.
- (104) Castner, D. G.; Ratner, B. D. *Biomedical Surface Science: Foundations to Frontiers*; 2002; Vol. 500. [https://doi.org/10.1016/S0039-6028\(01\)01587-4](https://doi.org/10.1016/S0039-6028(01)01587-4).
- (105) Moyano, D. F.; Rotello, V. M. Nano Meets Biology: Structure and Function at the Nanoparticle Interface. *Langmuir* **2011**, 27 (17), 10376–10385. <https://doi.org/10.1021/la2004535>.
- (106) Yim, E. K. F.; Darling, E. M.; Kulangara, K.; Guilak, F.; Leong, K. W. Nanotopography-Induced Changes in Focal Adhesions, Cytoskeletal Organization, and Mechanical Properties of Human Mesenchymal Stem Cells. *Biomaterials* **2010**, 31 (6), 1299–1306. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.10.037>.
- (107) McNamara, L. E.; McMurray, R. J.; Biggs, M. J. P.; Kantawong, F.; Oreffo, R. O. C.; Dalby, M. J. Nanotopographical Control of Stem Cell Differentiation. *J. Tissue Eng.* **2010**, 2010 (1), 120623. <https://doi.org/10.4061/2010/120623>.
- (108) Menzies, K. L.; Jones, L. The Impact of Contact Angle on the Biocompatibility of Biomaterials. *Optom. Vis. Sci.* **2010**, 87 (6), 387–399. <https://doi.org/10.1097/OPX.0b013e3181da863e>.
- (109) Fadeel, B.; Garcia-Bennett, A. E. Better Safe than Sorry: Understanding the Toxicological Properties of Inorganic Nanoparticles Manufactured for Biomedical Applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2010**, 62 (3), 362–374. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.11.008>.
- (110) Gupta, A. K.; Naregalkar, R. R.; Vaidya, V. D.; Gupta, M. Recent Advances on Surface Engineering of Magnetic Iron Oxide Nanoparticles and Their Biomedical Applications. *Nanomedicine* **2007**, 2 (1), 23–39. <https://doi.org/10.2217/17435889.2.1.23>.
- (111) Kasemo, B. Biological Surface Science. *Surf. Sci.* **2002**, 500 (1–3), 656–677. [https://doi.org/10.1016/S0039-6028\(01\)01809-X](https://doi.org/10.1016/S0039-6028(01)01809-X).
- (112) Puleo, D. A.; Nanci, A. Understanding and Controlling the Bone-Implant Interface. *Biomaterials* **1999**, 20, 2311–2321.
- (113) Bhattacharya, R.; Mukherjee, P. Biological Properties of “Naked” Metal Nanoparticles. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, 60 (11), 1289–1306. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.03.013>.
- (114) Feng, B.; Weng, J.; Yang, B. C.; Qu, S. X.; Zhang, X. D. Characterization of Surface Oxide Films on Titanium and Adhesion of Osteoblast. *Biomaterials* **2003**, 24 (25), 4663–4670. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00366-1](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00366-1).
- (115) Hanawa, T. A Comprehensive Review of Techniques for Biofunctionalization of Titanium. *J. Periodontal Implant Sci.* **2011**, 41 (6), 263–272. <https://doi.org/10.5051/jpis.2011.41.6.263>.
- (116) He, J.; Zhou, W.; Zhou, X.; Zhong, X.; Zhang, X.; Wan, P.; Zhu, B.; Chen, W. The Anatase Phase of Nanotopography Titania Plays an Important Role on Osteoblast Cell Morphology and Proliferation. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2008**, 19 (11), 3465–3472. <https://doi.org/10.1007/s10856-008-3505-3>.
- (117) Kubota, S.; Johkura, K.; Asanuma, K.; Okouchi, Y.; Ogiwara, N.; Sasaki, K.; Kasuga, T. Titanium Oxide Nanotubes for Bone Regeneration. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2004**, 15 (9), 1031–1035. <https://doi.org/10.1023/B:JMSM.0000042689.78768.77>.
- (118) Brammer, K. S.; Frandsen, C. J.; Jin, S. TiO₂ Nanotubes for Bone Regeneration. *Trends Biotechnol.* **2012**, 30 (6), 315–322. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.02.005>.

- (119) Tan, A. W.; Pingguan-Murphy, B.; Ahmad, R.; Akbar, S. A. Review of Titania Nanotubes: Fabrication and Cellular Response. *Ceram. Int.* **2012**, *38* (6), 4421–4435. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2012.03.002>.
- (120) Koch, F. P.; Weng, D.; Krämer, S.; Biesterfeld, S.; Jahn-Eimermacher, a.; Wagner, W. Osseointegration of One-Piece Zirconia Implants Compared with a Titanium Implant of Identical Design: A Histomorphometric Study in the Dog. *Clin. Oral Implants Res.* **2010**, *21*, 350–356. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2009.01832.x>.
- (121) Özkurt, Z.; Kazazoğlu, E. Zirconia Dental Implants: A Literature Review. *J. Oral Implantol.* **2011**, *37*, 367–376. <https://doi.org/10.1563/AAID-JOI-D-09-00079>.
- (122) Rack, H. J.; Qazi, J. I. Titanium Alloys for Biomedical Applications. *Mater. Sci. Eng. C* **2006**, *26* (8), 1269–1277. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2005.08.032>.
- (123) Le Guéhennec, L.; Soueidan, A.; Layrolle, P.; Amouriq, Y. Surface Treatments of Titanium Dental Implants for Rapid Osseointegration. *Dent. Mater.* **2007**, *23* (7), 844–854. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2006.06.025>.
- (124) Brett, P. M.; Harle, J.; Salih, V.; Mihoc, R.; Olsen, I.; Jones, F. H.; Tonetti, M. Roughness Response Genes in Osteoblasts. *Bone* **2004**, *35* (1), 124–133. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2004.03.009>.
- (125) Lampin, M.; Warocquier-Clérout, R.; Legris, C.; Degrange, M.; Sigot-Luizard, M. F. Correlation between Substratum Roughness and Wettability, Cell Adhesion, and Cell Migration. *J. Biomed. Mater. Res.* **1997**, *36* (1), 99–108. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(199707\)36:1<99::AID-JBM12>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(199707)36:1<99::AID-JBM12>3.0.CO;2-E).
- (126) Hayashi, K.; Inadome, T.; Tsumura, H.; Nakashima, Y.; Sugioka, Y. Effect of Surface Roughness of Hydroxyapatite-Coated Titanium on the Bone-Implant Interface Shear Strength. *Biomaterials* **1994**, *15* (14), 1187–1191.
- (127) Jalota, S.; Bhaduri, S.; Tas, A. Osteoblast Proliferation on Neat and Apatite-like Calcium Phosphate-Coated Titanium Foam Scaffolds. *Mater. Sci. Eng. C* **2007**, *27*, 432–440. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2006.05.052>.
- (128) Albrektsson, T.; Brånemark, P.; Hansson, H.; Lindström, J. Osseointegrated Titanium Implants: Requirements for Ensuring a Long-Lasting, Direct Bone-to-Implant Anchorage in Man. *Acta Orthop.* **1981**, *52* (2), 155–170. <https://doi.org/10.3109/17453678108991776>.
- (129) Chen, Z.; Kang, L.; Wang, Z.; Xu, F.; Gu, G.; Cui, F.; Guo, Z. Recent Progress in the Research of Biomaterials Regulating Cell Behavior. *RSC Adv.* **2014**, *4* (109), 63807–63816. <https://doi.org/10.1039/C4RA05534A>.
- (130) Wennerberg, A.; Hallgren, C.; Johansson, C.; Danelli, S. A Histomorphometric Evaluation of Screw-Shaped Implants Each Prepared with Two Surface Roughnesses. *Clin. Oral Implants Res.* **1998**, *9* (1), 11–19. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0501.1998.090102.x>.
- (131) Webster, T. J.; Ergun, C.; Doremus, R. H.; Siegel, R. W.; Bizios, R. Specific Proteins Mediate Enhanced Osteoblast Adhesion on Nanophase Ceramics. *J. Biomed. Mater. Res.* **2000**, *51* (3), 475–483.
- (132) Anselme, K.; Bigerelle, M.; Noel, B.; Dufresne, E.; Judas, D.; Lost, A.; Hardouin, P. Qualitative and Quantitative Study of Human Osteoblast Adhesion on Materials with Various Surface Roughnesses. *J. Biomed. Mater. Res.* **2000**, *49* (2), 155–166. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(200002\)49:2<155::AID-JBM2>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(200002)49:2<155::AID-JBM2>3.0.CO;2-J).
- (133) Jayaraman, M.; Meyer, U.; Bühner, M.; Joos, U.; Wiesmann, H.-P. Influence of Titanium Surfaces on Attachment of Osteoblast-like Cells in Vitro. *Biomaterials* **2004**, *25* (4), 625–631. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00571-4](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00571-4).
- (134) Rosales-Leal, J. I.; Rodríguez-Valverde, M. a.; Mazzaglia, G.; Ramón-Torregrosa, P. J.; Díaz-Rodríguez, L.; García-Martínez, O.; Vallecillo-Capilla, M.; Ruiz, C.; Cabrerizo-Vílchez, M. a. Effect of Roughness, Wettability and Morphology of Engineered Titanium Surfaces on Osteoblast-like Cell Adhesion. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2010**, *365* (1–3), 222–229. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2009.12.017>.
- (135) Martin, J. Y.; Schwartz, Z.; Hummert, T. W.; Schraub, D. M.; Simpson, J.; Lankford, J.; Dean, D. D.; Cochran, D. L.; Boyan, B. D. Effect of Titanium Surface Roughness on Proliferation, Differentiation, and Protein Synthesis of Human Osteoblast-like Cells (MG63). *J. Biomed. Mater. Res.* **1995**, *29* (3), 389–401.

<https://doi.org/10.1002/jbm.820290314>.

- (136) Webster, T. J.; Ejiófor, J. U. Increased Osteoblast Adhesion on Nanophase Metals: Ti, Ti6Al4V, and CoCrMo. *Biomaterials* **2004**, *25* (19), 4731–4939. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.12.002>.
- (137) Wennerberg, A.; Albrektsson, T. Effects of Titanium Surface Topography on Bone Integration: A Systematic Review. *Clin. Oral Implants Res.* **2009**, *20 Suppl 4*, 172–184. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2009.01775.x>.
- (138) Boyan, B. D.; Dean, D. D.; Lohmann, C. H.; David, L.; Sylvia, V. L.; Schwartz, Z.; Antonio, S.; Attachment, C. The Titanium-Bone Cell Interface In Vitro : The Role of the Surface in Promoting. In *Titanium in medicine*; Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, 2001; pp 561–585.
- (139) Khang, D.; Choi, J.; Im, Y.-M.; Kim, Y.-J.; Jang, J.-H.; Kang, S. S.; Nam, T.-H.; Song, J.; Park, J.-W. Role of Subnano-, Nano- and Submicron-Surface Features on Osteoblast Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Biomaterials* **2012**, *33* (26), 5997–6007. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.05.005>.
- (140) Sato, M.; Slamovich, E. B.; Webster, T. J. Enhanced Osteoblast Adhesion on Hydrothermally Treated Hydroxyapatite/Titania/Poly(Lactide-Co-Glycolide) Sol-Gel Titanium Coatings. *Biomaterials* **2005**, *26* (12), 1349–1357. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.04.044>.
- (141) Riehle, M. O.; Dalby, M. J.; Johnstone, H.; MacIntosh, A.; Affrossman, S. Cell Behaviour of Rat Calvaria Bone Cells on Surfaces with Random Nanometric Features. *Mater. Sci. Eng. C* **2003**, *23* (3), 337–340. [https://doi.org/10.1016/S0928-4931\(02\)00282-5](https://doi.org/10.1016/S0928-4931(02)00282-5).
- (142) Klymov, A.; Prodanov, L.; Lamers, E.; Jansen, J. A.; Walboomers, X. F. Understanding the Role of Nano-Topography on the Surface of a Bone-Implant. *Biomater. Sci.* **2013**, *1* (2), 135–151. <https://doi.org/10.1039/C2BM00032F>.
- (143) Brunetti, V.; Maiorano, G.; Rizzello, L.; Sorce, B.; Sabella, S.; Cingolani, R.; Pompa, P. P. Neurons Sense Nanoscale Roughness with Nanometer Sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, *107* (14), 6264–6269. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914456107>.
- (144) Kuna, J. J.; Voitchovsky, K.; Singh, C.; Jiang, H.; Mwenifumbo, S.; Ghorai, P. K.; Stevens, M. M.; Glotzer, S. C.; Stellacci, F. The Effect of Nanometre-Scale Structure on Interfacial Energy. *Nat. Mater.* **2009**, *8* (10), 837–842. <https://doi.org/10.1038/nmat2534>.
- (145) do Nascimento, R. M.; Schmitt, J.-F.; Sarig, U.; Rodrigues, J. E. F. S.; Pecharromán, C.; Ramos, A. P.; Ciancaglini, P.; Faita, F. L.; Rahouadj, R.; Hernandez, A. C.; Bechtold, I. H. Surface Wettability of a Natural Rubber Composite under Stretching: A Model to Predict Cell Survival. *Langmuir* **2021**, *37* (15), 4639–4646. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.1c00430>.
- (146) Quéré, D. Wetting and Roughness. *Annu. Rev. Mater. Res.* **2008**, *38* (1), 71–99. <https://doi.org/10.1146/annurev.matsci.38.060407.132434>.
- (147) Berg, J. M.; Eriksson, L. G. T.; Claesson, P. M.; Borge, K. G. N. Three-Component Langmuir-Blodgett Films with a Controllable Degree of Polarity. *Langmuir* **1994**, *10* (4), 1225–1234. <https://doi.org/10.1021/la00016a041>.
- (148) Vogler, E. a. Structure and Reactivity of Water at Biomaterial Surfaces. *Adv. Colloid Interface Sci.* **1998**, *74*, 69–117. [https://doi.org/10.1016/S0001-8686\(97\)00040-7](https://doi.org/10.1016/S0001-8686(97)00040-7).
- (149) Kwok, D. Y.; Neumann, A. W. Contact Angle Measurement and Contact Angle Interpretation. *Adv. Colloid Interface Sci.* **1999**, *81* (3), 167–249. [https://doi.org/10.1016/S0001-8686\(98\)00087-6](https://doi.org/10.1016/S0001-8686(98)00087-6).
- (150) Tirrell, M.; Kokkoli, E.; Biesalski, M. The Role of Surface Science in Bioengineered Materials. *Surf. Sci.* **2002**, *500* (1–3), 61–83. [https://doi.org/10.1016/S0039-6028\(01\)01548-5](https://doi.org/10.1016/S0039-6028(01)01548-5).
- (151) Arima, Y.; Iwata, H. Effect of Wettability and Surface Functional Groups on Protein Adsorption and Cell Adhesion Using Well-Defined Mixed Self-Assembled Monolayers. *Biomaterials* **2007**, *28* (20), 3074–3082. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.03.013>.

- (152) Anselme, K. Osteoblast Adhesion on Biomaterials. *Biomaterials* **2000**, *21* (7), 667–681. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(99\)00242-2](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(99)00242-2).
- (153) Hendsi, H.; Barbe, M. F.; Safadi, F. F.; Monroy, M. A.; Popoff, S. N. Integrin Mediated Adhesion of Osteoblasts to Connective Tissue Growth Factor (CTGF/ CCN2) Induces Cytoskeleton Reorganization and Cell Differentiation. *PLoS One* **2015**, *10* (2), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115325>.
- (154) Ferris, D. M.; Moodie, G. D.; Dimond, P. M.; Gioranni, C. W.; Ehrlich, M. G.; Valentini, R. F. RGD-Coated Titanium Implants Stimulate Increased Bone Formation in Vivo. *Biomaterials* **1999**, *20* (23–24), 2323–2331. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612/99/\\$](https://doi.org/10.1016/S0142-9612/99/$).
- (155) Rammelt, S.; Illert, T.; Bierbaum, S.; Scharnweber, D.; Zwipp, H.; Schneiders, W. Coating of Titanium Implants with Collagen, RGD Peptide and Chondroitin Sulfate. *Biomaterials* **2006**, *27* (32), 5561–5571. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.06.034>.
- (156) Kilpadi, K. L.; Chang, P. L.; Bellis, S. L. Hydroxylapatite Binds More Serum Proteins, Purified Integrins, and Osteoblast Precursor Cells than Titanium or Steel. *J. Biomed. Mater. Res.* **2001**, *57* (2), 258–267. [https://doi.org/10.1002/1097-4636\(200111\)57:2<258::AID-JBM1166>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/1097-4636(200111)57:2<258::AID-JBM1166>3.0.CO;2-R).
- (157) Lim, J. Y.; Taylor, A. F.; Li, Z.; Vogler, E. a; Donahue, H. J. Integrin Expression and Osteopontin Regulation in Human Fetal Osteoblastic Cells Mediated by Substratum Surface Characteristics. *Tissue Eng.* **2005**, *11* (1–2), 19–29. <https://doi.org/10.1089/ten.2005.11.19>.
- (158) Faucheux, N.; Schweiss, R.; Lützwow, K.; Werner, C.; Groth, T. Self-Assembled Monolayers with Different Terminating Groups as Model Substrates for Cell Adhesion Studies. *Biomaterials* **2004**, *25* (14), 2721–2730. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.09.069>.
- (159) Hotchkiss, K. M.; Reddy, G. B.; Hyzy, S. L.; Schwartz, Z.; Boyan, B. D.; Olivares-Navarrete, R. Titanium Surface Characteristics, Including Topography and Wettability, Alter Macrophage Activation. *Acta Biomater.* **2016**, *31*, 425–434. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.12.003>.
- (160) Surmenev, R. A.; Surmeneva, M. A.; Ivanova, A. A. Significance of Calcium Phosphate Coatings for the Enhancement of New Bone Osteogenesis: A Review. *Acta Biomater.* **2014**, *10* (2), 557–579. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.10.036>.
- (161) Surmenev, R. a. A Review of Plasma-Assisted Methods for Calcium Phosphate-Based Coatings Fabrication. *Surf. Coatings Technol.* **2011**, *206* (8–9), 2035–2056. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2011.11.002>.
- (162) Iafisco, M.; Bosco, R.; Leeuwenburgh, S. C. G.; van den Beucken, J. J. P.; Jansen, J. a.; Prat, M.; Roveri, N. Electrostatic Spray Deposition of Biomimetic Nanocrystalline Apatite Coatings onto Titanium. *Adv. Eng. Mater.* **2012**, *14* (3), B13–B20. <https://doi.org/10.1002/adem.201180062>.
- (163) Costa, D. O.; Allo, B. a; Klassen, R.; Hutter, J. L.; Dixon, S. J.; Rizkalla, A. S. Control of Surface Topography in Biomimetic Calcium Phosphate Coatings. *Langmuir* **2012**, *28* (8), 3871–3880. <https://doi.org/10.1021/la203224a>.
- (164) Tas, A. C. The Use of Physiological Solutions or Media in Calcium Phosphate Synthesis and Processing. *Acta Biomater.* **2014**, *10* (5), 1771–1792. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.12.047>.
- (165) Kokubo, T.; Kushitani, H.; Sakka, S.; Kitsugi, T.; Yamamuro, T. Solutions Able to Reproduce in Vivo Surface-Structure Changes in Bioactive Glass-Ceramic A-W3. *J. Biomed. Mater. Res.* **1990**, *24*, 721–734. <https://doi.org/10.1002/jbm.820240607>.
- (166) Cüneyt Tas, A. Synthesis of Biomimetic Ca-Hydroxyapatite Powders at 37°C in Synthetic Body Fluids. *Biomaterials* **2000**, *21* (14), 1429–1438. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00019-3](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00019-3).
- (167) Kokubo, T.; Takadama, H. How Useful Is SBF in Predicting in Vivo Bone Bioactivity? *Biomaterials*. May 2006, pp 2907–2915. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.01.017>.
- (168) Wang, Z.; Wang, K.; Lu, X.; Li, M.; Liu, H.; Xie, C.; Meng, F.; Jiang, O.; Li, C.; Zhi, W. BMP-2 Encapsulated

- Polysaccharide Nanoparticle Modified Biphasic Calcium Phosphate Scaffolds for Bone Tissue Regeneration. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **2014**, 1520–1532. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35282>.
- (169) Tsuruga, E.; Takita, H.; Itoh, H.; Wakisaka, Y.; Kuboki, Y. Pore Size of Porous Hydroxyapatite as the Cell-Substratum Controls BMP-Induced Osteogenesis. *J. Biochem.* **1997**, *121* (2), 317–324.
- (170) Kaganer, V.; Möhwald, H.; Dutta, P. Structure and Phase Transitions in Langmuir Monolayers. *Rev. Mod. Phys.* **1999**, *71* (3), 779–819. <https://doi.org/10.1103/RevModPhys.71.779>.
- (171) Dhanabalan, A.; Balogh, D. T.; Mendonça, C. R.; Riul, A.; Constantino, C. J. L.; Giacometti, J. A.; Zilio, S. C.; Oliveira, O. N. Mixed Langmuir and Langmuir-Blodgett Films of Disperse Red-13 Dye-Derivatized Methacrylic Homopolymer and Cadmium Stearate. *Langmuir* **1998**, *14* (13), 3614–3619.
- (172) Barros, A. M.; Dhanabalan, A.; Constantino, C. J. L.; Balogh, D. T.; Oliveira, O. N. Langmuir Monolayers of Lignins Obtained with Different Isolation Methods. *Thin Solid Films* **1999**, *354* (1), 215–221. [https://doi.org/10.1016/S0040-6090\(99\)00526-X](https://doi.org/10.1016/S0040-6090(99)00526-X).
- (173) Thakur, G.; Wang, C.; Leblanc, R. M. Surface Chemistry and in Situ Spectroscopy of a Lysozyme Langmuir Monolayer. *Langmuir* **2008**, *24*, 4888–4893.
- (174) Caseli, L.; Masui, D. C.; Furriel, R. P. M.; Leone, F. A.; Zaniquelli, M. E. D.; Orbulescu, J.; Leblanc, R. M. Rat Osseous Plate Alkaline Phosphatase as Langmuir Monolayer—an Infrared Study at the Air-Water Interface. *J. Colloid Interface Sci.* **2008**, *320* (2), 476–482.
- (175) Miranda, P. B.; Du, Q.; Shen, Y. R. Interaction of Water with a Fatty Acid Langmuir Film. *Chem. Phys. Lett.* **1998**, *286* (1–2), 1–8. [https://doi.org/10.1016/S0009-2614\(97\)01476-0](https://doi.org/10.1016/S0009-2614(97)01476-0).
- (176) Lose, E.; Díaz-Martí, E.; Zerbakhsh, A.; Meldrum, F. Study of Calcium Carbonate Precipitation under a Series of Fatty Acid Langmuir Monolayers Using Brewster Angle Microscopy. *Langmuir* **2003**, *19* (21), 2830–2837.
- (177) Fischer, A.; Lösche, M.; Möhwald, H.; Sackmann, E. On the Nature of the Lipid Monolayer Phase Transition. *J. Phys. Lettres* **1984**, *45* (16), 785–791. <https://doi.org/10.1051/jphyslet:019840045016078500>.
- (178) Maget-Dana, R.; Ptak, M. Interactions of Surfactin with Membrane Models. *Biophys. J.* **1995**, *68* (5), 1937–1943. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(95\)80370-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(95)80370-X).
- (179) Geraldo, V. P. N.; Pavinatto, F. J.; Nobre, T. M.; Caseli, L.; Oliveira, O. N. Langmuir Films Containing Ibuprofen and Phospholipids. *Chem. Phys. Lett.* **2013**, *559*, 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2012.12.064>.
- (180) Gonçalves da Silva, A. M.; Romão, R. I. S. Mixed Monolayers Involving DPPC, DODAB and Oleic Acid and Their Interaction with Nicotinic Acid at the Air-Water Interface. *Chem. Phys. Lipids* **2005**, *137* (1–2), 62–76. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2005.06.004>.
- (181) Toimil, P.; Prieto, G.; Miñones, J.; Sarmiento, F. A Comparative Study of F-DPPC/DPPC Mixed Monolayers. Influence of Subphase Temperature on F-DPPC and DPPC Monolayers. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12* (40), 13323–13332. <https://doi.org/10.1039/c0cp00506a>.
- (182) Vollhardt, D.; Fainerman, V. B. Progress in Characterization of Langmuir Monolayers by Consideration of Compressibility. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2006**, *127* (2), 83–97. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2006.11.006>.
- (183) Davies, J. T.; Rideal, E. K. *Interfacial Phenomena*; 1963.
- (184) Caseli, L.; Nobre, T. M.; Ramos, A. P.; Monteiro, D. S.; Zaniquelli, M. E. D. The Role of Langmuir Monolayers to Understand Biological Events. *ACS Symp. Ser.* **2015**, *1215*, 65–88. <https://doi.org/10.1021/bk-2015-1215.ch004>.
- (185) Costa, N.; Maquis, P. M. Biomimetic Processing of Calcium Phosphate Coating. *Med. Eng. Phys.* **1998**, *20* (8), 602–606. [https://doi.org/10.1053/1350-4533\(98\)51900](https://doi.org/10.1053/1350-4533(98)51900).
- (186) Zhang, Y.; Jin, R.; Zhang, L.; Liu, M. Growth of CaCO₃ in the Templated Langmuir-Blodgett Film of a Bolaamphiphilic Diacid. *New J. Chem.* **2004**, *28* (5), 614. <https://doi.org/10.1039/b314136e>.

- (187) Piattelli, a.; Podda, G.; Scarano, a. Clinical and Histological Results in Alveolar Ridge Enlargement Using Coralline Calcium Carbonate. *Biomaterials* **1997**, *18* (8), 623–627. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(96\)00158-5](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(96)00158-5).
- (188) Lopez, E.; Vidal, B.; Berland, S.; Camprasse, S.; Camprasse, G.; Silve, C. Demonstration of the Capacity of Nacre to Induce Bone Formation by Human Osteoblasts Maintained in Vitro. *Tissue Cell* **1992**, *24* (5), 667–679. [https://doi.org/10.1016/0040-8166\(92\)90037-8](https://doi.org/10.1016/0040-8166(92)90037-8).
- (189) Fujihara, K.; Kotaki, M.; Ramakrishna, S. Guided Bone Regeneration Membrane Made of Polycaprolactone/Calcium Carbonate Composite Nano-Fibers. *Biomaterials* **2005**, *26* (19), 4139–4147. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.09.014>.
- (190) Fricain, J. C.; Bareille, R.; Ulysse, F.; Dupuy, B.; Amedee, J. Evaluation of Proliferation and Protein Expression of Human Bone Marrow Cells Cultured on Coral Crystallized in the Aragonite or Calcite Form. *J. Biomed. Mater. Res.* **1998**, *42* (1), 96–102. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(199810\)42:1<96::AID-JBM12>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(199810)42:1<96::AID-JBM12>3.0.CO;2-M).
- (191) Piattelli, a.; Scarano, a.; Corigliano, M.; Piattelli, M. Effects of Alkaline Phosphatase on Bone Healing around Plasma-Sprayed Titanium Implants: A Pilot Study in Rabbits. *Biomaterials* **1996**, *17* (14), 1443–1449. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(96\)87288-7](https://doi.org/10.1016/0142-9612(96)87288-7).
- (192) Hoylaerts, M. F.; Van kerckhoven, S.; Kiffer-Moreira, T.; Sheen, C.; Narisawa, S.; Millán, J. L. Functional Significance of Calcium Binding to Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase. *PLoS One* **2015**, *10* (3), e0119874. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119874>.
- (193) Cui, L.; Houston, D. A.; Farquharson, C.; MacRae, V. E. Characterisation of Matrix Vesicles in Skeletal and Soft Tissue Mineralisation. *Bone* **2016**, *87*, 147–158. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2016.04.007>.
- (194) Wuthier, R. E. Matrix Vesicles: Structure, Composition, Formation and Function in Calcification. *Front. Biosci.* **2011**, *16* (1), 2812. <https://doi.org/10.2741/3887>.
- (195) Bolean, M.; Simão, A. M. S.; Barioni, M. B.; Favarin, B. Z.; Sebinelli, H. G.; Veschi, E. A.; Janku, T. A. B.; Bottini, M.; Hoylaerts, M. F.; Itri, R.; Millán, J. L.; Ciancaglini, P. Biophysical Aspects of Biomineralization. *Biophys. Rev.* **2017**, *9* (5), 747–760. <https://doi.org/10.1007/s12551-017-0315-1>.
- (196) Thula, T. T.; Svedlund, F.; Rodriguez, D. E.; Podschun, J.; Pendi, L.; Gower, L. B. Mimicking the Nanostructure of Bone: Comparison of Polymeric Process-Directing Agents. *Polymers (Basel)*. **2010**, *3* (1), 10–35. <https://doi.org/10.3390/polym3010010>.
- (197) Silvent, J.; Nassif, N.; Helary, C.; Azaïs, T.; Sire, J. Y.; Guille, M. M. G. Collagen Osteoid-Like Model Allows Kinetic Gene Expression Studies of Non-Collagenous Proteins in Relation with Mineral Development to Understand Bone Biomineralization. *PLoS One* **2013**, *8* (2), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057344>.
- (198) Thirivikraman, G.; Athirasala, A.; Gordon, R.; Zhang, L.; Bergan, R.; Keene, D. R.; Jones, J. M.; Xie, H.; Chen, Z.; Tao, J.; Wingender, B.; Gower, L.; Ferracane, J. L.; Bertassoni, L. E. Rapid Fabrication of Vascularized and Innervated Cell-Laden Bone Models with Biomimetic Intrafibrillar Collagen Mineralization. *Nat. Commun.* **2019**, *10* (1), 3520. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11455-8>.
- (199) Kokubo, T. Design of Bioactive Bone Substitutes Based on Biomineralization Process. *Mater. Sci. Eng. C* **2005**, *25* (2), 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2005.01.002>.
- (200) Behzadi, S.; Luther, G. A.; Harris, M. B.; Farokhzad, O. C.; Mahmoudi, M. Nanomedicine for Safe Healing of Bone Trauma: Opportunities and Challenges. *Biomaterials* **2017**, *146*, 168–182. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.09.005>.
- (201) Wang, Y.; Von Euw, S.; Laurent, G.; Crevant, C.; Bonhomme-Coury, L.; Giraud-Guille, M.-M.; Babonneau, F.; Nassif, N.; Azaïs, T. Impact of Collagen Confinement vs. Ionic Substitutions on the Local Disorder in Bone and Biomimetic Apatites. *Mater. Horiz.* **2014**, *1* (2), 224–231. <https://doi.org/10.1039/C3MH00071K>.
- (202) Landi, E.; Sprio, S.; Sandri, M.; Celotti, G.; Tampieri, A. Development of Sr and CO₃ Co-Substituted

- Hydroxyapatites for Biomedical Applications. *Acta Biomater.* **2008**, 4 (3), 656–663. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2007.10.010>.
- (203) Pors Nielsen, S. The Biological Role of Strontium. *Bone* **2004**, 35 (3), 583–588. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2004.04.026>.
- (204) Dahl, S. ; Allain, P.; Marie, P. ; Mauras, Y.; Boivin, G.; Ammann, P.; Tsouderos, Y.; Delmas, P. ; Christiansen, C. Incorporation and Distribution of Strontium in Bone. *Bone* **2001**, 28 (4), 446–453. [https://doi.org/10.1016/S8756-3282\(01\)00419-7](https://doi.org/10.1016/S8756-3282(01)00419-7).
- (205) Bonnelye, E.; Chabadel, A.; Saltel, F.; Jurdic, P. Dual Effect of Strontium Ranelate: Stimulation of Osteoblast Differentiation and Inhibition of Osteoclast Formation and Resorption in Vitro. *Bone* **2008**, 42 (1), 129–138. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2007.08.043>.
- (206) O'Donnell, M. D.; Candarlioglu, P. L.; Miller, C. A.; Gentleman, E.; Stevens, M. M. Materials Characterisation and Cytotoxic Assessment of Strontium-Substituted Bioactive Glasses for Bone Regeneration. *J. Mater. Chem.* **2010**, 20 (40), 8934. <https://doi.org/10.1039/c0jm01139h>.
- (207) Fonseca, J. E.; Brandi, M. L. Mechanism of Action of Strontium Ranelate: What Are the Facts? *Clin. Cases Miner. Bone Metab.* **2010**, 7 (1), 17–18.
- (208) Pashuck, E. T.; Stevens, M. M. Designing Regenerative Biomaterial Therapies for the Clinic. *Sci. Transl. Med.* **2012**, 4 (160), 160sr4–160sr4. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3002717>.
- (209) Pilmane, M.; Salma-Ancane, K.; Loca, D.; Locs, J.; Berzina-Cimdina, L. Strontium and Strontium Ranelate: Historical Review of Some of Their Functions. *Mater. Sci. Eng. C* **2017**, 78, 1222–1230. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.042>.
- (210) Li, Z. Y.; Lam, W. M.; Yang, C.; Xu, B.; Ni, G. X.; Abbah, S. A.; Cheung, K. M. C.; Luk, K. D. K.; Lu, W. W. Chemical Composition, Crystal Size and Lattice Structural Changes after Incorporation of Strontium into Biomimetic Apatite. *Biomaterials* **2007**, 28 (7), 1452–1460. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.11.001>.
- (211) Bussola Tovani, C.; Gloter, A.; Azaïs, T.; Selmane, M.; Ramos, A. P.; Nassif, N. Formation of Stable Strontium-Rich Amorphous Calcium Phosphate: Possible Effects on Bone Mineral. *Acta Biomater.* **2019**, 92, 315–324. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.05.036>.
- (212) Zado, L. N.; Pilatti, G. L. Hipersensibilidade Dentinária: Recentes Avanços e Tratamentos - Revisão de Literatura. *Braz J Periodontol* **2016**, 26 (02), 28–33.
- (213) Costa, L. M. da; Cury, M. S.; Oliveira, M. A. H. de M.; Nogueira, R. D.; Geraldo-Martins, V. R. A Utilização Da Laserterapia Para o Tratamento Da Hipersensibilidade Dentinária: Revisão Da Literatura. *J. Heal. Sci.* **2016**, 18 (3), 210–216.
- (214) Amarasena, N.; Spencer, J.; Ou, Y.; Brennan, D. Dentine Hypersensitivity - Australian Dentists' Perspective. *Aust. Dent. J.* **2010**, 55 (2), 181–187. <https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.2010.01223.x>.
- (215) Saeki, K.; Marshall, G. W.; Gansky, S. A.; Parkinson, C. R.; Marshall, S. J. Strontium Effects on Root Dentin Tubule Occlusion and Nanomechanical Properties. *Dent. Mater.* **2016**, 32 (2), 240–251. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2015.11.020>.
- (216) Chen, C. L.; Parolia, A.; Pau, A.; Celerino De Moraes Porto, I. C. Comparative Evaluation of the Effectiveness of Desensitizing Agents in Dentine Tubule Occlusion Using Scanning Electron Microscopy. *Aust. Dent. J.* **2015**, 60 (1), 65–72. <https://doi.org/10.1111/adj.12275>.
- (217) Hall, C.; Mason, S.; Cooke, J. Exploratory Randomised Controlled Clinical Study to Evaluate the Comparative Efficacy of Two Occluding Toothpastes – a 5% Calcium Sodium Phosphosilicate Toothpaste and an 8% Arginine/Calcium Carbonate Toothpaste – for the Longer-Term Relief of Dentine Hyp. *J. Dent.* **2017**, 60, 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2017.02.009>.
- (218) Chabanski, M. B.; Gillam, D. G. Aetiology, Prevalence and Clinical Features of Cervical Dentine Sensitivity. *J. Oral*

- Rehabil.* **1997**, 24 (1), 15–19. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2842.1997.tb00254.x>.
- (219) Mesquita, C. R.; Almeida, J. C. F.; Yamaguti, P. M.; Paula, L. M. de; Garcia, F. C. P. Hiperestesia Dentinária: Opções de Tratamento. *Rev. Dent. online* **2009**, 8 (18), 29–34.
- (220) Matias, M. N. A.; Leão, J. C.; Menezes Filho, P. F.; Silva, C. H. V. da. Hipersensibilidade Dentinária: Uma Revisão de Literatura. *Odontol Clin-Client* **2010**, 9 (3), 205–208.
- (221) Camargo, W. A. Hipersensibilidade Dentinária : Diagnóstico e Tratamento, Faculdade de medicina dentária - Universidade do Porto, 2011.
- (222) Hughes, N.; Mason, S.; Jeffery, P.; Welton, H.; Tobin, M.; O’Shea, C.; Browne, M. A Comparative Clinical Study Investigating the Efficacy of a Test Dentifrice Containing 8% Strontium Acetate and 1040 Ppm Sodium Fluoride versus a Marketed Control Dentifrice Containing 8% Arginine, Calcium Carbonate, and 1450 Ppm Sodium Monofluorophospha. *J Clin Dent* **2010**, 21 (Special Issue), 49–55.
- (223) Pinto, S. C. S.; Silveira, C. M. M.; Pochapski, M. T.; Pilatt, G. L.; Santos, F. A. Effect of Desensitizing Toothpastes on Dentin. *Braz. Oral Res.* **2012**, 26 (5), 410–417. <https://doi.org/10.1590/S1806-83242012000500006>.
- (224) Palazon, M. T.; Scaramucci, T.; Aranha, A. C. C.; Prates, R. A.; Lachowski, K. M.; Hanashiro, F. S.; Youssef, M. N. Immediate and Short-Term Effects of In-Office Desensitizing Treatments for Dentinal Tubule Occlusion. *Photomed. Laser Surg.* **2013**, 31 (6), 274–282. <https://doi.org/10.1089/pho.2012.3405>.
- (225) Mantzourani, M.; Sharma, D. Dentine Sensitivity: Past, Present and Future. *J. Dent.* **2013**, 41 (SUPPL. 4), S3–S17. [https://doi.org/10.1016/S0300-5712\(13\)70002-2](https://doi.org/10.1016/S0300-5712(13)70002-2).
- (226) Sharma, D.; Hong, C. X.; Heipp, P. S. A Novel Potassium Oxalate-Containing Tooth-Desensitising Mouthrinse : A Comparative in Vitro Study. *J. Dent.* **2013**, 41, S18–S27. [https://doi.org/10.1016/S0300-5712\(13\)70003-4](https://doi.org/10.1016/S0300-5712(13)70003-4).
- (227) Pinto, S. C. S.; Pochapski, M. T.; Wambier, D. S.; Pilatti, G. L.; Santos, F. ábio A. In Vitro and in Vivo Analyses of the Effects of Desensitizing Agents on Dentin Permeability and Dentinal Tubule Occlusion. *J. Oral Sci.* **2010**, 52 (1), 23–32.
- (228) Vieira Junior, W.; Lima, D.; Aguiar, F.; Lovadino, J. Dentifricios Para o Tratamento Da Hipersensibilidade Dentinária. *Rev Dent. Press Estét.* **2014**, 11 (4), 112–117.
- (229) Davies, M.; Paice, E. M.; Jones, S. B.; Leary, S.; Curtis, A. R.; West, N. X. Efficacy of Desensitizing Dentifrices to Occlude Dentinal Tubules. *Eur. J. Oral Sci.* **2011**, 119 (6), 497–503. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2011.00872.x>.
- (230) Godinho, C. J.; Grippi, M. F.; Costa, L. C. Avaliação Clínica Do Uso de Dois Novos Cremes Dentais No Tratamento Da Hipersensibilidade Dentinária. *RPG Rev Pós Gr.* **2011**, 18 (2), 72–78.
- (231) Lee, S. Y.; Kwon, H. K.; Kim, B. I. Effect of Dentinal Tubule Occlusion by Dentifrice Containing Nano-Carbonate Apatite. *J. Oral Rehabil.* **2008**, 35 (11), 847–853. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2842.2008.01876.x>.
- (232) Medvecky, L.; Stulajterova, R.; Giretova, M.; Mincik, J.; Vojtko, M.; Balko, J.; Briancin, J. Effect of Tetracalcium Phosphate/Monetite Toothpaste on Dentin Remineralization and Tubule Occlusion in Vitro. *Dent. Mater.* **2018**, 34 (3), 442–451. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2017.11.022>.
- (233) Giles, A.; Claydon, N.; Addy, M.; Hughes, N.; Sufi, F.; West, N. Clinical in Situ Study Investigating Abrasive Effects of Two Commercially Available Toothpastes. *J. Oral Rehabil.* **2009**, 36 (7), 498–507. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2842.2009.01965.x>.
- (234) Ahn, J. H.; Kim, J. H.; Ha, W. H.; Park, Y. D. Tooth Wear and Cleaning Effect of an Abrasive-Free Dentifrice. *J. Dent. Sci.* **2018**, 13 (1), 13–19. <https://doi.org/10.1016/j.jds.2017.10.006>.
- (235) Sabrah, A. H. A.; Lippert, F.; Kelly, A. B.; Hara, A. T. Comparison between Radiotracer and Surface Profile Methods for the Determination of Dentifrice Abrasivity. *Wear* **2013**, 306 (1–2), 73–79. <https://doi.org/10.1016/j.wear.2013.07.001>.

- (236) Amaechi, B. T.; Higham, S. M.; Edgar, W. M. Factors Influencing the Development of Dental Erosion in Vitro: Enamel Type, Temperature and Exposure Time. *J. Oral Rehabil.* **1999**, *26* (0305-182X SB-D SB-IM), 624–630.
- (237) Uchida, A.; Wakano, Y.; Fukuyama, O.; Miki, T.; Iwayama, Y.; Okada, H. Controlled Clinical Evaluation of a 10% Strontium Chloride Dentifrice in Treatment of Dentin Hypersensitivity Following Periodontal Surgery. *J. Periodontol.* **1980**, *51* (10), 578–581. <https://doi.org/10.1902/jop.1980.51.10.578>.
- (238) Pearce, N. X.; Addy, M.; Newcombe, R. G. Dentine Hypersensitivity: A Clinical Trial to Compare 2 Strontium Desensitizing Toothpastes With a Conventional Fluoride Toothpaste. *J. Periodontol.* **1994**, *65* (2), 113–119. <https://doi.org/10.1902/jop.1994.65.2.113>.
- (239) Olley, R. C.; Pilecki, P.; Hughes, N.; Jeffery, P.; Austin, R. S.; Moazzez, R.; Bartlett, D. An in Situ Study Investigating Dentine Tubule Occlusion of Dentifrices Following Acid Challenge. *J. Dent.* **2012**, *40* (7), 585–593. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2012.03.008>.
- (240) Bussola Tovani, C.; Gloter, A.; Azaïs, T.; Selmane, M.; Ramos, A. P.; Nassif, N. Formation of Stable Strontium-Rich Amorphous Calcium Phosphate: Possible Effects on Bone Mineral. *Acta Biomater.* **2019**, *92*. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.05.036>.
- (241) Rushdi, M. A. H.; Abdel-Fattah, A. A.; Soliman, Y. S. Radiation-Induced Defects in Strontium Carbonate Rod for EPR Dosimetry Applications. *Radiat. Phys. Chem.* **2017**, *131*, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2016.10.013>.
- (242) Schofield, E. J.; Sarangi, R.; Mehta, A.; Jones, A. M.; Smith, A.; Mosselms, J. F. W.; Chadwick, A. V. Strontium Carbonate Nanoparticles for the Surface Treatment of Problematic Sulfur and Iron in Waterlogged Archaeological Wood. *J. Cult. Herit.* **2016**, *18*, 306–312. <https://doi.org/10.1016/j.culher.2015.07.013>.
- (243) Gonçalves, F. C. Influência Do Estrôncio Não Radioativo Na Prevenção Do Processo de Osteonecrose Induzida Por Bisfosfonato. *Diss. apresentada à Univ. Estadual Paul. (Unesp), Fac. Odontol. Araraquara para obtenção do título Mestre em nome do programa Odontol. na Área Periodontia* **2018**, 1–56.
- (244) Scardueli, C. R. Utilização Sistêmica de Estrôncio Não Radioativo Como Potencializador Da Osseointegração de Implantes. Avaliação Biomecânica, Microtomográfica e Histomorfométrica Em Ratos. *Diss. apresentada ao Programa Pós-Graduação em Odontol. – Área Periodontia, da Fac. Odontol. Araraquara, da Univ. Estadual Paul. para o título Mestre em Odontol.* **2014**, 1–75.
- (245) Nascimento, M. A. Avaliação Dos Níveis Plasmáticos de Estrôncio e de Cálcio Na Regeneração de Defeito Crítico Em Calvária de Rato. *Diss. apresentada ao Programa Pós-graduação em Process. Interativos dos Órgãos e Sist. Inst. Ciências da Saúde, Univ. Fed. da Bahia, como requisito para obtenção do grau Mestre em Process. Interativos dos Órgãos e Sist.* **2010**, 1–81.
- (246) Sajesh, K. M.; Kiran, K.; Nair, S. V.; Jayakumar, R. Sequential Layer-by-Layer Electrospinning of Nano SrCO₃/PRP Loaded PHBV Fibrous Scaffold for Bone Tissue Engineering. *Compos. Part B Eng.* **2016**, *99*, 445–452. <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2016.06.026>.
- (247) Ratnayake, J. T. B.; Mucalo, M.; Dias, G. J. Substituted Hydroxyapatites for Bone Regeneration: A Review of Current Trends. *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* **2017**, *105* (5), 1285–1299. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33651>.
- (248) Meka, S. R. K.; Jain, S.; Chatterjee, K. Strontium Eluting Nanofibers Augment Stem Cell Osteogenesis for Bone Tissue Regeneration. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2016**, *146*, 649–656. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.07.012>.
- (249) Orsini, G.; Procaccini, M.; Manzoli, L.; Sparabombe, S.; Tiriduzzi, P.; Bambini, F.; Putignano, A. A 3-Day Randomized Clinical Trial to Investigate the Desensitizing Properties of Three Dentifrices. *J. Periodontol.* **2013**, No. November, 1–12. <https://doi.org/10.1902/jop.2013.120697>.
- (250) West, N.; Newcombe, R. G.; Hughes, N.; Mason, S.; Maggio, B.; Sufi, F.; Claydon, N. A 3-Day Randomised Clinical Study Investigating the Efficacy of Two Toothpastes, Designed to Occlude Dentine Tubules, for the Treatment of

- Dentine Hypersensitivity. *J. Dent.* **2013**, *41* (2), 187–194. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2012.11.007>.
- (251) Naveau, B. Strontium: A New Treatment for Osteoporosis. *Joint, bone, spine* **2004**, *71* (4), 261–263. <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2003.12.008>.
- (252) Querido, W.; Rossi, A. L.; Farina, M. The Effects of Strontium on Bone Mineral: A Review on Current Knowledge and Microanalytical Approaches. *Micron* **2016**, *80*, 122–134. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2015.10.006>.
- (253) Wornham, D. P.; Hajjawi, M. O.; Orriss, I. R.; Arnett, T. R. Strontium Potently Inhibits Mineralisation in Bone-Forming Primary Rat Osteoblast Cultures and Reduces Numbers of Osteoclasts in Mouse Marrow Cultures. *Osteoporos. Int.* **2014**, *25* (10). <https://doi.org/10.1007/s00198-014-2791-5>.
- (254) Svanström, H.; Pasternak, B.; Hviid, A. Use of Strontium Ranelate and Risk of Acute Coronary Syndrome: Cohort Study. *Ann. Rheum. Dis.* **2014**, *73* (6), 1037–1043. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2014-205283>.
- (255) Cooper, C.; Fox, K. M.; Borer, J. S. Ischaemic Cardiac Events and Use of Strontium Ranelate in Postmenopausal Osteoporosis: A Nested Case-Control Study in the CPRD. *Osteoporos. Int.* **2014**, *25* (2), 737–745. <https://doi.org/10.1007/s00198-013-2582-4>.
- (256) Rojo, L.; Radley-Searle, S.; Fernandez-Gutierrez, M.; Rodriguez-Lorenzo, L. M.; Abradelo, C.; Deb, S.; San Roman, J. The Synthesis and Characterisation of Strontium and Calcium Folates with Potential Osteogenic Activity. *J. Mater. Chem. B* **2015**, *3* (13), 2708–2713. <https://doi.org/10.1039/c4tb01969e>.
- (257) Bergamini, P.; Marchesi, E.; Pagnoni, A.; Lambertini, E.; Franceschetti, T.; Penolazzi, L.; Piva, R. Synthesis, Characterization of Strontium-Bile Acid Salts and Their Bioactivity vs. the Anti-Osteoporosis Drug Strontium Ranelate. *J. Inorg. Biochem.* **2009**, *103* (6), 891–897. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2009.03.006>.
- (258) Cruz, M. A. E.; Tovani, C. B.; Favarin, B. Z.; Soares, M. P. R.; Fukada, S. Y.; Ciancaglini, P.; Ramos, A. P. Synthesis of Sr–Morin Complex and Its in Vitro Response: Decrease in Osteoclast Differentiation While Sustaining Osteoblast Mineralization Ability. *J. Mater. Chem. B* **2019**, *7* (5), 823–829. <https://doi.org/10.1039/C8TB02045K>.
- (259) De Souza, R. F. V.; De Giovani, W. F. Synthesis, Spectral and Electrochemical Properties of Al(III) and Zn(II) Complexes with Flavonoids. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2005**, *61* (9), 1985–1990. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2004.07.029>.
- (260) Gutierrez, A. C.; Gehlen, M. H. Time Resolved Fluorescence Spectroscopy of Quercetin and Morin Complexes with Al³⁺. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2002**, *58* (1), 83–89. [https://doi.org/10.1016/S1386-1425\(01\)00515-7](https://doi.org/10.1016/S1386-1425(01)00515-7).
- (261) Panhwar, Q. K.; Memon, S. Synthesis and Evaluation of Antioxidant and Antibacterial Properties of Morin Complexes. *J. Coord. Chem.* **2011**, *64* (12), 2117–2129. <https://doi.org/10.1080/00958972.2011.590192>.
- (262) Weaver, C. M.; Alekel, D. L.; Ward, W. E.; Ronis, M. J. Journal of Nutrition in Gerontology and Geriatrics Flavonoid Intake and Bone Health. *J. Nutr. Gerontol. Geriatr.* **2012**, *31* (March 2013), 37–41. <https://doi.org/10.1080/21551197.2012.698220>.
- (263) Manchope, M. F.; Artero, N. A.; Fattori, V.; Mizokami, S. S.; Pitol, D. L.; Issa, J. P. M.; Fukada, S. Y.; Cunha, T. M.; Alves-Filho, J. C.; Cunha, F. Q.; Casagrande, R.; Verri, W. A. Naringenin Mitigates Titanium Dioxide (TiO₂)-Induced Chronic Arthritis in Mice: Role of Oxidative Stress, Cytokines, and NFκB. *Inflamm. Res.* **2018**, *67* (11–12), 997–1012. <https://doi.org/10.1007/s00011-018-1195-y>.
- (264) Cabrera, C.; Artacho, R.; Giménez, R. Beneficial Effects of Green Tea—A Review. *J. Am. Coll. Nutr.* **2006**, *25* (2), 79–99. <https://doi.org/10.1080/07315724.2006.10719518>.
- (265) Welch, A.; MacGregor, A.; Jennings, A.; Fairweather-Tait, S.; Spector, T.; Cassidy, A. Habitual Flavonoid Intakes Are Positively Associated with Bone Mineral Density in Women. *J. Bone Miner. Res.* **2012**, *27* (9), 1872–1878. <https://doi.org/10.1002/jbmr.1649>.
- (266) Wattel, A.; Kamel, S.; Prouillet, C.; Petit, J.; Lorget, F.; Offord, E.; Brazier, M. Flavonoid Quercetin Decreases Osteoclastic Differentiation Induced by RANKL via a Mechanism Involving NF κ B and AP-1. *J. Cell. Biochem.*

- 2004**, 295, 285–295. <https://doi.org/10.1002/jcb.20071>.
- (267) Léotoing, L.; Davicco, M.-J.; Lebecque, P.; Wittrant, Y.; Coxam, V. The Flavonoid Fisetin Promotes Osteoblasts Differentiation through Runx2 Transcriptional Activity. *Mol. Nutr. Food Res.* **2014**, *58* (6), 1239–1248. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201300836>.
- (268) Guo, M.; Qu, H.; Xu, L.; Shi, D. zhuo. Tea Consumption May Decrease the Risk of Osteoporosis: An Updated Meta-Analysis of Observational Studies. *Nutrition Research*. Elsevier Inc. 2017, pp 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2017.02.010>.
- (269) Borghi, S. M.; Mizokami, S. S.; Pinho-Ribeiro, F. A.; Fattori, V.; Crespigio, J.; Clemente-Napimoga, J. T.; Napimoga, M. H.; Pitol, D. L.; Issa, J. P. M.; Fukada, S. Y.; Casagrande, R.; Verri, W. A. The Flavonoid Quercetin Inhibits Titanium Dioxide (TiO₂)-Induced Chronic Arthritis in Mice. *J. Nutr. Biochem.* **2018**, *53*, 81–95. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2017.10.010>.
- (270) Tat, S. K.; Pelletier, J. P.; Mineau, F.; Caron, J.; Martel-Pelletier, J. Strontium Ranelate Inhibits Key Factors Affecting Bone Remodeling in Human Osteoarthritic Subchondral Bone Osteoblasts. *Bone* **2011**, *49* (3), 559–567. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2011.06.005>.
- (271) Henrotin, Y.; Labasse, A.; Zheng, S. X.; Galais, P.; Tsouderos, Y.; Crielaard, J. M.; Reginster, J. Y. Strontium Ranelate Increases Cartilage Matrix Formation. *J. Bone Miner. Res.* **2001**, *16* (2), 299–308. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2001.16.2.299>.
- (272) Bruyere, O.; Delferriere, D.; Roux, C.; Wark, J. D.; Spector, T.; Devogelaer, J. P.; Brixen, K.; Adami, S.; Fechtenbaum, J.; Kolta, S.; Reginster, J. Y. Effects of Strontium Ranelate on Spinal Osteoarthritis Progression. *Ann. Rheum. Dis.* **2008**, *67* (3), 335–339. <https://doi.org/10.1136/ard.2007.075572>.
- (273) Reginster, J. Y.; Badurski, J.; Bellamy, N.; Bensen, W.; Chapurlat, R.; Chevalier, X.; Christiansen, C.; Genant, H.; Navarro, F.; Nasonov, E.; Sambrook, P. N.; Spector, T. D.; Cooper, C. Efficacy and Safety of Strontium Ranelate in the Treatment of Knee Osteoarthritis: Results of a Double-Blind, Randomised Placebo-Controlled Trial. *Ann. Rheum. Dis.* **2013**, *72* (2), 179–186. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2012-202231>.
- (274) Hughes, S. D.; Ketheesan, N.; Haleagrahara, N. The Therapeutic Potential of Plant Flavonoids on Rheumatoid Arthritis. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2017**, *57* (17), 3601–3613. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1246413>.
- (275) Arnold, W. H.; Prange, M.; Naumova, E. A. Effectiveness of Various Toothpastes on Dentine Tubule Occlusion. *J. Dent.* **2015**, *43* (4), 440–449. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2015.01.014>.
- (276) Clark, D. C.; Hanley, J. A.; Geoghegan, S.; Vinet, D. The Effectiveness of a Fluoride Varnish and a Desensitizing Toothpaste in Treating Dentinal Hypersensitivity. *J. Periodontal Res.* **1985**, *20* (2), 212–219. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.1985.tb00428.x>.
- (277) Lippert, F. The Effects of Lesion Baseline Characteristics and Different Sr:Ca Ratios in Plaque Fluid-like Solutions on Caries Lesion de- and Remineralization. *Arch. Oral Biol.* **2012**, *57* (10), 1299–1306. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2012.08.012>.
- (278) Docimo, R.; Perugia, C.; Bartolino, M.; Maturo, P.; Montesani, L.; Zhang, Y. P.; Devizio, W.; Mateo, L. R.; Dibart, S. Comparative Evaluation of the Efficacy of Three Commercially Available. Toothpastes on Dentin Hypersensitivity Reduction: An Eight-Week Clinical Study. *J. Clin. Dent.* **2011**, *22* (4), 121–127.
- (279) Fagundes, M. R.; Mockdeci, H. R.; Martins, I. C. F.; Granato, A. P. A.; Raposo, N. R. B.; Chaves, M. das G. A. M. Avaliação Ex Vivo Da Obliteração de Túbulos Dentinários Humanos Pelo Uso Comparativo de Agentes Dessensibilizantes Convencionais e Dessensibilizantes Contendo Biovidro. *HU Rev.* **2017**, *43* (1), 39–49.
- (280) Rocha, C. de S.; Prado, M. do; Simão, R. A.; Lima, C. O. de; Gusman, H. Efeito de Agentes Dessensibilizantes Na Obliteração Dos Túbulos Dentinários - Estudo in Vitro. *Rev Bras Odontol* **2016**, *73* (4), 272–276.
- (281) Tovani, C. B.; Oliveira, T. M.; Soares, M. P. R.; Nassif, N.; Fukada, S. Y.; Ciancaglini, P.; Gloter, A.; Ramos, A. P. Strontium Calcium Phosphate Nanotubes as Bioinspired Building Blocks for Bone Regeneration. *ACS Appl.*

- Mater. Interfaces* **2020**, *12* (39), 43422–43434. <https://doi.org/10.1021/acsami.0c12434>.
- (282) Giraud Guille, M. M.; Helary, C.; Vigier, S.; Nassif, N. Dense Fibrillar Collagen Matrices for Tissue Repair. *Soft Matter* **2010**, *6* (20), 4963–4967. <https://doi.org/10.1039/c0sm00260g>.
- (283) Tampieri, A.; Celotti, G.; Landi, E.; Sandri, M.; Roveri, N.; Falini, G. Biologically Inspired Synthesis of Bone-like Composite: Self-Assembled Collagen Fibers/Hydroxyapatite Nanocrystals. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **2003**, *67* (2), 618–625. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.10039>.
- (284) El-Fiqi, A.; Kim, J.-H.; Kim, H.-W. Novel Bone-Mimetic Nanohydroxyapatite/Collagen Porous Scaffolds Biomimetically Mineralized from Surface Silanized Mesoporous Nanobioglass/Collagen Hybrid Scaffold: Physicochemical, Mechanical and in Vivo Evaluations. *Mater. Sci. Eng. C* **2020**, *110* (January), 110660. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110660>.
- (285) Ehrmann, R. L.; Gey, G. O. The Growth of Cells on a Transparent Gel of Reconstituted Rat-Tail. *J. Natl. Cancer Inst.* **1956**, *16* (6), 1375–1403. <https://doi.org/10.1093/jnci/16.6.1375>.
- (286) Heino, J. The Collagen Receptor Integrins Have Distinct Ligand Recognition and Signaling Functions. *Matrix Biol.* **2000**, *19* (4), 319–323. [https://doi.org/10.1016/S0945-053X\(00\)00076-7](https://doi.org/10.1016/S0945-053X(00)00076-7).
- (287) Zeltz, C.; Gullberg, D. The Integrin–Collagen Connection – a Glue for Tissue Repair? *J. Cell Sci.* **2016**, *129* (4), 653–664. <https://doi.org/10.1242/jcs.180992>.
- (288) Barczyk, M.; Carracedo, S.; Gullberg, D. Integrins. *Cell Tissue Res.* **2010**, *339* (1), 269–280. <https://doi.org/10.1007/s00441-009-0834-6>.
- (289) Tuckwell, S.; Humphries, J. Molecular and Cellular Biology of Integrins. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **1993**, *8428* (93), 149–171. [https://doi.org/10.1016/1040-8428\(93\)90053-7](https://doi.org/10.1016/1040-8428(93)90053-7).
- (290) Akiyama, S. K.; Yamada, M. Cell Surface Receptors for Extracellular Matrix Components. **1990**, *1031*, 91–110.
- (291) Bolean, M.; Izzì, B.; van kerckhoven, S.; Bottini, M.; Ramos, A. P.; Millán, J. L.; Hoylaerts, M. F.; Ciancaglini, P. Matrix Vesicle Biomimetics Harboring Annexin A5 and Alkaline Phosphatase Bind to the Native Collagen Matrix Produced by Mineralizing Vascular Smooth Muscle Cells. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **2020**, *1864* (8), 129629. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2020.129629>.
- (292) Veschi, E. A.; Bolean, M.; Strzelecka-kiliszek, A.; Bandorowicz-pikula, J.; Pikula, S.; Granjon, T.; Mebarek, S.; Magne, D.; Ramos, A. P.; Rosato, N.; Millán, J. L.; Buchet, R.; Bottini, M.; Ciancaglini, P. Localization of Annexin A6 in Matrix Vesicles during Physiological Mineralization. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21* (4), 1–16. <https://doi.org/10.3390/ijms21041367>.
- (293) Shapiro, F. Bone Development and Its Relation to Fracture Repair. The Role of Mesenchymal Osteoblasts and Surface Osteoblasts. *Eur. Cells Mater.* **2008**, *15*, 53–76. <https://doi.org/10.22203/eCM.v015a05>.
- (294) Florencio-Silva, R.; Sasso, G. R. D. S.; Sasso-Cerri, E.; Simões, M. J.; Cerri, P. S. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res. Int.* **2015**, *2015*, 1–17. <https://doi.org/10.1155/2015/421746>.
- (295) Amini, A. R.; Laurencin, C. T.; Nukavarapu, S. P. Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges. *Crit. Rev. Biomed. Eng.* **2012**, *40* (5), 363–408. <https://doi.org/10.1615/CritRevBiomedEng.v40.i5.10>.
- (296) Tortelli, F.; Cancedda, R. Three-Dimensional Cultures of Osteogenic and Chondrogenic Cells: A Tissue Engineering Approach to Mimic Bone and Cartilage in Vitro. *European Cells and Materials*. June 2009, pp 1–14. <https://doi.org/10.22203/eCM.v017a01>.
- (297) Wang, Y.; Silvent, J.; Robin, M.; Babonneau, F.; Meddahi-Pellé, A.; Nassif, N.; Giraud Guille, M. M. Controlled Collagen Assembly to Build Dense Tissue-like Materials for Tissue Engineering. *Soft Matter* **2011**, *7* (20), 9659. <https://doi.org/10.1039/c1sm05868a>.
- (298) Sheykhasan, M.; Ghiasi, M. Key Transcription Factors Involved in the Differentiation of Mesenchymal Stem

- Cells: Review Article. *Tehran Univ. Med. J.* **2017**, *75* (9), 621–631.
- (299) Teufel, S.; Hartmann, C. Wnt-Signaling in Skeletal Development. In *Current Topics in Developmental Biology*; 2019; Vol. 133, pp 235–279. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2018.11.010>.
- (300) Juhász, T.; Helgadottir, S. L.; Tamás, A.; Reglődi, D.; Zákány, R. PACAP and VIP Signaling in Chondrogenesis and Osteogenesis. *Peptides* **2015**, *66*, 51–57. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.02.001>.
- (301) Strzelecka-Kiliszek, A.; Mebarek, S.; Roszkowska, M.; Buchet, R.; Magne, D.; Pikula, S. Functions of Rho Family of Small GTPases and Rho-Associated Coiled-Coil Kinases in Bone Cells during Differentiation and Mineralization. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **2017**, *1861* (5), 1009–1023. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.02.005>.
- (302) Guo, X.; Wang, X.-F. Signaling Cross-Talk between TGF- β /BMP and Other Pathways. *Cell Res.* **2009**, *19* (1), 71–88. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.302>.
- (303) Farrell, E.; O'Brien, F. J.; Doyle, P.; Fischer, J.; Yannas, I.; Harley, B. A.; O'Connell, B.; Prendergast, P. J.; Campbell, V. A. A Collagen-Glycosaminoglycan Scaffold Supports Adult Rat Mesenchymal Stem Cell Differentiation along Osteogenic and Chondrogenic Routes. *Tissue Eng.* **2006**, *12* (3), 459–468. <https://doi.org/10.1089/ten.2006.12.459>.
- (304) Cheng, H. W.; Yuan, M. T.; Li, C. W.; Chan, B. P. Cell-Derived Matrices (CDM)—Methods, Challenges and Applications. In *Methods in Cell Biology*; 2020; Vol. 156, pp 235–258. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2020.01.001>.
- (305) Caron, M. M. J.; Emans, P. J.; Coolen, M. M. E.; Voss, L.; Surtel, D. A. M.; Cremers, A.; van Rhijn, L. W.; Welting, T. J. M. Redifferentiation of Dedifferentiated Human Articular Chondrocytes: Comparison of 2D and 3D Cultures. *Osteoarthr. Cartil.* **2012**, *20* (10), 1170–1178. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2012.06.016>.
- (306) Ahmed, M.; Ramos, T. A. D. S.; Damanik, F.; Quang Le, B.; Wieringa, P.; Bennink, M.; van Blitterswijk, C.; de Boer, J.; Moroni, L. A Combinatorial Approach towards the Design of Nanofibrous Scaffolds for Chondrogenesis. *Sci. Rep.* **2015**, *5* (1), 14804. <https://doi.org/10.1038/srep14804>.
- (307) Lin, Z.; Willers, C.; Xu, J.; Zheng, M. H. The Chondrocyte: Biology and Clinical Application. *Tissue Eng.* **2006**, *12* (7), 1971–1984. <https://doi.org/10.1089/ten.2006.12.1971>.
- (308) van Susante, J. L. C.; Buma, P.; van Osch, G. J.; Versleyen, D.; van der Kraan, P. M.; van der Berg, W. B.; Homminga, G. N. Culture of Chondrocytes in Alginate and Collagen Carrier Gels. *Acta Orthop.* **1995**, *66* (6), 549–556. <https://doi.org/10.3109/17453679509002314>.
- (309) Albrecht, C.; Tichy, B.; Nürnberger, S.; Hosiner, S.; Zak, L.; Aldrian, S.; Marlovits, S. Gene Expression and Cell Differentiation in Matrix-Associated Chondrocyte Transplantation Grafts: A Comparative Study. *Osteoarthr. Cartil.* **2011**, *19* (10), 1219–1227. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2011.07.004>.
- (310) Baker, B. M.; Chen, C. S. Deconstructing the Third Dimension – How 3D Culture Microenvironments Alter Cellular Cues. *J. Cell Sci.* **2012**, *125* (13), 3015–3024. <https://doi.org/10.1242/jcs.079509>.
- (311) Foldager, C. B. Induz. Advances in Autologous Chondrocyte Implantation and Related Techniques for Cartilage Repair. *Dan. Med. J.* **2013**, *60* (4), B4600.
- (312) Dennis, S. C.; Berklund, C. J.; Bonewald, L. F.; Detamore, M. S. Endochondral Ossification for Enhancing Bone Regeneration: Converging Native Extracellular Matrix Biomaterials and Developmental Engineering In Vivo. *Tissue Eng. Part B Rev.* **2015**, *21* (3), 247–266. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2014.0419>.
- (313) Nazempour, A.; Van Wie, B. J. Chondrocytes, Mesenchymal Stem Cells, and Their Combination in Articular Cartilage Regenerative Medicine. *Ann. Biomed. Eng.* **2016**, *44* (5), 1325–1354. <https://doi.org/10.1007/s10439-016-1575-9>.
- (314) Zou, J.; Bai, B.; Yao, Y. Progress of Co-Culture Systems in Cartilage Regeneration. *Expert Opin. Biol. Ther.* **2018**, *18* (11), 1151–1158. <https://doi.org/10.1080/14712598.2018.1533116>.

- (315) Liu, M.; Zeng, X.; Ma, C.; Yi, H.; Ali, Z.; Mou, X.; Li, S.; Deng, Y.; He, N. Injectable Hydrogels for Cartilage and Bone Tissue Engineering. *Bone Res.* **2017**, *5* (January). <https://doi.org/10.1038/boneres.2017.14>.
- (316) Stagnaro, P.; Schizzi, I.; Utzeri, R.; Marsano, E.; Castellano, M. Alginate-Polymethacrylate Hybrid Hydrogels for Potential Osteochondral Tissue Regeneration. *Carbohydr. Polym.* **2018**, *185* (December 2017), 56–62. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.01.012>.
- (317) Nourmohammadi, J.; Roshanfar, F.; Farokhi, M.; Haghbin Nazarpak, M. Silk Fibroin/Kappa-Carrageenan Composite Scaffolds with Enhanced Biomimetic Mineralization for Bone Regeneration Applications. *Mater. Sci. Eng. C* **2017**, *76*, 951–958. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.166>.
- (318) Bhardwaj, N.; Singh, Y. P.; Mandal, B. B. Silk Fibroin Scaffold-Based 3D Co-Culture Model for Modulation of Chondrogenesis without Hypertrophy via Reciprocal Cross-Talk and Paracrine Signaling. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2019**, *5* (10), 5240–5254. <https://doi.org/10.1021/acsbomaterials.9b00573>.
- (319) Bell, E.; Ivarsson, B.; Merrill, C. Production of a Tissue-like Structure by Contraction of Collagen Lattices by Human Fibroblasts of Different Proliferative Potential in Vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1979**, *76* (3), 1274–1278. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.3.1274>.
- (320) Coyac, B. R.; Chicatun, F.; Hoac, B.; Nelea, V.; Chaussain, C.; Nazhat, S. N.; McKee, M. D. Mineralization of Dense Collagen Hydrogel Scaffolds by Human Pulp Cells. *J. Dent. Res.* **2013**, *92* (7), 648–654. <https://doi.org/10.1177/0022034513488599>.
- (321) Neves, M. I.; Araújo, M.; Moroni, L.; da Silva, R. M. P.; Barrias, C. C. Glycosaminoglycan-Inspired Biomaterials for the Development of Bioactive Hydrogel Networks. *Molecules* **2020**, *25* (4), 978. <https://doi.org/10.3390/molecules25040978>.
- (322) Walimbe, T.; Panitch, A. Best of Both Hydrogel Worlds: Harnessing Bioactivity and Tunability by Incorporating Glycosaminoglycans in Collagen Hydrogels. *Bioengineering* **2020**, *7* (4), 1–24. <https://doi.org/10.3390/bioengineering7040156>.
- (323) Rico-Llanos, G. A.; Borrego-González, S.; Moncayo-Donoso, M.; Becerra, J.; Visser, R. Collagen Type I Biomaterials as Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Polymers (Basel)*. **2021**, *13* (4), 599. <https://doi.org/10.3390/polym13040599>.
- (324) Geanaliu-Nicolae, R.-E.; Andronescu, E. Blended Natural Support Materials—Collagen Based Hydrogels Used in Biomedicine. *Materials (Basel)*. **2020**, *13* (24), 5641. <https://doi.org/10.3390/ma13245641>.
- (325) Irawan, V.; Sung, T.-C.; Higuchi, A.; Ikoma, T. Collagen Scaffolds in Cartilage Tissue Engineering and Relevant Approaches for Future Development. *Tissue Eng. Regen. Med.* **2018**, *15* (6), 673–697. <https://doi.org/10.1007/s13770-018-0135-9>.
- (326) Sánchez-Cid, P.; Jiménez-Rosado, M.; Perez-Puyana, V.; Guerrero, A.; Romero, A. Rheological and Microstructural Evaluation of Collagen-Based Scaffolds Crosslinked with Fructose. *Polymers (Basel)*. **2021**, *13* (4), 1–11. <https://doi.org/10.3390/polym13040632>.
- (327) Wang, Y.; Azaïs, T.; Robin, M.; Vallée, A.; Catania, C.; Legriél, P.; Pehau-arnaudet, G.; Babonneau, F.; Nassif, N. The Predominant Role of Collagen in The. *Nat. Mater.* **2012**, *11* (8), 724–733. <https://doi.org/10.1038/nmat3362>.
- (328) Wang, Y.; Azaïs, T.; Robin, M.; Vallée, A.; Catania, C.; Legriél, P.; Pehau-Arnaudet, G.; Babonneau, F.; Giraud-Guille, M. M.; Nassif, N. The Predominant Role of Collagen in the Nucleation, Growth, Structure and Orientation of Bone Apatite. *Nat. Mater.* **2012**, *11* (8), 724–733. <https://doi.org/10.1038/nmat3362>.
- (329) França, C. M.; Thirivikraman, G.; Athirasala, A.; Tahayeri, A.; Gower, L. B.; Bertassoni, L. E. The Influence of Osteopontin-Guided Collagen Intrafibrillar Mineralization on Pericyte Differentiation and Vascularization of Engineered Bone Scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* **2019**, *107* (5), 1522–1532. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34244>.

- (330) Silvent, J.; Nassif, N.; Helary, C.; Azaïs, T.; Sire, J. Y.; Guille, M. M. G. Collagen Osteoid-Like Model Allows Kinetic Gene Expression Studies of Non-Collagenous Proteins in Relation with Mineral Development to Understand Bone Biomineralization. *PLoS One* **2013**, *8* (2), e57344. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057344>.
- (331) Lee, J.; Kim, G. Three-Dimensional Hierarchical Nanofibrous Collagen Scaffold Fabricated Using Fibrillated Collagen and Pluronic F-127 for Regenerating Bone Tissue. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10* (42), 35801–35811. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b14088>.
- (332) Lallier, T. E.; Yukna, R.; Moses, R. L. Extracellular Matrix Molecules Improve Periodontal Ligament Cell Adhesion to Anorganic Bone Matrix. *J. Dent. Res.* **2001**, *80* (8), 1748–1752. <https://doi.org/10.1177/00220345010800081301>.
- (333) Jacobs, T.; Morent, R.; De Geyter, N.; Dubruel, P.; Leys, C. Plasma Surface Modification of Biomedical Polymers: Influence on Cell-Material Interaction. *Plasma Chem. Plasma Process.* **2012**, *32* (5), 1039–1073. <https://doi.org/10.1007/s11090-012-9394-8>.
- (334) Kruger, T. E.; Miller, A. H.; Wang, J. Collagen Scaffolds in Bone Sialoprotein-Mediated Bone Regeneration. *Sci. World J.* **2013**, *2013* (1), 1–6. <https://doi.org/10.1155/2013/812718>.
- (335) Mizuno, M.; Imai, T.; Fujisawa, R.; Tani, H.; Kuboki, Y. Bone Sialoprotein (BSP) Is a Crucial Factor for the Expression of Osteoblastic Phenotypes of Bone Marrow Cells Cultured on Type I Collagen Matrix. *Calcif. Tissue Int.* **2000**, *66* (5), 388–396. <https://doi.org/10.1007/s002230010078>.
- (336) Schmidt, J. R.; Kliemt, S.; Preissler, C.; Moeller, S.; von Bergen, M.; Hempel, U.; Kalkhof, S. Osteoblast-Released Matrix Vesicles, Regulation of Activity and Composition by Sulfated and Non-Sulfated Glycosaminoglycans. *Mol. Cell. Proteomics* **2016**, *15* (2), 558–572. <https://doi.org/10.1074/mcp.M115.049718>.
- (337) Vaughan-Thomas, A.; Young, R. D.; Phillips, A. C.; Duance, V. C. Characterization of Type XI Collagen-Glycosaminoglycan Interactions. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (7), 5303–5309. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008764200>.
- (338) Bi, Y.; Patra, P.; Faezipour, M. Structure of Collagen-Glycosaminoglycan Matrix and the Influence to Its Integrity and Stability. *2014 36th Annu. Int. Conf. IEEE Eng. Med. Biol. Soc. EMBC 2014* **2014**, 3949–3952. <https://doi.org/10.1109/EMBC.2014.6944488>.
- (339) Ryan, A. J.; Gleeson, J. P.; Matsiko, A.; Thompson, E. M.; O'Brien, F. J. Effect of Different Hydroxyapatite Incorporation Methods on the Structural and Biological Properties of Porous Collagen Scaffolds for Bone Repair. *J. Anat.* **2015**, *227* (6), 732–745. <https://doi.org/10.1111/joa.12262>.
- (340) Alhag, M.; Farrell, E.; Toner, M.; Claffey, N.; Lee, T. C.; O'Brien, F. Evaluation of Early Healing Events around Mesenchymal Stem Cell-Seeded Collagen–Glycosaminoglycan Scaffold. An Experimental Study in Wistar Rats. *Oral Maxillofac. Surg.* **2011**, *15* (1), 31–39. <https://doi.org/10.1007/s10006-010-0241-x>.
- (341) Keogh, M. B.; O'Brien, F. J.; Daly, J. S. A Novel Collagen Scaffold Supports Human Osteogenesis - Applications for Bone Tissue Engineering. *Cell Tissue Res.* **2010**, *340* (1), 169–177. <https://doi.org/10.1007/s00441-010-0939-y>.
- (342) Farrell, E.; Byrne, E. M.; Fischer, J.; O'Brien, F. J.; O'Connell, B. C.; Prendergast, P. J.; Campbell, V. A. A Comparison of the Osteogenic Potential of Adult Rat Mesenchymal Stem Cells Cultured in 2-D and on 3-D Collagen Glycosaminoglycan Scaffolds. *Technol. Heal. Care* **2007**, *15* (1), 19–31. <https://doi.org/10.3233/thc-2007-15103>.
- (343) Byrne, E. M.; Farrell, E.; McMahon, L. A.; Haugh, M. G.; O'Brien, F. J.; Campbell, V. A.; Prendergast, P. J.; O'Connell, B. C. Gene Expression by Marrow Stromal Cells in a Porous Collagen- Glycosaminoglycan Scaffold Is Affected by Pore Size and Mechanical Stimulation. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2008**, *19* (11), 3455–3463. <https://doi.org/10.1007/s10856-008-3506-2>.
- (344) Rother, S.; Salbach-Hirsch, J.; Moeller, S.; Seemann, T.; Schnabelrauch, M.; Hofbauer, L. C.; Hintze, V.; Scharnweber, D. Bioinspired Collagen/Glycosaminoglycan-Based Cellular Microenvironments for Tuning Osteoclastogenesis. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7* (42), 23787–23797.

<https://doi.org/10.1021/acsami.5b08419>.

- (345) Harley, B. A.; Lynn, A. K.; Wissner-Gross, Z.; Bonfield, W.; Yannas, I. V.; Gibson, L. J. Design of a Multiphase Osteochondral Scaffold. II. Fabrication of a Mineralized Collagen-Glycosaminoglycan Scaffold. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **2010**, *92* (3), 1066–1077. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32361>.
- (346) Zhou, Q.; Ren, X.; Bischoff, D.; Weisgerber, D. W.; Yamaguchi, D. T.; Miller, T. A.; Harley, B. A. C.; Lee, J. C. Nonmineralized and Mineralized Collagen Scaffolds Induce Differential Osteogenic Signaling Pathways in Human Mesenchymal Stem Cells. *Adv. Healthc. Mater.* **2017**, *6* (23), 1700641. <https://doi.org/10.1002/adhm.201700641>.
- (347) Andersen, T.; Auk-Emblem, P.; Dornish, M. 3D Cell Culture in Alginate Hydrogels. *Microarrays* **2015**, *4* (2), 133–161. <https://doi.org/10.3390/microarrays4020133>.
- (348) Liu, P.; Shen, H.; Zhi, Y.; Si, J.; Shi, J.; Guo, L.; Shen, S. G. 3D Bioprinting and in Vitro Study of Bilayered Membranous Construct with Human Cells-Laden Alginate/Gelatin Composite Hydrogels. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2019**, *181* (January), 1026–1034. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.06.069>.
- (349) Piras, C. C.; Smith, D. K. Multicomponent Polysaccharide Alginate-Based Bioinks. *J. Mater. Chem. B* **2020**, *8* (36), 8171–8188. <https://doi.org/10.1039/D0TB01005G>.
- (350) Popa, E. G.; Caridade, S. G.; Mano, J. F.; Reis, R. L.; Gomes, M. E. Chondrogenic Potential of Injectable K-Carrageenan Hydrogel with Encapsulated Adipose Stem Cells for Cartilage Tissue-Engineering Applications. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2015**, *9* (5), 550–563. <https://doi.org/10.1002/term.1683>.
- (351) González Ocampo, J. I.; Machado de Paula, M. M.; Bassous, N. J.; Lobo, A. O.; Ossa Orozco, C. P.; Webster, T. J. Osteoblast Responses to Injectable Bone Substitutes of Kappa-Carrageenan and Nano Hydroxyapatite. *Acta Biomater.* **2019**, *83*, 425–434. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.10.023>.
- (352) Li, J.; Yang, B.; Qian, Y.; Wang, Q.; Han, R.; Hao, T.; Shu, Y.; Zhang, Y.; Yao, F.; Wang, C. Iota-Carrageenan/Chitosan/Gelatin Scaffold for the Osteogenic Differentiation of Adipose-Derived MSCs in Vitro. *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* **2015**, *103* (7), 1498–1510. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33339>.
- (353) Goonoo, N.; Khanbabaee, B.; Steuber, M.; Bhaw-Luximon, A.; Jonas, U.; Pietsch, U.; Jhurry, D.; Schönherr, H. κ-Carrageenan Enhances the Biomineralization and Osteogenic Differentiation of Electrospun Polyhydroxybutyrate and Polyhydroxybutyrate Valerate Fibers. *Biomacromolecules* **2017**, *18* (5), 1563–1573. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b00150>.
- (354) Kassab, Z.; Aziz, F.; Hannache, H.; Ben Youcef, H.; El Achaby, M. Improved Mechanical Properties of K-Carrageenan-Based Nanocomposite Films Reinforced with Cellulose Nanocrystals. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *123* (1), 1248–1256. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.030>.
- (355) Feng, W.; Feng, S.; Tang, K.; He, X.; Jing, A.; Liang, G. A Novel Composite of Collagen-Hydroxyapatite/Kappa-Carrageenan. *J. Alloys Compd.* **2017**, *693*, 482–489. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2016.09.234>.
- (356) Piculell, L.; Nilsson, S.; Ström, P. On the Specificity of the Binding of Cations to Carrageenans: Counterion N.M.R. Spectroscopy in Mixed Carrageenan Systems. *Carbohydr. Res.* **1989**, *188*, 121–135. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(89\)84065-0](https://doi.org/10.1016/0008-6215(89)84065-0).
- (357) Yuguchi, Y.; Urakawa, H.; Kajiwara, K. Structural Characteristics of Carrageenan Gels: Various Types of Counter Ions. *Food Hydrocoll.* **2003**, *17* (4), 481–485. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(03\)00021-3](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(03)00021-3).
- (358) Nogueira, L. F. B.; Maniglia, B. C.; Pereira, L. S.; Tapia-Blácido, D. R.; Ramos, A. P. Formation of Carrageenan-CaCO₃ Bioactive Membranes. *Mater. Sci. Eng. C* **2016**, *58*, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.08.021>.
- (359) Nogueira, L. F. B.; Maniglia, B. C.; Blácido, D. R. T.; Ramos, A. P. Organic-Inorganic Collagen/Iota-carrageenan/Hydroxyapatite Hybrid Membranes Are Bioactive Materials for Bone Regeneration. *J. Appl. Polym. Sci.* **2019**, *136* (39), 48004. <https://doi.org/10.1002/app.48004>.
- (360) Hirenkumar, M.; Steven, S. Poly Lactic-Co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery

- Carrier. *Polymers (Basel)*. **2012**, 3 (3), 1–19. <https://doi.org/10.3390/polym3031377>.Poly.
- (361) Yang, X.; Li, Y.; He, W.; Huang, Q.; Zhang, R.; Feng, Q. Hydroxyapatite/Collagen Coating on PLGA Electrospun Fibers for Osteogenic Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **2018**, 106 (11), 2863–2870. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36475>.
- (362) Kwak, S.; Haider, A.; Gupta, K. C.; Kim, S.; Kang, I. K. Micro/Nano Multilayered Scaffolds of PLGA and Collagen by Alternately Electrospinning for Bone Tissue Engineering. *Nanoscale Res. Lett.* **2016**, 11 (1). <https://doi.org/10.1186/s11671-016-1532-4>.
- (363) Ngiam, M.; Liao, S.; Patil, A. J.; Cheng, Z.; Chan, C. K.; Ramakrishna, S. The Fabrication of Nano-Hydroxyapatite on PLGA and PLGA/Collagen Nanofibrous Composite Scaffolds and Their Effects in Osteoblastic Behavior for Bone Tissue Engineering. *Bone* **2009**, 45 (1), 4–16. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2009.03.674>.
- (364) Liao, S.; Wang, W.; Uo, M.; Ohkawa, S.; Akasaka, T.; Tamura, K.; Cui, F.; Watari, F. A Three-Layered Nano-Carbonated Hydroxyapatite/Collagen/PLGA Composite Membrane for Guided Tissue Regeneration. *Biomaterials* **2005**, 26 (36), 7564–7571. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.05.050>.
- (365) Holderegger, C.; Schmidlin, P.; Weber, F.; Mohn, D. Preclinical in Vivo Performance of Novel Biodegradable, Electrospun Poly(Lactic Acid) and Poly(Lactic-Co-Glycolic Acid) Nanocomposites: A Review. *Materials (Basel)*. **2015**, 8 (8), 4912–4931. <https://doi.org/10.3390/ma8084912>.
- (366) Yang, W.; Both, S.; van Osch, G.; Wang, Y.; Jansen, J.; Yang, F. Performance of Different Three-Dimensional Scaffolds for in Vivo Endochondral Bone Generation. *Eur. Cells Mater.* **2014**, 27, 350–364. <https://doi.org/10.22203/eCM.v027a25>.
- (367) Dai, W.; Kawazoe, N.; Lin, X.; Dong, J.; Chen, G. The Influence of Structural Design of PLGA/Collagen Hybrid Scaffolds in Cartilage Tissue Engineering. *Biomaterials* **2010**, 31 (8), 2141–2152. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.11.070>.
- (368) Chenyu, C.; Deng, J.; Hou, Y.; Xiang, L.; Wu, Y.; Qu, Y.; Man, Y. Application of PEG and EGCG Modified Collagen-Base Membrane to Promote Osteoblasts Proliferation. *Mater. Sci. Eng. C* **2017**, 76, 31–36. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.02.157>.
- (369) Schroeder, M. E.; Gonzalez Rodriguez, A.; Speckl, K. F.; Walker, C. J.; Midekssa, F. S.; Grim, J. C.; Weiss, R. M.; Anseth, K. S. Collagen Networks within 3D PEG Hydrogels Support Valvular Interstitial Cell Matrix Mineralization. *Acta Biomater.* **2021**, 119, 197–210. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.11.012>.
- (370) Shen, S.; Kiong, W.; Dong, Y.; Ng, J.; Hee, R. Nanostructured Material Formulated Acrylic Bone Cements with Enhanced Drug Release. *Mater. Sci. Eng. C* **2016**, 58, 233–241. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.08.011>.
- (371) Tang, Y.; Chen, L.; Wu, Z.; Zhao, K.; Tan, Q. Fabrication of Injectable and Expandable PMMA / PAAS f Bone Cements. *Compos. Sci. Technol.* **2017**, 146, 203–209. <https://doi.org/10.1016/j.compscitech.2017.04.032>.
- (372) Hu, Y.; Chen, J.; Fan, T.; Zhang, Y.; Zhao, Y.; Shi, X.; Zhang, Q. Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Biomimetic Mineralized Hierarchical Hybrid Scaffolds Based on in Situ Synthesis of Nano-Hydroxyapatite / Chitosan / Chondroitin Sulfate / Hyaluronic Acid for Bone Tissue Engineering. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2017**, 157, 93–100. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.05.059>.
- (373) Aparecida, A. H.; Vinícius, M.; Fook, L.; Luis, M.; Guastaldi, C.; Físico-química, D. De; Química, I. De; Paulista, U. E.; Degni, R. F. Artigo. *Quim. Nov.* **2007**, 30 (4), 892–896.
- (374) Wang, C.; Duan, Y.; Markovic, B.; Barbara, J.; Howlett, C. R.; Zhang, X.; Zreiqat, H. Phenotypic Expression of Bone-Related Genes in Osteoblasts Grown on Calcium Phosphate Ceramics with Different Phase Compositions. *Biomaterials* **2004**, 25 (13), 2507–2514. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.09.035>.
- (375) Sadat-Shojai, M.; Khorasani, M. T.; Dinpanah-Khoshdargi, E.; Jamshidi, A. Synthesis Methods for Nanosized Hydroxyapatite with Diverse Structures. *Acta Biomater.* **2013**, 9 (8), 7591–7621. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.04.012>.

- (376) Hing, K.; Gibson, I.; Revell, P.; Best, S.; Bonfield, W. Influence of Phase Purity on the in Vivo Response to Hydroxyapatite. *Key Eng. Mater.* **2000**, *195*, 373–376. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/KEM.192-195.373>.

ANEXOS