

# UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



**Patrícia da Luz Moreira**

Avaliação *in vitro* dos processos de proliferação e diferenciação de células osteoblásticas e a mineralização sobre matrizes aniônicas de colágeno para reparo ósseo

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) PATRICIA DA LUZ MOREIRA.  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Doutor em Biologia Celular e Estrutural na área de Biologia Celular

Orientadora: **Profa. Dra. Selma Candelária Genari**  
Co-orientador: **Prof. Dr. Arnaldo Rodrigues do Santos Jr.**

Campinas – SP  
2005

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

**M813a**

Moreira, Patrícia da Luz  
Avaliação *in vitro* dos processos de proliferação e  
diferenciação de células osteoblásticas e a mineralização  
sobre matrizes aniônicas de colágeno para reparo ósseo /  
Patrícia da Luz Moreira. -- Campinas, SP: [s.n.], 2005.

***Orientadora: Selma Candelária Genari***

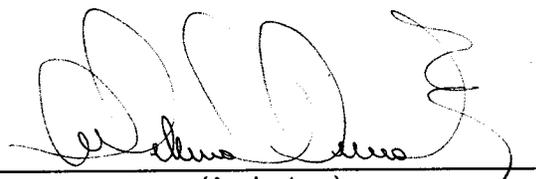
Co-orientador: Arnaldo Rodrigues dos Santos Júnior  
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.  
Instituto de Biologia.

1. Colágeno. 2. Ossos - Regeneração. 3. Biomineralização.  
4. Tecidos. I. Selma Candelária Genari. II. Arnaldo  
Rodrigues dos Santos Júnior. III. Universidade Estadual de  
Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título

Campinas, 24 de fevereiro de 2005.

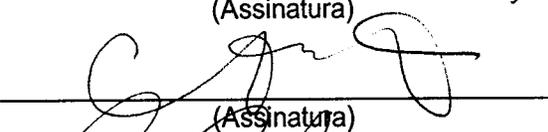
**Banca Examinadora**

Profa. Dra. Selma Candelária Genari  
(Orientador)



(Assinatura)

Prof. Dr. Celso Ap. Bertran



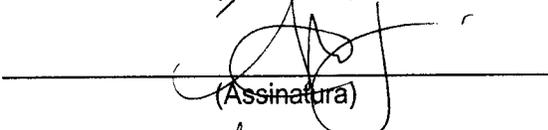
(Assinatura)

Prof. Dr. Paulo Joazeiro



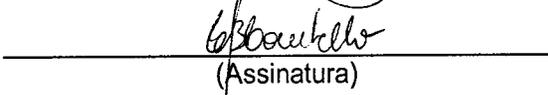
(Assinatura)

Prof. Dr. Gilberto Goissis



(Assinatura)

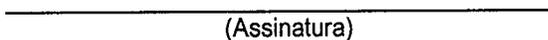
Profa. Dra. Christiane B. Lombello



(Assinatura)

**Suplentes**

Prof. Dr. Edson R. Pimentel



(Assinatura)

Profa. Dra. Eliana Ap. Resende Duek



(Assinatura)

***“A ciência tem raízes muito amargas, mas frutos muito doces”***

***Aristóteles***

## AGRADECIMENTOS

Nestes 4 longos anos, muitas pessoas especiais participaram e colaboraram para a realização desse trabalho. Muitas delas me incentivaram a continuar mesmo em momentos difíceis o que sempre tornou meu convívio no departamento imensamente prazeroso e, que de certa forma, contribuiu enormemente no êxito deste trabalho.

À Profa. Selma Candelária Genari pela dedicação e soberba orientação profissional, sem a qual eu não teria concluído esse trabalho e nas quais eu me espelho sempre. Obrigada pelo carinho, confiança e ensinamentos tanto profissionais quanto pessoais. Levo-os comigo e lhe sou eternamente grata pelo o que sou hoje profissionalmente. Pretendo cultivar nossa amizade independentemente de nossos vínculos profissionais. Agradeço também ao seu marido German pelos inúmeros conselhos profissionais, amizade e convivência ao longo desses anos.

Ao Prof. Arnaldo Rodrigues do Santos Jr., inicialmente meu colega de bancada, hoje meu co-orientador, pelo grande incentivo em todos os momentos e ensinamentos fundamentais para que eu concluísse esse trabalho e iniciasse outros desafios. Obrigada pela amizade e colaboração nesses anos de vida acadêmica sem os quais não seria possível chegar até aqui. Sua amizade continuará sendo inestimável para meu constante aprendizado profissional e pessoal.

Ao Prof. Leandro Petinari pela amizade, colaboração e incentivos imprescindíveis nesses anos todos e que eu espero poder manter indefinidamente.

Ao Dr. Yuehwei H. An pela orientação brilhante durante meu doutorado sanduíche, além da amizade e colaboração constante desde meu retorno ao Brasil. Agradeço também sua esposa Dr. Qian K. Kang pela amizade e companheirismo que se

tornou um exemplo de profissionalismo para mim. Obrigada também à Dr. Katheleen Hoogan, minha companheira em muitas aventuras pelos EUA.

Ao Prof. Gilberto Goissis por ter me concedido as matrizes de colágeno.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES) pelo apoio financeiro no Brasil e durante meu doutorado sanduíche, sem o qual esse trabalho não poderia ter sido realizado.

Aos meus colegas de pós-graduação e em especial a Karina, Leandro, Ana Cristina, Adelina, Klélia, Odair, Marta, Carmem que sempre estiveram presentes no desenvolvimento do meu trabalho e me mantiveram perseverante quanto ao objetivo final do mesmo. Gostaria também de agradecer-los pela convivência inestimável ao longo de todos esses anos e pelos inúmeros cafés que contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal. Vou sentir saudades!!!!

À Profa. Mary Ann Heidi Dolder e Profa. Karina Mancini que contribuíram e me orientaram de forma imprescindível nas microscopias eletrônicas desse trabalho.

Ao pessoal do Laboratório de Microscopia Eletrônica pelo apoio técnico prestado ao longo desses anos.

Ao Prof. Dr. Fernando Galembeck do Instituto de Química da UNICAMP, pela inestimável ajuda nas análises por EDS.

À secretária do Departamento de Biologia Celular da UNICAMP, especialmente a Liliam A. S. Panágio pela atenção e auxílio sempre prontamente prestados.

Aos professores do Departamento de Biologia Celular, em especial a Profa. Dra. Shirlei Maria Recco Pimentel pelo apoio e incentivo durante meu doutorado sanduíche e pelo auxílio em minha recente conquista profissional. Ao Prof. Dr. Ângelo L. Cortelazzo pelo auxílio direto ou indireto em diversas etapas do trabalho.

Aos membros da pré-banca e da banca pela leitura cuidadosa e sugestões inestimáveis para a versão final deste trabalho.

Aos meus queridos amigos Alex, Luciana, Manuela, Ricardo, Soraya que apesar de nem sempre estarem presentes, sempre me apoiaram e me incentivaram em todos os aspectos da minha vida e me acompanham agora e sempre.

Aos meus pais Guilherme e Evanilde e minha irmã Luciana, pelo constante incentivo e por terem sempre acreditado na minha capacidade, sem nenhum momento de pessimismo. Obrigada pelo apoio e espero poder, um dia, retribuir todo o investimento e confiança depositados em mim.

À todos que por ventura não tenham sido citados acima, mas que, direta ou indiretamente colaboraram para a execução deste trabalho.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>xii</b>
<b>LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS.....</b>	<b>xiii</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>xv</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xvii</b>
<b>ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO.....</b>	<b>xix</b>
<b>Capítulo 1.....</b>	<b>20</b>
1. Introdução.....	21
2. Biologia da Regeneração sem Perda de Massa Óssea.....	22
2.1. Mineralização Óssea.....	24
3. Biologia da Regeneração com Perda de Massa Óssea.....	27
3.1. Engenharia de Tecidos e Biomateriais.....	29
3.1.2. Engenharia Óssea, Implantes e Biomateriais.....	35
4. Interações Celulares com Biomateriais para Reparo Ósseo.....	40
5. Colágeno como Biomaterial.....	42
5.1. Características Estruturais do Colágeno.....	44
5.2. Interações Celulares com o Colágeno.....	48
5.3. Colágeno Aniônico como Scaffold para Reparo do Tecido Ósseo.....	49

6. Objetivos.....	53
6.1. Objetivos Gerais.....	53
6.2. Objetivos Específicos.....	54
<b>Capítulo 2.....</b>	<b>55</b>
Collagen-Based Scaffold for Bone and Cartilage Repair.....	56
<b>Capítulo 3.....</b>	<b>61</b>
<i>In Vitro</i> Analysis of Anionic Collagen Scaffolds for Bone Repair.....	62
<b>Capítulo 4.....</b>	<b>71</b>
Characterization of Cellular Differentiation and Mineralization on Anionic Collagen Scaffolds for Bone Repair.....	72
<b>Capítulo 5.....</b>	<b>95</b>
Conclusões Gerais.....	96
<b>Capítulo 6.....</b>	<b>98</b>
Referências.....	99
<b>Apêndice .....</b>	<b>113</b>

## LISTA DE FIGURAS

### **Capítulo 1**

Figura 1 – Diagrama da formação e estrutura do colágeno

Figura 2 - Hidrólise alcalina dos grupos carboxiamidas dos resíduos de Asn e Gln.

Figura 3 – Ligações cruzadas induzidas por glutaraldeído na molécula de colágeno

### **Capítulo 2**

Figure 1 – Diagram of collagen formation and structure

Figure 2 – Collagen/HA scaffold (HA-CC) created in the authors' laboratory.

### **Capítulo 3**

Figure 1 – Cellular adhesion assay.

Figure 2 – Von Kossa staining.

Figure 3 – Toluidine blue staining of samples cultured in Whitson's DMEM medium.

Figure 4 - Toluidine blue staining of samples cultured in mineralization medium.

Figure 5 – Enzymatic detection of chondroitin sulfate by chondroitinase AC.

Figure 6 – ALP production from osteoblasts cultured on matrix samples in mineralization medium.

Figure 7 - ALP production from osteoblasts cultured on matrix samples in Whitson's DMEM medium.

**Capítulo 4**

Figure 1 – Scanning electron microscopy of osteoblasts on the native, BP 24 and BP 48 matrices cultured on common and mineralization médium, respectively.

Figure 2 – Element mapping of P, Ca and Mg at BP 48 matrix kept in mineralization medium.

Figure 3 – EDS spectra of matrices cultured on mineralization medium.

Figure 4 – EDS spectra of matrices cultured on common medium.

Figure 5 – Transmission electron microscopy of the matrices.

Figure 6 – Osteocalcin immunocytochemical micrographs on native, BP 24 and BP 48 matrices cultured on common and mineralization medium, respectively.

## LISTA DE TABELAS

### **Capítulo 1**

Tabela 1 – Principais fatores de crescimento e suas ações.

Tabela 2 – Vantagens e desvantagens de biomateriais com base em colágeno.

Tabela 3 – Classes, tipos e características distintas dos colágenos.

Tabela 4 – Características químicas das matrizes de colágeno aniônicas

Tabela 5 – Incremento de grupos carboxílicos e características morfológicas das matrizes de colágeno aniônicas.

### **Capítulo 2**

Table 1 – Advantages and disadvantages of collagen-based material for medical application

### **Capítulo 4**

Table 1 – Atomic concentration (%) of elements detected on the different samples.

## LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

- $\beta$ GP -  $\beta$ - glicerofosfato  
AFM – microscopia de força atômica  
ALP – Fosfatase alcalina  
Arg – arginina  
Asp – aspartato ou ácido aspártico  
BMP – proteína morfogenética do osso  
BP – pericárdio bovino  
BSP – sialoproteína óssea  
Ca – cálcio  
CLAC – componente tipo colágeno da placa amielide de Alzheimer  
CS – condroitin sulfato  
DDPA – difenilfosforilazida  
DMEM – meio Dulbecco modificado de Eagle  
DNA – cido desoxirribonucleico  
DSC – calorimetria de varredura diferencial  
ECMVs – vesículas extracelulares ligadas à membrana  
EDS – espectroscopia de energia dispersiva de raio-X  
EDTA – etileno diamino tetra ácido acético  
EGF – fator de crescimento epidermal  
FCS – soro fetal bovino  
FGF – fator de crescimento fibroblástico  
FITC – fluoresceína  
GAGs – glicosaminoglicanos  
Gly – glicina  
HA – CC – complexo esponjoso de hidroxiapatita e colágeno  
Há – hidroxiapatita  
hFOB – osteoblastos fetais humanos

Ile – isoleucina

IR – espectroscopia de infravermelho

MEC ou ECM – Matriz extracelular

MECa – matrix extracelular artificial

Mg - magnésio

MMA – metil-metacrilato

MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil-2H- brometo de tetrazólio

MUSC – Medical University of South Carolina

NC1 – domínio não-colagênico tipo 1

NGF – fator de crescimento nervoso

OC – osteocalcina

P – fósforo

PBS – solução salina tamponada com fosfato

PDGF – Fator de crescimento derivado de plaqueta

PGA – ácido poli-glicólico

Pi – fosfato inorgânico

pI – ponto isoelétrico

PLGA – copolímero de poli ácido lático-co-ácido glicólico

PLLA – poli L-ácido lático

PMMA – poli metil-metacrilato

RGD – sequência específica de aminoácidos Arg-Gly-Asp

rhBMP-2 – forma recombinante da proteína morfogenética do osso humana 2

RNA – ácido ribonucleico

SEM – microscopia eletrônica de varredura

Ser – serina

TB – azul de toluidina

Tyr – tirosina

UV – ultravioleta

YIGSR – sequência específica de aminoácidos Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg

## RESUMO

Colágeno tem sido extensivamente descrito como um material importante na engenharia de tecido ósseo devido a sua biocompatibilidade, baixa antigenicidade e alta força de tensão. No entanto, suportes de colágeno na sua forma pura apresentam algumas desvantagens e, melhorias em suas propriedades físicas, químicas e biológicas são necessárias para suprir essas inadequações. Recentemente, a hidrólise seletiva de carboxiamidas de resíduos de asparagina e glutamina tem sido empregada, por um lado, na obtenção de um aumento no número de sítios negativos e por outro lado, na melhora nas propriedades piezoelétricas do colágeno. Suportes de colágeno aniônico foram obtidos a partir da hidrólise alcalina do pericárdio bovino por 24 (BP24) e 48 (BP48) horas. Osteoblastos bovinos foram cultivados sobre substratos e matrizes de colágeno nativas para o melhor entendimento das interações celulares responsáveis pela boa osteocondutividade e biocompatibilidade descritas em testes *in vivo*. Os parâmetros analisados foram a adesão e morfologia celular, o processo de mineralização, produção de condroitin sulfato, fosfatase alcalina, e osteocalcina pelas células. A adesão celular verificada para as matrizes BP24 e BP48 foi considerada tão boa quanto àquela descrita para substratos controles, enquanto a proliferação celular (por análise histológica) nas matrizes BP48 mantidas em meio comum demonstrou-se superior àquela encontrada para as matrizes de colágeno nativas e BP24 mantidas nas mesmas condições de cultura. As matrizes BP48 quando estimuladas a mineralizar, demonstraram um decréscimo na proliferação celular, que deve estar relacionado ao início do processo de diferenciação. Todas as membranas permitiram uma proliferação celular em múltiplas camadas, apresentando semelhanças morfológicas, mas quando estimuladas a mineralizar apresentaram osteoblastos com maior número de vesículas em sua superfície. O processo de mineralização foi verificado em todas as matrizes mantidas em meio de mineralização e, principalmente na superfície das mesmas. A análise por EDS comprovou que esses depósitos são compostos por fosfatos de cálcio. A produção de fosfatase alcalina (ALP) pelos osteoblastos foi verificada em todas as matrizes,

no entanto, matrizes mantidas em meio de mineralização apresentaram maior produção de ALP, devido à falta do suplemento nutricional para deposição mineral. Novamente, a matriz BP48 favoreceu a produção de ALP, o que deve também estar relacionado ao maior grau de mineralização da mesma. A detecção de osteocalcina em todas as matrizes mantidas em meio de mineralização, deve-se ao fato de uma maior diferenciação dos osteoblastos. Baseado nos resultados obtidos, a matriz de colágeno aniônico BP48 demonstrou ser mais adequada para o processo de regeneração óssea por apresentar influência na diferenciação osteoblástica e na produção de matriz óssea comparada àquela obtida para a matriz de colágeno nativo, que apresenta propriedades piezoelétricas reduzidas.

## ABSTRACT

Collagen has been extensively described as an important material in bone tissue engineering due to its biocompatibility, biodegradability, low antigenicity, and high tensile strength. However, collagen scaffolds in their pure form have some drawbacks and improvements in its physical, chemical and biological properties are necessary to overcome those inadequacies. Recently, the selective hydrolysis of carboxyamides groups of asparagine and glutamine residues of collagen has been employed to increase the number of negative sites and enhance the piezoelectric properties. Anionic collagen scaffolds were prepared by hydrolysis of bovine pericardium for both 24 h (BP24), and 48 h (BP48). Bovine osteoblasts were cultured on them and on native matrices to understand the cellular interactions responsible for the good osteoconductivity and biocompatibility reported with *in vivo* tests. Cellular adhesion and morphology, mineralization process, chondroitin sulfate, alkaline phosphatase (ALP) and osteocalcin were the parameters evaluated. Cellular adhesion was considered satisfactory in all matrices, while cellular proliferation (through histological analysis) in BP48 matrices kept in common medium has shown to be higher than the one found for BP24 and native collagen matrices. When BP48 was stimulated to mineralize, they showed a decrease at the proliferation, which may be related to the beginning of the differentiation process of these cells. All matrices allowed multilayered cellular proliferation, presenting several similar characteristics, but when they were stimulated to mineralize, they presented a higher amount of surface's vesicles. Mineralization process was observed at all matrices kept in mineralization medium and, mainly at their surfaces. EDS analysis showed that these deposits were composed of calcium phosphates. ALP production was observed in all matrices, despite the fact that matrices kept in common medium showed a higher production of ALP, due to the lack of nutritional supplement for mineral deposition. BP48 matrix favored ALP production, which may be related to its degree of mineralization. Osteocalcin detection in all matrices kept in the mineralization

medium should be due to the fact of a higher differentiation of those osteoblasts. Based on these results, BP48 matrix has shown to be more adequate to the bone regeneration process because of its good influence on osteoblastic differentiation and bone matrix production compared to the results obtained for native matrices, which present reduced piezoelectric properties.

## ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

A presente tese de doutorado está estruturada em 6 capítulos.

O Capítulo 1 aborda o tema expresso com uma introdução na qual são tratados os aspectos celulares e bioquímicos envolvidos nos processos de regeneração óssea e mineralização, assim como uma revisão ampla dos tópicos “Engenharia de Tecidos”, “Biomateriais”, “Engenharia Óssea” e “Colágeno como Biomaterial”. Além disso, este capítulo descreve os objetivos da presente tese.

O Capítulo 2 refere-se a uma mini-revisão enquanto os Capítulos 3 e 4 apresentam os resultados de nossos estudos sob a forma de artigos. O Capítulo 2 apresenta uma mini-revisão intitulada “Collagen-Based Scaffolds for Bone and Cartilage Repair” a qual foi publicada no MUSC Orthopaedic Journal: 5: 53-57, 2002, enquanto no doutorado “sanduíche” nos EUA. O Capítulo 3 refere-se ao artigo intitulado “*In Vitro* Analysis of Anionic Collagen Scaffolds for Bone Repair”, o qual já se encontra publicado no periódico internacional Journal Of Biomedical Material Research (Applied Biomaterials): 71(2): 229-237, 2004. Este artigo apresenta os dados sobre adesão e proliferação dos osteoblastos sobre as matrizes de colágeno nativas, BP24 e BP48 e inicia a discussão dos processos de mineralização e diferenciação celular sobre as membranas em questão. O Capítulo 4 refere-se ao artigo intitulado “Characterization of Cellular Differentiation and Mineralization on Anionic Collagen Scaffolds for Bone Repair”, o qual será submetido ao periódico Internacional Tissue Engineering e descreve o processo de mineralização e diferenciação celular dos osteoblastos cultivados sobre as matrizes avaliadas. O Capítulo 5 apresenta as conclusões gerais do trabalho enquanto o Capítulo 6 as referências bibliográficas referentes ao Capítulo 1 – Introdução.

O Apêndice contido no final dessa tese contém os meios de cultura utilizados e o protocolo de determinação da fosfatase alcalina no meio de cultura, que necessitou de adequação trabalhosa para obtenção dos resultados.



## **1. Introdução**

A restauração funcional e anatômica do osso é a meta principal da regeneração de fraturas sejam elas provenientes de acidente, enfermidades degenerativas, ou mesmo de uma osteotomia. A fratura óssea resulta na perda da estabilidade mecânica, descontinuidade do tecido ósseo e destruição parcial de seu suprimento sanguíneo. Seu reparo é um processo complexo de regeneração tecidual, resultando em estabilização dos fragmentos, consolidação por união óssea, reconstrução das pontas dos fragmentos avasculares e parcialmente necrosados e, finalmente, remodelagem interna e externa do tecido neoformado (Heppenstall, 1980).

Na regeneração de fraturas sem a perda de massa óssea, o processo de reparo ocorre em uma ordem biologicamente determinada. O primeiro evento é a estabilização e consolidação pela formação do calo na periferia e entre os fragmentos, seguida da remodelação do mesmo, além da revascularização e substituição das áreas necróticas. Fatores ambientais, extrínsecos e intrínsecos podem afetar profundamente o processo da regeneração, mas os tecidos agem de acordo com regras biológicas que controlam a proliferação e a diferenciação celular assim como a produção de matriz, que poderão ocorrer independentemente de interferências externas, embora influenciadas por elas. Essa regeneração será descrita na seção 2 da Introdução.

No entanto, fraturas com perdas de massa óssea necessitam da utilização de enxertos autólogos (tecido sadio isolado do próprio paciente) ou implantes de materiais osteoindutores e/ou osteocondutores. Estes últimos servem como suportes da regeneração óssea, interagindo com a interface dos fragmentos “receptores” e estimulando o processo de restauração tecidual. Esses biomateriais desenvolvidos para serem implantados (Hench, 1998) serão descritos posteriormente na seção 3 da Introdução, sendo nosso principal foco de estudo.

## **2. Biologia da Regeneração sem perda de Massa Óssea**

O processo de reparo ósseo pode ser caracterizado por 6 estágios fisiológicos: **impacto, indução e inflamação, formação do calo cartilaginoso, formação do calo ósseo e remodelação** (Heppenstall, 1980).

O **impacto** consiste no período de absorção de energia até a fratura. A quantidade de energia absorvida depende do volume do osso e está relacionada com a taxa de carga. O estágio de impacto da fratura ocorre até a dissipação de energia.

O estágio de **indução** envolve modulação e diferenciação de elementos celulares requeridos durante o processo de regeneração. Na fratura sempre ocorre hemorragia local pela lesão dos vasos sanguíneos do osso e do periósteo, além da destruição da matriz e morte das células ósseas junto ao local fraturado (Fawcett, 1986). Esse processo desencadeado pelo estágio **inflamatório**, que persiste até o estágio de remodelação, apresentará atividade fagocitária de macrófagos que irá remover restos de tecidos e coágulos. Células do periósteo e do endósteo, próximos à área fraturada são ativadas (estágio de indução) e respondem com intensa proliferação de seus fibroblastos. Tecidos mesenquimais, células osteogênicas e condrogênicas indiferenciadas se diferenciam em osteoblastos e condrócitos funcionais, respectivamente. Os estímulos para essa indução podem ser: elétrico, baixa tensão de oxigênio, baixo pH, liberação de enzimas lisossomais, liberação de citocina e a presença de uma série de proteínas indutoras, incluindo as proteínas morfogenéticas do osso (BMP) e fatores de crescimento (Reddi, 1981; Canalis, 1983; Zellin *et al.*, 1996; Lieberman *et al.*, 2002; Oringer, 2002). A indução, na verdade, ocorre através de uma série de sub-estágios nos quais os agentes indutores para cada fase de reparo subsequente podem ser bem distintos, com características únicas direcionadas para células alvo específicas (por exemplo: condrócitos no calo cartilaginoso e osteoblastos no calo ósseo).

Durante o estágio de **formação do calo cartilaginoso**, ocorrem grandes aumentos da vascularização, celularidade e na produção de colágeno, proteoglicanos e lipídeos. O calo apresenta potencial elétrico negativo, devido a secreção de hidrolases ácidas pelos osteoclastos, o que colabora com o processo de remoção do osso necrosado pelos mesmos, por permitir maior solubilização dos cristais de fosfato de cálcio e, provavelmente atrair mais células do tipo osteoclasto para essa região (Fawcett, 1986). A cartilagem formada através do calo sofre modificações, havendo hipertrofia dos condrócitos que geram uma compressão sobre a matriz cartilaginosa pré-existente, e o conseqüente alargamento de suas lacunas, sendo gradualmente reduzida à septos finos fenestrados e espículas com formas irregulares (Probst & Spiegel, 1997). A matriz hialina dessa região hipertrófica se torna calcificada, onde pequenas agregações granulares e cristais de fosfato de cálcio são depositados. O mecanismo pelo qual os minerais são depositados na matriz orgânica, tanto da cartilagem quanto no osso, tem sido o alvo de muitos debates e algumas hipóteses que serão discutidas na seção 2.1 da Introdução.

O estágio de formação do **calo ósseo** é marcado pela substituição da cartilagem calcificada por tecido ósseo primário (Heppenstall, 1980; Probst & Spiegel, 1997; Mandracchia *et al.*, 2001). Células com potencial osteogênico, provenientes do endóstio e principalmente do perióstio, são ativadas e, uma fina camada de osso (anel ou colar periosteal) é depositada ao redor da porção central da cartilagem calcificada. Ao mesmo tempo, vasos sanguíneos do perióstio crescem, invadindo as cavidades irregulares da matriz cartilaginosa criadas pela morte dos condrócitos e pela confluência de suas lacunas. Vasos com paredes finas e fundos cegos ramificam-se e crescem para dentro das cavidades da matriz cartilaginosa. Células pluripotentes são levadas para o tecido perivascular desses vasos sanguíneos e, algumas se diferenciam em elementos hematopoiéticos da medula óssea. Outras células se diferenciam em osteoblastos, as quais se depositam formando uma camada alinhada semelhante a um epitélio nas paredes

irregulares das espículas da matriz cartilaginosa calcificada e, iniciam a produção de matriz óssea. Os osteoblastos envolvidos por matriz se diferenciam em osteócitos e começam a manter contato uns com os outros através de processos citoplasmáticos em um sistema de canaliculos. O calo continua com potencial elétrico negativo, enquanto os osteoclastos terminam a remoção do osso necrosado, secretando enzimas hidrolíticas, incluindo collagenase (Fawcett, 1986). A matriz cartilaginosa é gradualmente substituída por tecido ósseo primário.

Durante a **remodelação**, a conversão do tecido ósseo primário em tecido ósseo secundário ou lamelar é completada. As fibras de colágeno são mais grossas e apresentam uma orientação preferencial alternando entre camadas ou lamelas. Essas lamelas podem ser compactadas se depositadas em uma superfície achatada ou concêntrica envolvendo um vaso sanguíneo. As fibras de colágeno se estendem entre as lamelas, aumentando, desta forma, a força do osso. Os vasos sanguíneos são contidos em canais centrais (Canais Haversianos) e, estes se intercomunicam por Canais de Volkmann. Além disso, há vários canaliculos que se estendem para nutrir os osteócitos. Esse conjunto é conhecido como *osteon* ou classicamente como *Sistema de Havers*. Osteons secundários são formados quando uma parte do osso lamelar concêntrico é convertido em Sistemas Haversianos (Fawcett, 1986). O canal medular é re-estabelecido. O diâmetro e o potencial elétrico negativo do calo diminuem e este último desaparece após equilíbrio de cargas.

### **2.1 Mineralização Óssea**

Há dois passos na mineralização da matriz: a nucleação dos cristais de fosfato de cálcio, seguido do crescimento do cristal (Robey, 1989). A nucleação pode ocorrer tanto heterogeneamente quanto homogeneamente. **Nucleação homogênea** é a formação de cristais devido à supersaturação do meio local com os íons apropriados. Acredita-se que ela pode ocorrer no lúmen de vesículas da matriz (Robey, 1989). Em uma das teorias mais aceitas, acredita-se que a calcificação da

cartilagem, na formação do calo cartilaginoso ou na ossificação endocondral, começa dentro de corpos extracelulares ligados à membrana (*extracellular membrane-bound bodies* – ECMVs), conhecidos como vesículas da matriz (Wuthier, 1993). Essas vesículas são provavelmente produzidas durante a apoptose dos condrócitos e são vistas nas regiões onde depósitos minerais aparecem pela primeira vez na matriz extraterritorial adjacente às células hipertróficas da cartilagem calcificada. ECMVs propiciam áreas protegidas para o acúmulo de íons minerais, longe dos agregados proteoglicanos que mantêm a matriz hidratada e, devido a sua carga negativa, inibem efetivamente a nucleação e o crescimento mineral (Eanes *et al.*, 1992; Cornelissen & de Ridder, 1993;). ECMVs contêm ainda um centro de nucleação (Wu *et al.*, 1997), consistindo de fosfolipídios ácidos, cálcio e fosfato inorgânicos, além da proteína transportadora de cálcio, a anexina. Esse centro deve ser o responsável pela formação mineral dentro das vesículas (Boskey *et al.*, 1997a).

As ECMVs encontram-se sempre adjacentes ao colágeno e a controvérsia reside em saber como o mineral concentrado dentro das vesículas chega até a matriz de colágeno, na qual a matriz óssea é depositada. Alguns estudos têm demonstrado a formação de cristais minerais concomitantemente nas vesículas e nas fibras de colágeno (Landis *et al.*, 1992). Acredita-se que as fibras cristalinas de colágeno altamente organizadas da matriz possam agir como catalisadoras da nucleação na transformação de soluções de cálcio e fosfato em depósitos minerais sólidos (Katz, 1969; Glimcher, 1989).

Já foi demonstrado que fibras de colágeno puras são capazes de induzir a formação de cristais de apatita quando introduzidas em soluções metaestáveis de cálcio e fosfato inorgânicos (Katz, 1969). Essa observação leva à especulação de que a nucleação mineral no osso seja dependente, ou ao menos facilitada pelo arranjo particular das moléculas nas fibras de colágeno. No entanto, a ausência de calcificação em muitos tecidos ricos em colágeno parece trazer a evidência de que o colágeno não pode ser o único iniciador da calcificação (Landis *et al.*, 1992).

A calcificação mediada por colágeno é o principal exemplo de nucleação heterogênea. **Nucleação heterogênea** ocorre apenas em superfícies onde a interação entre a superfície e os íons diminui o requerimento de energia interfacial, de forma que a nucleação possa continuar em concentrações menores daquelas da supersaturação. Nucleadores heterogêneos devem ter alta afinidade com os íons do cristal e uma topografia ideal para que um aglomerado (*'cluster'*) nuclear seja facilmente formado. Alguns autores acreditam que o colágeno sozinho não apresenta esses requerimentos, mas algumas proteínas não colagênicas apresentam alta afinidade por cálcio e, quando ligadas ao colágeno, tornam-se nucleadores *in vivo* (Boskey, 1996).

Apenas algumas proteínas da matriz óssea têm sido identificadas como nucleadores, sendo a sialoproteína óssea (BSP) a mais conhecida (Hunter & Goldberg, 1993). Essa proteína, produzida especificamente pelos osteoblastos, causa a formação de apatita, onde as unidades repetitivas de poliglutamato de sua estrutura devem ser responsáveis pela estabilização do núcleo da apatita (Fujiasawa *et al.*, 1996; Robey & Boskey, 1996). Uma variedade de outros constituintes da matriz óssea parece ter habilidade bifuncional, servindo de nucleadores em baixas concentrações, e regulando a extensão da proliferação dos cristais minerais em concentrações altas. Entre estes constituintes encontram-se os lipídeos do centro de nucleação das ECMVs (Boskey *et al.*, 1996), os biglicanos (Boskey *et al.*, 1997b) e outras fosfoproteínas do osso (Boskey, 1996; Robey & Boskey, 1996). Apesar do mecanismo de ação dessas proteínas diferirem, é possível que elas possam interagir com faces específicas do cristal de apatita, estabilizando o “núcleo crítico” (início da nucleação mineral, onde ela não é grande o suficiente para persistir em solução sem um alto gasto de energia) e bloqueando o crescimento em certas direções (Moradian-Oldak *et al.*, 1992).

Em experimentações *in vitro* (Bellows *et al.*, 1991), assim como em mutações na fosfatase alcalina, que levam à hipofosfatase nos homens (Whyte, 1996), existem boas evidências que a fosfatase alcalina esteja envolvida na mineralização. No

entanto, algumas características se contrapõem a essa idéia, tal qual a sua alta expressão em pré-osteoblastos, muito antes da necessidade do processo de mineralização e antes mesmo da expressão de moléculas como a osteocalcina e a sialoproteína óssea envolvidas diretamente no processo (Liu *et al.*, 1994; Malaval *et al.*, 1994). Por pertencer a uma classe de proteínas de superfície celular que se apresentam ligadas covalentemente à complexos fosfolipídicos de fosfatidilinositol na membrana plasmática (Turksen & Aubin, 1991), acredita-se que a fosfatase alcalina esteja envolvida na sinalização transmembrana, promovendo a formação de cristais nas vesículas da matriz removendo inibidores de nucleação. Além disso, acredita-se que ela participe na adesão, migração e diferenciação dos osteoblastos (Hui *et al.*, 1993).

Após a nucleação, o fosfato de cálcio deve ser o primeiro a ser depositado, sendo, então, convertido a fosfato de octa-cálcio e finalmente em hidroxapatita. Os cristais nas vesículas da matriz rompem a membrana e se fundem. A partir desse ponto, a precipitação mediada por colágeno predomina (Boskey, 1996). Após as nucleações, os pequenos cristais rapidamente crescem e se propagam nas regiões de sobreposição do colágeno, onde estarão alinhadas em todo o eixo da fibra. O tamanho dos cristais é determinado pelo espaço compreendido entre as fibras de colágeno, tanto quanto pelos inibidores químicos de crescimento. Outras proteínas de matriz, tais como a osteonectina, osteocalcina e osteopontina, as quais se ligam à apatita com alta afinidade, não demonstraram agir como nucleadoras, mas são inibidoras efetivas da proliferação de cristais de apatita (Boskey, 1996). Muitos detalhes do processo de mineralização/calcificação e sua regulação ainda precisam ser desvendados.

### **3. *Biologia da Regeneração com perda de Massa Óssea***

O fenômeno natural de regeneração óssea é insuficiente, por si só, para restabelecer a integridade de fraturas com grande perda de massa óssea.

Conseqüentemente, a necessidade da utilização de materiais que serviriam como um suporte para que o processo de regeneração atualmente se apresenta como uma alternativa para a utilização de enxertos, onde haja dificuldade para obtenção de tecido ósseo e moldagem para a fratura em questão. Esses materiais produzidos para servirem como implantes são conhecidos como biomateriais (Hench, 1998) e devem apresentar características que estimulem (osteoidução) e/ou guiem (osteocondução) o processo de regeneração óssea.

A **osteoidução** consiste em um conjunto de sinais químicos, humorais ou físicos que iniciam e sustentam os vários estágios do processo de regeneração óssea (Heppenstall, 1980; Nakagawa & Tagawa, 2000) e diversos fatores podem estar envolvidos. A proteína morfogenética do osso (BMP), uma glicoproteína de 17.500 Daltons, é um dos fatores identificados atualmente (Andriano *et al.*, 2000; Murata *et al.*, 2000; Nakagawa & Tagawa, 2000; Reddi, 2000). Campos eletromagnéticos e correntes diretas são fatores biofísicos que também manifestaram propriedades indutivas (Smiske *et al.*, 1997). O resultado comum da osteoidução é a modulação e diferenciação de células para a produção de osso.

Já a **osteocondução** está relacionada com o estabelecimento de um modelo de ambiente apropriado, sobre o qual células osteoprogenitoras, quando estimuladas apropriadamente, podem produzir osso (Heppenstall, 1980). A osteocondução também facilita a produção e o depósito ósseo no arranjo tridimensional apropriado e aumenta a habilidade do processo de regeneração em defeitos segmentais grandes. O colágeno, componente orgânico natural do osso e de superfícies ósseas, é o protótipo de uma substância osteocondutora, permitindo até angiogênese (Kimura *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2001). Um grande número de substâncias naturais e fabricadas também podem estimular um ambiente favorável para a formação óssea (Mandracchia *et al.*, 2001; Pineda *et al.*, 1996), como discutido à seguir.

### **3.1 Engenharia de Tecidos e Biomateriais**

Quatro estratégias gerais têm sido adotadas para a obtenção de novos tecidos (Langer & Vacanti, 1993):

- ✓ Utilização de células autógenas (ou autólogas, isso é, isoladas do próprio paciente através de biópsias) ou de células alogênicas (de indivíduos de mesma espécie) ou xenogênicas (substitutas, de indivíduos de espécies diferentes) (Lanza *et al.*, 1997). Essas células são expandidas em cultura e implantadas ao corpo por métodos de infusão. Um exemplo seria a utilização de condrócitos cultivados para tratamento de defeitos na articulação em humanos (Brittberg, 1999; Brittberg *et al.*, 2001). No entanto, suas limitações incluem a capacidade das células em manterem suas características diferenciadas *in vitro*; a dificuldade de expandir suficientemente algumas células em cultura, uma vez que alguns tipos celulares como células hepáticas e neurais não apresentam possibilidade de expansão em número adequado para uso clínico; além da rejeição imunológica, quando células alogênicas e xenogênicas são utilizadas.
- ✓ Cultura de tecidos para posterior implantação e substituição de tecidos doentes ou danificados. O exemplo mais comum é o enxerto de pele (Auger *et al.*, 1998; Koide *et al.*, 1993; Suzuki *et al.*, 2000) para uso clínico. Esta estratégia tem como principal vantagem a alta biocompatibilidade e biofuncionalidade. No entanto, apresenta as mesmas desvantagens citadas acima.
- ✓ Utilização de substâncias que induzem a regeneração do tecido danificado. O sucesso dessa estratégia depende da purificação e produção em larga escala de moléculas sinais apropriadas, como os fatores de crescimento e os fatores de adesão. Para a proliferação de muitos tipos celulares (o que pode induzir a formação de um novo tecido), existe a dependência de uma combinação de vários fatores de crescimento que são proteínas altamente específicas. Exemplos de alguns dos vários fatores de crescimento encontram-se na

Tabela 1. Alguns fatores de crescimento podem ser liberados lentamente através de cápsulas poliméricas e podem estimular o crescimento do tecido danificado (Kuzuya & Kinsella, 1994; Royce *et al.*, 1995; Isobe *et al.*, 1996; Martin *et al.*, 2000; Lieberman *et al.*, 2002). Já os fatores de adesão são multicomponentes protéicos dos fluidos biológicos e/ou da matriz extracelular adsorvidos na superfície do material, como a fibronectina, a vitronectina e a laminina as quais são reconhecidas por integrinas (receptores na membrana celular associados ao citoesqueleto) (Buck & Horwitz, 1993; Alberts *et al.*, 2002). As integrinas ligam-se à pequenos domínios nos fatores de adesão (Yamada, 1991), como por exemplo a seqüência de aminoácidos Arg-Gly-Asp (RGD) encontrada na estrutura da fibronectina e vitronectina ou a seqüência Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg (YIGSR) da estrutura da laminina. O RGD e muitos outros oligopeptídeos têm sido incorporados em alguns biomateriais para estimularem adesão e conseqüente proliferação celular.

**Tabela 1 – Principais fatores de crescimento e suas ações**

<b>FATOR</b>	<b>AÇÃO REPRESENTATIVA</b>
Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF)	Estimula proliferação de células do tecido conjuntivo e algumas células neurogliais
Fator de Crescimento Epidermal (EGF)	Estimula proliferação de muitos tipos celulares
Fator de Crescimento Nervoso (NGF)	Promove sobrevivência e o crescimento de classes específicas de neurônios
Proteína Morfogenética Óssea (BMP)	Promove proliferação de células precursoras do tecido ósseo e indução da formação óssea
Fator de Crescimento Fibroblástico (FGF)	Estimula proliferação de diversos tipos celulares, inibe diferenciação de vários tipos de células precursoras.

- ✓ Utilização de matrizes poliméricas contendo células. Em sistemas fechados, as células são isoladas do corpo por uma membrana que permite permeabilidade de nutrientes e catabólitos, mas evita grandes quantidades de anticorpos ou células do sistema imune de destruir o transplante. Em sistemas abertos, células aderidas às matrizes são implantadas e tornam-se incorporadas ao tecido (Valente *et al.*, 1998, Roche *et al.*, 2001).

Embora essas estratégias sejam descritas separadamente, elas podem ser combinadas para obtenção de materiais com respostas mais rápidas e específicas como, por exemplo, a utilização de matrizes poliméricas contendo células e fatores de crescimento.

Em função disso, as estratégias citadas anteriormente utilizam como suporte físico uma Matriz Extracelular artificial (MECa) (Steven *et al.*, 1996; Ma & Zhang, 1999), que deve simular o ambiente intersticial dos tecidos vivos, permitindo a adesão de células e servindo como suporte tridimensional para o crescimento dos mesmos. De fato, as MECa facilitam a localização e a liberação de células e fatores de crescimento para sítios específicos do corpo, definem e mantêm um espaço tridimensional para a formação de novos tecidos com manutenção da estrutura apropriada e são capazes de guiar o desenvolvimento e diferenciação de novos tipos celulares (Kim & Mooney, 1998).

Como tecidos não são constituídos somente de células, uma parte substancial do seu volume é o espaço intersticial, o qual é preenchido por uma rede intrincada de macromoléculas constituindo a **Matriz Extracelular** (MEC). Essa matriz é composta por uma variedade de proteínas e glicosaminoglicanos (GAG) que são secretados localmente e se arranjam em uma malha organizada em associação com a superfície das células que a produzem (Alberts *et al.*, 2002). As macromoléculas da matriz se agrupam em duas classes principais: uma de elementos fibrilares, composta predominantemente por **colágeno** e/ou fibras do **sistema elástico**, e uma de elementos não fibrilares onde se observa os

**glicosaminoglicanos (GAGs)** (geralmente encontrados covalentemente ligados a uma proteína central formando os proteoglicanos), além de **glicoproteínas** que promovem a interação dos diferentes componentes da MEC com as células dos diferentes tecidos. Esses componentes são responsáveis pelas propriedades mecânicas e fisiológicas da MEC que variam de acordo com a presença e concentração de cada componente (Alberts *et al.*, 2002). Durante décadas, a MEC foi vista apenas como uma estrutura inerte e de suporte, mas hoje está claro que ela desempenha um papel bastante ativo e complexo na regulação do comportamento das células em contato com a mesma (Alberts *et al.*, 2002).

O desenvolvimento de novos biomateriais tem sido um processo constante. Muitos dos compostos em uso clínico não foram produzidos para tal finalidade, mas sim adaptados para determinadas abordagens terapêuticas (Peppas & Langer, 1994), como é o caso dos materiais utilizados em corações artificiais que foram originalmente baseados em uma classe comercial de poliuretanos. Esses materiais causaram sérios problemas médicos, pois induziam reações biológicas na interface material-sangue que levaram a formação de trombos no coração artificial, com a conseqüente possibilidade de ataque cardíaco, além de outras complicações (baixa biocompatibilidade para a função a ser desempenhada).

O desenvolvimento dos primeiros biomateriais não levava em conta sua interação com o tecido ao qual era implantado. Na conceituação moderna, biomateriais não devem ter como função apenas o preenchimento de espaço (Ratner, 1993), eles devem ser programados para estimular uma resposta biológica específica, a qual depende de algumas propriedades particulares intrínsecas ao polímero, como a distribuição eletrônica, a conformação molecular, o estado de agregação ou as propriedades físico-químicas específicas (Alper *et al.*, 1991). O desenvolvimento desses biomateriais é baseado nos mecanismos que controlam a função que se deseja substituir e na relação estrutural do material com a propriedade que se pretende obter. Como exemplo, podemos citar os suportes para a regeneração de tecido nervoso periférico, que são caracterizados pelas propriedades elétricas

superficiais, para a orientação do crescimento da fibra nervosa e portanto, sua regeneração (Chen *et al.*, 2000). A grande vantagem da utilização de biomateriais está relacionada com seu fornecimento ilimitado, facilidade de manipulação e inovação tecnológica; porém eles não substituem por completo a função de um órgão ou tecido perdido.

Quanto aos tipos de MECa, estas podem ser de natureza sintética ou derivadas de materiais naturais e, independentemente da sua origem, devem apresentar as seguintes características gerais (Langer & Vacanti, 1993; Kim & Mooney, 1998; Ma & Zhang, 1999; Hutmacher, 2000):

a - biocompatibilidade e capacidade de sustentar ou não a adesão e o crescimento celular, dependendo da função que deve desempenhar;

b - propriedades mecânicas condizentes com o tecido a ser reconstruído;

c - velocidade de degradação compatível com o crescimento do tecido para o qual serve como suporte ou a não degradação;

d - permitir a associação com fatores de crescimento específicos para indução de respostas celulares mais rápidas e mais específicas.

A interação das MECa com os diversos tipos celulares está diretamente relacionada com propriedades específicas da superfície das matrizes que são: topografia, estrutura molecular, propriedades dielétricas, densidade de carga, tensão superficial, entre outras (Hubbell, 1990; Dewez *et al.*, 1999; Anselme, 2000).

A tensão superficial está relacionada com a adsorção de proteínas à superfície dos materiais. Imediatamente após colocar um polímero em contato com fluídos corpóreos ricos em proteínas, elas são adsorvidas e formam camadas, diminuindo a tensão interfacial estabelecida entre o fluído e a superfície, até sua completa anulação (Vogler *et al.*, 1995; Dewez *et al.*, 1999). Muitas dessas proteínas

adsorvidas à superfície do material são fatores de adesão, reconhecidos por receptores na membrana celular. Esta influência pode ser observada em culturas de células mamárias sobre substratos com alta e baixa tensão superficial. Estes ensaios mostram que superfícies com alta tensão superficial promovem a adesão de células mamárias, enquanto o oposto é verificado àquelas com baixa tensão superficial (Vogler *et al.*, 1995; Dewez *et al.*, 1999).

Já com relação à densidade de cargas da superfície, Krukowski (1991) mostrou que superfícies carregadas positivamente induziam a formação de tecido conjuntivo, enquanto superfícies carregadas negativamente estimulavam a formação de tecido ósseo intramedular.

Propriedades elétricas, piro ou piezoelétricas vêm sendo utilizadas no reparo de tecido nervoso e ósseo (Fukada, 1988). Materiais com essas propriedades vêm sendo também estudados para utilização na área cardiovascular, onde compostos dielétricos estão sendo indicados como promotores do aumento na liberação de prostaciclina (licosanóide que atua na prevenção da coagulação) e uma diminuição na liberação de tromboxano A<sub>2</sub> (licosanóide que atua na formação de trombos), colaborando na redução da trombogenicidade (Adam *et al.*, 1997).

Propriedades estruturais, como arranjo tridimensional e estrutura molecular, podem influenciar a adesão celular na superfície dos materiais. Quando Schor e colaboradores (Schor & Court, 1979) trabalharam com colágenos de diferentes estruturas, eles observaram que, enquanto a adesão celular ao colágeno desnaturado era dependente da presença de soro fetal, a adesão à superfície do colágeno nativo não era afetada pela presença do mesmo.

Nas MECa de origem sintética as propriedades citadas anteriormente nem sempre são conseguidas. Para seu aprimoramento o que tem sido feito é a associação de fatores de crescimento e de adesão a estas matrizes. Porém, estes fatores possuem um custo elevado o que encarece sua utilização. Uma alternativa é a utilização de MECa compostas por polímeros naturais presentes na matriz

extracelular. Entre eles podemos destacar o colágeno (Boyce, 1998; Chevallay & Herbage, 2000; Lee *et al.*, 2001; Nehrer *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1994), os compósitos de colágeno/ elastina (Hafemann *et al.*, 1999; Lefebvre *et al.*, 1992) e quitosana (Madhally & Matthew, 1999; Tan *et al.*, 2001), que além de serem biocompatíveis, possuem sítios de reconhecimento celular (Alberts *et al.*, 1994; Juliano & Haskill, 1993) que proporcionam interações com as células, motivando a utilização de MECa de colágeno como foco de estudo da presente tese.

Estas MECa podem ser obtidas de matrizes homólogas ou heterólogas, das quais células e outros componentes responsáveis por respostas biológicas não desejáveis tenham sido removidos (desvitalização) (Valente *et al.*, 1998).

Dentre os materiais citados acima, o colágeno tem merecido extrema atenção para fabricação de MECa na área de engenharia de tecidos. Isto porque, além de promover resistência mecânica, o colágeno influencia na diferenciação de um grande número de células, incluindo mioblastos (Yamamoto *et al.*, 1993), fibroblastos (McCarthy *et al.*, 1996; Park *et al.*, 2000), condrócitos (Nehrer *et al.*, 1997; Roche *et al.*, 2001; van Susante *et al.*, 2001), células epiteliais (McCarthy *et al.*, 1996; Auger *et al.*, 1998; Lam *et al.*, 1999), osteoblastos (Hollinger *et al.*, 1998; Du *et al.*, 1999; Gleiber *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2001) entre outras.

### **3.1.2. Engenharia Óssea, Implantes e Biomateriais**

A engenharia óssea se resume ao campo biomédico relacionado com o reparo e/ou a substituição de material ósseo. O reparo ósseo, historicamente, tem sido feito pela fixação mecânica do implante utilizando pregos, pinos, placas, parafusos e arames metálicos intramedulares. Cimentos e suportes ósseos, no entanto, são também utilizados no reparo ósseo, adicionando cerâmicas, polímeros, proteínas da matriz óssea (e proteínas morfogenéticas do osso) e minerais à lista de materiais. Esses últimos podem também ser utilizados como substitutos e apresentam um interesse predominante nesse trabalho.

A fixação mecânica do implante pode ser alcançada pelo uso de parafusos, compressão do implante ou pelo uso de poli metil-metacrilato (PMMA) como um cimento (Mandracchia *et al.*, 2001). Se o material utilizado é biocompatível e permite a deposição óssea, ele deve ser incorporado prontamente pelo osso circundante sem afrouxamento subsequente. Enquanto a necrose pode inicialmente ocorrer ao redor do implante, notou-se que superfícies rugosas em materiais como parafusos, pode promover maior osteointegração e prevenir reabsorção que poderia, ao contrário, afrouxar o implante (Simske *et al.*, 1997).

Em ossos com formação lenta, a fixação direta pode proporcionar uma integração do implante ao osso por períodos longos; por exemplo, a renovação anual do fêmur de um indivíduo adulto ocorre em aproximadamente 2% do osso cortical então, presumidamente, apenas 2% da interface osso/implante pode ser reabsorvida por ano (Simske *et al.*, 1997). Isso poderia levar ao afrouxamento do implante em pacientes jovens, provavelmente devido tanto ao período longo de implantação necessário quanto pelo processo de remodelação induzido por estresse, que se apresenta aumentado em pacientes jovens. A fixação direta, especialmente para próteses do quadril, é tipicamente alcançada através da utilização de cimentos ósseos, muitos dos quais contém metil-metacrilato (MMA). Devido ao afrouxamento de implantes “cimentados”, as pesquisas têm se concentrado no melhoramento dos cimentos, do processo de fixação utilizando os cimentos, ou mesmo utilizando um ‘*plug*’ intramedular de metacrilato, por exemplo.

Apesar das melhorias nesses processos (desenvolvimento e fixação) e assumindo que o cimento não irá falhar (uma suposição nem sempre válida), sua utilização é ainda limitada pela taxa de remodelagem do osso fixado ao implante. Fixação mecânica, por outro lado, é limitada pela deposição de osso no material por longos períodos. Essa deposição por períodos prolongados é aumentada por maior contato de superfície, levando naturalmente a superfícies rugosas ou implantes porosos (Lincks *et al.*, 1998).

Tradicionalmente, a geração de materiais porosos teve como base metais e cerâmicas. Isso provavelmente foi devido à utilização primária desses materiais como materiais não-porosos para o reparo ósseo, assim como sua disponibilidade e técnicas de fabricação bem desenvolvidas. Os metais primários utilizados para tais fins, são o aço inoxidável, ligas de cobalto e cromo e ligas de titânio. Recentemente, vários tipos de ligas de níquel, vanádio e outras ligas de metais têm ganhado atenção (Rogers *et al.*, 1997).

O aço inoxidável não é facilmente obtido como material poroso, além de também apresentar dificuldades em seu recobrimento com materiais porosos devido à sua alta propensão à corrosão. Tanto o titânio quanto as ligas de cobalto e cromo são muito mais resistentes à corrosão, devido à ampla formação de óxidos de metais em suas superfícies (Steinemann, 1996; Jacobs *et al.*, 1998). O titânio é altamente resistente à corrosão, além de ser biocompatível, substituindo em um grande número de aplicações as ligas de cobalto e cromo (Jacobs *et al.*, 1998; Schmidt *et al.*, 2001). Com uma dureza de aproximadamente metade do aço inoxidável, o titânio e suas ligas podem reduzir o estresse de contato na interface osso/implante devido a maior flexibilidade do aço, que desta forma, se adaptaria melhor ao estresse referido acima (Schmidt *et al.*, 2001).

Esses metais, apesar de não serem porosos em sua forma original, têm sido recobertos com materiais porosos, que podem incluir alguns metais, polímeros, vitro-cerâmicas e cerâmicas tradicionais (Jones, 1988; Mezger & Creugers, 1992; Schierholz *et al.*, 1998; Kaselmo & Gold, 1999; Lee *et al.*, 2000; Geibler *et al.*, 2000). No entanto, o uso de metais para substituição óssea permanente é limitada pela formação de cápsulas cartilaginosas ao redor do material implantado e, pela necessidade de superfícies lisas que limitam a corrosão metálica (Simske *et al.*, 1997).

Cerâmicas são materiais amplamente empregados como substitutos de enxertos ósseos e são facilmente obtidos na forma porosa, ocorrendo naturalmente nesse

estado (por exemplo: no ossos, corais, etc.). Materiais constituídos por fosfatos de cálcio apresentam diversas características desejáveis para sua utilização como implantes, tais como: a similaridade de composição com o mineral do osso; bioatividade (habilidade de formar apatita do osso ou hidroxiapatita em sua superfície), além da habilidade em promover função e expressão celular (osteoindução) e osteocondutividade (LeGeros, 2002). No entanto, esses materiais diferem do osso pela sua resistência mecânica e propriedades físico-químicas, além de sua alta solubilidade em pH fisiológico humano (LeGeros, 2002).

Nem todas as cerâmicas utilizadas na substituição óssea são formadas por fosfatos de cálcio. Algumas cerâmicas são inclusive bioinertes, não degradando após serem preenchidas por osso no corpo (Simske *et al.*, 1997). Alumina é um exemplo desse tipo de material, sendo excelente para substituição total do quadril ou outras articulações devido às suas características biocompatíveis e reduzido desgaste (Anneroth *et al.*, 1990). Zircônia também pode ser considerada uma biocerâmica bioinerte, apresentando excelentes características de biocompatibilidade e desgaste (Akagawa *et al.*, 1993; Scarano *et al.*, 2003). No entanto, é improvável que ganhe grande destaque, uma vez que apresenta metade da dureza da alumina e quase o dobro de sua densidade.

Vitro-cerâmicas, tais como a Bioglass e Ceravital, têm sido utilizadas também como implantes (Mayr-Wohlfart *et al.*, 2001; Livingston *et al.*, 2002; Norton & Wilson, 2002). Elas também podem se tornar porosas através da utilização de equipamentos que perfurem suas superfícies em blocos pré-formados, apesar da tendência de estilhaçamento durante sua produção (Constantino *et al.*, 2002).

Uma outra classe importante de biomateriais é a dos polímeros. Polímeros porosos, muitos dos quais constituídos de PMMA, foram introduzidos como meio de adesão de próteses (Simske *et al.*, 1997). Implantes de PMMA apresentam vantagens distintas, tais quais: disponibilidade, fácil preparo e biocompatibilidade.

Além disso, devido à sua dureza reduzida, implantes porosos de PMMA podem prevenir desgaste por estresse que podem ocorrer com os materiais implantados, prevenindo a perda do crescimento e deposição óssea devido à reabsorção óssea na interface implante/osso (Simske *et al.*, 1997).

Em adição ao PMMA, outros polímeros tais quais poli (L-ácido láctico) (PLLA) e ácido poli-glicólico (PGA) mostram-se promissores enquanto materiais implantáveis para o reparo ósseo. O transplante de células isoladas e cultivadas em polímeros biodegradáveis de PLLA e PGA vêm sendo investigado como uma forma de substituição de porções danificadas ou estimuladores da função tecidual (Langer & Vacanti, 1993; Agrawal *et al.*, 1995; Lanza *et al.*, 1997; Saldanha & Grande, 2000). Foi observado que copolímeros poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) quando implantados em ossos, concomitante à biodegradação do material, conduzem a neoformação de tecido ósseo no local do implante (Reed & Gilding, 1981). Além disso, as células sobre este polímero demonstraram um aumento na atividade da enzima fosfatase alcalina, um possível marcador de diferenciação e atividade óssea e na síntese de colágeno (Ishaug *et al.*, 1994). Resultados similares foram obtidos cultivando-se osteoblastos em dispositivos tridimensionais de PLGA. Neste caso, foi observado ainda a mineralização da matriz óssea produzida (Ishaug *et al.*, 1997; Ishaug-Riley *et al.*, 1998).

Outra abordagem bastante interessante é a adsorção pelos polímeros de fatores osteoindutores que estimulem as células a se diferenciarem. Há relatos da adição de uma forma recombinante da proteína morfogenética do osso humana-2 (rhBMP-2) à membranas bioabsorvíveis. Foi observado que nos osteoblastos cultivados nos materiais com rhBMP-2 houve uma maior produção de matriz óssea em relação aos controles (Lee *et al.*, 1994; Whang *et al.*, 1998). Experimento semelhante foi realizado por Hollinger e colaboradores (1998), onde a rhBMP-2 foi adsorvida a uma matriz de colágeno tipo I. Foi observado que quando esta matriz colagênica foi implantada em ossos fraturados, houve a neoformação de tecido ósseo bem como uma boa integração do implante com o

osso lesado. Embora os resultados obtidos sejam bastante promissores, esta abordagem terapêutica, parece ser limitada pelo tamanho da fratura produzida (Lee *et al.*, 1994).

Polímeros naturais, como por exemplo o colágeno (Reddi, 2000; Chevally & Herbage, 2000; Lee *et al.*, 2001) e a elastina (Hafemann *et al.*, 1999; Lefebvre *et al.*, 1992) já foram descritos diversas vezes na literatura com inúmeras vantagens na engenharia de materiais, apresentando por exemplo a seqüência de reconhecimento celular RGD (Alberts *et al.*, 2002). Porém esses materiais na forma simples ou de compósitos não conseguem restabelecer as características teciduais iniciais. O colágeno será discutido mais amplamente por ser a base do implante testado neste trabalho (Item 5).

#### **4. Interações celulares com biomateriais para reparo ósseo**

As interações celulares com os biomateriais, assim como a qualidades destas, influenciam a capacidade das células em proliferarem e se diferenciarem em contato com o implante. Como primeira fase dessa interação, podemos considerar a adesão celular à superfície dos materiais, a qual é influenciada pelas características superficiais dos materiais, tais como a topografia, energia superficial, rugosidade, entre outras.

O processo de adesão celular pode ser dividido basicamente em 2 etapas: a fase de fixação celular aos substratos, que envolve eventos de curta duração como ligações físico-químicas (forças iônicas, van der Waals, etc) e a fase de adesão propriamente dita, que ocorre após algum tempo e envolve várias moléculas biológicas, tais como as proteínas da matriz extracelular, proteínas da membrana celular e do citoesqueleto que, após interação conjunta, induzem sinais de transdução, promovendo a ação de fatores de transcrição e, conseqüentemente regulando a expressão gênica das células (Anselme, 2000).

No primeiro contato do implante com o corpo, sua superfície é quase imediatamente coberta de sangue e proteínas presentes no plasma (Puleo & Nanci, 1999). Diversas destas proteínas são encontradas na matriz extracelular, tais como a fibronectina e vitronectina, as quais são conhecidas por prover sítios de adesão para as células (Kornu *et al.*, 1996; Degasne *et al.*, 1999). Portanto, a adsorção de tais proteínas é uma característica desejável para um material implantável, pois materiais que adsorvem mais proteínas de adesão podem oferecer mais sítios de ligação mediados por integrina para osteoblastos, levando a um crescimento potencial mais rápido do osso e a estabilização do implante.

Um fator que afeta a adsorção de proteínas sobre a superfície de um substrato é o potencial elétrico da superfície do mesmo. Shelton e colaboradores (Shelton *et al.*, 1988) cultivaram osteoblastos de calvário de ratos neonatos que apresentaram uma melhor adesão em substratos carregados positivamente. No entanto, Davies e colaboradores (Davies *et al.*, 1986) observaram que osteoblastos cultivados sobre substratos que apresentavam tanto cargas negativas quanto positivas, demonstraram características compatíveis com um metabolismo ativo quando em contato com cargas negativas, enquanto apresentavam um aspecto inativo quando em contato com cargas positivas.

Pode existir também relação direta entre potencial elétrico da superfície e rugosidade. Em um estudo, avaliando a adesão celular em polimetilmetacrilato (PMMA) com diferentes níveis de rugosidade superficial, demonstrou-se que a adesão celular aumentou com a rugosidade, pois esta deve estimular células subconfluentes a secretarem proteínas extracelulares, as quais permitem uma melhor ancoragem das células ao substrato (Lampin *et al.*, 1997).

No entanto, vários estudos divergem quanto à reação das células frente à rugosidade de biomateriais. Alguns autores demonstraram que o espalhamento e proliferação de células ósseas sobre biomateriais de superfície lisa eram melhores do que a encontrada pra biomateriais com a superfície rugosa (Kieswetter *et al.*,

1996; Anselme *et al.*, 2000). Outros, no entanto, atestam exatamente o contrário (Blumenthal *et al.*, 1989; Rizzi *et al.*, 2001; Rea *et al.*, 2004). Portanto, a influência dessa característica física na interação celular com biomateriais precisa ainda ser mais amplamente investigada.

Outro parâmetro de grande importância para a adesão celular é a hidrofiliidade ou hidrofobicidade do material. Células geralmente aderem melhor em superfícies hidrofílicas (Altakov & Groth, 1994). No entanto, parece que materiais hidrofílicos promovem uma fraca adsorção reversível de proteínas, enquanto materiais hidrofóbicos induzem uma adsorção irreversível de proteínas com alto peso molecular. Fibrinogênio e fibronectina estão entre essas proteínas que tem alta afinidade por superfícies hidrofóbicas (Altakov & Groth, 1994).

## **5. Colágeno como biomaterial**

Dentre os polímeros naturais, o colágeno tem merecido atenção destacada. Sendo a proteína mais abundante no ser humano, o colágeno é um dos mais importantes componentes da MEC, a qual determina o tamanho, a firmeza (resistência a deformação) e o arranjo celular de todas as estruturas e todos os órgãos (Burgeson & Nimni, 1992; Haralson & Hassel, 1995; Alberts *et al.*, 2002). O colágeno interage com as células nos tecidos conjuntivos e traduz sinais essenciais para a regulação da adesão, migração, proliferação e diferenciação das células (Alberts *et al.*, 2002).

O colágeno apresenta muitas vantagens como biomaterial (Tabela 2). Ele pode ser preparado em diferentes formas como membranas, folhas, esponjas e esferas; é não-tóxico, é biocompatível e biodegradável, além de ser facilmente reabsorvido pelo corpo (Werkmeister & Ramshaw, 1992; Friess, 1998; Sano *et al.*, 1998; Maeda *et al.*, 1999), apresentando baixa antigenicidade e alta força de tensão com grande afinidade pela água. No entanto, seu custo de purificação é extremamente

alto e, quando isolado, apresenta alguma variabilidade quanto ao tamanho das fibras, impurezas e densidade de ligações cruzadas que estabilizam a estrutura de suas fibrilas (Werkmeister & Ramshaw, 1992).

Algumas modificações podem ser necessárias para superar essas desvantagens. Essas modificações podem incluir, por exemplo, o aumento de ligações cruzadas para melhorar a força de tensão (Singh *et al.*, 1995; Goisis *et al.*, 1999; Suh *et al.*, 2001); a associação do colágeno à outros materiais (Takaoka *et al.*, 1988; Suzuki *et al.*, 2000; Tan *et al.*, 2001) e até mesmo a adição de fatores de crescimento (Zellin *et al.*, 1996; Kimura *et al.*, 2000; Reddi, 2000), glicosaminoglicanos (van Susante *et al.*, 2001) e outras moléculas como a elastina (Lefebvre *et al.*, 1992) e fibronectina (Doillon & Silver, 1986) à sua estrutura.

**Tabela 2 – Vantagens e desvantagens de biomateriais com base em colágeno**

<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
Grande disponibilidade (1/3 de todas as proteínas nos tecidos)	Alto custo de purificação (principalmente do colágeno tipo I)
Obtido em diversas formas (membrana, folhas, esponjas, esferas, feixes).	Variabilidade nas fibras de colágeno e densidade de ligações cruzadas
Não-tóxico e não-antigênico	Altamente hidrofílico, causando inchamento e liberação rápida.
Biodegradável (controlado) e bioreabsorvível	
Alta força de tensão	
Idêntico a componentes bioativos	
Compatível Com Polímeros Sintéticos	
Facilmente modificado pelos seus grupos funcionais	

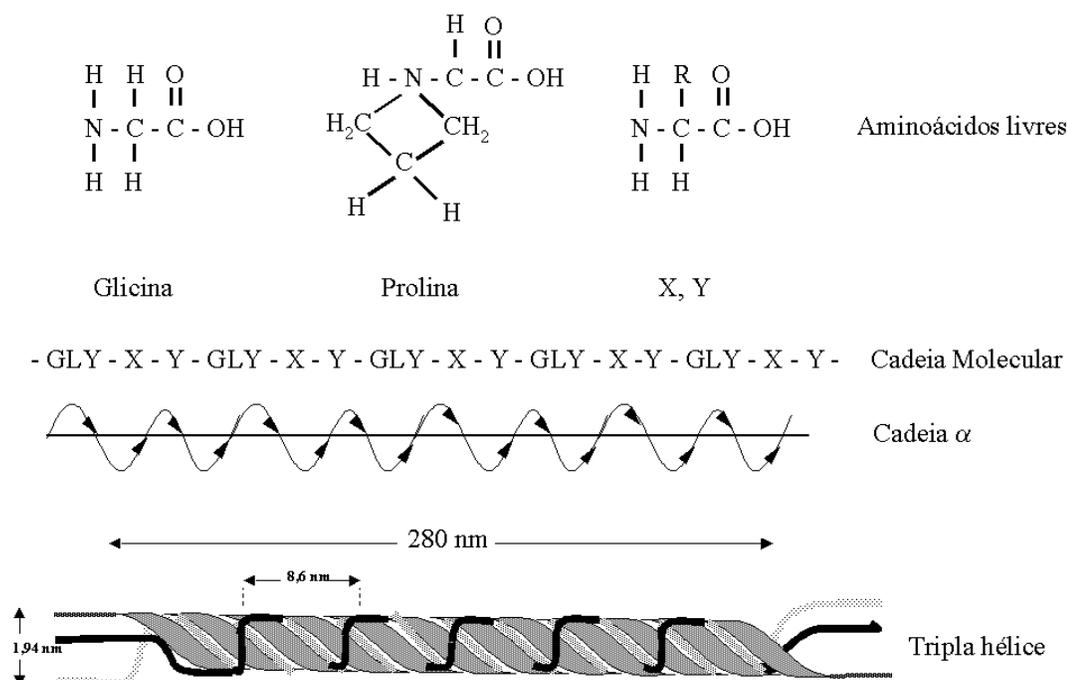
Fonte: Moreira & An, 2002.

Devido a todas essas características, o colágeno tem sido usado em diversas aplicações médicas incluindo a bioengenharia de tecidos, como próteses do coração, bexiga, ligamentos (Atala, 2000; Huynh *et al.*, 1999;), osso e cartilagem

(Wang *et al.*, 1994; Takaoka *et al.*, 1988; Kimura *et al.*, 2000; Saldanha & Grande, 2000; van Susante *et al.*, 2001).

### 5.1. Características Estruturais do Colágeno

A unidade estrutural básica apresenta um peso molecular de aproximadamente 300.000 Daltons e consiste em 3 cadeias polipeptídicas do mesmo tamanho. Sua composição depende do tipo de colágeno. Colágenos são compostos em sua maioria de três cadeias  $\alpha$ , formando uma tripla hélice devido à presença de um resíduo de glicina a cada três aminoácidos em toda a extensão da cadeia (uma unidade tripeptídica repetitiva de Gly-X-Y) (Figura 1). Prolina e hidroxiprolina são normalmente os aminoácidos X e Y, mas qualquer outro pode fazer parte da unidade tripeptídica, exceto a cisteína e triptofano.



**Figura 1 – Diagrama da formação e estrutura do colágeno.**

(Modificado de Plepis *et al.*, 1996).

Vinte e sete tipos de colágeno foram identificados até o momento (Yang *et al.* 2004). Eles são classificados baseado na estrutura polimérica que formam ou relacionados às características estruturais como mostrado na Tabela 3.

**Tabela 3 – Classes, tipos e características distintas dos colágenos.**

Classe	Tipo	Características
Colágenos formadores de fibrilas	I	Encontrado no tecido conjuntivo. Tipo mais abundante encontrado na pele, osso, ligamento e tendão. Heterotrimérico (duas cadeias $\alpha 1$ e 1 cadeia $\alpha 2$ )
	II	Colágeno da cartilagem, encontrado no disco intervertebral e humor vítreo. Homotrimérico
	III	Prevalente nos vasos sanguíneos, pele e intestino. Contaminante principal de produtos à base de colágeno. Homotrimérico
	V	Associado com o colágeno tipo I no osso
	XI	Forma fibrilas com o colágeno tipo II na cartilagem e disco intervertebral. Potente agente estimulador de células mononucleadas do sangue humano para a produção de prostaglandina E2 e interleucina – 1
	XXIV	Relacionado aos colágenos tipo V, IX e XI. Co-expressado com o colágeno tipo I no osso em desenvolvimento e olhos. Apresenta pequena imperfeição na tripla hélice.
	XXVII	Apresenta a mesma estrutura básica que o tipo V, XI. Apresenta pequena região com interrupção da hélice. Expressado por condrócitos, células epiteliais em tecidos em desenvolvimento incluindo estômago, pulmão, gônadas, pele e dente.
Colágenos associados aos colágenos formadores de fibrilas com interrupções nas triplas hélices	IX	Apresenta três domínios de tripla hélice e três domínios não helicais. Co-existe com o colágeno tipo II na cartilagem e no humor vítreo
	XII	Associado com o colágeno tipo I nos ligamentos e tendões

	XIV	Associado com o colágeno tipo I na pele e nos tendões
	XVI	Apresenta domínios interrompidos da tripla hélice. Expressado em fibroblastos e queratinócitos
	XIX	Homologia limitada ao colágeno tipo XVI. Apresenta cinco domínios de tripla hélice. Expresso em fibroblastos.
	XX	Similar aos colágenos tipos XII e XIV. Encontrado no epitélio da córnea, pele e tendão.
	XXI	Apresenta um único domínio para o fator de Willebrand e domínios para a trombospondina. Encontrado no coração, estômago, rim, músculos e placenta.
	XXII	Contém quatro domínios de tripla hélice
Colágenos formadores de redes	IV	Encontrado na membrana basal
	VIII	Encontrado em muitos tecidos, especialmente no endotélio. Pode formar uma treliça hexagonal.
	X	Colágeno com cadeia pequena, encontrado na cartilagem hipertrófica, com estrutura polimérica similar ao colágeno tipo VIII.
Colágenos multiplexin	XV	Colágeno da membrana basal. Deve tomar parte no controle da angiogênese. Expresso por fibroblastos e células musculares lisas.
	XVIII	Colágeno da membrana basal. Seu domínio C-terminal (NC1), endostatina, é um inibidor da angiogênese. Encontrado em tecidos vascularizados.
Colágenos com domínios transmembrana	XIII	Encontrado em muitos tecidos com um único domínio transmembrana N-terminal
	XV	Encontrado primariamente na pele com um único domínio transmembrana N-terminal no colágeno tipo XIII
	XVII	Consiste de um domínio citoplasmático amino-terminal, uma região transmembrana e três domínios colagenosos intercalado por pequenos domínios não-colagênicos.
	XXIII	Interage com CLAC e seu precursor como CLAC-P/colágeno tipo XXV

Colágeno formador de filamentos “em contas”	VI	Contem um pequeno domínio de tripla hélice com domínios globulares em ambas regiões terminais. Muito difundido
Colágeno formador de fibrilas de ancoragem	VII	Forma filamentos de ancoragem que liga a membrana basal epitelial ao tecido fibrilar adjacente
Outros	XXVI	Contêm dois clusters de repetições colagênicas de Gly-X-Y e três domínios não-colagênicos. Expresso nos testículos e ovários de tecidos adultos e mais abundante em neonatos
<b>CLAC</b> = <i>collagen-like Alzheimer amyloid plaque component</i> , <b>NC1</b> = domínio não-colagênico 1.		

Fonte: Yang *et al.*, 2004

Os processos relacionados a síntese de colágenos formadores de fibrilas, os quais são as moléculas utilizadas na engenharia de tecidos, são bem conhecidos (Kadler *et al.*, 1996; Alberts *et al.*, 2002; Jenkins & Raines, 2002). Esses colágenos são inicialmente sintetizados como moléculas precursoras grandes conhecidas como pró-colágenos. O processo crítico na organização dos pró-colágenos é a hidroxilação de resíduos de prolina na posição Y da seqüência Gly-X-Y em 4-hidroxiprolina pela prolil 4-hidroxilase, responsável pela estabilização da tripla hélice. Ao mesmo tempo, outra enzima hidroxila seletivamente alguns poucos resíduos de lisina em hidroxilisina, que pode ser glicosilada pela adição de *motifs* de glicose-galactose. No caso do colágeno tipo I, após cada cadeia ter adquirido aproximadamente 100 resíduos de 4-hidroxiprolina, a conformação de tripla hélice se propaga da região carboxi (C-) terminal para a amino (N-) terminal como um zíper. Após a secreção do pró-colágeno para a matriz extracelular, ambos pró-peptídeos C- e N- terminais são clivados e as moléculas se auto-arranjam em fibrilas (Kadler *et al.*, 1996; Jenkins & Raines, 2002).

As fibrilas de colágeno são estabilizadas por ligações cruzadas na matriz extracelular mediados pela enzima lisil oxidase (Kagan & Trackman, 1991). Essa

enzima extracelular converte resíduos de hidroxilisina selecionados em derivados de aldeídos, alisina e hidroxialisina, que reagem com resíduos de lisina, hidroxilisina e histidina próximos, para formar ligações cruzadas inter moleculares (Kagan & Trackman, 1991). Sabe-se que a quantidade de ligações cruzadas em uma molécula de colágeno é dependente da idade e pode variar com as condições fisiológicas e patológicas do tecido animal doador (Pokharna & Phillips, 1998).

O processamento intracelular de muitos colágenos não formadores de fibrilas é o mesmo que para os colágenos formadores de fibrilas. Um nível adequado de hidroxilação de resíduos de prolina é também necessário para a formação e a estabilidade dos domínios de tripla hélice encontrados nesses colágenos não formadores de fibrilas. Mas os processos envolvidos na secreção, processamento extracelular e ligações cruzadas de colágenos não formadores de fibrilas varia bastante.

A renovação do colágeno em tecidos é principalmente mediada por um grupo de metaloproteinases mamíferas cuidadosamente reguladas (Lauer-Fields *et al.*, 2002). Colagenases bacterianas podem ser responsáveis por uma renovação excessiva de tecidos colagenosos em ambientes expostos a crescimento bacteriano sobre condições patológicas. Essas proteinases bacterianas podem também estar envolvidas na degradação de implantes à base de colágeno.

### **5.2. Interações celulares com o colágeno**

O colágeno é uma proteína da matriz extracelular com propriedades adesivas ou quimioatrativas, por possuir a seqüência RGD (Arg-Gly-Asp) em sua estrutura, a qual é reconhecida especificamente pelos receptores da membrana celular, como as integrinas.

As integrinas fazem parte de uma família de receptores de adesão celular, apresentando duas subunidades ( $\alpha$  e  $\beta$ ) de glicoproteínas transmembranas

associadas não covalentemente (Alberts *et al.*, 2002). Diversos tipos de integrina já foram descritos (Rubin *et al.*, 1996) e, dependendo da composição de suas subunidades, elas reconhecem não só a seqüência RGD, mas outras seqüências e domínios. As integrinas  $\alpha_1\beta_1$  e  $\alpha_2\beta_1$  são as principais responsáveis pelo reconhecimento do colágeno tipo I e suas interações com as células. Osteoblastos superexpressam a integrina  $\alpha_2\beta_1$ , que após reconhecimento e ligação ao colágeno, induz a diferenciação dos osteoblastos e o processo de mineralização (Reyes & García, 2004).

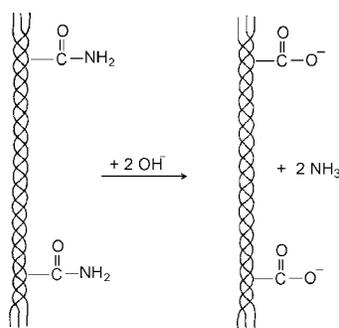
Diferentes seqüências no colágeno tipo I já foram descritas como responsáveis pelo reconhecimento específico da integrina  $\alpha_2\beta_1$ , além da seqüência RGD, tais como: a seqüência Asp-Gly-Glu-Ala (Statz *et al.*, 1991) e Gly-Glu-Arg-Gly-Val-X (Knight *et al.*, 1998). Essas seqüências na estrutura do colágeno colaboram enormemente para sua excelente interação celular, descrita na literatura (Reyes & Garcia, 2004; Johnson *et al.*, 2000).

### **5.3. Colágeno aniônico como suporte para reparo do tecido ósseo**

Como o colágeno nativo apresenta uma capacidade muito baixa de resistência à compressão, apesar de apresentar uma resistência à distensão muito significativa, modificações em sua estrutura podem ser úteis na confecção de um suporte mais resistente. A adição de fosfato de cálcio à sua estrutura melhora sua integridade mecânica (Yaylaoglu *et al.*, 1999; LeGeros, 2002), enquanto a adição de hidroxiapatita aumenta a força para resistência compressiva do suporte de colágeno (Takaoka *et al.*, 1988; Du *et al.*, 1999), além de apresentar uma taxa lenta de degradação, a qual pode ser utilizada para controlar a absorção de colágeno (Martins *et al.*, 1998). A utilização de glicosaminoglicanos e outras moléculas como elastina foi descrita aumentando a formação de cartilagem e osso (van Susante *et al.*, 2001; Rocha *et al.*, 2002), sem, no entanto, superar a utilização dos fatores de crescimento (Zellin *et al.*, 1996; Kimura *et al.*, 2000; Reddi, 2000). Colágeno pode também ter o número de suas ligações cruzadas

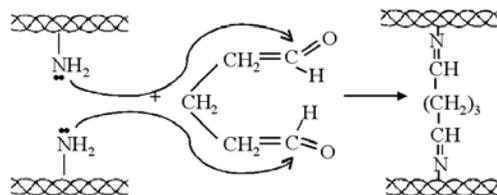
aumentadas quimicamente por diferentes técnicas, tais como difenilfosforilazida (DDPA) (Roche *et al.*, 2001), ultra-violeta (UV) (Suh *et al.*, 2001) e glutaraldeído (Goissis *et al.*, 1999). Elas aumentam a estabilidade mecânica enquanto diminuem a biodegradabilidade, além de proteger a estrutura de colágeno de digestão colagenolítica *in vivo*. Essas modificações químicas, bem como o aumento de cargas negativas e grupos carboxílicos na molécula de colágeno (Goissis *et al.*, 1998; Rocha *et al.*, 2002) têm contribuído para o aumento das propriedades piezoelétricas da molécula, a qual promove a osteogênese (Fukada, 1988).

Devido a essas propriedades, o grupo de pesquisa coordenado pelo Prof. Dr. Gilberto Goissis do Departamento de Química e Física Molecular, do Instituto de Química de São Carlos (USP), desenvolveu uma matriz de colágeno polianiônica do tipo I, a partir de pericárdio bovino, através de uma hidrólise seletiva de cadeias carboxiamidas de asparagina e glutamina (Figura 2), promovendo um aumento do número de cargas negativas superficiais da molécula de colágeno (Goissis *et al.*, 1998).



**Figura 2 - Hidrólise alcalina dos grupos carboxiamidas dos resíduos de Asn e Gln.**

Esse processo pode ser seguido de ligações cruzadas induzidas com glutaraldeído, permitindo a formação de um centro assimétrico de cargas, o que é uma característica importante para o desenvolvimento de materiais dielétricos (Pollack, 1984) (Figura 3).



**Figura 3 – Ligações cruzadas induzidas por glutaraldeído na molécula de colágeno**

Diversos estudos permitiram a caracterização química, física e biológica das matrizes aniônicas de colágeno tipo I tratado pelo processo de hidrólise por 24 (BP 24) e 48 horas (BP48). A composição do biomaterial particularmente por colágeno tipo I foi verificada através de um gel de eletroforese de SDS-poliacrilamida (Plepis *et al.*, 1996; Goissis *et al.*, 1998). A integridade da tripla hélice foi determinada por calorimetria de varredura diferencial (DSC), espectroscopia de infravermelho (IR) e por microscopia de força atômica (AFM). Todas as análises demonstraram que, apesar do colágeno aniônico apresentar uma menor estabilidade térmica (Tabela 4), a estrutura de tripla hélice se manteve intacta nas matrizes BP 24 e BP 48 (Plepis *et al.*, 1996; Goissis *et al.*, 1998; Lacerda *et al.*, 1998).

**Tabela 4 – Características químicas das matrizes de colágeno aniônicas**

	<b>Nativo</b>	<b>BP 24</b>	<b>BP 48</b>
<b><math>A_{1235} / A_{1450}</math></b>	1.02	1.00	1.04
<b><math>T_s</math> (°C)</b>	$64.6 \pm 0.1$	$55.2 \pm 0.1$	$46.6 \pm 0.4$

$A_{1235} / A_{1450}$  – taxas de absorvâncias referentes ao espectro infravermelho ( $A_{1235} / A_{1450} \geq 1.0$  – tripla hélice intacta;  $A_{1235} / A_{1450} \leq 0.60$  – desnaturação da tripla hélice)  
 $T_s$  – Estabilidade Térmica medida pela temperatura de encolhimento das amostras

Fonte: Bet *et al.*, 2001

O processo de hidrólise alcalina também permitiu um aumento das propriedades piezoelétricas (Goissis *et al.*, 1998; Bet *et al.*, 2001) e a diminuição do ponto isoelétrico (pI) das matrizes aniônicas que passaram a apresentar um pI ao redor de 4,6 – 5, 0, sendo que a matriz de colágeno nativo apresenta um pI ao redor de 6,7 – 7,1 (Goissis *et al.*, 1998). Essa característica faz com que as matrizes aniônicas apresentem um acréscimo de cargas negativas superficiais em pH fisiológico (pH 7,2 – 7,4). Matrizes tratadas por 24 horas (BP 24) apresentaram um incremento de  $46 \pm 12$  grupos carboxílicos por molécula de colágeno, enquanto matrizes tratadas por 48 horas (BP 48) apresentaram  $87 \pm 17$  (Bet *et al.*, 2001) (Tabela 5). Além disso, demonstrou-se que a absorção de água pelas matrizes e seu potencial hidrofílico aumenta linearmente com o aumento do conteúdo de carboxilados (Bet *et al.*, 2003). Essas características podem afetar o comportamento de adesão celular à essas matrizes, muito mais do que a morfologia de suas superfícies (Bet *et al.*, 2003).

**Tabela 5 – Incremento de grupos carboxílicos e características morfológicas das matrizes de colágeno aniônicas.**

Matriz	Aumento de grupos carboxílicos	Tamanho do poro ( $\mu\text{m}$ )	Tamanho mínimo de poro ( $\mu\text{m}$ )	Tamanho máximo de poro ( $\mu\text{m}$ )
<b>BP 24</b>	$46 \pm 12$	$42.54 \pm 23.03$	11.34	105.5
<b>BP 48</b>	$87 \pm 17$	$52.24 \pm 24.99$	14.06	134.3

Fonte: Bet *et al.*, 2001; Rocha *et al.*, 2002

Estudos morfológicos posteriores dessas matrizes também demonstraram que o aspecto denso da matriz nativa, após o tratamento químico, transforma-se em uma estrutura esponjosa e microfibrilar, com poros de diferentes formas e diâmetros (Rocha *et al.*, 2002) (Tabela 5). Além disso, pode-se notar que o

tratamento químico utilizado foi eficiente na remoção das células das matrizes aniônicas e matriz nativa (Bet *et al.*, 2001; Rocha *et al.*, 2002), o que poderia acarretar reações imunológicas quando implantadas.

Testes pilotos *in vivo* realizados com essas matrizes aniônicas demonstraram formação óssea e uma resposta inflamatória reduzida, apresentando características promissoras para o reparo de defeitos ósseos (Rocha *et al.*, 2002; Rosa *et al.*, 2003), enquanto a matriz nativa apresentou reação inflamatória moderada a intensa, associada com centros de reabsorção (Rosa *et al.*, 2003). Além disso, a mineralização das membranas aniônicas *in vivo* e *in vitro* já foi reportada (Goissis *et al.*, 2003) e, sugere que o tratamento de hidrólise teve ter introduzido nas matrizes sinais para a mineralização controlada das fibras de colágeno. No entanto, as interações celulares ocorrendo entre a formação óssea e as matrizes de colágeno aniônicas não estão totalmente esclarecidas e sua elucidação pode contribuir ainda mais para justificar as modificações estruturais realizadas na matriz de colágeno.

## **6. Objetivos**

### **6.1. Objetivos Gerais**

Este trabalho visou estudar o crescimento e a proliferação de osteoblastos sobre membranas tridimensionais de colágeno aniônico caracterizados por diferenças estruturais, densidades de cargas negativas e energia interfacial, em comparação com as matrizes de colágeno nativas, no que diz respeito à:

- Estudo das relações estrutura/propriedades físico-químicas e o crescimento celular.

## **6.2. Objetivos Específicos**

Visando uma comparação efetiva entre as membranas de colágeno aniônicas e as matrizes nativas, o estudo propôs-se a:

- Estudar a adesão celular *in vitro* de osteoblastos sobre as membranas nativas, BP24 e BP48;
- Observar possíveis alterações morfológicas ocorridas nos osteoblastos quando cultivadas nas membranas de colágeno nativas, BP24 e BP48;
- Verificar a possível ocorrência do processo de mineralização induzido pelas membranas de colágeno nativas, BP24 e BP48;
- Avaliar a possível diferenciação celular dos osteoblastos cultivados sobre as membranas de colágeno aniônico nativas, BP24 e BP48 através de marcadores enzimáticos e imunocitoquímicos.



## COLLAGEN-BASED SCAFFOLDS FOR BONE AND CARTILAGE REPAIR

Patricia L. Moreira and Yuehwei H. An

Orthopaedic Research Laboratories, Medical University of South Carolina, Charleston, SC

### Introduction

In the modern concept, biomaterials should not only work by space filling<sup>1</sup> but should also stimulate specific biological responses, which depend on the intrinsic properties of the polymer, such as electronic distribution, molecular conformation, aggregation state or physical-chemical properties.<sup>2</sup> The development of biomaterials for bone and cartilage repair should aim to replicate both the mechanism that controls the function and the substrate or its property that could be responsible for triggering biological and physiological reactions. Moreover, these biomaterials should be able to stimulate the interstitial ambient environment of tissues by allowing cell adhesion and serving as a three dimensional (3-D) scaffold for new tissue ingrowth.

Skeletal tissues, such as bone and cartilage, are usually organized into 3-D structures in the body. This intricate 3-D network of macromolecules known as the extracellular matrix (ECM) determines the shape, tensile strength and cellular arrangement of these structures and all organs. It is constituted by a variety of polysaccharides and proteins with fibrillar collagen arranged in an organized mesh in association with the surface of the cells that produce them. ECM, which was first known as an inert and scaffold structure, is now recognized to play a very active and complex role in the behavior regulation of cells within it.<sup>3</sup> The collagen of the ECM plays an important role in the formation of bone and cartilage, being responsible for resistance to tension and intermittent pressure, respectively. Moreover, its biodegradability, weak antigenicity<sup>4</sup> and superior biocompatibility compared with other natural polymers such as albumin and gelatin also account for the usefulness of collagen in bone and cartilage replacement and in several other areas. Collagen has also the ability to form fibers with extra strength and provides stability through its self-aggregation and cross-linking, which can control its absorption *in vivo*. However, some disadvantages have also been reported and include difficulty of adequate supplies and poor mechanical strength,<sup>5</sup> which will be better addressed later on this article. Improvements of the physi-

cal, chemical and biological properties of collagen are necessary to overcome some of the drawbacks.

Therefore, the purpose of this article is to review and discuss the biomaterial application of collagen in the repair of bone and cartilage, including the design and manufacturing of collagen-based scaffolds, its disadvantages as well as the strategies used to overcome them.

### Collagen Biology and Function as Biomaterial

Collagen is the most abundant protein in the animal kingdom, representing approximately one-third of all proteins in tissues.<sup>6,7</sup> The basic structural unit is called tropocollagen, which has a molecular weight of ~300.000 and consists of three polypeptide chains of the same size. Its composition depends on the type of collagen. Tropocollagens are mainly composed of three  $\alpha$  chains, forming a triple helix due to the occurrence of a glycyl residue in every third position along the chain (a repeating Gly-X-Y tripeptide unit) (Figure 1). Proline and Hydroxyproline are often the X and Y amino acids, but any other amino acid except cysteine and tryptophan can be in the tripeptide unit. The stability of the triple helix is provided by interchain hydrogen bonds between hydroxyproline and lysine as well as covalent bonds.<sup>8,9</sup> After the formation of collagen fibrils, the cross-linking between lysine residues to form both intra and inter-chain cross-links greatly enhances the tensile strength of the collagen fibers, and is what, depending from the tissue, is responsible or contributes for the function performance of the organ.

Nineteen types of collagen have been identified thus far.<sup>9</sup> Types I, II, III and V collagens are known as fibril forming collagen and are arranged into a continuous triple-helical structure. Collagen fibrils provide the major biomechanical scaffold for cell attachment and anchorage of macromolecules, allowing the shape and form of tissues to be defined and maintained *in vivo*. Therefore, most of the collagen-based biomaterials are designed with these collagen types.<sup>10-17</sup>

Collagen has various advantages as a biomaterial (Table 1). It can be prepared in different forms as sheets, sponges, beds and strips and is non-toxic, biocompatible and biodegradable, and is easily absorbable in the body.<sup>4,5,18,19</sup> It has very low antigenicity and high tensile strength with high affinity with water. However, its purification cost is extremely high and when isolated, it presents some

---

Corresponding author: Yuehwei H. An, M.D., Department of Orthopaedic Surgery, Medical University of South Carolina  
96 Jonathan Lucas St, Suite 708, Charleston SC 29425, USA  
Tel: (843) 792-8169; Fax (843) 792-3674; any@musc.edu

Moreira and An

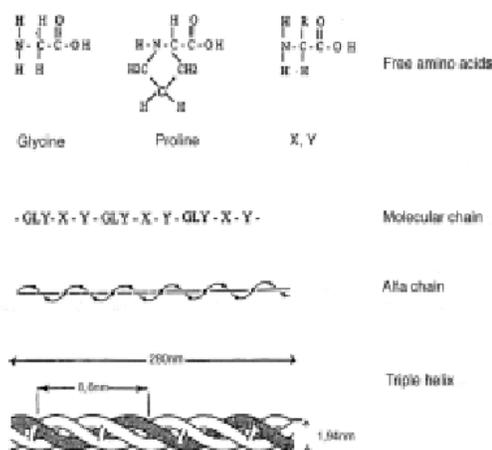


Figure 1. Diagram of collagen formation and structure. (Adapted with permission from Plepis AMG, Goissis G, Das-Gupta DK: *Polym Eng Sci* 36: 2932-6, 1996)

variability regarding fiber sizes, impurities and crosslinks density.<sup>19</sup> Some modifications may be necessary to overcome these drawbacks. These modifications can include, for example, increasing cross-linking to improve tensile strength,<sup>15,20,21</sup> the association of collagen with other materials<sup>12,22-27</sup> and even the addition of growth factors,<sup>16,28-33</sup> glycosaminoglycans and other molecules such as elastin, fibronectin<sup>10,34-38</sup> to its structure. Due to all these characteristics, collagen has been widely used in several medical applications including drug delivery systems;<sup>4,5,18,21,22,27</sup> skin replacement and burn wounds;<sup>13,24,25,31,32,35-39</sup> development of bioengineered tissues, such as blood vessels, heart valves, bladder and ligaments<sup>40-47</sup> and bone and cartilage substitutes.<sup>10,11,15-17,26,29,30,33,48</sup>

### Bone and cartilage engineering

Bone and cartilage repair are under extensive research in tissue engineering for several reasons, such as the need for better materials for use in the reconstruction of large orthopaedic defects and the desire to create implants mechanically suitable to the biological environment of bone and cartilage. The gold standard of autogenous bone or cartilage grafts, despite its excellent biological properties and adequate structural support, has some limitations including donor site morbidity, limited donor supply, anatomical problems, high resorption levels and economical cost.<sup>49,50</sup> Despite these limitations, autogenous tissue transplantation is still a very promising technique in biomedical engineering. Osteoblasts and chondrocytes can be harvested from healthy tissues of patients and after expansion in culture, seeded onto a scaffold that will provide the necessary support for the proliferation and

Table 1 – Advantages and disadvantages of collagen-based material for medical applications

Advantages	Disadvantages
Great availability, representing $\pm 1/3$ of all proteins in tissues	High cost of purification (mainly of type I collagen)
Biodegradable and bioresorbable	Variability in enzymatic degradation rate
Non-toxic and non-antigenic	Variability of collagen fibers, crosslinks density
High tensile strength and minimal expressibility	Highly hydrophobic, leading to swelling and rapid release
Prepared in a number of different forms	
Complex handling properties	
Easily modified by its functional groups	
Biodegradability regulated by cross-linking	
Identical to bioactive components	
Compatible with synthetic polymers	
Promotes blood coagulation (hemostatic)	

maintenance of the cells differentiated function.<sup>28,51</sup> Many scaffolds have been considered for bone and cartilage repair and should ideally: 1) be three-dimensional and present a highly interconnected porous network for cell proliferation and transport of nutrients and metabolic waste; 2) allow and stimulate cell attachment, proliferation and differentiation; 3) be biocompatible and bioresorbable with a controlled degradation rate to match tissue ingrowth and, 4) have mechanical properties which correspond to the bone and cartilage tissues at the implantation site.<sup>50</sup> Hydroxyapatite (HA), poly( $\alpha$ -hydroxyesters) and natural polymers such as collagen and chitin have been extensively investigated for that aim and several reviews have been published based on them.<sup>49,52-55</sup> However, this article will target the collagen-based scaffolds and their design and manufacturing for bone and cartilage repair.

### Design of collagen scaffolds

As native collagen possesses no inherent structural mechanical properties, engineering modifications may be

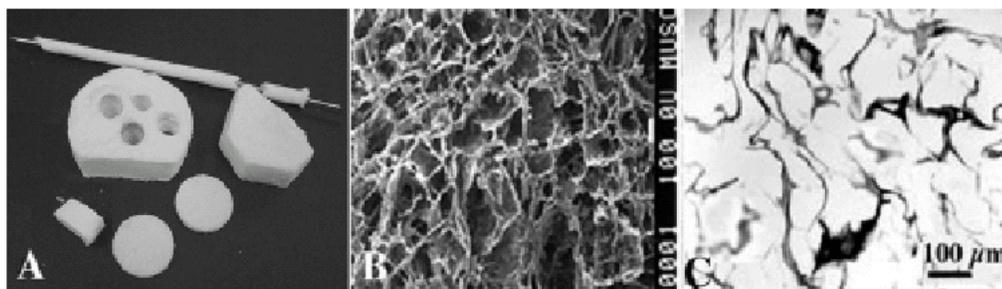


Figure 2. Collagen/HA scaffold (HA-CC) created in the authors laboratory..

useful to provide a firmer polymer. The addition of calcium phosphate to its structure improves the mechanical integrity<sup>56,57</sup> and although it is based on chondrocytes cultures, it seems very promising for bone applications as well.<sup>15</sup> The addition of hydroxyapatite enhances the compressive yield strength of collagen scaffolds<sup>26,58</sup> and as it has a very slow degradation rate, it can be used also to control collagen absorption.<sup>27</sup> The use of glycosaminoglycans and other molecules such as elastin<sup>10,59</sup> has been reported to increase cartilage and bone formation, but not as extensively as does the use of growth factors.<sup>16,29,30,33</sup> Growth factors such as bone morphogenetic proteins (BMP) and fibroblast growth factors (FGF) are known proteins with critical roles in embryological bone and cartilage formation, osteoinduction, angiogenesis, and bone and cartilage repair.<sup>60,61</sup> Growth factors can be successfully delivered by collagen composites and a controlled releasing rate may be ideal for promoting bone and cartilage proliferation.<sup>29,30,33</sup>

Collagen can also be chemically cross-linked by different techniques such as diphenylphosphorylazide (DPPA),<sup>62</sup> ultra-violet (UV)<sup>15</sup> and glutaraldehyde.<sup>20</sup> Cross linking increases mechanical stability while decreasing biodegradability and also protects collagen structure from collagenolytic digestion *in vivo*. This chemical modification as well as the increase of negative charges and carboxylic groups in the collagen molecule,<sup>20,59</sup> although the latter is still in preliminary experiments, also contributes to the enhancement of the molecule's piezoelectric properties, which is known to promote osteogenesis.<sup>63</sup>

Pore shape and size also affect cellular attachment and proliferation. Different topography of pores may be optimal for bone repair, since it has very different structures depending on its function and location.<sup>64,65</sup> Collagen pore size and shape can be modulated by a controlled freeze-drying process,<sup>17,62,66</sup> which is based on the observation that lower temperatures (at around  $-70^{\circ}\text{C}$ ) produces finer pores, while higher temperatures (around  $-20^{\circ}\text{C}$ ) does the opposite. Optimal pore size is also very cell-type specific. An average human osteon size is about  $223\ \mu\text{m}$  and prior reports have suggested an optimal pore range of  $100\text{-}400\ \mu\text{m}$ .<sup>67,68</sup> However, Pineda<sup>69</sup> reported that pore sizes smaller

than  $200\ \mu\text{m}$  promoted better bone growth in rabbit' radii. Chondrocytes, however, seem to have optimal growth with pore diameters up to  $300\ \mu\text{m}$ .<sup>70,71</sup> Even though smaller pore sizes up to  $100\ \mu\text{m}$  show higher chondrocyte proliferation, larger pore sizes result in the retention of chondrocytic morphology and differentiation for longer periods.<sup>17</sup>

Another important point related to porosity is the diffusion of nutrients into the collagen scaffold. Interconnected pores enhance the diffusion rates to and from the center of the scaffold, allowing cellular proliferation even inside the system.<sup>50,68</sup> After processing by freeze-drying or alkaline treatments, collagen often presents an interconnected porous network.<sup>10,17,59,62</sup> Furthermore, a fluid-dynamic microenvironment created by a bioreactor allows *in vitro* culture of larger and better organized 3-D cell communities, mimicking the interstitial conditions present in natural bone and cartilage.<sup>72-74</sup> However, there are no reports about the use of bioreactors and collagen scaffolds so far. Despite the fact that porosity enhances cellular proliferation and differentiation as well as fluid transportation to and from the center of collagen, it can adversely affect its mechanical characteristics. Increased porosity can also decrease malleability and tensile strength of scaffolds.<sup>50</sup>

### Laboratory Methods of Manufacturing Collagen-Based Scaffolds

Collagen scaffolds are often processed from collagens in bovine or porcine skin or tendons.<sup>13</sup> Collagen is frequently extracted using neutral salts and diluted acids solutions.<sup>75</sup> The obtained solution is then filtered and deaerated under vacuum. Collagens for manufacturing scaffolds are often obtained from experimental chemical companies such as Sigma or ICN.

In most laboratories, collagens are dissolved in acidic solution and collagen gels are made. The collagen gel is poured into molds, freeze-dried and lyophilized for producing porous scaffolds. As an example, the procedure for making a hydroxyapatite collagen complex sponge (HA-CC) for bone tissue engineering in the authors' laboratory will be briefly described here. The HA-CC, made of hydroxyapatite and bovine type I collagen, was tested in

Dr. Yuehwei An's laboratory in collaboration with Dr. Yuan Tian in 1995.<sup>76</sup> Bovine collagen I was dissolved in pH 2.0 PBS (adjusted by HCl) and mixed crystalline hydroxyapatite. After 18 hrs, the precipitated composite material was filtered briefly and placed in cell culture wells or in plastic tubes. The wet mixture in the wells or tubes was freeze-dried to form a sponge structure. The sponge was trimmed to make implants of the desired shape and size. The HA-CC implant material has a porous spongy structure. When immersed in PBS solution, its spongy structure remained. The PBS solution could be squeezed out of the structure and after the pressure was released, the implant returned to its original dimensions without any disintegration. The implant was also soaked in PBS solution for 14 days at 37°C with agitation (2 times per day, 60 min. each time) and no noticeable disintegration was seen. Macro, SEM, and histological images of HA-CC scaffolds are shown in Figure 2. The average pore sizes of the HA-CC ranges from 100 to 400  $\mu\text{m}$ .

#### Acknowledgments:

The fellowship of Patricia L. Moreira was jointly supported by Brazilian Government (Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) PDDE Proc. number BEX 0121/01-00) and Orthopaedic Research Laboratory at the Medical University of South Carolina.

#### References

- Ratner BD: New ideas in biomaterials science—a path to engineered biomaterials. *J Biomed Mater Res* 27:837-50, 1993
- Alper M, Calvert PD, Frankel R, et al: Materials Synthesis Based on Biological Processes. Materials Research Society, Pittsburgh, PA, 1991
- Alberts B, Bray D, Lewis S, et al: Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing, New York - London, 1994
- Maeda M, Tani S, Sano A, et al: Microstructure and release characteristics of the minipellet, a collagen-based drug delivery system for controlled release of protein drugs. *J Control Release* 62:313-24, 1999
- Friess W: Collagen—biomaterial for drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm* 45:113-36, 1998
- Burgeson RE, Nimni ME: Collagen types. Molecular structure and tissue distribution. *Clin Orthop*:250-72, 1992
- Haralson MA, Hassel JR: The extracellular matrix - an overview. In: Haralson MA, Hassel JR, eds. Extracellular Matrix: a practical approach. Oxford University Press Inc, New York, pp: 1-30, 1995
- Kadler KE, Holmes DF, Trotter JA, et al: Collagen fibril formation. *Biochem J* 316:1-11, 1996
- Jenkins CL, Raines RT: Insights on the conformational stability of collagen. *Nat Prod Rep* 19:49-59, 2002
- van Susante JLC, Pieper J, Buma P, et al: Linkage of chondroitin-sulfate to type I collagen scaffolds stimulates the bioactivity of seeded chondrocytes in vitro. *Biomaterials* 22:2359-69, 2001
- Saldanha V, Grande DA: Extracellular matrix protein gene expression of bovine chondrocytes cultured on resorbable scaffolds. *Biomaterials* 21:2427-31, 2000
- Tan W, Krishnaraj R, Desai TA: Evaluation of nanostructured composite collagen—chitosan matrices for tissue engineering. *Tissue Eng* 7:203-10, 2001
- Ruszczak Z, Schwartz RA: Collagen uses in dermatology - an update. *Dermatology* 199:285-9, 1999
- von Heimburg D, Zachariah S, Heschel I, et al: Human preadipocytes seeded on freeze-dried collagen scaffolds investigated in vitro and in vivo. *Biomaterials* 22:429-38, 2001
- Suh H, Park JC, Han DW, et al: A bone replaceable artificial bone substitute: cytotoxicity, cell adhesion, proliferation, and alkaline phosphatase activity. *Artif Organs* 25:14-21, 2001
- Zellin G, Hedner E, Linde A: Bone regeneration by a combination of osteopromotive membranes with different BMP preparations: a review. *Connect Tissue Res* 35:279-84, 1996
- Nehrer S, Breinan HA, Ramappa A, et al: Matrix collagen type and pore size influence behaviour of seeded canine chondrocytes. *Biomaterials* 18:769-76, 1997
- Sano A, Hojo T, Maeda M, et al: Protein release from collagen matrices. *Adv Drug Deliv Rev* 31:247-66, 1998
- Werkmeister JA, Ramshaw JA: Collagen-based biomaterials. *Clin Mater* 9:137-8, 1992
- Goissis G, Marcantonio E, Jr., Marcantonio RA, et al: Biocompatibility studies of anionic collagen membranes with different degree of glutaraldehyde cross-linking. *Biomaterials* 20:27-34, 1999
- Singh MP, Stefko J, Lumpkin JA, et al: The effect of electrostatic charge interactions on release rates of gentamicin from collagen matrices. *Pharm Res* 12:1205-10, 1995
- Thacharodi D, Rao KP: Rate-controlling biopolymer membranes as transdermal delivery systems for nifedipine: development and in vitro evaluations. *Biomaterials* 17:1307-11, 1996
- Park JC, Hwang YS, Lee JE, et al: Type I atelocollagen grafting onto ozone-treated polyurethane films: cell attachment, proliferation, and collagen synthesis. *J Biomed Mater Res* 52:669-77, 2000
- Koide M, Osaki K, Konishi J, et al: A new type of biomaterial for artificial skin: dehydrothermally cross-linked composites of fibrillar and denatured collagens. *J Biomed Mater Res* 27:79-87, 1993
- Suzuki S, Kawai K, Ashoori F, et al: Long-term follow-up study of artificial dermis composed of outer silicone layer and inner collagen sponge. *Br J Plast Surg* 53:659-66, 2000
- Takaoka K, Nakahara H, Yoshikawa H, et al: Ectopic bone induction on and in porous hydroxyapatite combined with collagen and bone morphogenetic protein. *Clin Orthop*:250-4, 1988
- Martins VC, Goissis G, Ribeiro AC, et al: The controlled release of antibiotic by hydroxyapatite: anionic collagen composites. *Artif Organs* 22:215-21, 1998
- Reddi AH: Morphogenesis and tissue engineering of bone and cartilage: inductive signals, stem cells, and biomimetic biomaterials. *Tissue Eng* 6:351-9, 2000
- Nakagawa T, Tagawa T: Ultrastructural study of direct bone formation induced by BMPs-collagen complex implanted into an ectopic site. *Oral Dis* 6:172-9, 2000
- Murata M, Maki F, Sato D, et al: Bone augmentation by onlay implant using recombinant human BMP-2 and collagen on adult rat skull without periosteum. *Clin Oral Implants Res* 11:289-95, 2000
- Marks MG, Doillon C, Silver FH: Effects of fibroblasts and basic fibroblast growth factor on facilitation of dermal wound healing by type I collagen matrices. *J Biomed Mater Res* 25:683-96, 1991
- Royce PM, Kato T, Ohsaki K, et al: The enhancement of cellular infiltration and vascularisation of a collagenous dermal implant in the rat by platelet-derived growth factor BB. *J Dermatol Sci* 10:42-52, 1995
- Kimura M, Zhao M, Zellin G, et al: Bone-inductive efficacy of recombinant human bone morphogenetic protein-2 expressed in *Escherichia coli*: an experimental study in rat mandibular defects. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 34:289-99, 2000

34. Lefebvre F, Gorecki S, Bareille R, et al: New artificial connective matrix-like structure made of elastin solubilized peptides and collagens: elaboration, biochemical and structural properties. *Biomaterials* 13:28-33, 1992
35. Doillon CJ, Silver FH: Collagen-based wound dressing: effects of hyaluronic acid and fibronectin on wound healing. *Biomaterials* 7:3-8, 1986
36. Boyce ST: Skin substitutes from cultured cells and collagen-GAG polymers. *Med Biol Eng Comput* 36:791-800, 1998
37. Harriger MD, Supp AP, Warden GD, et al: Glutaraldehyde crosslinking of collagen substrates inhibits degradation in skin substitutes grafted to athymic mice. *J Biomed Mater Res* 35:137-45, 1997
38. Lam PK, Chan ES, Liew CT, et al: The efficacy of collagen dermis membrane and fibrin on cultured epidermal graft using an athymic mouse model. *Ann Plast Surg* 43:523-8, 1999
39. Sabolinski ML, Alvarez O, Auletta M, et al: Cultured skin as a 'smart material' for healing wounds: experience in venous ulcers. *Biomaterials* 17:311-20, 1996
40. Wang MC, Pins GD, Silver FH: Collagen fibres with improved strength for the repair of soft tissue injuries. *Biomaterials* 15:507-12, 1994
41. Atala A: Tissue engineering of artificial organs. *J Endourol* 14:49-57, 2000
42. Auger FA, Rouabhia M, Goulet F, et al: Tissue-engineered human skin substitutes developed from collagen- populated hydrated gels: clinical and fundamental applications. *Med Biol Eng Comput* 36:801-12, 1998
43. Huynh T, Abraham G, Murray J, et al: Remodeling of an acellular collagen graft into a physiologically responsive neovessel. *Nat Biotechnol* 17:1083-6, 1999
44. Kuzuya M, Kinsella JL: Induction of endothelial cell differentiation in vitro by fibroblast- derived soluble factors. *Exp Cell Res* 215:310-8, 1994
45. Chevally B, Herbage D: Collagen-based biomaterials as 3D scaffold for cell cultures: applications for tissue engineering and gene therapy. *Med Biol Eng Comput* 38:211-8, 2000
46. van der Laan JS, Lopez GP, van Wachem PB, et al: TFE-plasma polymerized dermal sheep collagen for the repair of abdominal wall defects. *Int J Artif Organs* 14:661-6, 1991
47. Pennisi E: Tending tender tendons. *Science* 295:1011, 2002
48. Isobe M, Yamazaki Y, Oida S, et al: Bone morphogenetic protein encapsulated with a biodegradable and biocompatible polymer. *J Biomed Mater Res* 32:433-8, 1996
49. Burg KJ, Porter S, Kellam JF: Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials* 21:2347-59, 2000
50. Huttmacher DW: Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* 21:2529-43, 2000
51. Brittberg M, Tallheden T, Sjögren-Jansson B, et al: Autologous chondrocytes used for articular cartilage repair: an update. *Clin Orthop*:S337-48, 2001
52. Agrawal C, Niederauer G, Micallef D, et al: The use of PLA\_PGA polymers in orthopaedics. *Encyclopedic handbook of biomaterials and bioengineering*. M. Dekker, New York, pp: 2081-115, 1995
53. Chaignaud BE, Langer R, Vacanti JP: The history of tissue engineering using synthetic biodegradable polymer scaffolds and cells. In: Atala A, Mooney DJ, eds. *Synthetic biodegradable polymer scaffolds*. Birkhauser, Boston, pp: 1-14, 1997
54. Pachence JM, Kohn J: Biodegradable polymers for tissue engineering. In: Lanza RP, Langer R, Chick WL, eds. *Principles of Tissue Engineering*. R.G. Landes Co., Austin, Texas, pp: 273-93, 1997
55. West JL, Hubbell JA: Bioactive polymers. In: Atala A, Mooney DJ, eds. *Synthetic biodegradable polymer scaffolds*. Birkhauser, Boston, pp: 83-95, 1997
56. Yaylaoglu MB, Yildiz C, Korkusuz F, et al: A novel osteochondral implant. *Biomaterials* 20:1513-20, 1999
57. LeGeros RZ: Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clin Orthop*:81-98, 2002
58. Du C, Cui FZ, Zhu XD, et al: Three-dimensional nano-HAp/collagen matrix loading with osteogenic cells in organ culture. *J Biomed Mater Res* 44:407-15, 1999
59. Rocha LB, Goissis G, Rossi MA: Biocompatibility of anionic collagen matrix as scaffold for bone healing. *Biomaterials* 23:449-56, 2002
60. Martin I, Suetterlin R, Baschong W, et al: Enhanced cartilage tissue engineering by sequential exposure of chondrocytes to FGF-2 during 2D expansion and BMP-2 during 3D cultivation. *J Cell Biochem* 83:121-8, 2001
61. Andriano KP, Chandrashekar B, McEnery K, et al: Preliminary in vivo studies on the osteogenic potential of bone morphogenetic proteins delivered from an absorbable puttylike polymer matrix. *J Biomed Mater Res* 53:36-43, 2000
62. Roche S, Ronziere MC, Herbage D, et al: Native and DPPA cross-linked collagen sponges seeded with fetal bovine epiphyseal chondrocytes used for cartilage tissue engineering. *Biomaterials* 22:9-18, 2001
63. Fukada E: Piezoelectricity of natural biomaterials. *Medical Applications of Piezoelectric Polymers*. Vol. 5. Gordon and Breach Science Pub., New York, pp: 1-26, 1988
64. Holy CE, Dang SM, Davies JE, et al: In vitro degradation of a novel poly(lactide-co-glycolide) 75/25 foam. *Biomaterials* 20:1177-85, 1999
65. Burg KJ, Mikos AG, Beiler RJ, et al: Particulate selection and importance to cell to cell adhesion in solvent-cast, particulate-leached polymeric constructs, *25th Annual Meeting of The Society of Biomaterials*, Providence, RI, April, 1999
66. Heschel I, Rau G: Method for producing porous structures. *International Patent Application*, 1997
67. Holmes RE: Bone regeneration within a coralline hydroxyapatite implant. *Plast Reconstr Surg* 63:626-33, 1979
68. Simske SJ, Ayers RA, Bateman TA: Porous Materials for Bone Engineering. In: Liu D-M, Dixit V, eds. *Porous Materials for Tissue Engineering*. Vol. 250. Trans Tech. Publications, Switzerland, pp: 151-82, 1997
69. Pineda LM, Busing M, Meinig RP, et al: Bone regeneration with resorbable polymeric membranes. III. Effect of poly(L-lactide) membrane pore size on the bone healing process in large defects. *J Biomed Mater Res* 31:385-94, 1996
70. von der Mark K, Gauss V, von der Mark H, et al: Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture. *Nature* 267:531-2, 1977
71. LiVecchi AB, Tombes RM, LaBerge M: In vitro chondrocyte collagen deposition within porous HDPE: substrate microstructure and wettability effects. *J Biomed Mater Res* 28:839-50, 1994
72. Freed LE, Hollander AP, Martin I, et al: Chondrogenesis in a cell-polymer-bioreactor system. *Exp Cell Res* 240:58-65, 1998
73. Botchwey EA, Pollack SR, Levine EM, et al: Bone tissue engineering in a rotating bioreactor using a microcarrier matrix system. *J Biomed Mater Res* 55:242-53., 2001
74. Martin I, Obradovic B, Treppo S, et al: Modulation of the mechanical properties of tissue engineered cartilage. *Biorheology* 37:141-7, 2000
75. Pieper JS, Oosterhof A, Dijkstra PJ, et al: Preparation and characterization of porous crosslinked collagenous matrices containing bioavailable chondroitin sulphate. *Biomaterials* 20:847-58, 1999
76. Tian Y, An YH, Kang K, et al: A novel chondrocyte-seeded hydroxyapatite collagen scaffold for cartilage repair, *5th World Biomaterials Congress*, Toronto, Canada, May 28-June 2, 1996



## In Vitro Analysis Of Anionic Collagen Scaffolds For Bone Repair

Patricia L. Moreira,<sup>1</sup> Yuehuei H. An,<sup>2</sup> Arnaldo Rodrigues Santos, Jr.,<sup>1,3</sup> Selma Candelária Genari<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Department of Cellular Biology, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, P.O. Box 6109, São Paulo 13084-971, Brazil

<sup>2</sup> Orthopaedic Research Laboratory, Medical University of South Carolina, 96 Jonathan Lucas Street, Suite 708, Charleston, South Carolina 29425

<sup>3</sup> University Regional Center of Espírito Santo do Pinhal (CREUPI), Espírito Santo do Pinhal, P.O. Box 05, São Paulo 13990-000, Brazil

Received 31 July 2003; revised 13 October 2003; accepted 22 October 2003

Published online 31 August 2004 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/jbm.b.30026

**Abstract:** Collagen has been extensively described as a beneficial material in bone tissue engineering due to its biocompatibility, biodegradability, low antigenicity, and high tensile strength. However, collagen scaffolds in their pure form have some drawbacks and improvements in the physical, chemical, and biologic properties of collagen are necessary to overcome those inadequacies. Recently, the selective hydrolysis of carboxyamides of asparagine and glutamine residues of collagen has been employed to increase the number of negative sites and enhance the piezoelectric properties of collagen. Anionic collagen scaffolds were prepared by use of a hydrolysis treatment for either 24 h [bovine pericardium (BP 24)] or 48 h (BP 48). Bovine osteoblasts were cultured on them and on native matrices to understand the cellular interactions responsible for the good osteoconductivity and biocompatibility reported with *in vivo* tests. Based on the data obtained on cell adhesion, alkaline phosphatase (ALP) and extracellular matrix macromolecule production, and cellular proliferation through histological analysis, we may conclude that the materials tested reveal sufficient biocompatibility level for bone repair. Further, the evidence of some connection between ALP activity and the mineralization process should be emphasized. BP 48 presented the most promising results stimulating *in vitro* mineralization, ALP production, and possible osteoblast differentiation. © 2004 Wiley Periodicals, Inc. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater* 71B: 229–237, 2004

**Keywords:** anionic collagen; bone repair; cell adhesion; alkaline phosphatase; histological analysis; mineralization

### INTRODUCTION

The current concept for biomaterials is that they should not only fill a space<sup>1</sup> but also stimulate specific biologic responses. These latter may depend on the intrinsic properties of the polymer, such as molecular conformation, aggregation state, or physical–chemical properties.<sup>2</sup> Biomaterials should also be capable of stimulating the interstitial environment of tissues by allowing cell adhesion and serving as a 3D scaffold for new tissue ingrowth.

Bony tissue is composed mainly of minerals and type I collagen, which constitutes 90% of the bone extracellular matrix (ECM).<sup>3</sup> Water, noncollagenous proteins, lipids, vascular ele-

ments, and cells account for the remainder.<sup>3</sup> Collagen is responsible for tensile strength and flexibility as well as ECM organization.<sup>3</sup> Collagen is also an adhesive substrate for most cell types and is important for cellular migration, proliferation, and differentiation.<sup>3</sup> The utilization of collagen scaffolds in the treatment of bone defects builds on these properties.

Collagen<sup>4–6</sup> has been extensively described as a beneficial material in tissue engineering due to its biocompatibility, biodegradability, low antigenicity, and high tensile strength.<sup>7,8</sup> Moreover, it presents amino acid sequences of arginine–glycine–aspartate (RGD sequences),<sup>6,9</sup> which are responsible for cellular recognition and adhesion. However, collagen scaffolds in their pure form have some drawbacks as their poor mechanical strength<sup>7</sup> can interfere with the re-establishment of the initial tissue characteristics. Among these drawbacks may be included the high cost of purification (mainly of type I collagen) and the difficulty of scaffold reproducibility because it can differ at crosslinks density and fiber size. Therefore, improvements in the physical, chemical,

Correspondence to: P. L. Moreira, <sup>1</sup>Department of Cellular Biology, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, P.O. Box 6109, São Paulo 13084-971, Brazil (e-mail: plm@unicamp.br)

Contract grant sponsor: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

© 2004 Wiley Periodicals, Inc.

and biologic properties of collagen are necessary to overcome those inadequacies, and several approaches have been tried. The addition of other materials such as hydroxyapatite<sup>6,10</sup> and calcium phosphate<sup>11</sup> to collagen scaffolds serves to improve mechanical integrity and degradation rate, while the use of growth factors,<sup>12,13</sup> glycosaminoglycans,<sup>14</sup> and elastin<sup>5</sup> increases bone formation.

Recently, selective hydrolysis of carboxyamides of asparagine and glutamine residues of collagen<sup>15,16</sup> has been employed to increase the number of negative sites and enhance the piezoelectric properties of collagen. These latter have been shown to promote osteogenesis.<sup>17</sup> The chemical modification potentially constitutes an enhancement, which results in improving or modifying collagen scaffolds. This betters the performance of the scaffolds in bone repair because it does not denature the protein structure of collagen, allowing it to maintain its tissue characteristics.<sup>15,16</sup>

Most tissue-derived cells are anchorage dependent and require adhesion to a solid surface for viability and growth. Cellular adhesion precedes other events such as cell spreading, cell migration, and, often, differentiated cell function. Therefore, this process is of fundamental interest in tissue engineering<sup>18</sup> because adhesion is highly dependent on the characteristics of the substrate. Maintaining a culture for a period of time allows the influence of the substrate on cell viability and function to be determined.<sup>18,19</sup>

Thus, several important features are necessary for bone substitutes. The requirements include biocompatibility, biodegradability, bioresorbability, and osteoconductivity. To meet these requisites, anionic collagen scaffolds were prepared by use of a hydrolysis treatment for either 24 h [bovine pericardium (BP 24)] or 48 h (BP 48). A pilot *in vivo* test was performed on those scaffolds and a low inflammatory response and bone formation were found, presenting promising characteristics for repairing bone defects.<sup>5</sup> Moreover, the formation of bone marrow inside the implanted matrices showed extended ingrowth. This is not seen for several osteoconductor biomaterials. However, the cellular interactions occurring between the healing bone and the anionic collagen matrices are not fully understood. In this study, we examined bovine osteoblasts cultured on the different matrices and the types of cellular interactions that may be responsible for the good osteoconductivity and biocompatibility reported earlier.<sup>5</sup> Evaluation of the morphological and physiological differentiation of osteoblastic cells cultured on these anionic collagen membranes in comparison to the native collagen matrix may provide information to explain the processes reported *in vivo*.<sup>5</sup> Moreover, it may justify whether the structural modification (alkaline hydrolysis treatment) described in this work may also contribute to the better biologic performance of these collagen matrices in bone repair.

## MATERIALS AND METHODS

### Matrix Acquisition

BP (Braille Biomédica S/A, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil) was used for preparation of the 3D matrix. The

samples were obtained from the São Carlos Chemical Institute from the São Paulo University under supervision of Dr. Gilberto Goissis as described by Lacerda et al.<sup>15</sup> and Goissis et al.<sup>20</sup> Briefly, the alkaline hydrolysis was performed in aqueous dimethylsulfoxide solution containing chloride and sulfate salts. The hydrolysis times were 24 (BP 24) and 48 (BP 48) h. Excess salts were removed by extensive washes with 3% boric acid solution, 0.3% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), pH 11.0, and deionized water, and finally, the matrices were equilibrated in 0.13 mol/L phosphate buffer, pH 7.4. The anionic collagen matrices produced had been characterized by thermal analysis, infrared spectroscopy, titration, and dielectric properties, as described in previous publications.<sup>15,20</sup> The samples analyzed were (1) the 3D native anionic collagen/elastin matrices (native—no alkaline hydrolysis treatment), (2) and (3) the 3D anionic collagen/elastin matrices submitted to alkaline hydrolysis treatment for 24 and 48 h (BP 24 and BP 48, respectively). Following analysis, the samples were cut into small circumferences—circles (6 × 3 mm)—and used in the experiments described below.

### Cell Culture

For adhesion and cytotoxicity evaluation, hFOB 1.19 (human fetal osteoblastic cells) were used. They were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, University Boulevard, Manassas, VA). They were maintained at the Cell Culture Laboratory at the Cell Biology Department of the State University of Campinas (UNICAMP) in Ham's F-12 medium (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS; Nutricell Nutrientes Celulares, Campinas, São Paulo, Brazil) at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>.

For measurement of alkaline phosphatase (ALP) production and morphology analysis, a noncontinuous bovine fetal osteoblast culture was used. Cells were obtained from Dr. William Whitson<sup>21</sup> and maintained in the Orthopedic Research Laboratory at the Medical University of South Carolina (MUSC). The osteoblasts were cultured in Whitson's DMEM with 15% FCS (Sigma) at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>.<sup>21</sup> For experimental analysis, a mineralization medium as described by Whitson<sup>21</sup> was also used in the noncontinuous cell line culture. It differed from Whitson's DMEM due to the addition of  $\beta$ -glycerophosphate and calcium chloride. The cells were kept in Whitson's DMEM medium until the experiment was carried out, when they were cultured with both mediums as described below. The medium was changed every day until the cells reached confluence at about 5–7 days, when they were subcultured. These cells were used in all experiments at passage 4.

### Adhesion Assay

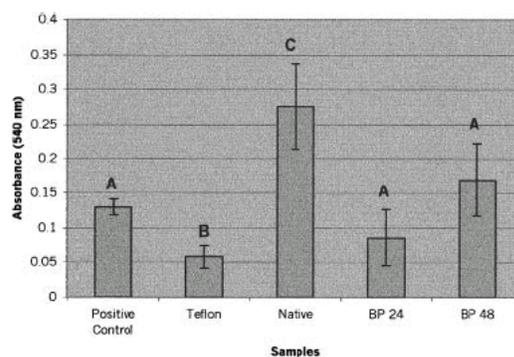
Cellular viability on substrates was measured using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT; Sigma) assay. This is a quantifiable test that measures cell metabolic function depending on the intact activity of a mitochondrial enzyme, succinate dehydrogenase,

that is impaired after exposure of cells to toxic surroundings. In brief, the test involves the conversion of tetrazolium salt (MTT) to an insoluble formazan product, which can be quantified by spectrophotometry.<sup>22</sup> Briefly, the different matrices were placed in a 96-well plate (Corning/Costar) in Ham's F-12 medium without FCS for 24 h at 37°C. After this incubation period, a 100- $\mu$ L aliquot of hFOB cell suspension ( $1.0 \times 10^5$  cell/mL) in Ham's F-12 medium with 10% FCS was added to the wells containing the different samples. The cells were cultured for 2 h at 37°C, washed twice with 0.1M phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4; Merck) at 37°C, and 100  $\mu$ L of fresh Ham's F-12 medium with FCS was added to each well along with 10  $\mu$ L of MTT. After 4-h incubation, 100  $\mu$ L/well of isopropanoic acid (Merck) was added and 100  $\mu$ L of each well was transferred to a corresponding well in a new 96-well plate. The plate was read in a microplate reader (Multiskan Bichromatic Version 1.06) at 540 nm. The culture plate itself (polystyrene) was used as a positive control (substrate that is optimum for adhesion) and Teflon disks as a negative control, according to the ISO 10993-5.<sup>18</sup> Seven repetitions were made of all experiments.

The absorbance values were  $\log_{10}$  transformed to obtain variance homogeneity (Levene's Test,  $F = 0.811354$ ;  $p = 0.526477$ ). Statistical significance ( $p < 0.005$ ) was assessed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey HSD multiple comparisons procedures.

#### ALP Production

For measurement of ALP production, Sigma kit 104-LS was used. The noncontinuous bovine fetal osteoblast line were maintained in Whitson's DMEM (Sigma) supplemented with 15% FCS (Sigma) until passage 4, when they were subcultured and seeded at each experimental well with the native, BP 24, and BP48 samples, as well as the control wells, which were left empty. The native, BP 24, and BP 48 matrices samples were placed on a 96-well plate (Corning/Costar) and a 200- $\mu$ L aliquot of cells ( $1.0 \times 10^5$  cells/mL) was added to each well. Two plates were prepared one for the DMEM medium analysis and another for the mineralization one. After 4 h, the DMEM medium was replaced by its respective medium without the pH indicator phenol red (Sigma D-2902), as the phenol red interferes with absorbance reading. The plate to be analyzed with the mineralization medium had the DMEM medium replaced by the mineralization medium without the pH indicator. The cells were cultured at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> for up to 21 days, and the ALP production was measured at days 1, 3, 5, 7, 10, 15, and 21. The medium was changed daily. Briefly, the medium was collected into 25-mL centrifuge tubes, and to each 0.5 mL of medium 0.25 mL of 2-amino-2-methyl-1-propanol and 0.25 mL of phosphate disodium *p*-nitrophenol were added. The tubes were placed in a warm bath at 37°C for 15 min; then, 0.05M NaOH was added to stop the reaction. The absorbance was read in a microplate reader (Multiskan Bichromatic Version 1.06) at 405 nm. At each reading, a standard calibration curve was made. Each experimental data point was read in triplicate. Results were expressed as means  $\pm$  standard deviation.



**Figure 1.** Cellular adhesion assay. Columns represent means of seven absorbance readings; vertical bars indicate standard deviation interval. Different letters indicate significantly different means (Tukey HSD tests,  $p < 0.005$ ).

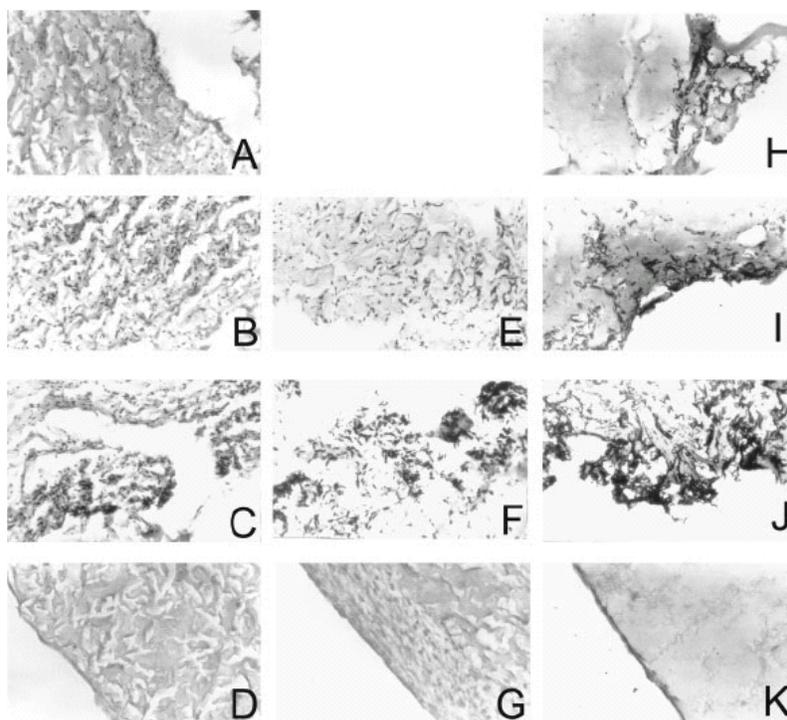
#### Light Microscopy

Noncontinuous bovine fetal osteoblast cells were cultured on the native, BP 24, and BP 48 3D matrices in Whitson's DMEM (Sigma) and Whitson's mineralization medium (Sigma), both with 15% FCS (Sigma) for 1, 3, 5, 10, 15, and 21 days at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. Cells at an initial concentration of  $1.0 \times 10^5$  cells/mL were added to a 96-well plate (200  $\mu$ L/well) (Corning/Costar) with the matrices. After 4 h of seeding (for adhesion purpose), the plate to be analyzed with the mineralization medium had the DMEM medium replaced by the mineralization one. At the determined time points, the matrices were fixed in 4% paraformaldehyde (Sigma), washed in PBS (Sigma), and embedded in paraffin (Paraplast, Fisher Scientific). Sections of 5- $\mu$ m thickness were obtained and stained with either toluidine blue or Von Kossa.<sup>23,24</sup> Due to the metachromasy observed on the sections stained with toluidine blue, some slides were also processed using alcian blue for glycosaminoglycan detection.<sup>23</sup> Enzymatic detection of chondroitin sulfate was performed using 0.01 Sigma U/mg of chondroitinase AC (Sigma) in 0.1M Tris, pH 7.4, at 37°C.<sup>25</sup> After overnight treatment with the enzyme, the sample was stained with toluidine blue. All experiments were performed in triplicate.

## RESULTS

#### hFOB 1.19 Adhesion

The results of the one-way ANOVA showed that there were significant differences among adhesion absorbance in the different samples ( $F = 58.25$ ;  $p < 0.001$ ;  $DF = 4$ ). Tukey HSD test was used to compare the samples ( $MS = .08983$ ,  $df = 35.000$ ) (Figure 1), and the results showed that cell adhesion on the native, BP 24, and BP 48 matrices was significantly different when compared to negative controls (Figure 1). The greatest cell adhesion was observed on the



**Figure 2.** Von Kossa staining. Native matrices after (A) 5, (B) 15, and (C) 21 days of culture in mineralization medium. Note the calcium deposits mainly at the matrix surfaces. BP 24 matrices after (E) 15 and (F) 21 days of culture in mineralization medium. (E) Calcium deposits were detectable after 15 days in culture. BP48 matrices after (H) 5, (I) 15, and (J) 21 days of culture in mineralization medium. Note the strong staining at the matrix surfaces. (D) Native, (G) BP24, and (K) BP48 matrices after 21 days of culture in Whitson's DMEM medium. None of the samples were mineralized.

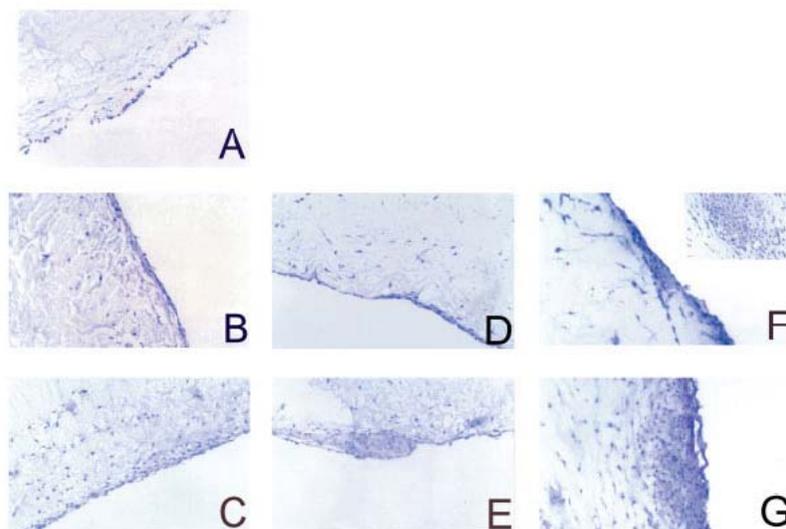
native matrices, which was even higher than the positive control ( $p < 0.005$ ). All samples except the native matrices were not significantly different from the positive control ( $p < 0.005$ ).

#### Noncontinuous Fetal Bovine Osteoblast Cell Line Assays

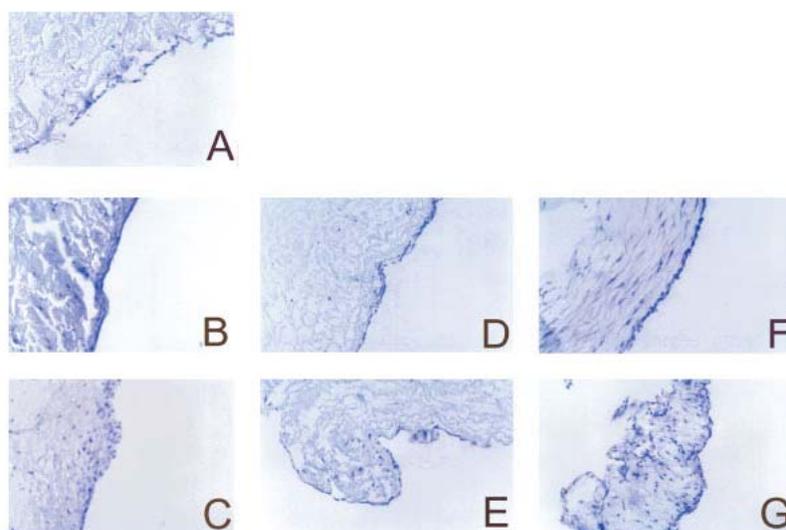
When samples were kept in common media (Whitson's DMEM), mineralization was not seen after 21 days in culture [Figure 2(D, G, K)]. When *in vitro* mineralization is stimulated (by the use of Whitson's mineralization medium), the native and BP 48 matrices began this process 5 days earlier than the BP 24 matrix [Figure 2(A, H)]. Mineralization in the native matrices seems to be more homogenous than in BP 48, where it appears to be mostly superficial [Figure 2(B, C, G, H)]. After 21 days, all matrices were mineralized [Figure 2(C, F, J)]. However, greater mineralization is evident in the BP 48 matrices [Figure 2(J)]. The morphological pattern of osteoblast distribution on all samples was similar at the 5-day time point [Figures 3(A) and 4(A)] regardless of the medium used. After 10 days in culture, some differences could be seen. In BP 24, cellular migration to the center of the matrix

seems to be less [Figures 3(D, E) and 4(D, E)] than that observed for the native [Figures 3(B, C) and 4(B, C)] and BP 48 matrices [Figures 3(F, G) and 4(F, G)]. A strong metachromasy could be seen in BP 48 matrices cultured for 21 days in common medium [Figure 3(G)]. When mineralization was stimulated, metachromatic regions in BP 48 matrices seem to exhibit some organization inside the samples [Figure 4(F)]. Treatment of some samples with chondroitinase AC showed that the metachromasy observed was due to chondroitin sulfate production by the osteoblasts [Figure 5(A, B)]. Nevertheless, fewer cells were observed in mineralized BP 48 matrices when compared to BP 48 in common medium [Figures 3(F) and 4(F)].

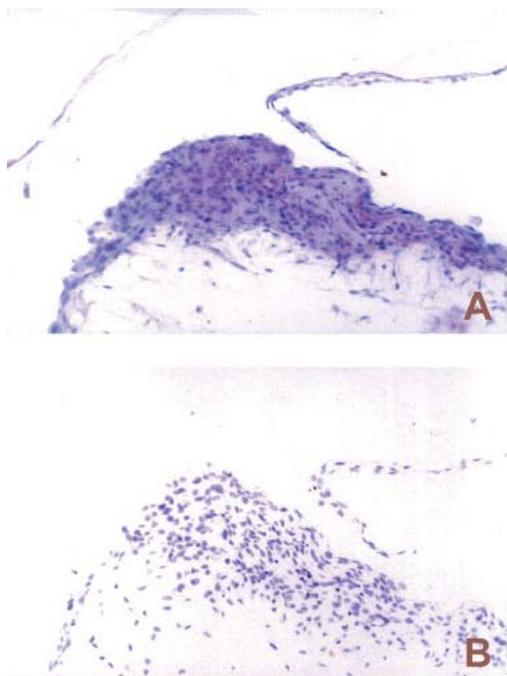
ALP production by osteoblasts in both common and mineralization medium is shown in Figures 6 and 7, respectively. In the common medium, ALP production reaches its peak at the 15th day of culture (Figure 7), while for samples in mineralization medium ALP production peaks at the third day of culture (Figure 6). Moreover, the ALP production of osteoblasts cultured in common medium is sometimes three-fold higher than ALP production of osteoblasts in mineral-



**Figure 3.** Toluidine blue staining of samples cultured in Whitson's DMEM medium. All samples showed the same cellular pattern after 5 days in culture, so for this specific time point only the native matrix is represented. Native matrices after (A) 5, (B) 15, and (C) 21 days of culture. BP 4 matrices after (D) 15 and (E) 21 days of culture. BP 48 matrices after (F) 15 and (G) 21 days of culture. Note the metachromasy on the BP 48 samples. (F) BP 48 center in detail. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com).]



**Figure 4.** Toluidine blue staining of samples cultured in mineralization medium. All samples showed the same cellular pattern after 5 days in culture, so for this specific time point only the native matrix is represented. Native matrices after (A) 5, (B) 15, and (C) 21 days of culture. BP 24 matrices after (D) 15 and (E) 21 days of culture. BP 48 matrices after (F) 15 and (G) 21 days of culture. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com).]



**Figure 5.** Enzymatic detection of chondroitin sulfate by chondroitinase AC. BP 48 matrix cultured on Whitson's DMEM medium. (A) Control and (B) chondroitinase treated. Note the disappearance of the metachromasy after the enzymatic treatment. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com).]

ization medium. In both cases, the enzyme was better expressed when osteoblasts were cultured on the BP 48 matrices (Figures 6 and 7).

## DISCUSSION

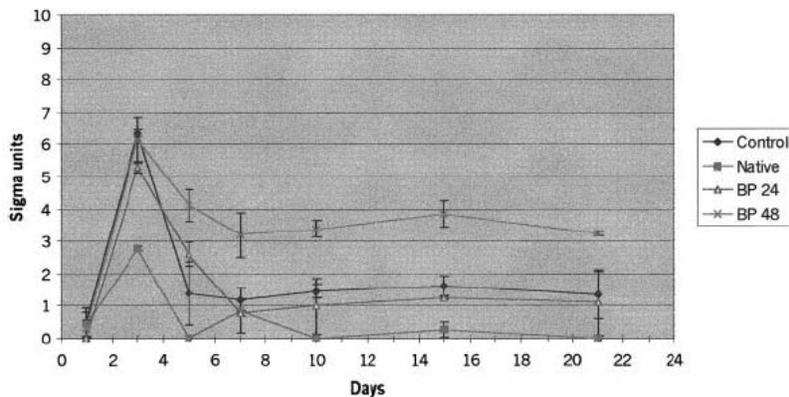
The results showed that the BP 48 matrices present better characteristics for osteoblast differentiation and for stimula-

tion of *in vitro* mineralization, an essential process for *in vitro* bone formation.<sup>26</sup>

The alkaline hydrolysis process to which the BP 24 and BP 48 matrices were submitted causes a restructuring that reassembles the collagen molecular network, opening spaces and pores and creating a spongy structure that favors cellular migration.<sup>5</sup> The pore size and distribution of both BP 24 and BP 48 were previously characterized.<sup>5</sup> Rocha et al.<sup>5</sup> reported that in addition to pores being interconnected there is an heterogeneous variance of pore size in both matrices. BP 24 presents pore sizes from 12–105  $\mu\text{m}$  (mean  $43 \pm 23 \mu\text{m}$ ), while BP 48 has pores between 14–134  $\mu\text{m}$  (mean  $52 \pm 25 \mu\text{m}$ ). The ideal pore size is cell specific. A human osteon measures about 223  $\mu\text{m}$  and some reports have suggested an ideal pore size varying between 100–400  $\mu\text{m}$ .<sup>27</sup> Thus, BP 24 and BP 48 have pores at the lower limit of the ideal pore size as suggested in the literature.

In addition to the size, the pore shape also affects cellular adhesion and proliferation. Different pore topographies may be ideal for bone repair as bone possesses different structures depending on its location and function.<sup>28,29</sup> It is possible that the greater cellular migration and proliferation observed in BP 48 may be related to the variation in pore size, along with the frequent presence of large pores [Figure 3(F, G)]. Another important issue related to porosity is nutrient diffusion into the collagen matrix.<sup>27,30</sup> Although porosity enhances cellular proliferation and differentiation as well as nutrient transportation to and from the center of the collagen matrix, it can adversely affect the mechanical characteristics of the matrix. Increased porosity may also decrease collagen scaffold malleability and tension strength.<sup>30</sup>

When stimulated to mineralize, BP 48 matrices showed a decrease in cellular proliferation [Figure 4(F, G)]. However, it seems to have some kind of organized cellular distribution inside these samples, resembling a circular organization [Figure 4(F)]. It seems that cells are growing and migrating according to the orientation of the fibrils as reported by Rocha et al.<sup>5</sup>



**Figure 6.** ALP production from osteoblasts cultured on matrix samples in mineralization medium.

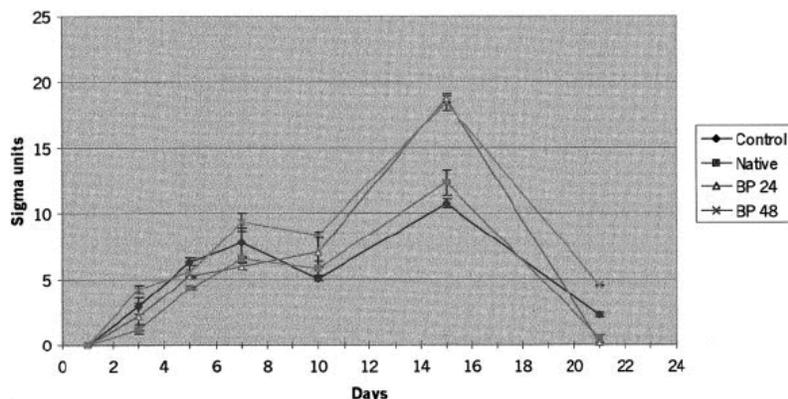


Figure 7. ALP production from osteoblasts cultured on matrix samples in Whitson's DMEM medium.

The metachromasy, observed in some samples [Figures 3(B–G) and 4(B–G)], indicated the presence of negatively charged substances produced by the osteoblasts because matrices without cells were not stained. An increase of suitably close anionic groups offers the possibility, at the cellular level, of an interaction of flattened toluidine blue (TB) molecules. This event triggers the need of a higher energy level to excite the electrons on these chromophores molecules groups (TB), decreasing the absorption band from 625 nm (blue-green stain) to 550 nm (pink stain). This methodology can reveal, even without absorption measurements, an increase of anionic group availability at different physiological stages of the same or different tissues. This can be done by the simple observation of the stain color, which, due to those interactions, may turn from green (basic monomers of TB) to blue and pink (TB molecules piled up).<sup>31</sup> So, the metachromasy of our samples indicates an increase of anionic groups, which for animal cells may indicate the presence of DNA, RNA, acidic sugars, or some glycosaminoglycans (GAGs). Suspecting the production of GAGs, metachromatic samples were stained with alcian blue and the result was positive staining (data not shown). Chondroitin sulfate (CS) is the main GAG in bone, its relative proportion varying with age and species.<sup>32</sup> GAG and collagen are produced during bone mineralization.<sup>33</sup> Bouvier et al.<sup>34</sup> suggested that CS, in association with collagen sponge fibers, promotes *in vitro* mineralization. However, calcification and bone maturation are associated with a decrease in the proteoglycan content of the organic matrix,<sup>35</sup> which is associated with decreased GAGs.<sup>32</sup> The disappearance of metachromasy after treatment of the slides with chondroitinase AC was an evidence of CS production (Figure 5). Our data are in agreement with Hagiwara et al.'s report<sup>36</sup> that the 4-CS isomer (CS with galactosamine residues sulfated in position 4) increases significantly in the proliferative tissue in contact with the mineralization zone. In our matrix samples, CS is evident around the proliferative cellular zone at the matrix surfaces, where Von Kossa staining showed that mineralization is stronger (Figure

2). Moreover, despite the lack of clinical data, during osteogenesis CS induced an increased capacity of the injured bone to regenerate,<sup>33</sup> as well as increased calcium pool availability. This suggests that osteoblasts cultured on native and BP 48 matrices may better promote bone regeneration than those cultured on BP 24 [Figures 3(D, E) and 4(D, E)].

Further, the negative charge on the collagen following the alkaline treatments may also affect cellular behavior. The alkaline treatments modified the collagen fibril assembly, thus changing the way bound sites are exposed.<sup>5</sup> Osteoblasts bind directly to collagen through interaction of integrin-RGD sites (-arg-gly-asp-).<sup>37</sup> It is possible that the 3D collagen reassembly may have affected the RGD site distribution on the molecular configuration of the new matrices. Bet et al.<sup>38</sup> proposed that new motifs described as the minimal active recognition sequence for  $\alpha_2\beta_1$  integrins binding of platelets, fibroblasts, and other cells with type I collagen would arise as a result of Asn and Gln carboxyamide side-chain hydrolysis. However, cellular interaction with these negative charges may cause a series of morphological modifications. These, in turn, can cause changes in metabolism. Reports have shown that osteoblasts cultured on substrates that presented both negative and positive charges may demonstrate characteristics compatible with an active metabolism when in contact with negative charges, while they are inactive when in contact with positive charges.<sup>39</sup> This fact may partially explain the varying adhesion patterns we saw in the different matrix types (Figure 1). The differences in the production of ALP by the osteoblasts may also be related to variations of activity (Figures 6 and 7). However, the influence of carboxylic groups on adhesion is still controversial, although they seem to decrease cell spreading and adhesion on substrates. These carboxylic groups could also be related to the increased adhesion pattern observed for the native matrices.

Osteoblasts cultured on the BP 24 and BP 48 matrices showed increased ALP production when cultured in common medium (Figure 7). When stimulated to mineralize, osteoblasts on the BP 24 matrix significantly decreased ALP

production when compared to those on the more anionic collagen matrix, BP 48 (Figure 6). There is good evidence, both *in vitro*<sup>40</sup> and in studies of ALP mutations causing hypophosphatasia in man,<sup>41</sup> that ALP may be involved in the mineralization process. However, its preosteoblast expression, previous to the need for mineralization and the expression of some molecules directly involved in the mineralization process, such as osteocalcin and bone sialoprotein,<sup>42</sup> may refute this idea. ALP is a membrane-bound enzyme anchored on the external side of the cytoplasmic membrane via a glycosyl phosphatidylinositol anchor. It is thought to be involved in transmembrane signaling,<sup>43</sup> promoting crystal formation at the matrix vesicles and removing nucleator inhibitors. Further, ALP is believed to play a role in osteoblast adhesion, migration, and differentiation.<sup>44</sup>

The results of this study show a connection between ALP activity and the mineralization process (Figures 6 and 7). When in normal culture conditions (common medium), the ALP production by osteoblasts is higher than that found for the mineralized samples, peaking at the 15th culture day. Nevertheless, even after the 21st day the samples did not show any mineralization focus (Figure 2) and ALP production is drastically reduced (Figure 7). This may be due to the fact that the medium in which the matrix samples were cultured did not contain  $\beta$ -glycerophosphate and calcium, which promote mineralization of the osteoblasts. Therefore, the osteoblasts increased ALP production in an effort to stimulate calcium deposition on the matrix samples. This process reaches its peak after 15 days in the common medium and ALP production declines after this time point (Figure 7). However, when the medium provides calcium (mineralizing medium) ALP production reaches a maximum in 3 days (Figure 6). Mineralization could be observed at the fifth culture day (Figure 2), suggesting ALP participation in the process. Once the mineralization began, ALP production decreased and remained stable for the evaluated period (Figure 6). Once more, the BP 48 matrix seemed to favor higher ALP production by osteoblasts stimulated to mineralize (Figure 6), which may be related to the higher degree of mineralization of these samples (Figure 2).

While further testing should be done in an effort to better evaluate the BP 24 and BP 48 efficiency, it seems that these matrices present significant characteristics favoring their use in bone repair. Although some of the results presented here are qualitative (cytochemistry), it is a helpful and confiable tool when screening for new biomaterials. Besides being an inexpensive method, it is objective as well as supplementary to the morphological analysis. However, on the basis of the data obtained on cell adhesion, ALP and extracellular matrix macromolecule production, as well as the cellular proliferation observed with histological analysis, we may conclude that the materials tested reveal a sufficient biocompatibility level for bone repair. Further, the evidence of some connection between ALP activity and the mineralization process should be emphasized. BP 48 presented the most promising results stimulating *in vitro* mineralization, ALP production, and possible osteoblast differentiation.

This work was supported by grants from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) Ph.D. fellowship of Patricia L. Moreira. The authors thank Drs. Q. Kay Kang and Kathleen Hogan for their help in the project, Kylie Martin and Dr. Mary Anne Heidi Dolder for their careful help in revising the article, and Dr. André Victor Lucci Freitas for his help with the statistical analysis.

## REFERENCES

1. Ratner BD. New ideas in biomaterials science—a path to engineered biomaterials. *J Biomed Mater Res* 1993;27:837–850.
2. Alper M, Calvert PD, Frankel R, Rieke P, Tirrel D. *Materials synthesis based on biological processes*. Pittsburgh, PA: Materials Research Society; 1991.
3. Boskly A. Mineralization, structure and function of bone. In: Seibel MJ, Robins SP, Bilezikian SP, editors. *Dynamics of bone and cartilage metabolism*. San Diego, CA: Academic Press; 1999. p 153–164.
4. Du C, Cui FZ, Zhu XD, de Groot K. Three-dimensional nano-HAp/collagen matrix loading with osteogenic cells in organ culture. *J Biomed Mater Res* 1999;44:407–415.
5. Rocha LB, Goissis G, Rossi MA. Biocompatibility of anionic collagen matrix as scaffold for bone healing. *Biomaterials* 2002; 23:449–456.
6. McCarthy JB, Vachhani B, Iida J. Cell adhesion to collagenous matrices. *Biopolymers* 1996;40:371–381.
7. Friess W. Collagen—biomaterial for drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm* 1998;45:113–136.
8. Werkmeister JA, Ramshaw JA. Collagen-based biomaterials. *Clin Mater* 1992;9(3/4):137–138.
9. Alberts B, Bray D, Lewis S, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Molecular biology of the cell*, 3rd ed. New York: Garland Publishing; 1994.
10. Takaoka K, Nakahara H, Yoshikawa H, Masuhara K, Tsuda T, Ono K. Ectopic bone induction on and in porous hydroxyapatite combined with collagen and bone morphogenetic protein. *Clin Orthop* 1988;234:250–254.
11. LeGeros RZ. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clin Orthop* 2002;395:81–98.
12. Zellin G, Hedner E, Linde A. Bone regeneration by a combination of osteopromotive membranes with different BMP preparations: a review. *Connect Tissue Res* 1996;35(1–4):279–284.
13. Nakagawa T, Tagawa T. Ultrastructural study of direct bone formation induced by BMPs—collagen complex implanted into an ectopic site. *Oral Dis* 2000;6:172–179.
14. van Susante JLC, Pieper J, Buma P, van Kuppevelt TH, van Beuningen H, van Der Kraan PM, Veerkamp JH, van den Berg WB, Veth RPH. Linkage of chondroitin-sulfate to type I collagen scaffolds stimulates the bioactivity of seeded chondrocytes *in vitro*. *Biomaterials* 2001;22:2359–2369.
15. Lacerda C, Plepis AMG, Goissis G. Selective hydrolysis of carboxiamides of asparagine and glutamine residues of collagen: preparation and characterization of anionic collagen matrices for biomaterial applications. *Quim Nova* 1998;21:267–271.
16. Plepis AMD, Goissis G, Das-Gupta DK. Dielectric and pyroelectric characterization of anionic and native collagen. *Polym Eng Sci* 1996;36:2932–2938.
17. Fukada E. Piezoelectricity of natural biomaterials. In: *Medical applications of piezoelectric polymers*, vol. 5. New York: Gordon and Breach; 1988. p 1–26.
18. ISO 10993-5 I. (E) Biological evaluation of medical devices—part 5—tests for cytotoxicity: *in vitro* methods. 1992.
19. Kirkpatrick CJ. Biological testing of materials and medical devices—a critical view of current and proposed methodologies for biocompatibility testing: cytotoxicity *in vitro*. *Regulatory Affairs* 1992;4:13–32.

20. Goissis G, Piccirilli L, Goes J, Plepis A, Das-Gupta D. Anionic collagen: polymer composites with improved dielectric and rheological properties. *Artif Organs* 1998;22:203–209.
21. Whitson SW, Whitson MA, Bowers DE Jr, Falk MC. Factors influencing synthesis and mineralization of bone matrix from fetal bovine cells grown in vitro. *J Bone Mineral Res* 1992;7:727–741.
22. Dekker A, Panfil C, Valdor M, Pennartz G, Richter H, Mittermayer C, Kirkpatrick CJ. Quantitative methods for in vitro cytotoxicity testing of biomaterials. *Cells Mater* 1994;4:101–112.
23. Mello MLS, Vidal BC. *Práticas de biologia celular*. São Paulo, Brazil: Edgard Bluncher Ltda.; 1980.
24. Pearse AG. *Analytical technology histochemistry—theoretical and applied*, 4th ed., vol. 2. New York: Churchill Livingstone; 1985.
25. Heinegard D, Sommarin Y. Isolation and characterization of proteoglycans. *Meth Enzymol* 1987;144:319–372.
26. Sikavitsas VI, Temenoff JS, Mikos AG. Biomaterials and bone mechanotransduction. *Biomaterials* 2001;22:2581–2593.
27. Simske SJ, Ayers RA, Bateman TA. Porous materials for bone engineering. In: Liu D-M, Dixit V, editors. *Porous materials for tissue engineering*, vol. 250. Switzerland: Trans Tech. Publications; 1997. p 151–182.
28. Holy CE, Dang SM, Davies JE, Shoichet MS. In vitro degradation of a novel poly(lactide-co-glycolide) 75/25 foam. *Biomaterials* 1999;20:1177–1185.
29. Burg KJ, Mikos AG, Beiler RJ, Culberson CR, Greene KG, Loeb sack AB, Roland WD, Wyatt S, Halberstadt CR, Holder WD Jr, Burg TC. Particulate selection and importance to cell to cell adhesion in solvent-cast, particulate-leached polymeric constructs. In: *Proceedings of the 25th Annual Meeting of the Society of Biomaterials*, Providence, RI. 1999.
30. Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* 2000;21:2529–2543.
31. Hayat MA. Staining and related reagents. In: Hayat MA, editor. *Stains and cytochemical methods*. New York: Plenum Press; 1993. p 73.
32. Hardingham T. Proteoglycans and glycosaminoglycans. In: Seibel MJ, Robins SP, Bilezikian JP, editors. *Dynamics of bone and cartilage metabolism*. San Diego: Academic Press; 1999. p 71–81.
33. Bali JP, Cousse H, Neuzil E. Biochemical basis of the pharmacologic action of chondroitin sulfate on the osteoarticular system. *Sem Arthritis Rheum* 2001;31:58–68.
34. Bouvier M, Couble ML, Hartmann DJ, Gauthier JP, Malgloire H. Ultrastructural and immunocytochemical study of bone-derived cell cultures in three-dimensional matrices: influence of chondroitin-4-sulfate on mineralization. *Differentiation* 1996;158:25–32.
35. Prince CW, Rahemtulla F, Buttler WT. Incorporation of [<sup>35</sup>S] sulfate into glycosaminoglycans by mineralized tissues in vivo. *Biochem J* 1984;224:941–945.
36. Hagiwara H, Aoki T, Yoshimi T. Immunoelectron microscopic analysis of chondroitin sulfates during calcification in the rat growth plate cartilage. *Histochem Cell Biol* 1995;103:213–220.
37. Horton MA, Townsend P, Nesbitt S. Cell surface attachment molecules in bone. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, editors. *Principles of bone biology*. San Diego, CA: Academic Press; 1996. p 217–230.
38. Bet M, Goissis G, Vargas S, Selistre-de-Araujo H. Cell adhesion and cytotoxicity studies over polyanionic collagen surfaces with variable negative charge and wettability. *Biomaterials* 2003;24:131–137.
39. Davies JE, Causton B, Bovell Y, Davy K, Sturt CS. The migration of osteoblasts over substrata of discrete surface charge. *Biomaterials* 1986;7:231–233.
40. Bellows CG, Aubin JE, Heersche JNM. Initiation and progression of mineralization of bone modules formed in vitro: the role of alkaline phosphatase and organic phosphate. *Bone Miner* 1991;14:27–40.
41. Whyte MP. Hypophosphatasia: Nature's window on alkaline phosphatase function in man. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, editors. *Principles of bone biology*. San Diego, CA: Academic Press; 1996. p 951–968.
42. Malaval L, Modrowski D, Gupta AK, Aubin JE. Cellular expression of bone-related proteins during in vitro osteogenesis in rat bone marrow stromal cell cultures. *J Cell Physiol* 1994;158:555–572.
43. Turksen K, Aubin JE. Positive and negative immunoselection for enrichment of two classes of osteoprogenitor cells. *J Cell Biol* 1991;114:373–384.
44. Hui M, Hu M, Tenenbaum HC. Changes in cell adhesion and cell proliferation are associated with expression of tissue non-specific alkaline phosphatase. *Cell Tissue Res* 1993;274:429–437.



***Characterization of Cellular Differentiation and Mineralization on Anionic  
Collagen Scaffolds for Bone Repair***

***Patrícia L. Moreira<sup>1</sup>, Fernando Galembeck<sup>2</sup>, Arnaldo Rodrigues Santos Jr.<sup>1,3</sup>,***

***Selma Candelária Genari<sup>1,3</sup>***

<sup>1</sup> Department of Cellular Biology, Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP), P.O.Box 6109, 13084-971, Campinas-SP, Brazil

<sup>2</sup> Department of Physical-Chemical, Institute of Chemistry, State University of Campinas (UNICAMP), P.O.Box 6159, 13084-971, Campinas-SP, Brazil

<sup>3</sup> University Regional Center of Espírito Santo do Pinhal (CREUPI), P.O. Box 05, Espírito Santo do Pinhal - SP, Brazil

Correspondence to: Patrícia L. Moreira, e-mail: [luzmoreira@hotmail.com](mailto:luzmoreira@hotmail.com)

This work was supported by grants from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) PhD. fellowship of Patrícia L. Moreira. The authors thank Millennium Institute for Complex Materials (PADCT/CNPq) and Mrs. Maria do Carmo for the EDS analysis.

## **INTRODUCTION**

The main goal of a fracture repair not only originated from accident but also from degenerative disease or an osteomy, is the functional and anatomical restoration of the bone. Bone fracture results in the loss of its mechanical stability, bony tissue discontinuation and partial destruction of the blood supplies. Its repair is a complex process of tecidual regeneration, resulting in stabilization of the fragments, consolidation by bone binding, reconstruction of the avascular and semi-necrotic fragments and, finally, internal and external remodeling of the neo-formed tissue.

In fracture regeneration without loss of bone mass, the repair process occurs in a biologically determined order. The first step is the stabilization and consolidation through the callus formation in the periphery and inter-fragments, followed by its remodeling, besides re-vascularization and replacement of the necrotic areas. External factors may deeply affect the regeneration process, although tissues act according to biological rules that control cellular proliferation and differentiation as well as the matrix production, which can independently occur despite of external interference, although being influenced by them. However, fractures with bone mass loss need grafts or implants. The later may be used as scaffolds for bone regeneration, interacting with the interface of the receptor fragments and stimulating the process of tecidual restoration. These devices, developed to be implanted, are important biomaterials (1).

Natural polymers, such as collagen (2-4) and elastin (5,6), have been already described as advantageous biomaterials for tissue engineering, presenting the cellular recognition sequence Arg-Gly-Asp (RGD), which will influence cellular adhesion (7). However, these materials on their pure form cannot re-establish the original tissue characteristics.

Collagen is the most abundant protein in the body and is also the most important compound of the extracellular matrix, which determines the size, tension strength

and cellular arrangement of all structures and organs (7-9). It presents several advantages as a biomaterial, such as non-toxicity, biocompatibility, biodegradability and ease re-absorption by the body (10-13), presenting low antigenicity and high tension strength with great affinity for the water. Nonetheless, its purification cost is extremely high and, when isolated, it presents some variability concerning the fibers size, impurities and cross-links density, which establish its structure (14).

Some modifications may be necessary to overcome these drawbacks, which may include the increase of cross-links to improve the tension strength (14-16); the addition of other materials (17-19), growth factors (4,20,21), glycosaminoglycans (22) and other molecules (6,23) to the collagen scaffold. The former also increases mechanical stability, while decreases biodegradability and protects the collagen structure from *in vivo* digestion. This modification in addition to the increase of negative charge and carboxylic groups in the collagen molecule (14,24), have contributed to the improvement of the molecule piezoelectrical properties, which promotes osteogenesis (25).

*In vivo* pilot tests performed with these anionic matrices demonstrated bone formation and low inflammatory response, presenting promising characteristics for bone defects repair (24,26), while the native collagen matrix presented mild to intense inflammatory reaction, associated with re-absorption centers (26). As it is known, cellular interactions with biomaterials, as well as their quality may influence the ability of cells to proliferate and differentiate when in contact with the implant. These interactions are influenced by the material's topography, surface energy, roughness, etc. However, cellular interactions happening on these anionic collagen matrices are not entirely understood and may help justifying the structural modifications at the collagen matrices.

In this study, we examined bovine osteoblasts cultured on anionic collagen scaffolds prepared by use of a hydrolysis treatment for either 24 hours (BP 24) or 48 hours (BP 48). Analysis of the mineralization process was done by Scanning

Electron Microscopy (SEM) and Energy-Dispersive X-Ray Spectrometry (EDS) along with the morphological and terminal differentiation of osteoblastic cells detected by immunocytochemical markers on these anionic collagen membranes in comparison to the native collagen matrix to provide useful information for the understanding of the biological processes responsible for the outstanding *in vivo* experiments (24,26). Moreover, it may show whether the structural modification (alkaline hydrolysis treatment) described in this work contributes to the better biological performance of these collagen matrices in bone repair.

## ***MATERIALS AND METHODS***

### **1. Matrix Acquisition**

Bovine pericardium (BP: Braile Biomédica S/A, São José do Rio Preto-SP, Brazil) was used for preparation of the 3D matrix. The samples were obtained from the Institute of Chemistry of São Carlos, from the University of São Paulo, under supervision of Dr. Gilberto Goissis as described by Lacerda (27) and Goissis (28). Briefly, the alkaline hydrolysis was performed in aqueous dimethylsulfoxide solution containing chloride and sulfate salts. The hydrolysis times were 24h (BP24) and 48h (BP48). Excess salts were removed by extensive washes with 3% boric acid solution, 0.3% EDTA pH11.0 and deionized water, and finally, the matrices were equilibrated in 0.13 mol/L phosphate buffer pH 7.4. The anionic collagen matrices produced had been characterized by thermal analysis, infrared spectroscopy, titration and dielectric properties as described in previous publications (27,28). The samples analyzed were (1) the 3D native anionic collagen/elastin matrices (native – no alkaline hydrolysis treatment) and (2) the 3D anionic collagen/elastin matrices submitted to alkaline hydrolysis treatment for 24 and 48 hours (BP 24 and BP 48, respectively). Following analysis, the samples were cut into small circumferences- circles (6 x 3 mm) and used in the experiments described below.

## 2. Cell Culture

A non-continuous bovine fetal osteoblast culture was obtained from Dr. William Whitson (29) and maintained in the Orthopaedic Research Laboratory at the Medical University of South Carolina (MUSC). The osteoblasts were cultured in Whitson's DMEM with 15% FCS (Sigma) at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> (29). For experimental analysis, a mineralization medium as described by Whitson (29) was also used in the non-continuous cell line culture. It differed from Whitson's DMEM due to the addition of  $\beta$ -glycerophosphate and calcium chloride. The cells were kept in Whitson's DMEM media until the experiment was carried out, when they were cultured with both mediums as described above. The medium was changed every day until the cells reached confluence at about 5-7 days, when they were subcultured. These cells were used in all experiments at passage 4. Cells were cultured on the native, BP24 and BP48 3D matrices in Whitson's DMEM (Sigma) and Whitson's mineralization medium (Sigma), both with 15% FCS (Sigma) for 21 days at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. Cells at an initial concentration of  $1.0 \times 10^5$  cells/ml were added to a 96-well plate (200  $\mu$ l/well) (Corning/Costar) with the matrices. After 4 hours of seeding (for adhesion purpose), the plate to be analyzed with the mineralization medium had the DMEM medium replaced by the mineralization one. At the determined time-points, the matrices were fixed in 4% paraformaldehyde (Sigma) and processed for the techniques described above.

## 3. Scanning Electron Microscopy and Energy Dispersive X-Ray Spectrometry (EDS)

After fixation with 4% paraformaldehyde (Sigma) in 0.1 M phosphate buffer (Merck) pH 7.4 for 30 minutes, the matrices were washed with phosphate buffer, post fixed in 1% osmium tetroxide (Sigma) and dehydrated in an ethanol series. The material was critical point dried (Balzers CPD030) and gold sputtered (Balzers SCD 050). The observation of the specimens was performed in a JEOL JSM-5800 LV

scanning electron microscope fitted with a Noran System Six Model 300 X-Ray spectrometer from Thermo. All experiments were done in triplicate.

#### **4. Transmission Electron Microscopy**

Samples were fixed with 4% paraformaldehyde (Sigma) in 0.1 M phosphate buffer (Merck) pH 7.4 for 30 minutes, post-fixed with 1% osmium tetroxide in the same buffer at 4°C, dehydrated in acetone and embedded in epoxy resin (Embed-812, Electron Microscopy Sciences (EMS), Washington, USA). Ultrathin sections (20-60nm) were stained with 2% uranyl acetate (EMS - 20 minutes) and 2% lead citrate (EMS - 7 minutes) prior to observation with a transmission electron microscope (Leo 906).

#### **5. Osteocalcin Immunocytochemical Detection**

After fixation with 4% paraformaldehyde (Sigma) in 0.1 M phosphate buffer (Merck) pH 7.4 for 30 minutes, the matrices were washed with phosphate buffer and embedded in paraffin (Paraplast, Fisher Scientific). Sections of 5  $\mu\text{m}$  thickness were obtained and they were cleared by regular protocol. The sections were washed in cold PBS (Nutricell Nutrientes Celulares, Campinas, SP, Brazil) and unspecific sites were inactivated by 1% BSA (Sigma) in PBS (Nutricell) for 60 minutes in humid camera. After washing in cold PBS, the primary antibody rabbit anti-human osteocalcin (BT-593, Biomedical Technologies Inc., Stoughton, USA) (1:30 in PBS and 1% BSA) was added to the sections and incubated overnight in the dark at a humid chamber. After gentle removal with cold PBS, the secondary antibody goat anti-rabbit IgG (FITC, BT-557, Biomedical Technologies Inc.) (1:50 in PBS) was added to the sections and incubated for 1 hour in the dark. Control samples differed from the samples' ones due to the lack of primary antibody. The analysis and photographic documentation were performed in an Olympus IX50 microscope, with FITC filter for fluorescein.

## **RESULTS**

### **1. Scanning Electron Microscopy and Energy Dispersive Spectrometric (EDX) Analysis**

On matrices kept in Whitson's DMEM medium, we could observe cells with an irregular morphology at a confluent multilayer (Fig. 1A-C). The majority of these cells have a polygonal or elongated flattened morphology maintained during all the culture period. At the cell surface, it was found a small quantity of vesicles and/or microvilosities. They also presented evident phyllopodia and lamellopodia. On matrices kept in mineralization medium (Fig. 1D-F), we could verify multilayered polygonal/elongated confluent cells with richer amount of vesicles and/or microvilosities. Several spots of spherical calcium crystals deposits were observed at the native and BP 48 matrices (Fig. 1D, F). The mapping of the elements shows that phosphorus (P) and calcium (Ca) are found concomitantly at the same areas in all matrices (Figure 2) and, the X-Ray spectra of the samples kept in the mineralization medium yields a Ca/P rates of 1.46 for BP48, 0.10 for BP24 and 2.26 for the native collagen (Table 1, Figure 3). On the other hand, the samples kept in Whitson's DMEM medium presented a Ca/P rate of 0.05, 0.10 and 0.27, respectively (Table 1, Figure 4).

### **2. Transmission Electron Microscopy**

All matrices presented similar ultrastructure when cultured on Whitson's DMEM (Fig. 5a) and mineralization (Fig. 5b) medium. Collagen matrices presented fibers arranged in layers that tended to run perpendicular to the parallel of the section (Fig. 5a). At higher magnifications, when a parallel plane of the section was obtained, the collagen showed a regular banding pattern. When mineralization nutritional conditions were supplied, there were some electron dense materials accumulated on the matrices (Fig. 5b). Cells could be found mainly at the matrices'

surfaces (Fig. 5c, d) and presented several phyllopodia within the matrices (Fig. 5f), mostly perpendicular to the plane of the section. Their chromatins were not condensed (Fig. 5c), indicating their active production of RNA. Vesicles being actively expelled could also be seen at the cells'cytoplasmatic membrane (Fig. 5c, e).

### **3. Osteocalcin Immunocytochemical Detection**

On matrices kept in Whitson's DMEM medium (Fig. 6A, C, E), osteocalcin could be evidently observed at the BP48 matrix's surface (Fig. 6E), although no mineral deposition was found by SEM and EDS (Fig. 1, 2, 3 and Table 1). When the medium favors the mineralization, osteocalcin expression could be observed in all matrices'surfaces (Fig. 6B, D, F, G) exactly at the mineralization front (30). Still, BP48 did show a more evident expression of this protein (Fig. 6F, G).

## **DISCUSSION**

According to cell kinetics based on several studies (31, 32), four successive morphological steps of bone nodule formation can be distinguished: (a) cell proliferation with formation of multicellular layers; (b) cell surface morphological changes with cell differentiation; (c) cell activity with matrix formation and maturation and cell inclusion processes; and (d) woven bone matrix mineralization with formation of active bone surface and mature osteocytes. However, these steps are repeated around the nodule as long as it is developing and occurs concomitantly, but at different locations, during the bone nodule development. Osteoblast cultured on all matrices proliferated, forming multilayers that could be seen by SEM and light microscopy as previously reported by our group (30). At day 5, osteoblasts could be seen forming multilayers on native and BP48 (data not shown). However, at day 10, these differences did not persist and all matrices allowed osteoblast proliferation in multilayers.

During this phase, cell activity seems to be more involved in metabolism related to proliferation to create a three-dimensional microenvironment, secondarily allowing cell differentiation expression (33). At the end of this stage when a permissive microenvironment was created by a three-dimensional cell organization, cells characterized by morphological modifications and alkaline phosphatase activity as previously reported by our group (30) start expressing non-collagenic proteins, such as osteocalcin. Osteocalcin, also known as bone Gla protein, is a vitamin K-dependent, calcium binding protein which is a major component of the noncollagenous bone matrix (34). It is synthesized by active mature osteoblasts in bone, with a small amount produced by odontoblasts in dentin, and hypertrophic chondrocytes (34). The function of osteocalcin is unclear, but it is thought to be related to bone mineralization, because it specifically interacts with calcium from hydroxyapatite (HA), probably regulating the growth of HA crystals. Cells at the matrices' surfaces were positive to osteocalcin (OC) production, despite being a diffuse labeling for native and BP 24 matrices. OC-positive matrices' surfaces were also positive to Von Kossa staining (30) and a biological reason can be proposed for this heavy labeling of the mineralized tissue (front). The affinity of OC for the HA and the presence of the mineral as a stabilizing element of this non-collagen protein may account for this observation. It is also possible that the relative faint labeling in BP24 matrix may be related to the fact that part of the protein released by the cells are degraded in the extracellular compartment unless they are stabilized in a defined conformation with other proteins or mineral elements in the mineralizes matrix. The vesicles observed at the osteoblasts' membranes may be also indicative of active production of OC. Moreover, its chromatin indicates that these osteoblasts are producing RNA, which could be promptly translated into protein, with direct participation of endoplasmatic reticulum and Golgi apparatus (Fig. 5e). Even though these vesicles could be seen in the osteoblasts from the matrices kept in common medium, they were much more evident and numerous at matrices kept in mineralization medium.

EDS analysis of the matrices showed that BP24 presented a higher content of P in all samples (mineralized or not), which suggests that we are in fact, measuring some other material already inserted into the collagen matrix. This result was quite similar to the ones for BP48 kept in common medium. Nevertheless, mineralized BP 48 matrix presented a Ca/P ratio of 1.46, nearly to the stoichiometry ratio of HA, which may be interpreted as a poorly crystallised form of HA, similar to that of mineralized fetal bone (35). Ca/P ratio higher than 1.67, which is typical of bovine bone HA (36), could only be verified at the native matrix kept in mineralization medium. However, our results should be normalized by the carbon ratio. This should be done because as the samples were coated by gold, this element did interfere with our measurements. Gold coating could not be avoided because the samples were all organic, which does not allow a carbon coating. When this normalization is done, Ca/P ratio of mineralized native scaffolds becomes closer from our results for mineralized BP48. Nonetheless, the calcium excess in this sample could be due to the fact that native collagen presents more calcium-binding sites and this fact may be also added to the HA deposition, which may have also happened. Moreover, our EDS analysis did not have any pattern because it would be impossible to set it under the same experimental model: HA on collagen matrix due to a biological process.

The medium supplemented with  $\beta$ - glycerophosphate ( $\beta$ GP) promotes mineralization because it serves as inorganic phosphate (Pi) donor for calcium phosphate deposition. However, mineralization depends on alkaline phosphatase (ALP)-mediated release of Pi from  $\beta$ GP. Results from our previous study (30) had shown that ALP production by osteoblasts kept in mineralization medium peaked after 3-days culture, while ALP production by osteoblasts kept in common medium peaked at day 15 without any mineral deposition. This was confirmed by EDS analysis of the samples kept in Whitson's DMEM medium (Table 1, Figure 3) and by Von Kossa staining of the matrices kept in mineralization medium, which showed positive staining after 5-days culture (30).

The next step after the osteoblast differentiation process is characterized by the active synthesis of matrix by the cells. SEM analysis showed that thin new filaments were being deposited on the cells (Fig. 1D, F). These are probably new collagen fibrils. Unfortunately, all matrices were composed of collagen I type, what makes its detection impossible by immunocytochemistry or conventional techniques. However, it seems highly probable that these osteoblasts are producing collagen since their chromatin is not condensed and they are actively expelling something by means of their vesicles. Moreover, collagen is one of the most abundant proteins produced by osteoblasts. Nevertheless, it may be necessary some refined technique to verify this hypothesis. On our previous study (30), we also verified the production of chondroitin sulfate (CS), mainly by BP48 matrices. CS can constitute versican, which is present in early stages of bone formation, and by association with hyaluronan, may demarcate space that will ultimately become mineralized (37). It may also compose decorin and biglycan, which bind to collagen and growth factors due to their leucine-rich repeat sequence (37). It is not clear if they play a role in matrix mineralization, but their localization in osteoid, and in the case of biglycan in osteocytic lacunae, is suggestive of a role in bone metabolism. Finally, in a small proportion, CS production may be also related to the vesicles observed by TEM (Fig. 5).

In summary, the present study shows that the sequential expression of ALP, OC and CS is similar to the known protein expression during *in vivo* osteogenesis. We found that OC was initially expressed during osteoblast differentiation and, it was associated with the mineralized process, although various density distributions are observed between the matrices kept in mineralization medium. Our results showed that these anionic collagen matrixes are capable of inducing osteoblastic proliferation until confluence and stratification are reached, regardless of the medium used. However, SEM and EDS analysis showed that native and BP48 matrices kept in mineralization medium had a stronger effect on calcium phosphate deposition, which may corroborate the higher expression of OC on these matrices,

mainly at BP48. Finally, BP48 matrix seems more adequate for small bone repair once it showed better effect at osteoblast differentiation and bone nodule formation compared to the native matrix, which does not possess good tension strength and piezoelectrical properties.

## REFERENCES

1. Hench, L.L., Biomaterials: a forecast for the future. *Biomaterials*, 19, 1419-1423, 1998.
2. Chevallay, B. & Herbage, D., Collagen-based biomaterials as 3D scaffold for cell cultures: applications for tissue engineering and gene therapy. *Med Biol Eng Comput*, 38, 211-218, 2000.
3. Lee, C.H., Singla, A. & Lee, Y., Biomedical applications of collagen. *Int J Pharm*, 221, 1-22, 2001.
4. Reddi, A.H., Morphogenesis and tissue engineering of bone and cartilage: inductive signals, stem cells, and biomimetic biomaterials. *Tissue Eng*, 6, 351-359, 2000.
5. Hafemann, B., Ensslen, S., Erdmann, C., Niedballa, R., Zuhlke, A., Ghofrani, K. & Kirkpatrick, C.J., Use of a collagen/elastin membrane for the tissue engineering of dermis. *Burns*, 25, 373-384, 1999.
6. Lefebvre, F., Gorecki, S., Bareille, R., Amedee, J., Bordenave, L. & Rabaud, M., New artificial connective matrix-like structure made of elastin solubilized peptides and collagens: elaboration, biochemical and structural properties. *Biomaterials*, 13, 28-33, 1992.
7. Alberts, B., Bray, D., Lewis, S., Raff, M., Roberts, K. & Watson, J.D., *Molecular Biology of the Cell*, 3rd ed., Garland Publishing, New York – London, 1994.
8. Burgeson, R.E. & Nimni, M.E., Collagen types. Molecular structure and tissue distribution. *Clin Orthop*, 250-272, 1992.
9. Haralson, M.A. & Hassel, J.R., The extracellular matrix - an overview. In: M.A. Haralson & J.R. Hassel (eds.), *Extracellular Matrix: a practical approach, The Practical Approach Series*, pp. 1-30, Oxford University Press Inc., New York, 1995.

10. Friess, W., Collagen--biomaterial for drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm*, 45, 113-136, 1998.
11. Maeda, M., Tani, S., Sano, A. & Fujioka, K., Microstructure and release characteristics of the minipellet, a collagen-based drug delivery system for controlled release of protein drugs. *J Control Release*, 62, 313-324, 1999.
12. Sano, A., Hojo, T., Maeda, M. & Fujioka, K., Protein release from collagen matrices. *Adv Drug Deliv Rev*, 31, 247-266, 1998.
13. Werkmeister, J.A. & Ramshaw, J.A., Collagen-based biomaterials. *Clin Mater*, 9, 137-138, 1992.
14. Goissis, G., Marcantonio, E., Jr., Marcantonio, R.A., Lia, R.C., Cancian, D.C. & de Carvalho, W.M., Biocompatibility studies of anionic collagen membranes with different degree of glutaraldehyde cross-linking. *Biomaterials*, 20, 27-34, 1999.
15. Singh, M.P., Stefko, J., Lumpkin, J.A. & Rosenblatt, J., The effect of electrostatic charge interactions on release rates of gentamicin from collagen matrices. *Pharm Res*, 12, 1205-1210, 1995.
16. Suh, H., Park, J.C., Han, D.W., Lee, D.H. & Han, C.D., A bone replaceable artificial bone substitute: cytotoxicity, cell adhesion, proliferation, and alkaline phosphatase activity. *Artif Organs*, 25, 14-21, 2001.
17. Suzuki, S., Kawai, K., Ashoori, F., Morimoto, N., Nishimura, Y. & Ikada, Y., Long-term follow-up study of artificial dermis composed of outer silicone layer and inner collagen sponge. *Br J Plast Surg*, 53, 659-666, 2000.
18. Takaoka, K., Nakahara, H., Yoshikawa, H., Masuhara, K., Tsuda, T. & Ono, K., Ectopic bone induction on and in porous hydroxyapatite combined with collagen and bone morphogenetic protein. *Clin Orthop*, 250-254, 1988.
19. Tan, W., Krishnaraj, R. & Desai, T.A., Evaluation of nanostructured composite collagen--chitosan matrices for tissue engineering. *Tissue Eng*, 7, 203-210, 2001.
20. Kimura, M., Zhao, M., Zellin, G. & Linde, A., Bone-inductive efficacy of recombinant human bone morphogenetic protein- 2 expressed in *Escherichia coli*: an experimental study in rat mandibular defects. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*, 34, 289-299, 2000.
21. Zellin, G., Hedner, E. & Linde, A., Bone regeneration by a combination of osteopromotive membranes with different BMP preparations: a review. *Connect Tissue Res*, 35, 279-84, 1996.

22. van Susante, J.L.C., Pieper, J., Buma, P., van Kuppevelt, T.H., van Beuningen, H., van Der Kraan, P.M., Veerkamp, J.H., van den Berg, W.B. & Veth, R.P.H., Linkage of chondroitin-sulfate to type I collagen scaffolds stimulates the bioactivity of seeded chondrocytes in vitro. *Biomaterials*, 22, 2359-2369, 2001.
23. Doillon, C.J. & Silver, F.H., Collagen-based wound dressing: effects of hyaluronic acid and fibronectin on wound healing. *Biomaterials*, 7, 3-8, 1986.
24. Rocha, L.B., Goissis, G. & Rossi, M.A., Biocompatibility of anionic collagen matrix as scaffold for bone healing. *Biomaterials*, 23, 449-456, 2002.
25. Fukada, E., Piezoelectricity of natural biomaterials, *In: Medical Applications of Piezoelectric Polymers*. Vol. 5, pp. 1-26, Gordon and Breach Science Pub., New York, 1988.
26. Rosa, F.P., Lia, R.C.C., Souza, K.O.F., Goissis, G. & Marcantonio Jr., E., Tissue response to polyanionic collagen:elastin matrices implanted in rat calvaria. *Biomaterials*, 24, 207-212, 2003.
27. Lacerda, C., Plepis, A.M.G. & Goissis, G., Selective hydrolysis of carboxiamides of asparagine and glutamine residues of collagen: preparation and characterization of anionic collagen matrices for biomaterial applications. *Quim Nova* 21, 267-271, 1998.
28. Goissis, G., Piccirilli, L., Goes, J., Plepis, A. & Das-Gupta, D., Anionic collagen: polymer composites with improved dielectric and rheological properties. *Artif Organs* 22, 203-209, 1998.
29. Whitson, S.W., Whitson, M.A., Bowers Jr, D.E. & Falk, M.C., Factors influencing synthesis and mineralization of bone matrix from fetal bovine cells grown in vitro. *J Bone Mineral Res* 7, 727-741, 1992.
30. Moreira, P.L., An, Y.H., Santos Jr., A.R., Genari, S.C., *In Vitro* analysis of anionic Collagen scaffolds for Bone Repair, *J Biomed Mater Res (App Biomater)* 71B, 229-237, 2004.
31. Malaval, L., Liu, F., Roche, P., Aubin, J.E., Kinetics of osteoprogenitor proliferation and osteoblast differentiation in vitro. *J Cell Biochem*, 74, 616-627, 1999.
32. Karsenty, G., Bone formation and factors affecting this process. *Matrix Biol*, 19, 85-89, 2000.
33. Nefussi, J.R., Brami, G., Modrowski, D., Obœuf, M., Forest, N., Sequential expression of bone matrix proteins during rat calvaria osteoblast differentiation and bone nodule formation in vitro, *J Histochem Cytochem* 45, 493-503, 1997.

34. Gundberg, C.M., Matrix proteins, *Osteoporos Int*, 14, 37-42, 2003.
35. Glimcher, M.J., Recent studies of the mineral phase in bone and its possible linkage to the organic matrix by protein-bound phosphate bonds. *Philos Trans R Soc Lond (Biol)*, 304, 479-508, 1984.
36. Joschek, S., Nies, B., Krotz, R., Gopferich, A., Chemical and physicochemical characterization of porous hydroxyapatite ceramics made of natural bone. *Biomaterials*, 21, 1645-1658, 2000.
37. Robey, P.G., Bianco, P., Termine, S.D., The cell Biology and molecular biochemistry of bone formation. *In: Favus, M.J., Coe, F.L., Disorders of Mineral Metabolism*, Raven Press, New York, pp. 241-263, 1992.

**TABLE 1**

**Table 1 – Atomic concentration (%) of elements detected on the different samples**

Samples Elements	Native		BP 24		BP 48	
	Co	M	Co	M	Co	M
C	54.94	20.39	41.80	46.98	74.91	34.15
P	0.40	2.16	1.17	2.94	2.10	12.47
Ca	0.11	4.90	0.12	0.32	0.12	18.26

Abbreviations: Co – common medium (Whitson's DMEM) and M – mineralization medium (Whitson's meralization medium). C – carbon, P – phosphorus, Ca – calcium.

Figure 1

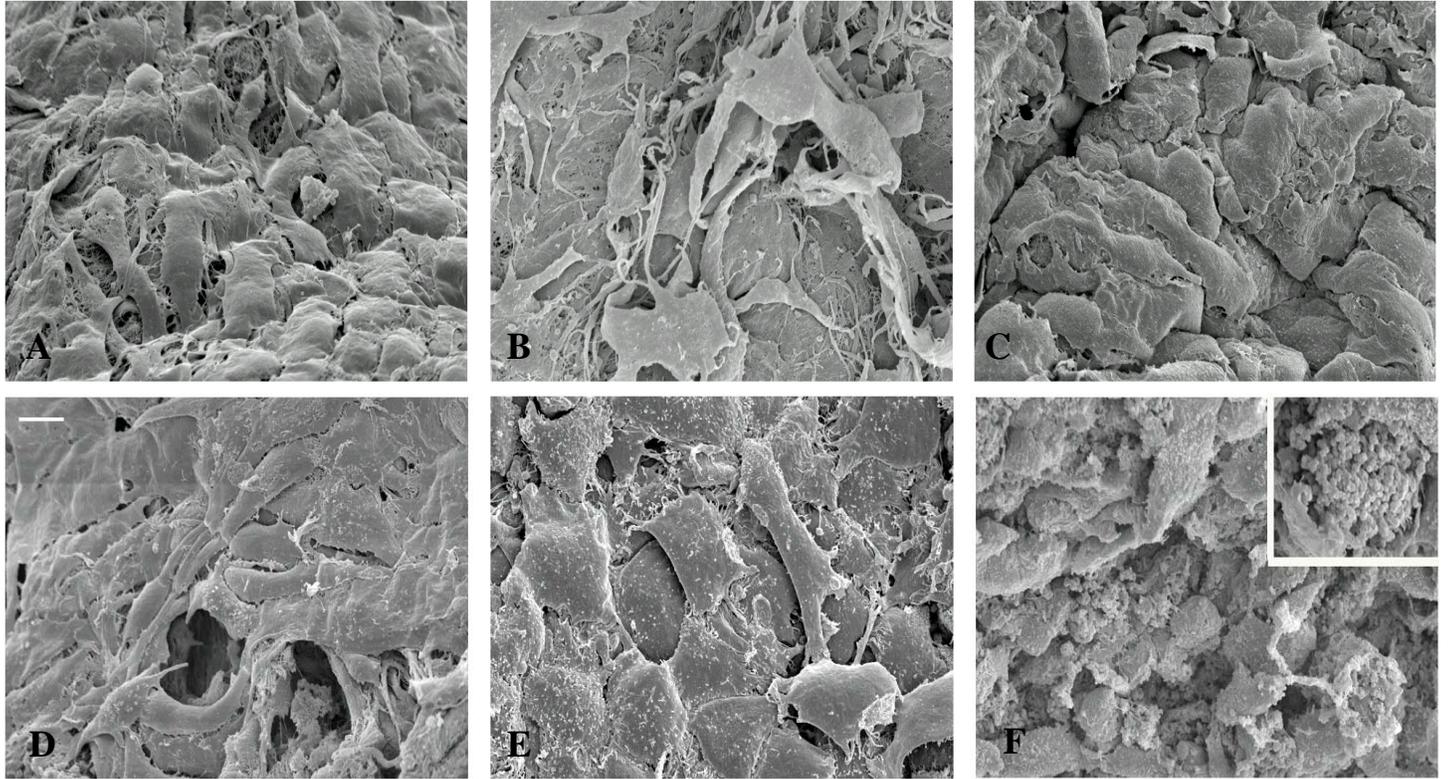


Figure 2

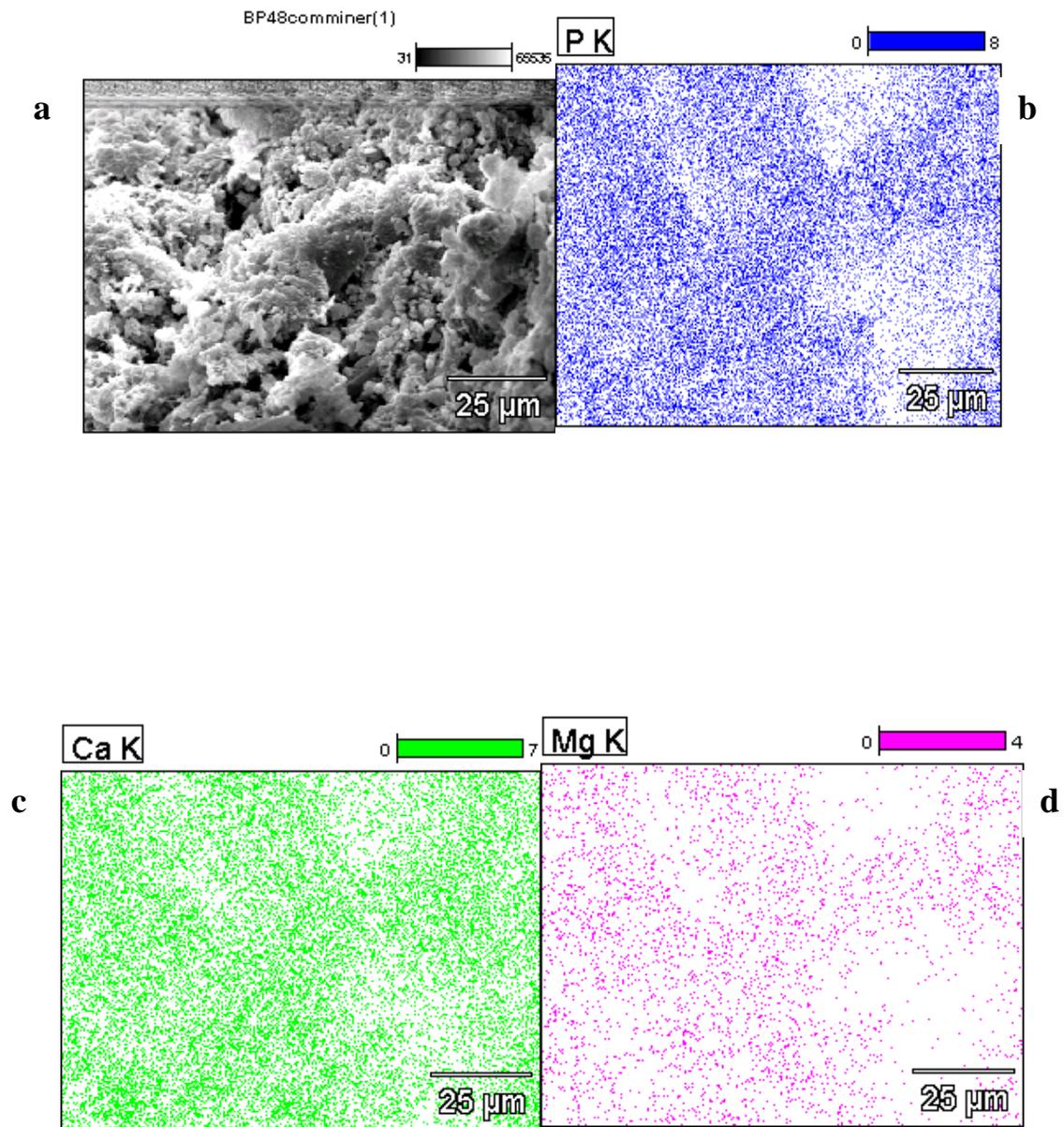


Figure 3

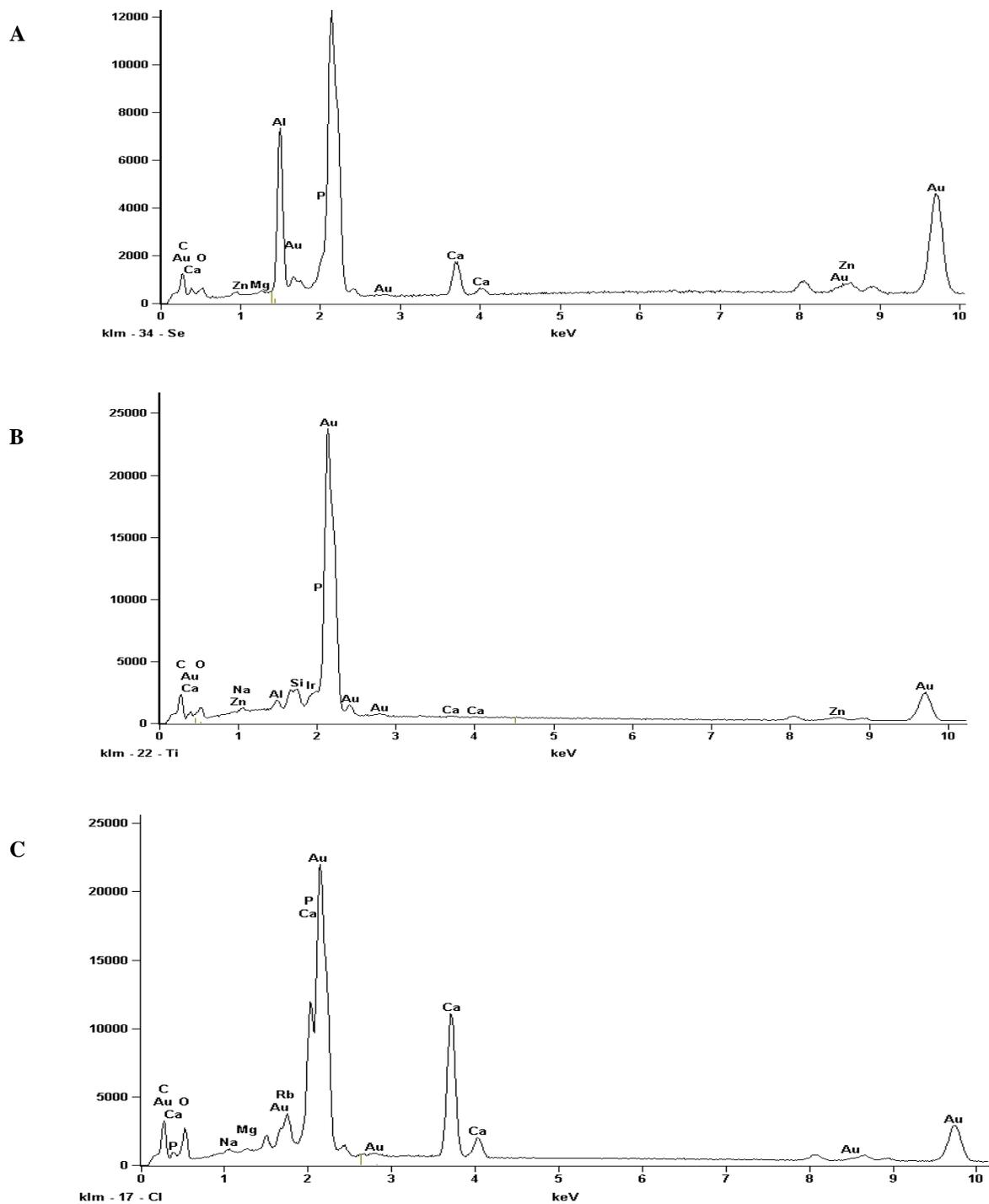
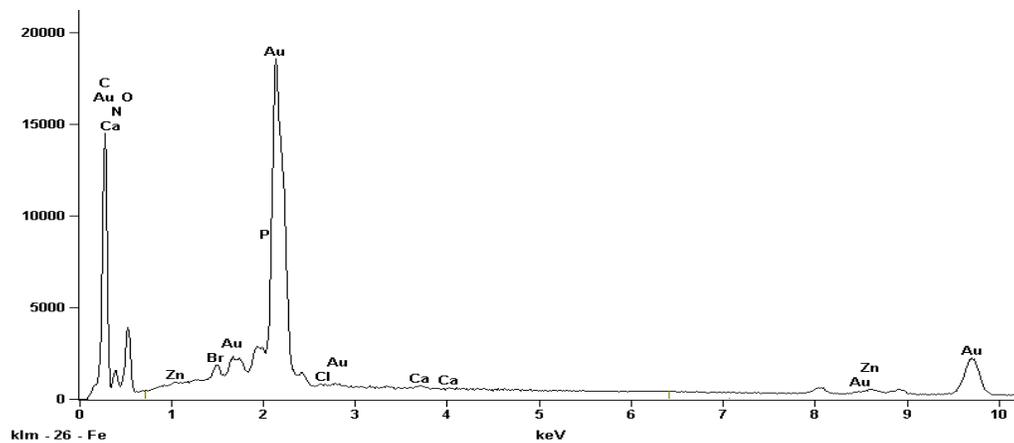
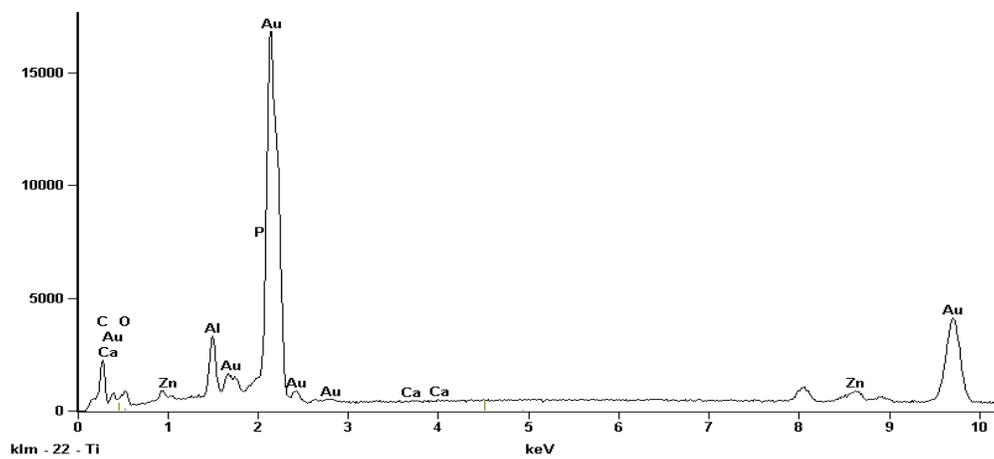


Figure 4

A



B



C

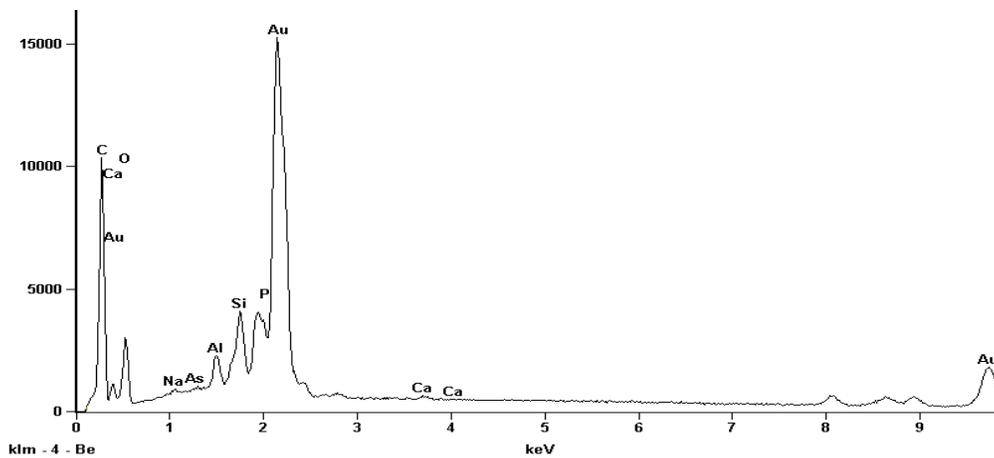


Figure 5

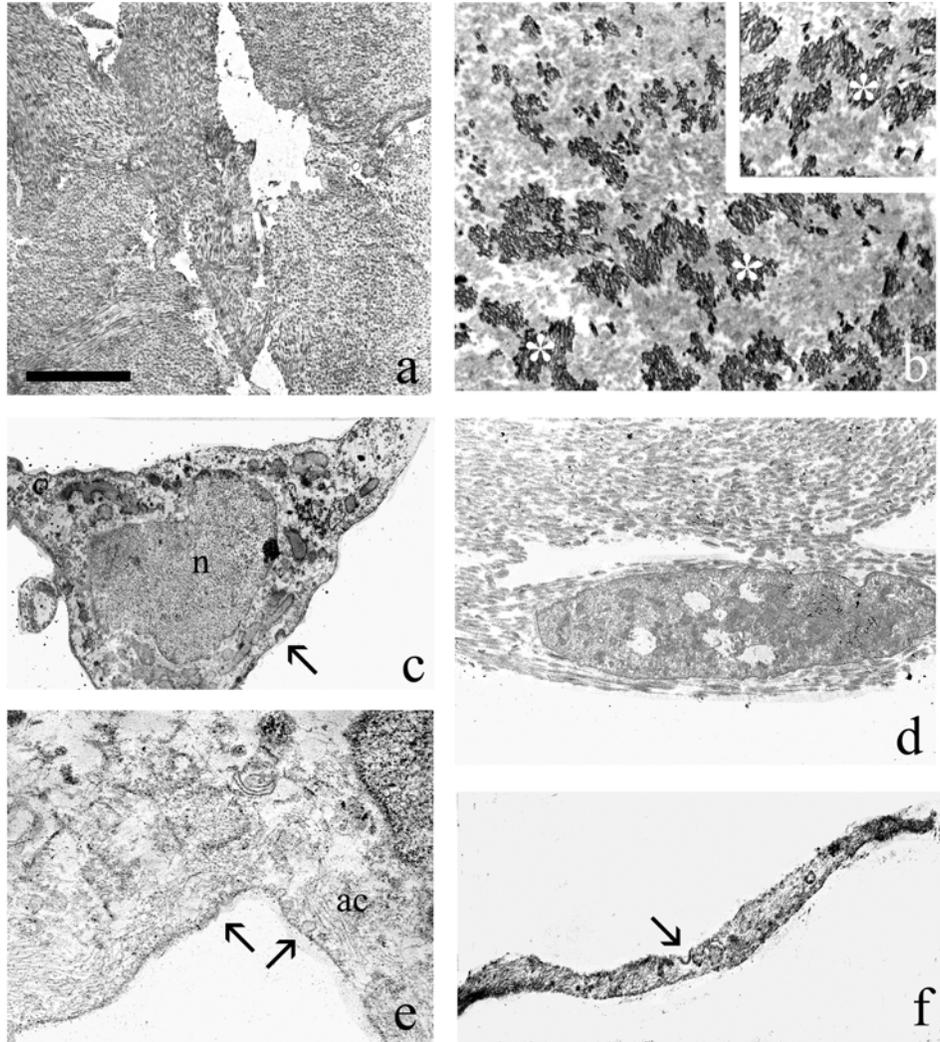
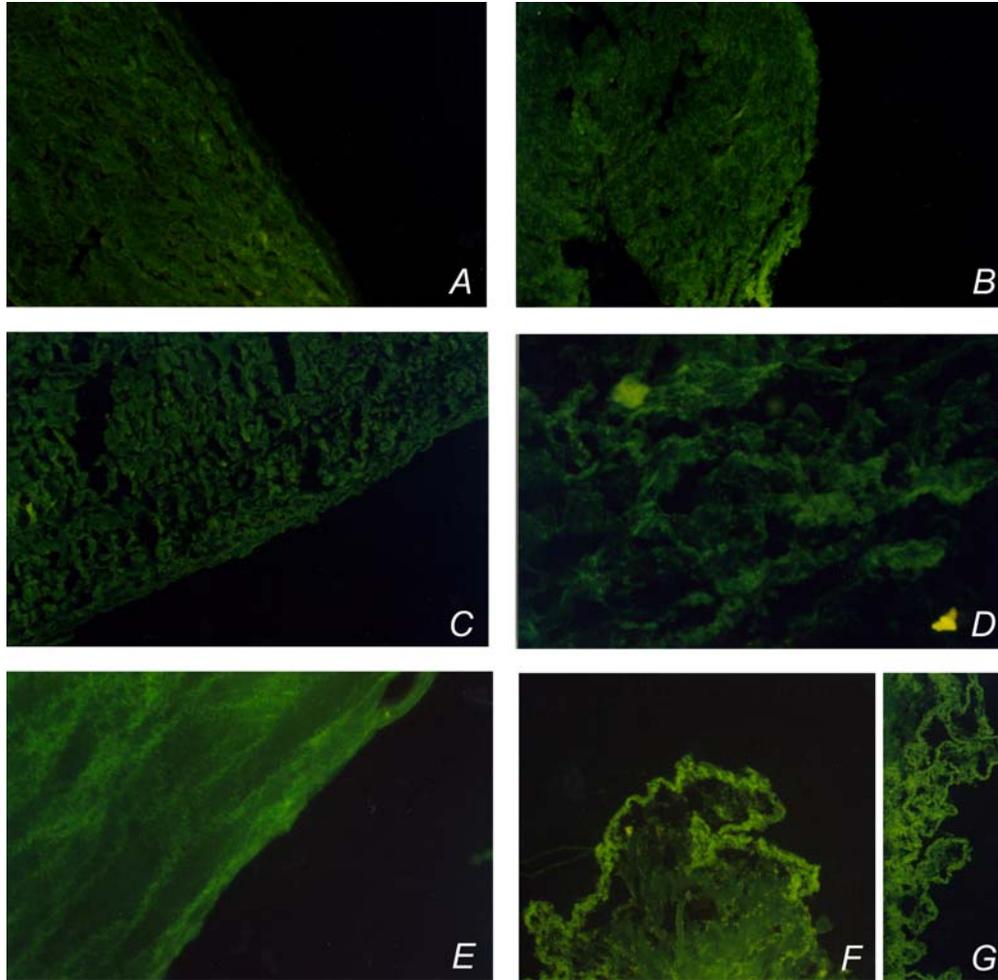


Figure 6



## Figure Legends

**Figure 1** – Scanning electron micrographs of osteoblasts on the native (A, D), BP 24 (B, E) and BP 48 (C, F) matrices cultured on common and mineralization medium, respectively. In detail, spots of spherical mineral deposits on BP 48 matrices. Scale bar = 2.5  $\mu\text{m}$ .

**Figure 2** – Element mapping of P (b), Ca (c) and Mg (d) at BP 48 matrix kept in mineralization medium (a).

**Figure 3** – EDS spectra of matrices cultured on mineralization medium: (A) native, (B) BP 24 and (C) BP 48.

**Figure 4** – EDS spectra of matrices cultured on common medium: (A) native, (B) BP 24 and (C) BP 48. Note the absence of calcium peaks.

**Figure 5** – Transmission electron micrographs of the matrices. (a) BP 48 matrices when cultured on common medium. Note that collagen fibers are almost all orientated at the same direction. Scale bar = 5.6  $\mu\text{m}$ ; (b) Native matrices cultured on mineralization medium. Note the electron dense deposits (\*) all over the matrices. Scale bar = 4  $\mu\text{m}$ ; (c) osteoblasts cultured on BP 48 matrices with mineralization medium. Note the nucleus (n) with not condensed chromatin and the vesicles'formation ( $\rightarrow$ ) within the cytoplasmatic membrane. Scale bar = 2  $\mu\text{m}$ ; (d) transversal section of an osteoblast within the BP 24 matrix cultured on common medium. Scale bar = 3  $\mu\text{m}$ ; (e) detail of the cytoplasmatic membrane of an osteoblast cultured on native matrices with common medium. Note the vesicles'formation ( $\rightarrow$ ) near some actin (ac) filaments. Scale bar = 435nm; (f) osteoblast's pseudopodium within BP 48 matrix cultured on common medium and vesicles'formation ( $\rightarrow$ ) on it. Scale bar = 1.21  $\mu\text{m}$ .

**Figure 6** – Osteocalcin immunocytochemical micrographs on native (A, B), BP 24 (C, D) and BP 48 (E, F, G) matrices cultured on common and mineralization medium, respectively. Scale bar = 50  $\mu\text{m}$ .



## CONCLUSÕES GERAIS

O tratamento alcalino realizado nas matrizes de colágeno interfere negativamente com o processo de adesão celular, pois a adesão verificada para as matrizes BP24 e BP48 foi considerada menor àquela encontrada para as matrizes de colágeno nativas.

Todas as membranas permitiram uma proliferação/organização celular em múltiplas camadas, apresentando semelhanças morfológicas entre elas. No entanto, matrizes mantidas em meio de mineralização apresentaram osteoblastos com maior número de vesículas em sua superfície, indicando uma maior atividade de secreção celular.

Os substratos colagênicos foram capazes de manter o fenótipo dos osteoblastos cultivados sobre eles além de induzir alguns aspectos da diferenciação de osteoblastos para osteócitos. Este fato foi evidenciado pela secreção de elementos com condroitin sulfato, fosfatase alcalina, osteocalcina, a mineralização da matriz colagênica e da permanência das células, com uma morfologia modificada, no ambiente mineralizado.

As matrizes de colágeno polianiônico foram muito mais eficientes que as de colágeno nativo na manutenção do crescimento e diferenciação dos osteoblastos, sendo capazes de induzir o processo de biomineralização das mesmas por parte das células cultivadas. Esta mineralização, dependente da atividade celular, ocorreu sempre que fossem fornecidas condições apropriadas para isso. A análise por EDS permitiu verificar que esses depósitos são compostos por fosfatos de cálcio próximos a proporção estequiométrica da hidroxiapatita nas matrizes de colágeno nativas.

A fosfatase alcalina mostrou-se um fator importante para a mineralização das matrizes colagênicas estudadas, embora para que o processo ocorresse, tornou-se necessária a adição de suplementos nutricionais para a deposição mineral no meio de cultura.

A matriz BP48 foi onde se observou maior produção de fosfatase alcalina, maior deposição de osteocalcina e conseqüente maior nível de mineralização óssea. Assim, foi o substrato mais bem adequado ao crescimento e diferenciação dos osteoblastos, demonstrando ser mais adequada para implantes visando a promoção do processo de regeneração óssea ou procedimentos que envolvam engenharia de tecido ósseo.



## REFERÊNCIAS

Adam, B., Alain, R. & Adrien, C., Vascular endothelial cell responses to different electrically charged poly (vinylidene fluoride) supports under static and oscillating flow conditions. *Biomaterials*, 18, 107-112 (1997).

Agrawal, C., Niederauer, G., Micallef, D. & Athanasiou, K., The use of PLA\_PGA polymers in orthopaedics, *Encyclopedic handbook of biomaterials and bioengineering*, pp. 2081-2115, Marcel Dekker, New York (1995).

Akagawa, Y., Ichikawa, Y., Nikai, H. & Tsuru, H., Interface histology of unloaded and early loaded partially stabilized zirconia endosseous implant in initial bone healing. *J Prosthet Dent*, 69, 599-604 (1993).

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P., *Molecular Biology of the Cell*, 4rd ed., Garland Science, New York (2002).

Altankov, G. & Groth, T., Reorganization of substratum-bound fibronectin on hydrophilic and hydrophobic materials is related to biocompatibility. *J Mater Sci Mater Med* 5, 732-737 (1994).

Alper, M., Calvert, P.D., Frankel, R., Rieke, P. & Tirrel, D., *Materials Synthesis Based on Biological Processes*, Materials Research Society, Pittsburgh, PA (1991).

Andriano, K.P., Chandrashekar, B., McEnery, K., Dunn, R.L., Moyer, K., Balliu, C.M., Holland, K.M., Garrett, S. & Huffer, W.E., Preliminary in vivo studies on the osteogenic potential of bone morphogenetic proteins delivered from an absorbable puttylike polymer matrix. *J Biomed Mater Res*, 53, 36-43 (2000).

Anneroth, G., Ericsson, A.R. & Zetterqvist, L., Tissue integration of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>- ceramic dental implants (Frialit) - a case report. *Swed Dent J*, 14, 63-70 (1990).

Anselme, K., Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials*, 21, 667-681 (2000).

Anselme, K., Bigerelle, M., Noel, B., Dufresne, E., Judas, D., Iost, A. & Hardouin, P., Qualitative and quantitative study of human osteoblast adhesion on materials with various surface roughness. *J Biomed Mater Res*, 49, 155-166 (2000).

Atala, A., Tissue engineering of artificial organs. *J Endourol*, 14, 49-57 (2000).

Auger, F.A., Rouabhia, M., Goulet, F., Berthod, F., Moulin, V. & Germain, L., Tissue-engineered human skin substitutes developed from collagen- populated

hydrated gels: clinical and fundamental applications. *Med Biol Eng Comput*, 36, 801-812 (1998).

Bellows, C.G., Aubin, J.E. & Heersche, J.N.M., Initiation and progression of mineralization of bone modules formed in vitro: the role of alkaline phosphatase and organic phosphate. *Bone Miner*, 14, 27-40 (1991).

Bet, M.R., Goissis, G. & Lacerda, C.A., Characterization of polyanionic collagen prepared by selective hydrolysis of asparagine and glutamine carboxamide side chains. *Biomacromolecules*, 2, 1074-1079 (2001).

Bet, M., Goissis, G., Vargas, S. & Selistre-de-Araujo, H., Cell adhesion and cytotoxicity studies over polyanionic collagen surfaces with variable negative charge and wettability. *Biomaterials*, 24, 131-137 (2003).

Blumenthal, N., Ricci, J.L. & Alexander, H., The effects of implant surfaces on bone mineral formation *in vitro*, *Trans Annu Meet Soc Biomater*, 12, 2 (1989).

Boskey, A.L., Matrix proteins and mineralization: An overview. *Connect Tissue Res*, 35, 357-363 (1996).

Boskey, A.L., Boyan, B.D. & Schwartz, Z., Matrix vesicles promote mineralization in a gelatin gel. *Calcif Tissue Int*, 60, 309-315 (1997).

Boskey, A.L., Spevak, L., Doty, S.B. & Rosenberg, L., Effects of bone CS-proteoglycans, DS-decorin and DS-biglycan on hydroxyapatite formation in a gelatin gel. *Calcif Tissue Int*, 61, 298-305 (1997).

Boskey, A.L., Ullrich, W., Spevak, L. & Gilder, H., Persistence of complexed acidic phospholipids in rapidly mineralizing tissues is due to affinity for mineral and resistance to hydrolytic attack: In vitro data. *Calcif Tissue Int*, 58, 45-51 (1996).

Boyce, S.T., Skin substitutes from cultured cells and collagen-GAG polymers. *Med Biol Eng Comput*, 36, 791-800 (1998).

Brittberg, M., Autologous chondrocyte transplantation. *Clin Orthop*, S147-55 (1999).

Brittberg, M., Tallheden, T., Sjogren-Jansson, B., Lindahl, A. & Peterson, L., Autologous chondrocytes used for articular cartilage repair: an update. *Clin Orthop*, S337-348 (2001).

Buck, C. & Horwitz, A.F., Cell surface receptors for extracellular matrix molecules. *Ann Rev Cell Biol*, 120, 577-585 (1993).

Burgeson, R.E. & Nimni, M.E., Collagen types. Molecular structure and tissue distribution. *Clin Orthop*, 250-272 (1992).

Canalis, E., The hormonal and local regulation of bone formation. *Endocr Rev*, 4, 62-77 (1983).

Chen, Y.S., Hsieh, C.L., Tsai, C.C., Chen, T.H., Cheng, W.C., Hu, C.L. & Yao, C.H., Peripheral nerve regeneration using silicone rubber chambers filled with collagen, laminin and fibronectin. *Biomaterials*, 21, 1541-1447 (2000).

Chevallay, B. & Herbage, D., Collagen-based biomaterials as 3D scaffold for cell cultures: applications for tissue engineering and gene therapy. *Med Biol Eng Comput*, 38, 211-218 (2000).

Constantino, P.D., Hiltzik, D., Govindaraj, S. & Moche, J., Bone healing and bone substitutes. *Facial Plastic Surg*, 18, 13-26 (2002).

Cornelissen, M. & de Ridder, L., Electron microscopic study of proteoglycan aggregates synthesized by embryonic chick sternal chondrocytes in vitro. *Eur J Morphol*, 31, 17-20 (1993).

Davies, J.E., Causton, B., Bovell, Y., Davy, K. & Sturt, C.S., The migration of osteoblasts over substrata of discrete surface charge. *Biomaterials* 7, 231-233 (1986).

Degasne, I., Baslé, M.F., Demais, V., Huré, G., Lesourd, M., Grolleau, B., Mercier, L. & Chappard, D., Effects of roughness, fibronectin and vitronectin on attachment, spreading and proliferation of human osteoblast-like cells (SAOS-2) on titanium surfaces. *Calcif Tissue Int* 64, 499-507 (1999).

Dewez, J.L., Doren, A., Schneider, Y.J. & Rouxhet, P.G., Competitive adsorption of proteins: key of the relationship between substratum surface properties and adhesion of epithelial cells. *Biomaterials*, 20, 547-559 (1999).

Doillon, C.J. & Silver, F.H., Collagen-based wound dressing: effects of hyaluronic acid and fibronectin on wound healing. *Biomaterials*, 7, 3-8 (1986).

Du, C., Cui, F.Z., Zhu, X.D. & de Groot, K., Three-dimensional nano-HAp/collagen matrix loading with osteogenic cells in organ culture. *J Biomed Mater Res*, 44, 407-415 (1999).

Eanes, E.D., Hailer, A.W., Midura, R.J. & Hascall, V.C., Proteoglycan inhibition of calcium phosphate precipitation in liposomal suspensions. *Glycobiology*, 2, 571-

578

(1992).

Fawcett, D.W., Bone. *In: D.W. Fawcett (ed.), A Textbook of Histology*, pp. 199-238, W.B. Saunders, Igaku-Shoin (1986).

Friess, W., Collagen--biomaterial for drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm*, 45, 113-136 (1998).

Fujiasawa, R., Wada, Y., Nodasaka, Y. & Kuboki, Y., Acidic amino acid-rich sequences as binding sites of osteonectin to hydroxyapatite crystals. *Biochim Biophys Acta*, 1075, 56-60 (1996).

Fukada, E., Piezoelectricity of natural biomaterials, *In: Medical Applications of Piezoelectric Polymers*. Vol. 5, pp. 1-26, Gordon and Breach Science Pub., New York (1988).

Geibler, U., Hempel, U., Wolf, C., Scharnweber, D., Worch, H. & Wenzel, K.-W., Collagen type I-coating of Ti6A14V promotes adhesion of osteoblasts. *J Biomed Mater Res*, 51, 752-760 (2000).

Glimcher, M.J., Mechanism of calcification: Role of collagen fibrils and collagen-phosphoprotein complexes in vitro and in vivo. *Anat Rec*, 224, 139-153 (1989).

Goissis, G., Piccirilli, L., Goes, J., Plepis, A. & Das-Gupta, D., Anionic collagen: polymer composites with improved dielectric and rheological properties. *Artif Organs*, 22, 203-209 (1998).

Goissis, G., Marcantonio, E., Jr., Marcantonio, R.A., Lia, R.C., Cancian, D.C. & de Carvalho, W.M., Biocompatibility studies of anionic collagen membranes with different degree of glutaraldehyde cross-linking. *Biomaterials*, 20, 27-34 (1999).

Goissis, G., Marginador, S.V.S. & Martins, V.C.A., Biomimetic mineralization of charged collagen matrices: in vitro and in vivo study. *Artif Organs*, 27, 437-443 (2003).

Hafemann, B., Ensslen, S., Erdmann, C., Niedballa, R., Zuhlke, A., Ghofrani, K. & Kirkpatrick, C.J., Use of a collagen/elastin membrane for the tissue engineering of dermis. *Burns*, 25, 373-384 (1999).

Haralson, M.A. & Hassel, J.R., The extracellular matrix - an overview. *In: M.A. Haralson & J.R. Hassel (eds.), Extracellular Matrix: a practical approach, The Practical Approach Series*, pp. 1-30, Oxford University Press Inc., New York (1995).

Hench, L.L., Biomaterials: a forecast for the future. *Biomaterials*, 19, 1419-1423 (1998).

Heppenstall, R.B., Fracture Healing. *In*: R.B. Heppenstall (ed.), *Fracture Treatment and Healing*, pp. 35, WB Saunders, Philadelphia (1980).

Hollinger, J.O., Schmitt, J.M., Buck, D.L., Shannon, R., Joh, S.P., Zegzula, H.D. & Wozney, J., Recombinant human bone morphogenetic protein-2 and collagen for bone regeneration. *J Biomed Mater Res*, 43, 356-364 (1998).

Hubbell, J.A., Biomaterials in tissue engineering. *Biotechnology*, 13, 565-576 (1990).

Hui, M., Hu, M. & Tenenbaum, H.C., Changes in cell adhesion and cell proliferation are associated with expression of tissue non-specific alkaline phosphatase. *Cell Tissue Res*, 274, 429-437 (1993).

Hunter, G.K. & Goldberg, H.A., Nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 90, 8562-8565 (1993).

Hutmacher, D.W., Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*, 21, 2529-2543 (2000).

Huynh, T., Abraham, G., Murray, J., Brockbank, K., Hagen, P.O. & Sullivan, S., Remodeling of an acellular collagen graft into a physiologically responsive neovessel. *Nat Biotechnol*, 17, 1083-1086 (1999).

Ishaug, S.L., Crane, G.M., Miller, M.J., Yasko, A.W., Yaszemski, M.J. & Mikos, A.G., Bone formation by three-dimensional stromal osteoblast culture in biodegradative polymer scaffolds. *J Biomed Mater Res*, 36, 17-28 (1997).

Ishaug, S.L., Yaszemski, M.J., Brizios, R. & Mikos, A.G., Osteoblast function on synthetic biodegradable polymers. *J Biomed Mater Res*, 28, 1145-1453 (1994).

Ishaug-Riley, S.L., Crane-Kruger, G.M., Yaszemski, M.J. & Mikos, A.G., Three-dimensional culture of rat calvarial osteoblasts in porous biodegradable polymers. *Biomaterials*, 19, 1405-1412 (1998).

Isobe, M., Yamazaki, Y., Oida, S., Ishihara, K., Nakabayashi, N. & Amagasa, T., Bone morphogenetic protein encapsulated with a biodegradable and biocompatible polymer. *J Biomed Mater Res*, 32, 433-438 (1996).

Jacobs, J.J., Gilbert, J.L. & Urban, R.M., Corrosion of metal orthopaedic implants. *J Bone Jt Surg (Am)*, 80, 268-282 (1998).

Jenkins, C.L. & Raines, R.T., Insights on the conformational stability of collagen. *Nat Prod Rep*, 19, 49-59 (2002).

Johnson, G., Jenkins, M., McLean, K.M., Griesser, H.J., Kwak, J., Goodman, M. & Steele, J.G., Peptoid-containing collagen mimetics with cell binding activity. *J Biomed Mater Res*, 51, 612-624 (2000).

Jones, D.W., Coatings of ceramics on metals. *Ann N Y Acad Sci*, 523, 19-37 (1988).

Juliano, R.L. & Haskill, S., Signal transduction from the extracellular matrix. *J Cell Biol*, 120, 577-583 (1993).

Kadler, K.E., Holmes, D.F., Trotter, J.A. & Chapman, J.A., Collagen fibril formation. *Biochem J*, 316, 1-11 (1996).

Kagan, H.M. & Trackman, P.C., Properties and function of lysyl oxidase. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 5, 206-210 (1991).

Kaselmo, B. & Gold, J., Implant surfaces and interface processes. *Adv Dent Res*, 13, 8-20 (1999).

Katz, E.P., The kinetics of mineralization in vitro. I. The nucleation properties of 640-angstrom collagen at 25 degrees. *Biochim Biophys Acta*, 194, 121-129 (1969).

Kieswetter, K., Schwarts, Z., Hummert, T.M., Cochran, D.L., Simpson, J., Dean, D.D. & Boyan, B.D., Surface roughness modulates the local production of growth factors and cytokines by osteoblast-like MG-63 cells. *J Biomed Mater Res*, 32, 55-63 (1996).

Kim, B.S. & Mooney, D.J., Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering. *Trends Biotechnol*, 16, 224-230 (1998).

Kimura, M., Zhao, M., Zellin, G. & Linde, A., Bone-inductive efficacy of recombinant human bone morphogenetic protein- 2 expressed in *Escherichia coli*: an experimental study in rat mandibular defects. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*, 34, 289-299 (2000).

Knight, C.G., Morton, L.F., Onley, D.J., Peachey, A.R., Messent, A.J., Smethurst, P.A., Tuckwell, D.S., Farndale, R.W. & Barnes, M.J., Identification of collagen type I of an integrin  $\alpha_2\beta_1$  - binding site containing an essential GER sequence. *J Biol Chem*, 273, 33287-33294 (1998).

Koide, M., Osaki, K., Konishi, J., Oyamada, K., Katakura, T., Takahashi, A. & Yoshizato, K., A new type of biomaterial for artificial skin: dehydrothermally cross-linked composites of fibrillar and denatured collagens. *J Biomed Mater Res*, 27, 79-87 (1993).

Kornu, R., Maloney, W.J., Kelly, M.A. & Smith, R.L., Osteoblast adhesion to orthopaedic implant alloys: Effects of cell adhesion molecules and diamond-like carbon coating. *J Orthop Res* 14, 871-877 (1996).

Krukowski, M., Hard and soft connective tissue growth and repair in response to charged surfaces. In: J.E. Davies (ed.), *The bone - Biomaterial interface*, pp. 275-284, University of Toronto Press, Toronto (1991).

Kuzuya, M. & Kinsella, J.L., Induction of endothelial cell differentiation in vitro by fibroblast-derived soluble factors. *Exp Cell Res*, 215, 310-318 (1994).

Lacerda, C., Plepis, A.M.G. & Goissis, G., Selective hydrolysis of carboxiamides of asparagine and glutamine residues of collagen: preparation and characterization of anionic collagen matrices for biomaterial applications. *Quim Nova*, 21, 267-271 (1998).

Lam, P.K., Chan, E.S., Liew, C.T., Lau, C.H., Yen, S.C. & King, W.W., The efficacy of collagen dermis membrane and fibrin on cultured epidermal graft using an athymic mouse model. *Ann Plast Surg*, 43, 523-528 (1999).

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* 36, 99-108 (1997).

Landis, W.J., Hodges, K.J., McKee, M.D., Nanci, A., Song, M.J., Kiyonaga, S., Arena, J. & McEwen, B., Extracellular vesicles of calcifying turkey leg tendon characterized by immunocytochemistry and high voltage electron microscopic tomography and 3-D graphic image reconstruction. *Bone Miner*, 17, 237-241 (1992).

Langer, R. & Vacanti, J.P., Tissue engineering. *Science*, 260, 920-926 (1993).

Lanza, R., Langer, R. & Chick, W., *Principles of Tissue Engineering*, RG Landes Company, NY (1997).

Lauer-Fields, J.L., Juska, D. & Fields, G.B., Matrix metalloproteinases and collagen catabolism. *Biopolymers* 66, 19-32 (2002).

Lee, C.H., Singla, A. & Lee, Y., Biomedical applications of collagen. *Int J Pharm*, 221, 1-22 (2001).

Lee, J.J., Rouhfar, L. & Beime, O.R., Survival of hydroxyapatite-coated implants: a meta-analytic review. *J Oral Maxillofac Surg*, 58, 1372-1379 (2000).

Lee, S.C., Shea, M., Battle, M.A., Kozitza, K., Ron, E., Turek, T., Schaub, R.G. & Hayes, W.C., Healing of large segmental defects in rat femurs in aided by RhBMP-2 in PLGA matrix. *J Biomed Mater Res*, 28, 1149-1156 (1994).

Lefebvre, F., Gorecki, S., Bareille, R., Amedee, J., Bordenave, L. & Rabaud, M., New artificial connective matrix-like structure made of elastin solubilized peptides and collagens: elaboration, biochemical and structural properties. *Biomaterials*, 13, 28-33 (1992).

LeGeros, R.Z., Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clin Orthop*, 81-98 (2002).

Lieberman, J.R., Daluiski, A. & Einhorn, T.A., The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications. *J Bone Joint Surg Am*, 84-A, 1032-1044 (2002).

Lincks, J., Boyan, B.D., Blanchard, C.R., Lohmann, C.H., Liu, Y., Cochran, D.L., Dean, D.D. & Schwartz, Z., Response of MG 63 osteoblast-like cells to titanium and titanium alloys is dependent of surface roughness and composition. *Biomaterials*, 19, 2219-2232 (1998).

Liu, F., Malaval, L., Gupta, A. & Aubin, J.E., Simultaneous detection of multiple bone-related mRNAs and protein expression during osteoblast differentiation: Polymerase chain reaction and immunocytochemical studies at the single cell level. *Dev Biol*, 166, 220-234 (1994).

Livingston, T., Ducheyne, P. & Garino, J., In vivo evaluation of a bioactive scaffold for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res*, 62, 1-13 (2002).

Ma, P.X. & Zhang, R., Synthetic nano-scale fibrous extracellular matrix. *J Biomed Mater Res*, 46, 60-72 (1999).

Madhally, S.V. & Matthew, H.W.T., Porous chitosan scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*, 20, 1133-1142 (1999).

Maeda, M., Tani, S., Sano, A. & Fujioka, K., Microstructure and release characteristics of the minipellet, a collagen-based drug delivery system for controlled release of protein drugs. *J Control Release*, 62, 313-324 (1999).

Malaval, L., Modrowski, D., Gupta, A.K. & Aubin, J.E., Cellular expression of bone-related proteins during in vitro osteogenesis in rat bone marrow stromal cell cultures. *J Cell Physiol*, 158, 555-572 (1994).

Mandracchia, V.J., Nelson, S.C. & Barp, E.A., Current concepts of bone healing. *Clin Podiatr Med Surg*, 18, 55-77 (2001).

Martin, I., Obradovic, B., Treppo, S., Grodzinsky, A.J., Langer, R., Freed, L.E. & Vunjak-Novakovic, G., Modulation of the mechanical properties of tissue engineered cartilage. *Biorheology*, 37, 141-147 (2000).

Martins, V.C., Goissis, G., Ribeiro, A.C., Marcantonio, E., Jr. & Bet, M.R., The controlled release of antibiotic by hydroxyapatite: anionic collagen composites. *Artif Organs*, 22, 215-221 (1998).

Mayr-Wohlfart, U., Fiedler, J., Gunther, K.-P., Puhl, W. & Kessler, S., Proliferation and differentiation rates of human osteoblast-like cell line (SaOS-2) in contact with different bone substitutes materials. *J Biomed Mater Res*, 57, 132-139 (2001).

McCarthy, J.B., Vachhani, B. & Iida, J., Cell adhesion to collagenous matrices. *Biopolymers*, 40, 371-381 (1996).

Mezger, P.R. & Creugers, N.H., Titanium nitride coatings in clinical dentistry. *J Dent*, 20, 342-344 (1992).

Moradian-Oldak, J., Frolow, F., Addadi, L. & Weiner, S., Interactions between acidic matrix macromolecules and calcium phosphate ester crystal: Relevance to carbonate apatite formation in biomineralization. *Proc R Soc London, Ser B*, 247 (1992).

Moreira, P.L. & An, Y.H. Collagen-based scaffolds for bone and cartilage repair. *MUSC Orthopaedic Journal*, 5, 53-57 (2002).

Murata, M., Maki, F., Sato, D., Shibata, T. & Arisue, M., Bone augmentation by onlay implant using recombinant human BMP-2 and collagen on adult rat skull without periosteum. *Clin Oral Implants Res*, 11, 289-295 (2000).

Nakagawa, T. & Tagawa, T., Ultrastructural study of direct bone formation induced by BMPs-collagen complex implanted into an ectopic site. *Oral Dis*, 6, 172-179 (2000).

Nehrer, S., Breinan, H.A., Ramappa, A., Young, G., Shortkroff, S., Louie, L.K., Sledge, C.B., Yannas, I.V. & Spector, M., Matrix collagen type and pore size

influence behaviour of seeded canine chondrocytes. *Biomaterials*, 18, 769-776 (1997).

Norton, M.R. & Wilson, J., Dental implants placed in extraction sites implanted with bioactive glass: human histology and clinical outcome. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 17, 249-257 (2002).

Oringer, R.J., Biological mediators for periodontal and bone regeneration. *Compend Contin Educ Dent*, 23, 501-510 (2002).

Park, J.C., Hwang, Y.S., Lee, J.E., Park, K.D., Matsumura, K., Hyon, S.H. & Suh, H., Type I atelocollagen grafting onto ozone-treated polyurethane films: cell attachment, proliferation, and collagen synthesis. *J Biomed Mater Res*, 52, 669-677 (2000).

Peppas, N.A. & Langer, R., New challenges in biomaterials. *Science*, 263, 1715-1720 (1994).

Pineda, L.M., Busing, M., Meinig, R.P. & Gogolewski, S., Bone regeneration with resorbable polymeric membranes. III. Effect of poly(L-lactide) membrane pore size on the bone healing process in large defects. *J Biomed Mater Res*, 31, 385-394 (1996).

Plepis, A.M.G., Goissis, G. & Das-Grupta, D.K., Dielectric and Pyroelectric Characterization of anionic and native collagen. *Polym Eng Science*, 36, 2932-2938 (1996).

Pokharna, H.K. & Phillips, F.M., Collagen crosslinks in human lumbar intervertebral disc aging. *Spine*, 23, 1645-1648 (1998).

Pollack, S.T., *Symposium on Electrically Induced Osteogenesis*. Vol. 15, W.B. Saunders Company, Pennsylvania (1984).

Probst, A. & Spiegel, H.U., Cellular mechanisms of bone repair. *J Invest Surg*, 10, 77-86 (1997).

Puleo, D.A. & Nanci, A. Understanding and controlling the bone-implant surface. *Biomaterials* 20, 2311-2321 (1999).

Ratner, B.D., New ideas in biomaterials science--a path to engineered biomaterials. *J Biomed Mater Res*, 27, 837-850 (1993).

Rea, S.M., Brooks, R.A., Schneider, A. Best, S.M. & Bonfield, W., Osteoblast-like cell response to bioactive composites - surface topography and composition effects. *J Biomed Mater Res (Appl Biomater)*, 70, 250-261 (2004).

Reddi, A.H., Cell Biology and biochemistry of endochondral bone development. *Coll Relat Res*, 1, 209-226 (1981).

Reddi, A.H., Morphogenesis and tissue engineering of bone and cartilage: inductive signals, stem cells, and biomimetic biomaterials. *Tissue Eng*, 6, 351-359 (2000).

Reed, A.M. & Gilding, D.K., Biodegradable polymers for use in surgery - poly(glycolic)/poly(lactic acid) homo and copolymers 2: in vitro degradation.

*Polymer*, 22, 342-346 (1981).

Reyes, C. & Gracia, A.J.,  $\alpha_2\beta_1$  Integrin-specific collagen-mimetic surfaces supporting osteoblastic differentiation. *J Biomed Mater Res* 69A, 591-600 (2004).

Rizzi, S.C., Heath, D.J., Coombes, A.G., Bock, N., Textor, M. & Downes, S., Biodegradable polymer hydroxyapatite composites. Surface analysis and initial attachment of human osteoblasts. *J Biomed Mater Res*, 55, 475-486 (2001).

Robey, P.G., The biochemistry of bone. *Endocrinol Metab Clin North America*, 18, 859-902 (1989).

Robey, P.G. & Boskey, A.L., Mineral and matrix. In: D. Feldman and J. Jowsey (eds.), *Osteoporosis*, pp. 95-184, Academic Press, San Diego, CA (1996).

Rocha, L.B., Goissis, G. & Rossi, M.A., Biocompatibility of anionic collagen matrix as scaffold for bone healing. *Biomaterials*, 23, 449-456 (2002).

Roche, S., Ronziere, M.C., Herbage, D. & Freyria, A.M., Native and DPPA cross-linked collagen sponges seeded with fetal bovine epiphyseal chondrocytes used for cartilage tissue engineering. *Biomaterials*, 22, 9-18 (2001).

Rogers, S.D., Howie, D.W., Graves, S.E., Percy, M.J. & Haynes, D.R., In vitro human monocyte response to wear particles of titanium alloy containing vanadium or niobium. *J Bone Jt Surg (Br)*, 79, 311-315 (1997).

Rosa, F.P., Lia, R.C.C., Souza, K.O.F., Goissis, G. & Marcantonio Jr., E., Tissue response to polyanionic collagen:elastin matrices implanted in rat calvaria. *Biomaterials*, 24, 207-212 (2003).

Royce, P.M., Kato, T., Ohsaki, K. & Miura, A., The enhancement of cellular infiltration and vascularisation of a collagenous dermal implant in the rat by platelet-derived growth factor BB. *J Dermatol Sci*, 10, 42-52 (1995).

Rubin, K., Gulberg, D., Tomansini-Johansson, B., Reed, R.K., Rýden, C. & Borg, T.K., Molecular recognition of the extracellular matrix by cell surface receptors. *In*: W.D. Comper, Extracellular Matrix, Volume 2: Molecular components and Interactions, pp 262-309, Hardwood Academic Publishers, Netherlands (1996).

Saldanha, V. & Grande, D.A., Extracellular matrix protein gene expression of bovine chondrocytes cultured on resorbable scaffolds. *Biomaterials*, 21, 2427-2431 (2000).

Sano, A., Hojo, T., Maeda, M. & Fujioka, K., Protein release from collagen matrices. *Adv Drug Deliv Rev*, 31, 247-266 (1998).

Scarano, A., DiCarlo, F., Quaranta, M. & Piattelli, A., Bone response to zirconia ceramic implants: an experimental study in rabbits. *J Oral Implantol*, 29, 8-12 (2003).

Schierholz, J.M., Lucas, L.J., Rump, A. & Pulverer, G., Efficacy of silver-coated medical devices. *J Host Infect*, 40, 257-262 (1998).

Schmidt, C., Ignatius, A.A. & Claes, L.E., Proliferation and differentiation parameters of human osteoblasts on titanium and steel surfaces. *J Biomed Mater Res*, 54, 209-215 (2001).

Schor, S.L. & Court, J., Different mechanisms in the attachment of cells to native and denatured collagen. *J Cell Sci*, 38, 267-281 (1979).

Shelton, R.M., Rasmussen, A.C. & Davies, J.E., Protein adsorption at the interface between charged polymer substrata and migrating osteoblasts. *Biomaterials* 9, 24-29 (1988).

Simske, S.J., Ayers, R.A. & Bateman, T.A., Porous Materials for Bone Engineering. *In*: D.-M. Liu & V. Dixit (eds.), *Porous Materials for Tissue Engineering, Materials Science Forum*. Vol. 250, pp. 151-182, Trans Tech. Publications, Switzerland (1997).

Singh, M.P., Stefko, J., Lumpkin, J.A. & Rosenblatt, J., The effect of electrostatic charge interactions on release rates of gentamicin from collagen matrices. *Pharm Res*, 12, 1205-1210 (1995).

Staatz, W.D., Fok, S., Zutter, K.F., Adams, M.M., Rodriguez, S.P. & Santoro, B.A. Identification of a tetrapeptide recognition sequence for the  $\alpha_2\beta_1$  integrin in collagen. *JBiol Chem* 266, 7363-7367 (1991).

Steinemann, S.G., Metal implants and surface reactions. *Injury*, 27, C16-22 (1996).

Steven, L., Goodman, P.A.S. & Albrecht, R.M., Three-dimensional extracellular matrix textured biomaterials. *Biomaterials*, 17, 2087-2095 (1996).

Suh, H., Park, J.C., Han, D.W., Lee, D.H. & Han, C.D., A bone replaceable artificial bone substitute: cytotoxicity, cell adhesion, proliferation, and alkaline phosphatase activity. *Artif Organs*, 25, 14-21 (2001).

Suzuki, S., Kawai, K., Ashoori, F., Morimoto, N., Nishimura, Y. & Ikada, Y., Long-term follow-up study of artificial dermis composed of outer silicone layer and inner collagen sponge. *Br J Plast Surg*, 53, 659-666 (2000).

Takaoka, K., Nakahara, H., Yoshikawa, H., Masuhara, K., Tsuda, T. & Ono, K., Ectopic bone induction on and in porous hydroxyapatite combined with collagen and bone morphogenetic protein. *Clin Orthop*, 250-254 (1988).

Tan, W., Krishnaraj, R. & Desai, T.A., Evaluation of nanostructured composite collagen--chitosan matrices for tissue engineering. *Tissue Eng*, 7, 203-210 (2001).

Turksen, K. & Aubin, J.E., Positive and negative immunoselection for enrichment of two classes of osteoprogenitor cells. *J Cell Biol*, 114, 373-384 (1991).

Valente, M., Ius, P., Bortolotti, U., Talenti, E., Bottio, T. & Thiene, G., Pathology of the pericarbon bovine pericardial xenograft implanted in humans. *J Heart Valve Dis*, 7, 180-189 (1998).

van Susante, J.L.C., Pieper, J., Buma, P., van Kuppevelt, T.H., van Beuningen, H., van Der Kraan, P.M., Veerkamp, J.H., van den Berg, W.B. & Veth, R.P.H., Linkage of chondroitin-sulfate to type I collagen scaffolds stimulates the bioactivity of seeded chondrocytes in vitro. *Biomaterials*, 22, 2359-2369 (2001).

Vogler, E.A., Graper, J.C., Harper, G.R., Sugg, H.W., Lander, L.M. & Brittain, W.J., Contact activation of the plasma coagulation cascade. I. Procoagulant surface chemistry and energy. *J Biomed Mater Res*, 29, 1005-1016 (1995).

Wang, M.C., Pins, G.D. & Silver, F.H., Collagen fibres with improved strength for the repair of soft tissue injuries. *Biomaterials*, 15, 507-512 (1994).

Werkmeister, J.A. & Ramshaw, J.A., Collagen-based biomaterials. *Clin Mater*, 9, 137-138 (1992).

Whang, D.C., Nam, E.K., Aitken, M., Sprague, S.M., Patel, P.K. & Healy, K.E., Ectopic bone formation via rhBMP-2 delivery from porous bioabsorbable polymer scaffolds. *J Biomed Mater Res*, 42, 491-499 (1998).

Whitson SW, Whitson MA, Bowers Jr DE & Falk MC Factors influencing synthesis and mineralization of bone matrix from fetal bovine cells grown in vitro. *J Bone Mineral Res* 7:727-741 (1992).

Whyte, M.P., Hypophosphatasia: Nature's window on alkaline phosphatase function in man. In: J.P. Bilezikian, L.G. Raisz & G.A. Rodan (eds.), *Principles of bone biology*, pp. 951-968, Academic Press, San Diego, CA (1996).

Wu, L.N., Genge, B.R., Dunkelberg, D.G., LeGeros, R.Z., Concannon, B. & Wuthier, R.E., Physicochemical characterization of the nucleational core of matrix vesicles. *J Biol Chem*, 272, 4404-4411 (1997).

Wuthier, R.E., Involvement of cellular metabolism of calcium and phosphate in calcification of avian growth plate cartilage. *J Nutr*, 123S, 301-309 (1993).

Yamada, K.M., Adhesive recognition sequences. *J Biol Chem*, 266, 12809-12812 (1991).

Yamamoto, M., Yamamoto, K. & Noumura, T., Type I collagen promotes modulation of cultured rabbit arterial smooth muscle cells from a contractile to a synthetic phenotype. *Exp Cell Res*, 204, 121-129 (1993).

Yang, C., Hillas, P.J., Báez, J.A., Nokelainen, M., Balan, J., Tang, J., Spiro, R. & Polarek, J.W., The application of recombinant human collagen in Tissue Engineering. *Biodrugs*, 18, 103-119 (2004).

Yaylaoglu, M.B., Yildiz, C., Korkusuz, F. & Hasirci, V., A novel osteochondral implant. *Biomaterials*, 20, 1513-1520 (1999).

Zellin, G., Hedner, E. & Linde, A., Bone regeneration by a combination of osteopromotive membranes with different BMP preparations: a review. *Connect Tissue Res*, 35, 279-84 (1996).



**Meio Whitson'S DMEM (Reagentes da Sigma)**

1 mistura em pó de DMEM (D-7777)

0,0059 gramas de ácido ascórbico (A-0278)

0,0588 gramas de gentamicina (G-3632)

3,7 gramas de bicarbonato de sódio (S-5761)

3,905 gramas de tampão HEPES (H-0763)

20 ml. Antibiótico e antimicótico (A-9909)

Misturar todos os ingredientes em 950 ml. de água destilada. Ajustar o pH para 7.35-7.37 e, depois ajustar o volume final para 1000 ml. de solução. Filtrar através de um filtro 0.22 $\mu$ m (Millipore). Adicionar 88 ml. (ou 15%) de Soro Fetal Bovino (F-2442) em 500 ml. do meio filtrado e 0,71 ml de ITS em 588 ml. de meio + soro.

**Meio Whitson de Mineralização (Reagentes da Sigma)**

1 mistura em pó de DMEM (D-7777)

0,0058 gramas de ácido ascórbico (A-0278)

0,0588 gramas de gentamicina (G-3632)

0,0783 gramas de cloreto de cálcio (C-7902)

2,54 gramas de  $\beta$ -glicerofosfato (G-9891)

3,7 gramas de bicarbonato de sódio (S-5761)

3,905 gramas de tampão HEPES (H-0763)

20 ml. Antibiótico e antimicótico (A-9909)

Misturar todos os ingredientes em 950 ml. de água destilada. Ajustar o pH para 7.35-7.37 e, depois ajustar o volume final para 1000 ml. de solução. Filtrar através de um filtro 0.22 $\mu$ m (Millipore). Adicionar 88 ml. (ou 15%) de Soro Fetal Bovino (F-2442) em 500 ml. do meio filtrado e 0,71 ml de ITS em 500 ml. de meio + soro.

### Determinação da Fosfatase Alcalina (ALP) no meio de cultura

Para esse teste é necessário a utilização do kit da Sigma 104-LS (Sigma Alkaline Phosphatase Endpoint Assay) que contém p-Nitrofenol, além de um tampão constituído por 2-amino 2-metil 1-propanol e um substrato da fosfatase alcalina de p-nitrofenol disódio fosfato.

Para a realização das medidas é necessária a realização de curvas padrões para cada dia de experimento.

Solução base: em 30 ml. de água destilada adicionar 150  $\mu$ l de p-nitrofenol (10 $\mu$ mol/ml) e 3 ml de NaOH 0.05M.

Tubo	Solução Base ( $\mu$ l)	NaOH 0.05M ( $\mu$ l)	Grau de Atividade	Concentração ( $\mu$ mol)
1	1000	0	10	7.5
2	800	200	8	6
3	600	400	6	4.5
4	800	1200	4	3
5	1000 do tubo 4	1000	2	1.5
6	1000 do tubo 5	1000	1	0.75
7	1000 do tubo 6	1000	0.5	0.38
8	1000 do tubo 7	1000	0.25	0.19

Colocar 100  $\mu$ l de cada tubo em poços de placas de 96 poços (Corning) e fazer a medida a 405 nm. Lembrar de colocar também a solução de 0.05M de NaOH para subtrair esses valores de cada tubo padrão

Construir curva padrão (absorbância x atividade).

Coletar meio dos poços do experimento (para esse experimento, não utilizar meio de cultura com indicador de pH. Substituir pó D-7777 por D-2902 e, lembrar de adicionar no meio 3.5 gramas de glicose).

Preparar o substrato da fosfatase alcalina, dissolvendo 1 cápsula em 25 ml. de água. Preparar tubos de teste que deverão conter: 0.5 ml do meio dos poços do experimento (para isso, juntar os sobrenadantes de 5 poços de teste. Lembrar de fazer pelo menos 15 poços para cada condição experimental, o que permitirá análise em triplicata), 0.25 ml. de tampão do kit e 0.25 ml do substrato da fosfatase alcalina já preparado.

A reação deverá ocorrer em banho maria à 37°C por 15 minutos. A reação será bloqueada com a adição de 4.5 ml da solução de NaOH 0.05M.

Pipetar 100 µl de cada tubo-teste em um poço de uma placa de 96 poços e fazer a leitura a 405 nm.

Não esquecer de fazer o branco da reação (meio sem ter sido metabolizado pelas células + tampão + substrato) e de subtrair seu valor de todos valores obtidos para o teste.