

CLÁUDIA REGINA APPIO DUARTE

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA CITOTOXICIDADE E DOS FATORES ANGIOGÊNICOS
DE NANOCOMPÓSITOS DE MATRIZ DE FOSFATO DE CÁLCIO PARA USO EM
REPARAÇÃO ÓSSEA**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal da Universidade do Estado de Santa
Catarina – UDESC, como requisito para a obtenção
parcial do título de Doutor em Ciência Animal.

Orientadora: Sandra Maria Ferraz

Coorientador: Ubirajara Maciel da Costa

**LAGES, SC
2019**

**Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da
Biblioteca Setorial do CAV/UEDESC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

Duarte, Cláudia Regina Appio
Avaliação in vitro da citotoxicidade e dos fatores
angiogênicos de nanocompósitos de matriz de fosfato de
cálcio para uso em reparação óssea / Cláudia Regina Appio
Duarte. -- 2019.
100 p.

Orientadora: Sandra Maria Ferraz
Coorientador: Ubirajara Maciel da Costa
Tese (doutorado) -- Universidade do Estado de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de
Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2019.

1. Cultura de células. 2. Moduladores da angiogênese. 3.
Cerâmicas de fosfato de cálcio. 4. Nanocompósitos. I. Ferraz,
Sandra Maria. II. Costa, Ubirajara Maciel da. III. Universidade
do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências
Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência
Animal. IV. Título.

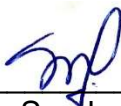
CLÁUDIA REGINA APPIO DUARTE

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA CITOTOXICIDADE E DOS FATORES ANGIOGÊNICOS
DE NANOCOMPÓSITOS DE MATRIZ DE FOSFATO DE CÁLCIO PARA USO EM
REPARAÇÃO ÓSSEA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

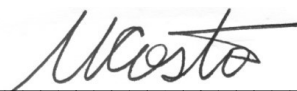
Banca Examinadora:

Orientadora:



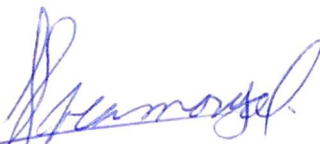
Prof. Dra. Sandra Maria Ferraz
Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC

Coorientador:

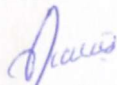


Prof. Dr. Ubirajara Maciel da Costa
Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC

Membros:



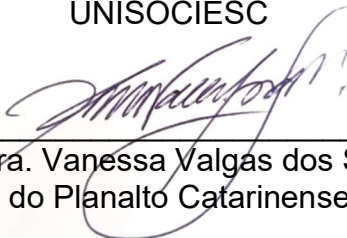
Prof. Dr. Nelson Heriberto Almeida Camargo
Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC



Prof. Dr. Aury Nunes de Moraes
Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC



Prof. Dra. Daiara Floriano da Silva
UNISOCIESC



Prof. Dra. Vanessa Valgas dos Santos
Universidade do Planalto Catarinense – UNIPLAC

Lages, 29 de julho de 2019.

AGRADECIMENTOS

Aos meus queridos orientadores, professor Ubirajara M. Costa (Bira) e professora Sandra M. Ferraz, pela confiança, orientação e amizade durante todos os anos de trabalho no laboratório.

A professora Eliana K. Vaz, pela amizade e conhecimentos repassados.

Ao professor Nelson H. Camargo e Daiara F. Silva, pelo fornecimento dos biomateriais do projeto e conhecimentos compartilhados para a execução do mesmo.

Ao professor Dimas pelos constantes auxílios no desenvolvimento da parte molecular do meu projeto.

Ao professor Miletto, pela disponibilização do laboratório sempre que solicitado.

Aos demais professores do programa de pós-graduação, pelos ensinamentos repassados.

Aos queridos amigos do Laboratório CEDIMA, Fernanda, Karine, Ricardo, Paula, Rosane, Ana Flávia, Alessandra, Igor, Marina e Amanda, pela amizade, auxílio e conhecimentos compartilhados.

As colegas e amigas de pós, Evelyn e Priscila, que muito me auxiliaram na parte molecular do trabalho.

A FAPESC pelos recursos disponibilizados para o desenvolvimento do projeto e a UNIEDU/FUMDES pela bolsa de estudos.

Ao Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC) pela oportunidade de aprimoramento profissional.

RESUMO

Biomateriais para reparo ósseo são compostos naturais ou sintéticos utilizados na clínica médica e odontológica, que auxiliam e estimulam a reparação óssea. Devem apresentar biocompatibilidade, biofuncionalidade, ausência de toxicidade e propriedades mecânicas adequadas pós-implantação. As biocerâmicas nanoestruturadas de fosfato de cálcio e os nanocompósitos com matriz de fosfatos de cálcio tem se destacado na área de biomateriais de reconstituição óssea pela sua semelhança química e cristalográfica com a apatita óssea do esqueleto humano, reforçando sua importância na ortopedia, odontologia e regeneração do tecido ósseo. Apresentam características microestruturais, nanoestruturais, microporosidade interconectada e área superficial de grãos diferenciadas dos biomateriais convencionais. Independente do biomaterial desenvolvido, o primeiro nível de testes, dentro da avaliação de biocompatibilidade é a determinação da citotoxicidade *in vitro*. Outro fator essencial na reparação de tecido ósseo lesado é a adequada vascularização da região. Alguns biomateriais apresentam a habilidade de estimular a secreção de fatores angiogênicos, como o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e o fator de crescimento fibroblástico básico (FGF-2). O objetivo deste trabalho foi avaliar a citotoxicidade de biomateriais cerâmicos de fosfato de cálcio e nanocompósitos de matriz de fosfato de cálcio em células de linhagem Vero, investigar seus efeitos na expressão de fatores angiogênicos e a interação célula-material em cultura de fibroblastos bovinos. Foram testados os seguintes biomateriais: hidroxiapatita (HA) (1100°C/2h); e os nanocompósitos HA/SiO₂ 5% (1100°C/2h); HA/ZrO₂ 5% (1100°C/2h) e HA/MgO 1% (1100°C/2h). Nos resultados de viabilidade celular obtidos por meio do ensaio colorimétrico MTT e curva de crescimento constatou-se que os biomateriais testados se mostraram biocompatíveis. A análise da interação célula-material feita por microscopia eletrônica de varredura mostrou a adesão dos fibroblastos na superfície dos biomateriais testados, reforçando sua característica de biocompatibilidade. Os nanocompósitos HA/SiO₂ 5% e HA/ZrO₂ 5% induziram a expressão de VEGF e FGF-2 após o cultivo dos fibroblastos com o extrato desses biomateriais por 72 horas, o que sugere seu potencial para utilização como estimuladores da angiogênese em reparo ósseo.

Palavras-chave: Cultura de Células. Moduladores da Angiogênese. Cerâmicas de Fosfato de Cálcio. Nanocompósitos.

ABSTRACT

Biomaterials for bone repair are natural or synthetic compounds used in medical and dental clinics, which aid and stimulate bone reparation. They must have biocompatibility, biofunctionality, absence of toxicity and adequate post-implantation mechanical properties. The nanostructured calcium phosphate bioceramics and the calcium phosphate matrix nanocomposites have been prominent in the biomaterials area of bone reconstitution due to their chemical and crystallographic similarity to the human skeletal bone apatite, reinforcing their importance in orthopedics, dentistry and bone tissue regeneration. They have microstructural, nanostructural, interconnected microporosity and grain surface area differentiated from conventional biomaterials. Regardless of the biomaterial developed the first level of tests within the biocompatibility assessment is the determination of *in vitro* cytotoxicity. Another essential factor in the repair of damaged bone tissue is the adequate vascularization of the region. Some biomaterials have the ability to stimulate the secretion of angiogenic factors, such as vascular endothelial growth factor (VEGF) and basic fibroblast growth factor (FGF-2). The aim of this work was to evaluate the cytotoxicity of calcium phosphate ceramics and calcium phosphate matrix nanocomposites in Vero cells, investigate their effects on the expression of angiogenic factors and the cell-material interaction in bovine fibroblasts culture. The following biomaterials were tested: hydroxyapatite (HA) (1100 °C/2h); the nanocomposites HA/SiO₂ 5% (1100 °C/2h); HA/ZrO₂ 5% (1100 °C/2h) and HA/MgO 1% (1100 °C/2h). In the cell viability results obtained by means of the MTT colorimetric assay and growth curve it was verified that the tested biomaterials were biocompatible. The analysis of the cell-material interaction made by scanning electron microscopy showed fibroblasts adhesion on the surface of the tested biomaterials reinforcing its characteristic of biocompatibility. The nanocomposites HA/SiO₂ 5% and HA/ZrO₂ 5% induced the expression of VEGF and FGF-2 after fibroblast culture with the extract of these biomaterials for 72 hours, suggesting its potential for use as angiogenesis stimulators in bone repair.

Keywords: Cell culture. Angiogenesis Modulators. Calcium Phosphate Ceramics. Nanocomposites.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Biomaterial no formato de grânulos (A) e pastilha (B).....	47
Figura 2	Grânulos de Biomaterial Imersos em DMEM com 10% de SFB.....	49
Figura 3	Cultivo dos Fibroblastos com as Pastilhas de Biomaterial.....	52
Gráfico 1	Viabilidade celular relativa (%) medida pelo teste MTT após contato com diferentes concentrações do extrato de HA em 24, 48 e 72 h....	55
Gráfico 2	Viabilidade celular relativa (%) medida pelo teste MTT após contato com diferentes concentrações do extrato do nanocompósito HA/SiO ₂ 5% em 24, 48 e 72 h.....	56
Figura 4	MEV da pastilha de HA. A) Micrografia mostrando a superfície de fratura do biomaterial. B) Fibroblasto aderido na superfície do biomaterial em contato por 7 dias.....	56
Figura 5	MEV da pastilha do nanocompósito HA/SiO ₂ 5%. A) Micrografia mostrando a superfície de fratura do biomaterial. B) Fibroblastos aderidos (setas) na superfície do biomaterial em contato por 7 dias.....	57
Gráfico 3	Expressão gênica do VEGF em células cultivadas com extrato de HA e HA/SiO ₂ 5% por 24, 48 e 72 horas.....	58
Gráfico 4	Expressão gênica do FGF-2 em células cultivadas com extrato de HA e HA/SiO ₂ 5% por 24, 48 e 72 horas.....	58
Figura 6	Biomaterial no formato de grânulos (A) e pastilha (B).....	69
Figura 7	Grânulos de Biomaterial Imersos em DMEM com 10% de SFB.....	71
Gráfico 5	Viabilidade celular relativa (%) medida pelo teste MTT após contato com diferentes concentrações do extrato de HA/ZrO ₂ 5% em 24, 48 e 72 h.....	77
Gráfico 6	Viabilidade celular relativa (%) medida pelo teste MTT após contato com diferentes concentrações do extrato de HA/MgO 1% em 24, 48 e 72 h.....	77
Figura 8	MEV da pastilha de HA/ZrO ₂ 5%. A) Micrografia mostrando a superfície de fratura do biomaterial. B) Indicação da presença de fibroblasto (seta) na superfície do biomaterial em contato por 7 dias	78
Figura 9	MEV da pastilha de HA/MgO 1%. A) Micrografia mostrando a superfície de fratura do biomaterial. B) Fibroblasto aderido na superfície do biomaterial em contato por 7 dias	78

Gráfico 7	Expressão gênica do VEGF em células cultivadas com extrato de HA/ZrO ₂ 5% e HA/MgO 1% por 24, 48 e 72 horas.....	79
Gráfico 8	Expressão gênica do FGF-2 em células cultivadas com extrato de HA/ZrO ₂ e HA/MgO 1% por 24, 48 e 72 horas.....	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Biomateriais utilizados no experimento de acordo com a forma, composição e temperatura de sinterização.....	47
Tabela 2	<i>Primers</i> bovinos utilizados nas análises de qPCR.....	53
Tabela 3	Quantidade de células após contato com o extrato dos diferentes biomateriais diferentes tempos.....	54
Tabela 4	Biomateriais utilizados no experimento de acordo com a forma, composição e temperatura de sinterização.....	69
Tabela 5	<i>Primers</i> bovinos utilizados nas análises de qPCR.....	75
Tabela 6	Quantidade de células após contato com o extrato dos diferentes biomateriais em diferentes tempos.....	76

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

CASR	Receptor sensor do cálcio
CAV	Centro de Ciências Agroveterinárias
CCT	Centro de Ciências Tecnológicas
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CEDIMA	Centro de Diagnóstico Microbiológico Animal
CO ₂	Dióxido de Carbono
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNase	Desoxirribonuclease
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FGF-2	Fator de crescimento fibroblástico básico
g	Gramas
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GPCR	Receptor acoplados à proteína G
h	Horas
HA	Hidroxiapatita
kV	Quilovolt
M	Molar
mA	Miliampere
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
mM	Milimolar
mm	Milímetros
Mg	Magnésio
mg	Miligramas
MgO	Óxido de magnésio
mL	Mililitros
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
nm	Nanômetros
OD	Densidade óptica
O ₂	Oxigênio
pH	Potencial hidrogeniônico
PO ₄ ³⁻	Íon fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
RNA	Ácido ribonucleico
SAS	Statistical Analysis System
SFB	Soro fetal bovino
Si	Sílica
SiO ₂	Óxido de sílica
UDESC	Universidade do Estado de Santa Catarina
VEGF	Fator de Crescimento Vascular Endotelial

Zr	Zircônia
ZrO ₂	Óxido de zircônia
β-TCP	Trifosfato de cálcio beta
μL	Microlitro
°C	Graus Celsius
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	25
2.1	CULTURA DE CÉLULAS.....	25
2.2	TECIDO ÓSSEO.....	27
2.3	FRATURAS E REPARO ÓSSEO.....	28
2.4	ANGIOGÊNESE E REPARO ÓSSEO.....	29
2.4.1	Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF).....	29
2.4.2	Fator de Crescimento Fibroblástico (FGF).....	30
2.5	MATERIAIS SUBSTITUTOS ÓSSEOS.....	31
2.5.1	Biomateriais.....	31
2.5.2	Biocerâmicas.....	33
2.5.3	Biocerâmicas de Fosfato de Cálcio.....	34
2.5.3.1	Hidroxiapatita.....	35
2.5.4	Zircônia (ZrO ₂).....	35
2.5.5	Sílica (SiO ₂).....	35
2.5.6	Magnésio (MgO).....	36
2.5.7	Nanocompósitos.....	36
2.6	ENSAIO <i>IN VITRO</i> : CITOTOXICIDADE.....	37
2.7	ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA PELA TÉCNICA DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE QUANTITATIVA EM TEMPO REAL.....	39
2.8	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	40
3	OBJETIVOS.....	41
3.1	Objetivo Geral.....	41
3.2	Objetivos Específicos.....	41
4	ARTIGO 1.....	43
4.1	INTRODUÇÃO.....	45
4.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	47
4.2.1	Obtenção das Biocerâmicas de Fosfato de Cálcio e Nanocompósitos de Matriz de Fosfato de Cálcio.....	47
4.2.2	Preparo de Meios para Cultivo Celular.....	47
4.2.3	Obtenção e Manutenção das Células.....	48
4.2.4	Preparo do Extrato dos Biomateriais em Grânulos.....	49
4.2.5	Determinação da Curva de Crescimento Celular.....	49

4.2.6	Determinação da Citotoxicidade dos Biomateriais pelo Teste MTT(3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina).....	50
4.2.7	Determinação da Interação Célula-Material por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	51
4.2.8	Reação em Cadeira da Polimerase Quantitativa em Tempo Real (qPCR).....	52
4.3	RESULTADOS.....	54
4.3.1	Curva de Crescimento Celular.....	54
4.3.2	Citotoxicidade dos Biomateriais pelo Teste MTT.....	55
4.3.3	Interação Célula-Material.....	56
4.3.4	Reação em Cadeira da Polimerase Quantitativa em Tempo Real (qPCR).....	57
4.4	DISCUSSÃO.....	59
4.5	CONCLUSÃO.....	63
4.6	AGRADECIMENTOS.....	63
5	ARTIGO 2.....	65
5.1	INTRODUÇÃO.....	67
5.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	69
5.2.1	Obtenção dos Nanocompósitos de Matriz de Fosfato de Cálcio.....	69
5.2.2	Preparo de Meios para Cultivo Celular.....	69
5.2.3	Obtenção e Manutenção das Células.....	70
5.2.4	Preparo do Extrato dos Biomateriais em Grânulos.....	71
5.2.5	Determinação da Curva de Crescimento Celular.....	71
5.2.6	Determinação da Citotoxicidade dos Biomateriais pelo Teste MTT(3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina).....	72
5.2.7	Determinação da Interação Célula-Material por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	73
5.2.8	Reação em Cadeira da Polimerase Quantitativa em Tempo Real (qPCR).....	74
5.3	RESULTADOS.....	75
5.3.1	Curva de Crescimento Celular.....	75
5.3.2	Citotoxicidade dos Biomateriais pelo Teste MTT.....	76
5.3.3	Interação Célula-Material.....	77
5.3.4	Reação em Cadeira da Polimerase Quantitativa em Tempo Real (qPCR).....	79

5.4	DISCUSSÃO.....	80
5.5	CONCLUSÃO.....	83
5.6	AGRADECIMENTOS.....	83
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFONSO, A.S. **Interação entre o biomaterial e o tecido ósseo**. Tese (Doutorado) Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto, Portugal, 1998. 208 p.
- AGUIRRE, A. et al. Control of microenvironmental cues with a smart biomaterial composite promotes endothelial progenitor cell angiogenesis. **European Cells and Materials**. v. 24, p. 90-106, 2012. Doi: 10.22203/eCM.v024a07
- AIVAZI, M. et al. Effect of Surface Modification on Viability of L929 Cells on Zirconia Nanocomposite Substrat. **J Lasers Med Sci**. v. 9, n. 2, p. 87-91, 2018. Doi: 10.15171/jlms.2018.18
- ALCAIDE, M. *et al.* L929 fibroblast and SAOS-2 osteoblast response to hydroxyapatite- β TCP/agarose biomaterial. **Wiley InterScience**. p. 539-549, 2008. Doi: 10.1002/jbm.a.31985
- ALMEIDA, U. **Análise e utilização de biomaterial confeccionado a partir das conchas de *Crassostrea gigas* em defeito periodontal em ratos**. 2010. Dissertação (Mestrado em Odontologia Clínica) - Universidade Positivo, Curitiba, 2010. 59 p.
- ALTMANN, B. et al. Cellular transcriptional response to zirconia-based implant materials. **Dental Materials**. v. 33, p. 241–255, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dental.2016.12.005>
- AMINI, A.R.; LAURENCIN, C.T.; NUKAVARAPU, S.P. Bone tissue engineering: recent advances and challenges. **Crit Rev Biomed Eng**. v.40, p. 363–408, 2012.
- ANSELME, K. Osteoblast adhesion on biomaterials. **Biomaterials**. v.21, p. 667-681, 2000.
- ARCOS, D.; VALLET-REGÍ, M. Sol–gel silica-based biomaterials and bone tissue regeneration. **Acta Biomaterialia**. v. 6, p. 2874-2888, 2010. Doi: 10.1016/j.actbio.2010.02.012
- BÄCHLE, M.; BUTZ, F.; HÜBNER, U.; BAKALINIS, E.; KOHAL, R.J. Behavior of CAL72 osteoblast-like cells cultured on zirconia ceramics with different surface topographies. **Clin. Oral Impl. Res**. v. 18, p. 53-59, 2007. Doi: 10.1111/j.1600-0501.2006.01292.x
- BASILICO, C.; MOSCATELLI, D. The FGF Family of Growth Factors and Oncogenes. **Advances in Cancer Research**. v. 59, 115-165, 1992. [https://doi.org/10.1016/S0065-230X\(08\)60305-X](https://doi.org/10.1016/S0065-230X(08)60305-X)
- BELLINI, O. J. Síntese e Caracterização de uma Matriz Óssea de Fosfato de Cálcio e Nanocompósitos Fosfato de Cálcio/SiO₂ para Substituição e Regeneração Óssea. **Dissertação de Mestrado**, Universidade do Estado de Santa Catarina, Joinville, 2007.

BODNAR, A. G. et al. Extension of life span by introduction of telomerase into normal human cells. **Science**. v. 279, p. 349-352, 1998. Doi: 10.1126/science.279.5349.349

BOSKEY, A.L. Natural And Synthetic Hydroxyapatites. In: RATNER, B.D.; HOFFMAN, A.S.; SCHOEN. F.J.; LEMONS, J.E. **Biomaterials Science- An Introduction to Materials in Medicine**. Academic Press: Oxford, 2013. 1573 p. p. 151-161. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-087780-8.00017-6>

BOULETREAU, P.J.; et al. Hypoxia and VEGF up-regulate BMP-2 mRNA and protein expression in microvascular endothelial cells: implications for fracture healing. **Plast Reconstr Surg**. v.109, p. 2384-2397, 2002. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12045566>

BRAMHILL, J.; ROSS, S.; ROSS, G. Bioactive Nanocomposites for Tissue Repair and Regeneration: A Review. **Int. J. Environ. Res. Public Health**. v.14, p.1-21, 2017. Doi:10.3390/ijerph14010066 www.mdpi

BURROWS, M.T. The cultivation of tissues of the chick-embryo outside the body. **JAMA**. v. 55, p. 2057-2058, 1910. Doi:10.1001/jama.1910.04330240035009

CALANDRELLI, L. et al. Development and performance analysis of PCL/silica nanocomposites for bone regeneration. **J Mater Sci: Mater Med**. v. 21, p. 2923-2936, 2010. Doi: 10.1007/s10856-010-4156-8

CALORI, G.M; MAZZA, E.; COLOMBO, M.; RIPAMONTI, C. The use of bone-graft substitutes in large bone defects: Any specific needs? **Injury**, v. 42, p.56-63, 2011. DOI: 10.1016/j.injury.2011.06.011

CAMARGO, N.H.A. **Elaboration et Caracterisation de Ceramique d'Alumine Sol-Gel Pure et de Nanocomposite Alumine Sol-Gel/Carbure de Silicium**. Tese de doutorado. Institut National de Sciences Appliquées de Lyon, 1995.

CAMARGO, N. H. A.; SOARES, C.; GEMELLI, E. Elaboration and characterization of nanostructured biocements for biomedical applications. **Material Research**, v. 10, n. 2 p. 135-140, 2007a.

CAMARGO, N.H.A.; BELLINI, O.J.; GEMELLI, E.; TOMIYAMA, M. Synthesis and characterization of nanostructured ceramics powders for biomedical applications. **Revista Matéria**. v. 12, n. 4, p. 574-582, 2007b. <Http://www.materia.coppe.ufrj.br/sarra/artigos/artigo10916>

CAMARGO, N. H. A.; DELIMA, S. A.; AGUIAR, J. F.; GEMELLI, E.; TOMIYAMA, M.; Synthesis and Characterization of Nanostructures Calcium Phosphates Powders and Calcium Phosphates/Al₂O₃ Nanocomposites. **Journal of Advanced Materials**, v. 41, n. 3, p. 33-43, 2009.

CAMARGO, N.H.A.; DELIMA, S.A.; GEMELLI, E. Synthesis and characterization of hidroxyapatite/TiO₂n nanocomposites for bone tissue regeneration. **American Journal of Biomedical Engineering**, vol.2, n°2, p.41-47, 2012.

- CAMARGO, N.H.A.; FRAN CZAK, P.F.; GEMELLI, E.; DA COSTA, B.D.; DE MORAES, A.N. Characterization of three calcium phosphate microporous granulated bioceramics. **Advanced Materials Research**. v. 936, p. 687-694, 2014a.
- CAMARGO, N.H.A.; GEMELLI, E.; DE MORAES, A.N.; DA COSTA, B.D.; OLESKOVICZ, N.; DALLABRIDA, A.; REGALIN, D.; LIMA, M.P.A. In Vivo Preliminary Study on Bone Neof ormation Behavior of Three Types of Calcium Phosphate Bioceramics. **Journal of Biosciences and Medicines**. v.2, p.36-42, 2014b.
- CARANO, R. A. D; FILVAROFF, E. H. Angiogenesis and Bone Repair. **Drug Discovery Today**, v. 8, p. 980-989, 2003. PMID: 14643161.
- CARREL, A.; BURROWS, M.T. Cultivation of tissues in vitro and its technique. **J Exp Med**. v. 13, p. 387-396, 1911.
- CARREL, A. A method for the physiological study of tissues in vitro. **J Exp Med**. 38, p. 407-418, 1923.
- CARSON, J.S.; BOSTROM, M.P. Synthetic bone scaffolds and fracture repair. **Injury**. v. 38, p. 33-37, 2007. Doi:10.1016j.injury.2007.02.008
- CATLEDGE, S.A.; et al. Nanostructured Ceramics for Biomedical Implants. **J. Nanosci. Nanotech**. v. 2, p. 293-312, 2002. Doi:10.1166/jnn.2002.116
- CHEN, Y. et al. Enhanced effect of b-tricalcium phosphate phase on neovascularization of porous calcium phosphate ceramics: *In vitro* and *in vivo* evidence. **Acta Biomaterialia**. v. 11, p. 435-448, 2015. Doi: 10.1016/j.actbio.2014.09.028
- CHEN, Y; WEBSTER, T.J. Nanostructured biomaterials for artificial tissues and organs. In: LYSAGHT, M; WEBSTER, T.J. **Biomaterials for Artificial Organs**. Woodhead Publishing Series in Biomaterials, p. 236-269, 2011. Doi: 10.1533/9780857090843.2.236
- CHIOU, M.; XU, Y.; LOGAKER, M.T. Mitogenic and chondrogenic effects of fibroblast growth factor-2 in adipose-derived mesenchymal cells. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 343(2), p. 644-652, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.02.171>
- CLAES, L.; RECKNAGEL, S.; IGNATIUS, A. Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. **Nature Reviews - Rheumatology**. v. 8, p. 133-143, 2012. Doi: 10.1038/nrrheum.2012.1
- CLARKE, S.A.; WALSH, P. Marine organisms for bone repair and regeneration. **Bone Substitute Biomaterials**. v. 1, p. 294-318, 2014. Doi: 10.1533/9780857099037.3.294
- COLLINS, K.; MITCHELL, J. R. Telomerase in the human organism. **Oncogene**. v. 21, p. 564-579, 2002. DOI: 10.1038/sj.onc.1205083

CONSTANTINO, P. D. *et al.* Hydroxyapatite cement: Basic chemistry and histologic properties. **Arch. Otolaryngol Head Neck Surgery**, v. 117, p. 379-384, 1991.

CORREA, P. Síntese e caracterização de nanocompósitos HA/Al₂O₃-α sol-gel para aplicações na reconstrução óssea. **Dissertação de Mestrado**. Universidade do Estado de Santa Catarina, Joinville, 2013.

DAY, R.M. Bioactive Glass Stimulates the Secretion of Angiogenic Growth Factors and Angiogenesis *in Vitro*. **Tissue Engineering**. v. 11, p. 768- 781, 2005. Doi: 10.1089/ten.2005.11.768

DAY, R.M. *et al.* *In vitro* and *in vivo* analysis of macroporous biodegradable poly(D,L-lactide-co-glycolide) scaffolds containing bioactive glass. **J. Biomed. Mater. Res. A**. v. 15, p. 778-87, 2005. Doi: 10.1002/jbm.a.30433

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV). In: **Microscopia Eletrônica de Varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores**. Edipucrs, Porto Alegre, cap.1, p. 9-26, 2007. <http://www.pucrs.br/edipucrs/online/microscopia.pdf>

DEMERS, C. *et al.* Natural coral exoskeleton as a bone graft substitute: A review. **Bio-Medical Materials and Engineering**. v. 12, p. 1-21, 2002.

DOROZHKIN, S. Calcium orthophosphates. **Journal of Materials Science**. v. 42, n. 4, p.1061-1095, 2007.

DOROZHKIN, S. Bioceramics of calcium orthophosphates. **Biomaterials**, v. 31, p. 1465-85, 2010.

DOS SANTOS, R.B.M. **Síntese e caracterização de pós nanoestruturados de fosfato de cálcio e nanocompósitos hidroxiapatita/sílica gel**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Joinville, SC. 2009. 87p.

DULBECCO, R.; FREEMAN, G. Plaque production by the polyoma virus. **Virology**. v. 8, p. 396-397, 1959.

EAGLE, H. Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. **Science**. v. 130, p. 432-437, 1959.

EFFROS, R. B.; DAGARAG, M.; VALENZUELA, H. F. *In vitro* senescence of immune cells. **Exp. Gerontol**. v. 38, p. 1243-1249, 2003. DOI: 10.1016/j.exger.2003.09.004

ELIAZ, N.; METOKI, N. Calcium Phosphate Bioceramics: A Review of Their History, Structure, Properties, Coating Technologies and Biomedical Applications. **Materials**. v. 10, n. 334, 2017. Doi:10.3390/ma10040334

EMING, S.A.; WYNN, TA.; MARTIN, P. Inflammation and metabolism in tissue repair and regeneration. **Science**. v. 356, p. 1026-1030, 2017. Doi: 10.1126/science.aam7928

ENGSIG, M.T. et al. Matrix metalloproteinase 9 and vascular endothelial growth factor are essential for osteoclast recruitment into developing long bones. **J. Cell Biol.** v.151, p. 879-889, 2000. <http://www.jcb.org/cgi/content/full/151/4/879>

FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique.** 4 ed. Wiley-Liss, 2000. 577p.

FRICAIN, J.C. et al. Cytocompatibility study of organic matrix extracted from Caribbean coral porites astroides. **Biomaterials.** v. 23. p. 673–679. 2002. Doi: 10.1016/S0142-9612(01)00155-7

FAJARDO, A.; PEREIRA, A.G.B.; MUNIZ, E. Hydrogels Nanocomposites Based on Crystals, Whiskers and Fibrils Derived from Biopolymers. **Advanced Structured Materials.** v. 74, p. 43-71, 2015. Doi: 10.1007/978-81-322-2473-0_2

GAO, Y. *et al.* Characterization and osteoblast-like cell compatibility of porous scaffolds: bovine hydroxyapatite and novel hydroxyapatite artificial bone. **Journal of Material Science.** v. 17. p. 815–823. 2006.

GERBER, H.; VU, T.H.; RYAN, A.M.; KOWALSKI, J.; MERB, Z.; FERRARA, N. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. **Nature Medicine,** vol. 5, n. 6, p. 623-628, 1999. Doi: 10.1038/9467

GERBER, H. FERRARA, N. Angiogenesis and bone growth. **Trends in Cardiovascular Medicine,** vol.10, n.5, p. 223-228, 2000.

GEY, G., COFFMAN, W., KUBIECEK, M. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. **Cancer Res.** v. 12, p. 264-265, 1952.

GINEBRA, M.P. **Desarrollo y caracterización de un cement óseo basado en fosfato tricálcico alfa para aplicaciones quirúrgicas.** Tese (Doutorado em Ciências) - Universidad Politécnica de Catalunã, Barcelona, Espanha, 1996.

GLOWACKI, J. Angiogenesis in Fracture Repair. **Clinical Orthopaedics And Related Research.** v. 355. p. 82-89. 1998.

GOSPODAROWICZ, D. et al. Factors involved in the modulation of cell proliferation in vivo and in vitro: The role of fibroblast and epidermal growth factors in the proliferative response of mammalian cells. **In Vitro.** v. 14, p. 85-118, 1978. <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02618177>

GSTRAUNTHALER, G. Alternatives to the use of fetal bovine serum: serum-free cell culture. **ALTEX.** n. 20, p. 275-281, 2003.

GU, X. et al. Corrosion of, and cellular responses to Mg–Zn–Ca bulk metallic glasses. **Biomaterials.** v. 31, p. 1093-1103, 2010. Doi:10.1016/j.biomaterials.2009.11.015

HAN, P.; WU, C.; XIAO, Y. The effect of silicate ions on proliferation, osteogenic differentiation and cell signalling pathways (WNT and SHH) of bone marrow stromal cells. **Biomater. Sci.** v. 1, p. 379-392, 2013. Doi: 10.1039/c2bm00108j

HARLEY, C.B.; FUTCHER, A.B.; GREIDER, C.W. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. **Nature**. Vol. 345, 1990.

HAUSMAN, M.R.; SCHAFFLER, M.B.; MAJESKA, R.J. Prevention of Fracture Healing in Rats by an Inhibitor of Angiogenesis. **Bone**. v. 29, p. 560-564, 2001. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11728927>

HAYFLICK, L.; MOORHEAD, P.S. The serial cultivation of human diploid cell strains. **Experimental Cell Research**. n. 25, p. 585-621, 1961.

HENCH, L.L. Bioceramics: From concept to clinic. **Journal of the American Ceramic Society**. v.74, p. 1487-510, 1991.

HENCH, L.L. Bioceramics, **J. Am. Ceram. Soc.**, v.81, p. 1705-1728, 1998. <https://doi.org/10.1111/j.1151-2916.1998.tb02540.x>

HENCH, L.L. The Skeletal System. In: HENCH, L. L.; JONES, J. R. **Biomaterials, Artificial Organs and Tissue Engineering**. Boca Raton: CRC Press; Cambridge: Woodhead, 2005. 304 p. p. 215-226.

HENCH, L.L.; BEST, S.M. Ceramics, Glasses, and Glass-Ceramics: Basic Principles. In: RATNER, B.D.; HOFFMAN, A.S.; SCHOEN, F.J.; LEMONS, J.E. **Biomaterials Science- An Introduction to Materials in Medicine**. Academic Press: Oxford, 2013. 1573 p. p. 128-151. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-087780-8.00016-4>

HISBERGUES, M.; VENDEVILLE, S.; VENDEVILLE, P. Zirconia: Established Facts and Perspectives for a Biomaterial in Dental Implantology. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**. p.519-529, 2008. Doi: 10.1002/jbm.b.31147

ISO 10993-5. Biological evaluation of medical devices part 5: tests for cytotoxicity: in vitro methods. **International Organization for standardization**, Geneva, 2009.

ITTHICHAISRI, C. et al. Comparative *in vitro* study of the proliferation and growth of human osteoblast-like cells on various biomaterials. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**. p. 777-787, 2007. Doi: 10.1002/jbm.a

JOHNSON, D.E. et al. Diverse forms of a receptor for acidic and basic fibroblast growth factors. **Molecular and Cellular Biology**. v. 10(9), p. 4728-4736, 1990. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2167437>

JOSKO, J.; GWOZDZ, B.; JEDRZEJOWSKA-SZYPULKA, H.; HENDRYK, S. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its effect on angiogenesis. **Med Sci Monit**. v. 6, p. 1047-1052, 2000. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11208453>

JOSSET, Y.; et al. *In vitro* reactions of human osteoblasts in culture with zirconia and alumina ceramics. **J Biomed Mater Res.** p. 481-93, 1999.

JUGDAOHSINGH, R. Silicon And Bone Health. **J Nutr Health Aging.** v.11. p.99-110, 2007. PMC2658806

JUN, Y. K.; KIM, W. H.; KWEON, O. K.; HONG, S. H. The Fabrication and Biochemical Evaluation of Alumina Reinforced Calcium Phosphate Porous Implants, **Biomaterials.** v. 24, p. 3731-3739, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00248-5](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00248-5)

JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica.** 12 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KAMITAKAHARA, M.; OHTSUKI, C.; MIYASAKI, T. Review Paper: Behavior of Ceramic Biomaterials Derived from Tricalcium Phosphate in Physiological Condition. **Journal of Biomaterials Applications.** v. 23, p.197-21, 2008. Doi: 10.1177/0885328208096798

KANAYA, S. et al. Extracellular calcium increases fibroblast growth factor 2 gene expression via extracellular signalregulated kinase 1/2 and protein kinase A signaling in mouse dental papilla cells. **J Appl Oral Sci.** v. 26, 2017. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-7757-2017-0231>

KANCZLER, J.; OREFFO, R. Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone. **European Cells and Materials.** v. 15. p.100–114. 2008.

KARIMI, Z. et al. Evaluation of the proliferation and viability rates of nucleus pulposus cells of human intervertebral disk in fabricated chitosan-gelatin scaffolds by freeze drying and freeze gelation methods. **Adv Biomed Res.** v. 30, 2015. Doi: 10.4103/2277-9175.170676.

KAYHAN, S.M. et al. Experimental and Numerical Investigations for Mechanical and Microstructural Characterization of Micro-Manufactured AZ91D Magnesium Alloy Discs for Biomedical Applications. **Materials & Design.** 2016. Doi: 10.1016/j.matdes.2015.12.17

KERAMARIS, N. C. et al. Fracture vascularity and bone healing: A systematic review of the role of VEGF. **International Journal os the Care of the Injured.** v. 39S2, p. 45-57, 2008. Doi: 10.1016/S0020-1383(08)70015-9

KESHAW, H.; FORBES, A.; DAY, R.M. Release of angiogenic growth factors from cells encapsulated in alginate beads with bioactive glass. **Biomaterials.** v. 26, 4171, 2005. Doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.10.021

KESHAW, et al. Assessment of Polymer/Bioactive Glass-Composite Microporous Spheres for Tissue Regeneration Applications. **Tissue Eng Part A.** v. 15, p. 1451-1461, 2009. Doi: 10.1089/ten.tea.2008.0203.

KIM, N.W. et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. **Science**. v. 266, p. 2011-2015, 1994. DOI: 10.1126/science.7605428

KIM, S.; KONG, Y. M.; LEE, I. S.; KIM, H. E. Effect of Calcinations of Starting Powder on Mechanical Properties of Hydroxyapatite-Alumina Bioceramic Composite, **Journal of Materials Science in Medicine**, v. 13, p. 307-310, 2002.

KIRKPATRICK, C.J.; MITTERMAYER, C. Theoretical and practical aspects of testing potential biomaterials in vitro. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**. p. 9-13. 1990.

KOLK, A. et al. Current trends and future perspectives of bone substitute materials - From space holders to innovative biomaterials. **Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery. Munich**. p. 706-718, 2012. Doi: 10.1016/j.jcms.2012.01.002

KUMTA, P.N.; SFEIR, C.; LEE, D.; OLTON, D.; CHOI, D. Nanostructured calcium phosphates for biomedical applications: novel synthesis and characterization. **Acta Biomaterialia**, p. 65-83, 2005. Doi:10.1016/j.actbio.2004.09.008

LE GEROS, R.Z. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. **Clin Orthop Relat Res**. v. 395, p. 81-98, 2002. PMID: 11937868

LI, H.; CHANG, J. Bioactive silicate materials stimulate angiogenesis in fibroblast and endothelial cell co-culture system through paracrine effect. **Acta Biomaterialia**. v. 9 p. 6981-6991, 2013. Doi: 10.1016/j.actbio.2013.02.014

LI, L.; GAO, J.; WANG, Y. Evaluation of cyto-toxicity and corrosion behavior of alkali-heat-treated magnesium in simulated body fluid. **Surface & Coatings Technology**. v. 185, p. 92-98, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2004.01.004>

LI, Z. et al. The development of binary MgCa alloys for use as biodegradable materials within bone. **Biomaterials**. v. 29, p. 1329-1344, 2008. Doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.12.021

LICHTE, P. et al. Impaired Fracture Healing after Hemorrhagic Shock. Mediators of Inflammation. v. 2015. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/132451>

LYGRE, H. *et al.* Biologic testing of leachable aromatic compounds from denture base materials. **Acta Odontologica Scandinavica**. v. 53. p. 397-40. 1995.

LYNCH, R.G. Tissue culture of mammalian cells. **ASIP Pathways**. v. 3, n. 2, 2008.

MALHOTRA, A.; HABIBOVIC, P. Calcium Phosphates and Angiogenesis: Implications and Advances for Bone Regeneration. **Trends in Biotechnology**. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.07.005>

MARCHI, J. et al. Cell Response of Calcium Phosphate Based Ceramics, a Bone Substitute Material. **Materials Research**. v. 16, p.703-712, 2013. Doi: 10.1590/S1516-14392013005000058

MARQUES, A.P. *et al.* The biocompatibility of novel starch-based polymers and composites: in vitro studies. **Biomaterials**. v. 23. p. 1471-1478, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(01\)00272-1](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(01)00272-1)

MARQUES, et al. Bone healing in titanium and zirconia implants surface: a pilot study on the rabbit tibia. **RSBO**. v.10. p.110-115, 2013.

MARSELL, R.; EINHORN, T.A. The Biology of Fracture Healing. **Injury, Int. J. Care Injured**. v. 42, p. 551-555, 2011. Doi:10.1016/j.injury.2011.03.031

MASSON, A.O.; LOMBELLO, C.B. Metodologias de Avaliação Citotóxica: Estudo Comparativo segundo Tempo de Exposição. **9º Congresso Latino-Americano de Órgão Artificiais e Biomateriais**. Foz do Iguaçu- PR, 2016.

MASUTOMI, K. et al. Telomerase maintains telomere structure in normal human cells. **Cell**. v. 114, p. 241-253, 2003. Doi:10.1016/S0092-8674(03)00550-6

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**. v. 454, p. 428-435, 2008. Doi: 10.1038/nature07201

MERTEN, O.W. Introduction to animal cell culture technology - past, present and future. **Cytotechnology**. v. 50, p. 1-7, 2006.

MIDY, V.; PLOUËT, J. Vasculotropin/Vascular endothelial growth factor induces differentiation in cultured osteoblasts. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, vol. 199, n. 1, p.380-386, 1994.

MONTAZEROLGHAEM, M.; KARLSSON OTT M.; ENGQVIST, H.; MELHUS, H.; RASMUSSEN, A.J. Resorption of monetite calcium phosphate cement by mouse bone marrow derived osteoclasts. **Materials Science and Engineering**. p.212–218. 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2015.03.038>

MOOSVI, S.R.; DAY, R.M. Bioactive glass modulation of intestinal epithelial cell restitution. **Acta Biomater**. v. 5, p. 76-83, 2009. Doi: 10.1016/j.actbio.2008.08.003

MORGANTE, C.V.; BLAWID, R. Análise da Expressão Gênica pela Técnica de PCR Quantitativa em Tempo Real: Princípios e Fundamentos. Petrolina: **Embrapa Semiárido**, 2016. <https://www.embrapa.br/fale-conosco/sac>

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**. v. 65. p. 55-63. 1983.

MOUR, M. et al. Advances in Porous Biomaterials for Dental and Orthopaedic Applications. **Materials**. v.3, p.2947-2974, 2010. Doi:10.3390/ma3052947

MULLIS, K.B. The unusual origin of the polymerase chain reaction. **Scientific American**. v. 262, p. 56-65, 1990.

- MURAMAKI, M.; SIMONS, M. Fibroblast growth factor regulation of neovascularization. **Current Opinion in Hematology**. v.15, p.215-220, 2008. Doi: 10.1097/MOH.0b013e3282f97d98
- MUSCHLER, G.F.; NAKAMOTO, C.; GRIFFITH, L.G. Engineering Principles of Clinical Cell-Based Tissue Engineering. **J Bone Joint Surg Am**. v. 86, p.1541-1558, 2004.
- NAKAGAWA, M. et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) directly enhances osteoclastic bone resorption and survival of mature osteoclasts. **FEBS Lett**. v. 473, p. 161-164, 2000. <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1016/S0014-5793%2800%2901520-9>
- NI, G.X. et al. Interfacial behavior of strontium-containing hydroxyapatite cement with cancellous and cortical bone. **Biomaterials**. v. 27, p. 5127-5133, 2006. Doi:10.1016/j.biomaterials.2006.05.030
- NICHOLAS, J.S. Ross Granville Harrison 1870-1959. **Yale J. Biol. Med**. v. 32, p. 497-412, 1960.
- OLIVEIRA, L.S.A.F.; OLIVEIRA, C.S.; MACHADO, A.P.L.; ROSA, F.P. Biomateriais com aplicação na regeneração óssea – método de análise e perspectivas futuras. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**. v. 9, p. 37-44, 2010. <https://repositorio.ufba.br/ri/bitstream/ri/1560/1/3503.pdf>
- OSATHANON, T. et al. Microporous nanofibrous fibrin-based scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**. v. 29, n. 30, p. 4091-4099, 2008. Doi:10.1016/j.biomaterials.2008.06.030
- OYELEYE, O.O.; et al. Basics of animal cell culture: Foundation for modern Science. **Biotechnology and Molecular Biology Reviews**. v. 11, p. 6-16, 2016.
- O'BRIEN, F.J. Biomaterials & Scaffolds for Tissue Engineering. **Materials Today**. v. 14, p. 88-95, 2011. [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(11\)70058-X](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(11)70058-X)
- PAE, A. et al. Attachment and growth behaviour of human gingival fibroblasts on titanium and zirconia ceramic surfaces. **Biomed. Mater**. v. 4, 2009. Doi: 10.1088/1748-6041/4/2/025005
- PAE, A. et al. Cell attachment and proliferation of bone marrow-derived osteoblast on zirconia of various surface treatment. **J Adv Prosthodont**. v.6, p. 96-102, 2014. <http://dx.doi.org/10.4047/jap.2014.6.2.96>
- PARDUE, E.L.; IBRAHIM, S.; RAMAMURTHI, A. Role of hyaluronan in angiogenesis and its utility to angiogenic tissue engineering. **Organogenesis**. v. 4, p. 203-214, 2008. <http://www.landesbioscience.com/journals/organogenesis/article/6926>
- PICONI, C; MACCAURO, G. Zirconia as a ceramic biomaterial. **Biomaterials**. v. 20, p. 1-25, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(98\)00010-6](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(98)00010-6)

PIRES, A.L.R.; BIERHALZ, A.C.K.; MORAES, A.M. Biomateriais: Tipos, Aplicações e Mercado. **Quim. Nova**, v. 38, n. 7, 957-971, 2015. <http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20150094>

POPP, J.R.; LAFLIN, K.E.; LOVE, B.J.; GOLDSTEIN, A.S. In vitro evaluation of osteoblastic differentiation on amorphous calcium phosphate-decorated poly(lactic-co-glycolic acid) scaffolds. **J Tissue Eng Regen Med**. v. 5, p. 780-789, 2011. Doi: 10.1002/term.376

RAAB, S. et al. A Comparative View on Human Somatic Cell Sources for iPSC Generation. **Stem Cells International**. v. 2014, p. 1-12, 2014.

RATNER, B.D. *et al.* **Biomaterials Science: An introduction to materials in medicine**. Academic Press. 2 ed. 2004. 879 p.

REE, S.; CHOI, J. Preparation of a Bioactive Poly(methyl methacrylate)/Silica Nanocomposite. **J. Am. Ceram. Soc.** v. 85, p. 1318-1320, 2002. Doi: 10.1111/j.1151-2916.2002.tb00269.x

REKAWIECKI, R.; RUTKOWSKA, J.; KOTWICA, J. Identification of optimal housekeeping genes for examination of gene expression in bovine corpus luteum. **Reproductive Biology**. v. 12, p. 362-367, 2012. Doi: 10.1016/j.repbio.2012.10.010

RINGER, S. Concerning the influence exerted by each of the constituents of the blood on the contraction of the ventricle. **The Journal of Physiology**. v. 3, p. 380-393, 1882.

RINGER, S. A further contribution regarding the influence of the different constituents of the blood on the contraction of the heart. **The Journal of Physiology**. 4, p. 29-42, 1883.

RODAN, G. A. Introduction to bone biology. **Bone**. v. 13, p. S3-S6, 1992. Doi: 10.1016/S8756-3282(09)80003-3

ROUWKEMA, J.; RIVRON, N.C.; BLITTERSWIJK, A. Vascularization in tissue engineering. **Trends in Biotechnology**. v.26, n. 8, p. 434-441, 2008. Doi:10.1016/j.tibtech.2008.04.009

SALGADO, A.J; COUTINHO, O.P.; REIS, R.L. Bone Tissue Engineering: State of the Art and Future Trends. **Macromol. Biosci**. v. 4, p. 743-765, 2004. Doi: 10.1002/mabi.200400026

SARAN, U.; PIPERNI, S.G.; CHATTERJEE, S. Role of angiogenesis in bone repair. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 561, p. 109-117, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2014.07.006>

SARIS, N.L.; et al. Magnesium: An update on physiological, clinical and analytical aspects. **Clinica Chimica Acta**. v. 294, p.1-26, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(99\)00258-2](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(99)00258-2)

SELVAKUMARAN, J.; JELL, G. A guide to basic cell culture and applications in biomaterials and tissue engineering. In: HENCH, L. L.; JONES, J. R. **Biomaterials, Artificial Organs and Tissue Engineering**. Boca Raton : CRC Press; Cambridge : Woodhead, 2005. 304 p. p. 215-226.

SEZER, N.; EVIS, Z.; KAYHAN, S.M.; TAHMASEBIFAR, A.; KOÇ, M. Review of magnesium-based biomaterials and their applications. **Journal of Magnesium and Alloys**. p.1-21, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jma.2018.02.003>

SHAPIRO, F. Bone Development and its Relation to Fracture Repair. The Role of Mesenchymal Osteoblasts and Surface Osteoblasts. **European Cells and Materials**. v. 15, p. 53-76, 2008. Doi: 10.22203/eCM.v015a05

SHAY, J.W.; WRIGHT, W.E. The use of telomerized cells for tissue engineering. **Nat. Biotech.** v.18, p. 22-23, 2000.

SHI, X.; ZHOU, K.; HUANG, F.; WANG, C. Interaction of hydroxyapatite nanoparticles with endothelial cells: internalization and inhibition of angiogenesis in vitro through the PI3K/Akt pathway. **International Journal of Nanomedicine**. v. 12, p. 5781-5795, 2017. <https://doi.org/10.2147/IJN.S140179>

SHI, Z.; et al. Study of the magnesia additive on the characterization of zirconia–magnesia composite sphere. **Microporous and Mesoporous Materials**. v. 94, p. 34-39, 2006. Doi:10.1016/j.micromeso.2006.03.017

SHIRLEY, D. et al. Systemic recruitment of osteoblastic cells in fracture healing. **Journal of Orthopaedic Research**. v. 23, p. 1013-1021, 2005. Doi: 10.1016/j.orthres.2005.01.013

SIVAKUMAR, M.; KUMAR, T.S.S.; SHANTHA, K.L.; RAO, K.P. Development of hydroxyapatite derived from Indian coral. **Biomaterials**. v. 17, p. 9-14, 1996.

SILBER, J.S. et al. Donor site morbidity after anterior iliac crest bone harvest for single-level anterior cervical discectomy and fusion. **Spine**. v. 28, p. 134-139, 2003. Doi:10.1097/00007632-200301150-00008

SILVA, D.F. **Desenvolvimento de Biocerâmicas de Origem Fossilizada para Reconstrução e Neoformação Óssea**. 1 ed. Curitiba: Editora Appris, 2018. 173 p.

SILVA, D.F.; FRIIS, T.E.; CAMARGO, N.H.A.; XIAO, Y. Characterization of mesoporous calcium phosphates from calcareous marine sediments containing Si, Sr and Zn for bone tissue engineering. **J. Mater. Chem. B**, 2016, Doi: 10.1039/C6TB02255C

SIQUEIRA, L.C.B. **Formulação e caracterização de biomateriais compósitos com hidroxiapatita**. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais) - Universidade Estadual do Norte Fluminense. Campo dos Goytacazes, RJ. 2009. 136 p.

SIQUEIRA, L.; *et al.* Influence of the addition of β -TCP on themorphology, thermal properties and cell viability of poly (lactic acid) fibers obtained by electrospinning. **Materials Science and engineering**. p. 135-143. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.03.055>

SLOCUM, H.K. et al. Characterization of cells obtained by mechanical and enzymatic means from human melanoma, sarcoma, and lung tumors. **Cancer Research**. n. 41, p. 1428-1434, 1981.

SOHIER, J.; MORONI, L.; BLITTERSWIJK, C.; DE GROOT, K.; BEZEMER, J.M. Critical factors in the design of growth factor releasing scaffolds for cartilage tissue engineering. **Expert Opin Drug Deliv**. v. 5, p. 543-66, 2008. Doi: 10.1517/17425247.5.5.543

STEGEN, S.; GASTEL, N.; CARMELIET, G. Bringing new life to damaged bone: The importance of angiogenesis in bone repair and regeneration. **Bone**. v. 70, p. 19-27, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2014.09.017>

STUTTFELD, E.; BALLMER-HOFER, K. Structure and Function of VEGF Receptors. **IUMBM Life**, vol. 61, p.915-922, 2009.

SUN, T. et al. Hydroxyapatite Nanowire@Magnesium Silicate Core-Shell Hierarchical Nanocomposite: Synthesis and Application in Bone Regeneration. **ACS Appl. Mater. Interfaces**. 2017. Doi: 10.1021/acsami.7b03532

TANG, Y.; ZHAO, Y.; WNAG, X.; LIN, T. Layer-by-layer assembly of silica nanoparticles on 3D fibrous scaffolds: Enhancement of osteoblast cell adhesion, proliferation, and differentiation. **J Biomed Mater Res A**. v. 102, p. 3803-3812, 2014. Doi: 10.1002/jbm.a.35050.

TAKAMORI, E.R. Estudo *in vitro* da citotoxicidade do osso bovino misto quimicamente tratado. **Dissertação** (Mestrado em Biologia Funcional e Molecular) - Universidade Estadual de Campinas, 2004.

THISSE, B.; THISSE, C. Functions and regulations of fibroblast growth factor signaling during embryonic development. **Developmental Biology**. v. 287, p. 390-402, 2005. Doi:10.1016/j.ydbio.2005.09.011

URIO, M. Viabilidade de células bovinas submetidas a diferentes estratégias de criopreservação. **Dissertação** (Mestrado em Ciência Animal). Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, SC. 2012.

VALLET-REGÍ, M. Revisiting ceramics for medical applications. **Dalton Trans**. p. 5211-5220, 2006. Doi: 10.1039/b610219k

VALLET-REGÍ, M.; FRANCISCO, B. Silica Materials for Medical Applications. **The Open Biomedical Engineering Journal**. v.2, p. 1-9, 2008. Doi: 10.2174/1874120700802010001

VAN DER STOK, J. et al. Bone substitutes in the Netherlands – A systematic literature review. **Acta Biomaterialia**. v. 7, p. 739-750, 2011.

Doi: 10.1016/j.actbio.2010.07.035

VISWANATH, V.; RAVISHANKAR, N. Interfacial reactions in hydroxyapatite/ alumina nanocomposites. **Scripta Materialia**, v. 55, p. 863-866, 2006.

<https://doi.org/10.1016/j.scriptamat.2006.07.049>

VON RECUM, A.F.; LABERGE, M. Educational Goals for Biomaterials Science and Engineering: Prospective View. **Journal of Applied Biomaterials**, v. 6, p. 137-144, 1995.

VORMANN, J. Magnesium: nutrition and metabolism. **Molecular Aspects of Medicine**. v. 24, p. 27-37, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0098-2997\(02\)00089-4](https://doi.org/10.1016/S0098-2997(02)00089-4)

WANG, J., CHEN Y., ZHU X., YUAN T., TAN Y., FAN Y. Effect of phase composition on protein adsorption and osteoinduction of porous calcium phosphate ceramics in mice. **Journal of Biomedical Material Research**. Part A. p. 2247-2255, 2014.

WANG, S. et al. Bioactive and biodegradable silica biomaterial for bone regeneration. **Bone**. v. 67, p. 292-304, 2014.

WANG, T.; ZHANG, X.; BIKLE, D.D. Osteogenic Differentiation of Periosteal Cells During Fracture Healing. **Journal of Cellular Physiology**. p. 913-921, 2016. Doi: 10.1002/jcp.25641

WEBLER, G.D. et al. Characterization and evaluation of cytotoxicity of biphasic calcium phosphate synthesized by a solid state reaction route. **Current Applied Physics**. v. 14, p. 876-880, 2014. Doi 10.1016/j.cap.2014.03.026

WEI, G.; MA, P.X. Nanostructure biomaterials for regeneration. **Adv Funct Mater**. v. 18, p. 3566–3582, 2008. Doi:10.1002/adfm.200800662.

WENNBERG, A. et al. A method for toxicity screening of biomaterials using cells culture on Millipore filters. **Journal of Biomedical Material Research**. Vol.13:109-20, 1979.

WILLIAMS, D. F. Definitions in Biomaterials. **Journal of Polymer Science Part C: Polymer Letters**. v. 26, n. 9, p. 381-416, 1987.

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

WITKOWSKY, J.A. Dr. Carrel's immortal cells. **Medical History**. n. 28, p. 129-142, 1980.

WOLF, F.I.; CITTADINI, A. Chemistry and biochemistry of magnesium. **Molecular Aspects of Medicine**. v. 24, p. 3-9, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0098-2997\(02\)00087-0](https://doi.org/10.1016/S0098-2997(02)00087-0)

- WU, A.C.; RAGGATT, L.; ALEXANDER, K.A.; PETTIT, A.R. Unraveling macrophage contributions to bone repair. **BoneKey Reports**. v. 373, p. 1-7, 2013. Doi:10.1038/bonekey.2013.107
- WU, C.; CHANG, J. A review of bioactive silicate ceramics. **Biomed. Mater.** v. 8, p. 1-12, 2013. Doi: 10.1088/1748-6041/8/3/032001
- WU, Y.H. et al. *In vitro* Study on Biodegradable AZ31 Magnesium Alloy Fibers Reinforced PLGA Composite. **J. Mater. Sci. Technol.** v.29, p. 545-550, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmst.2013.03.004>
- XIA, L. et al. Akermanite bioceramics promote osteogenesis, angiogenesis and suppress osteoclastogenesis for osteoporotic bone regeneration. **Sci Rep**. v. 25, 2016. Doi: 10.1038/srep22005.
- XYNOS, I.D. et al. Bioglass 45S5 Stimulates Osteoblast Turnover and Enhances Bone Formation In Vitro: Implications and Applications for Bone Tissue Engineering. **Calcif Tissue Int.** v.67, p. 321-329, 2000. Doi: 10.1007/s002230001134
- YANG, S.; LEONG, K.; ZHAOHUI, D.; CHUA, C. The Design of Scaffolds for Use in Tissue Engineering. Part I. Traditional Factors. **Tissue Engineering**. v. 7, n. 6, p. 679-689, 2001. Doi: 10.1089/107632701753337645
- YAO, T.; ASAYAMA, Y. Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. **Reproductive Medicine and Biology**. v. 16, p. 99-117, 2017.
- YOSHIKAWA, H.; MYOUI, A. Bone tissue engineering with porous hydroxyapatite ceramics. **J Artif Organs**. v. 8, p. 131-136, 2005. Doi: 10.1007/s10047-005-0292-1
- YU, D. et al. Bone regeneration of critical calvarial defect in goat model by PLGA/TCP/rhBMP-2 scaffolds prepared by lowtemperature rapidprototyping technology. **Int. J. Oral. Maxillofac. Surg.** v. 37, p. 929-934, 2008. Doi:10.1016/j.ijom.2008.07.012
- YU, H, et al. Ductile Biodegradable Mg-Based Metallic Glasses with Excellent Biocompatibility. **Adv. Funct. Mater.** v. 23, p. 4793–4800, 2013. Doi: 10.1002/adfm.201203738
- YUAN, H., *et al.* Cross-species comparison of ectopic bone formation in biphasic calcium phosphate (BCP) and hydroxyapatite (HA) scaffolds. **Tissue Engineering**. v. 12, p. 1607–15, 2006.
- YUASA, T. *et al.* Effects of apatite cements on proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. **Biomaterials**. v. 25, p. 1159-1166, 2004.
- ZAHA, A. Controle da expressão gênica em eucariotos. In: ZAHA, A.; FERREIRA, H.B.; PASSAGLIA, L.M.P. **Biologia Molecular Básica**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

ZEMTSOVA, G.E.; MONTGOMERY, M.; LEVIN, M.L. Relative Sensitivity of Conventional and Real Time PCR Assays for Detection of SFG Rickettsia in Blood and Tissue Samples from Laboratory Animals. **Plos One**. v. 10, p. 1-7, 2015. Doi:10.1371/journal.pone.0116658

ZHANG, C. et al. Angiopoiesis and bone regeneration via coexpression of the hVEGF and hBMP genes from na adeno-associated viral vector *in vitro* and *in vivo*. **Acta Pharmacologica Sinica**. v. 31, p. 821-830, 2010.

ZHANG, H. *et al.* Biocompatibility and osteogenesis of calcium phosphate composite scaffolds containing simvastatin-loaded PLGA microspheres for bone tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research**. Part A. p. 1-9, 2015. Doi: 10.1002/jbm.a.35463

ZHANG, S. et al. Research on an Mg–Zn alloy as a degradable biomaterial. **Acta Biomaterialia**. v. 6, p. 626-640, 2010. Doi:10.1016/j.actbio.2009.06.028

ZHAI, W. et al. Silicate bioceramics induce angiogenesis during bone regeneration. **Acta Biomaterialia**. v. 8, p. 341-349, 2012. Doi: 10.1016/j.actbio.2011.09.008