

**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.

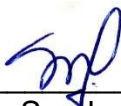
**CLÁUDIA REGINA APPIO DUARTE**

**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.

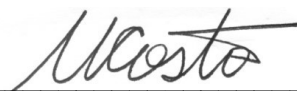
**Banca Examinadora:**

Orientadora:



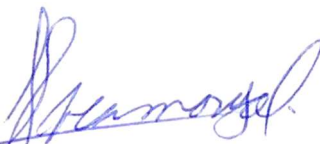
Prof. Dra. Sandra Maria Ferraz  
Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC

Coorientador:

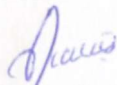


Prof. Dr. Ubirajara Maciel da Costa  
Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC

**Membros:**



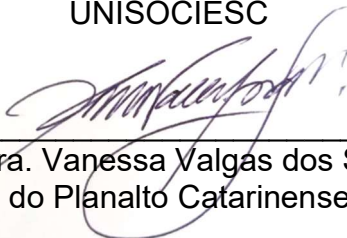
Prof. Dr. Nelson Heriberto Almeida Camargo  
Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC



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/SiO<sub>2</sub> 5% (1100°C/2h); HA/ZrO<sub>2</sub> 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/SiO<sub>2</sub> 5% e HA/ZrO<sub>2</sub> 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/SiO<sub>2</sub> 5% (1100 °C/2h); HA/ZrO<sub>2</sub> 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/SiO<sub>2</sub> 5% and HA/ZrO<sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub>	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 <sub>3</sub>	Bicarbonato de sódio
nm	Nanômetros
OD	Densidade óptica
O <sub>2</sub>	Oxigênio
pH	Potencial hidrogeniônico
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	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 <sub>2</sub>	Óxido de sílica
UDESC	Universidade do Estado de Santa Catarina
VEGF	Fator de Crescimento Vascular Endotelial

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

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>21</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>25</b>
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 <sub>2</sub> ).....	35
2.5.5	Sílica (SiO <sub>2</sub> ).....	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
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>41</b>
3.1	Objetivo Geral.....	41
3.2	Objetivos Específicos.....	41
<b>4</b>	<b>ARTIGO 1.....</b>	<b>43</b>
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
<b>5</b>	<b>ARTIGO 2.....</b>	<b>65</b>
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
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>85</b>



## 1 INTRODUÇÃO

O aumento da expectativa de vida da população associado com a procura por uma melhor qualidade de vida tem conduzido ao desenvolvimento científico e tecnológico nas diferentes áreas do conhecimento, na busca de satisfazer os interesses sociais e pessoais. As ciências exatas e biológicas vêm contribuindo para essa melhoria, através do desenvolvimento de materiais adequados para a substituição e restauração de tecidos lesados (DOROZHKIN, 2007).

O tecido ósseo apresenta grande poder de regeneração, mas em situações em que ocorrem danos teciduais extensos, infecções, tumores e defeitos congênitos, a resposta do organismo é insuficiente para uma reparação completa da lesão, necessitando da aplicação de enxertos para auxiliar na reconstrução desse tecido (KAMITAKAHARA et al., 2008).

O autoenxerto, onde o material a ser implantado é retirado do próprio indivíduo, ainda é considerado como padrão ouro quando se refere à aplicação clínica de enxertos biológicos (CARSON & BOSTROM, 2007), porém sua disponibilidade restrita associada com a necessidade de um procedimento cirúrgico adicional, dor e risco de infecção acabam por limitar sua utilização. Também são utilizados os aloenxertos, definidos como substitutos ósseos obtidos de outro indivíduo da mesma espécie, com limitações relacionadas ao risco de infecção bacteriana e viral, rejeição e disponibilidade de tecido (KAMITAKAHARA et al., 2008). Portanto, os materiais sintéticos têm sido amplamente estudados de modo a substituir o uso de enxertos biológicos.

Os materiais de fosfato de cálcio têm se destacado na área de biomateriais de reconstrução óssea pela sua semelhança química e cristalográfica com a apatita óssea do esqueleto humano, reforçando sua importância na ortopedia, odontologia, fixação de implantes e reparação do tecido ósseo (YUASA et al., 2004; CAMARGO et al., 2007; CAMARGO et al., 2014a). As cerâmicas de fosfato de cálcio se apresentam como potenciais substitutos ósseos principalmente devido a sua biocompatibilidade, bioatividade e características osteocondutivas (HENCH, 1998; JUN et al., 2003).

A utilização de matérias primas naturais para a obtenção de carbonatos de cálcio, precursor dos fosfatos de cálcio, é de interesse científico, comercial e tecnológico, pois esses materiais naturais provêm de fontes renováveis. Contudo, sua origem natural, pode gerar uma variação em suas propriedades físicas e químicas.

Essas possíveis variações podem influenciar na bioatividade e biocompatibilidade desses novos biomateriais desenvolvidos (SILVA, 2018).

Biomateriais nanoestruturados de fosfato de cálcio e nanocompósitos com matriz de fosfato de cálcio com adição de materiais como  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{SiO}_2$  ou  $\text{TiO}_2$ , tem sido extensivamente estudados e demonstram resultados promissores em aplicações na área traumatológica, ortopédica e odontológica, tais como reparação de tecido ósseo lesado e fixação de implantes (KUMTA et al., 2005; CAMARGO et al., 2007b; CAMARGO et al., 2009). Biomateriais nanocompósitos, que possuem nanopartículas dispersas dentro da matriz de hidroxiapatita, podem ter sua bioatividade melhorada, contribuindo significativamente com os processos de reparação do tecido ósseo lesado (JUN et al., 2003; KIM et al., 2002; VISWANATH & RAVISHANKAR, 2006).

Independente do material desenvolvido, para serem utilizados na prática médica, esses biomateriais precisam atender alguns requisitos básicos como: biocompatibilidade, biofuncionalidade e capacidade de induzir a formação de um novo tecido no indivíduo (GINEBRA et al., 1996). O primeiro nível de teste dentro da avaliação de biocompatibilidade de um biomaterial é a determinação da citotoxicidade *in vitro* (ISO 10993-5, 2009). Em comparação com as investigações *in vivo*, os estudos *in vitro* são mais facilmente controlados e apresentam melhor reprodutibilidade, além de diminuir o uso de animais em testes (FRESHNEY, 2000). O cultivo de células *in vitro* é uma valiosa técnica para se estudar os mecanismos pelos quais biomateriais podem ou não produzir reações adversas em nível celular e investigar as interações célula-biomaterial (WENBERG et al., 1979; SELVAKUMARAN & JELL, 2005).

Um dos testes mais utilizados para avaliação da citotoxicidade *in vitro* é o MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), que avalia a atividade mitocondrial, onde somente células viáveis conseguem converter o sal amarelo MTT em cristais de formazan, de cor púrpura. Essa produção de formazan é então quantificada através da leitura da densidade óptica das amostras.

A proliferação celular obtida pela contagem do número de células e curva de crescimento em determinado período de tempo também pode ser utilizada como parâmetro para avaliação de citotoxicidade (FRICAIN et al., 2002). O estudo do comportamento e viabilidade celular *in vitro* após contato com biomateriais é fundamental para o seu uso racional e seguro na prática médica, auxiliando na melhoria da qualidade de vida das pessoas.

Além do biomaterial de reparação óssea apresentar biocompatibilidade é importante que ele se mostre capaz de estimular a liberação de fatores angiogênicos celulares, que são essenciais para a formação de uma adequada vascularização, permitindo a completa e mais rápida reparação do tecido ósseo lesado. No tecido ósseo normal os vasos sanguíneos transportam oxigênio, nutrientes e fatores solúveis essenciais para vários tipos celulares, além de retirar os metabólitos e dióxido de carbono (KANCZLER & OREFFO, 2008). A angiogênese é considerada um processo essencial no reparo de fraturas ósseas, e a formação do novo tecido ósseo é altamente dependente de uma adequada vascularização (GLOWACKI, 1998; CARANO & FILVAROFF, 2003; KANCZLER & OREFFO, 2008). Vários fatores angiogênicos estão envolvidos na promoção da angiogênese, dentre eles o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e o fator de crescimento fibroblástico básico (FGF-2) (KERAMARIS et al., 2008; MURAMAKI & SIMONS, 2008).

Com o interesse de dispor de substitutos ósseos com melhor segurança e eficácia para testes *in vivo* em animais e posterior aplicação em humanos, este trabalho teve como objetivo avaliar *in vitro* a citotoxicidade e a expressão dos fatores angiogênicos de biomateriais cerâmicos de fosfato de cálcio e nanocompósitos de matriz de fosfato de cálcio para uso em reparação óssea.



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Cultivo de Células

A cultura de tecidos animais *in vitro* teve seus primeiros experimentos realizados em 1882 por Sydney Ringer, com o desenvolvimento da solução de Ringer, uma solução de sal balanceada semelhante à dos fluidos corporais, que com sucesso manteve corações de sapos batendo após a dissecação e remoção do corpo (RINGER, 1882; RINGER, 1883). Ross Harrison e Alexis Carrel foram os precursores em estudos do comportamento de células animais sem interferências sistêmicas. Harrison, em 1907, mostrou que fibras nervosas podem ser mantidas vivas em uma solução salina, fora do organismo animal (NICHOLAS, 1960). Carrel, em 1912, cultivou com sucesso células de embriões de galinha utilizando plasma sanguíneo de galinha e depois células de mamíferos. Também desenvolveu um protótipo do frasco de cultura celular que é utilizado nos dias atuais e estabeleceu a técnica de manipulação asséptica (CARREL, 1923; WITKOWSKY, 1980).

Em 1952 George Gey e colegas estabeleceram uma linhagem contínua de células derivadas de carcinoma cervical humano, retirada de Henrietta Lacks, largamente utilizada em pesquisas médicas, que ficou conhecida como células HeLa (GEY et al., 1952). A partir do desenvolvimento dessa linhagem infinita, não se fazia mais necessária a coleta de tecidos animais em cada experimento, permitindo aos pesquisadores realizar estudos com a mesma população celular homogênea. Isso permitiu que as diferenças entre os diferentes meios de cultura se destacassem, levando ao desenvolvimento rápido de meios de culturas avançados e mais adequados às necessidades celulares (YAO & ASAYAMA, 2017).

O primeiro meio de cultura definido para células animais, chamado de meio essencial mínimo (MEM), foi descrito por Harry Eagle, em 1955, e continha 13 aminoácidos, 8 vitaminas, glicose e 6 sais (EAGLE, 1959). Em 1959, Renato Dulbecco realizou modificações no MEM de acordo com o tipo celular desejado e o propósito do cultivo, sendo chamado de DMEM, meio essencial mínimo modificado por Dulbecco (DULBECCO, 1959).

A maioria dos cultivos celulares necessita de suplementação de soro em seu meio de cultivo. Ele serve como fonte de aminoácidos, proteínas, vitaminas, carboidratos, lipídeos, fatores de crescimento, necessários para estimular a divisão

celular. O soro fetal bovino (SFB) é o soro mais popular e utilizado, é rico em fatores de crescimento e contém pequenas quantidades de  $\gamma$ -globulinas que possuem atividade inibidora do crescimento celular (LYNCH, 2008; YAO & ASAYAMA, 2017). Devido às preocupações científicas e éticas, estudos vem buscando substituir o SFB por outros suplementos ou pelo uso de componentes químicos definidos adicionados em meios de cultivo celular livres de soro (GSTRAUNTHALER, 2003).

A cultura de células refere-se a células isoladas do tecido original ou de linhagem celular, obtidas por desagregação enzimática, mecânica ou química (SLOCUM, 1981). Uma grande variedade de células animais pode ser cultivada e manipulada *in vitro*, incluindo fibroblastos, osteoblastos, músculo cardíaco e liso, tecido epitelial, células nervosas e vários tipos de células tumorais (MERTEN, 2006). Os fibroblastos são um dos tipos celulares animais mais utilizados devido à facilidade de isolamento e cultivo (RAAB et al., 2014).

O ciclo de crescimento de células em cultura é dividido em três fases: (a) Fase *Lag*, onde ocorre pequeno crescimento no volume celular, sem aumento no número de células. É uma fase de adaptação na qual as células repõem elementos de superfície e da matriz extracelular. Também ocorre produção de DNA polimerase, seguido de síntese de DNA e proteínas estruturais. (b) Fase *Log*, esta fase é o período de crescimento exponencial do número de células, formando camadas celulares confluentes. (c) Fase *Plateau*, nesta fase toda a superfície de crescimento da placa está ocupada e todas as células estão em contato com as células ao redor. A cultura entra em fase estacionária com diminuição da atividade mitótica. Esta redução da multiplicação celular se dá pelo contato célula-célula, falta de nutrientes e fatores de crescimento e reduzida capacidade de dispersão celular (HAYFLICK & MOORHEAD, 1961; FRESHNEY, 2000; OYELEYE et al., 2016).

Células diploides ( $2n$ ) normais apresentam um potencial limitado de divisões em cultura, um evento chamado de senescência celular (HAYFLICK & MOORHEAD, 1961). Em células somáticas humanas sabe-se que o comprimento ou integridade dos telômeros refletem a capacidade mitótica *in vitro*. Os telômeros previnem a degradação e a fusão dos cromossomos. Ocorre um encurtamento de cinquenta a duzentos pares de bases no DNA telomérico a cada fase S de replicação do DNA. Quando o DNA do telômero atinge um comprimento médio de quatro a sete mil pares de bases, a divisão celular é suspensa irreversivelmente em células somáticas humanas normais (HARLEY et al, 1990).

Em células tumorais, células germinativas e células transformadas em laboratório, o comprimento do telômero é mantido pela enzima telomerase, que é capaz de replicar sequências terminais dos telômeros, estendendo a vida útil dessas células infinitamente (KIM et al., 1994; BODNAR, et al., 1998; FRESHNEY, 2000). Esta enzima contém um componente catalítico proteico chamado transcriptase reversa da telomerase (TERT) e um componente de RNA e atua adicionando repetições de DNA teloméricos diretamente no fim do cromossomo (COLLINS & MITCHELL, 2002). A maioria das células normais não expressa a TERT ou a expressa em níveis muito baixos que não são capazes de prevenir o encurtamento do telômero (EFFROS et al., 2003; MASUTOMI et al., 2003).

O aprimoramento do cultivo celular ocorreu devido a fatores como a produção de vacinas antivirais, o estudo de neoplasias e os testes de toxicidade e eficácia de drogas. Outro grande estimulador do avanço nas pesquisas relacionadas à cultura celular foi a preocupação em substituir ao máximo o uso de animais em experimentos pelos testes *in vitro* (FRESHNEY, 2000; SHAY & WRIGHT, 2000).

## **2.2 Tecido Ósseo**

O tecido ósseo é o componente principal do esqueleto, fornece suporte para os tecidos moles e protege órgãos vitais. Abriga a medula óssea, formadora das células do sangue e funciona como depósito de cálcio, fosfato, magnésio, potássio, entre outros íons, realizando seu armazenamento ou liberação de maneira controlada conforme a necessidade (RODAN, 1992).

O tecido ósseo é um tipo especializado de tecido conjuntivo formado por células e material extracelular calcificado, a matriz óssea. Seus principais constituintes são: células (osteoblastos, osteoclastos e osteócitos); material orgânico (colágeno, glicosaminoglicanos); cristais inorgânicos (hidroxiapatita) (HENCH, 2005). Os osteoblastos sintetizam a parte orgânica da matriz óssea e se localizam na sua parte periférica, são capazes de concentrar fosfato de cálcio, participando da mineralização da matriz. Os osteoclastos são células que reabsorvem o tecido ósseo, participando da remodelação óssea. Os osteócitos são células ósseas maduras envolvidas pelos cristais de hidroxiapatita, que se situam em lacunas no interior da matriz (RODAN, 1992; HENCH, 2005).

A parte inorgânica representa cerca de 67% do peso da matriz óssea. Os íons predominantes são o fosfato e o cálcio, que formam o constituinte mineral mais importante, a hidroxiapatita. A associação da hidroxiapatita com as fibras colágenas é responsável pela dureza e resistência do tecido ósseo (AFONSO, 1998).

### **2.3 Fraturas e Reparo Ósseo**

As fraturas ósseas representam frequentes e significativos problemas clínicos, pela complexidade do seu tratamento e evolução, e econômicos, pelos gastos envolvidos. No tecido ósseo fraturado, ocorre hemorragia, pela lesão dos vasos sanguíneos, destruição de matriz e morte de células ósseas. Para seu reparo e remodelação é necessária a interação entre fatores mecânicos e biológicos (CLAES et al., 2012; LICHTER et al., 2015). Dentre os fatores biológicos estão:

- **Inflamação:** é a primeira e fundamental etapa para o reparo do tecido ósseo lesado (MARSELL & EINHORN, 2011). Durante a inflamação ocorre infiltração de células inflamatórias como neutrófilos e macrófagos juntamente com a secreção de citocinas e fatores de crescimento (MEDZHITOV, 2008). Os neutrófilos são recrutados nas primeiras horas da lesão e secretam moléculas pró-inflamatórias, como a interleucina-6 (CLAES et al., 2012; EMING et al., 2017). Essa molécula atrai os macrófagos, que removem os coágulos e restos celulares da matriz, também recruta monócitos e leucócitos, que secretam citocinas, fatores osteogênicos e angiogênicos (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013; WU et al., 2013). Porém, a inflamação também pode trazer consequências indesejáveis, incluindo a ativação de resposta fibrótica, que vai ocasionar acúmulo exagerado de colágeno, podendo debilitar a função tecidual (EMING et al., 2017).

- **Recrutamento Celular:** além das células inflamatórias, as células tronco mesenquimais (MSC) também são recrutadas ao local onde a fratura óssea ocorreu, e são fundamentais para que ocorra a reparação do tecido, através da sua proliferação e diferenciação em células osteogênicas (SHIRLEY et al., 2005; MARSELL & EINHORN, 2011).

- **Angiogênese:** é o processo pelo qual novos vasos sanguíneos são formados a partir de vasos pré-existentes e tem como função reestabelecer o aporte de nutrientes e minerais para que ocorra a regeneração do tecido ósseo lesado (PARDUE et al., 2008).

- Diferenciação Osteogênica: as células tronco recrutadas para o local da fratura se diferenciam em condrócitos e osteoblastos que participam da formação do calo ósseo. (WANG et al., 2016). O tecido ósseo é formado por ossificação intramembranosa, endocondral ou uma mistura de ambos. Na ossificação intramembranosa as células tronco precursoras se proliferam e diferenciam diretamente em osteoblastos. Na ossificação endocondral, ocorre a diferenciação em condrócitos que secretam a matriz cartilaginosa; o tecido ósseo se formará a partir dessa cartilagem (SHAPIRO, 2008).

## **2.4 Angiogênese e Reparo Ósseo**

O processo de formação de novos vasos sanguíneos, denominado angiogênese, é indispensável para o reparo do tecido lesado, pois fornece adequado aporte de oxigênio, nutrientes, fatores de crescimento, permite o recrutamento de células e a remoção de metabólitos (CARANO & FILVAROFF, 2003; SARAN et al., 2014). A chegada de cálcio e fosfato que contribuem para a mineralização do tecido ósseo também depende de uma adequada vascularização (SARAN et al., 2014; STEGEN et al., 2014). Stegen et al. (2014) citam que estudos acerca dos processos celulares e moleculares envolvidos na cascata angiogênica podem auxiliar no tratamento de fraturas ósseas principalmente nas situações em que se tem uma resposta angiogênica limitada ou insuficiente, como em casos de fraturas com grande dano vascular.

Hausman et al. (2001) demonstraram em seu estudo que a inibição da angiogênese durante o reparo de fratura óssea em ratos resultou na formação de tecido fibroso no local. Portanto, tratamentos que visam promover a vascularização dos tecidos lesados têm gerado bons resultados de modo a acelerar a resposta do organismo e a regeneração do tecido (STEGEN et al., 2014).

Vários fatores angiogênicos importantes, incluindo o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e fator de crescimento fibroblástico (FGF), tem sido relacionados com a promoção da angiogênese (CARANO & FILVAROFF, 2003).

### **2.4.1 Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF)**

O VEGF é o fator angiogênico mais importante e melhor caracterizado, tem como função aumentar a permeabilidade vascular e induzir a angiogênese normal e

angiogênese em tecidos ósseos lesionados. A família de fatores de crescimento do VEGF é uma das mais importantes famílias de citocinas envolvidas na angiogênese (ZHANG et al., 2010). O VEGF interage com um ou vários receptores tirosina quinase, receptores VEGF-1, 2 e 3 e com correceptores (STUTTFELD & BALLMER-HOFER, 2009).

O VEGF é essencial para a formação e reparo durante o processo de regeneração óssea, atraindo e promovendo a proliferação de células endoteliais e aumentando a migração e diferenciação dos osteoblastos (MIDY & PLOUËT, 1994; BOULETREAU et al., 2002; STEGEN et al., 2014). O VEGF é produzido por várias células, incluindo fibroblastos, células endoteliais, macrófagos, células musculares lisas, condrócitos e osteoblastos (GERBER et al., 1999; JOSKO, et al., 2000).

Os osteoblastos tanto sintetizam o VEGF como são células alvo da ação desse fator de crescimento (MIDY & PLOUËT, 1994; GERBER & FERRARA, 1999; BOULETREAU, et al., 2002). O VEGF também estimula o recrutamento, sobrevivência e atividade dos osteoclastos, sendo necessário na reabsorção óssea durante a ossificação endocondral (ENGSIG et al., 2000; NAKAGAWA et al., 2000).

#### **2.4.2 Fator de Crescimento Fibroblástico (FGF)**

Os FGFs são fatores de crescimento polipeptídicos que apresentam diversas atividades biológicas, como a mediação da proliferação, diferenciação e migração celular. São sintetizados por células endoteliais, células musculares lisas, células da glia e fibroblastos (BASILICO & MOSCATELLI, 1992). Chiou, et al. (2006) demonstraram em seu estudo que a adição do fator de crescimento fibroblástico básico (FGF-2) em cultura primária de células tronco mesenquimais manteve o potencial osteogênico, adipogênico e condrogênico das células.

A maioria dos FGFs medeiam suas respostas biológicas através da ligação a receptores de superfície tirosina quinase específicos, os receptores FGF, e correceptores (JOHNSON et al., 1990; THISSE & THISSE, 2005). Os FGFs promovem a angiogênese também de maneira indireta coordenando a ação de outros fatores de crescimento, incluindo o VEGF (MURAMAKI & SIMONS, 2008).

Os FGFs são moléculas pleiotrópicas com atividade mitogênica não somente em células endoteliais, mas também em uma grande variedade de outros tipos celulares, incluindo condrócitos, fibroblastos e osteoblastos. A pleiotropia permite que

o FGF atue na angiogênese através da regulação de várias interações célula-célula (GOSPODAROWICZ et al., 1978; MIDY & PLOUËT, 1994; MURAMAKI & SIMONS, 2008).

## **2.5 Materiais Substitutos Ósseos**

Como visto anteriormente, o tecido ósseo apresenta grande poder de regeneração, mas em situações em que se tem lesões de grande extensão, decorrentes principalmente de acidentes, infecções, tumores e defeitos congênitos, a resposta do organismo é insuficiente para uma reparação completa do tecido, sendo necessário o uso de enxertos, que podem ser biológicos ou sintéticos.

Os enxertos biológicos se dividem em: autoenxertos, que são obtidos de outro local saudável no mesmo indivíduo. Os aloenxertos são retirados de um indivíduo diferente, porém, da mesma espécie que o receptor. Já no xenoenxerto o tecido a ser implantado é retirado de um indivíduo diferente e de espécie diferente que o receptor (KAMITAKAHARA et al., 2008).

O sucesso destes enxertos é limitado por problemas relacionados à disponibilidade do enxerto, estado do paciente, localização e tamanho do defeito ósseo, infecção viral ou bacteriana e integridade biomecânica (CONSTANTINO et al., 1991; KAMITAKAHARA et al., 2008). Diante destas limitações, o desenvolvimento e o uso de enxertos sintéticos, ou biomateriais, se tornam uma alternativa importante aos enxertos biológicos (KOLK et al., 2012).

### **2.5.1 Biomateriais**

A utilização de materiais não biológicos no corpo humano visando substituir alguma estrutura iniciou na pré-história, principalmente com o uso de implantes dentários primitivos compostos de ouro, conchas marinhas, ferro, entre outros (RATNER et al., 2004). O período da segunda guerra mundial foi determinante para o desenvolvimento dos materiais substitutos ósseos, devido à necessidade de tratar as sequelas físicas decorrentes de acidentes e desastres (VON RECUM & LABERGE, 1995; RATNER et al., 2004).

Para Yuan et al. (2006) um dos principais objetivos da ciência dos biomateriais é desenvolver materiais que tenham a capacidade de reparar, aumentar ou substituir

tecidos ou órgãos quando necessário. Os biomateriais disponíveis no mercado estão continuamente sendo estudados e otimizados no que diz respeito às suas propriedades químicas, mecânicas e de arquitetura, buscando mimetizar as características ósseas do esqueleto (YUAN et al., 2006).

Segundo conceito criado na Conferência da Sociedade Europeia de Biomateriais, em 1976, e, atualizado recentemente, biomaterial pode ser definido como um material desenvolvido para interagir com sistemas biológicos, de modo a avaliar, tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do corpo (O'BRIEN, 2011).

Para que um material possa ser utilizado como biomaterial substituo ósseo ele precisa atender a alguns requisitos básicos como:

- Biocompatibilidade: conceitualmente refere-se à habilidade do biomaterial em desempenhar sua função na terapia médica, sem provocar efeitos locais ou teciduais indesejáveis no indivíduo, mas gerando a resposta celular ou tecidual mais apropriada para a situação (WILLIAMS, 2008). O'Brien (2011) cita que um material biocompatível permite a adesão, multiplicação e migração celular em sua superfície, provocando uma reação imune insignificante, que evita a rejeição do material pelo organismo.
- Biodegradabilidade: com o avançar das pesquisas na área de biomateriais buscou-se o desenvolvimento de materiais biodegradáveis, que após sua dissolução pelo tecido hospedeiro, possam ser absorvidos e utilizados pelas células para formação de sua própria matriz extracelular (O'BRIEN, 2011; PIRES et al., 2015).
- Propriedades Mecânicas: devem ser adequadas à aplicação para que o biomaterial foi indicado e qualquer variação das propriedades mecânicas decorrente da sua degradação *in vivo* deve ser compatível com o processo de reparação e reestabelecimento do local de implantação do material (OLIVEIRA et al., 2010).
- Porosidade: é importante que o material apresente em sua estrutura poros abertos com geometria interconectada e grande superfície de área, permitindo a invasão e multiplicação celular dentro dos poros, o que facilitará a neovascularização do tecido, assim como, permitirá a difusão de nutrientes e gases e remoção de metabólitos gerados pela atividade celular (SALGADO et al., 2004). O tamanho dos poros possui importância pois se forem muito pequenos pode ocorrer oclusão desses pelas células, evitando penetração celular, produção de matriz extracelular e vascularização das áreas internas. Por outro lado, poros muito grandes podem prejudicar as propriedades mecânicas do material (YANG, et al., 2001; MOUR et al., 2010).

- Osteocondução: é a propriedade em que o material permite a proliferação e migração de células ósseas e capilares através da superfície e estrutura tridimensional do material implantado (CALORI et al., 2011). A osteocondução é determinada principalmente pelas características de porosidade do material (LE GEROS, 2002).
- Osteoindução: é o processo no qual as células tronco e osteoprogenitoras são recrutadas ao local lesionado e são estimuladas a passar pela diferenciação osteogênica (ELIAZ & METOKI, 2017).

Biomateriais utilizados em aplicações clínicas incluem polímeros (policloreto de vinila, polietileno, biopolímeros), metais (aço inoxidável, ligas à base de cobalto-cromo, titânio), cerâmicas (fosfatos de cálcio, alumina, zircônia), compósitos (biomateriais constituídos por duas ou mais fases distintas micrométricas) e nanocompósitos (formados por uma fase micrométrica e outra nanométrica ou ainda duas fases nanométricas) (PIRES et al., 2015).

### **2.5.2 Biocerâmicas**

Durante as últimas décadas, houve avanços no desenvolvimento de materiais biomédicos, incluindo materiais cerâmicos para reparo e reconstrução óssea. Sua aplicação na medicina tem se expandido juntamente com o aumento do número de publicações e patentes e a realização de conferências relacionadas ao tema (DOROZHKIN, 2010).

As biocerâmicas são materiais inorgânicos classificados de acordo com as fases presentes em suas composições: (a) monolíticos, formados por uma única composição química; (b) compósitos que são constituídos por dois ou mais constituintes químicos distintos dentro de uma matriz cerâmica (BELLINI, 2007).

As biocerâmicas de matriz de fosfato de cálcio microporosas se destacam por apresentarem uma arquitetura e constituição mineralógica semelhante à da estrutura óssea (DOS SANTOS, 2009). A tensão de compressão e resistência à fadiga dos biomateriais microporosos dependem do volume total de poros do biomaterial (HENCH, 1991).

Os biomateriais cerâmicos podem ser classificados de acordo com a sua interação com o tecido hospedeiro, como bioinertes, bioativos e absorvíveis. Materiais bioinertes, como a alumina e a zircônia, mantêm suas propriedades físicas e mecânicas enquanto implantadas e não ocasionam reatividade dos tecidos.

Cerâmicas bioativas são aquelas que provocam uma resposta biológica específica na interface do material, resultando na formação de uma ligação entre o tecido ósseo e o material implantado. Os fosfatos de cálcio e os biovidros estão entre os exemplos desta classe. Os materiais absorvíveis, como a hidroxiapatita e o trifosfato de cálcio, sofrem degradação gradual ao longo do tempo e são lentamente substituídos pelo tecido em formação (HENCH & BEST, 2013).

### 2.5.3 Biocerâmicas de Fosfato de Cálcio

As biocerâmicas de fosfato de cálcio se destacam como biomateriais de reparação óssea devido à sua excelente biocompatibilidade e não toxicidade de seus componentes químicos, além de apresentar as propriedades de osteocondução e osteoindução em algumas espécies animais. (KUMTA, 2005; YUAN et al, 2006; WANG et al, 2014).

Essa classe de biomateriais destaca-se também pela sua semelhança química e cristalográfica com a apatita biológica, reforçando sua importância na ortopedia, odontologia, fixação de implantes e reparação do tecido ósseo lesado (YUASA, 2004; CAMARGO, 2014).

As biocerâmicas de fosfato de cálcio se classificam principalmente nas composições hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) e trifosfato de cálcio nas formas polimórficas  $\alpha$  e  $\beta$  ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), que têm elevado potencial osteoindutivo (PIRES et al., 2015).

Pesquisas mostram que composições biocerâmicas obtidas de matérias primas naturais fornecem pós de fosfatos de cálcio com microestrutura microporosa formada por finos grãos (SIVAKUMAR et al., 1996), o que contribui para a adesão celular em sua superfície (KAMITAKAHARA et al., 2008). Dentre estas matérias primas naturais pode-se citar o osso bovino liofilizado, corais, algas e conchas calcárias. Uma desvantagem do osso bovino é o fato de ser um material xenógeno (origem de espécie diferente) que pode desencadear reações imunológicas e inflamatórias no hospedeiro (SIQUEIRA, 2009; ALMEIDA, 2010). As biocerâmicas obtidas de corais e outras espécies marinhas apresentam potencial em aplicações médicas no reparo de tecido ósseo lesado e liberação controlada de medicamentos (DEMERS et al., 2001; CLARKE & WALSH, 2014).

### 2.5.3.1 Hidroxiapatita

A hidroxiapatita é o principal componente presente na fase mineral dos ossos e dentre os fosfatos de cálcio é, sem dúvida, a mais estudada e utilizada para fins clínicos devido a sua biocompatibilidade, bioatividade, capacidade de neoformação óssea e ausência de toxicidade (YOSHIKAWA & MYOUI, 2005; ELIAZ & METOKI, 2017). Como biomaterial, apresenta vantagens como a rápida adaptação óssea, não formação de tecido fibroso, reduzido tempo de cicatrização e íntima adesão entre o implante e o tecido (PIRES et al., 2015). A limitação da hidroxiapatita está relacionada à sua baixa solubilidade (ELIAZ & METOKI, 2017). Porém, em formulações nanométricas (com tamanho de grãos menores que 100nm) a hidroxiapatita apresenta solubilidade superior e melhores propriedades osteogênicas de neoformação óssea quando aplicada *in vivo* (CAMARGO et al., 2014).

### 2.5.4 Óxido de Zircônia (ZrO<sub>2</sub>)

A zircônia é uma das cerâmicas mais utilizadas, principalmente como material alternativo à alumina na fabricação de próteses de quadril e joelho (PICONI & MACCAURO, 1999). É considerada um material inerte, apresentando resistência mecânica e térmica (SHI et al., 2006, HISBERGUES et al., 2008). A zircônia é um material biocompatível *in vitro* e *in vivo*, auxiliando na formação óssea (MARQUES et al., 2013).

De modo a buscar uma melhora nas propriedades deste material, alguns grupos de pesquisa estão testando a zircônia como segunda fase associada aos fosfatos de cálcio.

### 2.5.5 Óxido de Sílica (SiO<sub>2</sub>)

A sílica é um material inerte no organismo, biocompatível, bioativo e com excelente estabilidade química (VALLET-REGÍ, 2006; TANG et al, 2014). Evidências indicam que ela participa do processo de mineralização do tecido ósseo em desenvolvimento e síntese de colágeno (JUGDAOHSINGH, 2007). Ela já tem sido utilizada em nanocompósitos para cimentos ósseos (REE & CHOI, 2002) e quando

incorporada em biomateriais melhora seu potencial osteogênico, *in vivo* e *in vitro* (HAN et al., 2013; TANG et al, 2014).

Biomateriais contendo sílica em sua composição têm sido alvo de pesquisas para aplicações biomédicas, nas áreas de formação tecidual, buscando incrementar a bioatividade dos materiais (HAN et al., 2013).

### **2.5.6 Óxido de Magnésio (MgO)**

O Magnésio é importante na formação da apatita biológica, presente na parte mineral dos ossos e é um dos metais necessários para o metabolismo (SARIS et al., 2000). É considerado biocompatível e atóxico (VORMANN, 2003; WOLF & CITTADINI, 2003; LI et al., 2004).

Esse óxido apresenta efeito significativo na diferenciação de células osteoblásticas, e a sua rápida biodegradação libera íons no tecido vivo, resultando na estimulação das células locais para agirem na formação do tecido ósseo (SEZER, 2018).

### **2.5.7 Nanocompósitos**

A nanotecnologia refere-se à síntese e caracterização de materiais com tamanho de partículas e grãos inferiores a 100nm (CATLEDGE et al., 2002). Os biomateriais nanoestruturados são uma nova classe de biomateriais que podem oferecer novas características de propriedades mecânicas, químicas e biológicas superiores aos biomateriais microestruturados convencionais (CHEN & WEBSTER, 2011). Esses materiais têm se destacado na medicina regenerativa pois apresentam características nanométricas semelhantes às da matriz extracelular natural, ocasionando melhor integração com os tecidos biológicos (WEI & MA, 2008; CHEN & WEBSTER, 2011).

Os nanocompósitos são materiais constituídos de uma maneira geral de uma ou muitas fases descontínuas dispersas dentro de uma fase contínua (matriz), sendo a fase descontínua (segunda fase) de ordem nanométrica e apresentando características mecânicas superiores à da matriz. Quando existem muitas fases descontínuas de natureza diferentes, dispersas dentro da fase contínua, o material nanocompósito é chamado de híbrido (CAMARGO, 1995).

A adição de uma segunda fase descontínua na forma de nanopartículas dentro de uma fase contínua denominada matriz cerâmica pode ter como interesse duas possibilidades: a) modificar as características da microestrutura, da nanoestrutura e da superfície de grãos e microporos, procurando melhorar a solubilidade, a adesão e proliferação celular na superfície de grãos e microporos dos nanomateriais; b) melhorar as propriedades mecânicas, minimizando o problema de fratura frágil da matriz cerâmica. (CORREA, 2013).

A incorporação de uma segunda fase na forma de nanopartículas na matriz de hidroxiapatita pode melhorar as características de microporosidade, capilaridade, molhabilidade, aumentar o valor da área superficial de grãos e de microporos, fornecendo condições favoráveis à adesão e proliferação celular na superfície de grãos e microporos, e, conseqüente neoformação óssea (CAMARGO, 2007; CAMARGO, 2012).

Nanocompósitos de matriz cerâmica de HA são a nova geração de biomateriais apresentando características nanoestruturais com uma interface com grânulos e microporos, mostrando-se promissores em aplicações biomédicas no reparo de tecido ósseo lesado, pois facilitam a adesão e proliferação celular na sua superfície e microporos (CAMARGO, 2012; CORREA, 2013).

## **2.6 Ensaio *In Vitro*: Citotoxicidade**

Os biomateriais que serão utilizados na clínica médica devem passar por avaliações biológicas de modo a determinar sua toxicidade resultante do contato dos componentes do material com cultivos celulares e com o organismo vivo. Os materiais testados não podem produzir efeitos adversos locais ou sistêmicos e serem carcinogênicos. Quando se escolhe um teste para avaliação biológica deve-se levar em consideração as características químicas do material a ser testado, assim como a frequência e exposição no organismo receptor. Um dos principais testes de biocompatibilidade de biomateriais é a determinação da citotoxicidade *in vitro* (ISO 10993-5, 2009).

Em comparação com testes *in vivo*, os estudos *in vitro* são mais facilmente controlados, financeiramente acessíveis e apresentam melhor reprodutibilidade. A realização de ensaios *in vitro* ainda permite a redução no número de animais utilizados, o que é tendência nas pesquisas atualmente (FRESHNEY, 2000).

O cultivo de células é uma ferramenta adequada para se conhecer os mecanismos pelos quais biomateriais podem produzir reações adversas em nível celular (WENNBERG, 1979). Efeitos citotóxicos ocasionados pelos materiais testados, como lise celular, mudanças no crescimento e na permeabilidade da membrana celular podem ser verificados em ensaios *in vitro* (LYGRE et al., 1995). Vale ressaltar que a experimentação *in vitro* não substitui o subsequente estudo *in vivo*. Ambos são necessários para um adequado esquema de testes de potenciais biomateriais (KIRKPATRICK, 1990).

A avaliação de citotoxicidade pode ser feita através de testes qualitativos, onde se avalia a morfologia das células; ou quantitativos, que se caracterizam pela avaliação das células mortas, inibição do crescimento celular e proliferação celular. (ISO 10993-5, 2009).

Existem três métodos de contato para realizar a avaliação de citotoxicidade de um biomaterial: contato direto, no qual o material fica em contato direto com as células; contato indireto, no qual o material fica sobre camada de ágar que está sobre as células e os possíveis produtos tóxicos podem se difundir no ágar; e teste por extração, que utiliza um solvente (meio de cultura) em contato com o material por um determinado período de tempo, liberando produtos de sua decomposição no meio, para posterior contato com as células e assim avaliar sua toxicidade (ISO 10993-5, 2009).

Conforme a ISO 10993-5 (2009), que descreve a metodologia dos testes utilizados para verificação da citotoxicidade *in vitro* de dispositivos médicos, um dos testes que podem ser realizados é o teste colorimétrico de citotoxicidade chamado MTT. Desenvolvido por Tim Mosmann (1983), o teste se baseia no uso do sal brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) para avaliar a atividade de uma enzima mitocondrial, a succinato desidrogenase. A redução do MTT, de cor amarelada, a um produto insolúvel de cor púrpura, decorrente da formação de cristais de formazan ocorre apenas em células viáveis (com mitocôndrias ativas), refletindo o estado funcional da cadeia respiratória celular. A quantidade de cristais de formazan formados e conseqüente intensidade da coloração púrpura são diretamente proporcionais ao número de células viáveis presentes. A densidade óptica (OD) resultante do teste MTT é determinada em espectrofotômetro (MOSMANN, 1983).

## 2.7 Análise da Expressão Gênica pela Técnica da Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real

Os genes possuem a função de codificar proteínas específicas e as proteínas ditam a função celular. A expressão de um determinado gene em uma célula eucariótica envolve alterações na cromatina, para possibilitar a sua transcrição e gerar o RNA mensageiro, que será transportado para o citoplasma, onde ocorrerá a tradução dele em uma proteína (ZAHA, 2014).

As pesquisas com análise de expressão gênica, em diversas espécies sob condições experimentais específicas, vêm gerando grande quantidade de informações que permitem um melhor entendimento de processos celulares e fisiológicos (MORGANTE & BLAWIG, 2016). A técnica mais utilizada para análise da expressão gênica, por meio da quantificação do RNA mensageiro, é a Reação de Transcrição Reversa seguida da Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-qPCR). Esta técnica apresenta simples execução e maior sensibilidade quando comparada com outros métodos tradicionais (ZEMTSOVA et al., 2015).

Inicialmente é preciso sintetizar uma cadeia complementar de DNA (cDNA) a partir do RNA mensageiro extraído da amostra. Em seguida é realizada a técnica de qPCR que une a amplificação exponencial de um fragmento de DNA específico com métodos de quantificação, por meio de medidas da fluorescência associada à síntese de um produto amplificado, ou amplicon, ao longo dos ciclos da PCR (MORGANTE & BLAWIG, 2016). As etapas desta técnica são essencialmente as mesmas da PCR convencional. Primeira etapa: ocorre a desnaturação do DNA em fitas simples por aquecimento da placa; segunda etapa: anelamento dos *primers* a sequências complementares nas fitas simples de DNA; terceira etapa: extensão de novas fitas complementares, pela ação de uma enzima DNA polimerase termoestável, resultando em um aumento exponencial do número de amplicons ao longo dos ciclos (MULLIS, 1990).

Na qPCR esse aumento é registrado em tempo real por meio da detecção do sinal fluorescente emitido por um fluoróforo, exemplo o SYBR<sup>TM</sup> *Green*. A intensidade deste sinal é diretamente proporcional à quantidade de amplicons acumulados ao longo dos ciclos, que varia em função da quantidade inicial do DNA alvo da amostra (MORGANTE & BLAWIG, 2016).

## 2.8 Microscopia Eletrônica de Varredura

O Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) é um dos mais importantes instrumentos disponíveis para a observação em alta resolução de características microestruturais de objetos sólidos. O MEV apresenta as imagens da amostra de maneira tridimensional devido à grande profundidade de campo, fornecendo informações sobre a morfologia das amostras, complementando às imagens obtidas com a microscopia óptica (DEDAVID et al., 2007).

A avaliação da adesão e proliferação celular sobre o biomaterial também é de grande importância para verificar a biocompatibilidade. Ela pode ser feita através do MEV, permitindo observar a interação das células com o material avaliado (MARQUES et al., 2002; OSATHANON et al., 2008). Também permite observar as interconexões entre os poros (OSATHANON et al., 2008; YU et al., 2008) e visualizar a interface entre materiais implantados e o osso (NI et al., 2006).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar a citotoxicidade e expressão de fatores angiogênicos de biomateriais cerâmicos de fosfato de cálcio e nanocompósitos de matriz de fosfato de cálcio para uso em reparação óssea

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar a proliferação e viabilidade celular após contato com o extrato dos diferentes biomateriais cerâmicos de fosfato de cálcio e nanocompósitos de matriz de fosfato de cálcio.
- Avaliar a interação célula-material através de microscopia eletrônica de varredura após o cultivo das células com as pastilhas dos biomateriais testados.
- Avaliar a expressão gênica de fatores angiogênicos (VEGF e FGF-2) pelas células após contato com o extrato dos diferentes biomateriais testados.



## 4 ARTIGO 1

### **Avaliação da Citotoxicidade e Efeitos Angiogênicos de Biocerâmicas de Fosfato de Cálcio e Nanocompósitos de Fosfato de Cálcio/Sílica para Uso em Reparação Óssea**

#### RESUMO

Biomateriais para reparo ósseo são compostos naturais ou sintéticos utilizados na medicina e odontologia, que auxiliam e estimulam a reparação óssea. Devem apresentar biocompatibilidade, ausência de toxicidade e propriedades mecânicas adequadas pós-implantação. As biocerâmicas nanoestruturadas de fosfato de cálcio tem se destacado na área de biomateriais de reparação óssea pela sua semelhança química e cristalográfica com a apatita óssea do esqueleto humano, reforçando sua importância na ortopedia, odontologia, fixação de implantes e reparação do tecido ósseo. Estes biomateriais apresentam características micro e 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*. A angiogênese é considerada um processo essencial no reparo de fraturas ósseas e a formação do novo tecido ósseo é altamente dependente de uma adequada vascularização. Alguns biomateriais apresentam a habilidade de estimular a expressão de fatores angiogênicos, como o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e o fator de crescimento fibroblástico (FGF-2). Este trabalho teve o objetivo de avaliar a citotoxicidade de biomateriais cerâmicos de fosfato de cálcio e nanocompósitos de matriz de fosfato de cálcio em células de linhagem Vero e 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 o nanocompósito HA/SiO<sub>2</sub> 5% (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/SiO<sub>2</sub> 5% induziram a expressão de VEGF e FGF-2 após cultivo dos fibroblastos com o extrato do biomaterial 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.

## Evaluation of Cytotoxicity and Angiogenic Effects of Calcium Phosphates Bioceramics and Calcium Phosphates/Silica Nanocomposites for Use in Bone Repair

### ABSTRACT

Biomaterials for bone repair are natural or synthetic compounds used in medicine and dentistry which support and stimulate bone repair. They must have biocompatibility, absence of toxicity and appropriate mechanical properties after implantation. Nanostructured calcium phosphate bioceramics have been prominent in the area of biomaterials of bone repair due to their chemical and crystallographic similarity to the human skeleton apatite, reinforcing its importance in orthopedics, dentistry, implant fixation and repair of bone tissue. These biomaterials present micro and nanostructural characteristics, 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. Angiogenesis is considered an essential process in the repair of bone fractures and the formation of new bone tissue is highly dependent on adequate vascularization. Some biomaterials have the ability to stimulate the expression of angiogenic factors, such as vascular endothelial growth factor (VEGF) and fibroblast growth factor (FGF-2). This work aimed to evaluate the cytotoxicity of calcium phosphate and calcium phosphate matrix nanocomposites in Vero cells and to investigate their effects on the expression of angiogenic factors and cell-material interaction in bovine fibroblast culture. The following biomaterials were tested: hydroxyapatite (HA) (1100 °C/2h) and 5% HA/SiO<sub>2</sub> nanocomposite (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 cell-material interaction made by scanning electron microscopy showed the adhesion of the fibroblasts on the surface of tested biomaterials, reinforcing its characteristic of biocompatibility. The nanocomposite HA/SiO<sub>2</sub> 5% induced the expression of VEGF and FGF-2 after culturing the fibroblasts with biomaterial extract for 72 hours, suggesting their potential for use as angiogenesis enhancer in bone repair.

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

## 4.1 Introdução

Os ossos são importantes estruturas que realizam a sustentação do corpo, protegem os órgãos internos e armazenam íons importantes para o metabolismo, como o cálcio e fósforo (KAMITAKAHARA et al., 2008). O reparo de grandes defeitos ósseos provocados por trauma, infecções ou tumores representa um grande desafio na clínica ortopédica e odontológica (CALORI et al., 2011). Estima-se que no ano de 2020 a incidência de desordens ósseas terá dobrado (AMINI et al., 2012).

O tecido ósseo possui alta capacidade de reparação quando lesionado, porém, quando se trata de um dano extenso ou complicações pós-traumáticas, a utilização de enxertos naturais ou sintéticos é necessária (KAMITAKAHARA et al., 2008; CALORI et al., 2011; WANG, et al., 2014).

Os autoenxertos, que são provenientes do próprio indivíduo, ainda são considerados como padrão ouro quando se refere à aplicação clínica de enxertos biológicos (CARSON & BOSTROM, 2007), porém sua disponibilidade restrita associada com a necessidade de um procedimento cirúrgico adicional, dor e risco de infecção acabam por limitar sua utilização (SILBER et al. 2003). Também são utilizados os aloenxertos, que são obtidos de outro indivíduo da mesma espécie, com limitações relacionadas ao risco de infecção bacteriana e viral, rejeição e disponibilidade de tecido (KAMITAKAHARA et al., 2008). Estas complicações clínicas acabam por desestimular a aplicação clínica destes enxertos biológicos, ao mesmo tempo que estimulam o desenvolvimento de materiais sintéticos avançados que superem estas limitações (SUN et al. 2017).

As cerâmicas de fosfato de cálcio se destacam na área de biomateriais de reconstrução óssea pela sua semelhança química e cristalográfica com a apatita óssea do esqueleto humano, reforçando sua importância na ortopedia, odontologia, fixação de implantes e reparação do tecido ósseo (YUASA et al., 2004; CAMARGO et al., 2007a; CAMARGO et al., 2014a; CAMARGO et al., 2014b). Dentre as características que colocam estas cerâmicas como potenciais substitutos ósseos estão a sua biocompatibilidade, bioatividade e características osteocondutivas (HENCH, 1998; JUN et al., 2003). As biocerâmicas de fosfato de cálcio se classificam principalmente nas composições hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) e trifosfato de cálcio nas formas polimórficas  $\alpha$  e  $\beta$  ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), que têm elevado potencial de biodegradação (PIRES et al., 2015).

Biomateriais nanocompósitos de matriz de fosfato de cálcio, que apresentam nanopartículas dispersas dentro de uma fase contínua de hidroxiapatita, podem ter sua bioatividade melhorada, contribuindo significativamente com os processos de reparação do tecido ósseo lesado (KIM et al., 2002; JUN et al., 2003; VISWANATH & RAVISHANKAR, 2006). Biomateriais de fosfato de cálcio de ordem nanométrica e nanocompósitos com matriz de fosfato de cálcio com adição de materiais como alumina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), sílica ( $\text{SiO}_2$ ), zircônia ( $\text{ZrO}_2$ ) ou titânio ( $\text{TiO}_2$ ), tem sido alvo de pesquisas e demonstram resultados promissores em aplicações na área traumatológica, ortopédica e odontológica, tais como reparação de tecido ósseo lesado e fixação de implantes (KUMTA et al., 2005; CAMARGO et al., 2007b; CAMARGO et al., 2009).

A sílica é um material biocompatível, bioativo e com excelente estabilidade química (VALLET-REGÍ 2006; TANG et al, 2014). Diferentes biomateriais contendo sílica em sua composição apresentaram melhorias nas propriedades de osteoindução e osteocondução (XYNOS et al, 2000; TANG et al, 2014). Biomateriais contendo sílica em sua composição têm sido alvo de pesquisas para aplicações biomédicas, nas áreas de reparação tecidual e também como carreadores de fármacos (VALLET-REGÍ, 2008).

O adequado suprimento sanguíneo no local de implantação do biomaterial pode melhorar a integração do tecido e a performance do implante (MUSCHLER et al., 2004). A angiogênese é considerada um processo essencial no reparo de fraturas ósseas e a formação do novo tecido ósseo é altamente dependente de uma adequada vascularização (GLOWACKI, 1998; CARANO & FILVAROFF, 2003; KANCZLER & OREFFO, 2008). Vários fatores angiogênicos estão envolvidos na promoção da angiogênese, dentre eles o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e o fator de crescimento fibroblástico básico (FGF-2) (KERAMARIS et al., 2008; MURAMAKI & SIMONS, 2008). Uma nova estratégia para otimizar a reparação óssea tem sido estudada onde se utilizam os biomateriais como estimuladores da angiogênese (CHEN et al., 2015).

Após o disposto acima, o objetivo deste trabalho foi avaliar a citotoxicidade, a interação célula-material e os efeitos angiogênicos de cerâmicas de fosfato de cálcio e nanocompósitos de fosfato de cálcio/sílica para uso em reparação óssea.

## 4.2 Material e Métodos

### 4.2.1 Obtenção das Biocerâmicas de Fosfato de Cálcio e Nanocompósitos de Matriz de Fosfato de Cálcio

As biocerâmicas de fosfato de cálcio e os nanocompósitos utilizados no presente trabalho foram elaborados pelo Grupo de Pesquisa em Biomateriais da UDESC/CTT – Joinville e são formados pelas seguintes composições, respectivamente: hidroxiapatita (HA) e HA/SiO<sub>2</sub> 5%, obtidos da sinterização a temperatura de 1100 °C/2h (Tabela 1). Ambos os materiais se apresentam sob a forma de grânulos (Figura 1-A) e pastilhas (Figura 1-B).

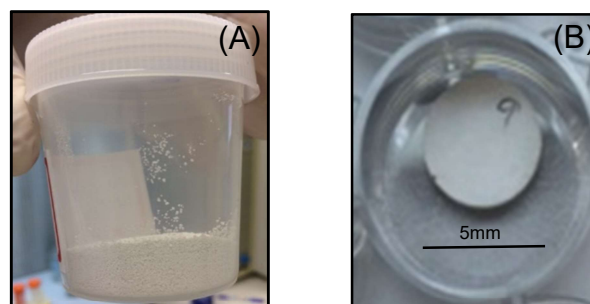
Tabela 1 – Biomateriais utilizados no experimento de acordo com a forma, composição e temperatura de sinterização.

Forma	Composição	Temperatura de Sinterização
Grânulos	HA	1100 °C/2h
Grânulos	HA/SiO <sub>2</sub> 5%	1100 °C/2h
Pastilhas	HA/TCP-β 4%	1100 °C/2h
Pastilhas	HA/SiO <sub>2</sub> 5%	1100 °C/2h

Legenda: HA- hidroxiapatita; SiO<sub>2</sub>- óxido de silício (sílica) ; TCP-β- trifosfato de cálcio beta.

Fonte: Grupo de Pesquisa em Biomateriais UDESC/CCT, 2017.

Figura 1 - Biomaterial no formato de grânulos (A) e pastilha (B)



Fonte: A autora, 2017.

### 4.2.2 Preparo de Meios para Cultivo Celular

O meio utilizado para o cultivo e manipulação das células foi o DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) High glucose D1152 (Sigma-Aldrich Co., St.

Louis, MO, EUA), contendo 25 mM de HEPES e 4,5 g/L de glicose, adicionado de 26 mM de NaHCO<sub>3</sub>, 0,2 mM de piruvato de sódio, 65 mg/L de penicilina sódica (Sigma-Aldrich Co.), 50 mg/L de sulfato de estreptomicina (Sigma-Aldrich Co.), e suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Nutricell®, Campinas, SP). Para a individualização das células foi usada solução isotônica de 0,05% de Tripsina 1:250 (BD Difco®, 215240, França) contendo 0,6 mM de EDTA.

Os meios e soluções utilizados no experimento foram preparados com água ultrapura tipo I (Direct-Q, Milli-Q) e filtrados utilizando-se um filtro descartável com membrana de 0,22 micrômetros e armazenados a 4 °C até o momento de sua utilização.

#### 4.2.3 Obtenção e Manutenção das Células

Para os testes de citotoxicidade e curva de crescimento celular foram utilizadas células de linhagem Vero gentilmente cedidas pelo laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias do CAV/UEDESC, Lages. Essas células foram criopreservadas em criotubos em DMEM com 10% de SFB e 10% de DMSO, em nitrogênio líquido, no Centro de Diagnóstico Microbiológico Animal (CEDIMA) do Centro de Ciências Agroveterinárias CAV-UEDESC.

Para as análises de expressão gênica de fatores angiogênicos e interação célula-material foram utilizadas linhagens celulares finitas de fibroblastos bovinos do banco de células do CEDIMA. Essas células foram obtidas através de explante após biópsia auricular de uma fêmea bovina da raça Flamengo, e criopreservadas com 10% de DMSO em criotubos em nitrogênio líquido a -196 °C (URIO, 2012).

Os criotubos contendo as células Vero e fibroblastos congelados foram retirados do botijão de nitrogênio líquido e colocados em banho-maria a 37 °C por aproximadamente 1 minuto. Em seguida, o conteúdo do criotubo foi transferido para um tubo de fundo cônico com capacidade de 15 mL, o qual continha 2 mL de DMEM + 10% de SFB a 37 °C. O tubo foi centrifugado a 526 g por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* de células foi ressuspensão em 1 mL de DMEM + 10% de SFB para a contagem celular pelo método de exclusão de células mortas por coloração com azul de Tripán a 0,4% (FRESHNEY, 2000).

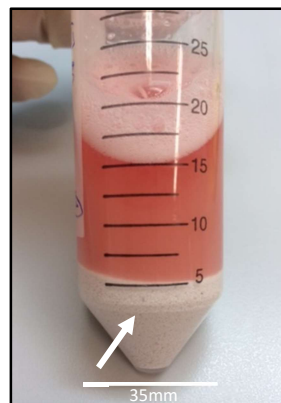
Após a contagem e deposição de  $5 \times 10^5$  células por placa de cultivo de 60 mm, as células eram cultivadas em DMEM acrescido de 10% de SFB, e mantidas na

incubadora a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub> em ar e atmosfera com umidade saturada, até atingirem a confluência máxima de 70%, quando era realizada a transferência para garrafas de 25 cm<sup>2</sup> para multiplicação ou para placas de 24 ou 96 poços para serem utilizadas nos experimentos.

#### 4.2.4 Preparo do Extrato dos Biomateriais em Grânulos

Os extratos foram obtidos por meio da imersão dos grânulos de cada biomaterial em meio DMEM com 10% de SFB, em tubos de fundo cônico com capacidade de 50 mL (TPP, Trasadingen, Suíça) (Figura 2), numa concentração de 200 mg/mL, por 24 h em incubadora a 37 °C sob agitação. Após a incubação a mistura foi centrifugada a 200 g por 10 minutos e o sobrenadante coletado e esterilizado por filtração em filtro com membrana de 0,22 µm. Os extratos permaneceram armazenados na geladeira a 4 °C até a sua utilização nos testes de curva de crescimento, MTT e expressão angiogênica.

Figura 2 – Grânulos de Biomaterial (seta) Imersos em DMEM com 10% de SFB



Fonte: A autora, 2017.

#### 4.2.5 Determinação da Curva de Crescimento Celular

A curva de crescimento celular tem como objetivo avaliar a proliferação das células em determinado período de tempo. Para obtenção da curva, as células Vero foram depositadas na densidade de  $1 \times 10^4$  células por poço em placas de 24 poços, com 1,9 cm<sup>2</sup> cada poço (TPP, Trasadingen, Suíça). Os extratos dos biomateriais foram testados em triplicata, assim como o grupo controle. Logo após a deposição das células foi acrescentado 1 mL do extrato de biomaterial acrescido de 10% de SFB, e

no grupo controle foi utilizado 1 mL do meio DMEM + 10% de SFB. As contagens foram realizadas às 24 h, 48 h e 72 h pós-cultivo.

Para a realização da leitura foi retirado o extrato do biomaterial ou meio de cultivo dos poços e as células individualizadas com a adição de 500 µL de tripsina a 0,05% a 37 °C. Para a inativação da tripsina foi acrescentado 1 mL de meio DMEM + 10% de SFB e este volume transferido para um microtubo de 1,5 mL e centrifugado por 5 min a 419 g. Em seguida da centrifugação e formação do pellet de células, o sobrenadante foi retirado e adicionou-se 100 µL de meio de cultivo com 10% de SFB para ressuspensão das células. As células eram homogeneizadas e feita a determinação da concentração celular pelo método de azul de Tripán a 0,4%, sendo as leituras realizadas na câmara de Neubauer. Todos os tratamentos foram feitos em triplicata.

A análise estatística dos dados da curva de crescimento foi feita utilizando o teste de Dunnett ( $p < 0.05$ ), através do Proc Univariate e Proc GLM do software estatístico SAS (University Edition).

#### **4.2.6 Determinação da Citotoxicidade dos Biomateriais pelo Teste MTT(3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina)**

O teste de citotoxicidade dos extratos dos biomateriais de fosfato de cálcio foi realizado de acordo a norma ISO 10993-5 (2009). Este ensaio é utilizado para estimar a citotoxicidade através da avaliação da atividade mitocondrial, onde somente células viáveis conseguem converter o sal amarelo MTT em cristais de formazan, de cor púrpura.

Para a realização deste teste foram utilizadas placas de 96 poços de fundo chato (TPP, Trasadingen, Suíça), onde foram depositadas  $1 \times 10^4$  células Vero por poço e deixadas em cultura com DMEM + 10% de SFB em estufa a 37 °C em atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub> por 24 h para que se formasse uma monocamada semi-confluyente.

Nesta avaliação foram testados:

- Os extratos dos biomateriais em 4 concentrações diferentes (100%, 50%, 25% e 12,5% do extrato, diluídos com DMEM + 10% de SFB);
- Controle positivo de toxicidade Triton X-100 em 4 concentrações diferentes (1%, 0,5%, 0,25% e 0,125%);

- Controle negativo de toxicidade: células VERO cultivadas em DMEM + 10% de SFB;

- Amostra Branco: somente DMEM + 10% de SFB sem adição de células.

Após 24 h de incubação, o meio de cultivo foi retirado de todos os poços com células e adicionado, por poço, 100 µL do extrato de biomaterial ou controle positivo ou controle negativo.

O MTT foi avaliado nos intervalos de 24, 48 e 72 horas após o plaqueamento. Decorrido cada período, retirou-se o meio de cultivo dos poços, sendo substituído por 100 µL de DMEM fresco (sem vermelho de fenol), adicionados de 10 µL da solução 12mM de MTT (5mg/mL) e incubados a 37 °C por 4 horas. Após, foi removido 85 µL do volume de cada poço e adicionado 50 µL de DMSO por poço, e incubados a 37 °C por 10 minutos. Realizada a homogeneização do conteúdo de cada poço e a placa colocada no agitador de placas por 5 minutos para a solubilização dos cristais de formazan. A leitura da absorbância dos cristais de formazan foi efetuada em leitor de ELISA Biotek® ELX808, com comprimento de onda de 490nm.

Todos os testes foram realizados em triplicata e a viabilidade celular relativa obtida através da equação abaixo:

$$\% \text{ Viabilidade celular relativa: } (DO_a - DO_b) / (DO_{cn} - DO_b) \times 100$$

Sendo DO<sub>a</sub>: densidade óptica da produção de formazan da amostra; DO<sub>b</sub>: densidade óptica do branco (DMEM sem células); DO<sub>cn</sub> densidade óptica do controle negativo de toxicidade.

Quanto menor o valor da % de viabilidade, maior o potencial citotóxico do material testado. Se a viabilidade for menor que 70 % a amostra testada possui potencial citotóxico (ISO 10993-5, 2009).

#### **4.2.7 Determinação da Interação Célula-Material por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

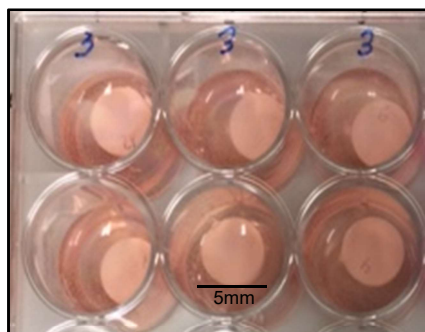
Nesta avaliação foram utilizados os materiais em formato de pastilhas, onde depositou-se uma pastilha de cada biomaterial e 5x10<sup>4</sup> fibroblastos por poço em placas de 24 poços, em duplicata (Figura 3). O cultivo se deu por 7 dias, sendo renovado o meio de cultivo quando necessário. Ao final do tempo de avaliação, o meio

de cultivo foi descartado e realizada a fixação do tapete celular com formol 2% por 24 horas em incubadora a 37 °C. Após retirado o fixador, o tapete celular foi desidratado completamente em incubadora a 37 °C.

As placas foram encaminhadas ao Grupo de Pesquisas em Biomateriais da UDESC/CCT- Joinville para realização do estudo da caracterização morfológica e microestrutural dos fibroblastos com os cilindros de biomaterial, através da técnica de MEV com o equipamento marca ZEISS modelo DSM 940A, por meio do método com elétrons secundários (SE), com distância de trabalho de 10mm e tensão de aceleração dos elétrons entre 15 kV.

A fim de evitar os efeitos de carga dentro da câmara do microscópio, todas as amostras foram submetidas ao processo de metalização por pulverização catódica com deposição de um filme de ouro sobre a superfície da amostra. Esta deposição foi realizada com um metalizador marca Bal-Tec modelo SCD 050 Sputter Coater, com os seguintes parâmetros de deposição iônica: temperatura na câmara de metalização de 25 °C, corrente de 40mA, tensão de 2kV e tempo de deposição de 140 segundos, fornecendo um filme de ouro na superfície das partículas da ordem de 30nm.

Figura 3 – Cultivo dos Fibroblastos com as Pastilhas de Biomaterial



Fonte: A autora, 2017.

#### 4.2.8 Reação em Cadeira da Polimerase Quantitativa em Tempo Real (qPCR)

Para a análise de expressão gênica de fatores angiogênicos foram utilizadas placas de 24 poços de fundo chato (TPP, Trasadingen, Suíça), foram onde foram depositadas  $2 \times 10^4$  fibroblastos por poço. Os extratos dos biomateriais foram testados em triplicata, assim como o grupo controle. Logo após a deposição das células foi acrescentado o extrato de biomaterial acrescido de 10% de SFB, e no grupo controle

foi utilizado o meio DMEM + 10% de SFB. Os cultivos foram mantidos em estufa a 37 °C em atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub> por 24 h, 48 h e 72 h.

Após cada período de avaliação, era retirado o extrato do biomaterial ou meio de cultivo dos poços e as células individualizadas com a adição de 500 µL de tripsina a 0,05% a 37 °C. Para a inativação da tripsina foi acrescentado 1 mL de meio DMEM + 10% de SFB e este volume transferido para um microtubo de 1,5 mL e centrifugado por 5 min a 419 g, formando o *pellet* de células.

A extração do RNA total foi realizada com a utilização do Kit ReliaPrep™ RNA Cell Miniprep System (Promega Corporation; Madison, WI, EUA). Com o propósito de reduzir substancialmente uma possível contaminação por DNA foi realizado tratamento com DNase (Promega Corporation). A pureza do RNA extraído foi verificada com o auxílio do espectrofotômetro NanoDrop® 2000 (Thermo Fisher Scientific, EUA) e a qualidade avaliada através da relação A260/280 nm que foi ~2,05 (± 0,03). Em seguida realizou-se a transcrição reversa para a síntese do DNA complementar (cDNA) utilizando o kit GoScript™ Reverse Transcription Mix, Random Primers (Promega Corporation; Madison, WI, EUA) em aparelho termociclador (MJ96+, Biocycler; Biosystems Importadora, Curitiba - PR, Brasil).

O qPCR foi realizado em placa de 48 poços (MicroAmp®, Applied Biosystems), com 3 repetições por amostra, com volume de reação de 15 µL, sendo 5 µL (30 ng) de cDNA e 10 µL de GoTaq® qPCR Master Mix (Promega Corporation; Madison, WI, EUA), no aparelho StepOne Real-Time (Applied BioSystems), com o uso de *primers* específicos para cada gene avaliado (Tabela 2).

Tabela 2 – *Primers* bovinos utilizados nas análises de qPCR

Gene	<i>Forward</i> (F) e <i>Reverse</i> (R)	Amplificação	Referência <sup>1</sup>
GAPDH <sup>2</sup>	F- CCTGCCCGTTTCGACAGATA R- GGCGACGATGTCCACTTTG	150 pb	NM_001034034.1
VEGF <sup>3</sup>	F- ACGAAGTGGTGAAGTTCATGG R- TTTTTGCAGGAACATTTACACG	388 pb	NM_001316955.1
FGF-2 <sup>4</sup>	F- TGTCTCCCCCTCACTCTGGTA R- ACTCCCTGTATAGCCAAAGGTCTG	79 pb	NM_174056.4

Fonte: A autora, 2019.

<sup>1</sup>Referência da Sequência no NCBI; <sup>2</sup>Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; <sup>3</sup>Fator de Crescimento Vascular Endotelial; <sup>4</sup>Fator de Crescimento Fibroblástico

Foi utilizado o software StepOne versão 2.1 (Applied Biosystems) para análise dos dados obtidos e geração das curvas de dissociação no final de cada execução, de modo a assegurar a presença de um único produto. Todas as amostras foram executadas com uma curva padrão de sete pontos com um *pool* de cDNA de todas as amostras com diluição seriada (100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 e 1,5625%). Foi gerada uma equação de regressão ao traçar os valores de limiar do ciclo de qPCR em relação ao log de cada valor da curva padrão. Todas as reações apresentaram coeficiente de determinação superior a 0,98 e eficiência entre 85 e 100%.

Os dados foram analisados através do Proc Mixed do programa estatístico SAS (University Edition). A expressão do gene *housekeeping* GAPDH foi utilizada como co-variável. As médias foram comparadas pelo LSMEANS, sendo a significância declarada em  $P < 0,05$ .

## 4.3 Resultados

### 4.3.1 Curva de Crescimento Celular

Quando avaliada a proliferação celular após contato com o extrato da HA, observou-se que em todos os períodos, 24, 48 e 72 horas, ocorreu diferença significativa quando comparados com o controle, apresentando contagem celular inferior. Na avaliação do nanocompósito HA/SiO<sub>2</sub> 5%, apenas no período de 24 horas de contato com o extrato, verificou-se contagem celular inferior em relação ao controle. Nos demais períodos, 48 e 72 horas, a contagem das células não diferiu significativamente do controle (Tabela 3).

Tabela 3 - Quantidade de células após contato com o extrato dos diferentes biomateriais diferentes tempos.

Tratamentos	Quantidade de Células por Poço			
	0 h	24 h	48 h	72 h
Controle	10.000 <sup>a</sup>	30.333 <sup>a</sup>	39.666 <sup>a</sup>	65.666 <sup>a</sup>
HA	10.000 <sup>a</sup>	20.333 <sup>b</sup>	21.000 <sup>b</sup>	39.666 <sup>b</sup>
HA/SiO <sub>2</sub> 5%	10.000 <sup>a</sup>	13.000 <sup>b</sup>	31.666 <sup>a</sup>	59.666 <sup>a</sup>

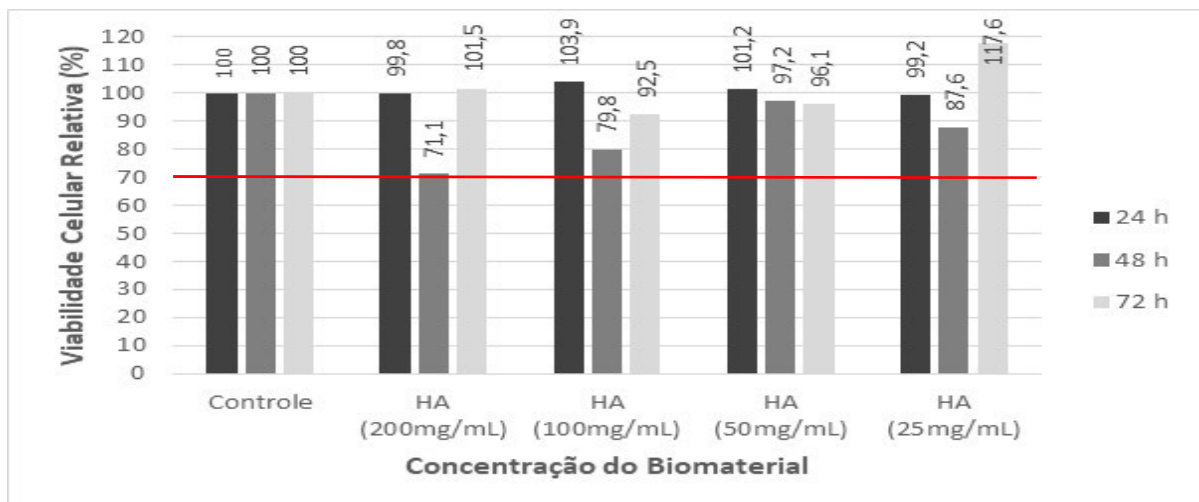
Letras diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ). Fonte: A autora, 2019.

### 4.3.2 Citotoxicidade dos Biomateriais pelo Teste MTT

Os cultivos de células VERO foram submetidos ao tratamento com os extratos dos dois biomateriais em quatro concentrações, durante 24, 48 e 72h para determinação da função mitocondrial pela redução do MTT. A coloração púrpura do meio, em razão dos cristais de formazan solubilizados, foi observada em diferentes intensidades em todas as amostras testadas, com exceção do controle branco, que continha apenas DMEM + 10% de SFB e dos controles positivos de citotoxicidade, Triton X-100, em diferentes concentrações, pois não houve a conversão do sal devido à ausência de viabilidade celular.

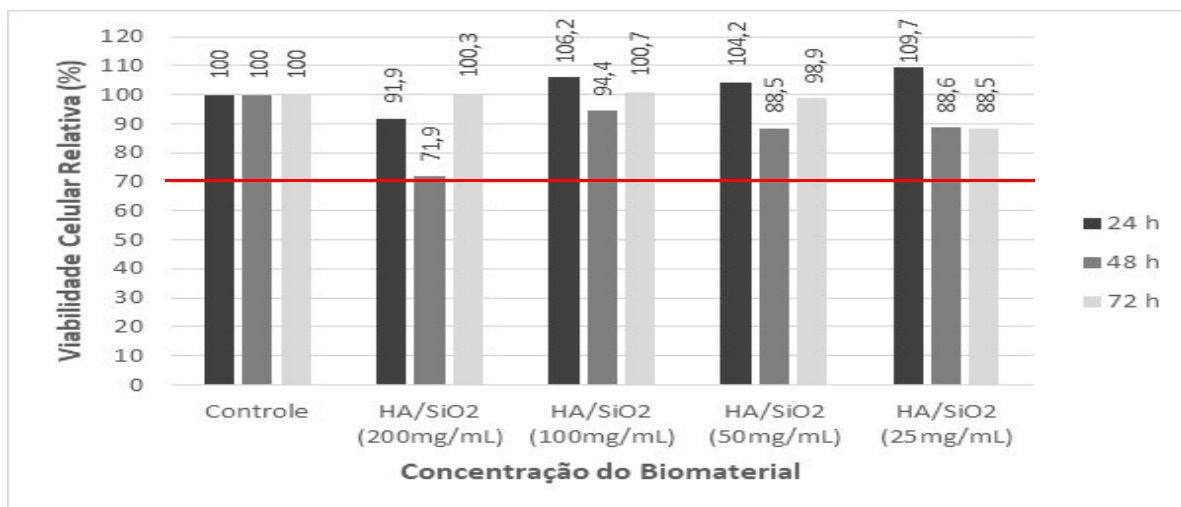
Em todos os períodos e concentrações avaliados, as células tratadas com o extrato de HA e HA/SiO<sub>2</sub> 5% apresentaram sua função mitocondrial preservada, com viabilidade celular relativa acima de 70% quando comparadas com o controle (Gráfico 1 e 2).

Gráfico 1- Viabilidade celular relativa (%) medida pelo teste MTT após contato com diferentes concentrações do extrato de HA em 24, 48 e 72 h.



Fonte: A autora, 2019.

Gráfico 2- Viabilidade celular relativa (%) medida pelo teste MTT após contato com diferentes concentrações do extrato do nanocompósito HA/SiO<sub>2</sub> 5% em 24, 48 e 72 h.

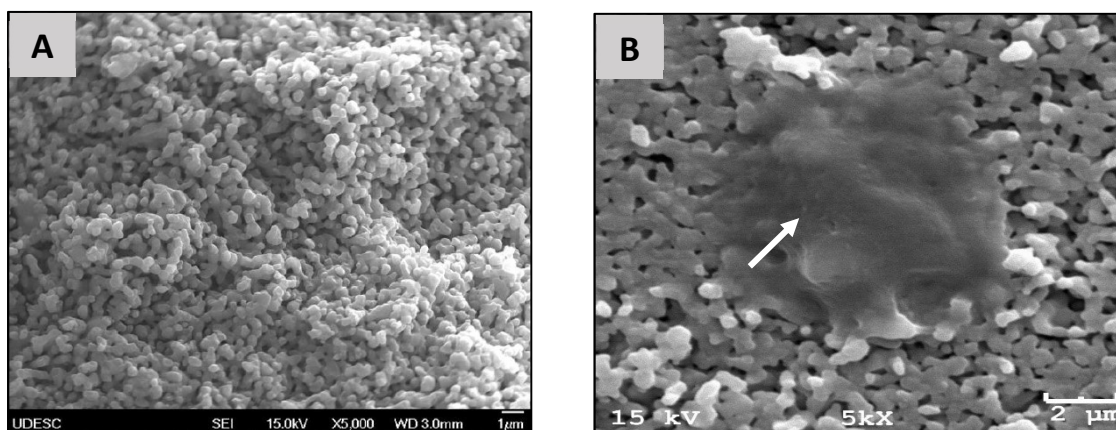


Fonte: A autora, 2019.

#### 4.3.3 Interação Célula-Material

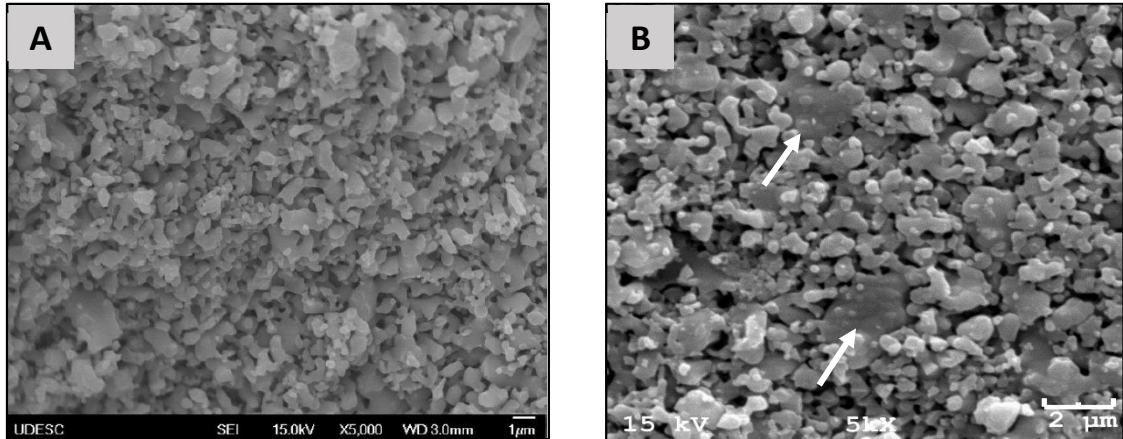
Após o cultivo dos fibroblastos com as pastilhas de biomaterial por 7 dias, com o auxílio da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) observou-se a presença das células na superfície das pastilhas de HA (Figura 4) e de HA/SiO<sub>2</sub> 5% (Figura 5).

Figura 4 – MEV da pastilha de HA. A) Micrografia mostrando a superfície de fratura do biomaterial. B) Fibroblasto aderido (seta) na superfície do biomaterial em contato por 7 dias.



Fonte: Grupo de Pesquisa em Biomateriais UDESC/CCT, 2018.

Figura 5 – MEV da pastilha do nanocompósito HA/SiO<sub>2</sub> 5%. A) Micrografia mostrando a superfície de fratura do biomaterial. B) Fibroblastos aderidos (setas) na superfície do biomaterial em contato por 7 dias.



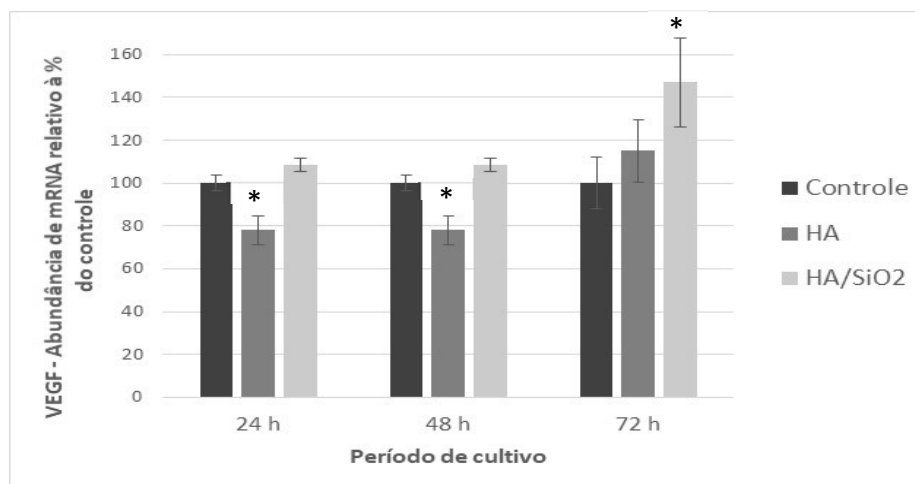
Fonte: Grupo de Pesquisa em Biomateriais UDESC/CCT, 2018.

#### 4.3.4 Reação em Cadeira da Polimerase Quantitativa em Tempo Real (qPCR)

Foi medida a expressão de dois genes promotores da angiogênese, o VEGF e FGF-2, após contato com o extrato de HA e HA/SiO<sub>2</sub> 5% por 24, 48 e 72 horas.

No tratamento HA ocorreu diminuição de 22% ( $P=0,03$ ) na expressão do VEGF nos períodos de 24 e 48 horas de cultivo (Gráfico 3). O tratamento HA 72 horas não alterou a expressão deste gene. No gráfico 3 também pode-se observar que o tratamento HA/SiO<sub>2</sub> 5% no período de 72 horas aumentou em 47% ( $P<0,0001$ ) a expressão do VEGF em relação ao controle. Nos demais períodos, para o material HA/SiO<sub>2</sub> 5%, não houve alteração na expressão.

Gráfico 3- Expressão gênica do VEGF em células cultivadas com extrato de HA e HA/SiO<sub>2</sub> 5% por 24, 48 e 72 horas.

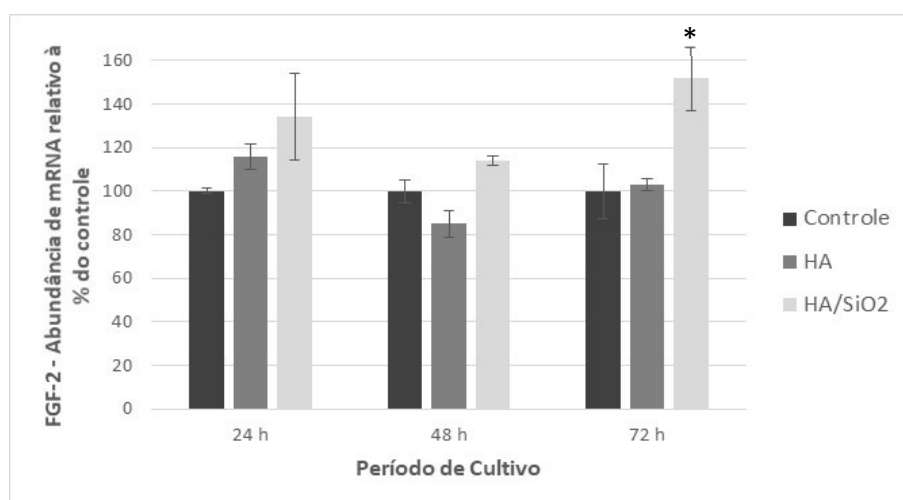


\* P<0,05.

Fonte: A autora, 2019.

Em relação ao gene FGF-2, no tratamento HA não ocorreu alteração na expressão em todos os períodos avaliados (Gráfico 4). Já na avaliação HA/SiO<sub>2</sub> 5%, ocorreu aumento de 52% (P<0,0001) na expressão de FGF-2 com 72 horas de cultivo (Gráfico 4). Em 24 e 48 horas não houve mudanças na expressão em relação ao controle.

Gráfico 4- Expressão gênica do FGF-2 em células cultivadas com extrato de HA e HA/SiO<sub>2</sub> 5% por 24, 48 e 72 horas.



\* P<0,05.

Fonte: DUARTE, 2019.

#### 4.4 Discussão

As cerâmicas de fosfato de cálcio têm se destacado na área de materiais de reparação óssea pela sua semelhança química e cristalográfica com a apatita óssea do esqueleto, reforçando sua importância na ortopedia e odontologia (YUASA et al., 2004; CAMARGO et al., 2007a; CAMARGO et al., 2014a; CAMARGO et al., 2014b). Biomateriais nanocompósitos de matriz de fosfato de cálcio, que apresentam nanopartículas dispersas dentro de uma fase contínua de hidroxiapatita, podem ter sua bioatividade melhorada, contribuindo significativamente com os processos de reparação do tecido ósseo lesado (KIM et al., 2002; JUN et al., 2003; VISWANATH & RAVISHANKAR, 2006).

Neste estudo foram testadas biocerâmicas de HA e nanocompósitos de HA/SiO<sub>2</sub> 5% que apresentam micro e nanoestruturas microporosas interconectadas. Segundo Camargo et al. (2014) estas características são favoráveis para adesão e proliferação celular nos microporos e superfície dos grãos, destacando sua utilização como matriz sintética na recuperação de tecido ósseo lesado.

Na análise da curva de crescimento, o tratamento HA alterou a proliferação celular nos três períodos avaliados em relação ao controle, porém o padrão de crescimento celular ascendente se manteve, demonstrando que as variações observadas não inviabilizaram a proliferação das células. O contato com o extrato do material HA/SiO<sub>2</sub> 5% reduziu o número de células com 24h de cultivo quando comparado com o controle. Contudo, nos demais períodos não houve diferença e a curva de crescimento se manteve crescente durante toda a análise, comprovando que o contato com o nanocompósito não afetou a capacidade de proliferação celular. A mudança brusca no meio de cultivo pode ocasionar um estresse inicial com alteração no ciclo celular, que desaparece assim que a cultura se estabiliza, como foi observado por Alcaide et al. (2008) em sua avaliação de citocompatibilidade de biomateriais bifásicos de fosfatos de cálcio.

A taxa de proliferação celular também foi utilizada por Masson & Lombello (2016) e por Fricain et al. (2002) como um dos parâmetros para avaliação de citotoxicidade de biomateriais. No trabalho de Fricain et al. (2002) foi constatada uma menor proliferação das células que entraram em contato com o biomaterial, derivado de exoesqueleto de corais, quando comparado ao controle, porém classificaram como um efeito citotóxico aceitável, atestando a biocompatibilidade do material.

No ensaio de redução do MTT ambos os tratamentos, HA e HA/SiO<sub>2</sub> 5%, em todos os períodos e concentrações avaliados, não provocaram alteração na função mitocondrial das células, com resultados de viabilidade celular relativa acima de 70% quando comparados com o controle, confirmando sua biocompatibilidade conforme classificação da ISO 10993-5 (2009). Corroborando com este estudo, Alcaide et al. (2008) testaram a citotoxicidade de fosfatos de cálcio bifásicos em fibroblastos e osteoblastos pelo teste MTT e concluíram que este material é biocompatível com potencial no uso em reparação óssea.

A ausência de citotoxicidade de cerâmicas de fosfato de cálcio, avaliada pelo ensaio MTT, foi comprovada por diversos autores, sugerindo seu potencial para aplicações biológicas (WEBLER et al., 2014; CHEN et al., 2015; SILVA et al., 2016). Semelhante ao observado neste estudo, Calandrelli et al. (2010) atestaram a ausência de citotoxicidade de nanocompósitos com a segunda fase de sílica. Em outro ensaio *in vitro* a sílica mostrou-se capaz de aumentar a viabilidade celular após ser adicionada em meio de cultura utilizado no cultivo de células estromais da medula óssea (HAN et al., 2013).

A avaliação da biocompatibilidade em experimentos *in vitro* pode ser complementada através da MEV, analisando-se a adesão, bem como a proliferação celular na superfície do material estudado (ANSELME, 2000). Vários estudos avaliaram a biocompatibilidade *in vitro* de biomateriais, através de ensaios de viabilidade celular em conjunto com a avaliação da interação célula-material por meio da MEV (TAKAMORI, 2004; ALCAIDE et al., 2008; OSATHANON et al., 2008; MONTAZEROLGHAEM et al., 2015; SIQUEIRA et al., 2015; ZHANG et al., 2015; SILVA et al., 2016). Neste trabalho foi realizada a avaliação da interação célula-material através da MEV após 7 dias de cultivo e observou-se que ocorreu a adesão dos fibroblastos sobre a superfície de HA e do nanocompósito HA/SiO<sub>2</sub> 5%. O que pode ser explicado pelas características micro e nanoestruturas microporosas interconectadas que esses biomateriais apresentam que, segundo Camargo et al. (2014), são favoráveis para adesão e proliferação celular.

Semelhante ao encontrado aqui, Itthichaisri et al. (2007), Hong et al. (2010) e Marchi et al. (2013) observaram adesão das células na superfície da HA com 1, 7 e 3 dias de cultivo, respectivamente. Diferentemente do relatado por Silva et al. (2016) onde foi observada a adesão celular nos discos de HA apenas no primeiro dia de análise, seguido da ausência de células na superfície do material nos períodos

posteriores, sugerindo que devido às propriedades do substrato do material as células não foram capazes de se aderir.

A avaliação da interação entre as células em contato com biomateriais com sílica também foi realizada por Sarker et al., (2013), com resultados semelhantes aos encontrados no presente estudo, onde eles observaram a adesão das células na superfície microporosa desde o primeiro até o décimo dia de cultivo. De maneira semelhante, Wu & Chang (2013) conduziram vários ensaios de modo a avaliar a adesão de células na superfície de cerâmicas à base de sílica, onde constataram a interação celular com a superfície dos materiais.

A angiogênese é considerada um processo essencial no reparo de fraturas ósseas e a formação do novo tecido ósseo é altamente dependente de uma adequada vascularização (GLOWACKI, 1998; CARANO & FILVAROFF, 2003; KANCZLER & OREFFO, 2008). Dentre os principais fatores promotores da angiogênese estão o VEGF e o FGF-2 (KERAMARIS et al., 2008; MURAMAKI & SIMONS, 2008). É possível incorporar o VEGF e FGF na matriz dos biomateriais com o objetivo de facilitar a angiogênese (ROUWKEMA et al., 2008). Contudo, esta estratégia é limitada devido ao seu alto custo, técnicas complexas e meia-vida curta dos fatores de crescimento (SOHIER et al., 2008). Uma nova estratégia para otimizar a reparação óssea tem sido estudada onde se utilizam os biomateriais como estimuladores da angiogênese (CHEN et al., 2015).

No presente estudo, ensaios *in vitro* foram realizados de modo a investigar a capacidade dos biomateriais de fosfato de cálcio em induzir a angiogênese por meio da expressão dos seus principais promotores, VEGF e FGF-2. Não foi detectada alteração na expressão do gene FGF-2 após contato das células com o extrato de HA em todos os períodos avaliados, quando comparados ao controle. Assim como foi observado por Chen et al. (2015) em análise com células endoteliais humanas e cultivo por 7 dias. Já o contato das células com o extrato de HA provocou diminuição na expressão do VEGF nos períodos de 24 e 48 horas de cultivo. Esse resultado difere do encontrado por Chen et al. (2015), onde não observaram mudança significativa na expressão de VEGF por células endoteliais humanas após cultivo por 7 dias com a HA. Também diverge do estudo de Shi et al. (2017), onde testaram a capacidade angiogênica da HA em células endoteliais humanas, constatando um leve aumento da expressão do VEGF com a HA em formato de nanopartículas. Portanto, novos

estudos com esse biomaterial se fazem necessários para identificar uma possível causa da diminuição da expressão do VEGF.

Em relação ao tratamento HA/SiO<sub>2</sub> 5%, no período de 72 horas, pode-se observar um aumento significativo na expressão do VEGF e FGF-2 em relação ao controle. Day (2005) avaliaram a capacidade de estimulação da secreção de fatores angiogênicos por materiais à base de sílica (biovidros) e também encontraram um aumento na expressão dos dois fatores pesquisados, não sendo possível explicar o mecanismo envolvido nesta estimulação, necessitando futuras investigações. Pode-se citar outras pesquisas que demonstraram o potencial angiogênico, com a estimulação do VEGF e FGF-2, de biomateriais à base de sílica: KESHAW et al. (2005); DAY et al. (2005); MOOSVI & DAY (2009); KESHAW et al. (2009).

Para Malhotra & Habibovic (2016) é difícil explicar a extensão da influência dos fosfatos de cálcio na angiogênese e como ela se compara a outros mecanismos estimulatórios e inibitórios (MALHOTRA & HABIBOVIC, 2016). Aguirre et al. (2012) verificaram o potencial angiogênico de compósitos de fosfato de cálcio em contato com células endoteliais e sugerem que o cálcio liberado pela degradação dos biomateriais no meio ativaria o receptor sensor do cálcio (CASR), uma proteína de superfície na célula, que estimularia a expressão de VEGF. Já Kanaya et al. (2017) sugerem que níveis elevados de cálcio extracelular atuam nas células da polpa dentária através de receptores acoplados a proteína G (GPCRs), que ativam a proteína quinase A, induzindo a expressão de FGF-2. Porém, não se deve considerar apenas o cálcio como indutor destas respostas específicas em vários tipos celulares. Todos os mecanismos e interação com outros fatores de crescimento devem ser levados em conta (AGUIRRE et al., 2012).

Alguns autores sugerem que a capacidade de materiais à base de sílica em induzir a liberação de VEGF e FGF-2 está relacionada à sílica liberada pela degradação do biomaterial e seu potencial em ativar cascatas celulares que levariam a liberação dos fatores em questão (ZHAI et al., 2012; LI & CHANG, 2013; XIA, et al., 2016). Porém, ainda não é possível afirmar por qual mecanismo a sílica estimula a liberação desses fatores pelas células. Uma possibilidade levantada por Xia et al. (2016) em relação ao VEGF seria que a sílica ativaria uma via de sinalização mediada pela proteína quinase P38, que ativaria a proteína AKT que estimularia a expressão do fator. Mecanismo este que necessita ser mais bem elucidado.

A habilidade dos nanocompósitos HA/SiO<sub>2</sub> 5% em estimular a expressão *in vitro* dos fatores angiogênicos VEGF e FGF-2 fornece uma nova ferramenta de estimulação da angiogênese extremamente útil para aplicação em tecidos ósseos em reparação. Futuras investigações devem ser realizadas com esses materiais de modo a buscar o mecanismo celular envolvido no aumento da expressão gênica, assim como sua avaliação *in vivo*.

#### **4.5 Conclusão**

Os resultados deste estudo sugerem que o contato das células Vero com os diferentes extratos de biomateriais cerâmicos de fosfato de cálcio e nanocompósitos HA/SiO<sub>2</sub> 5% influencia na proliferação destas células, porém mantendo sua viabilidade e comprovando a biocompatibilidade dos biomateriais nas condições avaliadas. Além disso, o cultivo de fibroblastos com os cilindros dos biomateriais proporcionou a adesão celular na superfície dos materiais, verificada através das imagens de MEV, reforçando a característica de biocompatibilidade.

Os nanocompósitos HA/SiO<sub>2</sub> 5% induziram a expressão de VEGF e FGF-2 em fibroblastos, o que sugere seu potencial para utilização como estimuladores da angiogênese em reparo ósseo.

#### **4.6 Agradecimentos**

Ao Grupo de Pesquisas em Biomateriais UDESC/CCT pelo fornecimento dos biomateriais testados, à FAPESC pelos recursos disponibilizados e à UNIEDU/FUMDES pela bolsa de estudos.



## 5 ARTIGO 2

### Avaliação da Citotoxicidade e Efeitos Angiogênicos de Nanocompósitos de Hidroxiapatita/ZrO<sub>2</sub> e Hidroxiapatita/MgO para aplicações na Reconstrução Óssea

#### RESUMO

Defeitos ósseos de grandes proporções podem requerer a aplicação de enxertos ósseos para a reconstrução do tecido. O padrão ouro entre os enxertos para reconstrução óssea é o autoenxerto, porém, devido a várias limitações, a utilização de biomateriais sintéticos tem se destacado. As biocerâmicas nanoestruturadas de fosfato de cálcio se destacam na área de materiais de reparação óssea pela sua semelhança química e cristalográfica com a apatita óssea do esqueleto humano. Pesquisas avançam com o desenvolvimento de materiais nanocompósitos com matriz de fosfato de cálcio. Nanocompósitos podem ser definidos como um material sólido composto de várias fases, onde uma das fases possui dimensões nanométricas. Estas propriedades permitem que ocorra uma maior adesão e proliferação celular na superfície do material quando comparado com materiais convencionais. Independente do biomaterial desenvolvido, o primeiro nível de testes, dentro da avaliação de biocompatibilidade é a determinação da citotoxicidade *in vitro*. A angiogênese é considerada um processo essencial no reparo de fraturas ósseas e a formação do novo tecido ósseo é altamente dependente de uma adequada vascularização. Alguns biomateriais apresentam a habilidade de estimular a expressão de fatores angiogênicos, como o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e o fator de crescimento fibroblástico (FGF-2). Este trabalho teve o objetivo de avaliar a citotoxicidade de nanocompósitos de matriz de fosfato de cálcio em células de linhagem Vero e investigar seus efeitos na expressão de fatores angiogênicos e a interação célula-material em cultura de fibroblastos bovinos. Foram testados os seguintes nanocompósitos: Hidroxiapatita (HA)/ZrO<sub>2</sub> 5% (1100°C/2h) e HA/MgO 1% (1100°C/2h). Nos resultados de viabilidade celular obtidos pelo teste 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/ZrO<sub>2</sub> 5% induziram a expressão de VEGF e FGF-2 após cultivo dos fibroblastos com o extrato do biomaterial por 72 horas, o que sugere seu potencial para utilização como estimuladores da angiogênese em reparo ósseo.

**Palavras-chave:** Reparação óssea. Moduladores da Angiogênese. Cerâmicas de Fosfato de Cálcio. Nanocompósitos.

## Evaluation of Cytotoxicity and Angiogenic Effects of Hydroxyapatite/ZrO<sub>2</sub> and Hydroxyapatite/MgO Nanocomposites for Applications in Bone Reconstruction

### ABSTRACT

Bone defects of large proportions may require the application of bone grafts for tissue reconstruction. The gold standard among grafts for bone reconstruction is autograft, however due to several limitations the use of synthetic biomaterials has been highlighted. The nanostructured calcium phosphate bioceramics stand out in the area of bone repair materials due to their chemical and crystallographic similarity to human skeletal apatite. Research advances with the development of nanocomposite materials with calcium phosphate matrix. Nanocomposites can be defined as a solid material composed of several phases, where one of the phases has nanometric dimensions. These properties allow greater cell adhesion and proliferation on the surface of the material when compared to conventional materials. Regardless of the biomaterial developed, the first level of tests within the biocompatibility assessment is the determination of *in vitro* cytotoxicity. Angiogenesis is considered an essential process in bone fractures repair and the formation of new bone tissue is highly dependent on adequate vascularization. Some biomaterials have the ability to stimulate the expression of angiogenic factors, such as vascular endothelial growth factor (VEGF) and fibroblast growth factor (FGF-2). This work aimed to evaluate the cytotoxicity of calcium phosphate matrix nanocomposites in Vero cells and to investigate their effects on the expression of angiogenic factors and cell-material interaction in bovine fibroblast culture. The following nanocomposites were tested: Hydroxyapatite (HA)/ZrO<sub>2</sub> 5% (1100 °C/2h) and HA/MgO 1% (1100 °C/ 2h). In cell viability results obtained by the MTT test and growth curve, it was found that the biomaterials tested were biocompatible. The analysis of the cell-material interaction made by scanning electron microscopy showed adhesion of fibroblasts on the surface of the tested biomaterials, reinforcing its characteristic of biocompatibility. The HA/ZrO<sub>2</sub> 5% nanocomposites induced the expression of VEGF and FGF-2 after culturing the fibroblasts with biomaterial extract for 72 hours, suggesting their potential for use as angiogenesis enhancer in bone repair.

**Keywords:** Bone Repair. Angiogenesis Modulators. Calcium Phosphate Ceramics. Nanocomposites.

## 5.1 Introdução

Defeitos ósseos de grandes proporções ou complicações pós-traumáticas podem requerer a aplicação de enxertos ósseos para o reparo do tecido lesado. Os enxertos ósseos, que podem ser biológicos ou sintéticos, preenchem os espaços, fornecem suporte e podem otimizar os processos biológicos de reparo do defeito ósseo (CALORI et al., 2011).

O padrão ouro entre os enxertos para reconstrução óssea é o autoenxerto, onde o material a ser implantado é obtido de outro local saudável no mesmo indivíduo. (KAMITAKAHARA et al., 2008). Contudo, a limitação na quantidade de tecido e a necessidade de um procedimento cirúrgico adicional tem resultado em grande interesse por materiais sintéticos, denominados de biomateriais (ARCOS & VALLET-REGÍ, 2010; KOLK et al., 2012).

Um substituto ósseo ideal deve ser biocompatível, bioabsorvível e com potencial para reparação óssea (CALORI et al., 2011). Além disso, ele não pode induzir a formação de tecido fibrótico e deve fornecer suporte para que o tecido ósseo seja reparado (VAN DER STOK et al., 2011).

Biomateriais utilizados em aplicações clínicas incluem polímeros, metais, cerâmicas, compósitos e nanocompósitos (PIRES et al., 2015). As cerâmicas de fosfato de cálcio se destacam na área de biomateriais de substituição óssea pela sua semelhança química e cristalográfica com a apatita óssea do esqueleto humano, reforçando sua importância na ortopedia, odontologia, fixação de implantes e reparação do tecido ósseo (YUASA et al., 2004; CAMARGO et al., 2007; CAMARGO et al., 2014a). Dentre as características que colocam estas cerâmicas como potenciais substitutos ósseos estão a sua biocompatibilidade e bioatividade (HENCH, 1998; JUN et al., 2003). As biocerâmicas de fosfato de cálcio se classificam principalmente nas composições hidroxiapatita (HA) e trifosfato de cálcio alfa e beta (PIRES et al., 2015).

Os nanocompósitos apresentam características estruturais únicas que têm atraído notável interesse de pesquisas na área da engenharia tecidual (BRAMHILL et al., 2017). Nanocompósito pode ser definido como um material sólido composto de várias fases, onde uma das fases possui dimensões nanométricas (FAJARDO et al., 2015). Estas propriedades permitem que ocorra uma maior adesão e proliferação celular na superfície do material quando comparado com materiais convencionais (BRAMHILL et al., 2017).

Os nanocompósitos de fosfato de cálcio apresentam nanopartículas dispersas dentro de uma fase contínua de hidroxiapatita podem ter sua bioatividade melhorada, contribuindo significativamente com os processos de reparação do tecido ósseo lesado (KIM et al., 2002; JUN et al., 2003; VISWANATH & RAVISHANKAR, 2006). Alguns dos materiais em formato de nanopartículas que podem ser adicionados na matriz de HA podem ser a zircônia e o magnésio.

A zircônia é uma das cerâmicas mais utilizadas e é considerada um material inerte, apresentando resistência mecânica e térmica (SHI et al., 2006; HISBERGUES et al., 2008). É considerada um material biocompatível *in vitro* e *in vivo* (HISBERGUES et al., 2008) que auxilia na formação óssea (JOSSET et al., 1999). O Magnésio é importante na formação da apatita biológica, presente na parte mineral dos ossos (SARIS et al., 2000) e é considerado biocompatível e atóxico (VORMANN, 2003; WOLF & CITTADINI, 2003; LI et al., 2004). Apresenta efeito na diferenciação de células osteoblásticas e a sua rápida biodegradação libera íons no tecido vivo, estimulando as células locais para agirem na formação do tecido ósseo (SEZER, 2018).

O processo de formação de novos vasos sanguíneos no local da fratura é indispensável para o reparo do tecido, pois fornece adequado aporte de oxigênio, nutrientes, fatores de crescimento, permite o recrutamento de células e a remoção de metabólitos (CARANO & FILVAROFF, 2003; SARAN et al., 2014). A chegada de cálcio e fosfato que contribuem para a mineralização do tecido ósseo também depende de uma adequada vascularização (SARAN et al., 2014; STEGEN et al., 2014).

Os principais fatores angiogênicos envolvidos na promoção da angiogênese são o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e o fator de crescimento fibroblástico básico (FGF-2) (KERAMARIS et al., 2008; MURAMAKI & SIMONS, 2008). Alguns estudos apontam a capacidade de certos biomateriais, como os fosfatos de cálcio, de estimular a expressão de fatores angiogênicos de modo a otimizar a reparação óssea (CHEN et al., 2015).

Este trabalho teve como objetivo avaliar a citotoxicidade, a interação célula-material e os efeitos angiogênicos de nanocompósitos de hidroxiapatita/zircônia e hidroxiapatita/magnésio para uso em reparação óssea.

## 5.2 Material e Métodos

### 5.2.1 Obtenção dos Nanocompósitos de Matriz de Fosfato de Cálcio

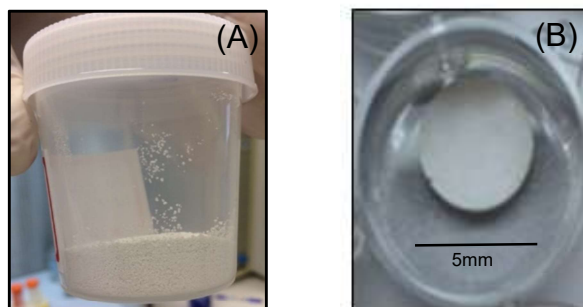
Os nanocompósitos de matriz de fosfato de cálcio utilizados no presente trabalho foram fornecidos pelo Grupo de Pesquisa em Biomateriais da UDESC/CTT – Joinville e são formados pelas seguintes composições: HA/ZrO<sub>2</sub> 5% e HA/MgO 1%, obtidos da sinterização a temperatura de 1100 °C/2h (Tabela 4). Ambos os materiais se apresentam sob a forma de grânulos (Figura 6-A) e pastilhas (Figura 6-B).

Tabela 4 – Biomateriais utilizados no experimento de acordo com a forma, composição e temperatura de sinterização.

Forma	Composição	Temperatura de Sinterização
Grânulos	HA/ZrO <sub>2</sub> 5%	1100 °C/2h
Grânulos	HA/MgO 1%	1100 °C/2h
Pastilhas	HA/ZrO <sub>2</sub> 5%	1100 °C/2h
Pastilhas	HA/MgO 1%	1100 °C/2h

Legenda: HA- hidroxiapatita; ZrO<sub>2</sub>- zircônia; MgO- óxido de magnésio.  
 Fonte: Grupo de Pesquisa em Biomateriais UDESC/CCT, 2017.

Figura 6 - Biomaterial no formato de grânulos (A) e pastilha (B)



Fonte: A autora, 2017.

### 5.2.2 Preparo de Meios para Cultivo Celular

Para o cultivo e manipulação das células foi utilizado o meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) High glucose D1152 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA), contendo 25 mM de HEPES e 4,5 g/L de glicose, adicionado de 26 mM de NaHCO<sub>3</sub>, 0,2 mM de piruvato de sódio, 65 mg/L de penicilina sódica (Sigma-Aldrich

Co.), 50 mg/L de sulfato de estreptomicina (Sigma-Aldrich Co.), e suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Nutricell®, Campinas, SP). Para a individualização das células foi usada solução isotônica de 0,05% de Tripsina 1:250 (BD Difco®, 215240, França) contendo 0,6 mM de EDTA.

Os meios e soluções utilizados no experimento foram preparados com água ultrapura tipo I (Direct-Q, Milli-Q). Após seu preparo, os meios eram filtrados utilizando-se um filtro descartável com membrana de 0,22 micrômetros e armazenados a 4 °C até o momento de sua utilização.

### 5.2.3 Obtenção e Manutenção das Células

Para os testes de MTT e curva de crescimento celular foram utilizadas células de linhagem Vero gentilmente cedidas pelo laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias do CAV/UDESC, Lages. Essas células foram mantidas criopreservadas em criotubos em DMEM com 10% de SFB e 10% de DMSO, em nitrogênio líquido, no Centro de Diagnóstico Microbiológico Animal (CEDIMA) do Centro de Ciências Agroveterinárias CAV-UDESC.

Para as análises de expressão gênica de fatores angiogênicos e interação célula-material foram utilizadas linhagens celulares finitas de fibroblastos do banco de células do CEDIMA. Essas células foram obtidas através de explante após biópsia auricular de uma fêmea bovina da raça Flamengo, e criopreservadas com 10% de DMSO em criotubos em nitrogênio líquido a -196 °C (URIO, 2012).

Os criotubos contendo as células Vero e fibroblastos foram retirados do botijão de nitrogênio líquido e colocados em banho-maria a 37 °C por aproximadamente 1 minuto. Em seguida, o conteúdo do criotubo foi transferido para um tubo de fundo cônico com capacidade de 15 mL, o qual continha 2 mL de DMEM + 10% de SFB a 37 °C. O tubo foi centrifugado a 526 g por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* de células foi ressuspenso em 1 mL de DMEM + 10% de SFB para a contagem celular pelo método de exclusão de células mortas por coloração com azul de Tripán a 0,4% (FRESHNEY, 2000).

Após a contagem e deposição de  $5 \times 10^5$  células por placa de cultivo de 60 mm, as células eram cultivadas em DMEM acrescido de 10% de SFB, e mantidas na incubadora a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub> em ar e atmosfera com umidade saturada, até atingirem a confluência máxima de 70%, quando era realizada a transferência para

garrafas de 25 cm<sup>2</sup> para multiplicação ou para placas de 24 ou 96 poços para serem utilizadas nos experimentos.

#### 5.2.4 Preparo do Extrato dos Biomateriais em Grânulos

Os extratos foram obtidos por meio da imersão dos grânulos de cada biomaterial em meio DMEM com 10% de SFB, em tubos de fundo cônico com capacidade de 50 mL (TPP, Trasadingen, Suíça) (Figura 7), numa concentração de 200 mg/mL, por 24 h em incubadora a 37 °C. Após a incubação a mistura foi centrifugada a 200 g por 10 minutos e o sobrenadante coletado e esterilizado por filtração em filtro com membrana de 0,22 µm. Os extratos permaneceram armazenados na geladeira a 4 °C até a sua utilização nos testes de curva de crescimento, MTT e expressão angiogênica.

Figura 7 – Grânulos de Biomaterial (seta) Imersos em DMEM com 10% de SFB



Fonte: A autora, 2017.

#### 5.2.5 Determinação da Curva de Crescimento Celular

Para obtenção da curva de crescimento as células Vero foram depositadas na densidade de  $1 \times 10^4$  células por poço em placas de 24 poços, com 1,9 cm<sup>2</sup> cada poço (TPP, Trasadingen, Suíça). Os extratos dos biomateriais foram testados em triplicata, assim como o grupo controle. Logo após a deposição das células foi acrescentado 1 mL do extrato de biomaterial acrescido de 10% de SFB, e no grupo controle foi utilizado 1 mL do meio DMEM + 10% de SFB. As contagens foram realizadas às 24 h, 48 h e 72 h pós-cultivo.

Para a leitura foi retirado o extrato do biomaterial ou meio de cultivo dos poços e as células individualizadas com a adição de 500 µL de tripsina a 0,05% a 37 °C. Para a inativação da tripsina foi acrescentado 1 mL de meio DMEM + 10% de SFB e este volume transferido para um microtubo de 1,5 mL e centrifugado por 5 min a 419 g. Em seguida da centrifugação e formação do pellet de células, o sobrenadante foi retirado e adicionou-se 100 µL de meio de cultivo com 10% de SFB para ressuspensão das células. As células eram homogeneizadas e feita a determinação da concentração celular pelo método de azul de Tripán a 0,4%, sendo as leituras realizadas na câmara de Neubauer. Todos os tratamentos foram feitos em triplicata.

A análise estatística dos dados da curva de crescimento foi feita utilizando o teste de Dunnett ( $p < 0.05$ ), através do Proc Univariate e Proc GLM do software estatístico SAS (University Edition).

### **5.2.6 Determinação da Citotoxicidade dos Biomateriais pelo Teste MTT(3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina)**

O ensaio de toxicidade *in vitro* dos extratos dos biomateriais de fosfato de cálcio foi realizado de acordo a norma ISO 10993-5 (2009).

Foram utilizadas placas de 96 poços de fundo chato (TPP, Trasadingen, Suíça), onde foram depositadas  $1 \times 10^4$  células Vero por poço e deixadas em cultura com DMEM + 10% de SFB em estufa a 37 °C em atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub> por 24 h para que se formasse uma monocamada semi-confluyente.

Neste ensaio foram testados:

- Os extratos dos biomateriais em 4 concentrações diferentes (100%, 50%, 25% e 12,5% do extrato, diluídos com DMEM + 10% de SFB);
- Controle positivo de toxicidade Triton X-100 em 4 concentrações diferentes (1%, 0,5%, 0,25% e 0,125%);
- Controle negativo de toxicidade: células VERO cultivadas em DMEM + 10% de SFB;
- Amostra Branco: somente DMEM + 10% de SFB sem adição de células.

Após 24 h de cultivo, o meio foi retirado de todos os poços com células e adicionado 100 µL do extrato de biomaterial ou controle positivo ou controle negativo por poço.

O MTT foi avaliado nos intervalos de 24, 48 e 72 horas após o contato com os extratos. Decorrido cada período, retirou-se o meio de cultivo dos poços, sendo substituído por 100 µL de DMEM fresco (sem vermelho de fenol), adicionados de 10 µL da solução 12mM de MTT (5mg/mL) e incubados a 37 °C por 4 horas. Após, foi removido 85 µL do volume de cada poço e adicionado 50 µL de DMSO por poço, e incubados a 37 °C por 10 minutos. Realizada a homogeneização do conteúdo de cada poço e a placa colocada no agitador de placas por 5 minutos para a solubilização dos cristais de formazan. A leitura da absorbância dos cristais de formazan foi efetuada em leitor de ELISA Biotek® ELX808, com comprimento de onda de 490nm. Todos os testes foram realizados em triplicata e a viabilidade celular relativa obtida através da equação abaixo:

**% Viabilidade celular relativa:  $(DO_a - DO_b)/(DO_{cn} - DO_b) \times 100$**

Sendo  $DO_a$ : densidade óptica da produção de formazan da amostra;  $DO_b$ : densidade óptica do branco (DMEM sem células);  $DO_{cn}$  densidade óptica do controle negativo de toxicidade.

Valores de viabilidade celular relativa menores que 70 % indicam que o material testado possui potencial citotóxico (ISO 10993-5, 2009).

### **5.2.7 Determinação da Interação Célula-Material por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

Foi feita a deposição de uma pastilha de biomaterial e  $5 \times 10^4$  fibroblastos por poço em placas de 24 poços, em duplicata. O cultivo se deu por 7 dias, sendo renovado o meio de cultivo quando necessário. Ao final do tempo de avaliação, o meio de cultivo foi descartado e realizada a fixação do tapete celular com formol 2% por 24 horas em incubadora a 37 °C. Após retirado o fixador, o tapete celular foi desidratado completamente em incubadora a 37 °C.

Em seguida, as placas foram encaminhadas ao Grupo de Pesquisas em Biomateriais da UDESC/CCT- Joinville para realização do estudo da caracterização morfológica e microestrutural dos fibroblastos com as pastilhas de biomaterial, através da técnica de MEV com o equipamento marca ZEISS modelo DSM 940A, por meio do método com elétrons secundários (SE), com distância de trabalho de 10mm e tensão de aceleração dos elétrons entre 15 kV.

Todas as amostras foram submetidas ao processo de metalização por pulverização catódica com deposição de um filme de ouro sobre a superfície da amostra. Esta deposição foi realizada com um metalizador Bal-Tec modelo SCD 050 Sputter Coater, com os seguintes parâmetros de deposição iônica: temperatura na câmara de metalização de 25 °C, corrente de 40mA, tensão de 2kV e tempo de deposição de 140 segundos, fornecendo um filme de ouro na superfície das partículas da ordem de 30nm. Esse procedimento foi feito para evitar os efeitos de carga dentro da câmara do microscópio.

### 5.2.8 Reação em Cadeira da Polimerase Quantitativa em Tempo Real (qPCR)

Foram depositadas  $2 \times 10^4$  fibroblastos por poço em placas de 24 poços de fundo chato (TPP, Trasadingen, Suíça) e acrescentado o extrato de biomaterial com 10% de SFB, e no grupo controle foi utilizado o meio DMEM + 10% de SFB. Os extratos dos biomateriais foram testados em triplicata, assim como o grupo controle. Os cultivos foram mantidos em estufa a 37 °C em atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub> por 24 h, 48 h e 72 h.

Após cada período de avaliação, era retirado o extrato do biomaterial ou meio de cultivo dos poços e as células individualizadas com a adição de 500 µL de tripsina a 0,05% a 37 °C. Para a inativação da tripsina foi acrescentado 1 mL de meio DMEM + 10% de SFB e este volume transferido para um microtubo de 1,5 mL e centrifugado por 5 min a 419 g, formando o *pellet* de células.

A extração do RNA total foi realizada com a utilização do Kit ReliaPrep™ RNA Cell Miniprep System (Promega Corporation; Madison, WI, EUA). Com o propósito de reduzir substancialmente uma possível contaminação por DNA foi realizado tratamento com DNase (Promega Corporation). A pureza do RNA extraído foi verificada com o auxílio do espectrofotômetro NanoDrop® 2000 (Thermo Fisher Scientific, EUA) e a qualidade avaliada através da relação A260/280 nm que foi ~2,05 (± 0,03). Em seguida realizou-se a transcrição reversa para síntese do DNA complementar (cDNA) utilizando o kit GoScript™ Reverse Transcription Mix, Random Primers (Promega Corporation; Madison, WI, EUA) em aparelho termociclador (MJ96+, Biocycler; Biosystems Importadora, Curitiba - PR, Brasil).

O qPCR foi realizado em placa de 48 poços (MicroAmp®, Applied Biosystems), com 3 repetições por amostra, com volume de reação de 15 µL, sendo 5 µL (30 ng)

de cDNA e 10 µL de GoTaq® qPCR Master Mix (Promega Corporation; Madison, WI, EUA), no aparelho StepOne Real-Time (Applied BioSystems), com o uso de *primers* específicos para cada gene avaliado (Tabela 5).

Tabela 5 – *Primers* bovinos utilizados nas análises de qPCR

Gene	<i>Forward</i> (F) e <i>Reverse</i> (R)	Amplificação	Referência <sup>1</sup>
GAPDH <sup>2</sup>	F- CCTGCCCGTTTCGACAGATA R- GGCGACGATGTCCACTTTG	150 pb	NM_001034034.1
VEGF <sup>3</sup>	F- ACGAAGTGGTGAAGTTCATGG R- TTTTTCGAGGAACATTTACACG	388 pb	NM_001316955.1
FGF-2 <sup>4</sup>	F- TGTCTCCCCCTCACTCTGGTA R- ACTCCCTGTATAGCCAAAGGTCTG	79 pb	NM_174056.4

Fonte: A autora, 2019.

<sup>1</sup>Referência da Sequência no NCBI; <sup>2</sup>Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; <sup>3</sup>Fator de Crescimento Vascular Endotelial; <sup>4</sup>Fator de Crescimento Fibroblástico

Foi utilizado o software StepOne versão 2.1 (Applied Biosystems) para análise dos dados obtidos e geração das curvas de dissociação no final de cada execução, de modo a assegurar a presença de um único produto. Todas as amostras foram executadas com uma curva padrão de sete pontos com um *pool* de cDNA de todas as amostras com diluição seriada (100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 e 1,5625%). Foi gerada uma equação de regressão ao traçar os valores de limiar do ciclo de qPCR em relação ao log de cada valor da curva padrão. Todas as reações apresentaram coeficiente de determinação superior a 0,98 e eficiência entre 85 e 100%.

Os dados foram analisados através do Proc Mixed do programa estatístico SAS (University Edition). A expressão do gene *housekeeping* GAPDH foi utilizada como co-variável. As médias foram comparadas pelo LSMEANS, sendo a significância declarada em  $P < 0,05$ .

## 5.3 Resultados

### 5.3.1 Curva de Crescimento Celular

Na avaliação da proliferação celular após contato com o extrato do nanocompósito HA/ZrO<sub>2</sub> 5% observou-se que em 24 e 48 horas de cultivo não ocorreu

diferença significativa quando comparado com o controle. Já no período de 72 horas a contagem celular foi significativamente inferior. Na avaliação do nanocompósito HA/MgO 1% em todos os períodos avaliados de contato com o extrato, verificou-se contagem celular inferior em relação ao controle (Tabela 6).

Tabela 6 - Quantidade de células após contato com o extrato dos diferentes biomateriais em diferentes tempos.

Tratamentos	Quantidade de Células por Poço			
	0 h	24 h	48 h	72 h
Controle	10.000 <sup>a</sup>	30.333 <sup>a</sup>	39.666 <sup>a</sup>	65.666 <sup>a</sup>
HA/ZrO <sub>2</sub> 5%	10.000 <sup>a</sup>	23.666 <sup>a</sup>	30.333 <sup>a</sup>	33.666 <sup>b</sup>
HA/MgO 1%	10.000 <sup>a</sup>	21.000 <sup>b</sup>	25.000 <sup>b</sup>	40.333 <sup>b</sup>

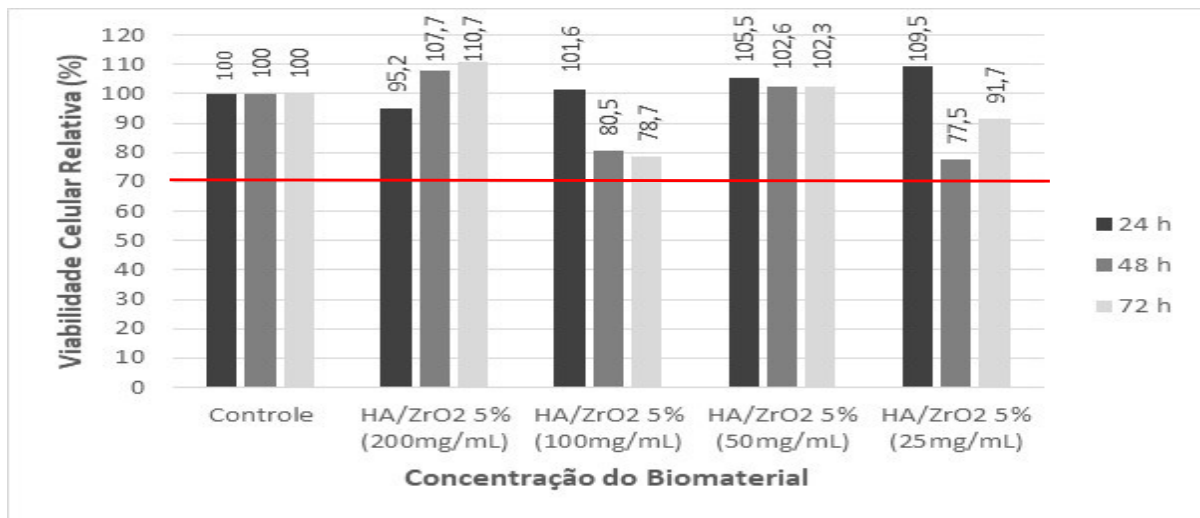
Letras diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ). Fonte: A autora, 2019.

### 5.3.2 Citotoxicidade dos Biomateriais pelo Teste MTT

Os cultivos de células VERO foram submetidos ao tratamento com os extratos dos dois biomateriais em quatro concentrações, durante 24, 48 e 72h para determinação da função mitocondrial pela redução do MTT. A coloração púrpura do meio, em razão dos cristais de formazan solubilizados, foi observada em diferentes intensidades em todas as amostras testadas, com exceção do controle branco, que continha apenas DMEM + 10% de SFB e dos controles positivos de citotoxicidade, Triton X-100, em diferentes concentrações, pois não houve a conversão do sal devido à ausência de viabilidade celular.

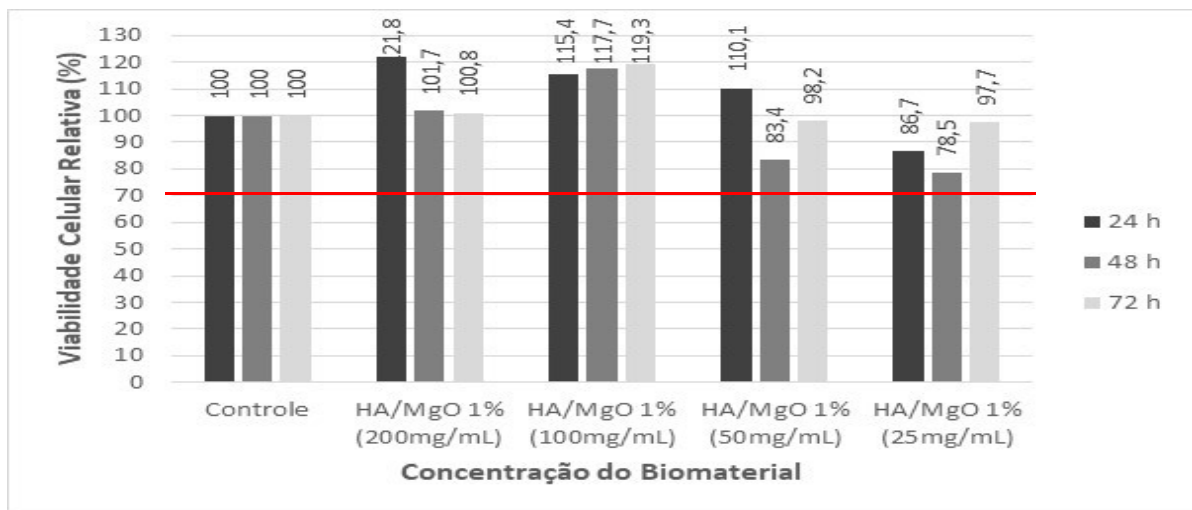
Em todos os períodos e concentrações avaliados, as células tratadas com o extrato de HA/ZrO<sub>2</sub> 5% e HA/MgO 1% apresentaram sua função mitocondrial preservada, com viabilidade celular relativa acima de 70% quando comparadas com o controle (Gráfico 5 e 6).

Gráfico 5- Viabilidade celular relativa (%) medida pelo teste MTT após contato com diferentes concentrações do extrato de HA/ZrO<sub>2</sub> 5% em 24, 48 e 72 h.



Fonte: A autora, 2019.

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.

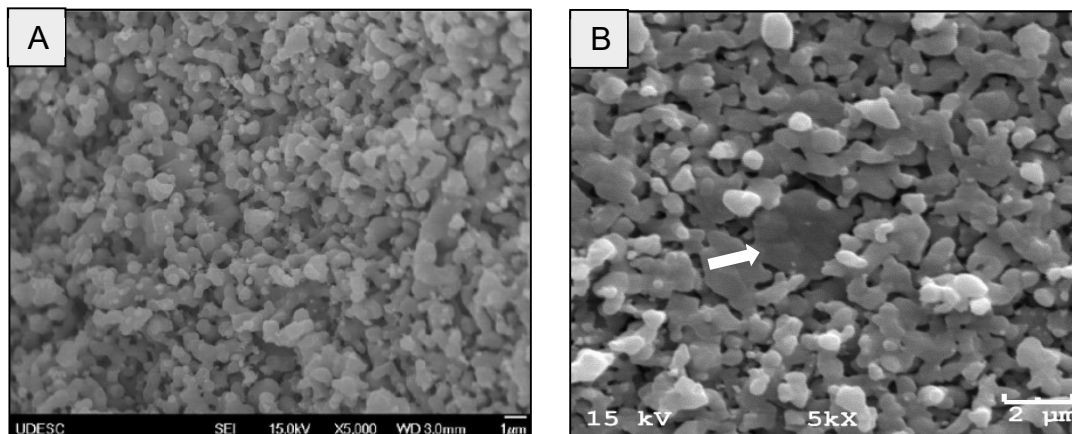


Fonte: A autora, 2019.

### 5.3.3 Interação Célula-Material

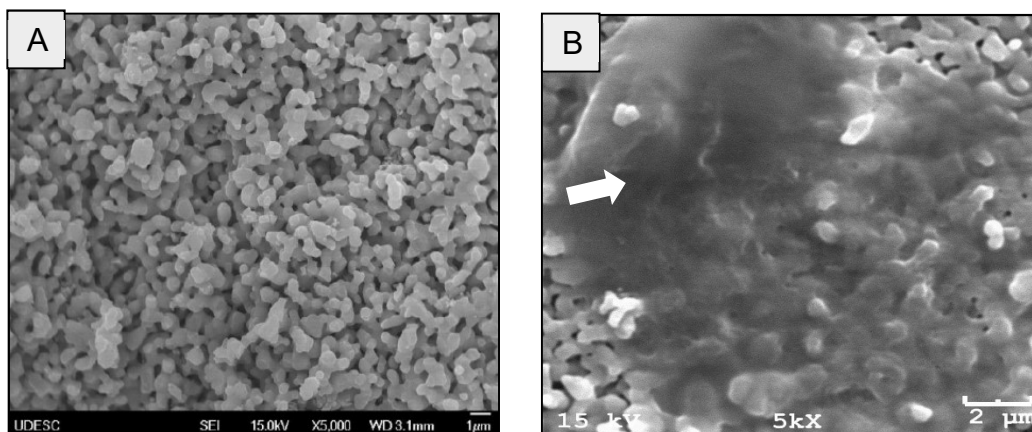
Após o cultivo dos fibroblastos com as pastilhas de biomaterial por 7 dias, com o auxílio da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) sugere-se a presença de células na superfície das pastilhas de HA/ZrO<sub>2</sub> 5% (Figura 8) e de HA/MgO 1% (Figura 9).

Figura 8 – MEV da pastilha de HA/ZrO<sub>2</sub> 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.



Fonte: Grupo de Pesquisa em Biomateriais UDESC/CCT, 2018.

Figura 9 – MEV da pastilha de HA/MgO 1%. A) Micrografia mostrando a superfície de fratura do biomaterial. B) Fibroblasto aderido (seta) na superfície do biomaterial em contato por 7 dias.



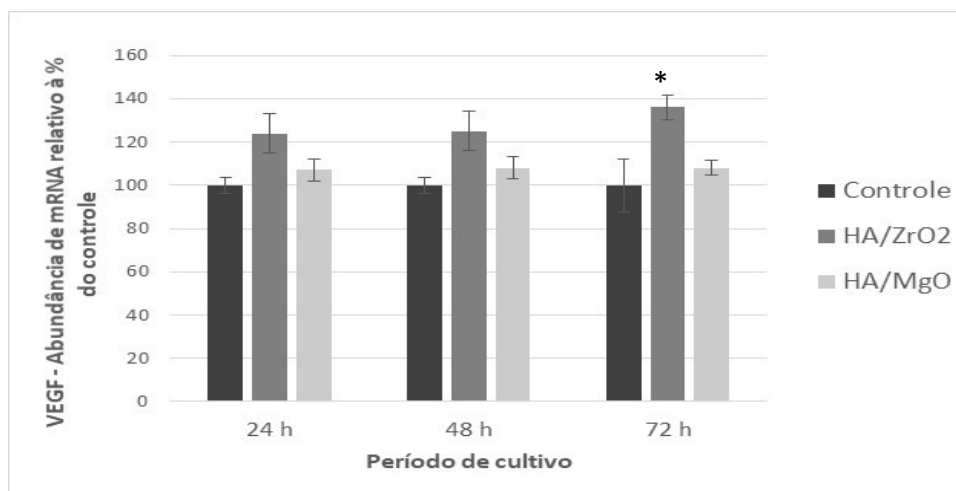
Fonte: Grupo de Pesquisa em Biomateriais UDESC/CCT, 2018.

### 5.3.4 Reação em Cadeira da Polimerase Quantitativa em Tempo Real (qPCR)

Foi medida a expressão de dois genes promotores da angiogênese, o VEGF e FGF-2, após contato com o extrato de HA/ZrO<sub>2</sub> 5% e HA/MgO 1% por 24, 48 e 72 horas.

No tratamento HA/ZrO<sub>2</sub> 5% ocorreu aumento de 36% (P=0,0002) na expressão do VEGF no período de 72 horas de cultivo (Gráfico 7), nos demais períodos não ocorreu alteração na expressão deste gene. No gráfico 7 também pode-se observar que o tratamento HA/MgO 1% não alterou a expressão de VEGF em todos os períodos analisados.

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

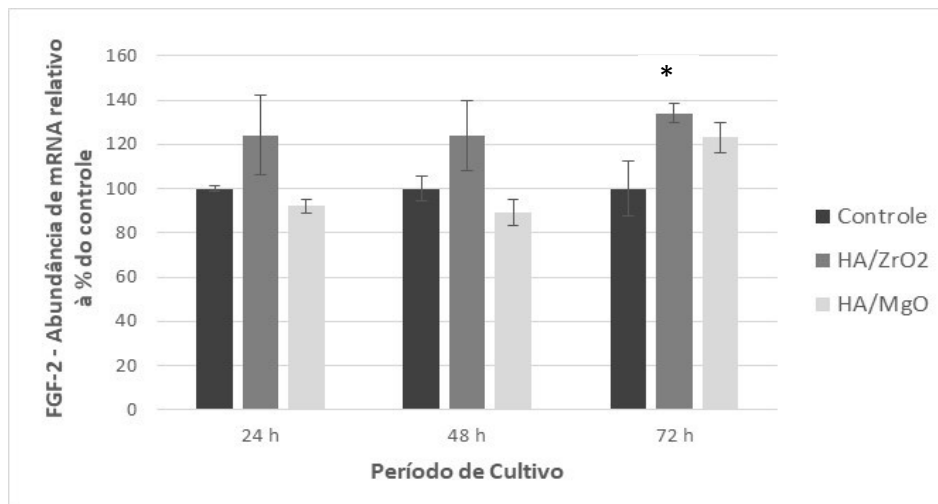


\* P<0,05.

Fonte: A autora, 2019.

Em relação ao gene FGF-2, no tratamento HA/ZrO<sub>2</sub> ocorreu aumento de 34% (P<0,0001) na expressão gênica com 72 horas de cultivo (Gráfico 8). Não houve mudanças na expressão com 24 e 48 horas de contato com o extrato. Já na avaliação HA/MgO 1% não ocorreu alteração significativa na expressão de FGF-2 em todos os períodos avaliados (Gráfico 8).

Gráfico 8- Expressão gênica do FGF-2 em células cultivadas com extrato de HA/ZrO<sub>2</sub> e HA/MgO 1% por 24, 48 e 72 horas.



\* P<0,05.

Fonte: A autora, 2019.

## 5.4 Discussão

Neste estudo foram testados dois nanocompósitos com matriz de HA, um com nanopartículas de ZrO<sub>2</sub> 5% e outro com MgO 1%. Estes materiais se destacam como substitutos ósseos por apresentarem micro e nanoestruturas microporosas interconectadas. Estas características favorecem a adesão e proliferação celular nos microporos e superfície dos grãos (CAMARGO et al., 2014a), favorecendo a formação do novo tecido ósseo.

Na avaliação da curva de crescimento, o tratamento HA/ZrO<sub>2</sub> 5% apresentou contagem celular significativamente inferior apenas no período de 72 horas de cultivo em relação ao controle, porém o padrão de crescimento celular ascendente se manteve, demonstrando que a variação observada não inviabilizou a proliferação das células. O contato com o extrato do material HA/MgO 1% reduziu o número de células em todos os períodos avaliados quando comparados com o controle. Contudo, o padrão de crescimento celular se manteve ascendente durante toda a análise, comprovando que o contato com o nanocompósito não afetou a capacidade de proliferação das células. Outros estudos também utilizaram a análise quantitativa pelo

método de exclusão de azul de Tripán para avaliar a viabilidade das células após contato com materiais (KARIMI et al., 2015; MASSON & LOMBELLO, 2016).

O documento ISO 10993-5 (2009) indica o MTT como um dos ensaios de citotoxicidade *in vitro* que devem ser realizados para a caracterização inicial da biocompatibilidade de biomateriais que visam aplicação clínica.

No ensaio de redução do MTT ambos os tratamentos, HA/ZrO<sub>2</sub> 5% e HA/MgO 1%, em todos os períodos e concentrações avaliados, não provocaram alteração na função mitocondrial das células, com resultados de viabilidade celular relativa acima de 70% quando comparados com o controle, confirmando sua biocompatibilidade conforme classificação da ISO 10993-5 (2009).

Corroborando com este estudo, Aivazi et al. (2018) testaram a citotoxicidade de biocerâmicas de zircônia em fibroblastos pelo teste MTT e observaram a manutenção da viabilidade celular após contato com o biomaterial. Assim como outros estudos atestaram a ausência de citotoxicidade de materiais à base de zircônia, avaliada pelo ensaio MTT (PICCONI & MACCAURO, 1999; PAE et al. 2009; PAE et al., 2014). A biocompatibilidade de biomateriais com magnésio também foi observada por Li et al. (2008), Gu et al. (2010), Zhang et al. (2010), Yu et al. (2013) através do ensaio MTT, reforçando a ausência de citotoxicidade desses materiais.

Através das imagens geradas na MEV pode-se analisar a adesão e a proliferação celular na superfície do material estudado. A biocompatibilidade dos biomateriais está estreitamente relacionada à adesão celular em sua superfície, que pode ser influenciada pelas características de superfície do material, topografia e composição química (ANSELME, 2000). Semelhante ao realizado neste trabalho, vários estudos avaliaram a biocompatibilidade *in vitro* de biomateriais, através de ensaios de citotoxicidade em conjunto com a avaliação da interação célula-material por meio da MEV (MONTAZEROLGHAEM et al., 2015; SIQUEIRA et al., 2015; ZHANG et al., 2015; SILVA et al., 2016).

Neste estudo a avaliação da interação célula-material foi feita através da MEV após 7 dias de cultivo e sugere-se a ocorrência de adesão celular sobre a superfície do nanocompósito HA/ZrO<sub>2</sub> 5%. No biomaterial HA/MgO 1% observou-se a presença de fibroblasto aderido, o que reforça a característica de biocompatibilidade apresentada nos ensaios de proliferação e viabilidade celular.

Semelhante ao encontrado aqui, outros trabalhos observaram adesão das células na superfície de materiais à base de zircônia, através de imagens de MEV

(BÄCHLE et al., 2007; PAE et al., 2009; PAE, et al. 2014; AIVAZI et al., 2018). Da mesma forma em relação à avaliação de interação entre as células em contato com biomateriais à base de magnésio, onde Wu et al. (2013) e Kayhan et al. (2016) constataram a adesão celular na superfície dos materiais, atestando sua citocompatibilidade.

O processo de formação de novos vasos sanguíneos no local da fratura é indispensável para o reparo do tecido ósseo lesado, pois fornece adequado aporte de oxigênio, nutrientes, fatores de crescimento, permite o recrutamento de células e a remoção de metabólitos (CARANO & FILVAROFF, 2003; SARAN et al., 2014). Os principais fatores angiogênicos envolvidos na promoção da angiogênese são o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e o fator de crescimento fibroblástico básico (FGF-2) (KERAMARIS et al., 2008; MURAMAKI & SIMONS, 2008).

No presente estudo, ensaios *in vitro* foram realizados de modo a investigar a capacidade dos biomateriais nanocompósitos de induzir a angiogênese por meio da expressão dos seus principais promotores, VEGF e FGF-2.

Foi detectado aumento na expressão dos genes FGF-2 e VEGF após contato das células com o extrato de HA/ZrO<sub>2</sub> 5% no período de 72 horas de contato quando comparados ao controle. O que sugere que esse material pode acelerar a recuperação de tecidos lesados por meio da indução da formação de novos vasos sanguíneos, porém, estudos *in vivo* se fazem necessários para acompanhar seu comportamento em contato com os tecidos vivos. Na pesquisa de Altmann et al. (2017) foi observado que o VEGF e FGF-2 estavam com sua expressão elevada em osteoblastos em contato com implantes dentários de zircônia por 7 dias. Esses resultados diferem do observado por Popp et al. (2011) que não detectaram diferença significativa na expressão de VEGF após contato de osteoblastos com fosfatos de cálcio hibridizados com zircônia por 14 e 21 dias.

Em relação ao tratamento HA/MgO 1%, em todos os períodos avaliados, não foi observada alteração significativa na expressão do VEGF e FGF-2 em relação ao controle. O resultado encontrado neste estudo para o gene VEGF diverge do observado por Xia et al. (2016), onde um biomaterial com magnésio estimulou a expressão de VEGF. Uma explicação levantada pelos autores para justificar essa estimulação seria que o magnésio liberado ativaria uma via de sinalização mediada pela proteína quinase P38, que ativaria uma proteína quinase B que estimularia a

expressão do fator. Porém, futuros estudos são necessários para comprovar esse mecanismo.

A capacidade dos nanocompósitos de HA/ZrO<sub>2</sub> em estimularem a expressão *in vitro* dos fatores angiogênicos VEGF e FGF-2 pode representar uma estratégia simples e efetiva na formação de novos vasos sanguíneos em tecidos ósseos lesados. Futuras investigações devem ser realizadas com esses materiais de modo a entender o mecanismo molecular envolvido no aumento da expressão gênica, assim como sua avaliação *in vivo*.

## 5.5 Conclusão

Os resultados deste trabalho sugerem que o contato das células Vero com os diferentes extratos de biomateriais nanocompósitos de HA/ZrO<sub>2</sub> 5% e HA/MgO 1% influencia na proliferação celular. Contudo, a viabilidade das células foi mantida, atestando a biocompatibilidade dos materiais nas condições avaliadas. Além disso, através do cultivo de fibroblastos com os cilindros dos biomateriais foi possível observar a adesão celular na superfície dos materiais, verificada pelas imagens obtidas pela MEV, reforçando a característica de biocompatibilidade.

Os nanocompósitos HA/ZrO<sub>2</sub> 5% induziram a expressão de VEGF e FGF-2 em fibroblastos, o que indica seu potencial como estimuladores da angiogênese em reparo ósseo.

## 5.6 Agradecimentos

Ao Grupo de Pesquisas em Biomateriais UDESC/CCT pelo fornecimento dos biomateriais testados, à FAPESC pelos recursos disponibilizados e à UNIEDU/FUMDES pela bolsa de estudos.



## 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- $\beta$ 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/SiO<sub>2</sub> 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](http://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/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 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/TiO<sub>2</sub>n 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/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-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  $\beta$ -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