

BIOTRANS

Programa de Pós-Graduação em
Biomedicina Translacional

Mestrado e Doutorado



RAQUEL FERREIRA CHAVES

INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA DE SÍNTESE DA HA CARBONATADA NANOESTRUTURADA NA BIOESTIMULAÇÃO DE OSTEÓBLASTOS TUMORAIS HUMANOS

Duque de Caxias

Fevereiro

2020

RAQUEL FERREIRA CHAVES

**INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA DE SÍNTESE DA
HIDROXIAPATITA CARBONATADA NANOESTRUTURADA
NA BIOESTIMULAÇÃO DE OSTEOLASTOS
TUMORAIS HUMANOS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional (BIOTRANS), como parte dos requisitos parciais para obtenção do título de mestre em Ciências Biomédicas.

Orientadores:

Dr^a. Sara Gemini Piperni

Dr. Rômulo Sperduto Dezone

Duque de Caxias

Fevereiro

2020

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UNIGRANRIO – NÚCLEO DE COORDENAÇÃO DE BIBLIOTECAS

C512i

Chaves, Raquel Ferreira.

Influência da temperatura de síntese da hidroxiapatita carbonatada :
estrutura na bioestimulação de osteoblastos tumorais humanos / Raquel
Ferreira Chaves. – 2020.

69 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Biomedicina Translacional) – Universidade do
Grande Rio "Prof. José de Souza Herdy", Escola de Ciências da
Saúde, Duque de Caxias, 2020.

"Orientadores: Dra. Sara Gemini Piperni e Dr. Rômulo Sperduto
Dezonne".

Referências: f.62-69.

1. Osteoblastos. 2. Hidroxiapatita carbonatada. 3. Materiais biomédicos.
I. Piperni, Sara Gemini. II. Dezonne, Rômulo Sperduto. III. Universidade do
Grande Rio "Prof. José de Souza Herdy". IV. Título.

CDD – 610.28

Raquel Ferreira Chaves Monteiro

**INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA DE SÍNTESE DA HIDROXIAPATITA
CARBONATADA NANOESTRUTURADA NA BIOESTIMULAÇÃO DE
OSTEOBLASTOS HUMANOS**

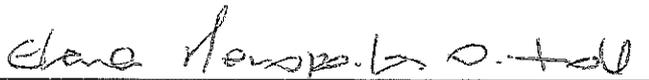
Dissertação apresentada à Universidade do
Grande Rio "Prof. José de Souza Herdy"
UNIGRANRIO para obtenção do grau de Mestre
em Ciências Biomédicas.

Aprovada em 28 de fevereiro de 2020

Banca Examinadora



Profa. Dra. Cláudia Maria Pereira
UNIGRANRIO – Universidade do Grande Rio



Profa. Dra. Élena Mavropoulos Oliveira Tude
CBPF – Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas



Prof. Dr. Sergian Vianna Cardozo
UNIGRANRIO – Universidade do Grande Rio

AGRADECIMENTOS

A Deus por me manter firme nos momentos de dificuldade.

Aos meus pais Jorge Luiz R. Chaves e Ionara Chaves, que sempre tiveram como prioridade minha educação e lutaram arduamente para que eu me tornasse uma pessoa honrada e digna, mesmo após o falecimento do meu pai, minha mãe nunca mediu esforços para que eu desse continuidade aos meus projetos.

Ao meu marido, Daniel Reynaldo, que em todos os momentos me acolheu e me motivou para que todas as etapas do trabalho fossem concluídas com êxito, além de contribuir imensamente com todo seu conhecimento científico nas situações de dúvida.

Aos meus orientadores Dra. Sara Gemini Piperni e Dr. Rômulo Dezone, pelo profissionalismo e todo conhecimento dedicado ao longo dessa jornada para que pudéssemos construir um trabalho de qualidade, sempre buscando o melhor em cada experimento e cada frase escrita.

A todos do grupo de pesquisa, em especial Priscilla Ruelles, Lorayne Aguiar e Ana Carolina, por sempre estarmos unidos em todas as reuniões e momentos no laboratório em meio as correrias de cada experimento sempre encontramos um tempo para sorrir e deixar o dia mais leve.

A técnica do laboratório, Ana Beatriz, que a cada dúvida com os protocolos, assumias as rédeas da situação e com maestria fazia com tudo parecesse muito simples.

Aos professores e funcionários da BIOTRANS, que sempre foram solícitos e gentis compartilhando informação e conhecimento contribuindo para o meu crescimento pessoal e profissional.

Aos colaboradores do CBPF e INMETRO que sempre estiveram dispostos a contribuir com as pesquisas cedendo seu tempo e empregando seu conhecimento em prol do meu trabalho.

**“Os ideais que iluminaram o meu caminho
são a bondade, a beleza e a verdade.”**

Albert Einstein

RESUMO

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo especializado, metabolicamente ativo e constituído por uma população heterogênea de células em diferentes estágios de diferenciação. A matriz extracelular óssea é composta de HA, um biomaterial, constituído de partículas nanoestruturadas cuja forma carbonatada é amplamente explorada na medicina regenerativa óssea, por suas características de biocompatibilidade, solubilidade e adsorção serem maiores em comparação a HA não carbonatada. O presente estudo visa compreender se diferentes temperaturas de síntese da HA carbonatada, sendo 37° C e 90° C, são capazes de influenciar no comportamento pré osteoblastos humanos extraídos de osteosarcoma, no que diz respeito ao seu potencial bioestimulador e mecanismos de citotoxicidade e biocompatibilidade, ao as células em cultivo, às partículas nanoestruturadas de HA carbonatada. Para que se pudesse confirmar se a carbonatação da HA ocorreu de maneira satisfatória e se o meio de cultivo influenciava no seu comportamento foram empregadas metodologias fisicoquímicas e microscopia eletrônica de transmissão para avaliar o perfil de internalização das partículas nas células, além MTT para avaliar a viabilidade celular frente a exposição das células às partículas e ELISA para análise das citocinas. Foi possível observar que a HA carbonatada não sofreu influência do meio de cultivo e que as temperaturas em que foram sintetizadas tem relação direta no que diz respeito a sua interação com as células, embora nas duas temperaturas testadas, as partículas tenham sido internalizadas pelas células, as células expostas ao material sintetizado à 37°C apresentaram um comportamento muito mais satisfatório em relação ao potencial bioestimulador, em especial na produção de colágeno tipo 1. E ainda a HA carbonatada sintetizada à 37°C e revestida com alginato, pareceu além de induzir características positivas no que diz respeito a bioestímulo, também apresentou indícios de que as células a ela expostas apresentam menor resposta inflamatória, sendo fundamental para o remodelamento ósseo.

Palavras chave: Osteoblasto, hidroxiapatita carbonatada, bioestimulador, biomaterial.

ABSTRACT

Bone tissue is a specialized connective tissue, metabolically active and constituted by a heterogeneous population of cells in different stages of differentiation. The extracellular bone matrix is composed of HA, a biomaterial, consisting of nanostructured particles whose carbonated form is widely explored in bone regenerative medicine, because its characteristics of biocompatibility, solubility and adsorption are greater compared to non-carbonated HA. The present study aims to understand whether different temperatures of carbonated HA synthesis, being 37° C and 90° C, are capable of influencing the pre osteoblast human behavior extracted from osteosarcoma, with regard to its biostimulatory potential and cytotoxicity and biocompatibility mechanisms, cultured cells to nanostructured carbonated HA particles. In order to confirm whether the carbonation of HA occurred satisfactorily and if the culture medium influenced its behavior, physicochemical methodologies and electronic transmission microscopy were used to evaluate the internalization profile of the particles in the cells, in addition to MTT to assess the viability cell exposure to cell exposure to particles and ELISA for analysis of cytokines. It was possible to observe that the carbonated HA was not influenced by the culture medium and that the temperatures at which they were synthesized are directly related to their interaction with the cells, although at the two temperatures tested, the particles were internalized by the cells, the cells exposed to the material synthesized at 37°C showed a much more satisfactory behavior in relation to the potential biostimulator, especially in the production of type 1 collagen. And yet the carbonated HA synthesized at 37°C and coated with alginate, it seemed to induce positive characteristics in what it says Regarding biostimulation, it also showed evidence that the cells exposed to it have less inflammatory response, being fundamental for bone remodeling.

Keywords: Osteoblast, carbonated hydroxyapatite, biostimulator, biomaterial.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estrutura de HA	14
Figura 2. Esquema da disposição do tecido ósseo.....	16
Figura 3. Microscopia eletrônica de transmissão de um osteoblasto.....	20
Figura 4. Osso em corte histológico apontando osteoblasto.....	22
Figura 5. Representação esquemática do processo de osteoblastogênese	24
Figura 6. Remodelação óssea de adultos.....	27
Figura 7. Comparação estrutural dos dentes humanos e materiais à base de apatita	29
Figura 8. Diagrama esquemático de nanopartículas conjugadas a transferrina e proteína corona.....	32
Figura 9. Micrografia eletrônica de transmissão	41
Figura 10. Difração de raios X	42
Figura 11. Análise de STEM/EDS em amostra de CHA37°C.....	43
Figura 12. Análise de STEM/EDS em amostra de CHA 90°C.....	43
Figura 13. Resultados FTIR comparativo entre três condições de CHA.....	44
Figura 14. Carga superficial das CHA sintetizadas à 90°C e 37°C	45
Figura 15. Viabilidade dos osteoblastos após exposição à CHA	45
Figura 16. Diferenciação osteoblástica	46
Figura 17. Maturação osteoblástica	47
Figura 18. Avaliação do colágeno após 3 dias de cultivo.....	48
Figura 19. Avaliação do colágeno após 21 dias de cultivo.....	49
Figura 20. Avaliação da hidroxiprolina	50
Figura 21. Avaliação do perfil inflamatório	51
Figura 22. Internalização das partículas de CHA por pré osteoblastos.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ALP:** Fosfatase alcalina
- ANKH:** Homólogo da anquilose progressiva
- BMPs:** Proteínas morfogenéticas ósseas
- BMU:** Unidades multicelulares básicas
- BSP:** Osteocalcina sialoproteína óssea
- C/EBP α :** Potencializador de proteína ligante óssea α
- CHA:** CarbonatoHA
- COL 1:** Colágeno Tipo 1
- CTMs:** Células tronco mesenquimais
- DRX:** Difração de Raio X
- EDS:** Espectroscopia por energia dispersiva de raio X
- FGF:** Fatores de crescimento fibroblásticos
- FTIR:** Infravermelho por transformada de *Fourier*
- GH:** Hormônio Do Crescimento Humano
- HA:** HA
- IL1b:** Interleucina 1b
- IL6:** Interleucina 6
- M-CSF:** Fator estimulador de colônia de macrófagos
- MEPE:** Fosfoglicoproteína extracelular da matriz
- MIP1:** Proteína inflamatória de macrófago 1
- NPs:** Nanopartículas
- OPG:** Osteoprotegerina
- PEA:** Fosfoetanolamina
- PHEX:** Endopeptidase neutra reguladora de fosfato
- PI:** Iodeto de propídeo
- PPAR-Y:** Recepto ativado por proliferadores de peroxissomas
- PPi:** Pirofosfato inorgânico
- PTH1R:** Paratormônio 1
- RANKL:** Ativador do receptor do fator nuclear Kappa- β
- Runx2:** Fator de transcrição 2 relacionado ao RUNT
- SOST:** Esclerostina
- TNAP:** Fosfatase alcalina tecido não específica
- TNF- α :** Fator de necrose tumoral α

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 TECIDO ÓSSEO	15
2.2 PROCESSOS DE OSSIFICAÇÃO	17
2.3 ORGANIZAÇÃO TECIDUAL	18
2.4 TIPOS CELULARES	19
2.4.1 Osteoblastos	19
2.4.2 Osteoclastos	21
2.4.3 Osteócitos	22
2.5 REMODELAMENTO ÓSSEO E MINERALIZAÇÃO	23
2.6 HIDROXIAPATITA.....	28
2.8 ALGINATO	31
2.9 PROTEÍNA CORONA	31
3. OBJETIVOS	34
3.1 OBJETIVO GERAL.....	34
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
4. METODOLOGIA	35
4.1 PREPARAÇÃO DA HA CARBONATADA NANOESTRUTURADA	35
4.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO QUÍMICA DO BIOMATERIAL.....	35
4.2.1 Difração de raio X - DRX	35
4.2.2 Microscopia eletrônica de transmissão - MET	36
4.2.3 Espectroscopia por energia dispersiva de raio X - EDS	36
4.2.4 Infravermelho por transformada de Fourier - FTIR	36
4.2.5 Potencial Zeta	36
4.3 INTERAÇÃO COM AS CÉLULAS	37
4.3.1 Cultura de células	37
4.3.2 Exposição do material.....	37
4.3.3 Internalização.....	37
4.3.4 Viabilidade celular	38
4.3.5 Ensaio de diferenciação (Fosfatase alcalina) e mineralização (vermelho de alizarina).....	38

4.3.5.1 Ensaio de diferenciação: marcação citoquímica com fosfatase alcalina	38
4.3.5.2 Ensaio de mineralização: marcação com vermelho de alizarina.....	39
4.3.6 Imunofluorescência.....	39
4.3.7 Análise das citocinas	39
4.3.8 Medição da produção de colágeno por meio da hidroxiprolina	40
5. RESULTADOS	41
5.1 ANÁLISE DAS PARTÍCULAS NANOESTRUTURADAS DE CARBOPATITAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.....	41
5.2 ANÁLISE DO PADRÃO DE CRISTALINIDADE DAS CHA POR DIFRAÇÃO DE RAIOS X - DRX.....	41
5.3 VERIFICAÇÃO DOS ELEMENTOS QUÍMICOS DA CHA POR ESPECTROSCOPIA POR ENERGIA DISPERSIVA DE RAIOS X - EDS.....	42
5.4 ANÁLISE DA PRESENÇA DOS GRUPOS FUNCIONAIS DA CHA	43
5.5 ANÁLISE DA CARGA SUPERFICIAL DAS PARTÍCULAS DE CHA	44
5.6 ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR	45
5.7 ANÁLISE DA DIFERENCIAÇÃO OSTEOBLÁSTICA	46
5.8 AVALIAÇÃO QUALITATIVA DA PRODUÇÃO DE COLÁGENO	47
5.9 AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DA PRODUÇÃO DE COLÁGENO	50
5.10 ANÁLISE DO PERFIL INFLAMATÓRIO APÓS EXPOSIÇÃO À CHA.....	50
5.11 AVALIAÇÃO DA INTERNALIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS DE CHA POR OSTEOBLASTOS.....	52
6. DISCUSSÃO.....	53
7. CONCLUSÃO	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62

1. INTRODUÇÃO

A área de biomaterias que possui globalmente maior expansão no mercado econômico tem sido a de implantes ortopédicos, o que se relaciona fortemente com o aumento significativo da expectativa de vida em todo o mundo, gerando um cenário desafiador para as ciências biomédicas, devido ao comprometimento da saúde relacionados a idade como osteoporose, artrite, artroses e fraturas (PIRES et al., 2015).

Por não existir ainda um biosubstituto ósseo perfeitamente biomimético, em diversas intervenções o reparo ósseo acaba por ser insuficiente, de modo que se faz necessário integrar a esse tecido materiais que possuam propriedades adequadas para reestabelecer a lesão da forma mais natural possível, criando um ambiente similar ou igual ao original (TARDELLI et al., 2019).

O atual panorama somado ao avanço das técnicas cirúrgicas culmina no uso de implantes, próteses ou sistemas clínicos que atuem na substituição local e que, ao mesmo tempo, estejam em contato com os outros tecidos do organismo, sem lhes causar danos posteriores (COSTA, T C, 2013).

Os biomateriais devem possuir características de biocompatibilidade e biofuncionalidade para que não sejam citotóxicos ou causem reações imunológicas indesejadas. Um outro fator importante nos biomateriais utilizados para uso clínico, é a durabilidade e a manutenção da funcionalidade do biomaterial ao longo de determinado período da vida do paciente. Ao longo desse período, os biomateriais devem manter contato com os tecidos vivos sem causar riscos de reações, principalmente na interface tecido-material (TARDELLI et al., 2019).

Alguns dos materiais selecionados atualmente são produzidos pela união de várias áreas do conhecimento a fim de fornecer ao paciente um sistema que gere reparo mais rápido e de melhor qualidade. Os conhecimentos das áreas de engenharia, farmacologia e biologia são empregados na produção de enxertos, próteses e implantes que buscam características biomiméticas (HOLZAPFEL et al., 2013). Essas características se destacam no mundo científico devido ao seu potencial acelerar o reparo da lesão a partir do tecido original do próprio paciente, uma vez que eles funcionam como a própria matriz extracelular, em vez de substituir o osso lesionado (HOLZAPFEL et al., 2013).

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo altamente especializado e dinâmico, e

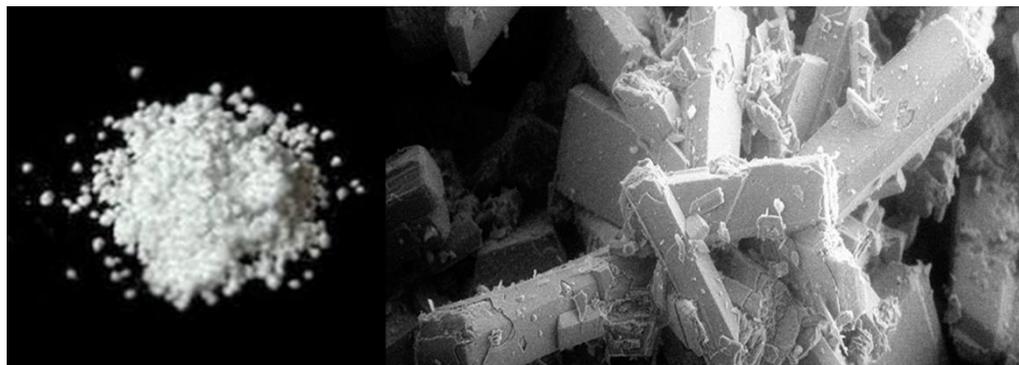
juntamente com o tecido cartilaginoso, forma o sistema esquelético. O sistema esquelético tem diferentes funções, dentre elas, função metabólica, função de proteção para órgãos vitais, função endócrina e regulação da função renal e energia e também como suporte e para fixação muscular (II e KARSENTY, 2007).

A matriz extracelular é composta por uma porção orgânica e uma inorgânica do tecido ósseo, constituída de hidroxiapatita (HA), que é um material cristalino com estrutura similar à da fluorapatita, presente em diversas rochas ígneas e metamórficas, especialmente em calcários cristalinos. É um constituinte mineral, pode ser encontrado nos ossos representando entre 30 e 70% da massa dos ossos e dentes. Nesse tecido a matriz extracelular orgânica é constituída de proteínas colágenas e não colágenas, sendo em sua maioria sintetizadas pelos osteoblastos. Porém, várias proteínas plasmáticas são absorvidas pela matriz óssea (RIGO, 2011).

Várias proteínas não colágenas presentes na matriz óssea foram purificadas e sequenciadas, mesmo que seu papel tenha sido apenas parcialmente elucidado. Muitas delas parecem servir para múltiplas funções, incluindo a regulação da deposição mineral óssea, *turnover* e a regulação da atividade das células ósseas. Os osteoblastos são células de revestimento, responsáveis pela produção de nova matriz óssea nas superfícies de formação (CAPPARIELLO et al., 2014).

Existe grande interesse na produção de HA sintética, pelas suas propriedades de biocompatibilidade e osteointegração, o que a torna uma boa alternativa, como biomaterial, na substituição do osso humano em implantes e próteses. Esta grande compatibilidade com o organismo, é devido provavelmente ao seu conteúdo iônico (cálcio, potássio, magnésio, sódio, etc.) comum com aquilo encontrado nos tecidos, além de limitada toxicidade para o corpo humano. Além disso, observa-se na HA, grande capacidade de adsorver e ou absorver moléculas, que fazem dela um excelente suporte para ação prolongada de drogas anticancerígenas no tratamento de tumores ósseos, e eficiente no tratamento de remoção de metais pesados em águas e solos poluídos (RIGO, 2011). **(Figura 1)**

Figura 1. Estrutura de HA



O painel da esquerda mostra uma imagem macroscópica da HA que se apresenta sob a forma de um pó branco e fino. O painel da direita mostra uma imagem de microscopia eletrônica de varredura das microestruturas de HA se apresentando sob a forma de cristais agregados. Adaptado de Chen, 2011.

Em particular, a HA precipitada por via úmida possui características próximas às do tecido ósseo e dentário, por serem sintetizadas em baixas temperaturas apresentam baixa cristalinidade e tamanho de cristais pequenos, além de ser de baixo custo (COSTA, A C F M et al., 2009).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 TECIDO ÓSSEO

Os ossos são estruturas fundamentais na constituição do corpo humano além de promover a sustentação do organismo, são responsáveis pela hematopoiese. Formam reserva de gordura, promovem a troca contínua de cálcio e fósforo com o plasma sanguíneo, protegem o encéfalo, a medula espinhal, o coração e os pulmões e compõem sistemas de alavancas nas articulações, garantindo ampla movimentação de várias partes do corpo. Além disso, os ossos são pontos de inserção muscular e transmitem a força das contrações musculares de uma parte à outra do corpo durante o movimento. São capazes de absorver toxinas e metais pesados minimizando seus efeitos adversos nos outros tecidos (TORTORA, 2016).

O osso é todo revestido externamente por uma resistente bainha branca de tecido fibroso denominado perióstio, cujas fibras colágenas se inserem firmemente no tecido ósseo. É constituído de tecido conjuntivo denso irregular, vasos sanguíneos e nervos que passam pelo osso e vários tipos de células ósseas. O perióstio é necessário para a proteção, nutrição, crescimento em diâmetro e reparo dos ossos e é local de fixação para ligamentos e tendões (GEMINI-PIPERNI et al., 2014).

O perióstio reveste toda a superfície externa do osso, exceto em suas superfícies articulares. Sua região externa é comparativamente espessa e é denominada camada fibrosa, enquanto sua região mais interna é menos definida e chamada camada osteogênica, devido à presença de células osteoprogenitoras. Já o endóstio é o revestimento da cavidade medular que consiste em células osteoprogenitoras achatadas sem um componente fibroso. Entretanto essas células osteoprogenitoras, assim como as do perióstio, são capazes de atuar no reparo de lesões ósseas (AMINI et al., 2012).

Assim como todos os tecidos do organismo, o tecido ósseo possui células próprias e substância intercelular bem definida. A matriz óssea é sólida e rígida devido a grande quantidade de compostos minerais, especialmente fosfato e carbonato de cálcio, mas também possui certa flexibilidade devido a presença de fibras proteicas. Os ossos das crianças têm maior proporção das substâncias orgânicas que os dos adultos e, essa proporção, diminui à medida que a idade avança. Isso explica a maior ocorrência de fraturas em idosos (II e KARSENTY, 2007).

A matriz óssea é formada por duas fases: a mineral (ou inorgânica) e a orgânica. Na fase mineral estão presentes grandes quantidades do fosfato de cálcio denominado HA, além de carboapatita, traços de íons magnésio, carbonato, hidroxila, cloro, flúor e citrato (ROLIM et al., 2018); a fase orgânica está representada por fibras de colágeno tipo I (Col I), proteo e glicosaminoglicanas e moléculas sinalizadoras como hormônios, fatores de crescimento e citosinas. As fibras de Col I proporcionam ductilidade ao osso enquanto os cristais de HA, resistência à compressão. Participando das atividades teciduais estão as principais células ósseas: células osteoprogenitoras, osteoblastos, osteócitos e osteoclastos (PORFIRIO e FANARO, 2016).

As células osteoprogenitoras mantêm a população de osteoblastos através do processo de diferenciação celular. Os osteoblastos localizam-se na superfície óssea sintetizando e secretando diversos componentes da matriz e, principalmente, Col I. Os osteócitos se localizam no interior da matriz óssea e são as células ósseas maduras (ao final do processo de diferenciação) (**Figura 2**). Os osteoclastos são encontrados na superfície óssea reabsorvendo a matriz mineralizada em um processo denominado remodelação óssea. O processo de remodelação óssea é importante para o crescimento, reparo e manutenção dos ossos e será discutido posteriormente (ALVES et al., 2016).

Figura 2. Esquema da disposição do tecido ósseo



Apontados pelas setas os principais constituintes do tecido ósseo: Osteoblastos e osteócitos. Adaptado de StuDocu Universidade Federal de Alagoas, 2018.

A principal função dos ossos, a de sustentar o corpo, está relacionada com sua matriz óssea mineralizada. Os ossos longos apresentam, em observação

macroscópica, um tipo de tecido ósseo com matriz mais densa em suas camadas superficiais. Esse tipo ósseo, denominado tecido ósseo compacto, apresenta propriedades mecânicas com valores altos, dando o caráter rígido ao osso. Em observações microscópicas, a matriz óssea mineralizada apresenta um arranjo determinado das fibras de Col I. (YUNOKI et al., 2006).

2.2 PROCESSOS DE OSSIFICAÇÃO

Os processos de ossificação podem ser de dois tipos, intramembranosa e endocondral envolvendo a substituição de tecido conjuntivo preexistente por osso, não havendo distinção dos dois processos quando observamos um osso adulto. A ossificação intramembranosa refere-se à formação de osso diretamente dentro ou sobre as membranas de tecido conjuntivo fibroso. Em contrapartida, o processo de ossificação do tipo endocondral apresenta um molde de cartilagem que é substituído gradualmente por tecido ósseo (ROLIAN, 2020).

A ossificação intramembranosa é o processo que forma, por exemplo, os ossos planos do crânio, a mandíbula e as clavículas. O embrião humano possui um esqueleto composto por cartilagem ou tecido conjuntivo fibroso. Esse esqueleto serve como molde para o evento de ossificação que começará a seguir. A ossificação se inicia por volta da sexta ou sétima semana de vida e continua ao longo da vida adulta (COSTA, T C, 2013).

Células do mesênquima diferenciam-se em células osteoprogenitoras e, posteriormente, em osteoblastos, formando o centro de ossificação. Os osteoblastos iniciam a secreção de matriz até que estejam totalmente circundados por ela. As células, agora denominadas osteócitos, promovem junções de suas membranas plasmáticas através de canálculos enquanto a matriz continua sendo mineralizada (CALASANS- MAIA et al., 2017).

À medida que a matriz óssea se mineraliza, ela se funde formando as trabéculas do osso esponjoso. Os espaços entre as trabéculas são preenchidos por medula óssea vermelha e, na superfície exterior do osso, o mesênquima se condensa formando o perióstio. As camadas superficiais do osso podem ainda ser substituídas por osso compacto pelo processo de remodelação, o que permitirá o crescimento do novo osso até o tamanho adulto (MEDINA-CRUZ et al., 2020).

Na ossificação endocondral, a maior parte dos ossos, inclusive os longos, é

formada por esse processo. No início do desenvolvimento embrionário, um molde de cartilagem hialina é formado. À medida que o molde de cartilagem cresce, células da região média do molde iniciam, estimuladas quimicamente, a mineralização, diminuindo a taxa de difusão de nutrientes e oxigênio e causando sua própria morte. As lacunas resultantes das células mortas são preenchidas por células osteoprogenitoras (ROLIAN, 2020).

Uma nova artéria penetra na matriz calcificada estimulando uma nova colonização celular. As células osteoprogenitoras se diferenciam em osteoblastos que secretam uma matriz óssea formando trabéculas do osso esponjoso. A atividade dos osteoclastos gera a cavidade medular, enquanto os osteoblastos continuam produzindo mais tecido ósseo em direção às extremidades. A cavidade medular é então preenchida pela medula óssea vermelha (ALVES et al., 2016).

A cartilagem hialina continua, mesmo no fim do processo, a recobrir as epífises como cartilagem articular, e aparece entre a diáfise e as epífises como placa epifisária, a qual é responsável pelo crescimento dos ossos em comprimento. A placa epifisária permite a diáfise aumentar em comprimento até o início da vida adulta. As células de cartilagem da placa epifisária cessam a divisão, e a cartilagem eventualmente é substituída pelo osso. A velocidade de crescimento é controlada por hormônios, como o hormônio do crescimento humano (GH) (HE e BARKAN, 2020).

O crescimento em diâmetro ocorre junto com o crescimento em comprimento. Neste processo, o osso revestindo a cavidade medular é destruído por osteoclastos do endóstio de modo que a cavidade aumenta em diâmetro. Ao mesmo tempo, os osteoblastos do perióstio acrescentam novo tecido ósseo em torno da superfície externa do osso (PERCIVAL e RICHTSMEIER, 2014).

2.3 ORGANIZAÇÃO TECIDUAL

A constituição do esqueleto se dá por dois tipos de tecidos ósseos, sendo eles, o compacto ou cortical e o esponjoso ou trabecular. Ambos apresentam um revestimento externo denominado perióstio e um interno denominado endóstio e apresentam as mesmas características moleculares celulares. O que os diferencia é a organização estrutural de moléculas e células, o que resulta em diferentes arranjos e propriedades mecânicas. As propriedades mecânicas do osso bem como sua elasticidade estão intimamente relacionadas com a idade do indivíduo, sabendo-se que

espécies femurais, o módulo de elasticidade do osso cortical femural tende a declinar aproximadamente 2% por década (KARAGEORGIU e KAPLAN, 2005).

Os ossos do corpo humano podem ser classificados como: longos, curtos, planos e irregulares devido ao seu formato. O fêmur e a tíbia por serem ossos longos apresentam grande quantidade de tecido ósseo compacto e osso esponjoso em quantidades consideráveis em seu interior, já ossos curtos como o carpo e o tarso, possuem grande quantidade de tecido ósseo esponjoso e uma fina camada de osso compacto. Em contrapartida ossos planos, representados pelos ossos do crânio, esterno, escápula e costelas, permitem uma proteção satisfatória de estruturas internas, uma vez que fornecem extensa área de inserção muscular e, por fim, os ossos irregulares como as vértebras variam na quantidade de osso compacto e esponjoso (GEMINI-PIPERNI et al., 2014).

O processo de preenchimento gradual que converte o osso esponjoso em osso compacto ocorre por meio da criação de canais estreitos revestidos por células osteoprogenitoras. Eles circundam os vasos que estavam presentes anteriormente nos espaços trabeculares da rede esponjosa, sendo cada um desses arranjos com várias camadas consecutivas, denominado ósteon (CLARKE, 2008).

O tecido ósseo compacto tem uma maior resistência uma vez que é composto principalmente por matriz óssea mineralizada. Este tecido é encontrado no perímetro do osso e é atravessado pelos Canais de Volkmann, por onde passam artérias nutritivas e nervos do periósteo. Nele também há presença de Canais de Havers que fazem a ligação de mais vasos sanguíneos e nervos da cavidade medular (CLARKE, 2008).

Os canais centrais estão sempre equidistantes ao comprimento do osso longo e ao redor deles encontram-se as lamelas concêntricas de matriz mineralizada. Entre uma lâmina e outra há formação de lacunas onde ficam os osteócitos e canalículos com projeções citoplasmáticas deles, que passam a se conectar entre si e com os canais centrais. O possibilita o metabolismo do tecido, com troca de substâncias, capacidade de regeneração, quando necessário e também a sensibilidade do osso, que é dada pela existência de fibras nervosas (POOLE et al., 2005).

2.4 TIPOS CELULARES

2.4.1 Osteoblastos

Osteoblastos (**Figura 3**) são células responsáveis pela síntese de nova matriz

óssea. Eles são originados de células-tronco mesenquimais (CTMs), que com fatores de transcrição específicos determinam a diferenciação celular, organizando o processo para que células possam se diferenciar em tecidos como condrócitos, osteoblastos, mioblastos e adipócitos (YOSHIKO et al., 2007).

Figura 3. Microscopia eletrônica de transmissão de um osteoblasto

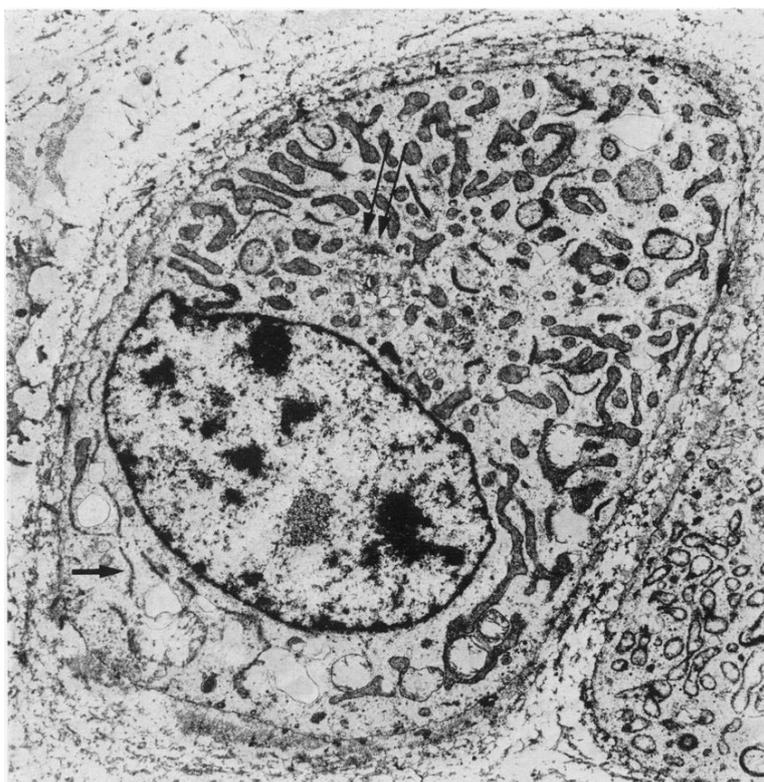


Imagem de microscopia eletrônica de um osteoblasto demonstrando complexo de Golgi, retículo endoplasmático granular. Fixação de glutaraldeído-ósmio: corada com urânio e chumbo. Aumento x 6900 (Photo: J. P. Thiery).

O período de maturação dos osteoblastos, que nos humanos dura aproximadamente 10 dias, dá origem aos osteóides, devido ao intervalo de tempo entre a formação da matriz e sua subsequente calcificação existe uma interessante dinâmica entre as células mesenquimais ativadas e os pré-osteoblastos, sendo o processo de diferenciação orquestrado por marcadores determinantes para o mesmo (GEMINI-PIPERNI et al., 2014).

A concentração no soro de fosfatase alcalina (ALP) pode ser utilizado como um indicador de formação óssea, pois esta constitui um marcador de células presente na membrana plasmática do osteoblasto maduro. O fator *10b Wingless-int* (Wnt10b) inibe a diferenciação pré-adipocitária e impulsiona o comprometimento das CTMs com osteo ou condro progenitor, sendo esse o primeiro passo da osteoblastogênese. Fatores de

transcrição pró-osteogênicos realizam esse comprometimento e um deles é o fator de transcrição 2 que se relaciona ao runt (runx2, do inglês Runt-related transcription factor 2) que diferencia os osteoblastos (YOSHIKO et al., 2007).

Além da ativação de fatores de transcrição pró-osteogênicos, também ocorre a supressão da proteína de ligação α do intensificador de fator de transcrição adipogênica CCAAT α (C / EBP α) e do receptor ativado por proliferador de peroxissomo γ (PPAR γ) no comprometimento da linhagem osteoblástica. Já os altos níveis de sinalização Wnt, junto com a presença de Runx2, aumentam a osteoblastogênese proveniente da diferenciação de condrócitos. Com isso, os precursores de osteoblastos se proliferam e se diferenciam em pré-osteoblastos e em seguida em osteoblastos maduros. Após isso, o osteoblasto se torna um osteócito e os osteoblastos em excesso passam pelo processo de apoptose (ALVES et al., 2016).

Proteínas colágenas e não colágenas são sintetizadas por osteoblastos maduros, incluindo osteocalcina, sialoproteína óssea (BSP), osteopontina, osteonectina, glicosaminoglicanos e proteoglicanos, como decorina e biglicano. Reguladores importantes para o processo de osteogênese são fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs), proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) e proteínas Wnt, juntamente com os fatores de transcrição específicos para osteoblastos Runx2 e Osterix. Durante a biossíntese da matriz extracelular e a mineralização da matriz, observa-se uma variação na expressão do marcador de osteoblastos: ALP e tipo 1 o receptor da paratireóide (PTH1R) aumenta na primeira fase e depois diminui quando a mineralização progride e os osteoblastos se tornam osteócitos, enquanto outros marcadores, como osteopontina, osteocalcina e sialoproteína óssea, aparecem e aumentam durante a mineralização (II e KARSENTY, 2007).

2.4.2 Osteoclastos

Sendo células altamente especializadas, os osteoclastos são multinucleados, com 4 a 20 núcleos, e capazes de retirar a matriz óssea antiga para a regulação da homeostase mineral do organismo (**Figura 4**). Membros da linhagem de monócitos / macrófagos, os osteoclastos e são constituídos por múltiplas fusões celulares diferenciadas de seus precursores mononucleares. Os osteoclastos podem ser considerados células terminalmente diferenciadas dessa família, M-CSF (fator estimulador de colônias de macrófagos) e RANKL (ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa) induzem sua diferenciação de precursores mielóides, bem como sua

transdiferenciação de macrófagos teciduais e células dendríticas (JEONG et al., 2020).

A capacidade única de dissolver a HA cristalina é a função característica dos osteoclastos, seguida pela degradação enzimática da matriz óssea orgânica. Os osteoclastos encontram-se em uma lacuna de reabsorção, entretanto os mecanismos envolvidos nesse processo ainda são obscuros.

Figura 4. Osso em corte histológico apontando osteoblasto



Corte histológico do tecido ósseo corado com Hematoxilina e Eosina, apontando osteoclasto multinucleado na lacuna de absorção. (<http://faculty.une.edu/com/abell/histo/Histolab4e.htm>).

Além disso, estudos recentes sugerem que eles podem ter algumas funções reguladoras em relação a outras linhagens celulares presentes no ambiente da medula óssea (JEONG et al., 2020).

2.4.3 Osteócitos

Os osteócitos constituem cerca de 90-95% do total de células ósseas, sendo a mais abundante em um esqueleto adulto, diferente dos osteoblastos e osteoclastos que constituem 4-6% e 1-2%, respectivamente. Na composição da matriz mineralizada, há a presença dos osteócitos que ficam em pequenas lacunas osteocíticas no osso (25.000 / mm³ de osso).

Osteócitos passam pelo processo de apoptose quando há danificação no osso durante a reabsorção óssea dos osteoclastos, tendo como principais marcadores: fosfatase alcalina baixa ou inexistente, caseína-quinase alta, osteocalcina e CD44, E11 / gp38, endopeptidase neutra fosforeguladora no cromossomo X (Phex),

fosfoglicoproteína extracelular da matriz (MEPE), fator de crescimento de fibroblastos 23 (FGF23), proteína 1 da matriz da dentina (DMPI) e esclerostina (SOST) (PROBST et al., 2020).

Estudos evidenciam a grande importância dos osteócitos na estrutura óssea, uma vez que os mesmos aumentam em cortes histológicos e são sinais característicos quando há o diagnóstico de determinadas doenças, de modo que se sugere que a matriz perilacunar apresenta-se de forma mais maleável ou menos mineralizada do que a matriz circundante. Nas superfícies das lacunas osteocíticas ocorrem a mineralização ou a remoção da matriz mineralizada através dos osteócitos. O microambiente dessas células também pode ser modificado, alterando suas propriedades da matriz circundante (ALVES et al., 2016)..

Outras funções desenvolvidas pelos osteócitos são: a regulação do metabolismo mineral e a homeostase do fosfato (ALVES et al., 2016).

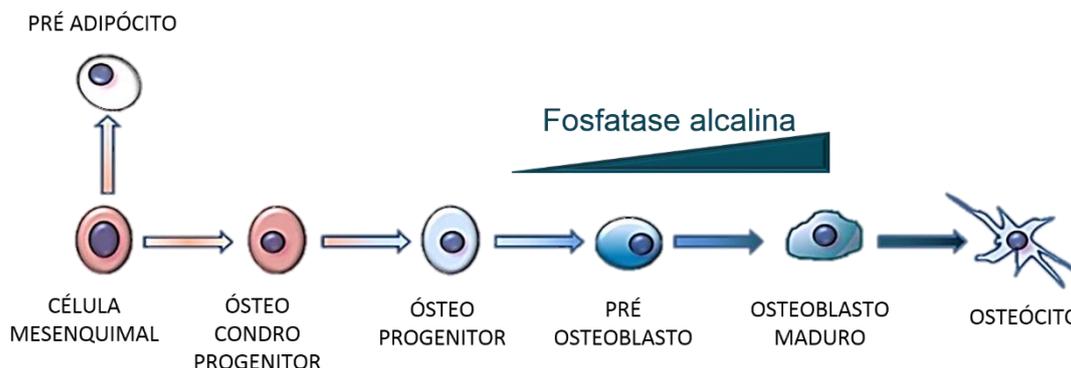
2.5 REMODELAMENTO ÓSSEO E MINERALIZAÇÃO

No processo fisiológico normal, a reabsorção e a formação ósseas estão intimamente relacionadas em tempo, grau e espaço, tanto que a formação óssea só é ativada depois que estiver estabelecida uma área de absorção. O metabolismo ósseo é influenciado por vários fatores hormonais, locais, comportamentais e ambientais, além de forças mecânicas, elétricas, químicas e magnéticas. Esse mecanismo é relativamente rápido no osso trabecular e mais lento no osso cortical (ANDRÉ BARRIÈRE et al., 2019).

Processos citoplasmáticos se estendem profundamente na matriz óssea recentemente produzida e ficam em contato com os processos osteocíticos em seus canalículos. Complexos juncionais (junções comunicantes) são frequentemente encontrados entre os osteoblastos (GEMINI-PIPERNI et al., 2014).

O primeiro passo da osteoblastogênese é o compromisso das CTMs com um osteo/condro-progenitor, impulsionado pelo fator Wnt10b, que também inibe a diferenciação pré-adipocitária. Esse comprometimento é realizado pela ativação de fatores de transcrição pro-osteogênicos como runx2. (JUE et al., 2014) **(Figura 5)**.

Figura 5. Representação esquemática do processo de osteoblastogênese



O osteoblasto origina de uma célula tronco mesenquimal multipotente (CTM) que, na presença de estímulos adequados, como os sinais Wnt, está comprometida com um osteocondroprogenitor, seguida por uma célula osteoprogenitor, um pré-osteoblastos (pré-obl) que expressam fosfatase alcalina (ALP), receptor de PTH 1 (PTH1R) e colágeno 1 alfa 1 (Col1A1) e um osteoblasto maduro ativo (OBL) que secreta proteínas da matriz óssea. Uma vez depositado a matriz óssea, um osteoblasto maduro é preso na própria matriz mineralizada e se diferencia em um osteócito. Adaptado de Gemini -Piperni, 2015.

Diversos estudos demonstraram que o fator de transcrição Runx2 desempenha um papel fundamental no desenvolvimento do esqueleto, pois é um gene fundamental para a diferenciação de osteoblastos. O comprometimento da linhagem osteoblástica é realizado não apenas pela ativação de fatores de transcrição pro-osteogênicos, mas também pela supressão do fator de transcrição adipogênico potencializador de C/EBP α e o receptor ativado por proliferador de PPAR γ . Por outro lado, altos níveis de sinalização Wnt, juntamente com a presença de Runx2, promovem ainda mais a osteoblastogênese às custas da diferenciação dos condrócitos (TAKARADA et al., 2016).

Sob esses estímulos, os precursores dos osteoblastos sofrem proliferação e diferenciam-se em pré-osteoblastos e depois em osteoblastos maduros, alterando a morfologia de osteoprogenitores fusiformes para osteoblastos grandes e diferenciados de forma cúbica depositados em superfícies de matriz óssea. Nos últimos estágios de sua diferenciação, o osteoblasto torna-se uma célula de revestimento plana ou um osteócito (ROOT et al., 2020).

Durante a biossíntese da matriz extracelular e mineralização da matriz, observa-se uma variação na expressão do marcador de osteoblastos: ALP e receptor de paratireoide tipo 1 (PTH1R) aumentam na primeira fase, diminuem quando a mineralização progride e os osteoblastos se tornam osteócitos, enquanto outros

marcadores, como osteopontina, osteocalcina e sialoproteína óssea, aparecem e aumentam durante a mineralização (MARTÍN et al., 2020).

Além disso, os osteoblastos desempenham um papel crucial na formação de osteoclastos, produzindo duas citocinas osteoclastogênicas essenciais: fator estimulante de colônias de macrófagos (M-CSF), um fator de crescimento capaz de estimular a proliferação de precursores de osteoclastos e ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANKL), uma citocina transmembrana expressa por osteoblastos, que interage com seu receptor RANK na superfície pré-osteoclástica, desencadeando a osteoclastogênese. Eles também secretam osteoprotegerina (OPG), um receptor chamariz para RANKL, que tem um papel osteoprotetor. De fato, a OPG é uma proteína secretada que possui a mesma estrutura do domínio extracelular do RANK, de modo que se liga ao RANKL prevenindo sua interação com o RANK, com uma consequente inibição da osteoclastogênese (PAULA-SILVA et al., 2020).

A biomineralização é o processo pelo qual a HA é depositada na matriz extracelular. Mesmo que esse processo ainda não seja totalmente compreendido, supõe-se que ocorram os mesmos eventos que os da mineralização da cartilagem. Esses eventos envolvem a liberação de vesículas matriciais, vesículas envoltas por membrana extracelular (50-200 nm de diâmetro), que são formadas por brotamento polarizado da membrana superficial de condrócitos, osteoblastos (ROCHA et al., 2012).

A mineralização começa com a nucleação dos cristais de HA dentro das vesículas da matriz, seguida pela propagação da formação de HA através da membrana para a matriz extracelular. Os fosfolípidios de ligação ao cálcio (incluindo a fosfatidilserina), as proteínas de ligação ao cálcio, a sialoproteína óssea e as anexinas formadoras do canal de cálcio promovem o acúmulo de cálcio dentro das vesículas da matriz (ROLIM et al., 2018).

Os fosfatos são fornecidos pelo co-transportador Na (sódio) / Pi (fosfato inorgânico) tipo III, localizado tanto na membrana celular quanto na vesícula da matriz, e por uma nova fosfatase que foi recentemente identificada como essencial para a geração de Pi e mineralização óssea normal, O FOSPHO1, que cliva fosfoetanolamina (PEA) e fosfocolina para gerar fosfato inorgânico. Quando o acúmulo de cálcio e fosfato nas vesículas da matriz excede o ponto de saturação da solubilidade do CaPO_4 , ele se precipita na forma de HA. No segundo passo da mineralização, os cristais de HA crescem para a matriz extracelular, preenchendo o espaço entre as fibras de colágeno.

Este alongamento da HA requer concentrações apropriadas de cálcio e fosfato fora das vesículas da matriz (HUESA et al., 2012).

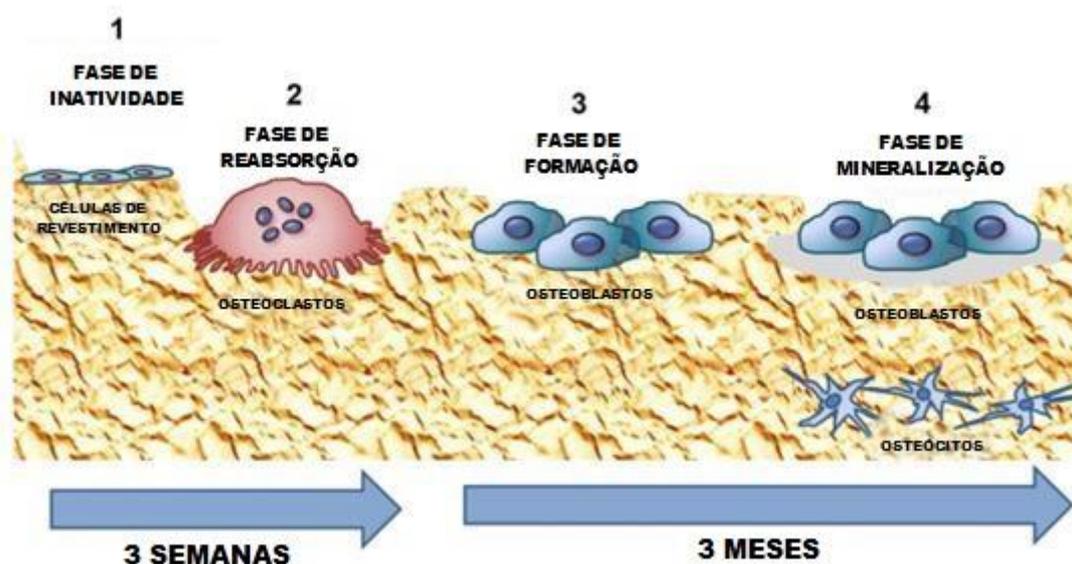
Em particular, a razão entre Pi e pirofosfato inorgânico (PPi) é crucial nesta fase. O PPi, que inibe a formação de HA, é formado pela NPP1 (uma isoenzima Nucleotídeo Pirofosfatase / Fosfodiesterase) dos trifosfatos nucleotídeos. O PPi é também fornecido por ANKH (homólogo da anquilose progressiva), que transporta o PPi de dentro da célula para o espaço extracelular. Em contraste, a fosfatase alcalina não específica tecidual (TNAP) hidrolisa o PPi para gerar duas moléculas de Pi, promovendo assim a mineralização da matriz (MÜLLER et al., 2019).

O osso é um tecido dinâmico, constantemente submetido a um processo de remodelação para manter a estabilidade biomecânica e a regulação da homeostase mineral de todo o organismo. Ossos adultos sofrem continuamente remodelação. Mesmo após o crescimento e a modelagem do esqueleto terem sido completados, ~20% da superfície do osso esponjoso está passando por remodelação a qualquer momento e 8-10% do tecido ósseo é substituído anualmente (PAULA-SILVA et al., 2020).

A remodelação óssea permite a substituição do osso velho e/ou danificado por osso novo e mecanicamente competente. Anormalidades nesse processo ocorrem em algumas das doenças mais comuns que afetam os seres humanos, como osteoporose, periodontite, artrite e osteólise induzida por tumor. O remodelamento ósseo é um processo complexo regulado por uma variedade de fatores bioquímicos e mecânicos, envolvendo a primeira reabsorção óssea, realizada pelos osteoclastos, são gigantes, multinucleados (com 4 a 20 núcleos), células altamente especializadas capazes de remover a matriz óssea antiga, e a formação óssea, realizada pelos osteoblastos, colaborando estreitamente nas unidades multicelulares básicas (BMU) (CAPPARIELLO et al., 2014).

O primeiro passo do remodelamento ósseo é a fase de reabsorção, seguida pela fase de reversão, a fase de formação e a fase de mineralização (**Figura 6**).

Figura 6. Remodelação óssea de adultos



A integridade estrutural óssea é mantida pela reabsorção mediada por osteoclastos e seguida pela nova formação óssea e a fase de mineralização mediada por osteoblastos.

Fonte: Adaptado de Gemini – Piperni, 2015

Entre 2% e 5% do osso cortical é remodelado a cada ano, perfurando gradualmente o osso, carregando um grupo de osteoclastos na ponta, cavando um túnel circular (cone de corte) na direção de carregamento dominante, seguido por vários milhares de osteoblastos que preenchem o túnel (cone de fechamento) para produzir um osteon secundário de osso renovado (ALVES et al., 2016).

No osso trabecular, o processo de remodelação é principalmente um evento de superfície mais ativo (com taxas de remodelação que podem ser até 10 vezes maiores) e então o remodelamento ocorre no osso cortical, devido à razão superfície-volume muito maior. Osteoclastos vêm em primeiro lugar no processo: eles viajam através da superfície trabecular, cavando uma vala em vez de um túnel, com uma profundidade de 40-60mm e seguido pela formação óssea dos osteoblastos. Os locais de remodelação ativos abrangem áreas de tamanhos variados, desde 50x20 mm até 1000x1000 mm (POOLE et al., 2005).

A inflamação possui relação direta com o tempo e qualidade da remodelação óssea. A massa óssea depende da homeostase da dinâmica balanceada entre a atividade dos osteoblastos e osteoclastos, firmemente controlada pelo sistema imunológico. Algumas citocinas pró inflamatórias estão diretamente envolvidas nesse processo: IL-1 β , IL-6 e TNF, que estimulam a atividade dos osteoclastos de forma autócrina; RANKL (ligante do receptor ativador nuclear kappa beta - da família do TNF), que se liga aos

receptores transmembrana RANK (receptor ativador nuclear kappa beta) dos osteoclastos e induz a osteoclastogênese; a osteoprotegerina (OPG), que regula negativamente a formação e ativação dos osteoclastos, interrompe a ligação RANK-RANKL por ligar-se ao RANKL (BRIOT, K et al, 2017).

A OPG é produzida primariamente pelos osteoblastos e seus precursores, mas também pode ser expressa pelas células B e células dendríticas. Em contrapartida, o fator de crescimento transformador beta (TGF- β), produzido pelos osteoblastos e pelas células da medula óssea, é o mais abundante dos fatores de crescimento armazenado no osso e estimula a formação óssea, como também inibe a diferenciação, formação e atividade dos osteoclastos maduros (GUERRINI, M et al, 2014).

2.6 HIDROXIAPATITA

Existem vários tipos de fosfatos de cálcio sendo que a formação de uma fase ou outra é determinada pelas condições do meio (pH, temperatura) e presença de impurezas. Dentre todas as estruturas cristalinas possíveis destaca-se a HA (COSTA, A C F M et al., 2009).

Destaca-se o uso de HA no desenvolvimento de materiais bioativos que simulem a composição do tecido ósseo devido a sua similaridade química e estrutural com a fase mineral dos ossos e dentes de vertebrados, sendo essa denominada HA biológica (**Figura 7**) (PIRES et al., 2015).

Além disso, materiais cerâmicos à base de HA têm sido amplamente pesquisados no desenvolvimento de substitutos ósseos devido às suas propriedades osteocondutora, baixa toxicidade, biocompatibilidade e bioatividade. Considera-se que a HA sintética seja capaz de induzir o crescimento do tecido ósseo onde está inserida devido à sua estrutura porosa semelhante ao osso, além disso, a superfície da fase inorgânica sintética permite interações dipolares, de modo que moléculas de água e proteínas podem ser adsorvidas na sua superfície proporcionando, conseqüentemente, uma forte ligação com o tecido sob a qual é aplicada e induzindo a regeneração do mesmo (RIBEIRO et al., 2016).

Figura 7. Comparação estrutural dos dentes humanos e materiais à base de apatita



Microscopia eletrônica de varredura comparando em diferentes aumentos (da esquerda para a direita 100 nm, 2 μm e 20 μm) as estruturas dos dentes e de materiais artificiais constituídos por apatita. <https://www.upf.br/biblioteca/noticia/nova-tecnica-consegue-regenerar-esmalte-dos-dentes>

Conhecendo a estrutura química da HA (HA), $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, para que as características físico-químicas do material sejam modificadas, podem ser efetuadas substituições introduzindo íons como AsO_4^{3-} , CO_3^{2-} , e CO_3^{2-} , F^- , Cl^- , Br^- , CO_2^- respectivamente no lugar dos grupos fosfato e hidroxila. Particularmente, a introdução do grupo carbonato que pode substituir tanto o grupo hidroxila quanto o grupo fosfato, origina a carbonatação do tipo alfa e do tipo beta, respectivamente. As HAs carbonatadas apresentam melhor solubilidade quando comparadas à HA não substituída, o que a torna amplamente utilizada na prática clínica como substituto ósseo pelas melhores características de biocompatibilidade, maior solubilidade e absorção (ROCHA et al., 2012).

A HA apresenta um grande potencial como biomaterial baseado em sua compatibilidade com o organismo, pois a mesma pode conter íons comumente encontrados nos tecidos (cálcio, potássio, magnésio, sódio, etc.), além de limitada toxicidade para o corpo humano (COSTA, A C F M et al., 2009).

Em particular, a HA precipitada por via úmida possui características próximas às do tecido ósseo e dentário, por serem sintetizadas em baixas temperaturas apresentam baixa cristalinidade e tamanho de cristais pequenos. O oposto da HA sintetizada a altas temperaturas, que apresentam boa cristalinidade e tamanho de cristais grandes.

Portanto, alguns estudos têm evidenciado que as condições de síntese influenciam o conteúdo de carbonato estrutural e a cristalinidade das CHA (RIGO, 2011).

A literatura internacional evidencia a eficiência e segurança de nanoproductos para uso clínico na forma de nanopartículas (NPs), ou sistemas nanoestruturados. Tal eficiência e segurança dependem dos mecanismos de interação destes dispositivos com células e tecidos pois esta interação ocorre em nível local pela incorporação no interior das células (BASTAN, 2020).

As aplicações das NPs abrangem uma grande diversidade de áreas tais como a terapia de câncer, cardiovascular, ortopedia e odontologia, doenças infecciosas, gastroenterologia, imunologia, neurologia, além de cosméticos e fotoprotetores (CALASANS- MAIA et al., 2017).

O desenho de novas NPs carreadoras de fármacos, fatores de crescimento e genes dependem diretamente do modelo de trânsito do meio extracelular para o intracelular, bem como sua biodisponibilidade após seu contato com o meio biológico e tecidos. O primeiro evento que ocorre quando as NPs entram em contato com o fluido biológico é a adsorção de constituintes do meio tais como proteínas, peptídeos e sais minerais. Esta interação pode mudar drasticamente as características físico-químicas da superfície das NPs tais como estequiometria e a carga de superfície. Se localmente ocorre variação de pH, como é comum em processos inflamatórios, as NPs podem ser submetidas a processos de oxidação e dissolução, como ocorre com NPs de fosfatos de cálcio. A internalização celular das mesmas ocorre principalmente através de diferentes mecanismos dependentes de regulação, tais como endocitose, fagocitose e macropinocitose (SRIVASTAV et al., 2019).

Ao longo do processo de transporte, as NPs podem interagir bioquimicamente com diferentes estruturas e, dependendo de suas características, afetar a fisiologia celular através da modulação de vias de sinalização química intracelulares. Uma vez presentes no citosol, as NPs podem alcançar o compartimento nuclear e interferir na integridade do genoma, afetando desde a síntese proteica até o metabolismo celular.

Com o aumento da expectativa de vida, faz necessário aprimorar técnicas que melhorem a qualidade e durabilidade dos implantes ósseos, este estudo propõe a utilização de CHA (CHA), um biomaterial que é amplamente utilizado na medicina regenerativa óssea como importante substituto ósseo bioativo e osteocondutor tanto de uso em implantes ortopédicos quanto dentários pelas suas características de

biocompatibilidades e propriedades de maior solubilidade e adsorção comparada a HA não substituída pelo carbonato (BASTAN, 2020).

Portanto, pretende-se relacionar duas diferentes temperaturas de síntese (90°C e 37°C) de CHA nanoestruturada, obtida por precipitação por via úmida, assim como a presença de um revestimento com o elemento alginato na carboapatita sintetizada com 37°C com os mecanismos de citotoxicidade e biocompatibilidade na sua interação com osteoblastos humanos, com intuito de aprimorar a qualidade dos produtos que utilizam em sua composição HA em aplicações clínicas (ROCHA et al., 2012).

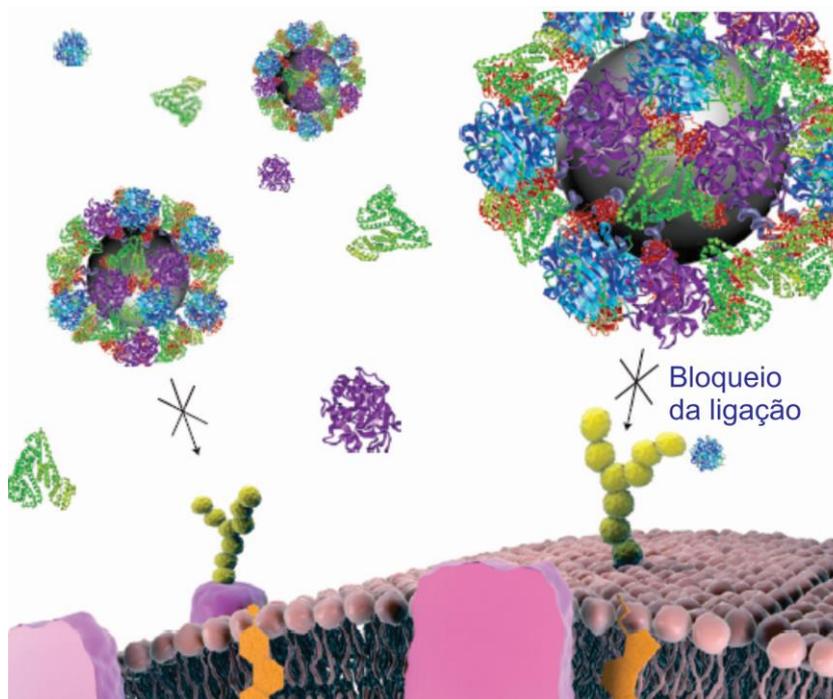
2.8 ALGINATO

O alginato de cálcio é um biopolímero composto por fibras de ácido algínico, e esse ácido é extraído de algumas algas marinhas (*laminaria*, popularmente conhecida como algas marinhas marrons). Sua camada externa é produzida com poliuretano e sua camada interna com gelatina, pectina e também carboximetilcelulose sódica. O alginato de cálcio também conta com íons de sódio e cálcio. Sua ação hemostática se deve pela substituição dos íons de cálcio pelos íons de sódio presentes no sangue (PINHEIRO, L, 2013).

2.9 PROTEÍNA CORONA

O fenômeno conhecido como proteína corona é caracterizado pela adsorção espontânea e inespecífica de proteínas na superfície de nanopartículas (**Figura 8**). Essa camada de proteínas adsorvida tem uma grande influência sobre a ação e eficiência dos nanomateriais. Na maioria dos casos, proteínas com alta abundância no plasma são adsorvidas na superfície e, ao longo do tempo, são substituídas por proteínas de menor concentração, mas com maior afinidade (RAHMAN et al, 2013).

Figura 8. Diagrama esquemático de nanopartículas conjugadas a transferrina e proteína corona



Seus alvos são receptores de transferrina, na presença de proteínas do soro (estruturas em verde, roxo e azul), que formam uma coroa de proteínas em torno das nanopartículas (proteína corona). Como resultado, as proteínas de transferrina (estruturas vermelhas) ficam ocultas nas nanopartículas e não conseguem se ligar aos receptores de transferrina (estruturas amarelas) localizados na membrana das células. Adaptado de: Gaspar, R., *Nanoparticles: Pushed off target with proteins*. *Nat Nanotechnol*, 2013

Estas mudanças na composição da proteína corona resultante da dessorção/adsorção são conhecidas como o “efeito Vroman”. Este efeito leva em conta que as identidades das proteínas adsorvidas podem mudar ao longo do tempo, mesmo que a quantidade total de proteína adsorvida permaneça aproximadamente constante (VROMAN, et. al., 1980).

Durante a formação inicial da proteína corona, as proteínas com as maiores taxas de associação adsorvem a um nanomaterial. Se essas proteínas tiverem tempos de permanência curtos, elas serão substituídas por outras proteínas que podem ter taxas de associação mais lentas, mas tempos de permanência mais longos. Durante a adsorção de 23 proteínas plasmáticas, o efeito Vroman pode ser dividido em estágios “iniciais” e “tardios”. O estágio inicial envolve a rápida adsorção de albumina, IgG e fibrinogênio, que são substituídos no segundo passo por apolipoproteínas e fatores de coagulação. O estágio inicial do efeito Vroman não é relacionado com todos os nanomateriais e o final desse efeito ocorre quando proteínas com afinidades

moderadas são substituídas por aquelas que possuem afinidades muito altas. (GÖPPERT & MÜLLER, 2005).

Compreender a formação da coroa de proteínas e suas consequências biológicas é fundamental para o campo da nanomedicina uma vez que as características das proteínas e das NPs tendem a mudar consideravelmente mediante as interações (FLEISCHER & PAYNE, 2014). Em particular, as proteínas tendem a sofrer mudanças conformacionais, que podem ser reversíveis ou não e tais alterações na forma e na função poderiam ter relação direta com possíveis efeitos adversos.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo visa avaliar a interação de partículas de HA carbonatada nanoestruturada sintetizadas à 37 e 90°C, com osteoblastos humanos em relação a citotoxicidade, diferenciação e produção de matriz extracelular.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar e caracterizar as HAs carbonatadas nanoestruturadas antes e após contato com meio de cultivo;
- Avaliar o potencial citotóxico das partículas de CHA nanoestruturadas, em osteoblastos linhagens de osteosarcoma humano;
- Analisar o processo de internalização celular da CHA em osteoblastos humanos e as possíveis alterações morfológicas resultantes da exposição;
- Averiguar o processo de diferenciação celular mediante a exposição dos osteoblastos às partículas de CHA sintetizadas em diferentes temperaturas;
- Avaliar a produção de matriz orgânica, através da síntese de colágeno, em osteoblastos após exposição à partículas de CHA em diferentes temperaturas de síntese;
- Analisar o perfil inflamatório apresentado pelos osteoblastos humanos por meio da produção de citocinas.

4. METODOLOGIA

Para a realização do presente estudo houve colaboração científica e acadêmica entre grupos do CBPF, INMETRO, UFRJ e Unigranrio.

4.1 PREPARAÇÃO DA HA CARBONATADA NANOESTRUTURADA

Para elaboração deste trabalho, foram sintetizadas HAs carbonatadas em 2 diferentes temperaturas de síntese (37°C, 90°C). As HAs carbonatadas nanoestruturadas foram sintetizadas através da precipitação por via úmida de soluções aquosas de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,21 mol/L; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 0,09mol/L e $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, 0,033 mol/L. A solução fosfato/carbonato foi adicionada sob fluxo de 20mL/min à solução de cálcio com condições de síntese rigorosamente controladas em pH 12 e temperatura de 37°C, e 90°C, respectivamente. Em seguida, as suspensões de CHA ficaram em agitação por 2 horas, foram lavadas e filtradas a vácuo e seco 12 horas em estufa a: 50°C para a CHA sintetizada à 37°C e à 70°C para a CHA sintetizada a 90°C. Após seco os materiais foram passados por uma peneira com poros de 75µm e uma alíquota da CHA37 foi revestida com alginato 1%. Dessa maneira a passaram a ser CHA (hidroxiapatita carbonatada), contendo 0,83% de carbonato da CHA 37 e 1,20% na CHA 90.

4.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO QUÍMICA DO BIOMATERIAL

A concentração de 5 mg/ml de CHA foi ressuspensa em água ou alternativamente em meio de cultura Dulbecco *Modified Eagle Medium* (DMEM), 10% soro fetal bovino, 1% penicilina e estreptomicina, em seguida a solução foi centrifugada e o pellet foi submetido à secagem em temperatura ambiente por 30 minutos e finalizado em estufa de secagem.

Técnicas físicas e químicas de DRX, MET, FTIR e Potencial Zeta foram utilizados para caracterizar os biomateriais produzidos antes e depois o contato com meio biológico.

4.2.1 Difração de raio X - DRX

Para verificar o grau de cristalinidade do material sintetizado foi utilizada a técnica de Difração de Raio X (DRX). As medidas são obtidas através do difratômetro SEIFERT-FPM GmbH operando com uma radiação $\text{CuK}\alpha$ (1.5418 Å) a 40 kV and 40 mA com um monocromador de grafite. Os DRXs foram comparados com os padrões

disponíveis no banco de dados ICDD (*International Center for Diffraction Data*, antigo JCPDS – *Joint Committee of Powder Diffraction Standards*) da ASTM para os vários fosfatos de cálcio.

4.2.2 Microscopia eletrônica de transmissão - MET

Para verificar o tamanho primário das nanopartículas foram realizadas micrografias de microscopia eletrônica de transmissão em grade de cobre 300 mesh. Para obtenção da caracterização morfológica ultraestrutural das dimensões das partículas, foi utilizada a técnica de microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução MET-FEG (FEG = *Field Emission Gun*) e realizada no Microscópio Eletrônico de Transmissão Jeol JEM 2100F do LabNano do CBPF.

4.2.3 Espectroscopia por energia dispersiva de raio X - EDS

Para caracterizar cada componente de um material e/ou a eventual adsorção de íons ao redor da superfície do material foi utilizada a técnica da Espectroscopia de raios X por dispersão em energia (*Energy-Dispersive X-Ray Spectroscopy*, EDS) acoplada à microscopia eletrônica de transmissão. Análises dos mapas elementares (fosforo (P-K) e cálcio (Ca-k)) foram realizados utilizando um espectrômetro *Noran Energy EDX spectrometer* acoplado ao microscópio eletrônico de transmissão (HRTEM, Microscópio Eletrônico, FEI, Holanda operado a 200 kV).

4.2.4 Infravermelho por transformada de *Fourier* - FTIR

Esta técnica é usada para identificar um composto ou investigar a composição de uma amostra desfrutando as frequências de vibração específicas devidas às ligações químicas das substâncias. A radiação do espectrofotômetro é guiada pelo interferômetro, que atua medindo os ângulos e distâncias de ondas eletromagnéticas, em seguida é gerado um gráfico que apresenta a potência da radiação em um instante através da distância. O interferograma foi gerado por um Shimadzu IR- Prestige-21/ AIM-880 operando entre 400 to 4000 cm^{-1} .

4.2.5 Potencial Zeta

Para verificar a eventual adsorção de moléculas, principalmente proteínas, foi utilizada a técnica do potencial Z, que mede a amplitude da repulsão ou da atração das cargas entre as partículas do material e o meio através da mobilidade eletroforética. A medição é feita mediante dois eletrodos que aplicam na temperatura de 25°C um

potencial elétrico a uma cubeta óptica de poliestireno de 10 mm contendo 1 mg/ml de material nanoestruturado ressuspenso em KCL 1mM e medido no ZetaSizer Nano ZS (*Malvern Instruments GmbH, Germany*).

4.3 INTERAÇÃO COM AS CÉLULAS

4.3.1 Cultura de células

Células SAOS2 (ATCC® HTB-85™) e MG63 (ATCC® CRL-1427™) foram cultivadas em meio de cultivo (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) high contendo 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina/estreptomicina) ou meio de cultivo osteogênico incompleto, ou seja, sem a presença de dexametasona, para que se pudesse mimetizar o ambiente corporal (Meio de cultivo suplementado com (Penicilina e estreptomicina 1%, ácido ascórbico 0,05mg/ml e β glicerofosfato 1 μ M). As células foram incubadas a 37°C e em atmosfera umidificada controlada contendo 5% de CO₂.

4.3.2 Exposição do material

As células foram expostas a á 50 μ g/ml de CHA 37°, CHA 37°+Alginato e CHA 90° respectivamente por 3, 7, 14 e 21 dias. As CHA foram esterilizadas em UV *overnight* e a solução de exposição é preparada por diluição em meio de cultivo completo partindo de uma solução estoque contendo 2 mg/ml de material nanoestruturado ressuspenso em meio de cultivo completo.

4.3.3 Internalização

Após terem sido expostas às partículas de HA carbonatada sintetizadas em diferentes temperaturas e tempos experimentais indicados, as células foram fixadas em uma solução de fixação de Karnovsky, pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% e 0,8% de ferrocianeto de potássio (1:1) e acetato de uranila 1%.

Para realização da técnica de MET foi realizada uma desidratação em concentrações crescentes de acetona incluídas em resina SPURR. Seções semi-finas (3 μ m) foram cortadas e coradas com azul de toluidina e examinado sob um microscópio óptico para localizar células com núcleo visível. Seções ultra-finas (70 nm) foram examinados um microscópio electrónico de transmissão - Tecnai Spirit G2 (FEI, Eindhoven, Holanda).

4.3.4 Viabilidade celular

O teste do MTT é um teste colorimétrico e foi usado para avaliar a viabilidade celular. Desidrogenases mitocondriais, presentes apenas em células metabolicamente viáveis, clivam o anel de tetrazólio, transformando-se de um composto de coloração amarela em um composto de coloração azul escuro, chamado de formazan {E, Z- 1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -1,3- diphenylformazan}, que são cristais insolúveis em soluções aquosas. Assim sendo, a produção de formazan reflete o estado funcional da cadeia respiratória.

A viabilidade das células após 1, 3, 7, 14 e 21 dias foi determinada utilizando o ensaio de brometo de MTT [3 (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5- difeniltetrazio]. Os cristais de formazan púrpura foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO), transferidos numa placa de 96 poços (100 µL / poço) e a absorbância foi registrada num leitor de microplacas a um comprimento de onda de 570 nm com subtração do branco a 690 nm.

4.3.5 Ensaio de diferenciação (Fosfatase alcalina) e mineralização (vermelho de alizarina)

Os osteoblastos foram plaqueadas em placas de 24 poços (50 000 células por poço em triplicata), durante 3,7,14, 21 dias e cultivadas com meio de cultivo DMEM HIGH GLUCOSE. No caso do uso de osteoblastos primários e MG63 o meio foi enriquecido com ácido ascórbico na concentração de 50 µg/mL (SIGMA A8960 (≥95%) e β - glicerofosfato na concentração de 10mM (SIGMA-ALDRICH Código: G9422) para promover a indução in vitro da via osteogênica (Meio osteogênico incompleto)). Nestas condições as células foram tratadas com 50 µg/mL de CHAs a cada 7 dias. O experimento foi realizado em triplicata. Após o período de exposição, as células foram lavadas com tampão fosfato salino (PBS) 0,01M e fixadas com paraformaldeído (PFA) 4%.

4.3.5.1 Ensaio de diferenciação: marcação citoquímica com fosfatase alcalina

Para analisar a atividade de fosfatase alcalina, as células foram incubadas com o kit para marcação da atividade da enzima fosfatase alcalina (SIGMA-ALDRICH Código 85L3R-1R), durante 30 minutos, protegido da luz segundo as instruções do fabricante.

As análises foram realizadas no microscópio óptico invertido, na qual as células positivas para atividade da enzima fosfatase alcalina (ALP) aparecem coloridas.

4.3.5.2 Ensaio de mineralização: marcação com vermelho de alizarina

As células foram lavadas com PBS 0,01M e coradas com 10 mg/ ml vermelho de alizarina (SIGMA-ALDRICH Código A5533) diluída em água e incubada durante 30 minutos. Ao término desta incubação, as células foram lavadas por 3 vezes com PBS 0,01M. As células coradas em vermelho foram visualizadas em microscópio óptico invertido (Nikon Eclipse TS100), utilizando o programa de fotos (*Leica Applications Suites – LAS EZ*).

4.3.6 Imunofluorescência

Para avaliar a produção de colágeno foi realizada uma tripla marcação para colágeno, faloidina e núcleo utilizando a técnica da imunofluorescência. Lâminas preparadas com osteoblastos humanos MG63 expostas a concentração de NPs de 50 µg/ml foram incubadas a noite toda à 4°C com um anticorpo primário anti-colágeno humano feito em camundongo (Sigma- Aldrich cód. SAB1402151) e após disso 1 hora a temperatura ambiente com um anticorpo secundário *Goat Anti-Mouse* conjugado Alexa Fluor® 488 (Thermo fisher, cód. A-21042). Em seguida foi realizada uma incubação de 30 com faloidina conjugada com Alexa Fluor® 568 (Thermo Fisher A12380) e as lâminas foram seladas com uma resina contendo DAPI e analisadas no microscópio de fluorescência.

4.3.7 Análise das citocinas

Foi utilizado o kit Bio-Plex Pro™ para análise de citocinas da Bio-Rad, seguindo seu protocolo. Uma solução com esferas magnéticas é depositada em uma placa de 96 poços, acoplada a uma base magnética. O meio condicionado com as células expostas à CHA foi adicionado à solução com

a presença das esferas magnéticas, que possuem anticorpos para o reconhecimento das variadas citocinas. A incubação com as esferas magnéticas foi realizada por 12 horas (de um dia para o outro). Em seguida, o sobrenadante foi descartado, e adicionado um anticorpo secundário ligado à uma solução fluorescente e a absorbância lida por espectrofotometria para especificar as citocinas presentes na amostra, avaliando seu perfil pró inflamatório.

4.3.8 Medição da produção de colágeno por meio da hidroxiprolina

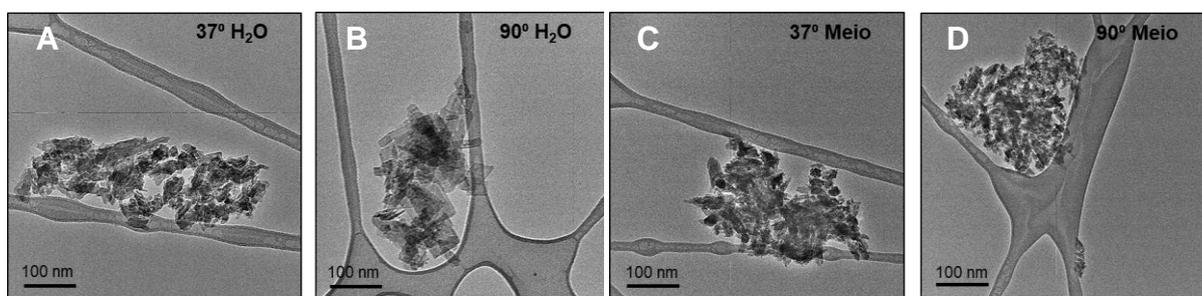
A hidroxiprolina é um aminoácido não essencial que contribui para estabilizar a tríplice hélice do tropocolágeno. A concentração de hidroxiprolina é uma medida direta da síntese do colágeno é determinada pela reação de oxidação da hidroxiprolina com o *4-(Dimethylamino) Benzaldehyde* (DMAB), gerando uma reação colorimétrica, cuja absorvância é medida a (560 nm). A avaliação dos resultados é realizada medindo as absorvâncias, que serão proporcionais à quantidade de hidroxiprolina presente e conseqüentemente o colágeno.

5. RESULTADOS

5.1 ANÁLISE DAS PARTÍCULAS NANOESTRUTURADAS DE CARBOAPATITAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Os tamanhos primários das partículas foram analisados pela técnica do MET. As micrografias eletrônicas de transmissão apresentam um padrão predominante hexagonal e alongado conforme pode ser observado na **Figura 9**. Além disso, o tamanho primário das partículas é diretamente proporcional a elevação da temperatura de síntese, confirmando os resultados anteriores do grupo do CBPF (DOS ANJOS et al., 2019).

Figura 9. Micrografia eletrônica de transmissão

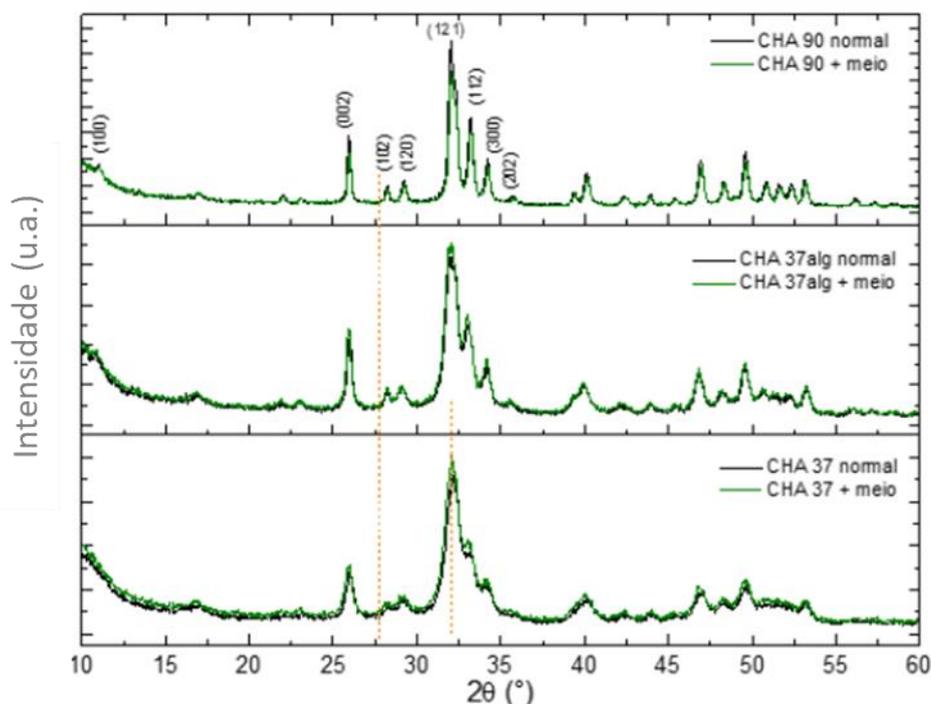


(A e C) Partículas agregadas de CHA 37°C e **(B e D)** partículas agregadas de CHA 90°C com e sem presença de meio respectivamente.

5.2 ANÁLISE DO PADRÃO DE CRISTALINIDADE DAS CHA POR DIFRAÇÃO DE RAIOS X - DRX

Para avaliar a cristalinidade das amostras foi utilizada a técnica do DRX. A análise de DRX (**Figura 10**) mostrou que a HA carbonatada sintetizada a alta temperatura (90°C) apresenta uma maior cristalinidade quando comparada com a sintetizada em temperatura menor (37°C). Além disso, a presença de meio de cultivo não influencia a cristalinidade como demonstrado da perfeita sobreposição dos gráficos gerado por cada CHA em ausência ou em presença de meio de cultivo.

Figura 10. Difração de raios X

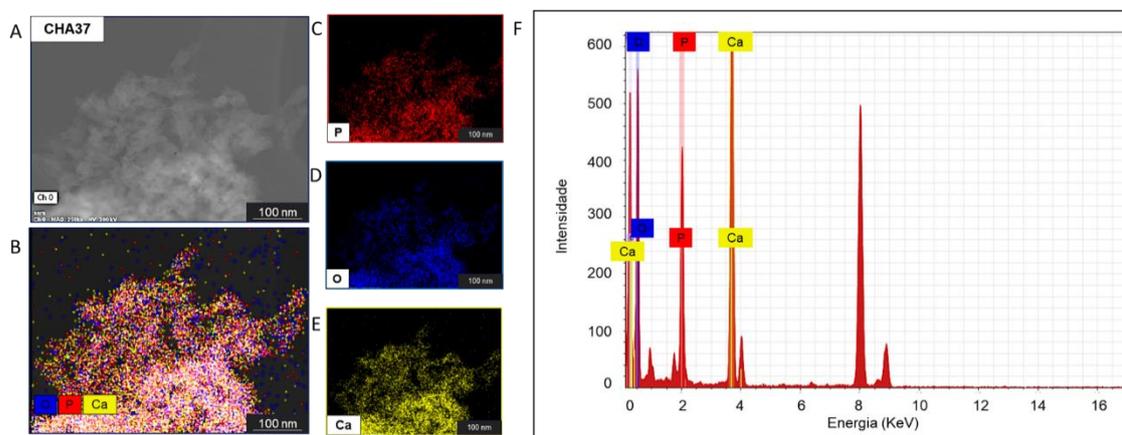


Observa-se o padrão de cristalinidade das amostras nas condições de HA carbonatada, sintetizada a 90°C, 37°C e 37°C com alginato, na ausência (linha preta) e presença (linha verde) de meio de cultivo. A CHA 90 apresenta picos mais estreitos e altos demonstrando maior cristalinidade.

5.3 VERIFICAÇÃO DOS ELEMENTOS QUÍMICOS DA CHA POR ESPECTROSCOPIA POR ENERGIA DISPERSIVA DE RAIOS X - EDS

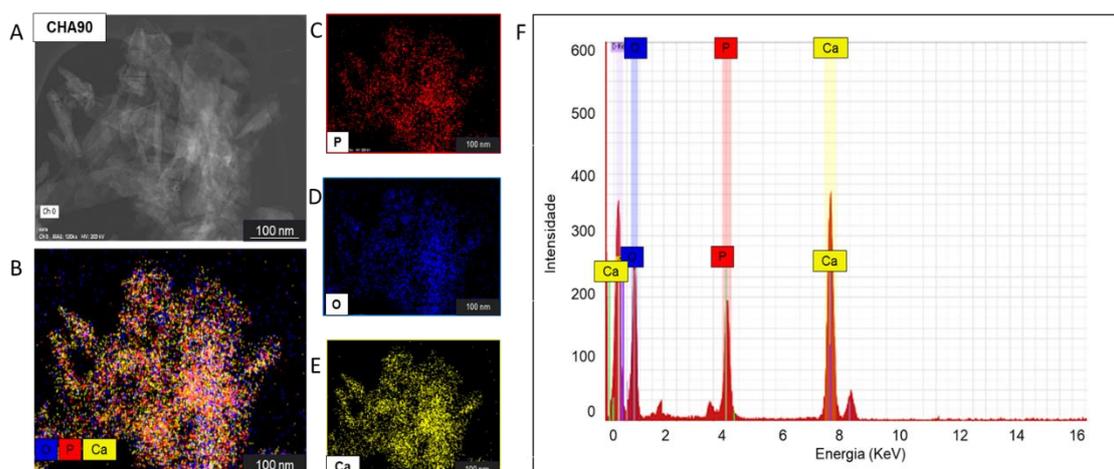
A análise de EDS mostra que tanto na CHA sintetizada à 37°C (**Figura 11**) quanto na sintetizada à 90°C (**Figura 12**), os elementos químicos encontrados são característicos do material pesquisado, entretanto a presença de carbono não pode ser analisada por espectroscopia, uma vez que é um dos materiais utilizados para possibilitar a visualização, estando impregnado nas grades de microscopia eletrônica de transmissão, de modo que não seria possível então afirmar que esse material é proveniente da amostra.

Figura 11. Análise de STEM/EDS em amostra de CHA37°C



(A) Imagem mostrando STEM em campo escuro, correspondendo aos elementos obtidos. (B) Presença de elementos químicos em sobreposição na amostra de CHA 37°C. (C) STEM/EDS mostrando os pontos representativos da presença de fósforo (vermelho). (D) STEM/EDS mostrando os pontos representativos da presença de oxigênio (azul). (E) STEM/EDS mostrando os pontos representativos da presença de cálcio (amarelo). (F) Gráfico representando a intensidade de cada um dos elementos químicos da amostra.

Figura 12. Análise de STEM/EDS em amostra de CHA 90°C



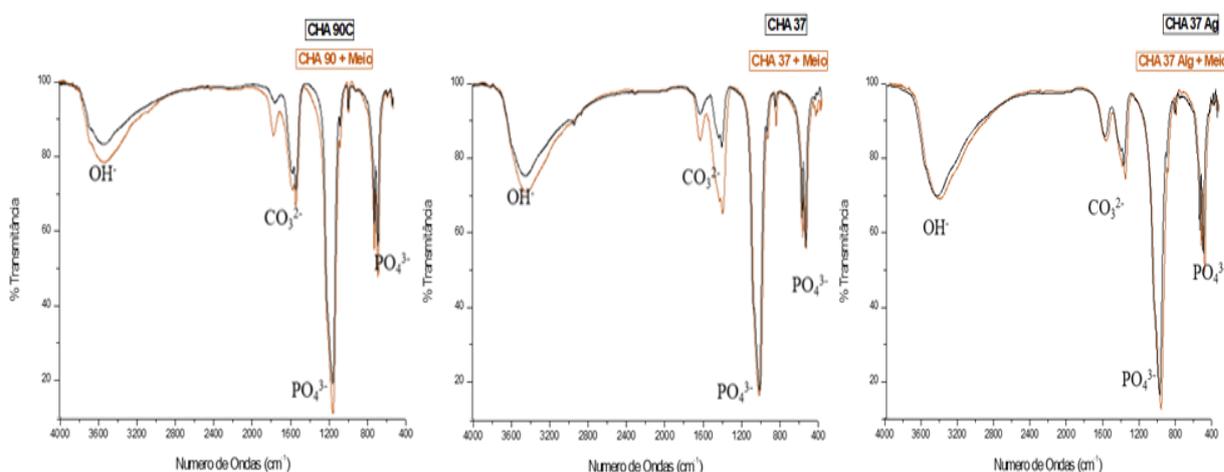
(A) Imagem mostrando STEM em campo escuro, correspondendo aos elementos obtidos. (B) Presença de elementos químicos em sobreposição na amostra de CHA 90°C. (C) STEM/EDS mostrando os pontos representativos da presença de fósforo (vermelho). (D) STEM/EDS mostrando os pontos representativos da presença de oxigênio (azul). (E) STEM/EDS mostrando os pontos representativos da presença de cálcio (amarelo). (F) Gráfico representando a intensidade de cada um dos elementos químicos da amostra.

5.4 ANÁLISE DA PRESENÇA DOS GRUPOS FUNCIONAIS DA CHA

A caracterização das partículas nanoestruturadas de HA carbonatada foi realizada mediante a análise FTIR (**Figura 13**). Foram identificados picos característicos da HA e bandas de absorção do CO_3 , onde também ocorre sobreposição das bandas representativas da presença do alginato na região de 1500 a 2000 cm^{-1} , além das bandas características de uma HA em torno de 1000 e 500 cm^{-1} , devido à presença de

grupos PO_4 , confirmando que o material é HA. Particularmente, o espectro FTIR da, CHA 37°C e CHA 90°C demonstra que todas as amostras são constituídas pela HA carbonatada, com as bandas típicas de cálcio fosfato a $1107\text{--}1038\text{ cm}^{-1}$ ($\nu_3 \text{PO}_4$), 962 cm^{-1} ($\nu_1 \text{PO}_4$), $601\text{--}560\text{ cm}^{-1}$ ($\nu_4 \text{PO}_4$) e $1453\text{--}1420\text{ cm}^{-1}$ ($\nu_3 \text{CO}_3$) e 875 cm^{-1} ($\nu_2 \text{CO}_3$), características da HA carbonatada do tipo B. Além disso, o espectro da CHA 90°C apresenta uma banda adicional em posição 3570 cm^{-1} (ν_s), atribuído ao grupo hidroxila, e picos mais fracos das bandas da água comparados em outras moléculas por causa da menor absorção das moléculas de água. Contudo, se observa que na presença de meio de cultura os picos apresentam algum distanciamento, possivelmente devido a sua complexidade de constituição e grande caráter proteico.

Figura 13. Resultados FTIR comparativo entre três condições de CHA

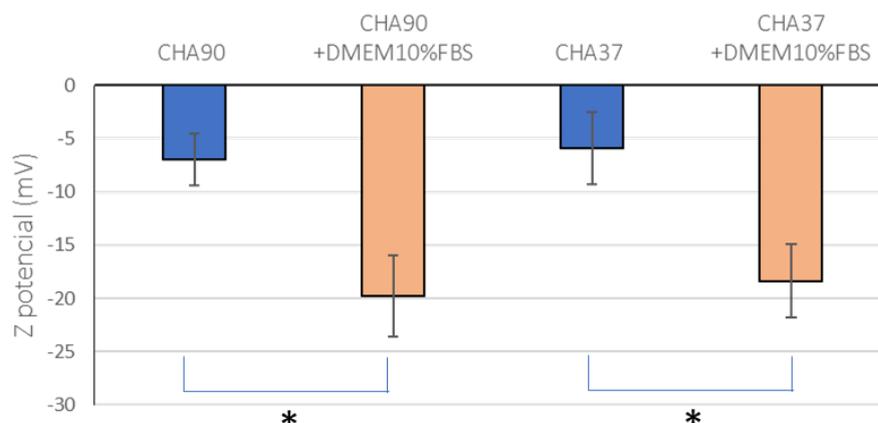


Os picos demonstram os elementos químicos componentes da amostra. **(A)** Sobreposição dos gráficos de CHA sintetizada à 90°C na presença e na ausência de meio de cultivo. **(B)** Sobreposição dos gráficos de CHA sintetizada à 37°C na presença e na ausência de meio de cultivo. **(C)** Sobreposição dos gráficos de CHA sintetizada à 37°C + alginato na presença e na ausência de meio de cultivo. Não observa-se nenhuma diferença no comportamentos das amostras na presença do meio de cultivo.

5.5 ANÁLISE DA CARGA SUPERFICIAL DAS PARTÍCULAS DE CHA

O Potencial Zeta mede a amplitude de atração e repulsão das cargas da superfície **(Figura 14)**. A CHA apresenta carga superficial negativa, bem como as proteínas do meio. Na presença de meio de cultura observa-se a diminuição da carga superficial, de modo que há adsorção, provavelmente proteínas componentes do SFB que suplementaram o meio de cultivo.

Figura 14. Carga superficial das CHA sintetizadas à 90°C e 37°C

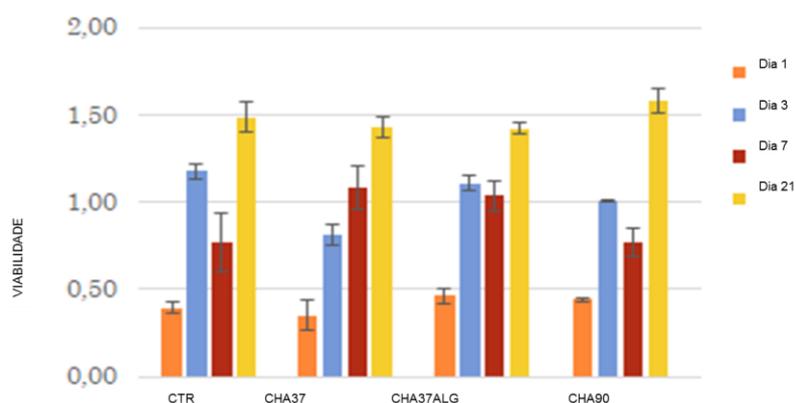


O gráfico representa as cargas superficiais das partículas de CHA sintetizadas à 90 e 37°C, na presença (laranja) e na ausência (azul) de meio de cultivo suplementado com soro fetal bovino. Na presença do meio suplementado observa-se aumento das cargas negativas. *P<0.05 vs CTR.

5.6 ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR

Para a análise da viabilidade celular após as células terem sido expostas ao biomaterial, foi realizado o ensaio de MTT. O gráfico (**Figura 14**) mostra que todas as células parecem estar viáveis sem diferença significativa das amostras entre elas e com o controle, sendo a diferença apresentada correspondente ao tempo de cultivo e consequentemente o número de células.

Figura 15. Viabilidade dos osteoblastos após exposição à CHA

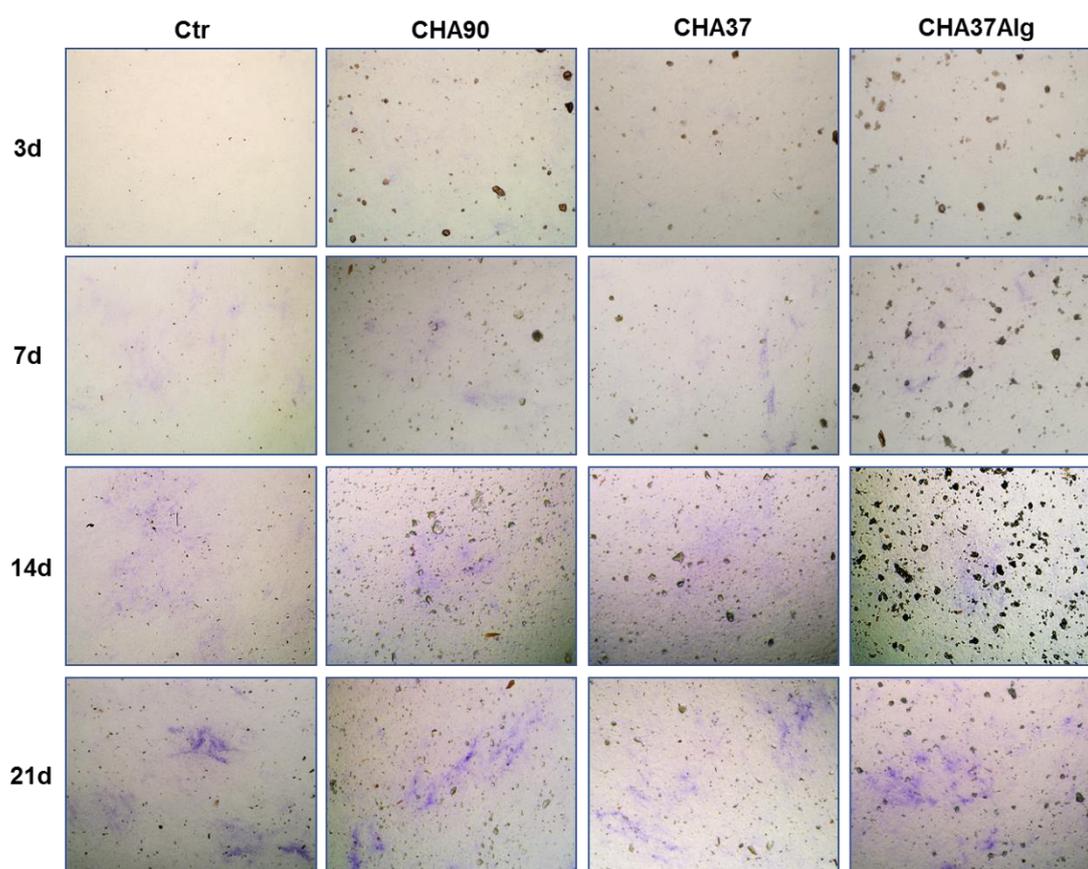


A viabilidade celular foi avaliada por meio do ensaio de MTT, após a exposição dos osteoblastos ao longo dos dias de cultivo às partículas de CHA37, CHA 37ALG ou CHA90. 1 dia (laranja), 3 dias (azul), 7 dias (vermelho) e 21 dias (amarelo). Não se observa nenhuma alteração da viabilidade ao longo dos dias de exposição.

5.7 ANÁLISE DA DIFERENCIAÇÃO OSTEOBLÁSTICA

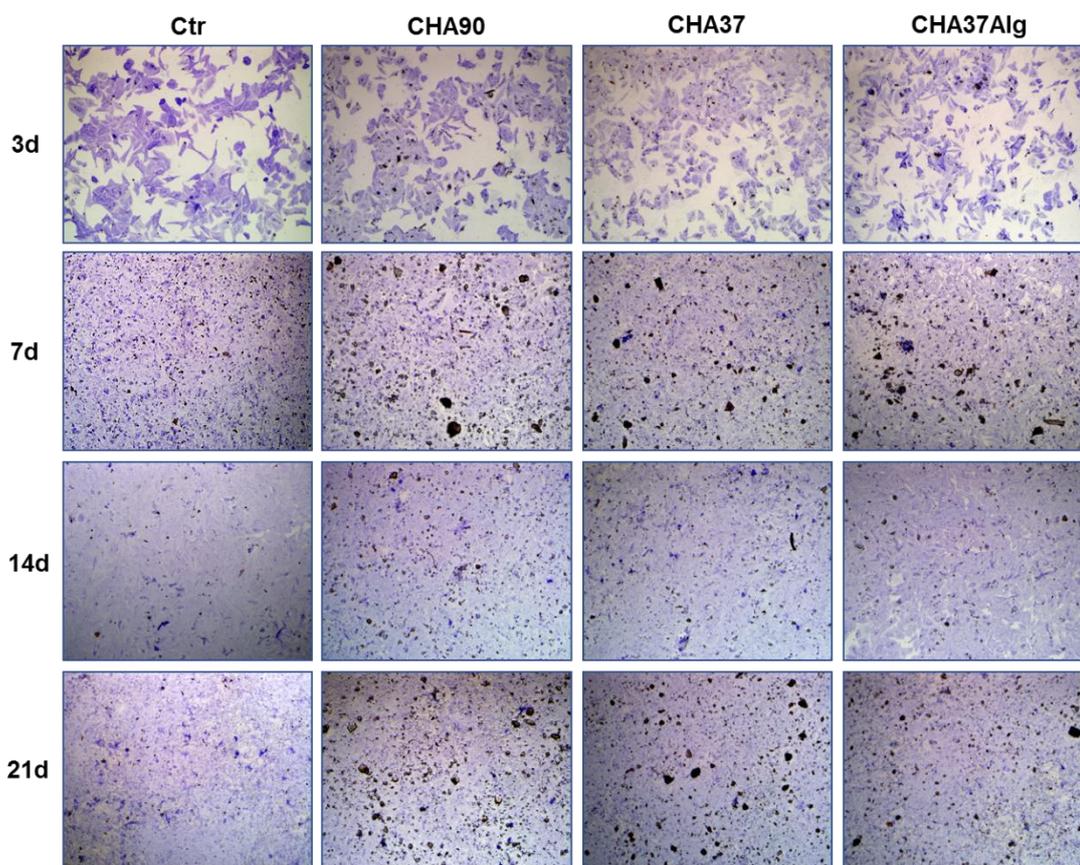
O ensaio de fosfatase alcalina foi realizado tanto com pré-osteoblastos (MG63) (Figura 16) cultivados em meio osteogênico incompleto quanto com osteoblastos maduros (SAOS2) (Figura 17) cultivados em meio normal. Todas as amostras foram expostas a 50 µg/ml de cada CHA em quatro tempos (3,7,14,21 dias). Os resultados não revelaram diferenças na marcação azulada de ambas as células durante o mesmo tempo de exposição as diferentes CHAs, sugerindo que a exposição das células à HA carbonatada não interfere na diferenciação celular.

Figura 16. Diferenciação osteoblástica



Ensaio enzimático de fosfatase alcalina em pré osteoblastos (MG63) cultivados em meio osteogênico e expostos a quatro condições: controle, CHA 90, CHA 37 e CHA 37ALG, ao longo de 21 dias de cultivo. A presença de CHA não influencia a diferenciação osteoblástica.

Figura 17. Maturação osteoblástica

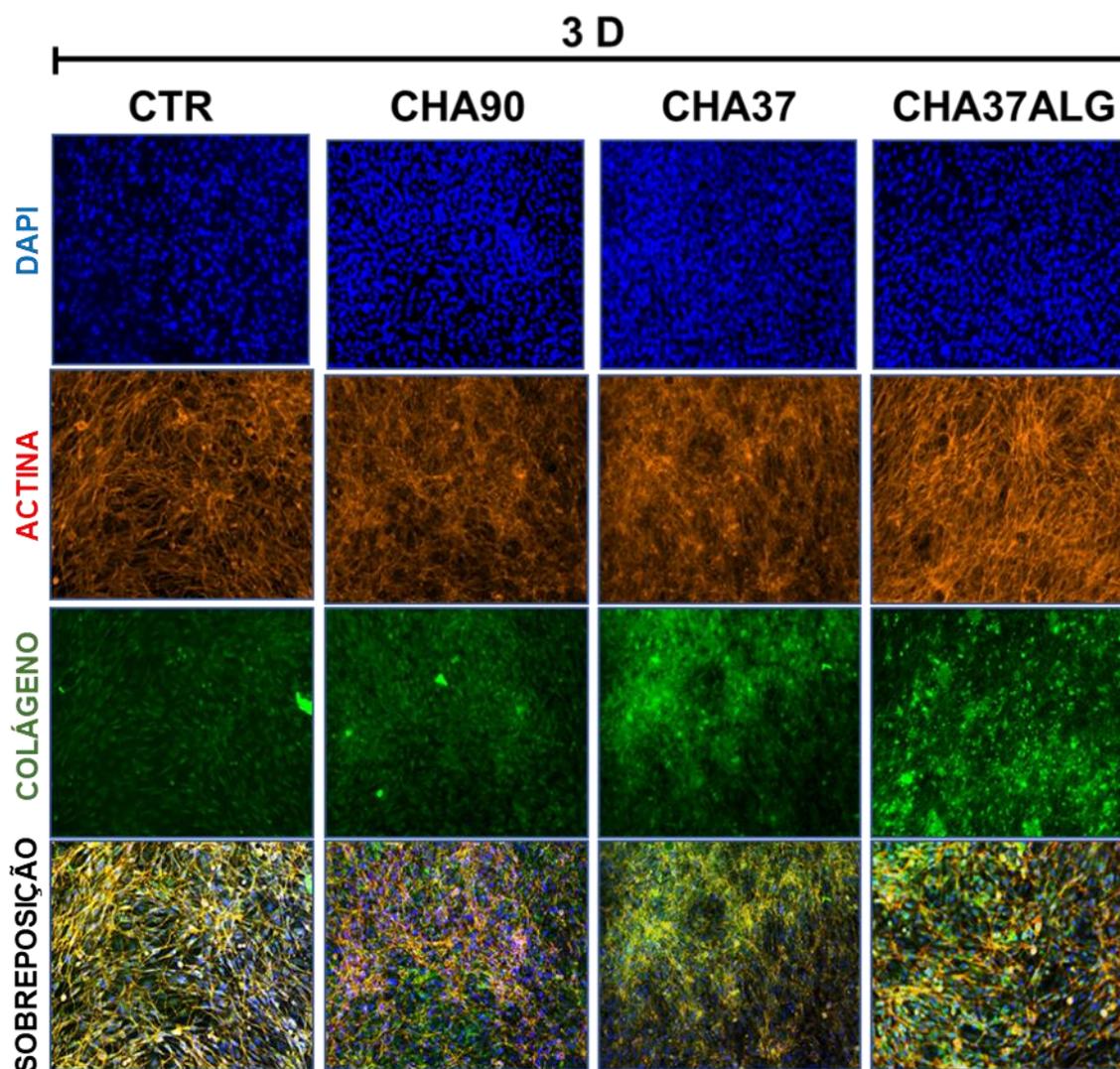


Ensaio enzimático de fosfatase alcalina em osteoblastos (SAOS2), *in vitro*, em quatro condições: controle, CHA 90, CHA 37 e CHA 37ALG, ao longo de 21 dias de cultivo. A presença de CHA não influencia o estágio de maturação osteoblástica.

5.8 AVALIAÇÃO QUALITATIVA DA PRODUÇÃO DE COLÁGENO

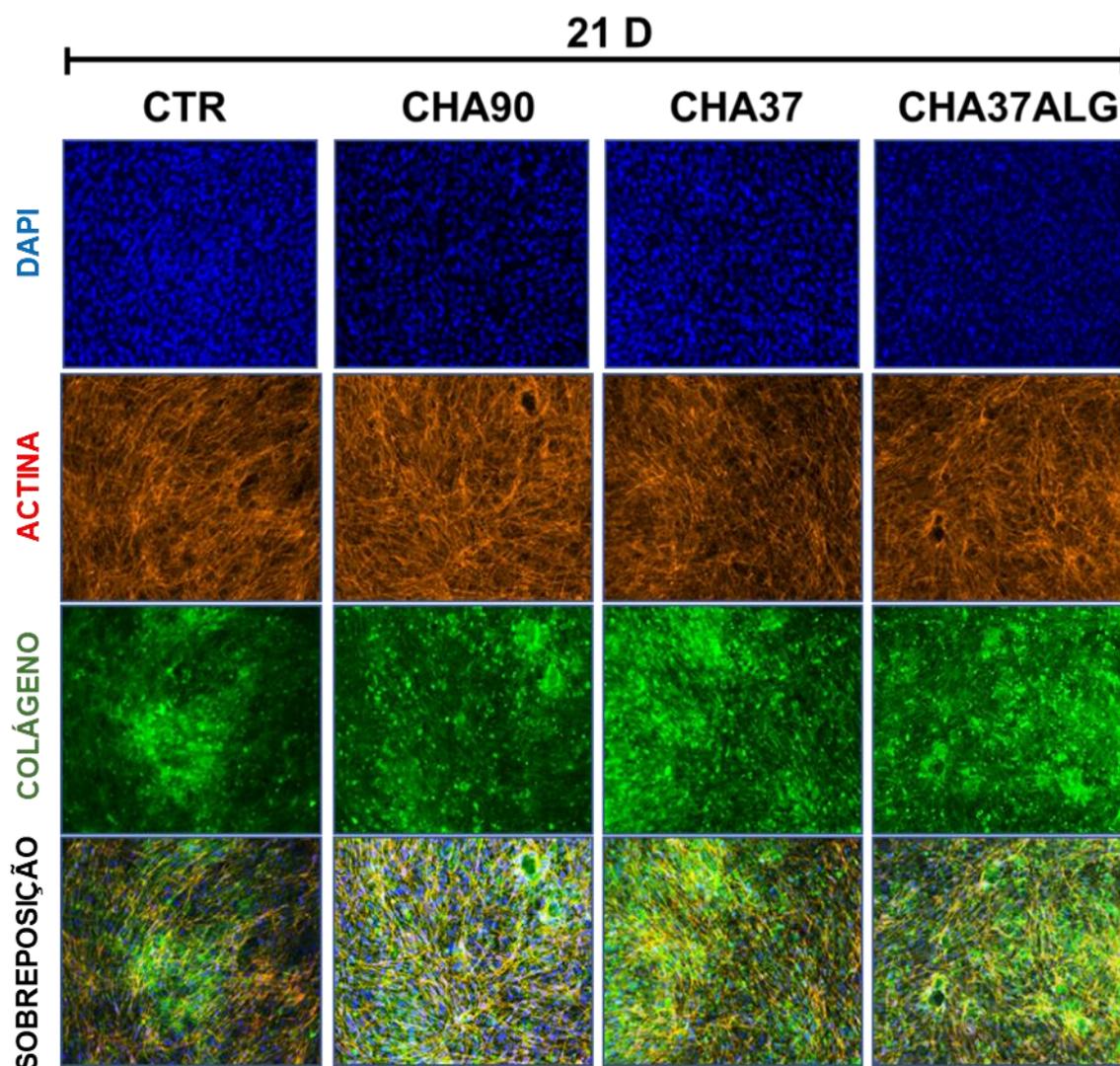
Para verificar a produção de matriz extracelular e a interferência do biomaterial (CHA) com os ensaios comuns de mineralização utilizando a marcação de vermelho de alizarina foram utilizados ensaios de imunofluorescência com marcação tripla para colágeno, citoesqueleto e núcleo. As células (MG63) foram expostas em dois tempos experimentais aos diferentes biomateriais. Foram utilizados três tipos de marcação, sendo elas para observação do núcleo (DAPI), do citoesqueleto (F-actina) e do colágeno (Ab-anti-colágeno). Nos resultados encontrados, pode-se observar uma maior expressão e colágeno nas amostras de células expostas à CHA sintetizadas a 37°C com e sem encobrimento com alginato, tanto após 3 dias (**Figura 18**), quanto após 21 dias (**Figura 19**) de exposição. Contudo, sendo a marcação para imunofluorescência uma medida quantitativa será realizada mais análises utilizando ensaios quantitativos para medição do colágeno com o método da hidroxiprolina.

Figura 18. Avaliação do colágeno após 3 dias de cultivo



Análise da matriz extracelular de colágeno por imunomarcção nos pré osteoblastos após exposição às partículas de CHA, após 3 dias *in vitro*. Observa-se que a CHA 37 e CHA 37 ALG apresentaram marcação mais intensa do colágeno. Núcleos (DAPI, em azul), microfilamentos de actina (F-actina, em vermelho) e colágeno (em verde).

Figura 19. Avaliação do colágeno após 21 dias de cultivo

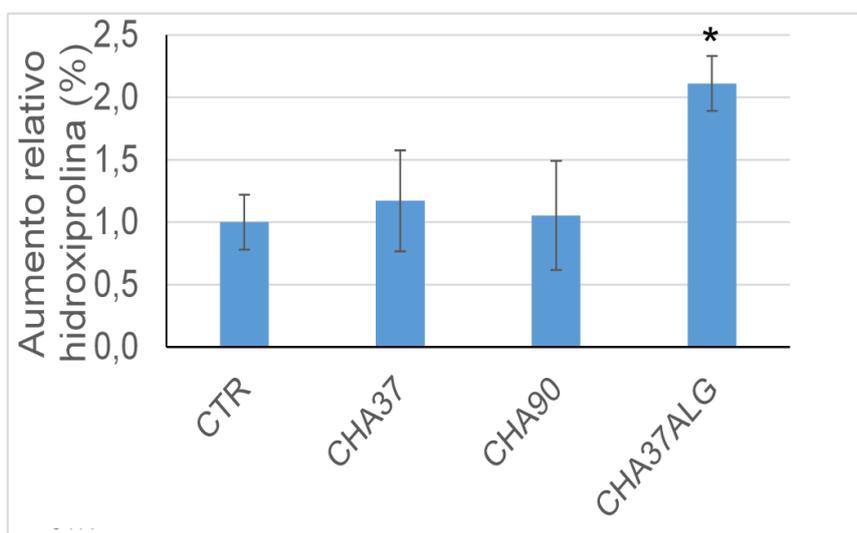


Análise da matriz extracelular de colágeno por imunomarcação nos pré osteoblastos após exposição às partículas de CHA, após 21 dias *in vitro*. Observa-se que a CHA 37 e CHA 37 ALG apresentaram marcação mais intensa do colágeno. Núcleos (DAPI, em azul), microfilamentos de actina (F-actina, em vermelho) e colágeno (em verde).

5.9 AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DA PRODUÇÃO DE COLÁGENO

Para verificar se a presença do carbonato HA influenciava o potencial de síntese de colágeno dos osteoblastos, foi realizado o ensaio de hidroxiprolina, que um aminoácido essencial exclusivo do colágeno. Foi possível observar o aumento significativo da síntese nas amostras em que as células foram expostas à CHA sintetizada à 37°C e revestida com alginato (**Figura 20**).

Figura 20. Avaliação da hidroxiprolina

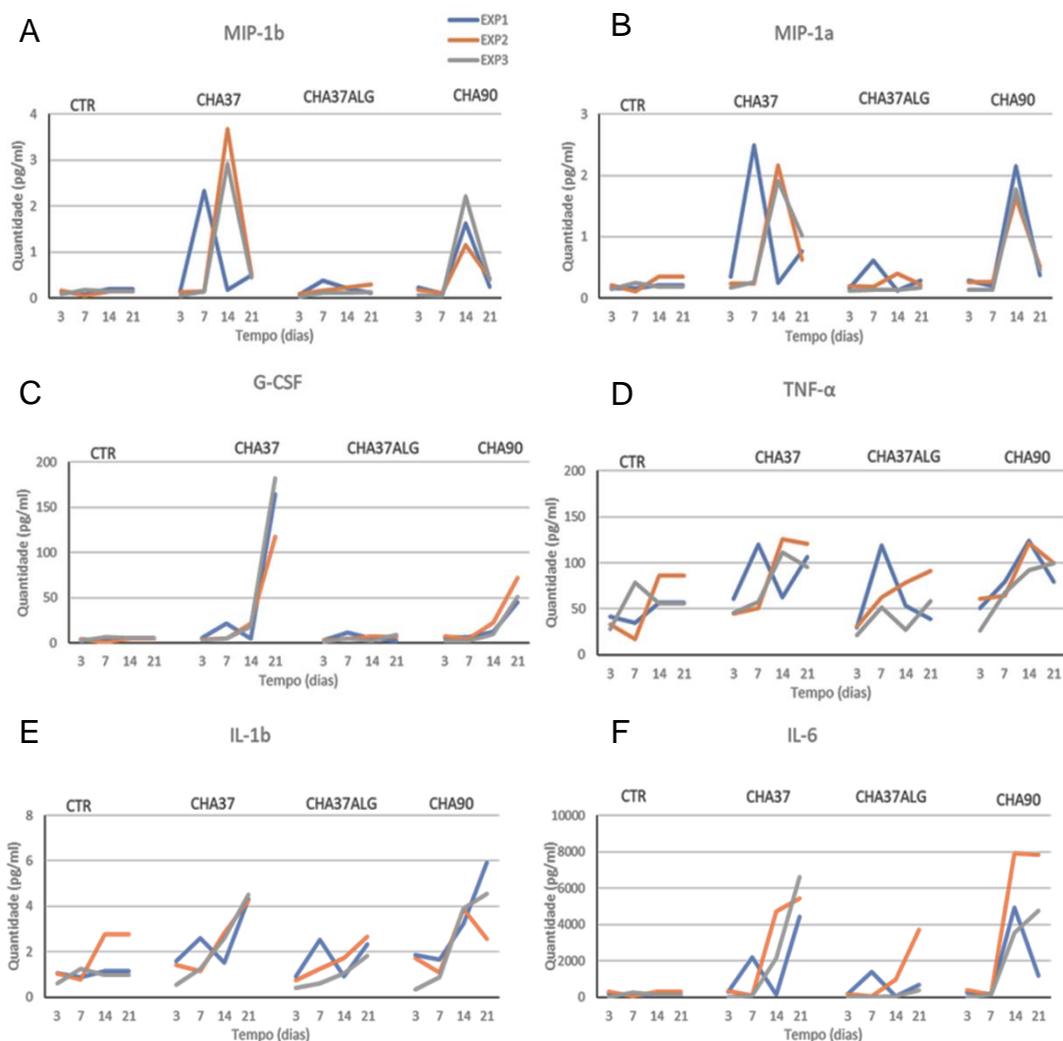


Análise da produção de colágeno por meio da avaliação de hidroxiprolina em pré osteoblastos *in vitro* após 14 dias de exposição as partículas de CHA 37, CHA 90 ou CHA 37 ALG. As células expostas à CHA37 ALG apresentaram maior produção de colágeno.

5.10 ANÁLISE DO PERFIL INFLAMATÓRIO APÓS EXPOSIÇÃO À CHA

Foram selecionadas as principais citocinas de interesse para análise do perfil inflamatório, a análise foi realizada a partir do sobrenadante das amostras, constituído prioritariamente de meio de cultivo suplementados, após a exposição do biomaterial. Os resultados demonstraram clareza que a amostra referente à CHA 37 ALG demonstra menos picos sugerindo menor perfil de mediação inflamatória (**Figura 21**).

Figura 21. Avaliação do perfil inflamatório

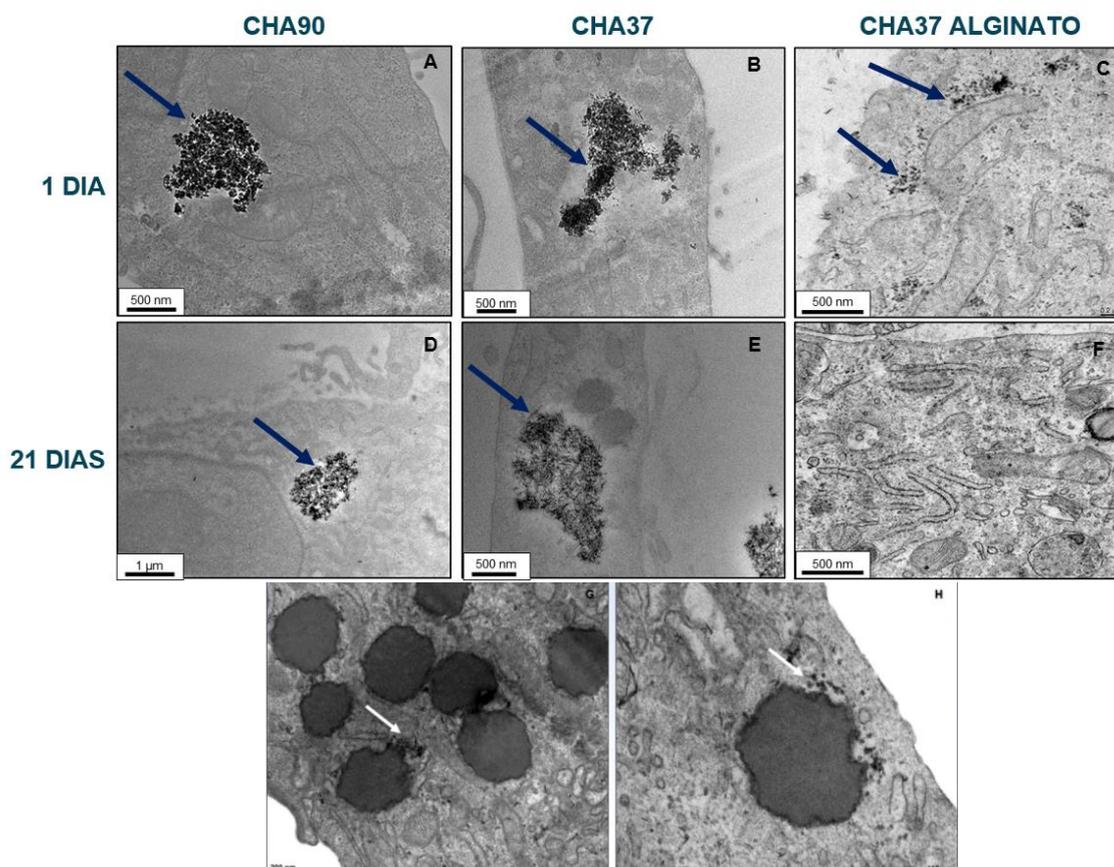


Os gráficos mostram os níveis das citocinas nos pré osteoblastos (MG63), nas diferentes condições ao longos de 21 dias de cultivo e representativos de três experimentos (EXP 1 azul) (EXP 2 laranja) (EXP 3 cinza): **(A)** MIP-1b, **(B)** MIP-1a **(C)** G-CSF **(D)** TNF- α **(E)** IL-1b e **(F)** IL-6. A CHA 37 ALG apresentou menor potencial inflamatório.

5.11 AVALIAÇÃO DA INTERNALIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS DE CHA POR OSTEÓBLASTOS

Após a exposição as CHA 37 ou CHA 90 por 24 horas e 21 dias (**Figura 22**), os osteoblastos humanos foram analisados por meio de microscopia eletrônica de transmissão, objetivando verificar a internalização das partículas e a morfologia celular, esclarecendo de a presença do biomaterial influenciava de alguma maneira nas características físicas e funcionais das células e se o comportamento se mantinha em tempos diferentes de exposição.

Figura 22. Internalização das partículas de CHA por pré osteoblastos



Eletromicrografia dos pré osteoblastos **(A)** CHA 90 após 1 dia de exposição. **(B)** CHA 37 após 1 dia de exposição. **(C)** CHA 37 ALG após 1 dia de exposição. **(D)** CHA 90 após 21 dias de exposição. **(E)** CHA 37 após 21 dias de exposição. **(F)** CHA 37 ALG após 21 dias de exposição. Observa-se internalização das partículas de CHA em todas as condições já a partir do primeiro dia de exposição. **(G e H)** CHA 37ALG após 1 dia de exposição borda eletro densa e presença de lisossomos.

6. DISCUSSÃO

No presente estudo foi analisada a influência das temperaturas de síntese da HA carbonatada nanoestruturada no potencial bioestimulador, bem como sua capacidade de interação com osteoblastos humanos, células responsáveis pela produção de matriz mineralizada óssea, que possuem etapas de diferenciação bem demarcadas e apresentam um papel crucial no que diz respeito ao dinamismo do tecido ósseo.

Este estudo se baseou na comparação da HA mineral com a óssea. A HA óssea não é estequiométrica, sendo deficiente em cálcio em até 10%. O balanço das cargas pode ser obtido pela ausência de grupos hidroxilas (OH) ou alternativamente pela presença do ânion hidrogeno fosfato (HPO_4^{2-}) no lugar do PO_4^{3-} . O cálcio pode também ser substituído, principalmente por cátions de magnésio, sódio e estrôncio. A hidroxila pode ser substituída por ânions como carbonato, ortofosfato, fluoreto ou cloreto. A análise química do osso apresenta composição de 4 a 6% de carbonato, 0,9% de citrato, 0,5% de magnésio, 0,7% de sódio e traços de flúor, cloro, potássio, estrôncio e outros íons metálicos (SRIVASTAV et al., 2019).

A composição da HA depende fortemente de vários parâmetros de síntese e principalmente o método de síntese escolhido. De fato, a HA pode ser sintetizada por diferentes métodos: aquoso, seco e hidrotermal, entretanto o método aquoso realizado por precipitação de via úmida possui vantagens significativas em relação aos outros, pois além de possuir baixo custo operacional, também possibilita a obtenção de um material mais homogêneo. Embora outras técnicas sejam capazes de produzir um material com melhor cristalinidade e tamanho, essas não são capazes de atender ao objetivo da pesquisa, pois necessitam elevar o material a uma temperatura extremamente alta, o que, ao nosso ver, não reproduziria as características da HA sintetizada pelo organismo com 37°C (ROCHA et al., 2012). Sabidamente durante sua síntese, quando tratado com temperatura superior a 800°C, esse material torna-se cerâmico e não absorvível ao longo do tempo, portanto pode permanecer no organismo por anos, o que pode limitar seu uso na prática clínica, pois na maioria das aplicações como substituto ósseo a biodegradação e substituição do material por novo tecido é altamente desejável (BITTENCOURT et al., 2014).

Quando sintetizada a elevadas temperaturas, as CHAs apresentam reabsorção relativamente lenta, o que é desvantajoso para o mecanismo de remodelação óssea no local do implante, necessária para uma boa funcionalidade do tecido neoformado, de

modo que o desenvolvimento de biomateriais com elevada nanocristalinidade, preparada sem o tratamento à alta temperatura, tem sido mais interessante na a prática clínica.

A utilização da CHA nanostruturada associada a outros materiais para tem sido uma promissora alternativa. Com estrutura composta por mais de um tipo de substrato, que mimetizam o tecido ósseo natural e favorecem a osteogênese acompanhada de uma degradação gradativa, compatível com a regeneração óssea. Além disso, esses materiais oferecem maior área de superfície, alta reatividade da superfície, ligação interfacial relativamente forte, *design* flexível, e propriedades mecânicas melhoradas. (VALENZUELA et al., 2012).

Para correlacionar os resultados biológicos com o tipo de material sintetizado e se o meio de cultivo celular influenciaria no comportamento do material as CHAs foram caracterizadas pelas suas propriedades físico-químicas através de técnicas bem estabelecidas, confirmando a qualidade da síntese e demonstrando que o material apresentava diferente tamanho e cristalinidade, sendo diretamente proporcional ao aumento da temperatura. Além disso, uma alíquota da CHA37°C foi revestida com alginato, um biopolímero que mimetiza as fases mineral e orgânica do tecido ósseo natural, amplamente utilizado na prática clínica odontológica.

Moreira e colaboradores relatam que a temperatura de síntese tem influência direta nos cristais de HA, logo quanto menor a temperatura, menor a cristalinidade (MOREIRA et al., 2007). Os resultados obtidos no presente estudo puderam confirmar os dados encontrados na literatura, pois observa-se na técnica de DRX que comparativamente, CHA 90 apresenta picos mais estreitos e altos significativos de uma maior cristalinidade e nas micrografias uma imagem com perfil mais demarcado e melhor definição nas amostras, apresentando maior tamanho da partícula primária, quando comparada a sintetizada à 37°C, o que demonstra uma relação direta entre a temperatura de síntese, o tamanho da partícula primária e sua cristalinidade.

O efeito da substituição de cátions e ânions na HA depende do tamanho iônico e da fração a ser substituída, os efeitos sobre os parâmetros de rede são diferentes em cada substituição perturbando o arranjo cristalino perfeito dos íons, dependendo do grupo alterado e das posições que ocupam na estrutura (MOREIRA et al., 2007).

Os substitutos de carbonatos divalentes, fosfatos trivalentes ou hidroxilas monovalentes possuem necessidade de compensação das cargas desequilibradas na estrutura do biomaterial. Podendo levar não só a modificação da estequiometria do

composto, mas também ao favorecimento da incorporação de outras impurezas na rede cristalina. Como no caso da carbonatação da HA, que implica em íons CO_3^{2-} maiores, substituindo os íons OH^- menores, o que tem como consequências uma expansão do eixo “a” e uma contração do eixo “c”. Essa substituição é denominada carbonatação tipo A, formando CHAs do tipo A. Já a substituição do tipo B, ocorre no sítio do fosfato e tem um efeito oposto. Essas mudanças nos parâmetros da rede cristalina induzem alterações na cristalinidade, estabilidade térmica, morfologia, solubilidade e outras propriedades físico-químicas e biológicas do material (ROCHA et al., 2012).

Mediante a análise de FTIR foi confirmada a presença do grupo carbonato incorporado à estrutura, o que confirma que a carbonatação do tipo beta foi realizada com sucesso e ao avaliar a sobreposição dos gráficos podemos concluir que tanto na presença, quanto na ausência do meio de cultivo, as CHAs apresentam as mesmas características.

Segundo Anselme, 2016, a interação do biomaterial com os osteoblastos poderiam ser um desafio, como o envolvimento de muitos e simultâneos parâmetros, os quais alguns não podem ser completamente controlados, uma vez que a presença do meio de cultivo poderia influenciar no comportamento da CHA inviabilizando ou mascarando o estudo não permitindo claro entendimento sobre a criação de um ambiente biomimético (RIBEIRO et al., 2016). Portanto, a fim de caracterizar a influência do meio de cultivo em contato com as HAs carbonatadas, a caracterização físico-química foi repetida em presença de meio de cultivo conforme mencionado anteriormente, nesse estudo a maioria dos resultados mostrou que, apesar do contato com o meio de cultivo não influenciou na cristalinidade nem no tamanho do cristal, de fato houve uma adsorção de moléculas do meio na superfície das CHAs, como indicativo do aumento da carga superficial negativa encontrada nas análises de potencial Z após suplementação do meio de cultivo.

De fato, o tipo de proteínas que são adsorvidas na superfície da CHA poderia ser influenciado pelas diferenças de cristalinidade devido à temperatura de síntese. Este achado está sendo objeto de estudos mais aprofundados de parte do grupo já que a proteína corona que se forma em volta de um material não é estática e sim dinâmica e seria de fundamental importância definir se existem diferenças e quais são, entre as *hard corona* formadas pelas moléculas do meio de cultivo em volta das partículas (RIBEIRO et al., 2016).

Reconhecimento, adesão e espraiamento da célula serão iniciados a partir dos primeiros contatos célula/material e a qualidade desse primeiro contato, será decisiva para a capacidade proliferativa e de diferenciação dessas células em contato com o enxerto. Por meio das análises realizadas a HA carbonatada sintetizadas em ambas as temperaturas não interferiu no tempo e padrão de diferenciação das células estudadas (MEDINA-CRUZ et al., 2020).

Para ser empregado na engenharia de tecidos dentro dos organismos vivos, o material deve possuir baixa citotoxicidade; propriedades mecânicas semelhantes ao tecido originalmente substituído; porosidade que permita a neovascularização e colonização de novas células; baixa imunogenicidade; bioatividade e biodegradabilidade. As CHAs sintetizadas por via úmida demonstraram um material biomimético e que apresenta baixa ou nenhuma citotoxicidade, sendo internalizadas pelos osteoblastos humanos e não interferindo nas suas atividades metabólicas normais.

Isso confirma os achados na literatura que indicam o baixo potencial citotóxico das HAs devido provavelmente ao seu conteúdo iônico (cálcio, potássio, magnésio, sódio, etc.) comum com aquilo encontrado nos tecidos.

A proteína corona desenvolve uma interface inicial entre o material e a célula que sofre alterações dinâmicas conforme tráfego de partículas para dentro das células e dependendo das características físico-químicas das nanopartículas e do ambiente biológico, proteínas seletivas permanecerão ligadas à partícula e é provável que essa camada de proteína seja o que as células “veem” e “sentem” (RIBEIRO et al., 2016).

Recentemente Xu e colaboradores mostraram a formação de um bio-complexo (íons e proteínas) como resultado da ligação seletiva de íons e proteínas da cultura de células às nanopartículas de CuO e ZnO, demonstrando que o nível de complexidade nessa biointerface é maior (XU et al., 2012).

Dados do grupo sobre a identificação de proteínas corona apoiam a noção de que sua formação pode ter resultados ambivalentes, pois pode contribuir para o enriquecimento iônico e ao mesmo tempo levar a respostas das células ósseas. Este bio-complexo funciona como um efeito de cavalo de Tróia, facilitando a internalização das nanopartículas, uma vez que o cálcio é um regulador chave de várias funções celulares, enquanto os grupos fosfato/cálcio amorfo pode prender várias biomoléculas. De fato, P e Ca são íons minerais que desempenham um papel crítico nos processos de biomineralização das células ósseas.

A fim de identificar se as partículas nanoestruturadas de HA eram internalizadas pelos osteoblastos humanos após o cocultivo, analisamos as imagens obtidas pela microscopia eletrônica de transmissão e foi possível notar que as CHAs são internalizadas independente do tempo de exposição, entretanto as células expostas à CHA 37 ALG apresentaram estruturas semelhantes à vacúolos tanto com 1 quanto com 21 dias de exposição, porém após os 21 dias, não conseguimos encontrar quantidade significativa de partículas no interior da célula, o que pode sugerir que as partículas foram utilizadas pelo aparato celular para aumentar a síntese de matriz orgânica. Como ainda não se pode responder qual o caminho percorrido por essas partículas até o interior da célula, bem como seus mecanismos de internalização, o grupo já estuda estratégias para mapear o tráfego intracelular e esclarecer as vias de internalização.

Para verificar o potencial bioestimulador foi realizada a análise de diferenciação celular pela fosfatase alcalina, interessantemente a análise citoquímica não parece indicar alterações na diferenciação celular, embora os osteoblastos assumam um comportamento de alto desempenho na síntese de matriz orgânica.

Contudo esta análise citoquímica não apresenta grande sensibilidade por ser uma análise de moléculas superficiais e não de fato um marcador da totalidade da proteína ativa presente nas células. Serão, portanto, realizadas análises posteriores por absorvância para confirmar este dado.

Devido a semelhança na composição da CHA com a HA espontaneamente produzida pela célula em condições osteogênicas, não foi possível realizar ensaios de mineralização sem interferência do material com o próprio ensaio. Portanto para verificar o potencial bioestimulador foi avaliada a produção de matriz orgânica, pela síntese do colágeno do tipo I. Geralmente os cristais de HA se dispõem longo as fibras de colágeno para formar a estrutura óssea. Fibrilas de Colágeno I e cristais de HA são responsáveis pela flexibilidade e resistência do osso, respectivamente.

Os resultados obtidos com a técnica da imunofluorescência mostraram que a síntese de colágeno é estimulada em seguida a exposição das células a CHA 37^aC e 37^oC com encobrimento de alginato. Contudo, esta técnica não é quantitativa, portanto, para confirmar estes resultados foi necessário analisar a presença de um aminoácido presente no colágeno, a hidroxiprolina.

A molécula de colágeno é composta basicamente por uma sequência repetida de três aminoácidos (Gly-X-Y), em que Gly é o aminoácido glicina; X, quase sempre é prolina e Y, hidroxiprolina ou hidroxilisina. Em geral, o colágeno contém cerca de 30%

de glicina, 12% de prolina, 11% de alanina, 10% de hidroxiprolina e 1% de hidroxilisina (VISTA e LAU, 2011).

A hidroxiprolina é o aminoácido responsável da estabilidade do colágeno na matriz extracelular, portanto este ensaio permite não apenas a quantificação do colágeno presente, mas também a avaliação das moléculas de colágeno que já formaram a tríplice hélice, e, portanto, são estruturas funcionais já depositadas e organizadas na matriz extracelular. Confirmando os resultados da imunofluorescência o colágeno sintetizado pelos osteoblastos após a exposição à CHA resultou ser significativamente mais abundante quando comparado ao controle e as temperaturas de síntese tiveram importante participação na indução da produção de matriz orgânica, sendo a CHA 37 maior indutora dessa produção e em especial a CHA 37 revestida com alginato.

O mecanismo de reparo ósseo depende fortemente da resolução da fase inflamatória para nova deposição de tecido ósseo. Na fase de intervenção dos osteoblastos para a deposição de matriz a fase inflamatória deve ter sido resolvida e, portanto, o material não deverá induzir estas células a produção de citocinas pró-inflamatórias, para não comprometer o resultado do reparo. A produção de várias citocinas pró-inflamatórias em seguida a exposição dos osteoblastos aos materiais foi avaliada (CAPPARIELLO et al., 2014).

MIP-1a é uma proteína envolvida no estado inflamatório agudo na ativação e recrutamento de leucócitos polimorfonucleares. Estudos mostraram também que, assim como o RANK, RANKL e OPG, a MIP-1a está envolvida na diferenciação e ativação dos osteoclastos (PAULA-SILVA et al., 2020).

No que diz respeito ao estímulo e crescimento de precursores de neutrófilos, bem como na regulação da sobrevivência de neutrófilos maduros, através da inibição da apoptose, destaca-se G-CSF uma importante proteína pró-inflamatória (ALVES et al., 2016).

A citocina IL-1b está relacionada a atividade dos osteoclastos maduros, a diferenciação e o crescimento das células precursoras dos osteoclastos, todavia a IL-1b é mais ativa na reabsorção óssea, além de estimular a expressão de RANKL (PAULA-SILVA et al., 2020).

IL-6 atua como pró-inflamatória, secretada por células T e macrófagos para estimular a resposta imune, sendo também produzida por osteoblastos após o estímulo de alguns hormônios como o paratormônio (PTH) por exemplo. Além disso é capaz de

induzir a formação de osteoclastos pela indução à reabsorção óssea (MARTÍN et al., 2020).

De acordo com a literatura o TNF- α refere-se a um grupo de citocinas capaz de provocar a morte de células tumorais que possuem uma vasta gama de ações pró-inflamatórias. Ele age na maturação e diferenciação dos osteoclastos, promovendo a erosão óssea, atuando em conjunto com o RANKL, IL-1 e IL-6 (ANDRÉ BARRIÈRE et al., 2019).

Com base no ensaio realizado para a análise de citocinas presentes no sobrenadante das amostras, foi possível observar que a CHA37 revestida com alginato apresenta menor perfil inflamatório quando comparada a CHA90 e CHA37 sem recobrimento com alginato, ainda vale ressaltar que CHA37 revestida com alginato demonstra um papel fundamental na estimulação da produção óssea, pois sabidamente essas citocinas são também responsáveis por uma excessiva estimulação na produção dos osteoclastos e da consequente reabsorção óssea, de modo que na presença do biomaterial, em especial a CHA 37ALG, o tecido ósseo assume um comportamento bem estabelecido demonstrando maior suscetibilidade ao sucesso dos implantes, devido à melhora das características de osteointegração.

Estes achados podem ser corroborados com a temperatura de síntese da CHA37°C ser mais parecida com a temperatura de síntese do organismo humano e, portanto, levar a uma CHA nanoestruturada que melhor mimetiza aquele presente em vivo. Além disso, a presença do alginato melhora estas características, provavelmente devido à ductilidade deste material que pode ser modificado através de reações químicas e físicas para obter derivados com várias estruturas.

O mecanismo de reparação óssea é um fenômeno dinâmico e complexo que requer compreensão dos principais fatores que interferem na maneira das células ósseas interagirem com o ambiente em que estão inseridas. Em condições em que não haja intervenção essa reparação pode ser auto resolutiva, porém culminando em defeitos ou até mesmo lesões recentes ou tardias, dessa maneira, a bioengenharia tecidual desempenha importante papel na elaboração de materiais que possam auxiliar ou substituir a recuperação de tecidos orgânicos.

A CHA sintetizada à 37°C revestida com alginato demonstrou ser superior às demais no que diz respeito ao potencial bioestimulador, devido à ausência de citotoxicidade apesar da massiva internalização, à maior produção de colágeno e o menor perfil inflamatório, o que é de grande valia para a medicina regenerativa que

vêm utilizando a bioengenharia tecidual como uma poderosa ferramenta que contribui para o aumento da qualidade de vida e um maciço impacto na sua vida financeira e estabilidade psicológica quando se trata da boa qualidade e baixo índice de rejeição de implante ou prótese.

7. CONCLUSÃO

- Observamos que a síntese e a caracterização da hidroxiapatita foram satisfatórias mediante a avaliação dos dados obtidos pelas análises físicoquímicas;
- Após as células terem sido expostas às partículas de hidroxiapatita foi possível observar por meio da técnica de MTT que não houve dano citotóxico, dessa maneira pode-se dizer que o biomaterial não interage com as células a ponto de toxicidade;
- A diferenciação celular não foi afetada após a exposição das células MG63 ao biomaterial nos diferentes tempos durante, bem como os osteoblastos humanos já diferenciados SAOS2 também não apresentaram alteração no programa de diferenciação;
- Resultados mostraram a internalização das partículas CHA nos osteoblastos humanos MG63, entretanto a via de internalização ainda não está esclarecida. Porém, observa-se que as células expostas à CHA 37 ALG apresentaram lisossomas quando vistas na MET demonstrando um processo de internalização diferenciado;
- A produção de colágeno nas células expostas à CHA 37°C, com e sem alginato, está aumentada, indicando um potencial bioestimulador, pelo menos *in vitro*;
- Células exposta à CHA 37°C revestida com alginato, apresentam menor perfil inflamatório, como observado após a análise de um painel de citocinas pró inflamatórias. Esse menor potencial inflamatório poderia resultar, *in vivo*, na melhora no processo de osteointegração.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, Endrigo G.L. et al. **Estudo comparativo da diferenciação osteogênica das células tronco mesenquimais da medula óssea e do tecido adiposo de cães adultos**. Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 36, n. suppl 1, p. 21–32, 2016.

AMINI, Ami R. e LAURENCIN, Cato T. e NUKAVARAPU, Syam P. **Bone tissue engineering: Recent advances and challenges**. Critical Reviews in Biomedical Engineering, v. 40, n. 5, p. 363–408, 2012.

ANDRÉ BARRIÈRE, David et al. **Dichotomic effects of clinically used drugs on tumor growth, bone remodeling and pain management**. Scientific Reports, v. 9, n. 1, p. 59781, 2019.

BASTAN, Faith Erdem. **Fabrication and characterization of an electrostatically bonded PEEK- hydroxyapatite composites for biomedical applications**. 2020.

BITTENCOURT, Rafael Cotias e CASTRO-SILVA, Igor Iuco e PAULO, Anderson De Oliveira. **Revista Odonto Ciência collagen-based bone substitute material**. v. 29, n. 1, p. 6–13, 2014.

CALASANS- MAIA, Monica Diuana et al. **Avaliação clínica de compósito constituídos por fosfato de cálcio nanoestruturado e biopolímero associado à células osteoprogenitoras como alternativa à biocerâmica para a uso na rede SUS na regeneração óssea**. Comun. ciênc. saúde, v. 28, n. 1, p. 79–84, 2017. Disponível em: <<http://pt>>.

CAPPARIELLO, Alfredo et al. **The Great Beauty of the osteoclast**. Archives of Biochemistry and Biophysics, v. 558, p. 70–78, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2014.06.017>>.

CLARKE, Bart. **Normal Bone Anatomy and Physiology**. p. 131–139, 2008.

COSTA, A C F M et al. **HA : Obtenção , caracterização e aplicações**. v. 3, p. 29–38, 2009.

COSTA, T C. **AVALIAÇÃO DA INTERFACE OSSO-IMPLANTE EM SUPERFÍCIES DE Ti6Al4V E DO AÇO ISO 5832-9 TRATADAS ELETROQUIMICAMENTE**. 2013. 1689–1699 f. 2013.

DOS ANJOS, Suzana et al. **Impact of crystallinity and crystal size of nanostructured carbonated hydroxyapatite on pre-osteoblast in vitro biocompatibility**. Journal of Biomedical Materials Research - Part A, v. 107, n. 9, p. 1965–1976, 2019.

GEMINI-PIPERNI, Sara et al. **Cellular behavior as a dynamic field for exploring bone bioengineering: A closer look at cell-biomaterial interface**. Archives of Biochemistry and Biophysics, v. 561, n. July, p. 88–98, 2014.

HE, Xin e BARKAN, Ariel L. **Growth hormone therapy in adults with growth hormone deficiency: a critical assessment of the literature**. Pituitary, n. 0123456789, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11102-020-01031-5>>.

HOLZAPFEL, Boris Michael et al. **How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view**. Advanced Drug Delivery Reviews, v. 65, n. 4, p. 581–603, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2012.07.009>>.

HUESA, Carmen et al. **NIH Public Access**. v. 48, n. 5, p. 1066–1074, 2012.

II, Donald A Glass e KARSENTY, Gerard. **Minireview : In Vivo Analysis of Wnt Signaling in Bone**. v. 148, n. 6, p. 2630–2634, 2007.

JEONG, Hyo et al. **Biochemical and Biophysical Research Communications IL-17 promotes osteoblast differentiation , bone regeneration , and remodeling in mice**. Biochemical and Biophysical Research Communications, n. xxxx, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.02.054>>.

JUE, Erik e YAMANISHI, Cameron D e WU, Benjamin M. **Accepted Preprint Accepted Preprint**. p. 1–28, 2014.

KARAGEORGIU, Vassilis e KAPLAN, David. **Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis**. Biomaterials, v. 26, n. 27, p. 5474–5491, 2005.

MARTÍN, Eduardo et al. **Primary cilia mediate parathyroid hormone receptor type 1 osteogenic actions in osteocytes and osteoblasts via Gli activation**. n. July 2019, p. 1–14, 2020.

MEDINA-CRUZ, David et al. **Expert Opinion on Drug Delivery Green nanotechnology-based drug delivery systems for osteogenic disorders**. Expert Opinion on Drug Delivery, v. 00, n. 00, p. 1–16, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/17425247.2020.1727441>>.

MOREIRA, E.L. et al. **Análise por difração de raio-x de uma HA carbonatada usando o método de Rietveld**. Matéria (Rio de Janeiro), v. 12, n. 3, p. 494–502, 2007.

MÜLLER, Werner E.G. e SCHRÖDER, Heinz C. e WANG, Xiaohong. **Inorganic Polyphosphates As Storage for and Generator of Metabolic Energy in the Extracellular Matrix**. Chemical Reviews, v. 119, n. 24, p. 12337–12374, 2019.

PAULA-SILVA, Francisco Wanderley Garcia et al. **Effects of 5-lipoxygenase gene**

disruption on inflammation, osteoclastogenesis and bone resorption in polymicrobial apical periodontitis. Archives of Oral Biology, v. 112, n. January, p. 104670, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2020.104670>>.

PERCIVAL, Christopher J e RICHTSMEIER, Joan T. **Intramembranous ossification.** v. 242, n. 8, p. 909–922, 2014.

PIRES, Ana Luiza R. e BIERHALZ, Andréa C.K. e MORAES, Ângela M. **Biomateriais: Tipos, aplicações e mercado.** Quimica Nova, v. 38, n. 7, p. 957–971, 2015.

POOLE, Kenneth E S et al. **Sclerostin is a delayed secreted product of osteocytes that inhibits bone formation.** v. 18, p. 1–18, 2005.

PORFIRIO, ELISÂNGELA e FANARO, GUSTAVO BERNARDES. **Suplementação com colágeno como terapia complementar na prevenção e tratamento de osteoporose e osteoartrite : uma revisão sistemática.** Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia, v. 19, n. 1, p. 153–164, 2016.

PROBST, Florian Andreas et al. **Bone regeneration of minipig mandibular defect by adipose derived mesenchymal stem cells seeded tri-calcium phosphate-poly(D,L-lactide-co-glycolide) scaffolds.** Scientific Reports, v. 10, n. 1, p. 2062, 2020. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41598-020-59038-8>>.

RIBEIRO, A. R. et al. **Trojan-Like Internalization of Anatase Titanium Dioxide Nanoparticles by Human Osteoblast Cells.** Scientific Reports, v. 6, n. October 2015, p. 1–11, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/srep23615>>.

RIGO, Eliana Cristina da Silva. **Síntese E Caracterização De HA Obtida a Partir Da Casca De Ovo De Avestruz.** p. 88, 2011. Disponível em: <http://propemm.vi.ifes.edu.br/wp-content/uploads/2012/05/Síntese-e-caracterização-de-HA-obtida-a-partir-da-casca-de-ovo-de-avestruz_Lorena-Batista.pdf>.

ROCHA, Daniel Navarro Da e SILVA, Marcelo Henrique Prado Da e GOBBO, Luciano de Andrade. **Produção de HA parcialmente substituída com nióbio.** p. 11–17, 2012.

ROLIAN, Campbell. **Endochondral ossification and the evolution of limb proportions.** n. October 2019, p. 1–22, 2020.

ROLIM, Ana Emília H. et al. **Chitosan scaffolds - Physico - Chemical and biological properties for bone repair.** Revista Virtual de Quimica, v. 10, n. 2, p. 211–228, 2018.

ROOT, Sierra H et al. **Perivascular osteoprogenitors are associated with trans-**

cortical channels of long bones. n. October 2019, p. 1–17, 2020.

SRIVASTAV, Ashu et al. **Biomimetic Hydroxyapatite a Potential Universal Nanocarrier for Cellular Internalization & Drug Delivery.** *Pharmaceutical Research*, v. 36, n. 4, 2019.

TAKARADA, Takeshi et al. **Genetic analysis of Runx2 function during intramembranous ossification.** *Development (Cambridge)*, v. 143, n. 2, p. 211–218, 2016.

TARDELLI, Juliana Dias Corpa e VALENTE, Mariana Lima da Costa e DOS REIS, Andréa Cândido. **Influência da topografia de superfície nanométrica na estabilidade primária de mini-implantes dentários.** *Revista de Odontologia da UNESP*, v. 48, p. 1–8, 2019.

TORTORA, 2016. **tortora.** *Journal of Chemical Information and Modeling*. [S.l.: s.n.], 2016

VISTA, Evan S. e LAU, Chak S. **What about supplements for osteoarthritis? A critical and evidenced-based review.** *International Journal of Rheumatic Diseases*, v. 14, n. 2, p. 152–158, 2011.

XU, Mingsheng et al. **Formation of nano-bio-complex as nanomaterials dispersed in a biological solution for understanding nanobiological interactions.** *Scientific Reports*, v. 2, p. 1–6, 2012.

YOSHIKO, Yuji et al. **Osteoblast Autonomous P i Regulation via Pit1 Plays a Role in Bone Mineralization** □. v. 27, n. 12, p. 4465–4474, 2007.

YUNOKI, S. et al. **Control of pore structure and mechanical property in hydroxyapatite/collagen composite using unidirectional ice growth.** *Materials Letters*, v. 60, n. 8, p. 999–1002, 2006.

ALVES, Endrigo G.L. et al. **Estudo comparativo da diferenciação osteogênica das células tronco mesenquimais da medula óssea e do tecido adiposo de cães adultos.** *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 36, n. suppl 1, p. 21–32, 2016.

AMINI, Ami R. e LAURENCIN, Cato T. e NUKAVARAPU, Syam P. **Bone tissue engineering: Recent advances and challenges.** *Critical Reviews in Biomedical Engineering*, v. 40, n. 5, p. 363–408, 2012.

ANDRÉ BARRIÈRE, David et al. **Dichotomic effects of clinically used drugs on tumor growth, bone remodeling and pain management.** *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 59781, 2019.

BASTAN, Faith Erdem. **Fabrication and characterization of an electrostatically**

bonded PEEK- hydroxyapatite composites for biomedical applications. 2020.

BITTENCOURT, Rafael Cotias e CASTRO-SILVA, Igor Iuco e PAULO, Anderson De Oliveira. **Revista Odonto Ciência collagen-based bone substitute material.** v. 29, n. 1, p. 6–13, 2014.

CALASANS- MAIA, Monica Diuana et al. **Avaliação clínica de compósito constituídos por fosfato de cálcio nanoestruturado e biopolímero associado à células osteoprogenitoras como alternativa à biocerâmica para a uso na rede SUS na regeneração óssea.** Comun. ciênc. saúde, v. 28, n. 1, p. 79–84, 2017. Disponível em: <<http://pt>>.

CAPPARIELLO, Alfredo et al. **The Great Beauty of the osteoclast.** Archives of Biochemistry and Biophysics, v. 558, p. 70–78, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2014.06.017>>.

CLARKE, Bart. **Normal Bone Anatomy and Physiology.** p. 131–139, 2008.

COSTA, A C F M et al. **HA : Obtenção , caracterização e aplicações.** v. 3, p. 29–38, 2009.

COSTA, T C. **AVALIAÇÃO DA INTERFACE OSSO-IMPLANTE EM SUPERFÍCIES DE Ti6Al4V E DO AÇO ISO 5832-9 TRATADAS ELETROQUIMICAMENTE.** 2013. 1689–1699 f. 2013.

DOS ANJOS, Suzana et al. **Impact of crystallinity and crystal size of nanostructured carbonated hydroxyapatite on pre-osteoblast in vitro biocompatibility.** Journal of Biomedical Materials Research - Part A, v. 107, n. 9, p. 1965–1976, 2019.

GEMINI-PIPERNI, Sara et al. **Cellular behavior as a dynamic field for exploring bone bioengineering: A closer look at cell-biomaterial interface.** Archives of Biochemistry and Biophysics, v. 561, n. July, p. 88–98, 2014.

HE, Xin e BARKAN, Ariel L. **Growth hormone therapy in adults with growth hormone deficiency: a critical assessment of the literature.** Pituitary, n. 0123456789, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11102-020-01031-5>>.

HOLZAPFEL, Boris Michael et al. **How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view.** Advanced Drug Delivery Reviews, v. 65, n. 4, p. 581–603, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2012.07.009>>.

HUESA, Carmen et al. **NIH Public Access.** v. 48, n. 5, p. 1066–1074, 2012.

II, Donald A Glass e KARSENTY, Gerard. **Minireview : In Vivo Analysis of Wnt**

Signaling in Bone. v. 148, n. 6, p. 2630–2634, 2007.

JEONG, Hyo et al. **Biochemical and Biophysical Research Communications IL-17 promotes osteoblast differentiation , bone regeneration , and remodeling in mice.** Biochemical and Biophysical Research Communications, n. xxxx, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.02.054>>.

JUE, Erik e YAMANISHI, Cameron D e WU, Benjamin M. **Accepted Preprint Accepted Preprint.** p. 1–28, 2014.

KARAGEORGIU, Vassilis e KAPLAN, David. **Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis.** Biomaterials, v. 26, n. 27, p. 5474–5491, 2005.

MARTÍN, Eduardo et al. **Primary cilia mediate parathyroid hormone receptor type 1 osteogenic actions in osteocytes and osteoblasts via Gli activation.** n. July 2019, p. 1–14, 2020.

MEDINA-CRUZ, David et al. **Expert Opinion on Drug Delivery Green nanotechnology-based drug delivery systems for osteogenic disorders.** Expert Opinion on Drug Delivery, v. 00, n. 00, p. 1–16, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/17425247.2020.1727441>>.

MOREIRA, E.L. et al. **Análise por difração de raio-x de uma HA carbonatada usando o método de Rietveld.** Matéria (Rio de Janeiro), v. 12, n. 3, p. 494–502, 2007.

MÜLLER, Werner E.G. e SCHRÖDER, Heinz C. e WANG, Xiaohong. **Inorganic Polyphosphates As Storage for and Generator of Metabolic Energy in the Extracellular Matrix.** Chemical Reviews, v. 119, n. 24, p. 12337–12374, 2019.

PAULA-SILVA, Francisco Wanderley Garcia et al. **Effects of 5-lipoxygenase gene disruption on inflammation, osteoclastogenesis and bone resorption in polymicrobial apical periodontitis.** Archives of Oral Biology, v. 112, n. January, p. 104670, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2020.104670>>.

PERCIVAL, Christopher J e RICHTSMEIER, Joan T. **Intramembranous ossification.** v. 242, n. 8, p. 909–922, 2014.

PIRES, Ana Luiza R. e BIERHALZ, Andréa C.K. e MORAES, Ângela M. **Biomateriais: Tipos, aplicações e mercado.** Quimica Nova, v. 38, n. 7, p. 957–971, 2015.

POOLE, Kenneth E S et al. **Sclerostin is a delayed secreted product of osteocytes that inhibits bone formation.** v. 18, p. 1–18, 2005.

PORFIRIO, ELISÂNGELA e FANARO, GUSTAVO BERNARDES. **Suplementação com colágeno como terapia complementar na prevenção e tratamento de**

osteoporose e osteoartrite : uma revisão sistemática. Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia, v. 19, n. 1, p. 153–164, 2016.

PROBST, Florian Andreas et al. **Bone regeneration of minipig mandibular defect by adipose derived mesenchymal stem cells seeded tri-calcium phosphate-poly(D,L-lactide-co-glycolide) scaffolds.** Scientific Reports, v. 10, n. 1, p. 2062, 2020. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41598-020-59038-8>>.

RIBEIRO, A. R. et al. **Trojan-Like Internalization of Anatase Titanium Dioxide Nanoparticles by Human Osteoblast Cells.** Scientific Reports, v. 6, n. October 2015, p. 1–11, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/srep23615>>.

RIGO, Eliana Cristina da Silva. **Síntese E Caracterização De HA Obtida a Partir Da Casca De Ovo De Avestruz.** p. 88, 2011. Disponível em: <http://propemm.vi.ifes.edu.br/wp-content/uploads/2012/05/Síntese-e-caracterização-de-HA-obtida-a-partir-da-casca-de-ovo-de-avestruz_Lorena-Batista.pdf>.

ROCHA, Daniel Navarro Da e SILVA, Marcelo Henrique Prado Da e GOBBO, Luciano de Andrade. **Produção de HA parcialmente substituída com nióbio.** p. 11–17, 2012.

ROLIAN, Campbell. **Endochondral ossification and the evolution of limb proportions.** n. October 2019, p. 1–22, 2020.

ROLIM, Ana Emília H. et al. **Chitosan scaffolds - Physico - Chemical and biological properties for bone repair.** Revista Virtual de Química, v. 10, n. 2, p. 211–228, 2018.

ROOT, Sierra H et al. **Perivascular osteoprogenitors are associated with transcortical channels of long bones.** n. October 2019, p. 1–17, 2020.

SRIVASTAV, Ashu et al. **Biomimetic Hydroxyapatite a Potential Universal Nanocarrier for Cellular Internalization & Drug Delivery.** Pharmaceutical Research, v. 36, n. 4, 2019.

TAKARADA, Takeshi et al. **Genetic analysis of Runx2 function during intramembranous ossification.** Development (Cambridge), v. 143, n. 2, p. 211–218, 2016.

TARDELLI, Juliana Dias Corpa e VALENTE, Mariana Lima da Costa e DOS REIS, Andréa Cândido. **Influência da topografia de superfície nanométrica na estabilidade primária de mini-implantes dentários.** Revista de Odontologia da UNESP, v. 48, p. 1–8, 2019.

TORTORA, 2016. **tortora.** Journal of Chemical Information and Modeling. [S.l.: s.n.].

, 2016

VISTA, Evan S. e LAU, Chak S. **What about supplements for osteoarthritis? A critical and evidenced-based review.** International Journal of Rheumatic Diseases, v. 14, n. 2, p. 152–158, 2011.

XU, Mingsheng et al. **Formation of nano-bio-complex as nanomaterials dispersed in a biological solution for understanding nanobiological interactions.** Scientific Reports, v. 2, p. 1–6, 2012.

YOSHIKO, Yuji et al. **Osteoblast Autonomous P i Regulation via Pit1 Plays a Role in Bone Mineralization** □. v. 27, n. 12, p. 4465–4474, 2007.

YUNOKI, S. et al. **Control of pore structure and mechanical property in hydroxyapatite/collagen composite using unidirectional ice growth.** Materials Letters, v. 60, n. 8, p. 999–1002, 2006.