

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISILOGIA

Thallyson Pedro Medeiros Godoi

**EFEITO DE BIOVIDROS NA ADESÃO, VIABILIDADE E DIFERENCIAÇÃO  
OSTEOGÊNICA DE CÉLULAS-TRONCO HUMANAS**

Porto Alegre

Agosto, 2022

Thallyson Pedro Medeiros Godoi

**EFEITO DE BIOVIDROS NA ADESÃO, VIABILIDADE E DIFERENCIAÇÃO  
OSTEOGÊNICA DE CÉLULAS-TRONCO HUMANAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Fisiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Patricia Pranke

Coorientadora: Dra. Natasha Maurmann

Porto Alegre

Agosto, 2022

## **Apresentação**

A presente dissertação foi desenvolvida no laboratório de Hematologia e Células-tronco da Faculdade de Farmácia e no laboratório de Células-tronco do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, ambos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), o Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e o Instituto de Pesquisa com Células-Tronco (IPCT) foram os órgãos fomentadores do trabalho. Foi realizada parceria com o Laboratório de Materiais Vítreos da Universidade Federal de São Carlos, para a obtenção das biocerâmicas utilizadas no trabalho.

## **Agradecimentos**

Primeiramente, gostaria de agradecer aos meus pais por todo o apoio durante esse período. Mesmo de longe continuaram me apoiando e acreditando na minha capacidade, por terem entendido e respeitado a minha decisão de me manter longe deles durante o período de mudança. A confiança foi essencial.

Agradeço a professora Patricia Pranke por ter me aceitado como aluno e aberto as portas do seu laboratório para o desenvolvimento desse estudo e pela orientação. Aos colegas de laboratório pelo convívio (mesmo que a distância na maioria das vezes), pelo apoio e pelas conversas em relação ao futuro.

É impossível chegar ao fim do mestrado sem destacar e agradecer a importância de duas pessoas que foram essenciais para a construção deste trabalho e do meu desenvolvimento teórico e prático.

Primeiro, minha coorientadora, Natasha Maurmann. Muito obrigado por todas as reuniões e conversas sobre nosso tema. Obrigado pela sua dedicação exemplar e por toda paciência desde o início quando estávamos procurando um tema interessante para nosso estudo até a execução dos experimentos mesmo que por vídeo chamada, ainda assim, me acompanhou, me ensinou e orientou durante todo esse período.

E não poderia esquecer da Luiza Oliveira, aluna de iniciação científica. Sem ela, esse trabalho não seria possível. Agradeço profundamente por tudo que me ensinou em relação as práticas do cultivo celular e pela disponibilidade de estar no laboratório mesmo durante uma pandemia. Muitas vezes não era fácil a locomoção até o laboratório, mas tu sempre estiveste disposta a ajudar no desenvolvimento desse trabalho. Natasha e Luiza, muito obrigado pela amizade.

Obrigado a todos do laboratório, Juliana Girón, Rafaela Zimmermann, Raissa Padilha e Bruna Leal por toda parceria e conversas durante as idas ao laboratório.

Em especial, um agradecimento para a Marina Souza, Professor Edgar Zanotto e equipe da Universidade Federal de São Carlos pela colaboração e fornecimentos dos materiais.

*Procure descobrir o seu caminho na vida.  
Ninguém é responsável por nosso destino, a não ser nós mesmos.*

*Chico Xavier.*

## Resumo

**Introdução:** O osso é um tecido complexo e sua composição e arquitetura permitem que o esqueleto desempenhe suas funções mecânicas essenciais. A utilização de biocerâmicas para a regeneração de tecido ósseo é uma estratégia que visa o desenvolvimento de substitutivos funcionais para esse tecido. Isso é possível graças aos desenvolvimentos da engenharia tecidual e medicina regenerativa. **Objetivos:** Investigar o efeito das biocerâmica Biosilicato<sup>®</sup>, F18, 45S5 e hidroxiapatita na adesão, diferenciação óssea e viabilidade *in vitro* de células-tronco mesenquimais obtidas de dentes visando regeneração óssea. **Métodos:** Para avaliar o efeito das biocerâmicas nas células-tronco (CT), foram realizados o teste DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) para avaliação de adesão celular, o teste de viabilidade celular MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolio]) e fosfatase alcalina (FAL) para avaliação de diferenciação celular. **Resultados:** No ensaio com DAPI as concentrações de 1, 0,5 e 0,25 mg/mL das biocerâmicas F18, HAp e 45S5 respectivamente, induziram o aumento na adesão de células-tronco. No teste com MTT em meio de expansão de CT, o material 45S5 diminuiu a viabilidade das células nas concentrações de 0,5 e 1,0 mg/mL em 2 dias. Em meio de diferenciação osteogênico, 0,25 mg/mL de 45S5 também reduziu a viabilidade em 2 dias. Os resultados da quantificação de FAL demonstraram que 0,25 mg/mL das biocerâmicas não afetaram a quantificação de FAL em 2 dias de cultura em meio de cultura osteogênico. Em 7 dias, Biosilicato<sup>®</sup>, F18 e 45S5 aumentaram os níveis de FAL na comparação com meio de cultura de CT. HAp manteve níveis de FAL similares ao grupo não diferenciado. **Conclusão:** Com base nos resultados obtidos nesse estudo é possível afirmar que os biomateriais, Biosilicato<sup>®</sup> e F18 são promissores para estudos futuros no campo da engenharia de tecidos e medicina regenerativa.

## Abstract

**Introduction:** Bone is a complex tissue and its composition and architecture allow the skeleton to perform its essential mechanical functions. The use of bioceramics for bone tissue regeneration is a strategy that aims to develop functional substitutes for this tissue. This is possible due to the development of tissue engineering and regenerative medicine. **Aims:** To investigate the effect of the bioceramics Biosilicate<sup>®</sup>, F18, 45S5 and hydroxyapatite using *in vitro* assays on adhesion, differentiation and viability of mesenchymal stem cells obtained from deciduous teeth for bone regeneration. **Methods:** To evaluate the effect of bioceramics in stem cells (SC), DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol) test was performed to evaluate cell adhesion. MTT ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]) was used as cell viability test and alkaline phosphatase (ALP) was performed to evaluate cell differentiation. **Results:** In the DAPI assay, the concentrations of 1, 0.5 and 0.25 mg/mL of F18, HAp and 45S5 bioceramics, respectively induced the increase in stem cell adhesion. In the MTT test in the stem cell expansion medium, the 45S5 material decreased the viability of cells at concentrations of 0.5 and 1.0 mg/mL within 2 days. In the osteogenic differentiation medium, 0.25 mg/mL of 45S5 also reduced cellular viability by 2 days. The results of ALP quantification showed that 0.25 mg/mL of the bioceramics did not affect ALP quantification at 2 days of cultivation in osteogenic culture medium. At 7 days, Biosilicate<sup>®</sup>, F18 and 45S5 increased ALP levels in comparison to the SC culture medium. HAp maintained ALP levels similar to the non-differentiated group. **Conclusion:** Based on the results obtained in this study, it is possible to state that the biomaterials Biosilicate<sup>®</sup> and F18 are promising for future studies in the field of tissue engineering and regenerative medicine.

## Lista de figuras

**Figura 1:** Descrição anatômica da estrutura óssea. Osso esponjoso localizado na parte interna e responsável pelas funções metabólicas e osso cortical representando a parte densa responsável pela função mecânica. Fonte: Elaborado pelo autor.

**Figura 2:** Esquema adaptado de Langer e Vacanti sobre a tríade da engenharia de tecidos que engloba a integração de células, biomateriais e moléculas bioativas. Fonte: Elaborado pelo autor.

**Figura 3.** Medições de pH do meio de cultura DMEM (meio) e das biocerâmicas Biosilicato® (Bios), F18, hidroxiapatita (HAp) e 45S5 suspensas em DMEM na concentração de 0,25 mg/mL após 0, 1, 24, 96, 168 e 336 horas representadas pelo eixo X. eixo Y representa a variação de pH. Dados expressos em média e EPM. Teste de Análise de variância de uma via seguido pelo teste Tukey HSD com \*\*  $p \leq 0,01$  na amostra Biosilicato® em 24h versus controle (meio de cultura DMEM)  $n = 3$ .

**Figura 4.** Aspecto das biocerâmicas Biosilicato® (Bios), F18, hidroxiapatita (HAp) e 45S5 suspensas em DMEM na concentração de 1 mg/mL após 0, 1, 24, 96, 168 e 336 horas. Visualização por microscopia de campo claro. Aumento de 50x.  $n = 4$ ..

**Figura 5:** Morfologia fibroblastóide em campo claro das células-tronco mesenquimais aderidas à placa de cultivo observadas em microscópio ótico invertido. Aumento de 100x (A) e 50x (B).

**Figura 6:** Ensaio de adesão celular (DAPI) de CT tratadas em contato direto com diferentes concentrações das biocerâmicas Biosilicato® (Bios), F18, hidroxiapatita (HAp) e 45S5 por 3 horas. Diferença estatística do biomaterial F18 1 mg/mL, HAp 0,5 mg/mL e 45S5 0,25 mg/mL em comparação com Poço. Eixo X representa as concentrações testadas e eixo Y a média do número de núcleos quantificados por concentração. Dados expressos em média e EPM da quantificação de núcleos corados. Poço corresponde às células cultivadas diretamente nos poços da placa de cultura sem tratamento. Teste de Análise de

variância de uma via seguido pelo teste Tukey HSD. \* representa resultados com  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$  em relação ao controle (poço)  $n = 24$ .

**Figura 7:** Imagens de microscopia de fluorescência do ensaio de adesão celular por DAPI após 3 horas. Fotos representativas dos núcleos das células fixadas e coradas em azul após tratamento com os biomateriais Biosilicato<sup>®</sup> (Bios), F18, hidroxiapatita (HAp) e 45S5 e controle. 120 imagens submetidas a quantificação pelo software LAS X Life Science Leica Microsystems Aumento de 50x.  $n = 24$ .

**Figura 8:** Ensaio de viabilidade (MTT) de CT tratadas em contato direto com diferentes concentrações das biocerâmicas Biosilicato<sup>®</sup> (Bios), F18, hidroxiapatita (HAp) e 45S5 por 2 dias. Eixo X representa as concentrações testadas e eixo Y representa a absorbância obtida através da leitura no fotômetro Multiskan FC<sup>®</sup>. Dados expressos em média e EPM. Poço corresponde às células cultivadas diretamente nos poços da placa de cultura sem tratamento e “Morte” representa as células tratadas com Triton X-100. Teste de Análise de variância de uma via seguido pelo teste Tukey HSD. \*\* indica resultados com  $p < 0,01$  em relação ao controle (poço)  $n = 4$ .

**Figura 9:** Teste Live/Dead não foi observado morte celular. Imagens de microscopia de campo claro e de fluorescência com marcação de células vivas em verde (FDA) e mortas em vermelho (IP) após 2 dias de cultivo. Grupos: controle não diferenciado (Controle), controle de diferenciação osteogênica (Diferenciação), biocerâmicas Biosilicato<sup>®</sup> (Bios), F18, hidroxiapatita (HAp) e 45S5 na concentração de 0,25 mg/mL em meio de diferenciação osteogênico. Aumento de 50x.  $n = 3$ .

**Figura 10:** Aumento da viabilidade celular dos biomateriais testados. Ensaio de viabilidade (MTT) de CT em meio de diferenciação osteogênico tratadas em contato direto com 0,25 mg/mL das biocerâmicas Biosilicato<sup>®</sup> (Bios), F18, hidroxiapatita (HAp) e 45S5 por 2 e 7 dias. Dados expressos em média e EPM. Tempo experimental (2 e 7 dias) expresso no eixo X e absorbância no eixo Y. Controle corresponde às células cultivadas em meio de CT. Diferenciação corresponde às células cultivadas em meio de diferenciação osteogênico. Teste de Análise de variância de uma via seguido pelo teste Tukey HSD. \* representa resultado com  $p < 0,05$  em relação ao controle diferenciado  $n = 3$ .

**Figura 11:** Aumento de FAL nos principais biomateriais estudados. Quantificação de FAL de CT cultivadas em meio de diferenciação osteogênico tratadas em contato direto com 0,25 mg/mL das biocerâmicas Biosilicato<sup>®</sup> (Bios), F18, hidroxiapatita (HAp) e 45S5 nos tempos de 2 e 7 dias. Dados expressos em média e EPM. Tempo experimental (2 e 7 dias) expresso no eixo X e absorbância no eixo Y. Controle corresponde às células cultivadas em meio de CT. Diferenciação corresponde às células cultivadas em meio de diferenciação osteogênico. Teste de Análise de variância de uma via seguido pelo teste Tukey HSD. \* representa resultado com  $p < 0,05$  e \*\* representa resultados com  $p < 0,01$  em relação ao controle não diferenciado.  $n = 4$

## Lista de abreviaturas

°C – Graus Celsius

3D – Três Dimensões

7AAD – do inglês *7-Amino Actinomycin D*

ANOVA – Análise De Variância De Uma Via

APC – do inglês *Allophycocyanin*

BC – Biocerâmicas

BG – do inglês *Bioglass*

Bio – Biosilicato®

Ca(OH)<sub>2</sub> – Hidróxido de Cálcio

CaO – Óxido de cálcio

CD105 – do inglês *Cluster of Differentiation 105*

CD14 – do inglês *Cluster of Differentiation 14*

CD184 – do inglês *Cluster of Differentiation 184*

CD29 – do inglês *Cluster of Differentiation 29*

CD34 – do inglês *Cluster of Differentiation 34*

CD44 – do inglês *Cluster of Differentiation 44*

CD45 – do inglês *Cluster of Differentiation 45*

CD73 – do inglês *Cluster of Differentiation 73*

CD90 – do inglês *Cluster of Differentiation 90*

cm – Centímetros

CO<sub>2</sub> – Gás Carbônico

CT – Células-tronco

CTM – Células-tronco Mesenquimais

DAPI – 4',6-diamidino-2-fenilindol

DMEM – do inglês *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DPSC – do inglês *Dental Pulp Stem Cells*

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra Acético

EPM – Erro Padrão da Média

FAL – Fosfatase Alcalina

FITC – do inglês *Fluorescein Isothiocyanate*

FTIR – Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

g – Gramas

GMSCs – do inglês *Gingiva-derived Mesenchymal Stem Cells*

h – Horas

H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> – Ácido Orto-fosfórico

HAp – Hidroxiapatita

HEPES – 4-(2-hidroxietil) - ácido 1-piperazinaetanossulfônico

HLA-DR – do inglês *Human Leukocyte Antigen – DR isotype*

INCA – Instituto Nacional Do Câncer

IP – Iodeto de Propídio

IPCT – Instituto de Pesquisa com Células-tronco

iPS – do inglês *induced pluripotent stem cells*

ISCT – do inglês *International Society for Cellular Therapy*

LaMaV – Laboratório de Materiais Vítreatos

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

mg – Miligrama

mL – Mililitro

mM – Milimolar

MO – Microscopia Óptica

MTT – Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolio]

Na<sub>2</sub>O – Óxido de Sódio

P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> – Pentóxido de Fósforo

PBS – do inglês *Phosphate Buffered Saline*

PCL – Policaprolactona

PDLSCs – do inglês *Periodontal Ligament Stem Cells*

PE – do inglês *Phycoerythrin*.

pH – Potencial Hidrogeniônico

PLGA – Poli (ácido láctico-co-ácido glicólico)

RT – Reagente De Trabalho

SCAP – do inglês *Stem Cells From Apical Papilla*

SFB – Soro Fetal Bovino

SHED – do inglês *Stem Cells From Human Exfoliated Deciduous Teeth*

SiO<sub>2</sub> – Dióxido de Silício

TDSC – do inglês *Tooth-Derived Stem Cells*

UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

UFSCar – Universidade Federal de São Carlos

UMBs – Unidades Multicelulares Básicas

UV – Ultravioleta

β-TCP – Beta fosfato tricálcico

## Sumário

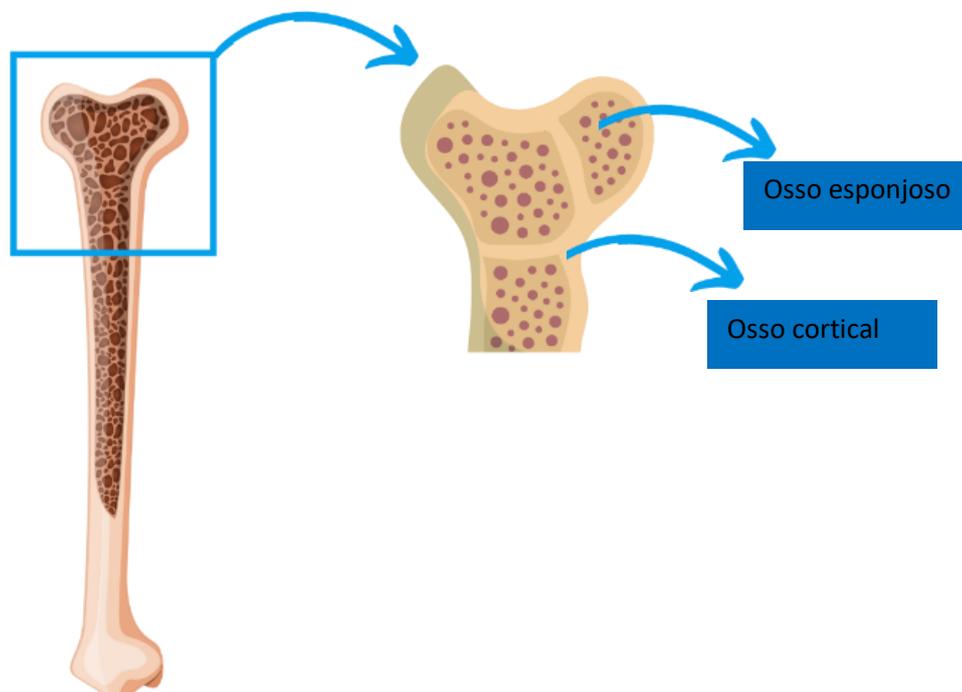
1. Introdução.....	14
1.1. Tecido ósseo.....	14
1.2. Regeneração tecidual .....	17
1.3. Regeneração óssea .....	20
1.4. Biomateriais .....	22
1.4.1. Biocerâmicas .....	23
1.4.2. Bioglass® 45S5.....	24
1.4.3. Biosilicato® .....	25
1.4.4. F18 .....	25
1.4.5. Hidroxiapatita.....	26
1.5. Justificativa .....	26
2. Objetivos .....	27
2.1. Objetivo principal.....	27
2.2. Objetivos específicos .....	27
3. Materiais e Métodos.....	28
3.1. Isolamento e cultivo das células-tronco mesenquimais .....	28
3.2. Caracterização das SHED .....	29
3.2.1. Análise morfológica das culturas celulares .....	29
3.2.2. Análise imunofenotípica das células cultivadas .....	29
3.2.3. Diferenciação celular <i>in vitro</i> .....	30
3.3. Obtenção e preparação da biocerâmica.....	31
3.4. Medição do pH.....	31
3.5. Caracterização microscópica .....	31
3.6. Adesão Celular .....	31
3.7. Análises de viabilidade celular .....	32

	13
3.8. Diferenciação osteogênica com biomateriais .....	33
3.8.1. Fosfatase Alcalina (FAL) .....	33
3.9. Análise Estatística.....	34
4. Resultados.....	35
4.1. Caracterização das biocerâmicas .....	35
4.1.1. Medição de pH .....	35
4.1.2. Aspectos microscópicos .....	36
4.2. Caracterização das células-tronco .....	38
4.3. Adesão celular .....	39
4.4. Análises de viabilidade celular .....	41
4.5. Ensaio de diferenciação com biomateriais .....	41
4.5.1. Aspecto das células e viabilidade .....	41
4.5.2. Fosfatase alcalina.....	43
5. Discussão .....	45
6. Conclusão.....	51
7. Perspectivas .....	52
8. Referências.....	53

## 1. Introdução

### 1.1. Tecido ósseo

O osso é um tecido complexo em constante mudança. Sua composição e arquitetura permitem que o esqueleto desempenhe suas funções mecânicas essenciais. O osso é constituído pelo tecido esponjoso, revestido pelo osso cortical. Como pode ser observado na ilustração da figura 1, o osso cortical representa a parte densa e compacta, constituindo cerca de 80% do esqueleto e sua principal função é fornecer força mecânica e proteção corpórea de estruturas vitais. O osso esponjoso ou trabecular localiza-se na parte interna, apresentando função metabólica e fornecendo suprimento mineral em estados de hipocalcemia. Por ser metabolicamente ativo, a perda de massa óssea por exemplo, ocorre de maneira intensa em quadros clínicos de hipogonadismo e menopausa (BUCKWALTER e COOPER, 1987)



**Figura 1:** Descrição anatômica da estrutura óssea. Osso esponjoso localizado na parte interna e responsável pelas funções metabólicas e osso cortical representando a parte densa responsável pela função mecânica. Fonte: Elaborado pelo autor

Até a metade do século passado, o tecido ósseo era considerado um tecido passivo de responder a influências hormonais e dietéticas (MENCZEL et al., 1963; URIST, 1965; PARFITT, 1976; FLORENCIO-SILVA *et al.*, 2015; HART *et al.*, 2017). Em 1996, Frost sugeriu o paradigma de Utah. Segundo esse paradigma esquelético-biológico, a arquitetura óssea seria moldada pelo estresse ao qual o osso é submetido. Estudos já mostravam que o estresse mecânico atuava diretamente nos osteoblastos e osteoclastos existentes, afetando a arquitetura óssea (WEINMANN e SICHER, 1955; EVANS, 1957). Segundo Frost (1998), baseado em percepções do paradigma de Utah, após o nascimento os ossos saudáveis são responsáveis pelo suporte de carga e fornecem somente força suficiente para evitar que cargas voluntárias gerem fraturas espontâneas. A força óssea total combinaria duas partes: uma presente no nascimento, somado com qualquer força adicionada a ela posteriormente (FROST, 1996; FROST, 1997; FROST, 2000). As ideias de Frost corroboram com as Leis de Wolff (WOLFF, 1986) que de acordo com Chen e colaboradores (2010), o processo de formação e remodelação do tecido ósseo seria induzido e mediado por células ósseas que detectam e respondem a estímulos mecânicos locais em resposta às forças mecânicas que sofrem. A mudança de proposta gerada pelo paradigma de Utah e a lei de Wolff, em relação ao tecido ósseo como tecido passivo também foi reforçada pelo estudo de Jee (2000). Atualmente o osso é considerado um tecido dinâmico, pois além de responder a influências hormonais e dietéticas, também responde as necessidades de adaptação mecânicas (WEILBAECHER, GUISE e MCCAULEY, 2011; GRABOWSKI, 2015; FLORENCIO-SILVA *et al.*, 2015; HARDY e FERNANDEZ-PATRON, 2020). Os ossos do corpo humano são responsáveis por proporcionar sustentação, locomoção e proteção de órgãos vitais como o coração, encéfalo e pulmões. Outras funções dos ossos estão associadas ao depósito de sais minerais e armazenamento de fatores de crescimento. Além disso, no osso está presente a medula óssea onde ocorre a hematopoese, que é o processo de produção, proliferação e maturação das células sanguíneas (CALVI e LINK, 2015; KONIECZNY e ARRANZ, 2018).

No contexto nacional, as fraturas ósseas apresentam grandes problemas de saúde e bem-estar. As causas que levam um indivíduo a ter fratura óssea

estão relacionadas a traumas que são observados em acidentes onde se aplica força excessiva no osso (MOYSÉS *et al.*, 2000). Outro contexto para fraturas ósseas são patologias que ocorrem devido a condições genéticas, o que gera deficiência de sais e conseqüentemente diminuição da densidade mineral óssea (AKIMOVA *et al.*, 2022; MÄKITIE *et al.*, 2022) ou decorrentes de pequenas pancadas, como é o caso da osteoporose e tumores ósseos (KHAJURIA, RAZDAN e MAHAPATRA, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2018).

A osteoporose é uma doença que leva ao enfraquecimento ósseo, aumentando a suscetibilidade de fraturas, principalmente em idosos. A fisiopatologia doença está relacionada diversos fatores, entre eles, diminuição dos níveis de estrogênio, levando ao aumento da atividade dos osteoclastos, principal causa de perda da massa óssea (WEITZMANN *et al.*, 2006; CAMACHO, *et al.*, 2020; ARCEO-MENDOZA e CAMACHO, 2021). Segundo o Ministério da Saúde estima-se que cerca de 50% das mulheres e 20% dos homens com idade igual ou superior a 50 anos sofrerão uma fratura osteoporótica ao longo da vida.

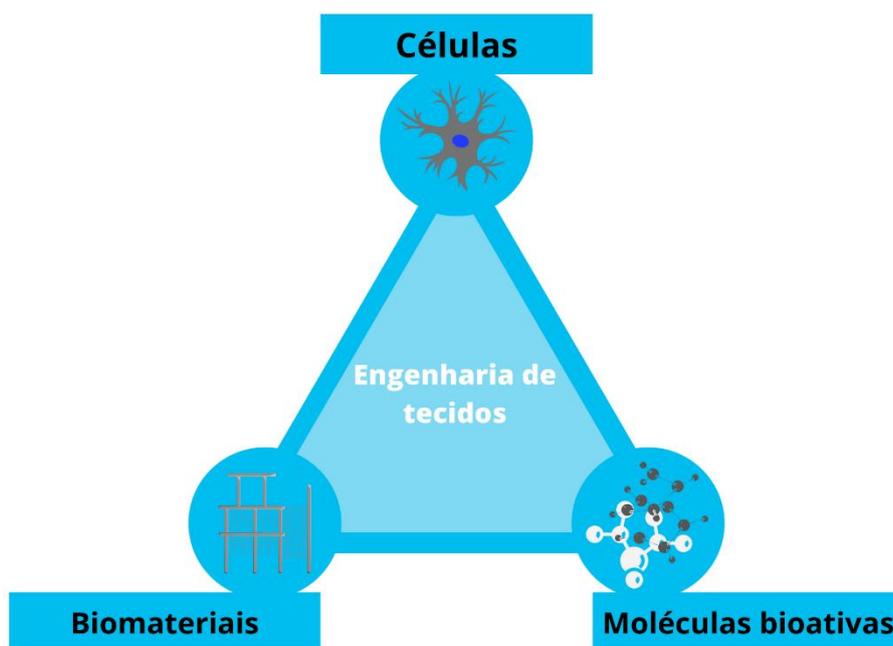
O osteossarcoma é a neoplasia que apresenta maior prevalência entre a população infanto-juvenil, correspondendo de 3% a 5% de todas as neoplasias na faixa etária de 0 a 19 anos de idade. Os principais locais de aparecimento do osteossarcoma são: fêmur, tíbia e região proximal de úmero, que pode levar a ocorrência de fraturas patológicas no paciente (INCA, 2021). Os tumores ósseos levam ao enfraquecimento ósseo devido aos tratamentos e evolução da doença, gerando fraturas recorrentes. Segundo a Sociedade Americana de Câncer, a estimativa de câncer ósseo primário para o ano de 2022 é de cerca de 3.910 novos casos diagnosticados e cerca de 2.100 mortes. No Brasil, o Instituto Nacional de Câncer (INCA) não dispõe de estimativas futuras para os tumores ósseos. Além dos danos relacionados a mobilidade, as fraturas ósseas também são um grave problema, pois podem gerar síndrome de embolia gordurosa, condição rara e potencialmente fatal que pode ocorrer após uma fratura de osso longo (KASSIMI *et al.*, 2022).

## 1.2. Regeneração tecidual

A medicina regenerativa objetiva o reparo e/ou a substituição de tecidos e órgãos com finalidade da restauração funcional (EDGAR *et al.*, 2020). Na área da medicina regenerativa, os estudos buscam solucionar esse desafio através da produção de órgãos podendo utilizar as células do próprio receptor. A maioria dos estudos na área ainda possuem algumas limitações, o que dificulta a avaliação de consequências em longo prazo. Essas limitações se relacionam a eficácia e segurança, consentimento do paciente e responsabilidade profissional (HERMERÉN, 2021).

Para regenerar as estruturas ósseas, o procedimento pode ser induzido por uma série de materiais implantáveis bioativos, diferentes tipos de células e sinalização molecular intracelular e extracelular.

A engenharia de tecidos é um campo da medicina regenerativa e foi descrita por Langer e Vacanti em 1993 como sendo uma nova área que aplica os princípios da engenharia e biologia para o desenvolvimento de um substitutivo funcional para tecidos danificados (LANGER e VACANTI, 1993). Desde a introdução do conceito de engenharia de tecidos, houve muita evolução na área de regeneração óssea, onde foi possível observar a aplicação dos mais diversos biomateriais. Langer e Vacanti propuseram uma tríade para o funcionamento da engenharia de tecidos, que pode ser resumida e aplicada na figura 2, onde observa-se a interação entre células, biomateriais que são utilizados para a produção de estruturas tridimensionais e moléculas bioativas.



**Figura 2:** Esquema adaptado de Langer e Vacanti sobre a tríade da engenharia de tecidos que engloba a integração de células, biomateriais e moléculas bioativas. Fonte: Elaborado pelo autor.

As células-tronco (CT) são as células que se destacam na medicina regenerativa. São células indiferenciadas que possuem a habilidade de autorrenovação, bem como capacidade de proliferação celular. As CT também possuem capacidade de diferenciação, que se refere a plasticidade celular, um processo fisiológico constante em resposta aos desafios homeostáticos. Mais especificamente é definida como a capacidade de conversão de uma célula indiferenciada em um tipo celular específico (ASSMUS *et al.*, 2020). As CT podem ser categorizadas de acordo com seu potencial de diferenciação em 5 grupos: totipotentes, pluripotentes, multipotentes, oligopotentes e unipotentes (SMITH, 2006). As células-tronco pluripotentes incluem as células embrionárias (células dos embriões até a fase de blastocisto) e as células-tronco pluripotentes induzidas (do inglês *induced pluripotent stem cells* – iPS).

As células-tronco adultas (localizadas em tecidos formados) são definidas pela capacidade de se diferenciar em múltiplas linhagens e autorrenovação (YOUNG e BLACK JR, 2004; WAGERS e WEISSMAN, 2004; KOCH e RADTKE,

2010; DULAK *et al.*, 2015; CABLE *et al.*, 2020). As células-tronco adultas estão presentes na maioria dos tecidos e podem se diferenciar em células especializadas como, por exemplo, células sanguíneas, musculares, nervosas etc. (SNIPPERT e CLEVERS, 2011; SOBHANI *et al.*, 2017; MARKOV *et al.*, 2021). Entre as células-tronco adultas, encontram-se as células-tronco mesenquimais (CTM), também conhecidas como células estromais mesenquimais. As CTM são células multipotentes que possuem a função de manter e reparar os tecidos em que elas são encontradas (CAPLAN, 1991; DING, SHYU e LIN, 2011; LAN, LUO e WEI, 2021). As CTM também são capazes de sintetizar e secretar fatores bioativos, como citocinas e fatores de crescimento, que auxiliam no processo de regeneração celular. Esses compostos contribuem para a imunomodulação, inibição da apoptose, estimulação da angiogênese, bem como a mitose intrínseca de células-tronco dos tecidos ou a estimulação das células progenitoras (CAPLAN, 2007; LEE e SONG, 2018; WEISS e DAHLKE, 2019; SONG, SCHOLTEMEIJER e SHAH, 2020).

As células-tronco mesenquimais podem ser expandidas em meio de cultura em decorrência da facilidade em se dividir e proliferar (CAPLAN, 2005; CAPLAN, 2017). A *International Society for Cellular Therapy* (ISCT) preconiza que três propriedades devem ser testadas para que as células possam ser designadas como CTM: (1) morfologia fibroblastoide e proliferação como células aderentes; (2) imunofenótipo característico e (3) capacidade de diferenciação *in vitro* em células como os osteoblastos, adipócitos e condroblastos (DOMINICI *et al.*, 2006; VALLONE *et al.*, 2013; UDER *et al.*, 2018).

Como as CTM e sua diferenciação durante os processos de remodelação têm papéis importantes na regeneração óssea, é necessário a compreensão das vias de sinalização molecular envolvidas, pois são cruciais para o desenvolvimento de implantes ósseos baseados em células e biomateriais para regeneração óssea (MAJIDINIA, SADEGHPOUR e YOUSEFI, 2018).

Os dentes de mamíferos abrigam CTM, que contribuem para o crescimento e reparo desses tecidos. Essas CTM dentárias possuem muitas características *in vitro* de CTM derivadas da medula óssea (SHARPE,

2016). Dentre os diversos tipos de células-tronco multipotentes, as células-tronco derivadas do dente (do inglês *tooth-derived stem cells* – TDSCs) possuem algumas propriedades que valem ser destacadas como acessibilidade, fácil isolamento e baixo grau de invasão. Esses critérios fazem com que as TDSCs sejam uma boa fonte para uso no tratamento de diversas doenças (BANIEBRAHIMI, KHANMOHAMMADI e MIR, 2019). As células-tronco mesenquimais dentárias incluem múltiplas populações de células-tronco. Inicialmente foram identificadas as CT da polpa dentária (do inglês *Dental Pulp Stem Cells* – DPSCs) que são isoladas a partir do tecido da polpa dentária de dentes permanentes extraídos de humanos. Posteriormente foram descritas células-tronco de dentes decíduos esfoliados humanos (do inglês *stem cells from human exfoliated deciduous teeth* – SHED), CT do ligamento periodontal (*periodontal ligament stem cells* – PDLSCs), células-tronco da papila apical (*stem cells from apical papilla* – SCAP) e células-tronco mesenquimais derivadas da gengiva (*gingiva-derived mesenchymal stem cells* – GMSCs) (ZHAO *et al.*, 2015; SHI, MAO e LIU, 2020; KIM *et al.*, 2021). O uso de CT pulparenses como DPSCs e SHED, tem sido proposto como alternativa às células-tronco de outras fontes visando sua diferenciação em várias linhagens celulares *in vitro* e para aplicação terapêutica (FERRO, SPELAT e BAHENEY, 2014; SHI, MAO e LIU, 2020). As SHED foram identificadas como uma população de células clonogênicas altamente proliferativas e com capacidade de diferenciação em uma variedade de tipos de células, incluindo células do tecido ósseo (TAGUCHI *et al.*, 2019; FULORIA *et al.*, 2021). A capacidade de diferenciação em outros tipos celulares e a fácil obtenção com pouco dano invasivo ao doador como é o caso das TDSCs tornam essas CT uma fonte atrativa para testes de biomateriais objetivando a utilização em pesquisas na medicina regenerativa.

### **1.3. Regeneração óssea**

O processo de cicatrização e regeneração óssea leva em consideração diversos fatores, como o grau de lesão, tecido atingido, tipo de fratura, paciente e tipo de tratamento utilizado (LI, KACENA e STOCUM, 2019). A complexidade no processo de consolidação e reparo de fratura óssea envolve padrões regenerativos e mudanças na expressão de diversos genes (MARSELL e

EINHORN, 2011; COTTRELL *et al.*, 2016; CAMAL RUGGIERI *et al.*, 2021). De modo geral, o processo de cicatrização primária ocorre em três estágios: inflamatório, reparo e remodelação (BERGSMA e BOS, 1997; GIANNOUDIS, EINHORN e MARSH, 2007; MARUYAMA *et al.*, 2020). Esses estágios podem se sobrepor e a duração de cada um será dependente de fatores locais e sistêmicos.

A remodelação óssea é um processo de remoção e reparo ósseo com a finalidade de manter as funções fisiológicas e mecânicas do tecido ósseo. Esse processo conta com a participação de diferentes tipos celulares, como osteoblastos, osteoclastos, osteócitos, células imunes (linfócitos T e B), megacariócitos e osteomacs (macrófagos teciduais residentes). Os osteoblastos são as células formadoras de osso e possuem diversas funções durante a remodelação óssea como por exemplo, a expressão de fatores osteoclastogênicos, produção de proteínas da matriz óssea e mineralização óssea. Os osteoclastos são células mieloides exclusivamente adaptadas para remoção de matriz óssea mineralizada. Os osteócitos formam uma rede que se estende por todo osso mineralizado e representam 90-95% de todas as células ósseas (PALUMBO, 1986; TEITELBAUM e ROSS, 2003; KACENA *et al.*, 2004; BONEWALD, 2007; LI *et al.*, 2007; KARSENTY, 2008; HUME, 2008). As etapas para a remodelação óssea ocorrem ao longo de várias semanas e são realizadas por um aglomerado de osteoclastos e osteoblastos dispostos em estruturas conhecidas como “unidades multicelulares básicas” (UMBs). Essas estruturas cobrem a superfície óssea exposta/danificada para a deposição óssea (HAUGE *et al.*, 2001).

Para a regeneração óssea são utilizados alguns tipos de enxertos que podem ser classificados como: autógenos, alógenos, xenógenos ou sintéticos. Nos casos de uso de enxertos autógenos, utiliza-se o osso do próprio paciente. Os enxertos alógenos são provenientes de indivíduos da mesma espécie, porém, geneticamente diferentes e podem ser obtidos a partir de Banco de Tecidos Humanos. Os xenógenos, também conhecidos como heterógeno, podem ser obtidos de um doador de outra espécie animal. Já os enxertos

sintéticos são materiais obtidos por síntese química (ELGALI *et al.*, 2017), os quais são o foco do presente estudo.

Os enxertos devem possuir propriedades fisiológicas que permitam interações com as células. Algumas dessas características são: suporte de carga, osteogênese, osteoindução e osteocondução (KHAN *et al.*, 2005; FILLINGHAM e JACOBS, 2016; SCHMIDT, 2021). O suporte de carga será dependente do local doado, já que algumas regiões suportam mais carga e pressão do que outras. A osteogênese é a propriedade que os enxertos devem possuir de recrutar elementos celulares que são capazes de promover a formação óssea. A osteoindução é quando o enxerto possui a capacidade de promover o recrutamento, proliferação e diferenciação celular. A osteocondução está relacionada com o fornecimento de suporte para hospedar a população de células para conduzir a formação óssea (KHAN *et al.*, 2005; KAMAL *et al.*, 2018).

#### **1.4. Biomateriais**

De acordo com a definição da Sociedade Europeia de Biomateriais de 1982, os biomateriais são “substâncias (exceto drogas) ou combinações de substâncias, de origem natural ou sintética, que por período tempo indeterminado são usados como um todo ou parte de um sistema para tratamento, amplificação ou substituição de qualquer tecido, órgão ou função do corpo” (WILLIAMS, 1987). Os materiais que incluem ligas metálicas, cerâmicas, polímeros e compósitos são chamados de biomateriais, quando para fins biomédicos. São definidos por função, ou seja, na medida em que irão interagir e substituir a função tecidual, servindo como enxertos. Existem vários tipos de biomateriais utilizados para a regeneração óssea que incluem metais, biocerâmicas, polímeros e compósitos (LOS, HUDECKI e WIECHEC, 2019; GIRÓN *et al.*, 2021; JIN *et al.*, 2021; AMBROSIO *et al.*, 2021). Os biomateriais mais utilizados no reparo de tecido ósseo nos últimos 10 anos são: titânio (metal), hidroxiapatita (cerâmica), colágeno (polímero natural), PCL e PLGA (polímeros sintéticos) (GIRÓN *et al.*, 2021; WANG *et al.*, 2022). Para a substituição de ossos funcionais, substitutos metálicos têm sido amplamente

utilizados devido ao suporte de carga e propriedades mecânicas superiores quando comparadas às biocerâmicas e biopolímeros (PUTRA *et al.*, 2020).

O uso de próteses de titânio, nióbio e estanho é muito comum devido à sua biocompatibilidade e por não apresentarem riscos à saúde humana (OLDER, 1992; PIRES, BIERHALZ e MORAES, 2015;). No entanto, a justificativa de não utilizar metais deve-se à necessidade de criação de substitutos ósseos que não ofereçam apenas funções mecânicas, mas funções mecânicas e fisiológicas.

#### **1.4.1. Biocerâmicas**

As biocerâmicas (BC) são materiais biocompatíveis sintéticos que incluem uma gama vasta de biomateriais, como os biovidros (Bioglass<sup>®</sup> 45S5), vitrocerâmicas (como Biosilicato<sup>®</sup>), fosfatos de cálcio, hidroxiapatita (Hap), alumina, zircônia, entre outros (JITARU *et al.*, 2016; PINA *et al.*, 2018). As aplicações de BC estão relacionadas com o preenchimento de defeitos ósseos, preenchimento apical, selamento de perfurações e como auxiliares na regeneração. As biocerâmicas apresentam como vantagens a biocompatibilidade, não toxicidade e estabilidade dimensional (GUVEN *et al.*, 2014; RAGHAVENDRA *et al.*, 2017). As BC podem ser caracterizadas como inertes, porosas, bioativas e reabsorvíveis. Essa caracterização está relacionada com o tipo de interação com o tecido. Biocerâmicas inertes, como a alumina, não interagem química ou biologicamente com o tecido. BC porosas, por exemplo, aluminato poroso e HAp, são caracterizadas pela formação e crescimento de tecido dentro dos poros. As BC bioativas proporcionam uma forte ligação no complexo osso-implante, como 45S5, HAp e Biosilicato<sup>®</sup>. As reabsorvíveis, quando implantadas, se degradam e são substituídas por tecido, servindo apenas como guia para a modulação. Nessa categoria estão o gesso e o fosfato tricálcico (KAWACHI *et al.*, 2000; RAGHAVENDRA *et al.*, 2017; RECLARU *et al.*, 2020; MENG *et al.*, 2021).

Em geral, as biocerâmicas têm mostrado interações muito positivas com os tecidos duros e moles (BAINO, NOVAJARA e VITALE-BROVARONE, 2015; YU, CHANG e WU, 2019; KARGOZAR *et al.*, 2020; MAZZONI *et al.*, 2021) sendo

eficazes na produção de substitutos ósseos. Uma peculiaridade um tanto importante são as atividades antimicrobianas que esses materiais possuem.

Os biovidros (do inglês *bioglass*, BG) são uma classe de BC que apresentam alto índice de bioatividade e osteoindução (WANG *et al.*, 2016; GHITULICA *et al.*, 2021). Estudos mostram que certas características de alguns BG, como tamanho e pH são capazes de promover a liberação de íons como sódio, cálcio, fosfato e silício. Esses íons são metabolizados pelo organismo e proporcionam um efeito antimicrobiano e de angiogênese (VARGAS *et al.* 2013; BENETTI *et al.* 2019; CRUSH *et al.*, 2021; HU *et al.*, 2021; SPIRANDELI *et al.*, 2021).

#### **1.4.2. Bioglass® 45S5**

O Bioglass® 45S5 foi um dos primeiros materiais artificiais produzidos formador de forte ligação química com o osso, dando início ao campo das cerâmicas bioativas. Esse vidro foi desenvolvido por HENCH e colaboradores no final da década de 60, e apresenta uma composição relativamente simples com apenas 4 componentes ( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{Na}_2\text{O}$ ,  $\text{CaO}$  e  $\text{P}_2\text{O}_5$ ), possuindo alta bioatividade. Esse material apresenta uma composição aproximada em peso de 45%  $\text{SiO}_2$ , 24,5%  $\text{Na}_2\text{O}$ , 24,5%  $\text{CaO}$  e 6%  $\text{P}_2\text{O}_5$  (HENCH, 1993). Estudos *in vitro* indicaram que suas propriedades osteogênicas se devem aos seus produtos de dissolução que estimulam as células osteoprogenitoras no nível genético (AGUIRRE *et al.*, 2010; EL-GENDY *et al.*, 2013; JONES, 2015). O biovidro 45S5, quando implantado no corpo, é capaz de se ligar quimicamente com os tecidos ósseos e tecidos moles (JELL e STEVENS, 2006; VÄLIMÄKI E ARO, 2006; YANG *et al.*, 2015). De fato, alguns estudos *in vivo* mostraram que vidros bioativos possuem a capacidade de ligação ao osso mais rapidamente do que outras biocerâmicas. Mas existem algumas implicações quanto a sua aplicação como material de suporte de carga, que é restrita devido à sua fragilidade (RIZWAN, HAMDY E BASIRUN, 2017).

### 1.4.3. Biosilicato®

O Biosilicato® é uma vitro-cerâmica bioativa que foi produzida a partir de composições próximas ao Bioglass® 45S5, desenvolvida no Laboratório de Materiais Vítreos (LaMaV) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). É um material do sistema  $P_2O_5$ - $Na_2O$ - $CaO$ - $SiO_2$ , com o detalhamento da composição e do tratamento térmico descritos na patente WO 2004/074199 (ZANOTTO *et al.*, 2004). O Biosilicato® apresenta melhoria nas propriedades mecânicas, elasticidade e melhor usinabilidade em comparação ao biovidro de partida 45S5. Outro ponto importante está relacionado com a alta bioatividade, sendo, neste quesito, superior às cerâmicas disponíveis no mercado. Essa vitro-cerâmica apresenta vantagens, como a ausência de arestas cortantes na forma particulada e, na forma monolítica, resistência superior à fratura e razoável usinabilidade (SIQUEIRA e ZANOTTO, 2011).

### 1.4.4. F18

O F18 também foi produzido na UFSCar e é coberto pela patente BR10 INPI 20130209619, sendo composto por  $SiO_2$ - $Na_2O$ - $K_2O$   $MgO$ - $CaO$ - $P_2O_5$ . Esse biovidro foi obtido através do processo de fusão e os blocos formados a partir desse processo foram moídos em almofariz exclusivo para moagem desse material. O pó resultante foi submetido ao processo de peneiramento. A granulometria desejada foi obtida com o uso de peneiras de nylon (CAMPANINI, 2015). O F18 foi definido como uma nova formulação e pode ser usado para a produção de fibras e biomateriais (SOUZA, 2011; SOUZA, 2015). A utilização desse material como manta para recobrir implantes ortopédicos e odontológicos mostrou-se útil para acelerar a reparação tecidual (CHINAGLIA, 2013; HIDALGO PITALUGA *et al.*, 2018). Outra propriedade importante desse material é a capacidade antimicrobiana. Estudos demonstraram a elevada eficiência antimicrobiana desse biovidro contra *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* e *P. aeruginosa*, eliminando os micro-organismos viáveis após o tempo de contato de 24 horas. (CAMPANINI, 2015; MARQUES *et al.*, 2020; PASSOS *et al.*, 2021).

#### 1.4.5. Hidroxiapatita

A hidroxiapatita (HAp) é um dos principais constituintes do esmalte dentário e do tecido ósseo (DOS SANTOS, OSAJINA e DA SILVA FILHO, 2016, SHANG, SHAO e GE, 2022). A síntese de Hap na forma de pó pode ser realizada por precipitação química úmida. Essa é uma das técnicas mais utilizadas na síntese de hidroxiapatita em nanoescala devido à sua simplicidade e baixo custo, sendo amplamente utilizada por diversos autores (MALINA, BIERNAT e SOBCZAK-KUPIEC, 2013; RAMESH *et al.*, 2013; MICHAL, EWA e TOMASZ, 2015; KRAUKLIS, KREICBERGS e DREYER, 2018; YELTEN e YILMAZ, 2018; MAQBOOL *et al.*, 2021). Nessa reação, o hidróxido de cálcio ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ), serve como fonte de cálcio e o ácido orto-fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$  em água) é utilizado como fonte de fósforo. A HAp é um dos biomateriais mais utilizados na engenharia de tecido ósseo devido a biocompatibilidade com os tecidos do corpo, comportamento estável em relação a íons que podem gerar efeito tóxico ou inflamação e também pela facilidade de produção e baixo custo (YELTEN e YILMAZ, 2018; GEORGE *et al.*, 2022; SHANG, SHAO e GE, 2022).

#### 1.5. Justificativa

Com base nessas informações, a medicina regenerativa, visando a regeneração óssea, utiliza diferentes biomateriais. Os principais métodos atuais para o tratamento de fraturas ósseas estão muito restritos à imobilização do membro lesionado. Com base nessas informações, a medicina regenerativa com a utilização de biomateriais vem como uma opção de utilização de um enxerto que pode ser de fácil absorção, permitindo estimular a formação óssea.

Sendo assim, para que seja possível criar estratégias com a utilização de biovidros para a regeneração óssea, é importante entender o comportamento das células-tronco em contato com biomateriais vítreos, motivo do presente estudo.

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo principal

Investigar o efeito das biocerâmicas Biosilicato<sup>®</sup>, F18, 45S5 e hidroxiapatita no comportamento *in vitro* de células-tronco mesenquimais, obtidas de dentes decíduos, visando a regeneração óssea.

### 2.2. Objetivos específicos

- ✓ Avaliar a variação de pH das biocerâmicas em meio de cultivo.
- ✓ Caracterizar as biocerâmicas morfológicamente.
- ✓ Avaliar a adesão de células-tronco expostas a diferentes composições e proporções de biocerâmicas *in vitro*.
- ✓ Testar a viabilidade de células-tronco expostas a diferentes composições e proporções de biocerâmicas *in vitro*.
- ✓ Analisar a viabilidade e quantificar a enzima fosfatase alcalina das células-tronco expostas ao meio de diferenciação osteogênico e diferentes biocerâmicas *in vitro*.

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1. Isolamento e cultivo das células-tronco mesenquimais

As células-tronco utilizadas nesse estudo foram isoladas de dentes decíduos humanos esfoliados de pacientes a partir de uma parceria com a Clínica Infanto-Juvenil da Faculdade de Odontologia da UFRGS. A coleta foi realizada após assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido pelo paciente ou seu responsável, após aprovação no Comitê de Ética (CAAE n° 45120921.0.0000.5347).

As células foram isoladas em cabines de fluxo laminar. O isolamento celular foi efetuado conforme o protocolo já estabelecido (BERNARDI *et al.*, 2011), em que foi realizada a remoção da polpa dental do tecido dentário com o auxílio de uma colher de dentina. Em seguida, o tecido pulpar foi imerso em uma solução de colagenase com concentração 0,2% (Gibco®) e incubado a 37°C por 60 minutos. Sucessivamente, foi realizada a centrifugação da amostra a 800g por 10 minutos, resultando em um *pellet* de células que foi ressuspensão em 1 mL de meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma-Aldrich®) de baixa glicose suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab®) e 1% de penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich®), denominado meio de expansão de CT. Por fim, a suspensão composta das células isoladas e do meio de cultivo foi semeada em placas de cultivo e acondicionada em uma incubadora umidificada a 37°C e com teor de 5% de CO<sub>2</sub> por aproximadamente 72 horas. Posteriormente, as células não aderidas à placa foram descartadas durante a troca do meio de cultura. Subsequentemente, o meio de cultivo das células isoladas foi trocado a cada 3-4 dias (BOTTEZINI, 2019).

Após a confluência, as células cultivadas foram submetidas à lavagem com solução tampão fosfato (PBS), seguida pelo processo de tripsinização durante 3 minutos a 37°C, em uma solução de 0,05% de tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich®) diluída em PBS. Em seguida, para inativar a ação da tripsina, foi adicionado o dobro de meio de cultivo DMEM contendo SFB e foi realizada a centrifugação. Após, as células foram transferidas para novas garrafas de cultivo na densidade

de 5.000 células/cm<sup>2</sup>, visando o crescimento da cultura celular. As subculturas foram estabelecidas de modo similar ao descrito acima, conforme atingiam a confluência nas garrafas de cultivo utilizadas no estudo.

## **3.2. Caracterização das SHED**

### **3.2.1. Análise morfológica das culturas celulares**

Conforme preconizado pela ISCT, a análise das células-tronco cultivadas foi realizada por meio da sua morfologia. A caracterização foi observada pelo formato fibroblastoide e a capacidade de adesão à placa de cultivo. Esses parâmetros foram avaliados de modo rotineiro a partir da visualização das culturas em um microscópio invertido de contraste de fase Leica Dmi8 (Leica Microsystems) durante todo o período de cultivo.

### **3.2.2. Análise imunofenotípica das células cultivadas**

Para a caracterização imunofenotípica, a avaliação foi realizada com marcadores moleculares que são característicos de células-tronco mesenquimais assim como a ausência de marcadores característicos de células hematopoéticas, utilizando da técnica de citometria de fluxo (KOBOLAK *et al.*, 2016). Após a quinta passagem ser atingida, 100.000 células provenientes do isolamento dos dentes decíduos foram utilizadas juntamente com anticorpos específicos para verificar a expressão dos marcadores de CTM, CD29, CD44, CD73, CD90 e CD105. Do mesmo modo, para assegurar a ausência de marcadores de células-tronco hematopoéticas, utilizou-se os marcadores CD14, CD34, CD45 e CD184 (BOTTEZINI, 2019). Para a realização do experimento, as células cultivadas foram incubadas por 30 minutos no abrigo da luz com 2 µL de cada anticorpo monoclonal anti-humano (Pharmlingen, Becton Dickinson, San Jose, CA) para examinar a presença das moléculas citadas anteriormente. Posteriormente, as células foram lavadas e ressuspensas com 1 mL de PBS. Para os testes, foi utilizado o reagente 7AAD (7-Amino Actinomicina D)

(Molecular Probes, Eugene), com concentração final de 1 µg/mL em PBS, como parâmetro exclusivo, propiciando apenas a avaliação de células viáveis. As células foram incubadas, juntamente com o reagente, por 30 minutos à temperatura ambiente e analisadas no citômetro de fluxo FACSCanto™ II flow cytometer (BD Biosciences). Levando em consideração o tamanho e a complexidade celular da amostra analisada, o equipamento foi previamente ajustado para as condições de análise desejadas. A fluorescência foi ajustada por meio dos controles isotípicos APC (do inglês *allophycocyanin* – alofococianina), FITC (do inglês *fluorescein isothiocyanate* – isotiocianato de fluoresceína) e PE (do inglês *phycoerythrin* – ficoeritrina). Desse modo, os dados da análise foram adquiridos de aproximadamente 20.000 eventos para cada amostra (BOTTEZINI, 2019).

### **3.2.3. Diferenciação celular *in vitro***

Para constatar a identidade das células isoladas, houve a necessidade da realização de testes de diferenciação para comprovar a capacidade dessas em dar origem a diferentes tipos celulares adultos, podendo assim ser caracterizadas como células-tronco mesenquimais (DOMINICI *et al.*, 2006). Utilizando uma placa de cultura celular de 48 poços foram realizados ensaios de diferenciação osteogênica, condrogênica e adipogênica em células cultivadas, empregando meios de cultivo característicos para cada indução de diferenciação, que foram trocados a cada 3-4 dias, durante 3-4 semanas. As células foram lavadas com tampão fosfato, fixadas com paraformaldeído 4%, lavadas com água Milli-Q e coradas com a coloração específica de cada teste para confirmação da diferenciação, no tempo de diferenciação e nos parâmetros de morfologia adequados (BOTTEZINI, 2019; MAURMANN *et al.*, 2017; SIQUEIRA *et al.*, 2017).

### **3.3. Obtenção e preparação da biocerâmica**

As biocerâmicas foram obtidas a partir de uma parceria com o Laboratório de Materiais Vítreos da Universidade Federal de São Carlos.

Antes da utilização dos materiais, para iniciar os experimentos, após a pesagem balança de precisão Bel Engineering, as biocerâmicas ficaram expostas por 30 minutos na luz ultravioleta (UV) em capela de fluxo laminar.

### **3.4. Medição do pH**

Após exposição a luz UV, as biocerâmicas foram suspensas em meio de cultura DMEM de baixa glicose na concentração de 0,25 mg/ml e adicionadas em incubadora de CO<sub>2</sub> a 37°C. Após os períodos experimentais de 0h, 1h, 1, 4, 7 e 14 dias, foram retirados 20 mL da suspensão e submetidos às análises de no equipamento PHS-3E (Ion). Os ensaios foram realizados em triplicata (n = 3).

### **3.5. Caracterização microscópica**

Para observação da morfologia dos materiais, as biocerâmicas foram suspensas em meio de cultura DMEM de baixa glicose na concentração de 1 mg/ml e acondicionados em poços de placa de cultura de 96 poços (n = 4). Os materiais foram avaliados em microscópio Leica Dmi8 (Leica Microsystems) nos mesmos tempos de medição do pH.

### **3.6. Adesão Celular**

Foi realizado o teste de adesão celular após coloração com DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), um marcador fluorescente que se liga a regiões de DNA contendo adenina-timina. Para esse teste 10.000 células foram semeadas por poço juntamente com o meio de cultura contendo o tratamento das biocerâmicas nas concentrações de 0,25, 0,5 e 1 mg/mL. Após 3 horas, as células foram

fixadas com paraformaldeído 4% e após, foi realizada a coloração com 0,5 µg/mL de DAPI.

Para a quantificação foi utilizado microscópio Leica Dmi8 (Leica Microsystems) com aumento de 50X. Foram retiradas 6 fotos por poço e cada tratamento contou com 4 poços, totalizando n = 24 fotos para cada biomaterial testado (poço da placa sem tratamento, Biosilicato<sup>®</sup>, 45S5, F18 e HAp). Após as imagens foram submetidas a quantificação pelo software LAS X Life Science Leica Microsystems, para determinar a quantidade de núcleos em cada imagem.

### **3.7. Análises de viabilidade celular**

As análises de viabilidade celular foram executadas a partir do ensaio de MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolio]), o qual é reduzido a cristais de formazan nas mitocôndrias de células metabolicamente ativas por enzimas redutases. Cada biocerâmica foi analisada separadamente e o desempenho de cada material foi comparado ao resultado da placa de cultivo (grupo controle). As células foram tripsinizadas e semeadas nas placas de cultura de 96 poços. No dia seguinte, foi adicionado o tratamento de biovidro na concentração de 0 (controle), 0,25, 0,5 e 1 mg/mL em meio de expansão. Também foi realizado o ensaio MTT com 0,25 mg/mL dos biomateriais suspensos em meio de diferenciação osteogênico, descrito no item a seguir. Foram utilizados 200 µL das suspensões de BC nas diferentes concentrações nos respectivos poços. Após 2 ou 7 dias, o tratamento foi removido e foram adicionados 75 µL de MTT na concentração de 0,25 mg/mL. Após o tempo de 3 horas, foi realizada a remoção do MTT e adicionados 275 µL de dimetil sulfóxido P.A (DMSO) para dissolver os cristais formados. Posteriormente, foi executada a leitura da absorbância de 200 µL da solução em fotômetro de microplaca Multiskan<sup>™</sup> FC nos comprimentos de onda 570 nm e 630 nm.

Paralelamente à análise quantitativa, foi realizada uma avaliação qualitativa da viabilidade celular por meio do ensaio utilizando a coloração com diacetato de fluoresceína (FDA) e iodeto de propídio (IP) para a marcação de

células vivas e mortas, respectivamente. Após a cultura em meio de diferenciação osteogênico contendo 0,25 mg/mL dos biovidros por 2 dias, as células foram incubadas com 10 µg/mL de FDA e 5 µg/mL de IP por 5 minutos. O registro da fluorescência foi realizado no microscópio de fluorescência Leica Dmi8 (Leica Microsystems).

### **3.8. Diferenciação osteogênica com biomateriais**

A análise de diferenciação osteogênica foi executada a partir do cultivo das células-tronco mesenquimais, utilizando meio de cultivo osteogênico composto de DMEM de baixa glicose, SFB (15%), dexametasona (0,1 µM), ácido ascórbico 2-fosfato (50 µM) e β-glicerofosfato (15 mM) juntamente com o tratamento com os biomateriais Biosilicato<sup>®</sup>, Hidroxiapatita, 45S5 e F18 na concentração de 0,25 mg/mL. Subsequentemente, utilizou-se teste de fosfatase alcalina (FAL).

#### **3.8.1. Fosfatase Alcalina (FAL)**

A análise de FAL para a detecção da diferenciação osteogênica foi efetuada após 2 e 7 dias (n = 4). Após os tempos experimentais, o meio de cultura foi removido dos poços e as células lavadas 2 vezes com PBS gelado. Para gerar a lise celular, foram adicionados 150 µL de Triton 1%, por poço, dissolvido no reagente de trabalho (RT) do kit (Bioclin Fosfatase Alcalina IFCC. K224-2). O RT foi preparado conforme recomendado pelo fabricante, misturando-se quatro (4) partes do reagente N<sup>o</sup>1 (Tampão) com uma (1) parte do Reagente N<sup>o</sup> 2 (Substrato). A placa foi incubada por 30 minutos à 37°C em incubadora. Em uma nova placa de cultura, foram adicionados 100 µL do lisado celular e 200 µL do reagente de trabalho. Após um minuto, foi realizada a leitura com comprimento de onda 405 nm utilizando o fotômetro Multiskan FC<sup>®</sup>.

### **3.9. Análise Estatística**

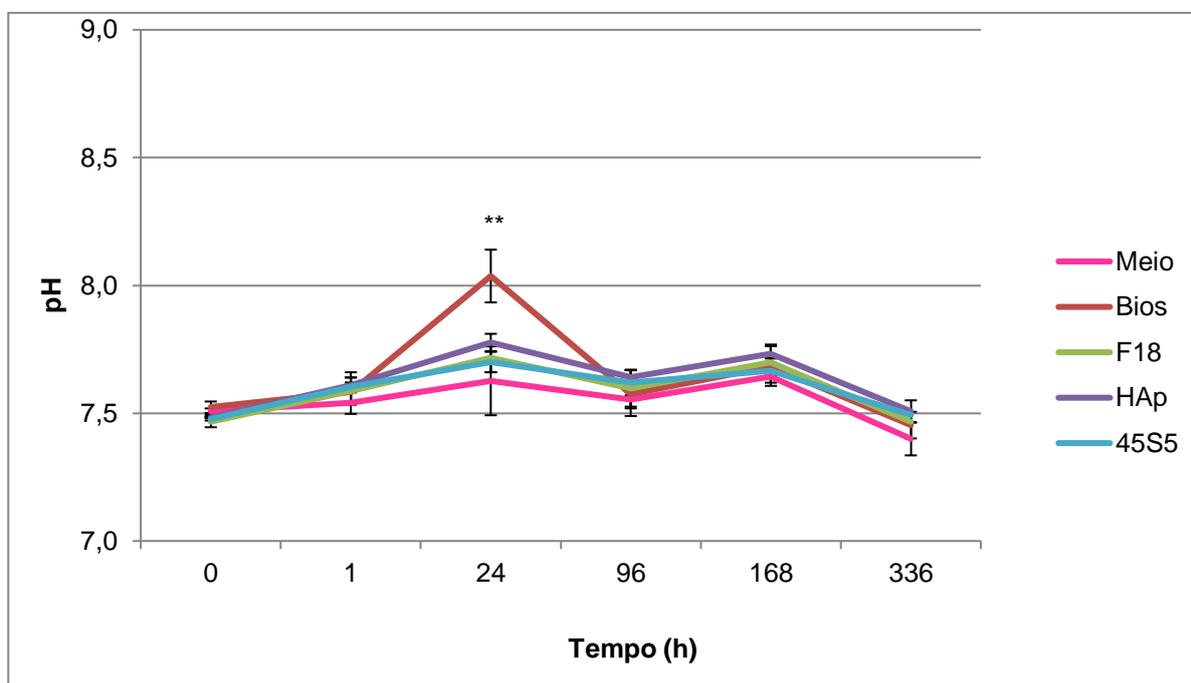
Os dados obtidos nos experimentos foram organizados e tabelados utilizando o *software* Microsoft Office Excel e expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média. A significância estatística foi avaliada a partir do teste de Análise de variância de uma via (ANOVA) seguido pelo teste pós-hoc de Tukey HSD utilizando o *software* BioEstat. O valor mínimo de “p” considerado como estatisticamente significativo foi definido como inferior a 0,05 e o intervalo de confiança foi estabelecido em 95%.

## 4. Resultados

### 4.1. Caracterização das biocerâmicas

#### 4.1.1. Medição de pH

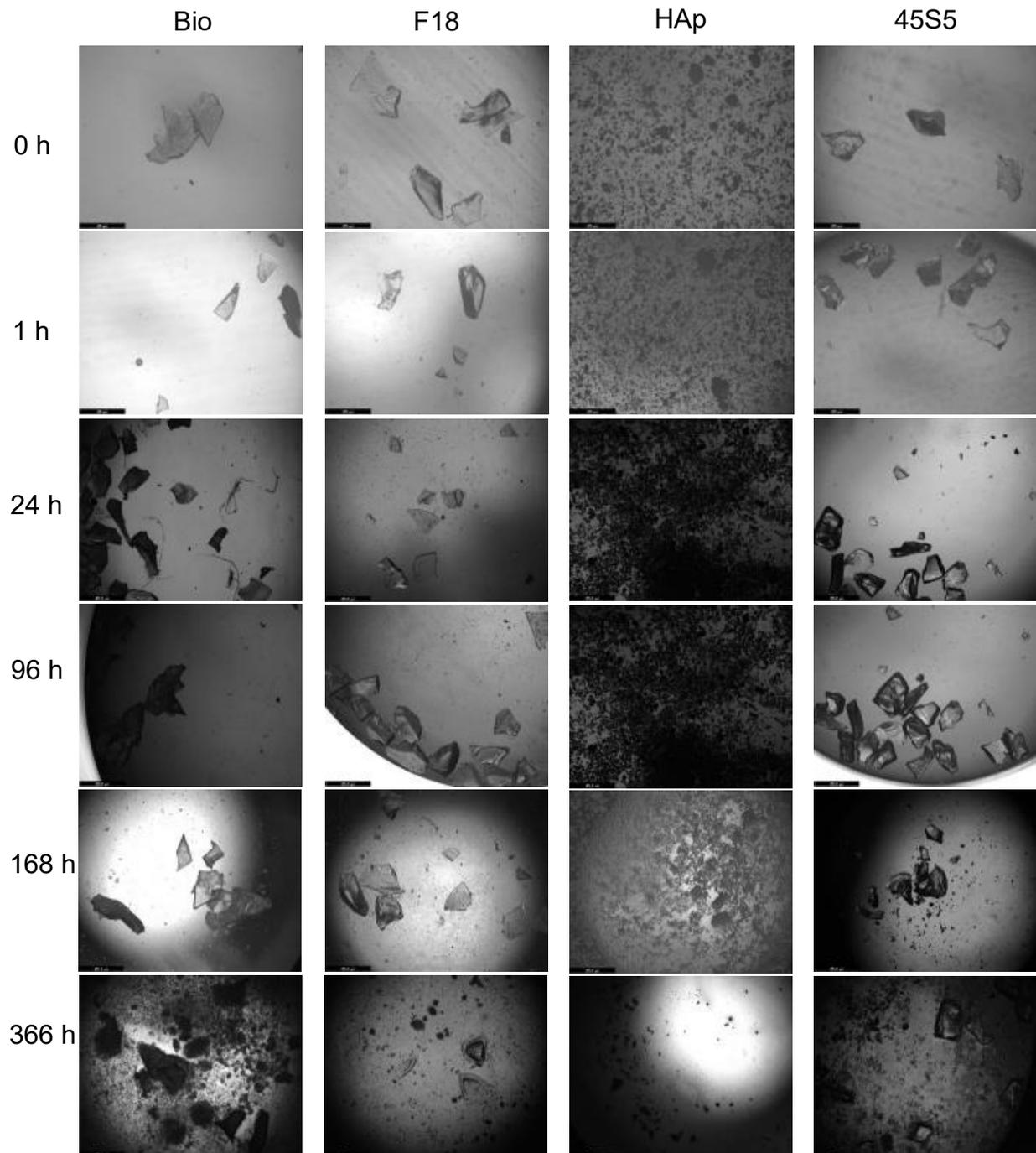
Os resultados das medições de pH durante 14 dias estão apresentados na figura 3. Foi detectado o aumento estatisticamente significativo do pH na amostra de Biosilicato® em 24 horas em comparação com o controle ( $p < 0,01$ ). Nas demais avaliações com as diferentes biocerâmicas, a análise não demonstrou variação substancial do pH, mantendo o valor ao redor de 7,6 entre os dias 0 e 14 de incubação.



**Figura 3.** Medições de pH do meio de cultura DMEM (meio) e das biocerâmicas Biosilicato® (Bios), F18, hidroxiapatita (HAp) e 45S5 suspensas em DMEM na concentração de 0,25 mg/mL após 0, 1, 24, 96, 168 e 336 horas representadas pelo eixo X. eixo Y representa a variação de pH. Dados expressos em média e EPM. Teste de Análise de variância de uma via seguido pelo teste Tukey HSD com \*\*  $p \leq 0,01$  na amostra Biosilicato® em 24h versus controle (meio de cultura DMEM)  $n = 3$ .

#### **4.1.2. Aspectos microscópicos**

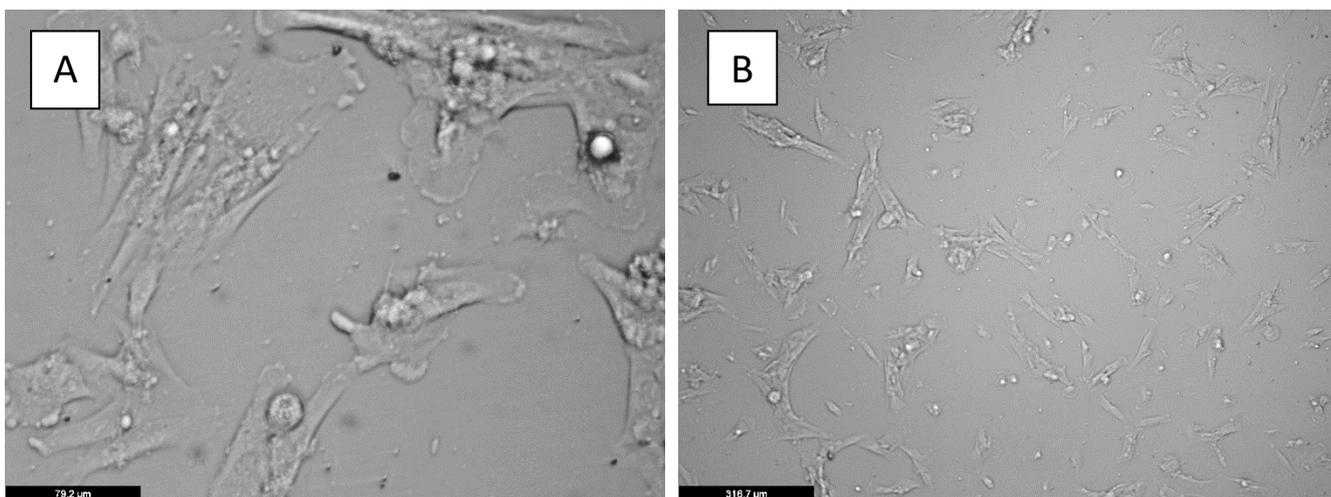
O aspecto microscópico das biocerâmicas avaliado por microscopia de campo claro indicou partículas irregulares com cerca de 500  $\mu\text{m}$  de comprimento. Os materiais não apresentaram alterações visíveis durante as primeiras 168 horas (7 dias) suspensos em meio de cultura DMEM (Figura 4). Em 366 horas (14 dias), as partículas deixaram de apresentar aspecto pontiagudo, tendendo a apresentar cantos arredondados.



**Figura 4.** Aspecto das biocerâmicas Biosilicato<sup>®</sup> (Bios), F18, hidroxiapatita (HAp) e 45S5 suspensas em DMEM na concentração de 1 mg/mL após 0, 1, 24, 96, 168 e 336 horas. Visualização por microscopia de campo claro. Aumento de 50x. n = 4.

## 4.2. Caracterização das células-tronco

Em relação à caracterização das CTM preconizada pela ISCT, foi realizada a avaliação rotineira em microscópio óptico invertido da aderência celular nas placas de cultivo. As células-tronco cultivadas demonstraram capacidade de manter essa ligação ao longo das passagens celulares realizadas durante as semanas de cultivo. Durante todo o período de cultivo, observou-se que a forma fibroblastoide foi mantida, como é possível observar na Figura 5.



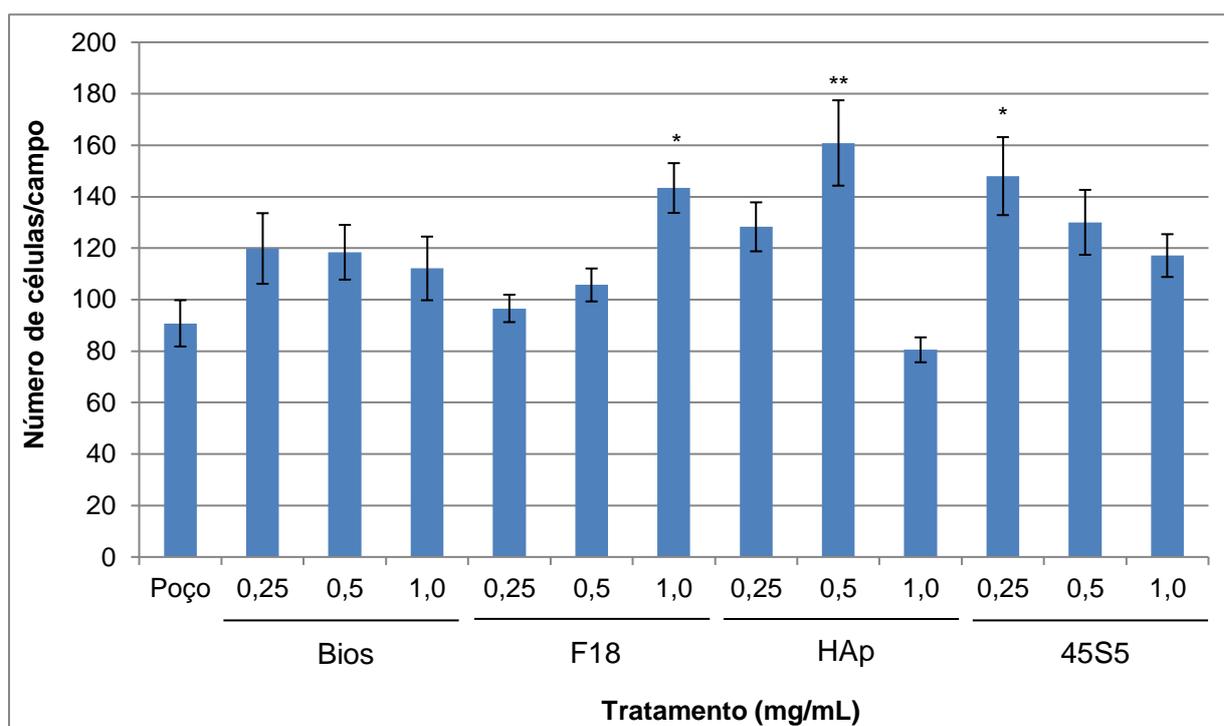
**Figura 5:** Morfologia fibroblastoide em campo claro das células-tronco mesenquimais aderidas à placa de cultivo observadas em microscópio óptico invertido. Aumento de 100x (A) e 50x (B).

Além disso, as CTM foram previamente diferenciadas após o cultivo nos meios adipogênico, osteogênico e condrogênico (BOTTEZINI, 2019).

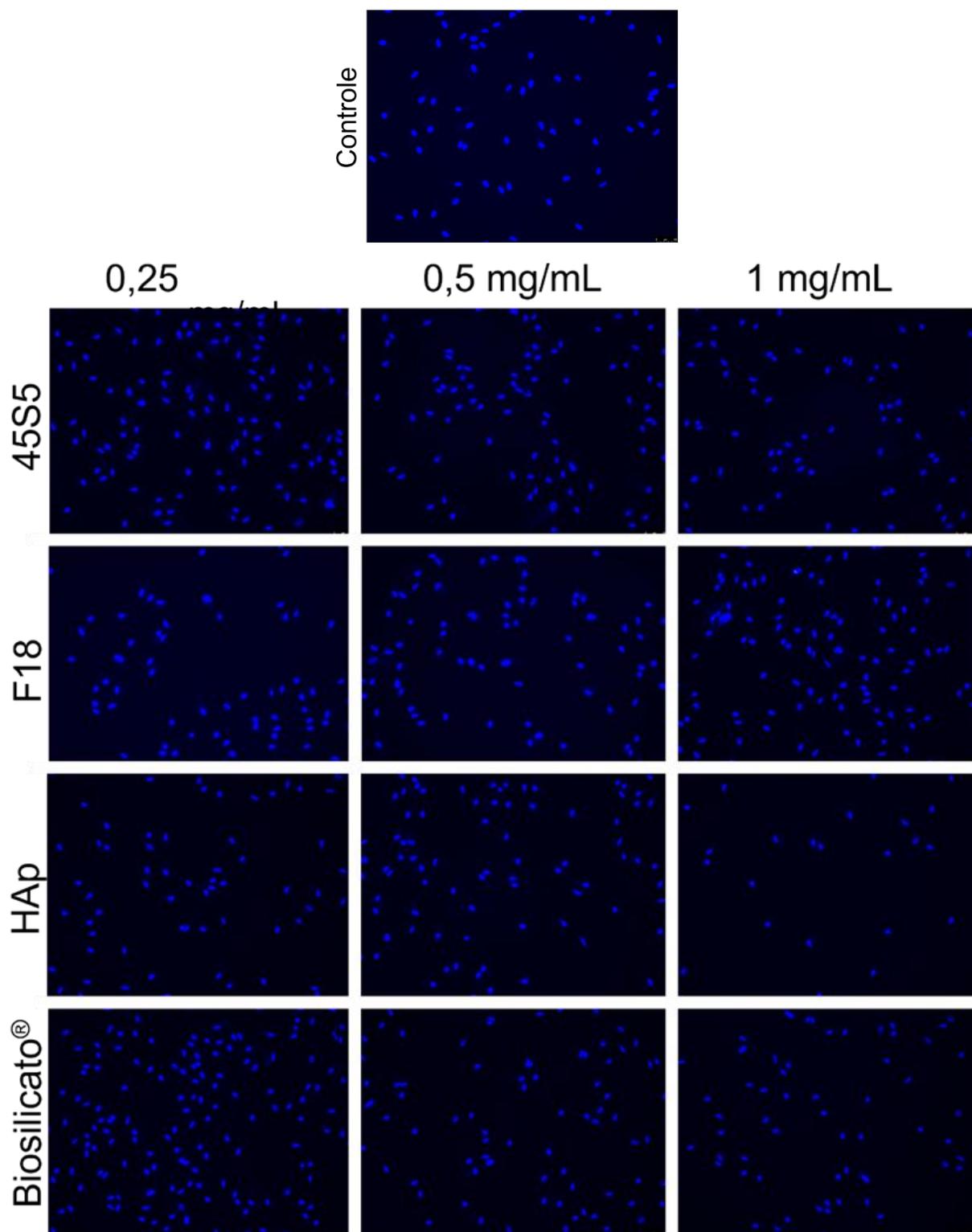
A análise imunofenotípica também foi realizada em um estudo anterior (BOTTEZINI, 2019). A partir dos resultados obtidos pela técnica de citometria de fluxo foi possível realizar a caracterização a partir das altas taxas de expressão de marcadores moleculares que estão associados a células-tronco mesenquimais e a baixas porcentagens de expressão de marcadores de células hematopoiéticas. Foi possível observar a presença dos marcadores CD29, CD73, CD90 de células-tronco mesenquimais com mais que 95% de positividade, enquanto a taxa de expressão de marcadores de células hematopoiéticas CD14, CD34, CD45, CD73, CD184, HLA-DR e STRO-1 foi inferior a 2%.

### 4.3. Adesão celular

A avaliação da adesão das CT nas placas de cultura foi realizada após o cultivo das mesmas com os biomateriais, fixação das células e coloração com o reagente DAPI. Os resultados demonstraram que a biocerâmica Biosilicato® não afetou a adesão das CT após 3 horas, independentemente da concentração estudada (Figura 6). As biocerâmicas F18, HAp e 45S5, respectivamente nas concentrações de 1, 0,5 e 0,25 mg/mL, induziram o aumento da adesão de CT. Na figura 7 pode ser observado o aspecto dos núcleos após coloração com DAPI.



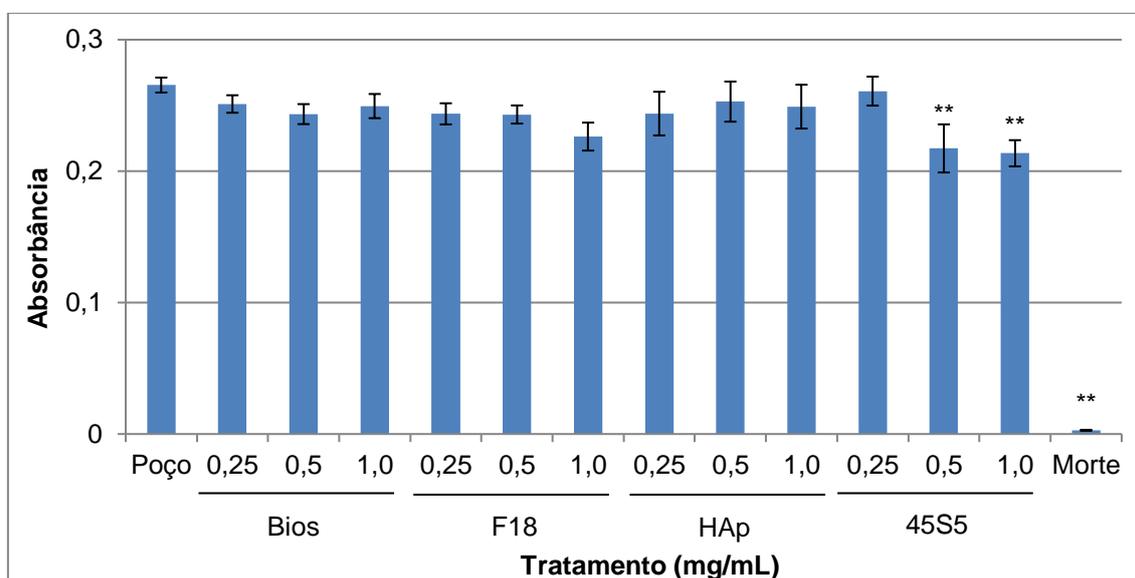
**Figura 6:** Ensaio de adesão celular (DAPI) de CT tratadas em contato direto com diferentes concentrações das biocerâmicas Biosilicato® (Bios), F18, hidroxiapatita (HAp) e 45S5 por 3 horas. Diferença estatística do biomaterial F18 1 mg/mL, HAp 0,5 mg/mL e 45S5 0,25 mg/mL em comparação com Poço. Eixo X representa as concentrações testadas e eixo Y a média do número de núcleos quantificados por concentração. Dados expressos em média e EPM da quantificação de núcleos corados. Poço corresponde às células cultivadas diretamente nos poços da placa de cultura sem tratamento. Teste de Análise de variância de uma via seguido pelo teste Tukey HSD. \* representa resultados com  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$  em relação ao controle (poço)  $n = 24$ .



**Figura 7:** Imagens de microscopia de fluorescência do ensaio de adesão celular por DAPI após 3 horas. Fotos representativas dos núcleos das células fixadas e coradas em azul após tratamento com os biomateriais Biosilicato® (Bios), F18, hidroxiapatita (HAp) e 45S5 e controle. 120 imagens submetidas a quantificação pelo software LAS X Life Science Leica Microsystems Aumento de 50x. n = 24.

#### 4.4. Análises de viabilidade celular

As diferentes concentrações da BC (0,25, 0,5 e 1 mg/mL) foram testadas em contato direto com as células. As biocerâmicas Biosilicato<sup>®</sup>, F18 e a hidroxiapatita não afetaram a viabilidade das CTM após 2 dias de tratamento, independentemente da concentração estudada. O material 45S5 diminuiu a viabilidade das células nas concentrações de 0,5 e 1 mg/mL (Figura 8).



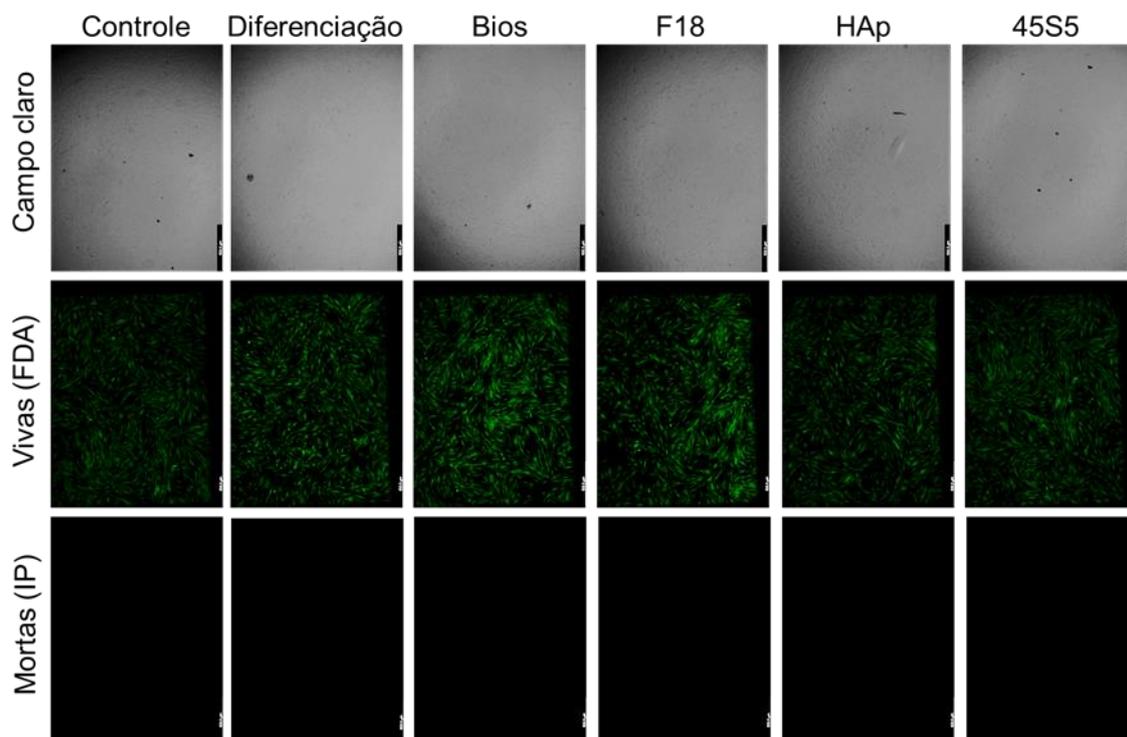
**Figura 8:** Ensaio de viabilidade (MTT) de CT tratadas em contato direto com diferentes concentrações das biocerâmicas Biosilicato<sup>®</sup> (Bios), F18, hidroxiapatita (HAp) e 45S5 por 2 dias. Eixo X representa as concentrações testadas e eixo Y representa a absorbância obtida através da leitura no fotômetro Multiskan FC<sup>®</sup>. Dados expressos em média e EPM. Poço corresponde às células cultivadas diretamente nos poços da placa de cultura sem tratamento e “Morte” representa as células tratadas com Triton X-100. Teste de Análise de variância de uma via seguido pelo teste Tukey HSD. \*\* indica resultados com  $p < 0,01$  em relação ao controle (poço)  $n = 4$ .

#### 4.5. Ensaio de diferenciação com biomateriais

##### 4.5.1. Aspecto das células e viabilidade

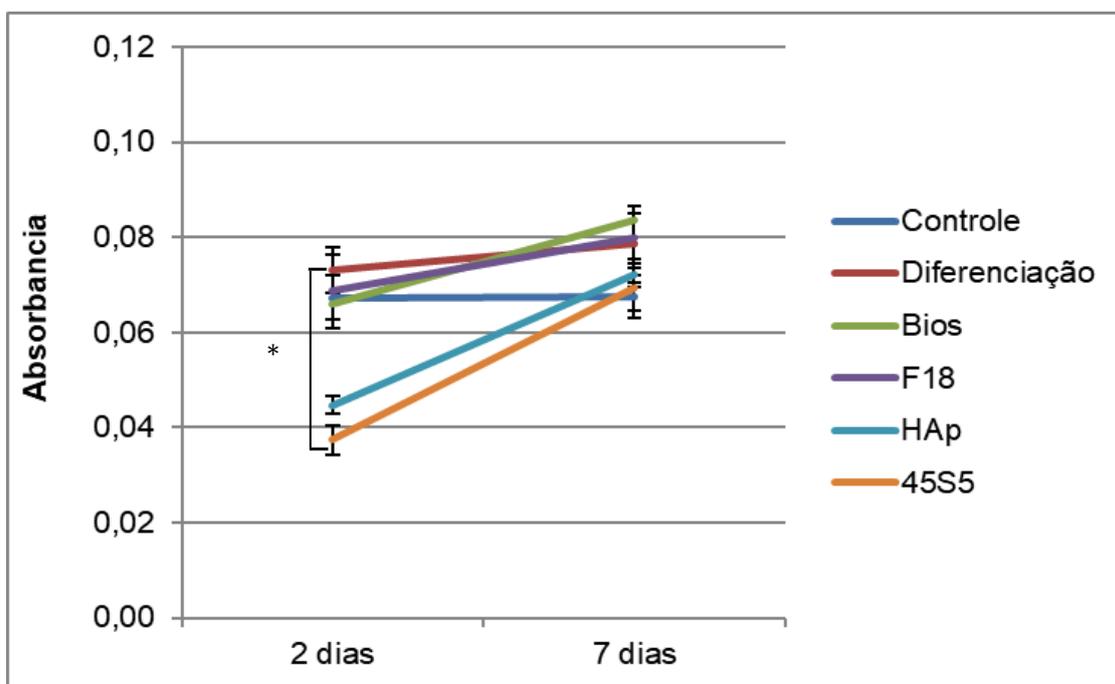
As BCs Biosilicato<sup>®</sup>, F18, 45S5 e HAp na concentração de 0,25 mg/mL foram suspensas em meio de diferenciação e testadas em contato direto com as

células. A Figura 9 se refere ao teste de viabilidade após 2 dias de cultivo em meio de diferenciação osteogênico.



**Figura 9:** Teste Live/Dead não foi observado morte celular. Imagens de microscopia de campo claro e de fluorescência com marcação de células vivas em verde (FDA) e mortas em vermelho (IP) após 2 dias de cultivo. Grupos: controle não diferenciado (Controle), controle de diferenciação osteogênica (Diferenciação), biocerâmicas Biosilicato<sup>®</sup> (Bios), F18, hidroxiapatita (HAp) e 45S5 na concentração de 0,25 mg/mL em meio de diferenciação osteogênico. Aumento de 50x. n = 3.

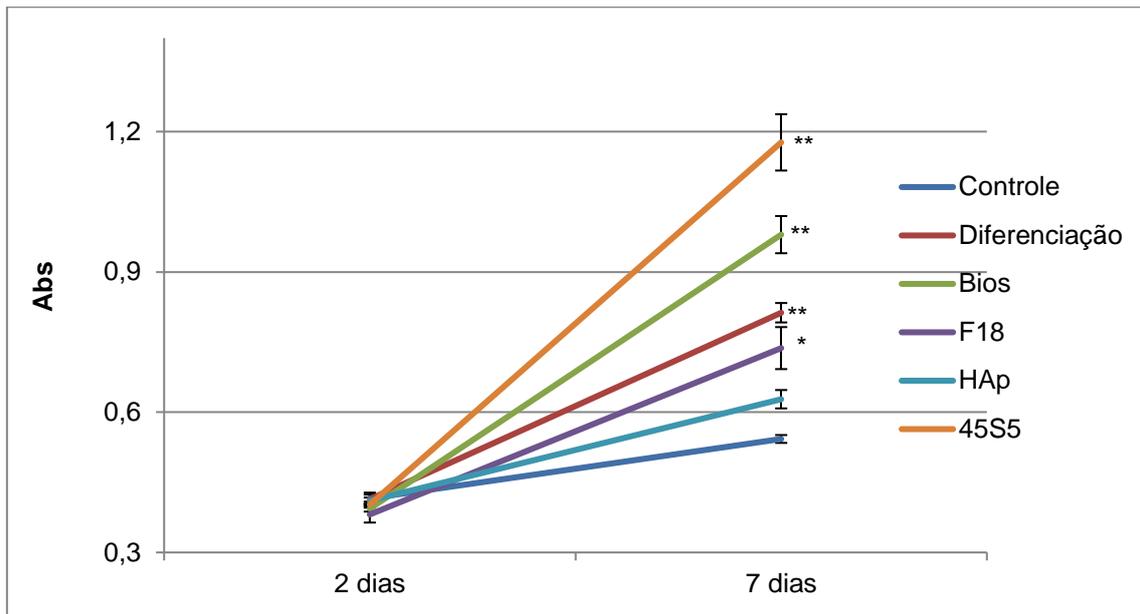
A viabilidade das células tratadas com 0,25 mg/mL de 45S5 foi reduzida após 2 dias de cultivo em comparação com as células cultivadas em meio de diferenciação osteogênico ( $p < 0,05$ ). A viabilidade celular, após 7 dias de cultivo, foi semelhante entre todos os grupos (controle em meio de CT, controle em meio de diferenciação e 0,25 mg/ml de Biosilicato<sup>®</sup>, HAp, F18 e 45S5 em meio de diferenciação) (Figura 10).



**Figura 10:** Aumento da viabilidade celular dos biomateriais testados. Ensaio de viabilidade (MTT) de CT em meio de diferenciação osteogênico tratadas em contato direto com 0,25 mg/mL das biocerâmicas Biosilicato<sup>®</sup> (Bios), F18, hidroxiapatita (HAp) e 45S5 por 2 e 7 dias. Dados expressos em média e EPM. Tempo experimental (2 e 7 dias) expresso no eixo X e absorbância no eixo Y. Controle corresponde às células cultivadas em meio de CT. Diferenciação corresponde às células cultivadas em meio de diferenciação osteogênico. Teste de Análise de variância de uma via seguido pelo teste Tukey HSD. \* representa resultado com  $p < 0,05$  em relação ao controle diferenciado  $n = 3$ .

#### 4.5.2. Fosfatase alcalina

Os resultados da quantificação de FAL demonstraram que 0,25 mg/mL das biocerâmicas não afetaram a quantificação de FAL em 2 dias de cultura em meio de cultura osteogênico (Figura 11). Em 7 dias, Biosilicato<sup>®</sup>, F18 e 45S5 aumentaram os níveis de FAL na comparação com meio de cultura de CT. Nesse teste, HAp manteve níveis de FAL similares ao grupo não diferenciado.



**Figura 11:** Aumento de FAL nos principais biomateriais estudados. Quantificação de FAL de CT cultivadas em meio de diferenciação osteogênico tratadas em contato direto com 0,25 mg/mL das biocerâmicas Biosilicato<sup>®</sup> (Bios), F18, hidroxiapatita (HAp) e 45S5 nos tempos de 2 e 7 dias. Dados expressos em média e EPM. Tempo experimental (2 e 7 dias) expresso no eixo X e absorbância no eixo Y. Controle corresponde às células cultivadas em meio de CT. Diferenciação corresponde às células cultivadas em meio de diferenciação osteogênico. Teste de Análise de variância de uma via seguido pelo teste Tukey HSD. \* representa resultado com  $p < 0,05$  e \*\* representa resultados com  $p < 0,01$  em relação ao controle não diferenciado.  $n = 4$

## 5. Discussão

Ao longo dos últimos anos, surgiu uma grande variedade de biomateriais com a proposta de auxiliar na regeneração tecidual. Os biomateriais, permanentes ou biodegradáveis, naturais ou sintéticos, precisam possuir biocompatibilidade. Com o objetivo específico de regeneração óssea, espera-se que sejam osteoindutores, osteocondutores, integráveis, possuam boa porosidade e sejam compatíveis de modo mecânico com o osso nativo para cumprir seu papel desejado. As cerâmicas como os vidros bioativos foram introduzidos há mais de 30 anos como substitutos ósseos. Os mesmos são considerados bioativos, pois se ligam ao osso e melhoram a formação do tecido ósseo. A propriedade de bioatividade tem sido atribuída à semelhança entre a composição e estrutura da superfície dos materiais bioativos e a fase mineral do osso. A desvantagem no uso de vidros bioativos é que a proximidade com o osso hospedeiro é necessária para alcançar a osteocondução. Muitas vezes mesmo quando essa característica é alcançada, o crescimento de osso novo é estritamente limitado, porque alguns desses materiais não possuem natureza osteoindutora. O osso tem uma vasta capacidade de regeneração a partir de células com características de células-tronco.

A estrutura física dos biomateriais é um fator de extrema importância que determina as respostas celulares. As diferenças nas características apresentadas pelos biomateriais podem influenciar significativamente na morfologia, adesão, proliferação e diferenciação celular. No presente estudo, o aspecto microscópico das biocerâmicas, avaliado por microscopia de campo claro, não apresentou alterações visíveis durante 7 dias de contato com o meio de cultura. Após 14 dias, as partículas deixaram de apresentar aspecto pontiagudo, tendendo a apresentar cantos arredondados. A estrutura física dos biovidros é um fator que pode afetar sua taxa de dissolução, o que influencia na cinética das reações e conseqüentemente na modulação da atividade osteoindutora. Por meio da microscopia óptica (MO) é possível avaliar o tamanho de partículas grandes (por exemplo, as encontradas nesse trabalho que possuem cerca de 500  $\mu\text{m}$ ), embora muitos autores utilizem microscopia eletrônica de varredura (MEV). A partir dos resultados obtidos com MO podemos

mensurar resultados estruturais das partículas, que como citado, pode ser um fator que influencia na taxa de dissolução do biomaterial. A taxa de dissolução gera alterações no comportamento de viabilidade, diferenciação e adesão celular. Um exemplo são as estruturas porosas que facilitam a migração e o crescimento celular. Essas estruturas auxiliam no transporte de nutrientes e metabólitos, estimulando a integração óssea (ROSETI *et al.*, 2017; NIKOLOVA e CHAVALI, 2019).

A influência do tamanho das partículas de biovidros são relatados na literatura (DOS SANTOS ALMEIDA *et al.*, 2014; XU *et al.*, 2020; JUHL IV, LATIFI e DONAHUE, 2021). A variação no tamanho dos grânulos dos biovidros é um fator que pode gerar uma extrapolação na resposta inflamatória. A variação pode não ser tão benéfica devido à distribuição dos grânulos menores de biovidro ocupando espaços entre as maiores. Essa distribuição de partículas pode reduzir o potencial regenerativo e o interstício devido à obstrução dos espaços que são necessários para a migração celular (SCHEPERS *et al.*, 1993). Já Wheeler e colaboradores (1998) afirmam que biomateriais com grande variação na distribuição do tamanho das partículas, de 90 a 710 microns de diâmetro, formam uma área de superfície maior em relação à biomateriais com variação pequena, o que disponibiliza maior o número de sítios de adesão para osteoblastos e favorece a regeneração óssea.

Dallabrida e colaboradores (2018) observaram, através de MEV, a integração dos biomateriais de fosfato de cálcio e bifásicos de HAp/beta fosfato tricálcico ( $\beta$ -TCP) em osso neoformado, demonstrando que as taxas de dissolução do biomaterial auxiliaram na osteointegração. Todos os biomateriais utilizados apresentaram uma morfologia de grânulos entre 200 e 500  $\mu$ m, característica promissora quanto à adesão e proliferação celular na superfície de grãos e de microporos.

A dissolução iônica é o processo de separação de íons e ocorre quando um composto é dissolvido. Nesse processo de reatividade de um material bioativo, como é o caso do Biosilicato<sup>®</sup>, F18 e 45S5, essa separação dos compostos

iônicos no meio de cultura pode elevar a condução elétrica e gerar alteração de pH. Essas variações afetam a atividade celular, podendo ser responsáveis por um controle genético, o que influencia na osteoindução desses materiais. Embora exista o relato de variação do pH devido ao contato com cerâmicas (LEE, 2017), neste trabalho não foram detectadas alterações significativas com exceção do Biosilicato® no período de 24 h em contato com o meio de cultivo celular. A hipótese para a ausência de variação pode ser devido ao valor do pH para a cultura de células ser ajustado para 7,4 e os meios de cultivo utilizados para a manutenção das células serem tamponados com bicarbonato de sódio e HEPES (4-(2-hidroxietil) – ácido 1-piperazinaetanossulfônico). Esses reagentes mantêm o pH do meio de cultura estável na incubadora nas condições de cultivo utilizadas (5% CO<sub>2</sub> e 37 °C) (HODNE *et al.*, 2012). A manutenção dos valores de pH pode ser sustentada pelo fato de que no meio de cultura testado não havia atividade celular. Sendo assim, não ocorreram processos metabólicos capazes de alterar significativamente o pH dos meios, como por exemplo íons (Ca<sup>2+</sup> e K<sup>+</sup>) e outros metabólitos (CONNETT, 1989; ERECIŃSKA, DEAS e SILVER, 1995; WU e DAVIS, 1981). Bushinsky (1996) e Silver e colaboradores (2001) salientam a importância da alcalinização (pH 7,6) do meio para o estímulo de deposição de HAp e colágeno para a diferenciação osteogênica.

Após o período de 24 h de contato entre o meio de cultivo e o Biosilicato®, foi observada a alcalinização do meio, estatisticamente significativa em relação ao meio de cultura base. A alcalinização causada por esse biomaterial também foi relatada em sua patente (ZANOTTO *et al.*, 2006). A liberação de íons sódio e cálcio em solução gera aumento na pressão osmótica e pH devido ao processo de lixiviação que esses materiais sofrem quando em contato com meio aquoso. Esse processo conta com cinco estágios que ocorrem quando estão em contato com fluidos corporais, como é o caso do SFB utilizado para suplementação do meio de cultura. Inicialmente ocorre a lixiviação dos cátions Na<sup>+</sup> e substituição deles na estrutura do vidro por cátions H<sup>+</sup> ou H<sub>3</sub>O<sup>+</sup> (estágio I). O processo de lixiviação gera um aumento no pH causando a lise de Si-O-Si e o silício é liberado na solução como Si(OH)<sub>4</sub> (estágio II). Se o pH local for inferior a 9,5, o Si(OH)<sub>4</sub> condensa e a sílica (SiO<sub>2</sub>) repolimeriza na superfície do vidro, formando uma camada de sílica-gel (estágio III). No estágio IV, os íons cálcio e fósforo se

difundem do vidro através da camada de sílica-gel (que permite que as trocas iônicas entre os vidros e a solução continue ocorrendo). A sílica-gel adicionada aos íons cálcio e aos fosfatos presentes forma na superfície do vidro uma camada de fosfato de cálcio amorfo. A última etapa irá ocorrer após o aumento da espessura das camadas amorfas de sílica-gel e fosfato. Essa camada irá incorporar os íons hidroxila, carbonato ou fluoreto, dando início à cristalização em apatita.

Os testes *in vitro* de viabilidade celular realizados neste estudo foram de extrema importância, para avaliar se os biomateriais eram capazes de manter as células viáveis, quando com elas cultivadas. No estudo de Silver e colaboradores em 2001, o Bioglass® 45S5 não induziu a diminuição na viabilidade de osteoblastos. Para realização desses experimentos, o Bioglass® 45S5 foi embebido por até 72 h em meio de cultura antes do uso. As partículas de vidro bioativo foram aplicadas como suspensões em meio de cultura nos poços. O objetivo foi produzir uma cobertura semi-confluyente de biovidro que foi correspondente a 2,38 mg/cm<sup>2</sup> e as células foram incubadas por mais 2-6 dias). Os resultados de Silver e colaboradores ficaram em desacordo com o presente estudo, visto que o Bioglass® 45S5 diminuiu a viabilidade das células, após 2 dias de cultivo, nas concentrações mais elevadas (0,5 e 1 mg/mL) do biovidro. A divergência dos resultados do estudo de Silver e colaboradores e o presente estudo, pode ser explicada pelas diferentes condições metodológicas utilizadas, como por exemplo, a concentração de biomaterial e o tipo celular estudado.

Heidari e colaboradores 2018 trabalharam com adição de titânio em amostras de 45S5 a fim de avaliar a citotoxicidade do biomaterial em uma relação de 0,01 g/mL (vitrocerâmica/SBF). Os resultados das células testadas quando cultivadas com o Bioglass® 45S5 com adição de titânio indicaram que a citotoxicidade foi reduzida. Esses resultados foram especialmente mais evidentes nas células tratadas com 100% e 50% de amostras diluídas por 1 e 7 dias. Segundo os autores, a principal razão para a maior viabilidade celular é o pH mais baixo do meio de cultura celular. Essa diminuição de pH foi relacionada com a diminuição na liberação de íons de silício e sódio.

A viabilidade das células submetidas à diferenciação osteogênica e tratadas com 0,25 mg/mL de 45S5 também foi reduzida após 2 dias de cultivo em comparação com as células cultivadas em meio de diferenciação osteogênico, e a viabilidade celular após 7 dias foi semelhante entre todos os grupos. A hipótese para viabilidade diminuída das células cultivadas com biovidro 45S5 e com meio de diferenciação celular pode se relacionar com a adaptação das células ao meio com os mediadores osteogênicos para o processo de diferenciação celular.

O F18 e o Biosilicato<sup>®</sup> são materiais osteoindutores. Portanto, é esperado que os mesmos estimulem a diferenciação celular devido a liberação de íons que, quando absorvidos pelas células ósseas, ativam genes relacionados ao processo de proliferação celular (FERRAZ, 2016; FERRAZ *et al.*, 2017; MARQUES *et al.*, 2020; BIGHETTI-TREVISAN *et al.*, 2022.). O 45S5 possui propriedades que estão associadas à formação de grupos fosfato de cálcio na superfície do material, aos quais estão associadas à propriedade osteoindutora do biovidro (THOMAS, PULEO e AL-SABBAGH, 2005; SILVA, 2011; HENCH e JONES, 2015). Os biomateriais Biosilicato<sup>®</sup> e F18 apresentaram características osteoindutoras mantendo o teor de FAL em 7 dias semelhante ao grupo controle de diferenciação e maior que o grupo controle em meio de expansão de CT. As células tratadas com 45S5 apresentaram maior quantidade de FAL que o controle de diferenciação. No presente estudo, a HAp manteve níveis de FAL similares ao grupo não diferenciado. A HAp, por mais que possua excelente propriedade osteocondutora, não apresenta características osteoindutoras (CARLO *et al.*, 2007; SOUZA *et al.*, 2016; SZCZEŚ, HOŁYSZ, CHIBOWSKI, 2017). Segundo os resultados obtidos nesse trabalho, a HAp foi incapaz de estimular a diferenciação de células-tronco mesenquimais osteoprogenitoras em osteoblastos, mesmo quando em meio com propriedades osteoindutoras.

De modo geral, os achados no presente trabalho condizem com a bibliografia disponível em relação ao uso dos biomateriais testados referente à eficiência dos mesmos para a utilização na área de medicina regenerativa.

Este trabalho foi de suma importância, já que resultou em novos entendimentos sobre a ação desses biomateriais e possibilitam a criação de novas tecnologias para área médica. Os biomateriais estudados são

promissores para estudos futuros no campo da engenharia de tecidos e medicina regenerativa.

## 6. Conclusão

Os biomateriais Biosilicato®, F18, 45S5 e HAp não apresentaram características citotóxicas. Nenhuma concentração analisada diminuiu a viabilidade celular em mais de 30%, conforme preconiza a norma ISO 10993-5. Os biomateriais apresentaram boa biocompatibilidade com as células. Somente o biovidro 45S5, comercialmente utilizado, diminuiu a viabilidade celular nos experimentos realizados. Os biomateriais, exceto HAp que manteve resultados de diferenciação osteogênicas similares ao controle não diferenciado, apresentaram bons resultados de osteoindução, em meio de cultura osteogênico.

## 7. Perspectivas

Para a obtenção de dados mais robustos referentes à interação entre células e esses biomateriais, as perspectivas envolvem realizar outros testes como microscopia eletrônica de Varredura (MEV) para avaliar a superfície dos materiais e Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) para determinação semi-quantitativa dos componentes das biocerâmicas em contato com as células.

Em estudos futuros, esses resultados poderão servir como ponto de partida no que se refere à engenharia tecidual óssea utilizando biomateriais para a construção de *scaffolds*, servindo como suporte para avaliações mais aprofundadas no tema. Nesse contexto, as perspectivas futuras incluem:

- Testar diferentes protocolos de descelularização de fígados de ratos;
- Utilizar as matrizes descelularizadas para a produção de biomateriais para serem utilizados na bioimpressora e eletrofição;
- Associar estruturas de policaprolactona obtidas a partir das matrizes descelularizadas aos *scaffolds* obtidos por impressão 3D e a redes nanoestruturadas produzidas a partir de *electrospinning* para conferir estrutura mecânica mais rígida, similar ao tecido ósseo;
- Combinar aos biomateriais as estruturas acima citadas (biotintas, eletrofiados, impresso 3D e biovidros) com hidrogéis de alginato e colágeno, bem como a vidros bioativos capazes de incrementar a viabilidade de células-tronco e para mimetizar a porção inorgânica da matriz extracelular óssea nativa;
- Testar *in vitro* os *scaffolds* produzidos a partir da associação dos biomateriais com células-tronco mesenquimais e células-tronco diferenciadas;
- Analisar o potencial de regeneração osteogênica dos *scaffolds* produzidos a partir de testes em modelos murinos.

## 8. Referências

AGUIRRE, Aitor et al. Extracellular calcium modulates in vitro bone marrow-derived Flk-1+ CD34+ progenitor cell chemotaxis and differentiation through a calcium-sensing receptor. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 393, n. 1, p. 156-161, 2010.

AKIMOVA, Anna. V. et al. Association of peripheral bone fractures and signs of undifferentiated connective tissue dysplasia. **Procedia Structural Integrity**, v. 40, p. 12-16, 2022.

AMBROSIO, Luca et al. Innovative biomaterials for the treatment of bone cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 15, p. 8214, 2021.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Key Statistics About Bone Cancer. Atlanta, 2022. Disponível em: <https://www.cancer.org/content/dam/CRC/PDF/Public/8562.00.pdf>

ARCEO-MENDOZA, Rod Marianne; CAMACHO, Pauline M. Postmenopausal osteoporosis: latest guidelines. **Endocrinology and Metabolism Clinics**, v. 50, n. 2, p. 167-178, 2021.

ASSMUS, Adrienne M. *et al.* Cellular plasticity: a mechanism for homeostasis in the kidney. **Acta Physiologica**, v. 229, n. 1, p. e13447, 2020.

BAINO, Francesco; NOVAJRA, Giorgia; VITALE-BROVARONE, Chiara. Bioceramics and scaffolds: a winning combination for tissue engineering. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 3, p. 202, 2015.

BANIEBRAHIMI, Ghazaleh; KHANMOHAMMADI, Razieh; MIR, Fatemeh. Teeth-derived stem cells: A source for cell therapy. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 3, p. 2426-2435, 2019.

BENETTI, Francine *et al.* Cytotoxicity and biocompatibility of a new bioceramic endodontic sealer containing calcium hydroxide. **Brazilian oral research**, v. 33, 2019.

BERGSMA, Jan Eelco; BOS, Rudolf. R. Fracture healing of the face. General principals. **Nederlands Tijdschrift Voor Tandheelkunde**, v. 104, n. 11, p. 425-427, 1997.

BERNARDI, Lisiane *et al.* The isolation of stem cells from human deciduous teeth pulp is related to the physiological process of resorption. **Journal of endodontics**, v. 37, n. 7, p. 973-979, 2011.

BIGHETTI-TREVISAN, Rayana Longo *et al.* Bioactive glass-ceramic for bone tissue engineering: an in vitro and in vivo study focusing on osteoclasts. **Brazilian Oral Research**, v. 36, 2022.

BONEWALD, Lynda F. Osteocytes as dynamic multifunctional cells. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1116, n. 1, p. 281-290, 2007.

BOTTEZINI, Paola Arosi. Efeito da remoção seletiva de tecido cariado nas características imunofenotípicas apresentadas por células-tronco mesenquimais da polpa de dentes decíduos humanos. Dissertação (Mestrado em Programa de Pós-graduação em Odontologia UFRGS) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre 2019

BRASIL. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. PORTARIA Nº 451, DE 9 DE JUNHO DE 2014, Aprova o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Osteoporose. Brasília, 2014.

BRIÃO, Marina Moraes Mattaredona. Cultivo de células-tronco mesenquimais em *scaffolds* de alginato associado a colágeno para aplicação na engenharia tecidual. Trabalho de Conclusão de Curso. Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. 2017.

BUCKWALTER, Joseph. A.; COOPER, R. R. Bone structure and function. **Instructional course lectures**, v. 36, p. 27-48, 1987.

BUSHINSKY, David A. Metabolic alkalosis decreases bone calcium efflux by suppressing osteoclasts and stimulating osteoblasts. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 271, n. 1, p. F216-F222, 1996.

CABLE, Jennifer et al. Adult stem cells and regenerative medicine—a symposium report. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1462, n. 1, p. 27-36, 2020.

CALVI, Laura M.; LINK, Daniel C. The hematopoietic stem cell niche in homeostasis and disease. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 126, n. 22, p. 2443-2451, 2015.

CAMACHO, Pauline M. et al. American Association Of Clinical Endocrinologists and American College of Endocrinology clinical practice guidelines for the diagnosis and treatment of postmenopausal osteoporosis—2016--executive summary. **Endocrine Practice**, v. 22, n. 9, p. 1111-1118, 2016.

CAMAL RUGGIERI, Iván Nadir et al. Bone fracture healing: perspectives according to molecular basis. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 39, n. 3, p. 311-331, 2021.

CAMPANINI, Lidiani Aparecida. Avaliação da atividade bactericida do biovidro F18 e F18 com prata para aplicações médicas. Dissertação de mestrado. Programa de pós-graduação em Biotecnologia – PPGBiotec. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2015.

CAPLAN, Arnold I. “Review: mesenchymal stem cells: cell-based reconstructive therapy in orthopedics.” **Tissue engineering** v. 11, p.7-8. 2005

CAPLAN, Arnold I. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. **Journal of cellular physiology**, v. 213, n. 2, p. 341-347, 2007.

CAPLAN, Arnold I. Mesenchymal stem cells. **Journal of orthopaedic research**, v. 9, n. 5, p. 641-650, 1991.

CAPLAN, Arnold I. Mesenchymal stem cells: time to change the name!. **Stem cells translational medicine**, v. 6, n. 6, p. 1445-1451, 2017.

CARLO, Emily Correna *et al.* Avaliação do efeito osteoindutor da hidroxiapatita e do biovidro implantados em tecido subcutâneo de cão. **Revista Ceres**, v.54, p.492-500 2007.

CHEN, Jan Hung.; CHAO, Liu.; LIDAN, You.; CRAIG, Simmons A. Boning up on Wolff's law: mechanical regulation of the cells that make and maintain bone. **J Biomech**, v. 43, n. 1, p. 108-118, 2010.4

CHINAGLIA, Clever Ricardo *et al.* O uso de um vidro altamente bioativo para conferir bioatividade à superfície do titânio: desenvolvimento de um método para recobrimentos descontínuos. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2013.

CONNETT, Richard J. In vivo control of phosphofructokinase: system models suggest new experimental protocols. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 257, n. 4, p. R878-R888, 1989.

COTTRELL, Jessica A. *et al.* The biology of bone and ligament healing. **Foot and ankle clinics**, v. 21, n. 4, p. 739-761, 2016.

CRUSH, Jos *et al.* Bioactive glass: methods for assessing angiogenesis and osteogenesis. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, p. 1523, 2021.

DALLABRIDA, Ademar L. *et al.* Bioceramic characterization of calcium phosphates microstructured in different composition in sheep. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, p. 1327-1336, 2018.

DING, Dah-Ching; SHYU, Woei-Cherng; LIN, Shinn-Zong. Mesenchymal stem cells. **Cell transplantation**, v. 20, n. 1, p. 5-14, 2011.

DOMINICI, Massimo. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-317, 2006.

DOS SANTOS ALMEIDA, Renata *et al.* Avaliação da fase inicial do reparo ósseo após implantação de biomateriais. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 13, n. 3, p. 331-336, 2014.

DOS SANTOS, Marcus Vinicius Bezerra.; OSAJIMA, Josy. A.; DA SILVA FILHO, Edson Cavalcanti. Hydroxyapatite: support for drug release and antimicrobial properties. **Cerâmica**, v. 62, p. 256-265, 2016.

DULAK, Józef *et al.* Adult stem cells: hopes and hypes of regenerative medicine. **Acta Biochimica Polonica**, v. 62, n. 3, 2015.

EDGAR, Lauren. *et al.* Regenerative medicine, organ bioengineering and transplantation. **Journal of British Surgery**, v. 107, n. 7, p. 793-800, 2020.

ELGALI, Ibrahim *et al.* Guided bone regeneration: materials and biological mechanisms revisited. **European journal of oral sciences**, v. 125, n. 5, p. 315-337, 2017.

EL-GENDY, Reem *et al.* Osteogenic differentiation of human dental pulp stromal cells on 45S5 Bioglass® based scaffolds in vitro and in vivo. **Tissue Engineering Part A**, v. 19, n. 5-6, p. 707-715, 2013.

ERECIŃSKA, Maria; DEAS, Judith.; SILVER, Ian. A. The effect of pH on glycolysis and phosphofructokinase activity in cultured cells and synaptosomes. **Journal of neurochemistry**, v. 65, n. 6, p. 2765-2772, 1995.

EVANS, Francis Gaynor. **Stress and strain in bones: their relation to fractures and osteogenesis**. Thomas, 1957.

FERRAZ, Emanuela P. *et al.* Bioactive glass-based surfaces induce differential gene expression profiling of osteoblasts. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 105, n. 2, p. 419-423, 2017.

FERRAZ, Emanuela Prado. **Engenharia de tecidos**: efeito da associação de células e o Biosilicato® com duas fases cristalinas (BioS-2P) no reparo de defeitos ósseos. 2016. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/58/58136/tde-23092016-154149/>.

FERRO, Federico; SPELAT, Renza; BAHENEY, Chelsea S. Dental pulp stem cell (DPSC) isolation, characterization, and differentiation. In: **Stem Cells and Tissue Repair**. Humana Press, New York, NY, 2014. p. 91-115.

FILLINGHAM, Yale.; JACOBS, Joshua. Bone grafts and their substitutes. **The bone & joint journal**, v. 98, n. 1\_Supple\_A, p. 6-9, 2016.

FLORENCIO-SILVA, Rinaldo et al. Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells. **BioMed research international**, v. 2015, 2015.

FROST, Harold M. On our age-related bone loss: insights from a new paradigm. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 12, n. 10, p. 1539-1546, 1997.

FROST, Harold M. The Utah paradigm of skeletal physiology: an overview of its insights for bone, cartilage and collagenous tissue organs. **Journal of bone and mineral metabolism**, v. 18, n. 6, p. 305-316, 2000.

FROST, Harold. M. A Proposed General Model of the "Mechanostat"(Suggestions From A New Skeletal-Biologic Paradigm). **Anatomical Record**, v. 244, p. 139-147, 1996.

FROST, Harold. M. Osteoporoses: new concepts and some implications for future diagnosis, treatment and research (based on insights from the Utah paradigm). **Ernst Schering Research Foundation AG**, p. 7-57, 1998.

FULORIA, Shivkanya et al. Regenerative potential of stem cells derived from human exfoliated deciduous (SHED) teeth during engineering of human body tissues. **Current Stem Cell Research & Therapy**, v. 16, n. 5, p. 507-517, 2021.

GEORGE, Suchi Mercy et al. Multifunctional Hydroxyapatite Composites for Orthopedic Applications: A Review. **ACS Biomaterials Science & Engineering**, 2022.

GHIȚULICĂ, Cristina-Daniela et al. Synthesis and Characterization of ZnO (MgO)-CaO-SiO<sub>2</sub>-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> Bioglass Obtained by Sol-Gel Method in Presence of Surfactant Agent. **Gels**, v. 7, n. 4, p. 187, 2021.

GIANNOUDIS, Peter V.; EINHORN, Thomas A.; MARSH, David. Fracture healing: the diamond concept. **injury**, v. 38, p. S3-S6, 2007.

GIRÓN, Juliana. *et al.* Biomaterials for bone regeneration: an orthopedic and dentistry overview. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 54, 2021.

GRABOWSKI, Peter. Physiology of bone. **Calcium and Bone Disorders in Children and Adolescents**, v. 28, p. 33-55, 2015.

GUVEN, Yeliz *et al.* X-ray diffraction analysis of MTA-Plus, MTA-Angelus and DiaRoot BioAggregate. **European journal of dentistry**, v. 8, n. 02, p. 211-215, 2014.

HARDY, Eugenio; FERNANDEZ-PATRON, Carlos. Destroy to rebuild: the connection between bone tissue remodeling and matrix metalloproteinases. **Frontiers in physiology**, v. 11, p. 47, 2020.

HART, Nicolas H. et al. Mechanical basis of bone strength: influence of bone material, bone structure and muscle action. **Journal of musculoskeletal & neuronal interactions**, v. 17, n. 3, p. 114, 2017.

HAUGE, Ellen M. *et al.* Cancellous bone remodeling occurs in specialized compartments lined by cells expressing osteoblastic markers. **Journal of bone and mineral research**, v. 16, n. 9, p. 1575-1582, 2001.

HEIDARI, Soolmaz *et al.* Effect of addition of titanium on structural, mechanical and biological properties of 45S5 glass-ceramic. **Ceramics International**, v. 44, n. 10, p. 11682-11692, 2018.

HENCH, Larry L. Bioceramics: from concept to clinic. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 74, n. 7, p. 1487-1510, 1991.

HENCH, Larry. L.; JONES, Julian. R. Bioactive glasses: frontiers and challenges, **Front. Bioeng. Biotechnol.** 3 (2015) 1–12. 2015.

HERMERÉN, Göran. The ethics of regenerative medicine. **Biologia Futura**, v. 72, n. 2, p. 113-118, 2021.

HIDALGO PITALUGA, Lucas et al. Electrospun F18 bioactive Glass/PCL—Poly ( $\epsilon$ -caprolactone)—Membrane for guided tissue regeneration. **Materials**, v. 11, n. 3, p. 400, 2018.

HODNE, Kjetil et al. Optimized conditions for primary culture of pituitary cells from the Atlantic cod (*Gadus morhua*). The importance of osmolality, pCO<sub>2</sub>, and pH. **General and comparative endocrinology**, v. 178, n. 2, p. 206-215, 2012.

HU, Jue et al. Vanillin-bioglass cross-linked 3D porous chitosan scaffolds with strong osteopromotive and antibacterial abilities for bone tissue engineering. **Carbohydrate polymers**, v. 271, p. 118440, 2021.

HUME, David. A. Differentiation and heterogeneity in the mononuclear phagocyte system. **Mucosal immunology**, v. 1, n. 6, p. 432-441, 2008.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (Brasil). Osteossarcoma. Brasília, DF: **Ministério da Saúde**, 2021. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-infantojuvenil/osteossarcoma/profissional-de-saude>>

ISO 10993–5: 2009 Biological evaluation of medical devices—part 5: tests for in vitro cytotoxicity. **International Organization for Standardization**, Geneva, 2009.

JEE, Webster. S. Principles in bone physiology. **J Musculoskelet Neuronal Interact**, v. 1, n. 1, p. 11-13, 2000.

JELL Gavin, STEVENS M. M. Gene activation by bioactive glasses. **J Mater Sci Mater Med.** 2006 Nov;17(11):997-1002.

JIN, Shue et al. Recent advances in PLGA-based biomaterials for bone tissue regeneration. **Acta Biomaterialia**, v. 127, p. 56-79, 2021.

JITARU, Stefan et al. The use of bioceramics in endodontics-literature review. **Clujul medical**, v. 89, n. 4, p. 470, 2016.

JONES, Julian R. Reprint of: Review of bioactive glass: From Hench to hybrids. **Acta biomaterialia**, v. 23, p. S53-S82, 2015.

JUHL IV, Otto J.; LATIFI, Seyed Mohsen; DONAHUE, Henry J. Effect of carbonated hydroxyapatite submicron particles size on osteoblastic differentiation. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 109, n. 9, p. 1369-1379, 2021.

KACENA, Melissa A. *et al.* Megakaryocyte-osteoblast interaction revealed in mice deficient in transcription factors GATA-1 and NF-E2. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 19, n. 4, p. 652-660, 2004.

KAMAL, Mohammad *et al.* Comparison of bone grafts from various donor sites in human bone specimens. **Journal of Craniofacial Surgery**, v. 29, n. 6, p. 1661-1665, 2018.

KARGOZAR, Saeid *et al.* "Hard" ceramics for "Soft" tissue engineering: Paradox or opportunity?. **Acta biomaterialia**, v. 115, p. 1-28, 2020.

KARSENTY, Gerard. Transcriptional control of skeletogenesis. **Annual review of genomics and human genetics**, v. 9, n. 1, p. 183-196, 2008.

KASSIMI, Mariam *et al.* Cerebral fat embolism syndrome after long bone fracture: A case report. **Radiology Case Reports**, v. 17, n. 2, p. 283-285, 2022.

KAWACHI, Elizabete Y. *et al.* Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. **Química nova**, v. 23, p. 518-522, 2000.

KHAJURIA, Deepak Kumar; RAZDAN, Rema; MAHAPATRA, D. Roy. Medicamentos para o tratamento da osteoporose: revisão. **Revista brasileira de reumatologia**, v. 51, p. 372-382, 2011.

KHAN, Safdar N. *et al.* The biology of bone grafting. **JAAOS-Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons**, v. 13, n. 1, p. 77-86, 2005.

KHAN, Safdar N. *et al.* The biology of bone grafting. **JAAOS-Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons**, v. 13, n. 1, p. 77-86, 2005.

KIM, Dane *et al.* Gingiva-derived mesenchymal stem cells: potential application in tissue engineering and regenerative medicine-a comprehensive review. **Frontiers in immunology**, v. 12, p. 667221, 2021.

KOCH, Ute; RADTKE, Freddy. Notch signaling in solid tumors. **Current topics in developmental biology**, v. 92, p. 411-455, 2010.

KONIECZNY, Joanna; ARRANZ, Lorena. Updates on old and weary haematopoiesis. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 9, p. 2567, 2018.

KRAUKLIS, Andrey E.; KREICBERGS, Imants; DREYER, Ilo. Modified Ginstling–Brounshtein model for wet precipitation synthesis of hydroxyapatite: analytical and experimental study. **Acta of Bioengineering and Biomechanics**, v. 20, n. 4, 2018.

LAN, Tianxia; LUO, Min; WEI, Xiawei. Mesenchymal stem/stromal cells in cancer therapy. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 14, n. 1, p. 1-16, 2021.

LANGER, Robert; VACANTI, Joseph P. May 14, 1993." **Tissue Engineering.**" **Science**, v. 260, n. 5110, p. 920-926.

LEE, Don K.; SONG, Sun U. Immunomodulatory mechanisms of mesenchymal stem cells and their therapeutic applications. **Cellular immunology**, v. 326, p. 68-76, 2018.

LEE, Ju Kyung *et al.* Physicochemical properties of epoxy resin-based and bioceramic-based root canal sealers. **Bioinorganic chemistry and applications**, v. 2017, 2017.

LI, Jiliang; KACENA, Melissa A.; STOCUM, David L. Fracture healing. In: **Basic and Applied bone biology**. Academic Press, 2019. p. 235-253.

LI, Yan *et al.* B cells and T cells are critical for the preservation of bone homeostasis and attainment of peak bone mass in vivo. **Blood**, v. 109, n. 9, p. 3839-3848, 2007.

LOS, Marek J.; HUDECKI, Andrzej; WIECHEC, Emilia (Ed.). **Stem Cells and Biomaterials for Regenerative Medicine**. Academic Press, 2019.

MAJIDINIA, Maryam; SADEGHPOUR, Alireza; YOUSEFI, Bahman. The roles of signaling pathways in bone repair and regeneration. **Journal of cellular physiology**, v. 233, n. 4, p. 2937-2948, 2018.

MÄKITIE, Riikka Emilia. *et al.* Genetic variation in WNT16 and its association with bone mineral density, fractures and osteoporosis in children with bone fragility. **Bone reports**, v. 16, p. 101525, 2022.

MALINA, Dagmara; BIERNAT, Kamila; SOBCZAK-KUPIEC, Agnieszka. Studies on sintering process of synthetic hydroxyapatite. **Acta Biochimica Polonica**, v. 60, n. 4, 2013.

MAQBOOL, Muhammad *et al.* Synthesis, characterization, antibacterial properties, and in vitro studies of selenium and strontium co-substituted hydroxyapatite. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 8, p. 4246, 2021.

MARKOV, Alexander *et al.* Mesenchymal stem/stromal cells as a valuable source for the treatment of immune-mediated disorders. **Stem cell research & therapy**, v. 12, n. 1, p. 1-30, 2021.

MARQUES, Daniella Maia *et al.* Biomaterials for orthopedics: anti-biofilm activity of a new bioactive glass coating on titanium implants. **Biofouling**, v. 36, n. 2, p. 234-244, 2020.

MARSELL, Richard; EINHORN, Thomas A. The biology of fracture healing. **Injury**, v. 42, n. 6, p. 551-555, 2011.

MARUYAMA, Masahiro *et al.* Modulation of the inflammatory response and bone healing. **Frontiers in endocrinology**, v. 11, p. 386, 2020.

MAURMANN, Natasha. *et al.* Mesenchymal stem cells cultivated on scaffolds formed by 3D printed PCL matrices, coated with PLGA electrospun nanofibers for use in tissue engineering. **Biomedical Physics & Engineering Express**, v. 3, n. 4, p. 45005, jun. 2017. Acesso em: 5 dez. 2019.

MAURMANN, Natasha.; SIQUEIRA, Renato L.; PAVULACK, Daniela. P.; BRIAO, Marina. M. M.; ZANOTTO, Edgar. D; PRANKE, Patrícia. Viability of Keratinocytes Cultivated with Bioactive Ceramics. **10º Congresso Latino-Americano De Órgãos Artificiais E Biomateriais (COLAOB)**. Sociedade Latino-Americana de Biomateriais e Órgãos Artificiais (SLABO). João Pessoa - Paraíba, 2018. Acesso em: 8 dez. 2019.

MAZZONI, Elisa *et al.* Bioactive materials for soft tissue repair. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 9, p. 613787, 2021.

MENCZEL, Jacob. *et al.* Effect of a low calcium diet on bone crystallinity and skeletal uptake of Ca45 in rats. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 112, n. 1, p. 128-132, 1963.

MENG, Zhaotong *et al.* Electrical, mechanical and thermal properties of ZnO/SiR composite dielectric. **Journal of Materials Science: Materials in Electronics**, v. 32, n. 13, p. 17253-17265, 2021.

MICHAŁ, Wojasiński; EWA, Duszyńska; TOMASZ, Ciach. Lecithin-based wet chemical precipitation of hydroxyapatite nanoparticles. **Colloid and polymer science**, v. 293, n. 5, p. 1561-1568, 2015.

MOYSÉS, José M. *et al.* Estudo dos tipos mais comuns de fraturas ósseas ocasionadas por acidentes automobilísticos que dão entrada em Serviço de Emergência. **J. bras. med**, p. 69-73, 2000.

NIKOLOVA, Maria P.; CHAVALI, Murthy S. Recent advances in biomaterials for 3D scaffolds: A review. **Bioactive materials**, v. 4, p. 271-292, 2019.

OLDER, John. Introduction: history and research on bone transplantation. **Bone Implant graftingSpringer**, 1992.

OLIVEIRA, Marcelo Bragança dos Reis *et al.* Fratura patológica devido à metástase óssea do câncer de pulmão: fatores de risco e sobrevida. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 26, p. 388-393, 2018.

PALUMBO, Carla. A three-dimensional ultrastructural study of osteoid-osteocytes in the tibia of chick embryos. **Cell and tissue research**, v. 246, n. 1, p. 125-131, 1986.

PARFITT, A. Michael. The actions of parathyroid hormone on bone: Relation to bone remodeling and turnover, calcium homeostasis, and metabolic bone diseases: Part II of IV parts: PTH and bone cells: Bone turnover and plasma calcium regulation. **Metabolism**, v. 25, n. 8, p. 909-955, 1976.

PASSOS, Tathiane Ferroni *et al.* Bactericidal activity and biofilm inhibition of F18 bioactive glass against *Staphylococcus aureus*. **Materials Science and Engineering: C**, v. 118, p. 111475, 2021.

PINA, Sandra *et al.* Bioceramics for osteochondral tissue engineering and regeneration. **Osteochondral tissue engineering**, p. 53-75, 2018.

PIRES, Ana Luiza R.; BIERHALZ, Andrea CK; MORAES, Angela M. Biomaterials: types, applications, and market. **Química Nova**, v. 38, p. 957-971, 2015.

PUTRA, Niko Eka. *et al.* Multi-material additive manufacturing technologies for Ti-, Mg-, and Fe-based biomaterials for bone substitution. **Acta biomaterialia**, v. 109, p. 1-20, 2020.

Raghavendra Srinidhi Surya *et al.* Bioceramics in endodontics - a review. **J Istanbul Univ Fac Dent**. (3 Suppl 1):S128-S137. 2017

RAMESH, Singh. *et al.* Sintering properties of hydroxyapatite powders prepared using different methods. **Ceramics International**, v. 39, n. 1, p. 111-119, 2013.

RECLARU, Lucien *et al.* Are Zirconia Bioceramics and Ceramics Intended to Come in Contact with Skin Inert?. **Materials**, v. 13, n. 7, p. 1697, 2020.

RIZWAN, Muhammad; HAMDY, Mohd; BASIRUN, Wan Jeffrey. Bioglass® 45S5-based composites for bone tissue engineering and functional applications. **Journal of biomedical materials research Part A**, v. 105, n. 11, p. 3197-3223, 2017.

ROSETI, Livia *et al.* Scaffolds for bone tissue engineering: state of the art and new perspectives. **Materials Science and Engineering: C**, v. 78, p. 1246-1262, 2017.

SCHEPERS, Evert. J. *et al.* Bioactive glass particles of narrow size range: a new material for the repair of bone defects. **Implant dentistry**, v. 2, n. 3, p. 151-156, 1993.

SCHMIDT, Andrew H. Autologous bone graft: Is it still the gold standard?. **Injury**, v. 52, p. S18-S22, 2021.

SHANG, Lingling; SHAO, Jinlong; GE, Shaohua. Immunomodulatory Properties: The Accelerant of Hydroxyapatite-Based Materials for Bone Regeneration. **Tissue Engineering Part C: Methods**, 2022.

SHARPE, Paul T. Dental mesenchymal stem cells. **Development**, v. 143, n. 13, p. 2273-2280, 2016.

SHI, Xin; MAO, Jing; LIU, Yan. Pulp stem cells derived from human permanent and deciduous teeth: Biological characteristics and therapeutic applications. **Stem cells translational medicine**, v. 9, n. 4, p. 445-464, 2020.

SILVER, Ian A.; DEAS, Judith; ERECIŃSKA, Maria. Interactions of bioactive glasses with osteoblasts in vitro: effects of 45S5 Bioglass®, and 58S and 77S bioactive glasses on metabolism, intracellular ion concentrations and cell viability. **Biomaterials**, v. 22, n. 2, p. 175-185, 2001.

SIQUEIRA, Renato L. *et al.* Bioactive gel-glasses with distinctly different compositions: bioactivity, viability of stem cells and antibiofilm effect against *Streptococcus mutans*. **Materials Science and Engineering: C**, v. 76, p. 233-241, 2017.

SIQUEIRA, Renato Luiz; ZANOTTO, Edgar Dutra. Biosilicato®: histórico de uma vitrocerâmica brasileira de elevada bioatividade. **Química Nova**, v. 34, p. 1231-1241, 2011.

SMITH, Austin. A glossary for stem-cell biology. **Nature**, v. 441, n. 7097, p. 1060-1060, 2006.

SNIPPERT, Hugo J.; CLEVERS, Hans. Tracking adult stem cells. **EMBO reports**, v. 12, n. 2, p. 113-122, 2011.

SOBHANI, Aligholi *et al.* Multipotent stem cell and current application. **Acta Medica Iranica**, p. 6-23, 2017.

SONG, Na; SCHOLTEMEIJER, Martijn; SHAH, Khalid. Mesenchymal stem cell immunomodulation: mechanisms and therapeutic potential. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 41, n. 9, p. 653-664, 2020.

SOUZA, Gilberto de. *et al.* Hidroxiapatita como biomaterial utilizado em enxerto ósseo na impantodontia: Uma reflexão. **Revista Odontológica de Araçatuba**, v. 37, n. 3, p. 33-39, 2016.

SOUZA, Marina Trevelin. Desenvolvimento de Manta Flexível Altamente Bioativa. Dissertação (mestrado pelo Programa de Pós-graduação em Ciência e Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de São Carlos. São Carlos. 2011.

SOUZA, Marina Trevelin. Desenvolvimento e caracterização de tecidos vítreos flexíveis altamente bioativos. Tese (doutorado pelo Programa de Pós-graduação em Ciência e Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de São Carlos. São Paulo. 2015.

SPIRANDELI, Bruno Roberto *et al.* Incorporation of 45S5 bioglass via sol-gel in  $\beta$ -TCP scaffolds: Bioactivity and antimicrobial activity evaluation. **Materials Science and Engineering: C**, v. 131, p. 112453, 2021.

SZCZEŚ, Aleksandra; HOŁYSZ, Lucyna; CHIBOWSKI, Emil. Synthesis of hydroxyapatite for biomedical applications. **Advances in colloid and interface science**, v. 249, p. 321-330, 2017.

TAGUCHI, Tomoaki *et al.* Regenerative medicine using stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED): a promising new treatment in pediatric surgery. **Surgery today**, v. 49, n. 4, p. 316-322, 2019.

TEITELBAUM, Steven L.; ROSS, Patrick Ross. Genetic regulation of osteoclast development and function. **Nature Reviews Genetics** v. 4, n. 8, p. 638-649. 2003

THOMAS, Mark V.; PULEO, David A.; AL-SABBAGH, Mohanad. Bioactive glass three decades on. **Journal of Long-Term Effects of Medical Implants**, v. 15, n. 6, 2005.

UDER, Christiane *et al.* Mammalian MSC from selected species: Features and applications. **Cytometry Part A**, v. 93, n. 1, p. 32-49, 2018.

URIST, Marshall R. Bone: formation by autoinduction. **Science**, v. 150, n. 3698, p. 893-899, 1965.

VÄLIMÄKI, Ville-Valtteri; ARO, Hannu T. Molecular basis for action of bioactive glasses as bone graft substitute. **Scandinavian journal of surgery**, v. 95, n. 2, p. 95-102, 2006.

VALLONE, VB Fernández *et al.* Mesenchymal stem cells and their use in therapy: what has been achieved?. **Differentiation**, v. 85, n. 1-2, p. 1-10, 2013.

VARGAS, Gabriela E. *et al.* Effect of nano-sized bioactive glass particles on the angiogenic properties of collagen based composites. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 24, n. 5, p. 1261-1269, 2013.

WAGERS, Amy J.; WEISSMAN, Irving L. Plasticity of adult stem cells. **Cell**, v. 116, n. 5, p. 639-648, 2004.

WANG, Sainan *et al.* Characteristics and effects on dental pulp cells of a polycaprolactone/submicron bioactive glass composite scaffold. **Journal of Endodontics**, v. 42, n. 7, p. 1070-1075, 2016.

WANG, Yaping *et al.* Biomimetic glycopeptide hydrogel coated PCL/nHA scaffold for enhanced cranial bone regeneration via macrophage M2 polarization-induced osteo-immunomodulation. **Biomaterials**, v. 285, p. 121538, 2022.

WEILBAECHER, Katherine N.; GUISE, Theresa A.; MCCAULEY, Laurie K. Cancer to bone: a fatal attraction. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, n. 6, p. 411-425, 2011.

WEINMANN, Joseph. P.; SICHER, Harry. Bone tissue. **Bone and bones. fundamentals of bone biology, 2nd ed. St. Louis, MO: CV Mosby.** p, p. 18-46, 1955.

WEISS, Andreas Robert Rudolf; DAHLKE, Marc. Hendrik. Immunomodulation by mesenchymal stem cells (MSCs): mechanisms of action of living, apoptotic, and dead MSCs. *Front Immunol* 10: 1191. **Link: <https://bit.ly/2YPSmNi>**, 2019.

WEITZMANN, M. Neale *et al.* Estrogen deficiency and bone loss: an inflammatory tale. **The Journal of clinical investigation**, v. 116, n. 5, p. 1186-1194, 2006.

WHEELER, Donna. L. *et al.* Effect of bioactive glass particle size on osseous regeneration of cancellous defects. **Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and the Australian Society for Biomaterials**, v. 41, n. 4, p. 527-533, 1998.

WILLIAMS, David Franklyn (Ed.). **Definitions in biomaterials: proceedings of a consensus conference of the European Society for Biomaterials, Chester, England, March 3-5, 1986.** Elsevier Science Limited, 1987.

WOLFF, Julius. Concept of the Law of Bone Remodelling. In: **The Law of Bone Remodelling**. Springer, Berlin, Heidelberg. 1986

WU, Tsai-Feng Lin; DAVIS, E. Jack. Regulation of glycolytic flux in an energetically controlled cell-free system: the effects of adenine nucleotide ratios, inorganic phosphate, pH, and citrate. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 209, n. 1, p. 85-99, 1981.

XU, Dong et al. Tailorable hierarchical structures of biomimetic hydroxyapatite micro/nano particles promoting endocytosis and osteogenic differentiation of stem cells. **Biomaterials science**, v. 8, n. 12, p. 3286-3300, 2020.

YANG Qingbo, et al. In vitro study of improved wound-healing effect of bioactive borate-based glass nano-/micro-fibers. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**. 55:105-17. 2015

YELTEN-YILMAZ, Azade; YILMAZ, Suat. Wet chemical precipitation synthesis of hydroxyapatite (HA) powders. **Ceramics International**, v. 44, n. 8, p. 9703-9710, 2018.

YOUNG, Henry E.; BLACK JR, Asa C. Adult stem cells. **The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology: An Official Publication of the American Association of Anatomists**, v. 276, n. 1, p. 75-102, 2004.

YU, Qingqing; CHANG, Jiang; WU, Chengtie. Silicate bioceramics: from soft tissue regeneration to tumor therapy. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 7, n. 36, p. 5449-5460, 2019.

ZANOTTO, Edgar Dutra *et al.* **Process and compositions for preparing particulate, bioactive or resorbable biosilicates for use in the treatment of oral ailments**. U.S. Patent Application n. 10/546,365, 9 nov. 2006.

ZANOTTO, Edgar Dutra. *et al.* Processo de preparação de biosilicatos particulados bioativos e reabsorvíveis, composições para preparar ditos

biosilicatos, biosilicatos particulados e reabsorvíveis e uso dos mesmos no tratamento de afecções bucais. *Patent WO/2004/074199*, **2004**.

ZHAO, Ningbo et al. Characteristics and tissue regeneration properties of gingiva-derived mesenchymal stem cells. **Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression**, v. 25, n. 2, 2015.