



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Programa de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas

Tese de Doutorado

Caracterização estrutural e avaliação *in vitro* e *in vivo* do estímulo angiogênico do cobalto incorporado em vidro bioativo e desenvolvimento de *scaffolds* híbridos de poli (álcool vinílico) / vidro bioativo contendo cobalto

Autora: Andréia Grossi Santos de Laia

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Marivalda de Magalhães Pereira

Coorientador: Prof. Dr. Marcos Augusto de Sá

Belo Horizonte - MG

2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Programa de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas

Andréia Grossi Santos de Laia

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO*
DO ESTÍMULO ANGIOGÊNICO DO COBALTO INCORPORADO EM VIDRO
BIOATIVO E DESENVOLVIMENTO DE *SCAFFOLDS* HÍBRIDOS DE POLI
(ÁLCOOL VINÍLICO) / VIDRO BIOATIVO CONTENDO COBALTO**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas da Escola de Engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas.

Área de concentração: Ciência e Engenharia de Materiais.

Orientadora: Marivalda de Magalhães Pereira.

Coorientador: Marcos Augusto de Sá.

Belo Horizonte – MG

Universidade Federal de Minas Gerais

Escola de Engenharia

2020

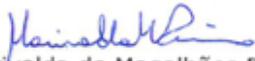
- L185c Laia, Andréia Grossi Santos de.
Caracterização estrutural e avaliação *in vitro* e *in vivo* do estímulo angiogênico do cobalto incorporado em vidro bioativo e desenvolvimento de *scaffolds* híbridos de poli (álcool vinílico) / vidro bioativo contendo cobalto [recurso eletrônico] / Andréia Grossi Santos de Laia. - 2020.
1 recurso online (xvii, 116 f. : il., color.) : pdf.
- Orientadora: Marivalda de Magalhães Pereira.
Coorientador: Marcos Augusto de Sá.
- Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Engenharia.
- Apêndice: f. 116.
- Bibliografia: f. 97-115.
Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.
1. Materiais - Teses. 2. Ciência dos materiais - Teses. 3. Cobalto - Teses. 4. Vidros bioativos - Teses. I. Pereira, Marivalda de Magalhães. II. Sá, Marcos Augusto de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Engenharia. IV. Título.
- CDU: 620(043)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
 ESCOLA DE ENGENHARIA
 Programa de Pós-Graduação em Engenharia
 Metalúrgica, Materiais e de Minas



Tese intitulada "**Caracterização Estrutural e Avaliação *In Vitro* e *In Vivo* do Estímulo Angiogênico do Cobalto Incorporado em Vidro Bioativo e Desenvolvimento de Scaffolds Híbridos de Poli (Álcool Vinílico) / Vidro Bioativo Contendo Cobalto**", área de concentração: Ciência e Eng. Materiais, apresentada pela candidata **Andréia Grossi Santos de Laia**, para obtenção do grau de Doutora em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas, aprovada pela comissão examinadora constituída pelos seguintes membros:

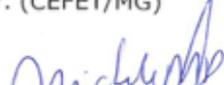

 Prof^a Marivalda de Magalhães Pereira
 Orientadora - PhD (UFMG)

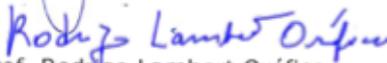

 Prof. Marcos Augusto de Sá
 Coorientador - Dr. (ICB/UFMG)


 Breno Rocha Barrioni
 Dr. (Pós-Doc/UFMG)


 Prof. Celso Martins Queiroz Júnior
 Dr. (UFMG)


 Prof. Hermes de Souza Costa
 Dr. (CEFET/MG)


 Prof^a Michele Munk Pereira,
 Dr^a (UFJF)


 Prof. Rodrigo Lambert Oréfice
 Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia
 Metalúrgica, Materiais e de Minas/UFMG

Belo Horizonte, 24 de abril de 2020

*Aos meus queridos pais, Belarminda Mariza
Grossi dos Santos e Antônio Luiz dos Santos,
por serem exemplo para mim.*

*“Acima de tudo, guarde o seu coração, pois dele
procede toda fonte de vida”. Pv. 4:23.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por seu amor incondicional e sua eterna fidelidade que me sustentaram durante os desafios deste doutorado.

Aos meus pais, Antônio e Mariza, por colocarem em meu coração a necessidade de estudar e por me proporcionarem tudo.

Ao meu esposo Marconi, meu amor, pelo incentivo constante sem o qual não teria chegado à conclusão deste doutorado. Agradeço por ter aceitado esse desafio juntamente comigo, por todo amparo e por não me deixar desistir.

Aos meus irmãos Bruno e Breno, por torcerem por mim. Aos meus sobrinhos, sempre querendo saber sobre a “escola da titia”.

Agradeço especialmente à minha querida orientadora Marivalda de Magalhães Pereira, mulher que admiro por ser exemplo de pesquisadora, por me aceitar em sua equipe e por toda amizade que cresceu ao longo destes 4 anos.

Ao meu coorientador Marcos Augusto de Sá, excelente pesquisador e professor. Obrigada pela orientação paciente e constante. Agradeço a amizade, por me ensinar, aconselhar, incentivar e ajudar sempre.

Aos professores Rodrigo Lambert Oréfice e Herman Sander Mansur, pela disponibilidade e permissão das análises deste trabalho, pelos incentivos no desenvolvimento do trabalho. Também à Alexandra Mansur pela análise térmica deste trabalho.

Ao professor Eduardo Nunes e sua esposa Patrícia, pela ajuda nas análises de FTIR, pelas conversas e pela ótima amizade desenvolvida.

Aos professores Emílio Osório Neto (*in memoriam*) e Cláudia Lima Caldeira pelas análises de ICP-OES realizadas no Laboratório de Análises Químicas (LAQ - DEMET - UFMG) e à professora Andréia Bicalho Henriques pelo auxílio nas análises de DRX.

Aos professores Alfredo Miranda de Goes e Dawidson Assis Gomes do Instituto de Ciências Biológicas (ICB-UFMG), além dos pós-doutorandos Thalita Marcolan Valverde, Pricila da Silva Cunha, Marcelo Coutinho de Miranda e Thaís Maria da Mata Martins, por tamanha dedicação e cuidado no desenvolvimento da parte biológica deste trabalho. Agradeço também ao Celso Martins Queiroz-Júnior por sempre se dispor a ajudar, pela ótima amizade e aos alunos de iniciação científica Ana, Samuel e Júlia por toda ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Um agradecimento especial ao amigo Breno Rocha Barrioni, pela amizade, que com sua disponibilidade dedicou tempo em sanar minhas dúvidas, pelas sugestões e críticas que foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço à Lorraine do Laboratório de Irradiação Gama (LIG - CDTN), por sempre se dispor, agendando com rapidez a esterilização dos materiais.

À toda equipe do laboratório de Biomateriais (Labbio), que fizeram dos momentos em conjunto de trabalho transbordar tanta alegria que deixarão saudade. São eles: Breno Barrioni, Talita Martins, Layla Mosqueira, Cheisy Moreira, Priscila Mol, Diogo Maia, Ingrid Elen, Sandhra Carvalho, Amanda Maria, Iuri Diniz, Michelle Dias, Ana Celeste Ximenes, Agda de Oliveira e Fabiana Pereira.

Aos professores e funcionários do Departamento de Engenharia Metalúrgica, Materiais e Minas, em especial à Maria Aparecida Pacheco, Ilda Batista, Patrícia Azevedo, Samuel Barbosa Lima e Nelson Azevedo (*in memoriam*) por toda assistência e amizade durante esses anos de trabalho.

Aos colegas do PPGEM pela convivência e troca de experiências durante esses anos.

Aos meus amigos “mais chegados que irmãos” do grupo de casais, pelas constantes orações e sábios conselhos. Também às minhas grandes amigas Greiziane Soares e Cássia Viana. Me faltam palavras que expressem minha gratidão a vocês.

Ao Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais da Universidade Federal de Minas Gerais e ao PPGEM pela oportunidade e suporte durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao CNPq, CAPES e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

| | |
|---|-------|
| LISTA DE FIGURAS..... | xi |
| LISTA DE TABELAS | xiv |
| LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS | xv |
| RESUMO..... | xviii |
| ABSTRACT | xix |
| Capítulo 1 . INTRODUÇÃO..... | 1 |
| Capítulo 2 . OBJETIVOS | 5 |
| 2.1 Objetivo Geral..... | 5 |
| 2.2 Objetivos Específicos | 5 |
| Capítulo 3 . REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 6 |
| 3.1 Engenharia de Tecidos | 6 |
| 3.2 Angiogênese..... | 8 |
| 3.3 Fontes de células para a Engenharia de tecidos..... | 15 |
| 3.3.1 Células Tronco | 16 |
| 3.3.2 Célula Endotelial (CE) | 18 |
| 3.4 Vidro Bioativo | 20 |
| 3.4.1 Materiais dopados com cobalto | 25 |
| 3.4.2 Vidro bioativo em <i>scaffolds</i> híbridos | 27 |
| Capítulo 4 . EFEITO SOBRE A ANGIOGÊNESE DE PASTILHAS DE VIDRO BIOATIVO CONTENDO COBALTO - ESTUDOS <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i> | 30 |
| 4.1 Introdução | 30 |
| 4.2 Materiais e Métodos | 31 |
| 4.2.1 Síntese de pastilhas de vidro bioativo (BG) e cobalto (Co)..... | 31 |
| 4.2.2 Caracterização estrutural das pastilhas de VB e VB-2.5Co | 31 |
| 4.2.3 Estudos <i>in vitro</i> | 33 |

| | |
|---|-----------|
| 4.2.4 Estudos <i>in vivo</i> | 39 |
| 4.2.5 Análise estatística..... | 42 |
| 4.2.6 Declaração de ética. | 42 |
| 4.3 Resultados e Discussão | 42 |
| 4.3.1 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)..... | 42 |
| 4.3.2 Difração de Raios X (DRX)..... | 43 |
| 4.3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia por Dispersão de Energia de Raios X (EDS)..... | 44 |
| 4.3.4 Avaliação da microestrutura e distribuição do tamanho dos poros por Microtomografia (micro-CT) | 46 |
| 4.3.5 Teste de citotoxicidade | 47 |
| 4.3.6 Ensaio de formação de tubo endotelial..... | 49 |
| 4.3.7 Ensaio qPCR | 51 |
| 4.3.8 Estudo <i>in vivo</i> - Coloração imunohistoquímica | 52 |
| 4.4 Conclusões | 57 |
| Capítulo 5 . INCORPORAÇÃO DO ÍON TERAPÊUTICO COBALTO EM SCAFFOLDS HÍBRIDOS DE POLI (ÁLCOOL VINÍLICO) / VIDRO BIOATIVO PARA ENGENHARIA DE TECIDOS | 58 |
| 5.1 Introdução | 58 |
| 5.2 Materiais e Métodos | 59 |
| 5.2.1 Síntese de <i>scaffolds</i> híbridos de poli (álcool vinílico) e vidro bioativo incorporados com cobalto (Co) | 59 |
| 5.2.2 Caracterização estrutural | 60 |
| 5.2.3 Imersão <i>in vitro</i> em SBF | 62 |
| 5.2.4 Caracterização biológica <i>in vitro</i> dos <i>scaffolds</i> híbridos | 64 |
| 5.2.5 Análise estatística..... | 66 |
| 5.3 Resultados e Discussão | 66 |

| | |
|--|-----|
| 5.3.1 Caracterização dos <i>scaffolds</i> híbridos - avaliação da composição química ... | 66 |
| 5.3.2 Análise do comportamento térmico | 68 |
| 5.3.3 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)..... | 69 |
| 5.3.4 Análise por difração de raios X (DRX)..... | 71 |
| 5.3.5 Avaliação dos <i>scaffolds</i> híbridos por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e análise química elementar por Espectroscopia por Dispersão de Energia (EDS)..... | 72 |
| 5.3.6 Avaliação da microestrutura e distribuição do tamanho dos poros dos <i>scaffolds</i> híbridos | 75 |
| 5.3.7 Comportamento mecânico: teste de compressão | 78 |
| 5.3.8 Comportamento <i>in vitro</i> após imersão em SBF | 79 |
| 5.3.9 Ensaio de crescimento Bacteriano e fúngico | 88 |
| 5.3.10 Ensaio de Citotoxicidade..... | 90 |
| 5.3.11 Curva de crescimento celular | 92 |
| 5.4 Conclusões | 93 |
| Capítulo 6 . CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 94 |
| Capítulo 7 . SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS | 96 |
| Capítulo 8 . REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 97 |
| Capítulo 9 . ANEXOS..... | 116 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 3-1. Cascata de eventos de angiogênese. | 9 |
| Figura 3-2. Modos de formação de vasos sanguíneos. | 12 |
| Figura 3-3. Efeitos da angiogênese excessiva e insuficiente. | 14 |
| Figura 3-4. A) Fotomicrografia de uma secção de uma veia. Células endoteliais (ECs, setas) revestindo o vaso sanguíneo; B) Processo angiogênico destacando-se alguns integrantes do endotélio vascular. | 19 |
| Figura 3-5. Diagrama de composição ternária para o vidro bioativo e a capacidade de ligação com o tecido ósseo. | 21 |
| Figura 3-6. Desenho esquemático do efeito de íons com potencial terapêutico na regeneração óssea. | 25 |
| Figura 3-7. Efeito estimulador da angiogênese através dos íons Cu e Co. | 26 |
| Figura 3-8. Fórmula química do poli (álcool vinílico-co-acetato de vinila). | 28 |
| Figura 4-1. Metodologia esquemática da parte cirúrgica da implantação das pastilhas para os grupos controle, VB e VB-2.5Co. | 40 |
| Figura 4-2. FTIR para amostras de VB e VB-2,5Co tratadas a 650 °C. | 43 |
| Figura 4-3. DRX para as amostras VB e VB-2,5Co tratadas a 650 °C. | 44 |
| Figura 4-4. MEV das pastilhas de (A) VB-2,5Co, 200 x e B) Mapeamento de Raios X de Co na amostra VB-2.5Co, 200 x. Barra de escala: 500 µm. | 45 |
| Figura 4-5. Espectro de EDS das amostras de (A) VB e (B) VB-2.5Co. | 46 |
| Figura 4-6. Modelos de micro-CT 3D e distribuição do tamanho dos poros obtidos dos <i>scaffolds</i> híbridos de VB e VB-2,5Co. | 47 |
| Figura 4-7. Viabilidade de HUVECs determinada pelo ensaio MTT para (A) VB e (B) VB-2.5Co. | 48 |
| Figura 4-8. Ensaio de formação de tubo endotelial realizado na presença de HUVECs. | 50 |
| Figura 4-9. Expressão relativa dos genes (A, B) HIF1A e (C, D) VEGFA em amostras de VB e VB-2.5Co em dois tempos de análise: 14h e 20h. | 51 |
| Figura 4-10. Imagens representativas (10x e 40x) contendo coloração HIF1A. | 54 |
| Figura 4-11. Imagens representativas (10x e 40x) contendo coloração com VEGFA. ... | 56 |
| Figura 5-1. Curvas de TGA dos <i>scaffolds</i> híbridos PVA-VB, PVA-VB-5Co e PVA-VB-10Co. | 68 |

| | |
|--|----|
| Figura 5-2. Curvas de DSC dos <i>scaffolds</i> híbridos PVA-VB, PVA-VB-5Co e PVA-VB-10Co..... | 69 |
| Figura 5-3. Espectro de FTIR para os <i>scaffolds</i> híbridos PVA-VB, PVA-VB-5Co e PVA-VB-10Co. | 70 |
| Figura 5-4. Padrões de DRX para os <i>scaffolds</i> híbridos PVA-VB, PVA-VB-5Co e PVA-VB-10Co..... | 72 |
| Figura 5-5. Microscopia eletrônica de varredura dos <i>scaffolds</i> híbridos de (A) PVA-VB, 60 x; (B) PVA-VB-5Co, 60 x; (C) PVA-VB-10Co, 60 x..... | 73 |
| Figura 5-6. Microscopia eletrônica de varredura dos <i>scaffolds</i> híbridos de A) PVA-VB-5Co, 150 x e C) PVA-VB-10Co, 150 x; mapeamentos químicos de Co para B) PVA-VB-5Co, 150 x e D) PVA-VB-10Co, 150 x..... | 74 |
| Figura 5-7. Espectro de EDS de <i>scaffolds</i> híbridos de PVA-VB, PBA-VB-5Co e PVA-VB-10Co..... | 75 |
| Figura 5-8. Modelos Micro-CT 3D e distribuição do tamanho dos poros obtidos dos <i>scaffolds</i> híbridos de A) e B) PVA-VB; C) e D) PVA-VB-5Co; E) e F) PVA-VB-10Co. | 76 |
| Figura 5-9. Curvas de tensão de compressão x deformação dos <i>scaffolds</i> híbridos PVA-VB, PVA-VB-5Co e PVA-VB-10Co. | 78 |
| Figura 5-10. Variação no conteúdo de Si, Ca, P e Co com o tempo de imersão em uma solução de fluido corporal simulada para os <i>scaffolds</i> híbridos PVA-VB, PVA-VB-5Co e PVA-VB-10Co..... | 80 |
| Figura 5-11. Espectro de FTIR para os <i>scaffolds</i> híbridos PVA-VB, PVA-VB-5Co e PVA-VB-10Co antes e após imersão em SBF por 14 dias..... | 82 |
| Figura 5-12. Padrões de DRX para os <i>scaffolds</i> híbridos PVA-VB, PVA-VB-5Co e PVA-VB-10Co após imersão em SBF por 14 dias..... | 84 |
| Figura 5-13. Microscopia eletrônica de varredura dos <i>scaffolds</i> híbridos de (A) PVA-VB, 150x; (B) PVA-VB-5Co, 150x; (C) PVA-VB-10Co, 150x, após 14 dias de imersão em SBF. | 85 |
| Figura 5-14. Microscopia eletrônica de varredura dos <i>scaffolds</i> híbridos de A) PVA-VB-5Co, 150 x e C) PVA-VB-10Co, 150 x; mapeamentos químicos de Co para B) PVA-VB-5Co, 150 x e D) PVA-VB-10Co, 150 x. | 86 |
| Figura 5-15. Espectro de EDS de <i>scaffolds</i> híbridos de PVA-VB, PBA-VB-5Co e PVA-VB-10Co..... | 87 |

| | |
|---|----|
| Figura 5-16. Variação do pH dos <i>scaffolds</i> híbridos da dissolução de SBF durante o período de 14 dias de imersão. | 88 |
| Figura 5-17. Teste de crescimento bacteriano e fúngico dos <i>scaffolds</i> híbridos PVA-VB, PVA-VB-5Co e PVA-VB-10Co nos períodos de 1 dia (A e B), 2 dias (C e D), 3 dias (E e F), 4 dias (G e H) e 7 dias (I e J)..... | 89 |
| Figura 5-18. Viabilidade das HUVECs determinada pelo ensaio MTT para PVA-VB, PVA-VB-5Co, PVA-VB-10Co. | 91 |
| Figura 5-19. Curva de crescimento celular na presença de PI dos <i>scaffolds</i> híbridos.... | 92 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 3.1. Resumo da resposta biológica de alguns íons terapêuticos. | 22 |
| Tabela 4.1. Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores e tamanho esperado dos amplicons. | 36 |
| Tabela 4.2. Dados da análise tridimensional das amostras VB e VB-2.5Co. | 47 |
| Tabela 5.1. Composições nominais e medidas; % orgânicos e inorgânicos e composição da fase inorgânica dos híbridos PVA-BG, PVA-BG-5Co e PVA-BG-10Co determinados pelo método de dissolução de metaborato de lítio e ICP-OES. | 67 |
| Tabela 5.2. Dados da análise tridimensional, por microtomografia computadorizada, dos <i>scaffolds</i> híbridos PVA-VB, PVA-VB-5Co e PVA-VB-10Co. | 77 |
| Tabela 5.3. Módulo de elasticidade e tensão à deformação de 50% para os <i>scaffolds</i> híbridos PVA-VB, PVA-VB-5Co e PVA-VB-10Co. | 79 |

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

| | |
|-------------------|--|
| Ag | Prata |
| Ang 2 | Angiotensina 2 |
| ASCs | Células tronco derivadas do tecido adiposo |
| ATP | Trifosfato de adenosina |
| B | Boro |
| BMSC | Bone marrow-derived stem/stromal cells (Célula estromal da medula óssea) |
| BSA | Albumina de soro bovino |
| Ca | Cálcio |
| CD | Cluster of differentiation (Grupos de diferenciação) |
| Ce | Cério |
| CE | Célula Endotelial |
| CEs | Células endoteliais |
| CFU-F | Unidade Formadora de Colônia - Fibroblastóides |
| Co | Cobalto |
| CoCl ₂ | Cloreto de cobalto |
| CSCs | Células tronco cancerosas |
| Cu | Cobre |
| DLL4 | Delta-like 4 |
| DRX | Difração de Raios X |
| DSC | Calorimetria Diferencial de Varredura |
| EC | Emissor comum |
| EDS | Espectroscopia por Dispersão de Energia de Raios X |
| EGF | Fator de Crescimento Epidermal |
| EGFL7 | Estatina Endotelial Vascular 7 |
| EPCs | Células progenitoras endoteliais |
| ET | Engenharia de Tecidos |
| F | Flúor |
| FGF | Fator de crescimento de fibroblasto |
| FTIR | Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier |
| Ga | Gálio |

| | |
|----------|---|
| hASC | Células tronco de tecido adiposo humano |
| HIF1A | Fator induzível por hipóxia subunidade 1 A |
| HUVEC | Célula endotelial de veia umbilical humana |
| ICP-OES | Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Acoplado Indutivamente |
| IR | Infravermelho |
| JAGGED1 | Ligante para o receptor NOTCH 1 |
| MEC | Matriz extracelular |
| MEV | Microscopia Eletrônica de Varredura |
| Mg | Magnésio |
| Micro-CT | Microtomografia computadorizada |
| Mn | Manganês |
| MT1-MMP | Membrana tipo 1-Metaloproteinase de Matriz |
| MTT | Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio |
| NOTCH | Proteína que faz parte de uma via de sinalização, promovendo incisão de uma borda ou superfície |
| OPG | Osteoprotegerina |
| P | Fósforo |
| PBS | Solução salina tamponada de fosfato |
| PCL | Policaprolactona |
| PDGFr | Receptor do Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas |
| PHB | Polihidroxibutirato |
| PHBHHX | Polihidroxibutirato-hidroxihexanoato |
| PI | Produto Iônico |
| PIs | Produtos Iônicos |
| PLA | Ácido Polilático |
| PLGA | Poli(ácido lático-co-ácido glicólico) |
| PMMA | Polimetilmetacrilato |
| PU | Poliuretano |
| PVA | Poli (álcool vinílico) |
| RT-qPCR | Reação da cadeia polimerase quantitativa em tempo real |
| Si | Silício |
| Sr | Estrôncio |
| TGA | Termogravimetria |

| | |
|----------|--|
| TIMPs | Inibidores Tissulares de Metaloproteinases |
| VB | Vidro bioativo |
| VBs | Vidros Bioativos |
| VB-2,5Co | Vidro bioativo contendo 2,5% de cobalto |
| VEGFA | Fator de Crescimento Endotelial Vascular A |
| VEGFR | Receptor do fator de crescimento endotelial vascular |
| VSMCs | Células vasculares do músculo liso |
| Zn | Zinco |

RESUMO

A angiogênese tem sido estudada em terapias como o tratamento de insuficiência vascular periférica, terapias antigênicas e redução do fluxo sanguíneo que chega a comprometer os tecidos, sendo também um processo importante nas abordagens de regeneração tecidual usando biomateriais. Os biomateriais compreendem uma representativa fração dos produtos utilizados na área de saúde. Dentre estes, os vidros bioativos (VB) têm demonstrado flexibilidade de composição que permite a incorporação de diferentes íons com atividades fisiológicas e propriedades terapêuticas. O cobalto (Co) é um íon terapêutico que estimula a formação de novos vasos sanguíneos pela ativação do fator de crescimento endotelial vascular A (VEGFA) e pelo fator induzível por hipóxia subunidade 1 A (HIF1A). *Scaffolds* híbridos de poli (álcool vinílico) e vidro bioativo aparecem como uma estratégia promissora para acelerar o reparo tecidual. No entanto, os efeitos dos vidros incorporados com Co na angiogênese precisam ser investigados mais detalhadamente. Também não existem estudos em *scaffolds* híbridos, utilizando o método sol-gel e um sistema de formação de espuma, com a incorporação direta do íon terapêutico cobalto. Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo desenvolver, caracterizar e avaliar o potencial angiogênico de VBs derivados do processo sol-gel contendo Co em sua estrutura, e de *scaffolds* híbridos contendo Co. Análises estruturais confirmaram a presença de Co na estrutura dos vidros bioativos e dos *scaffolds* híbridos. A viabilidade *in vitro* de células expostas à diferentes concentrações do produto iônico (PI) dos materiais não foi alterada. Demonstrou-se, através do ensaio de formação de tubos com HUVECs, que o PI do VB 2,5% de Co mimetiza o desempenho do VEGFA na indução de formação de vasos sanguíneos. Foi observado ainda o aumento da expressão dos genes VEGFA e HIF1A, após 14h de contato com o PI. Através dos estudos *in vivo* em ratos Wistar, mostrou-se que o VB incorporado com Co em sua estrutura foi capaz de aumentar a expressão de VEGFA e HIF1A, caracterizando uma estimulação do processo de angiogênese devido à liberação de Co. Já nos estudos com os *scaffolds* híbridos após a incorporação do Co, observou-se a formação de hidroxiapatita e excelente viabilidade celular nos ensaios *in vitro*. A incorporação de Co em VBs e *scaffolds* híbridos apresentou-se como promissora estratégia para aprimoramento do seu potencial para a angiogênese e engenharia de tecidos.

Palavras-chave: poli (álcool vinílico), vidro bioativo; sol-gel, formação de espuma, cobalto.

ABSTRACT

Angiogenesis has been studied in therapies such as the treatment of peripheral vascular insufficiency, antigenic therapies and reduction of blood flow that can compromise tissues, and it is also an important process in tissue regeneration approaches using biomaterials. Biomaterials comprise a representative fraction of the products used in the health area. Among these, bioactive glasses (BGs) have demonstrated flexibility in composition that allows the incorporation of different ions with physiological activities and therapeutic properties. Cobalt (Co) is a therapeutic ion that stimulates the formation of new blood vessels by activating vascular endothelial growth factor A (VEGFA), and by the hypoxia inducible factor 1 subunit A (HIF1A). Hybrid *scaffolds* made of poly (vinyl alcohol) and bioactive glass appear as a promising strategy to accelerate bone tissue repair. However, the effects of glasses incorporated with Co on angiogenesis need to be investigated in more detail. There are also no studies on hybrid *scaffolds*, using the sol-gel method and a foaming method, with the direct incorporation of the therapeutic ion cobalt. In this context, this work aimed to develop, characterize and evaluate BGs derived from the sol-gel process, containing cobalt in its structure, and of hybrid *scaffolds* containing Co. Structural analyzes confirmed the presence of Co in the structure of bioactive glasses and hybrid scaffolds. The *in vitro* viability of cells exposed to different concentrations of the ionic product (IP) of the materials has not been altered. It was demonstrated, through the tube formation test with HUVECS, that the IP of the BG containing 2.5%Co mimics the performance of VEGFA in the induction of blood vessels formation. It was also observed an increase in the expression of the VEGFA and HIF1A genes, after 14 hours of contact with the IP. Through *in vivo* studies in Wistar rats, it was shown that the BG incorporated with Co in its structure was able to increase the expression of VEGFA and HIF1A, characterizing a stimulation of the angiogenesis process due to the release of Co. For the hybrid scaffolds after the incorporation of Co, the formation of hydroxyapatite and excellent cell viability were observed in *in vitro* tests. The incorporation of Co in BGs and hybrid scaffolds proved to be a promising strategy to improve its potential for angiogenesis and tissue engineering.

Keywords: polyvinyl alcohol, bioactive glass; sol-gel, foaming, cobalt.

Capítulo 1 . INTRODUÇÃO

O processo biológico em que os vasos preexistentes formam novos vasos é chamado angiogênese ¹⁻³, um processo extremamente importante na regeneração de um tecido. Os vasos fornecem nutrientes e retiram resíduos e sua falta é um dos problemas para construção de *scaffolds* ou construções projetadas implantadas no corpo ⁴. Um dos maiores desafios enfrentados no campo da engenharia de tecidos (ET) é promover o crescimento da vasculatura nos tecidos manipulados, permitindo a integração suficiente do tecido ao hospedeiro. Um *scaffold* ideal deve possuir propriedades angiogênicas inatas ou incorporar fatores de crescimento que promovam a vascularização ⁵. A falta de vascularização pode levar à falha desta integração entre o tecido e o hospedeiro. Para se obter angiogênese, o uso de proteínas e genes que codificam para fatores de crescimento são métodos iniciais que podem ser associados aos biomateriais na forma de matrizes porosas bioativas. Uma estratégia alternativa é direcionar a via celular do Fator induzível por hipóxia (HIF), que responde à baixa concentração de oxigênio (hipóxia) e resulta na ativação de uma cascata de genes pró-vasculogênicos críticos para a angiogênese, incluindo o VEGFA, imitando assim a resposta regenerativa normal.

A ET é um campo interdisciplinar que tem crescido rapidamente na área da saúde, dedicado à fabricação de tecidos e órgãos intactos através de biomateriais, imitando o desenvolvimento biológico natural. Seu principal objetivo é regenerar componentes biológicos para uma eventual terapia de substituição por meio da manipulação de células, materiais de *scaffolds*, naturais ou sintéticos, que suportam células e moléculas bioativas ⁶. São utilizadas três ferramentas fundamentais pela ET para a regeneração dos tecidos: células, moléculas sinalizadoras e matrizes porosas ⁷.

Matrizes porosas obtidas à base de cerâmicas bioativas têm sido estudadas como estrutura para crescimento de tecido ósseo e para vascularização ^{8,9}. O processo por agentes formadores de espuma resulta em estruturas de poros orientadas ¹⁰. Materiais híbridos a base de polímeros biodegradáveis associados com vidros bioativos (VBs) oferecem resistência mecânica e rigidez, além da melhora nas propriedades mecânicas, quando comparados com seus componentes individuais ^{11,12}. Esses materiais são de particular interesse para a ET, pois materiais híbridos orgânico-inorgânico são materiais sintéticos intimamente misturados, onde pelo menos um dos domínios tem dimensões

variando de poucos angstroms a vários nanômetros. As condições de síntese promovidas pelo processo sol-gel tais como, precursores organometálicos, baixa temperatura de processamento e versatilidade do estado coloidal permitem a mistura de componentes orgânicos e inorgânicos na escala nanométrica em praticamente qualquer proporção de mistura ^{13,14}.

Dentre os vários materiais aplicados nesta área, o poli (álcool vinílico) (PVA) tem sido frequentemente explorado como material de implante em aplicações biomédicas, aproveitando de sua excelente resistência mecânica, biocompatibilidade e baixa toxicidade ^{15,16}. Outro material são os VBs que surgiram como uma alternativa aos materiais inertes utilizados como implantes, dando origem ao campo dos materiais bioativos, caracterizados como aqueles que podem provocar uma reação controlada em ambiente fisiológico levando à regeneração do tecido, que induzem uma resposta específica em sua superfície quando implantados, resultando na formação de uma forte ligação entre o tecido e o material ^{17,18}.

Os VBs permitem uma grande flexibilidade em sua composição, sendo possível a incorporação de várias concentrações de diferentes íons com atividades fisiológicas e propriedades terapêuticas, que são liberados durante o processo de dissolução do material ^{19,20}. O cobalto (Co) é um íon que tem chamado a atenção de estudiosos por ser um íon que estimula a angiogênese a partir do mecanismo de hipóxia, estabilizando o fator de transcrição HIF1A ^{21,22} que depois se transloca no núcleo para estimular a regulação positiva de genes pró-vasculogênicos como o fator de crescimento endotelial vascular A (VEGFA), influenciando a formação de novos vasos sanguíneos, tendo importante papel na regeneração de tecidos. VBs contendo esse íon têm sido avaliados para aplicação na ET ²³, apresentando aumento na expressão de VEGFA ²⁴ e do HIF ²⁵. Essa abordagem foi adotada como uma potencial estratégia de neovascularização em vários estudos ^{26,27}. Recentemente, vidros bioativos liberadores de cobalto foram desenvolvidos ²⁸, e sua capacidade de ativar a via HIF sob condições normóxicas foi demonstrada ²⁹.

Foi desenvolvido um trabalho por nossa equipe de pesquisa onde relatamos a síntese de um vidro sol-gel incorporado com 2,5% de CoO e uma avaliação preliminar de biocompatibilidade foi realizada *in vitro* ³⁰. Foi realizado um estudo de liberação iônica

mostrando que o vidro bioativo na composição 58S mostrou a capacidade de liberar Co dentro da faixa considerada terapêutica. Além disso, foi realizado estudo *in vivo*, no qual foi observado infiltrado celular na camada profunda da derme, adjacente ao local onde o material foi inserido, compatível com os estágios iniciais da cicatrização. No entanto, tornou-se necessário aprofundar o estudo da angiogênese com experimentos complementares *in vitro* e *in vivo*, e também em *scaffolds* híbridos, como uma abordagem para expandir o conhecimento de seus efeitos e subsequente aplicação para angiogênese.

Sendo assim, o foco desse trabalho foi incorporar o íon terapêutico Co às micropartículas de VB e aos *scaffolds* híbridos de PVA e VB, utilizando a associação dos métodos sol-gel e de formação de espuma, visando melhorar as propriedades mecânicas e estruturais desses biomateriais e, o mais importante, promover a angiogênese que é vital para a regeneração óssea^{31,32}. Especificamente, os objetivos foram avaliar os efeitos da incorporação do Co nas propriedades estruturais e biológicas *in vitro* e *in vivo* desses biomateriais e sua capacidade de expressão angiogênica.

Esta tese de doutorado está dividida em capítulos para o melhor entendimento das etapas de trabalho realizadas. O capítulo 2 apresenta o objetivo geral do trabalho, assim como os objetivos específicos desta tese de doutorado. Uma revisão da literatura é apresentada no Capítulo 3, com foco na descrição do PVA, processamento, estrutura, propriedades de VBs e sobre a angiogênese. Os Capítulos 4 e 5 apresentam os resultados obtidos durante a execução desse trabalho. Esses capítulos foram apresentados na forma de artigos, e divididos de acordo com os seus objetivos específicos.

No Capítulo 4, é apresentado o estudo de VBs incorporados com Co, um íon terapêutico com capacidade de aprimorar o processo de angiogênese, obtidos pelo processamento sol-gel, e o efeito dessa incorporação na estrutura do material. Foi avaliado o potencial angiogênico dos VBs incorporados com Co através de estudos biológicos *in vitro* e *in vivo*. Foi estudada a expressão de diferentes marcadores da diferenciação angiogênica em Células Endoteliais de Veia Umbilical Humana (HUVECs) que foram expostas ao produto iônico (PI) dos VBs.

O Capítulo 5 descreve o estudo de *scaffolds* híbridos de PVA e VB com a incorporação de cobalto em sua estrutura. Neste capítulo é apresentado o efeito da incorporação do Co na estrutura dos *scaffolds* híbridos, nas propriedades mecânicas e de dissolução. Estudos biológicos *in vitro* dos *scaffolds* híbridos foram realizados, assim como a validade do processo de esterilização dos *scaffolds* híbridos, a biocompatibilidade em HUVECs através do produto iônico destes *scaffolds*, bem como o crescimento celular e o crescimento de microorganismos. Por fim, as considerações finais sobre este trabalho de Doutorado são apresentadas no Capítulo 6, assim como sugestões para trabalhos futuros no Capítulo 7.

Capítulo 2 . OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo geral estudar o potencial angiogênico da incorporação de Co em vidro bioativo pelo processo sol-gel, através de experimentos *in vitro* e *in vivo*, e o desenvolvimento de *scaffolds* híbridos de poli (álcool vinílico)/vidro bioativo obtidos pelo processo sol-gel, utilizando o método de formação de espuma, e avaliar o efeito da incorporação desse íon terapêutico nas propriedades estruturais e biológicas dos materiais.

2.2 Objetivos Específicos

- Estudar o efeito da incorporação de Co nas propriedades estruturais de pastilhas de vidro bioativo derivados do processo sol-gel com 2,5% de CoO (% molar);
- Avaliar a viabilidade celular de HUVECs expostas ao PI das pastilhas;
- Analisar a expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFA) por HUVECs após 20h de exposição ao PI dos vidros bioativos.
- Averiguar a expressão gênica do *HIF1A* e do *VEGFA* com 14h e 20h de exposição ao produto iônico em HUVECs.
- Investigar a formação de novos vasos sanguíneos na região profunda da derme de ratos após 28 dias de implante de pastilhas de vidro bioativo incorporadas ou não com Co;
- Obter *scaffolds* híbridos de poli (álcool vinílico) e vidros bioativos contendo 5 e 10% de CoO (% molar) derivados da composição 58S pelo processo sol-gel e método de formação de espuma;
- Analisar a composição química e o efeito da incorporação de Co nas propriedades térmicas e estruturais dos *scaffolds* híbridos.
- Avaliar o perfil de dissolução dos *scaffolds* híbridos em fluido corporal simulado.
- Verificar a eficácia da esterilização nos *scaffolds* híbridos esterilizados a 4 kGy;
- Analisar a viabilidade de HUVECs após exposição ao produto iônico dos *scaffolds* híbridos;
- Avaliar do crescimento celular após exposição ao produto iônico dos *scaffolds* híbridos em diferentes concentrações de CoO (5% e 10%).

Capítulo 3 . REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Engenharia de Tecidos

A engenharia de tecidos (ET) surgiu como uma abordagem promissora nas últimas duas décadas para a regeneração de tecidos e órgãos lesionados ou perdidos como resultado de lesões traumáticas, doenças e envelhecimento³³⁻³⁵, que permanece como um desafio significativo na clínica. A ET compreende estudos de células para fisiologia e biologia tecidual, bem como a interação destas células com os biomateriais, sendo destinada a promover a regeneração da lesão pela restauração funcional de um tecido ou órgão³⁶.

A definição da ET é ampla e pode incluir dispositivos que sejam acelulares ou celulares. No caso de dispositivos acelulares, haverá crescimento do tecido pré-existente através do implante. Já nos dispositivos celulares, existirá o fornecimento de novas células ao sítio de implante, o que aumentará a população de células existentes ou irá reintroduzir a população de células ausentes³⁷.

A obtenção de tecidos doadores que são desenvolvidos dentro de matrizes com células específicas é alvo no campo da ET, onde estas células podem ser implantadas diretamente no local destinado, ou estimuladas a se proliferarem de maneira organizada em cultura tecidual externa, onde podem ter seu crescimento orientado por meio de um substrato, denominado *scaffold*. Após a cultura celular, o tecido é implantado no local previamente definido³⁸.

A presença de um material que age como uma superfície de adesão e promoção do crescimento celular é essencial, pois permite a sinalização entre as células, a produção de moléculas bioativas e a formação de matriz extracelular, favorecendo, assim, a regeneração tecidual³⁹. Através da fabricação de matrizes estruturais, da inclusão de células e da incorporação de moléculas indutoras, acredita-se ser possível facilitar o mecanismo de regeneração.

As matrizes estruturais utilizadas são produzidas a partir de diferentes tipos de biomateriais e devem possuir propriedades adequadas para o tecido ao qual se deseja substituir⁴⁰. A matriz ou o *scaffold* constitui o componente principal e é responsável por providenciar formação da estrutura necessária e apropriada para o suporte do

componente celular ³⁷. Os *scaffolds* são materiais temporários estruturados tridimensionalmente, possuem matriz porosa com poros interconectados que desempenham um importante papel de guiar o crescimento celular *in vitro* ou *in vivo*. O local e a resposta sistêmica dos tecidos para os implantes compreendem um aspecto de biocompatibilidade ³⁸.

Langer e Vacanti ³³ discutiram e descreveram como o campo da ET poderia contribuir para fornecer soluções clínicas. Eles destacaram diversas vezes a importância da utilização de biomateriais na engenharia de tecidos, relatando o tratamento da doença de Parkinson e a regeneração de nervos periféricos para projetar o modelo de transplantes vasculares e a recuperação da cartilagem.

Um biomaterial pode ser definido como qualquer tipo de material utilizado para fabricação de dispositivos para substituição de uma parte ou de uma função do corpo, de maneira aceitável fisiologicamente, sendo de origem natural ou sintética. Essa substituição deve ser realizada de forma segura, confiável e econômica. Todo material usado *in vivo* deve ser aprovado pela *FDA (United States Food and Drug Administration)*. No Brasil, existem leis e normas a serem seguidas, como os regulamentos éticos e de bem-estar animal do Governo Brasileiro (lei 11794/2008) e as normas da Sociedade Americana para Testes e Materiais (ASTM). O sucesso de um biomaterial ou de um implante depende de três fatores principais: a biocompatibilidade do implante, o estado de saúde do paciente beneficiário e a competência do cirurgião que implanta e monitora seu progresso ³⁷.

Os biomateriais são amplamente usados para aplicações médicas. Seu uso envolve crescimento celular em cultivo, ensaios em laboratórios clínicos, matrizes de diagnósticos genéticos e diversos tipos de implantes. Estudos prévios afirmam que a combinação de células e biomateriais podem resultar em reparo tecidual rápido, previsível e controlado ⁴¹. Em um estudo realizado por Won et al. ⁴² foi produzido um *scaffold* microestruturado a base policaprolactona para ser usado na regeneração de tecidos. Ryan et al. ⁴³ desenvolveram um *scaffold* de colágeno e vidro bioativo com cobre, para exercerem função osteocondutora e de cicatrização óssea como uma opção de tratamento de Osteomielite em idosos. Os biomateriais são essenciais para auxiliarem a vascularização e regeneração óssea.

3.2 Angiogênese

O termo angiogênese foi utilizado pela primeira vez em 1935 por Hertig para descrever a vascularização na placenta. O estudo sistemático da angiogênese teve início com Judah Folkman e, progressivamente, foram desenvolvidos vários modelos *in vitro* e *in vivo* para o estudo de seus mecanismos moleculares, modulação e a sua importância nos processos fisiológicos e patológicos ⁴⁴.

Um importante esclarecimento de discussões específicas envolvendo vascularização é a terminologia a ser usada: angiogênese ou vasculogênese. Esses dois termos são geralmente usados intercambiáveis na literatura, mas permanecem como entidades diferentes, sendo que, a angiogênese é estritamente a formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes, enquanto que a vasculogênese resulta da diferenciação de células progenitoras endoteliais (EPCs) ⁴⁵ e está presente no estágio de desenvolvimento precoce de um organismo quando vasos sanguíneos são originalmente formados ⁴⁶. Na vasculogênese ocorre a diferenciação de células endoteliais a partir de angioblastos durante o desenvolvimento embrionário ³, mas também pode estar presente em outras fases da vida, como na gestação por exemplo.

A matriz extracelular (MEC) é essencial para todos os estágios da angiogênese. No adulto, a angiogênese começa com a ativação da célula endotelial (CE), degradação da membrana basal, e brotamento vascular dentro da matriz intersticial. Sinais moleculares essenciais para todos os estágios da formação de vasos sanguíneos são fornecidos pela MEC ^{47,48}. Nos estágios iniciais, fatores de crescimento estimulam células endoteliais (CEs) em vasos sanguíneos pré-existentes, fazendo com que as CEs liberem enzimas denominadas proteases, as quais degradam a membrana basal. A MEC permite que as células migrem para os vasos existentes, proliferem na matriz circundante, e formem brotos ligantes aos vasos nas proximidades ⁴⁶. A Figura 3.1 mostra a cascata de eventos da angiogênese, que está descrita a seguir.

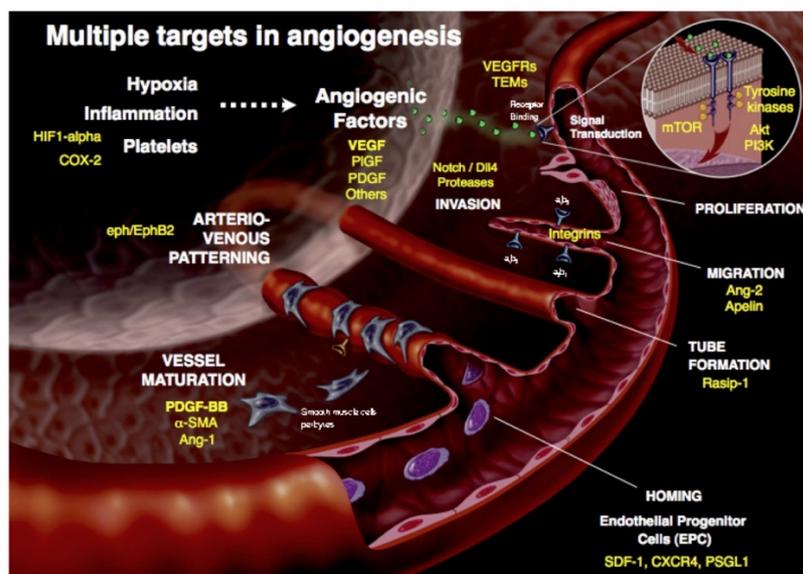


Figura 3-1. Cascata de eventos de angiogênese.

Fonte: THE ANGIOGENESIS FOUNDATION, 2016 ⁴⁹.

O processo de angiogênese em um adulto saudável ocorre como uma série ordenada de eventos. Os vasos sanguíneos fornecem nutrientes e oxigênio por todo o corpo, e são constituídos por tecido conjuntivo, tecido muscular liso, endotélio e possuem um revestimento interno de CEs montado por pericitos (a membrana basal) embutidos no compartimento estromal (várias células estromais e MEC). Em adultos saudáveis, um balanço da sinalização de fatores de crescimento mantém as células endoteliais num estado de repouso ou de latência. Para monitorar e fornecer quantidades suficientes de oxigênio aos tecidos circundantes, os vasos sanguíneos têm receptores induzidos por oxigênio ou hipóxia e receptores que permitem, através da remodelação do vaso, o ajuste do fluxo sanguíneo em conformidade. A hipóxia ou outros sinais endógenos ativam células e induzem a liberação de fatores de crescimento e peptídeos, tais como VEGFA, Ang-2, FGF e quimiocinas, para promover o crescimento de novos capilares sanguíneos a partir de vasos pré-existentes. Os pericitos destacam-se do vaso (sinalização de Ang-2), e as células endoteliais são ativadas e perdem o seu contato próximo à medida que o vaso dilata (sinalização de caderina VE). Na formação de brotos, seleciona-se uma célula de ponta (seleção influenciada por Neuropilina, VEGFA / VEGFR e NOTCH / DLL4 e JAGGED1) que libera metaloproteinases de matriz (MT1-MMP) para degradar a membrana basal e remodelar a MEC. As células da ponta são polarizadas e estendem numerosos filopódios para guiar a migração do broto (via sinais de orientação de semaforinas, efrinas e integrinas) em direção a estímulos

angiogênicos (gradiente de VEGFA). As células de ponta são principalmente migratórias e não proliferam. Células Stalk seguem a célula da ponta e proliferam, estendendo o brotamento. As células de proliferação Stalk estabelecem junções com células endoteliais vizinhas e liberam moléculas, tais como EGFL7 (uma quimiocina que atrai células endoteliais expressa a partir da proliferação das próprias células endoteliais), que se ligam a componentes de membrana extracelular e regulam a formação de lúmen vascular. A fusão de ramos vizinhos ocorre quando duas células de ponta se encontram, estabelecem junções EC-CE (VE-caderina, Ang-1), e formam um lúmen contínuo. A MEC é depositada para estabelecer uma nova membrana basal (TIMPs), a proliferação de células endoteliais cessa, e os pericitos são recrutados para estabilizar o novo vaso (PDGFR / PDGF-B, Ang-1). Uma vez estabelecido o fluxo sanguíneo, a perfusão de oxigênio e nutrientes reduz os estímulos angiogênicos (expressão de VEGFA) e inativa os receptores de oxigênio das células endoteliais, restabelecendo o estado de repouso do vaso sanguíneo ⁴⁹.

Senger e Davis ⁴⁸ relataram que os estágios para a formação de vasos sanguíneos são: 1) Brotamento vascular; 2) Formação do lúmen; 3) Maturação do vaso sanguíneo e 4) Estabilização do vaso sanguíneo ⁴⁸. Eles ainda relataram que a MEC fornece um *scaffold* de imobilização para citocinas que são importantes para a angiogênese. Já Carmeliet e Jain ⁴⁷ relataram vários modos de formação de vasos identificados (Figura 3.2). No embrião de mamíferos em desenvolvimento, os angioblastos se diferenciam em células endoteliais, que se unem em um labirinto vascular (Figura 3.2b). Diferentes sinais especificam a diferenciação arterial ou venosa ⁵⁰. O brotamento subsequente assegura a expansão da rede vascular (Figura 3.2a). A arteriogênese então ocorre, sendo o processo no qual os canais de células endoteliais ficam cobertos por pericitos ou células vasculares de músculo liso (VSMCs), proporcionando estabilidade e controle de perfusão. Os tecidos também podem se tornar vascularizados por outros mecanismos, mas a relevância desses processos não é bem compreendida. Por exemplo, os vasos pré-existentes podem se dividir por um processo conhecido como intussuscepção (invaginação), dando origem a outros vasos (Figura 3.2c). Em outros casos, ocorre a co-opção do vaso, em que as células tumorais sequestraram a vasculatura existente (Figura 3.2d), ou as células tumorais podem alinhar vasos - um fenômeno conhecido como mimetismo vascular (Figura 3.2e). Células tumorais putativas do tipo tronco podem até se diferenciar em células endoteliais (Figura 3.2f).

Existem modos conhecidos de formação de vasos sanguíneos em tecidos hígidos e tumores invasivos e não-invasivos (a - f). A formação do vaso pode ocorrer por germinação da angiogênese (a), pelo recrutamento de células progenitoras endoteliais residuais residentes na parede vascular (EPCs) derivadas da medula óssea e/ou vasculares que se diferenciam em ECs (b). Por um processo de divisão de vasos conhecido como intussuscepção (c). Em d-f, as células tumorais podem co-optar por vasos pré-existentes (d), ou os vasos tumorais podem ser revestidos por células tumorais (mimetismo vascular) (e) ou podem ser revestidos por células endoteliais, com anormalidades citogenéticas em seus cromossomos, derivadas de células tronco tumorais putativas (f). Ao contrário dos tecidos normais, que usam angiogênese germinante, vasculogênese e intussuscepção (a - c), os tumores podem usar todos os seis modos de formação de vasos (a - f) ⁴⁷.

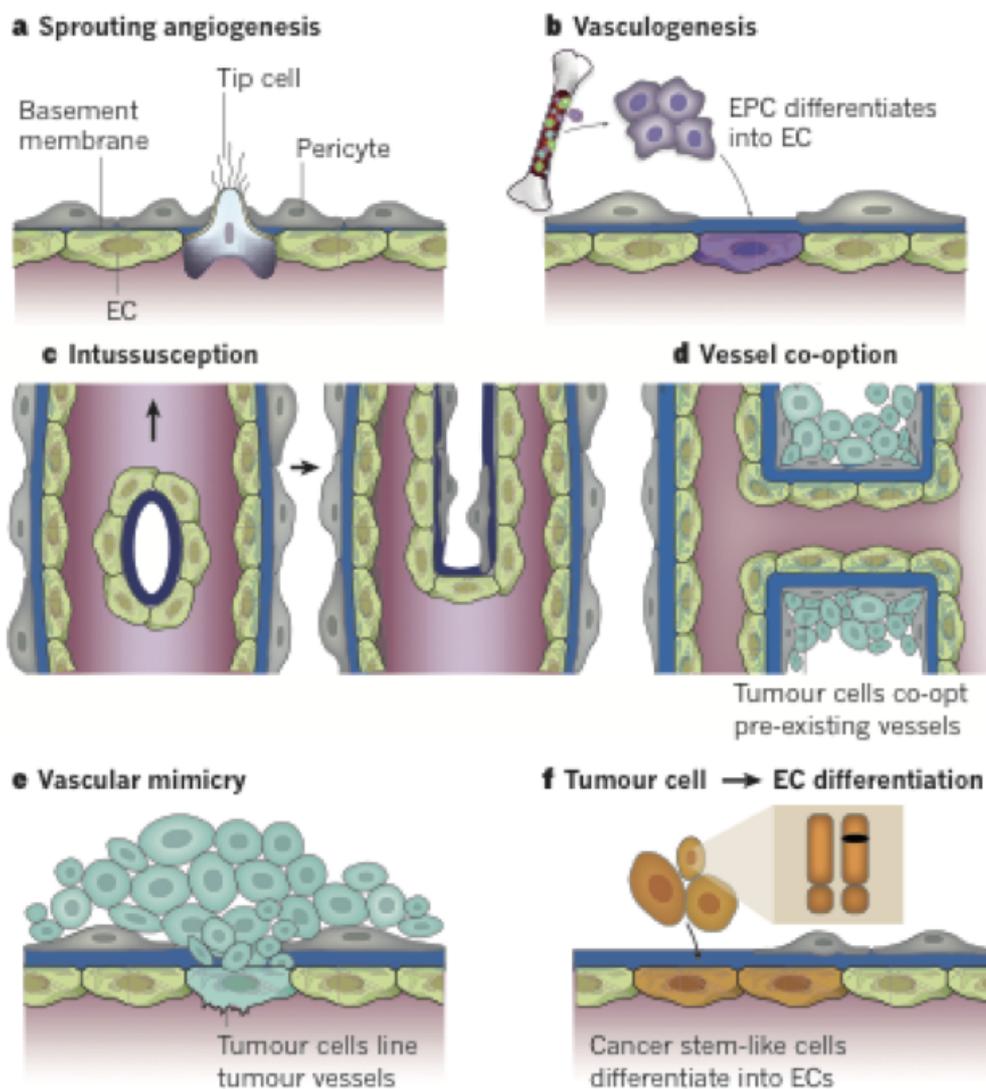


Figura 3-2. Modos de formação de vasos sanguíneos.
 Fonte: Carmeliet; Jain, 2011 ⁴⁷.

Folkman, Haudenschild e Zetter ⁵¹ sustentaram a idéia de que alguns sinais pró-angiogênicos liberados a partir de células de tumor sólido desempenham um papel fundamental para o crescimento e sobrevivência de células endoteliais. Dentre os fatores citados por Folkman e colaboradores, os principais estão descritos a seguir:

- Fator de Crescimento Endotelial Vascular A (VEGFA): é uma molécula pró-angiogênica, uma proteína 45KD que aumenta a permeabilidade vascular e exibe atividade angiogênica ³. O VEGFA é um mitógeno potente para CEs e é considerada a molécula mais importante para regular o desenvolvimento vascular. O VEGFA pode estimular a proliferação, a migração, a diferenciação da CE e a formação de estruturas

capilares ⁴⁵.

- Fator Induzível de Hipóxia (HIF): pode induzir resposta angiogênica pela ativação do gene VEGFA na área de lesão vascular de mucosa gastrointestinal e esofágica causada por fatores ulcerogênicos e lesões.

- HIF1A: é um fator de transcrição que ativado sob condições de hipóxia, se acumula nas células endoteliais e pode se ligar ao promotor do gene do VEGFA, induzindo a expressão desse gene ⁵².

- Fator de crescimento de Fibroblasto (FGF): é outro modulador mais bem caracterizado de angiogênese. Pode promover neovascularização *in vivo* e está envolvido no crescimento de novos vasos sanguíneos durante a cicatrização da ferida e durante a embriogênese.

- Células-tronco derivadas de Tecido Adiposo Humano (ASCs): podem formar capilares via sinalização por FGF básico (bFGF) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF).

- Micro RNAs (miRNAs, miRs): são essenciais para o desenvolvimento da vasculatura. Podem modificar de maneira específica o comportamento biológico das células endoteliais, incluindo a angiogênese.

- Células-tronco cancerosas (CSCs): são um pequeno subconjunto de células cancerosas dentro de um câncer que tem a capacidade de auto renovação e podem causar a linhagem heterogênea de células cancerosas que compreendem o tumor. Têm sido comprovado que elas dão origem a células endoteliais e formam vasos sanguíneos do tumor ³.

Durante o crescimento do tumor, uma “interrupção angiogênica” é desencadeada pela privação de nutrientes e de hipóxia, levando normalmente uma vasculatura em repouso a renovar continuamente novos vasos sanguíneos que permitem a progressão deste tumor ³.

A inibição da angiogênese é uma estratégia promissora para tratar doenças como o câncer, enquanto promover a angiogênese pode ser benéfico no tratamento das doenças isquêmicas, tais como o infarto agudo do miocárdio. Compreensões moleculares para estes processos e novas abordagens terapêuticas são, portanto, ferramentas promissoras para entender patologias fundamentais e expandir as opções de tratamento disponíveis em quadros anormais de angiogênese ⁵³. A Figura 3.3 mostra os efeitos consequentes da

angiogênese excessiva e deficiente. A diminuição do equilíbrio entre fatores pró e anti-angiogênicos causa a angiogênese patológica.

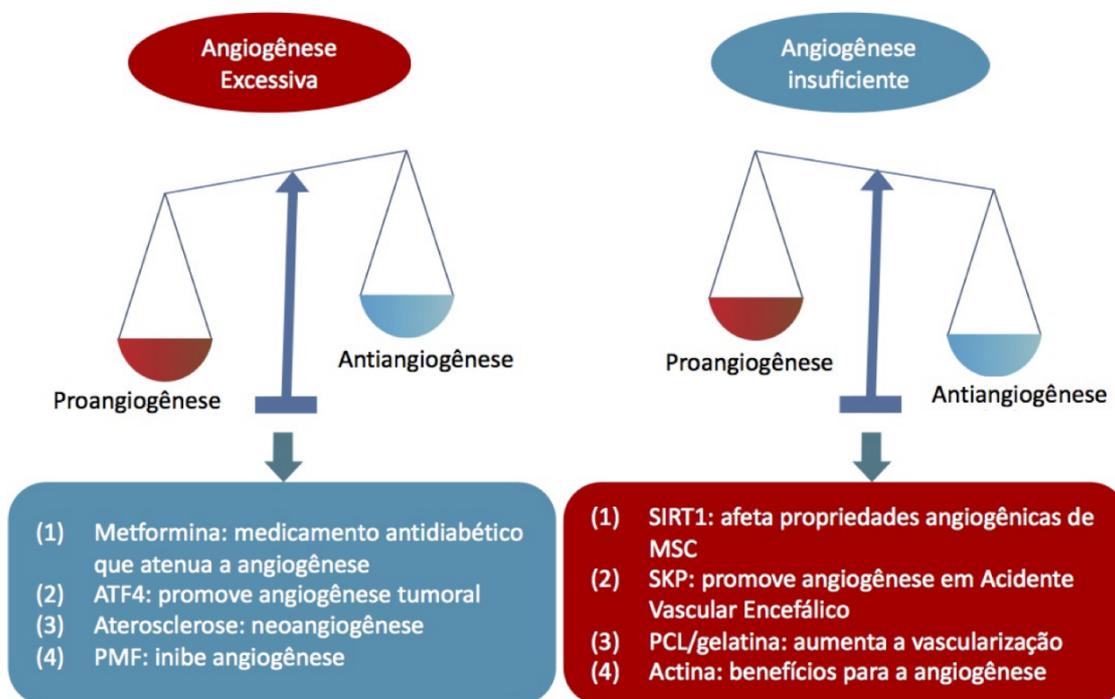


Figura 3-3. Efeitos da angiogênese excessiva e insuficiente.

Fonte: Adaptado de ZHAO; LI, 2015⁵³.

Os materiais biológicos apresentam uma característica importante na capacidade de induzir o rápido crescimento vascular durante a regeneração óssea, sendo a vascularização uma etapa crítica da regeneração de tecidos. A vascularização é crítica para a regeneração óssea. Implantes portadores de genes e células pró-angiogênicas demonstraram induzir crescimento de vasos no tecido ósseo, e estudos têm demonstrado que biocerâmicas podem desempenhar um papel crítico na angiogênese durante a regeneração óssea^{43,54,55}.

A angiogênese é crítica para a regeneração de tecidos, e depende do estímulo hipóxico e da produção do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFA). O fator de indução da hipóxia (HIF) é o mecanismo principal para detectar e responder a alterações na disponibilidade local de oxigênio em uma ampla variedade de organismos, apresentando efeito em genes que influenciam a angiogênese (por exemplo, VEGFA, angiopoietina) e no metabolismo celular (transporte de glicose), além de poder recrutar células

inflamatórias e mesenquimais, que irão influenciar a diferenciação ⁵⁶.

González et al.⁵⁷ estudaram a neovascularização em córneas de coelhos, e desenvolveram uma técnica de indução da angiogênese através de implantes de “pellets” de polimetilmetacrilato (PMMA) contendo bFGF, que foi lentamente liberado na córnea dos coelhos. Esta técnica consiste basicamente na estimulação de vascularização na córnea do coelho através do implante de um "pellet" de polímero inerte, misturado com um fator de crescimento, em um pequeno bolso feito cirurgicamente no estroma corneal. O estímulo angiogênico induziu a formação de brotos capilares a partir da rede vascular existente na área córneo-escleral, promovendo a vascularização local e favorecendo a angiogênese ⁵⁷.

Tendo em vista que apenas estimular a angiogênese através da obtenção células endoteliais em germinação não são suficientes para o sucesso da recuperação de uma isquemia ⁵⁸, estratégias terapêuticas com o uso de células *in vivo* e abordagens de liberação de fatores de crescimento para promoverem ambientes favoráveis à indução da angiogênese precisam ser desenvolvidas, bem como o estudo de sua potencial contribuição para a regeneração de tecidos moles e do tecido ósseo.

3.3 Fontes de células para a Engenharia de tecidos

As células aplicáveis à engenharia de tecidos podem ser classificadas como autólogas (do próprio paciente), alogênicas (célula humana de outro paciente) e xenogênica (origem animal). As células autólogas são as mais apropriadas para a engenharia de tecidos, uma vez que as células alogênicas e xenogênicas são imunogênicas, tornando-se necessária a utilização de terapias com imunossupressores. Nesse contexto, um tipo bastante atraente de células para a engenharia de tecidos são as células-tronco ⁵⁹.

A célula ideal para ser utilizada deve possuir algumas características, tais como estar disponível em quantidade suficiente, ser capaz de exercer a função destinada a ela, ser isolada com mínima morbidade da área doadora e ser compatível com o sistema imunológico do receptor ⁶⁰. Dessa forma, a fonte de células tem uma enorme influência sobre o sucesso de terapias que utilizam a engenharia de tecidos.

3.3.1 Células Tronco

Células-tronco são células indiferenciadas que possuem a capacidade de auto-renovação e diferenciação em diferentes tipos celulares ⁶¹. As células-tronco estão presentes desde o desenvolvimento embrionário e persistem no indivíduo adulto.

As células-tronco mesenquimais foram descritas pela primeira vez por Friedstein em 1970 ⁶² como sendo células não hematopoiéticas da medula óssea que formam colônias fibroblastóides (CFU-F) aderentes ao plástico. Posteriormente foram denominadas como “Células-Tronco Mesenquimais”, pois ficou claro que elas possuem a capacidade de se autorrenovar e diferenciar em células derivadas do mesoderma embrionário: adipócitos, condrócitos e osteócitos ⁶³. As células-tronco mais bem estudadas e caracterizadas são as células-tronco hematopoiéticas e as células-tronco mesenquimais ⁶⁴.

Quando expandidas, as células-tronco mesenquimais, além de serem morfológicamente parecidas aos fibroblastos, devem expressar certas glicoproteínas de superfície celular em suas membranas quando analisadas por citometria de fluxo ⁶⁵. Na medula óssea, as células-tronco mesenquimais dão suporte a hematopoese, especialmente na produção do microambiente hematopoiético, que regula a manutenção e a diferenciação das células tronco hematopoiéticas ⁶⁶.

As células-tronco mesenquimais cultivadas são derivadas do nicho perivascular, portanto a característica dessas células de se diferenciar em vários tipos celulares reflete a capacidade desse nicho na manutenção tecidual. Estas células podem ser isoladas da medula óssea, tecido adiposo, tecido muscular esquelético, derme, membrana sinovial, endotélio da veia umbilical, rim, ligamento periodontal e pulmão. Há evidências de que as células estão nas paredes dos vasos sanguíneos, independente do órgão que se encontram, por isso elas são chamadas de pericitos¹ ⁶³.

Devido ao grande número de estudos descrevendo a presença de células-tronco

¹ Pericitos são células tipo mesenquimais multipotenciais, associadas com a parede de vasos sanguíneos pequenos; células progenitoras tecido-residentes capazes de se diferenciarem em diferentes tipos celulares, incluindo osteoblastos, condroblastos, fagócitos e adipócitos ^{229,230}.

mesenquimais em diferentes tecidos, a sociedade internacional para terapia celular propôs critérios mínimos para a definição de células-tronco mesenquimais ⁶⁷:

- I) serem aderentes a superfícies de plástico quando mantidas em condições de cultivo padronizadas;
- II) expressarem as glicoproteínas de superfície CD73, CD90, CD105 e não expressarem CD45, CD34, CD14, CD19 e HLA-DR;
- III) quando estimuladas *in vitro*, diferenciarem em osteoblastos, condrócitos e adipócitos.

O isolamento de linhagens de células-tronco pluripotentes humanas deu esperança à comunidade científica e médica ⁶⁸. Porém, sua obtenção e utilização geram questionamentos éticos, políticos e religiosos ⁶⁹. No Brasil, a utilização de células-tronco embrionárias é permitida de acordo com a Lei de Biossegurança (Lei 11.105), de 24 de março de 2005 ⁷⁰.

As células-tronco embrionárias são extraídas do embrioblasto e possuem a capacidade de se diferenciar em qualquer tipo celular derivado dos três folhetos embrionários. Por isso, são consideradas células pluripotentes ⁷¹. Uma fonte alternativa bastante promissora às células-tronco embrionárias são as células-tronco de pluripotência induzida. Takahashi e Yamanaka ⁷² demonstraram que através de manipulações genéticas, é possível reverter o processo de diferenciação de uma célula adulta.

Células-tronco adultas são uma alternativa às células-tronco embrionárias e são consideradas multipotentes, pois possuem a capacidade de se diferenciar em vários tipos celulares. Podem ser isoladas de tecidos fetais, placenta, cordão umbilical e vários tecidos do indivíduo adulto ⁷³⁻⁷⁵.

As células-tronco adultas mais utilizadas para estudos na área da medicina regenerativa são as células extraídas da medula óssea e do tecido adiposo ⁷⁶. As células-tronco do tecido adiposo humano (hASC – human adipose stem cells) foram primeiramente isoladas por Zuk e colaboradores em 2001. Esse grupo isolou células a partir da fração estromal do tecido adiposo, capazes de se diferenciarem em osteoblastos, condrócitos, adipócitos e mioblastos, e com características semelhantes às células-tronco

mesenquimais da medula óssea. Já foi demonstrado o potencial de diferenciação dessas células em células endoteliais ⁷⁷, cardiomiócitos ⁷⁸, células pancreáticas ⁷⁹, neurônios ⁸⁰ e hepatócitos ⁸¹.

O potencial de diferenciação condrogênica das ASC utilizando matrizes tridimensionais para engenharia de tecido cartilaginoso, também foi demonstrado utilizando diferentes tipos de biomateriais como gelatina ⁸², sulfato de condroitina ⁸³, PCL ⁸⁴ e PHB/PHBHHX ⁸⁵. Há uma diversidade de tipos de biomateriais que estão sendo utilizados em associação com as ASC na perspectiva de se regenerar diversos tecidos, além dos já anteriormente citados ⁸⁶⁻⁸⁸.

Na engenharia tecidual óssea, estudos têm demonstrado que as ASC derivadas de murinos e humanos exibem boas propriedades de adesão a vários tipos de biomateriais mantendo a capacidade de se diferenciarem em osteoblastos quando cultivadas nessas matrizes. A diferenciação osteogênica de ASC já foi promovida em matrizes de poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) – PLGA ⁸⁹, colágeno ⁹⁰, beta-fosfato tricálcio (TCP) ⁹¹, e Poli(ácido láctico)-PLA/beta TCP, PLA/ VB ^{92,93}.

3.3.2 Célula Endotelial (CE)

Historicamente, a célula endotelial (CE) foi um dos primeiros tipos celulares a ser cultivada. Em 1921, Lewis cultivou células endoteliais extraídas de tecidos e observou que elas possuíam capacidade de formar vasos. Em 1961 Robertson aplicou técnicas de clonagem para isolar diferentes tipos de células a partir de explante arterial, enquanto em 1963 e 1966, Maruyama e Freyer e colaboradores, respectivamente, colhiam células endoteliais do revestimento interno das artérias e veia do cordão umbilical humano através de digestão enzimática por tripsina. No entanto, somente em 1973 que Jaffe e colaboradores foram bem-sucedidos com a manutenção de cultivos de células endoteliais, obtendo uma população homogênea ^{94,95}.

A partir da diferenciação de células progenitoras endoteliais (EPCs) em CEs maduras, novos vasos sanguíneos são formados, sendo que as EPCs podem ser isoladas a partir de várias fontes, tais como medula óssea, sangue periférico e sangue de cordão umbilical. Independentemente do método de isolamento, as EPCs têm promovido a

neoangiogênese. A liberação de EPCs, ou por injeção direta ou por cultivo em *scaffolds*, melhorou a formação de vasos sanguíneos em modelos animais de defeitos ósseos ².

As CEs maduras podem ser isoladas a partir de uma grande variedade de fontes, tais como o cordão umbilical, a pele e a veia safena. Há um grande interesse em aplicar as CEs na engenharia de tecidos, devido a sua alta capacidade de expansão *in vitro* e por conseguir manter seu potencial de diferenciação ².

Estudos recentes demonstram que as CEs participam da regeneração tecidual e são principal tipo celular envolvido na angiogênese e neovascularização. Essas células são consideradas como base do endotélio vascular (Figura 3.4). Uma função importante da CE durante a angiogênese, além da constituição da estrutura do endotélio dos vasos sanguíneos, é a secreção de vários fatores bioativos ⁹⁶, dentre eles o VEGFA e o HIF1A.

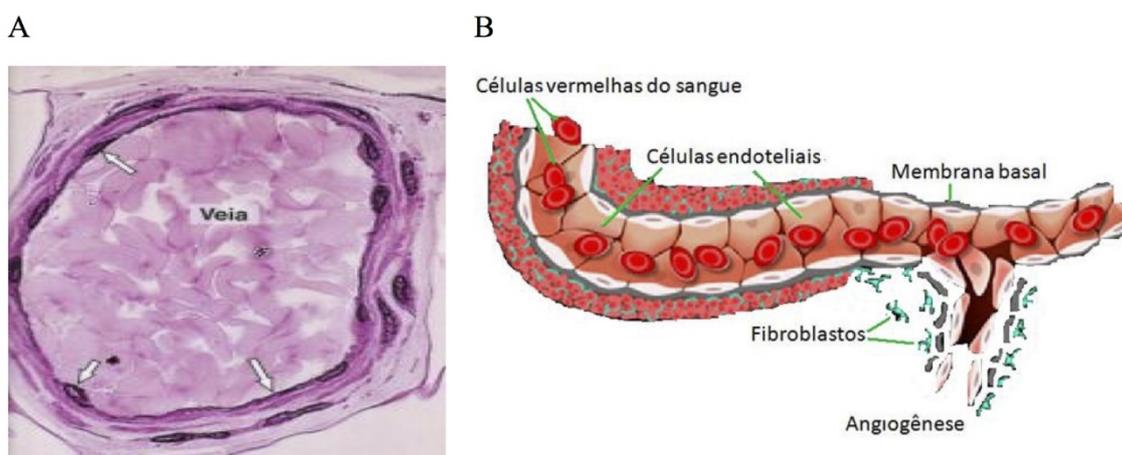


Figura 3-4. A) Fotomicrografia de uma seção de uma veia. Células endoteliais (ECs, setas) revestindo o vaso sanguíneo; B) Processo angiogênico destacando-se alguns integrantes do endotélio vascular. Fonte: FERRARA, 1998 ⁹⁷.

A regeneração dos tecidos é considerada um importante fator que afeta o resultado clínico da implantação. É um processo complexo que envolve uma série de eventos dinâmicos, tais como coagulação, inflamação, granulação e remodelação de tecidos, nos quais a angiogênese está envolvida ^{96,98,99}. A reação do processo de microvascularização ao biomaterial inserido desempenha um papel central no sucesso ou fracasso de qualquer implante ¹⁰⁰. O efeito angiogênico dos biomateriais é geralmente avaliado em uma cultura de monocamada convencional de CEs. Este é um método de triagem estabelecido, que tem a adesão celular, a proliferação e a migração como indicadores

iniciais para angiogênese ⁹⁶.

Co-cultura celular pode também ser usada para estudar a angiogênese. Bianchi et al. ¹⁰¹ estudaram fibroblastos humanos co-cultivados com HUVECs, o que levou a um aumento da angiogênese. Isto foi conseguido controlando a topologia superficial e as interações heterotípicas, que aumentaram a atividade metabólica das células ¹⁰². An et al ⁹⁶ relataram que as HUVECs preferem superfícies lisas, semelhantes a outras células de tecidos moles, tais como fibroblastos gengivais e células epiteliais. Lehle, Buttstaedt e Birnbaum ¹⁰³ relataram uma capacidade insatisfatória de CEs para aderir e proliferar em polímeros hidrofóbicos. De et al. ¹⁰⁴ demonstraram que as CEs apresentaram baixa taxa de crescimento em um biomaterial de filme de poliuretano revestido em substrato de vidro, com superfície áspera e altamente hidrofóbica. A preferência de CEs por superfícies lisas e hidrofílicas parece ser baseado em sua função *in vivo*, onde se ligam às estruturas lisas dos vasos.

3.4 Vidro Bioativo

A segunda geração de biomateriais teve o início do seu desenvolvimento quando uma composição especial de vidro foi sintetizada por Hench e colaboradores na Universidade de Flórida, em 1969 ^{105,106}. O termo bioativo foi definido como “um material que extrai uma resposta biológica específica na sua interface resultando na formação de uma união entre os tecidos e o material” ¹⁰⁷. Os vidros bioativos são cerâmicas bioativas ricas em dióxido de silício (SiO₂), componente frequentemente encontrado nos vidros industriais ³³.

Uma composição de vidro bioativo, posteriormente denominada Bioglass[®] ou 45S5, surgiu como uma alternativa aos materiais inertes, dando origem ao campo das cerâmicas bioativas, grupo de materiais caracterizado como aqueles que induzem uma resposta biológica específica na sua superfície, resultando na formação de uma ligação entre os tecidos e os materiais ¹⁸. O diagrama de composições ternário proposto por Hench é apresentado na Figura 3.5, onde se observa a composição do Bioglass[®] e demais composições de vidros bioativos preparados pelo processo de fusão, que também apresentaram capacidade de formação de ligação interfacial com tecidos.

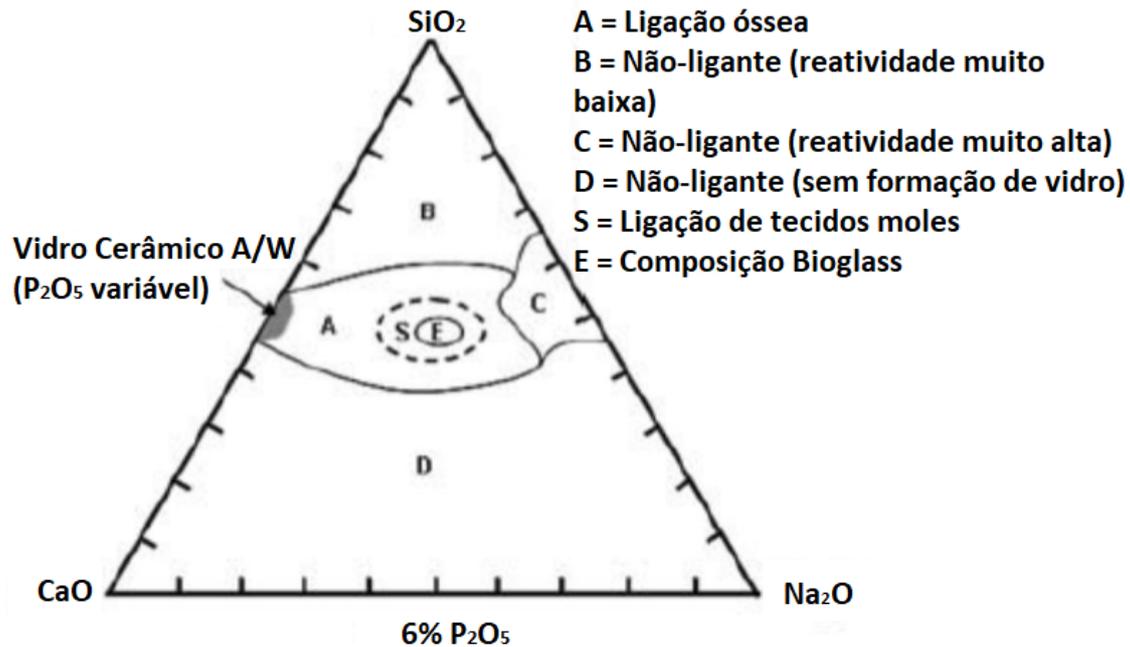


Figura 3-5. Diagrama de composição ternária para o vidro bioativo e a capacidade de ligação com o tecido ósseo.
 Fonte: HENCH, 2006 ¹⁰⁵.

Ao longo dos anos diversas composições de vidros bioativos foram desenvolvidas, possuindo menos componentes do que a 45S5 ou apresentando elementos adicionais, incorporados em sua estrutura para aprimorar as propriedades do material dependendo da sua aplicação ¹⁸. Diferentes composições resultam em alterações nas propriedades estruturais e na resposta biológica desses materiais para regeneração de tecidos, sendo dessa forma essencial o estudo de vidros bioativos e a relação entre diferentes composições destes e suas propriedades. Esse conhecimento pode ser utilizado para projetar vidros bioativos com propriedades superiores, sendo modelados de acordo com as especificidades de cada aplicação ^{108,109}.

Estruturas de vidro bioativo permitem uma grande flexibilidade em sua composição, já que não são dependentes de uma estequiometria específica, permitindo a incorporação de várias concentrações de íons com atividades fisiológicas e propriedades terapêuticas ^{20,110,111}. Esses íons são liberados durante o processo de dissolução do material e tem a capacidade de executar uma ação terapêutica no corpo humano ²⁰. Sabe-se que vários íons inorgânicos, como cálcio, fósforo, silício, estrôncio, zinco, dentre outros, estão envolvidos no metabolismo ósseo e possuem um papel fisiológico na angiogênese e no crescimento e mineralização de tecido ósseo ¹¹². Em particular, íons metálicos podem agir como cofatores de enzimas, influenciando vias de sinalização e estimulando efeitos

metabólicos que ocorrem durante a formação do tecido ¹¹³, tornando-os atrativos para uso como agentes terapêuticos no campo da engenharia de tecidos ¹¹⁰.

Os vidros bioativos permitem a liberação contínua de íons, mantendo o efeito terapêutico ao longo da degradação. A taxa de degradação de vidros bioativos pode ser ajustada (e assim otimizando o efeito terapêutico) através da variação da composição, alteração da conectividade de rede e do tipo de modificador de rede ¹¹⁴⁻¹¹⁶. Estudos sobre vidros bioativos demonstraram que os produtos da dissolução iônica estimulam a expressão de genes, o fator de crescimento endotelial vascular A (VEGFA) e o fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF) em fibroblastos, implicando em um potencial para indução angiogênica através deste tipo de material de silicato ^{117,118}.

Há grande vantagem dos íons liberados localmente, ao invés da medicação administrada sistemicamente. Quando liberados localmente, esses íons são liberados exatamente onde são necessários, resultando em um efeito terapêutico otimizado e na redução das reações adversas, podendo melhorar o desempenho de vidros bioativos *in vitro* e *in vivo*. A Tabela 3.1 apresenta um resumo das respostas biológicas de vários íons, e os efeitos biológicos de alguns íons de interesse nesse trabalho serão discutidos.

Tabela 3.1. Resumo da resposta biológica de alguns íons terapêuticos.

| Íon | Função/Resposta Biológica |
|-----|---|
| Ca | -Favorece diferenciação de osteoblastos e mineralização da matriz extracelular; -Regula células ósseas pela ativação de receptores extracelulares sensores do cálcio; -Regula expressão de colágeno tipo I e de osteocalcina. |
| Co | -Promove angiogênese pela ativação do fator de indução da hipóxia; -Pode acelerar o desenvolvimento e regeneração de tecido ósseo e diferenciação de células tronco. |
| Si | -Essencial na formação e calcificação do tecido ósseo; |

| | |
|----|--|
| | -Estimula formação do colágeno tipo I e aumenta diferenciação de osteoblastos. |
| P | -Regula expressão de proteínas formadora do osso em osteoblastos. |
| F | -Acelera a formação de apatita no osso e no tecido mineralizado, aumenta estabilidade do tecido e estimula proliferação celular; -Reduz a desmineralização do esmalte e dentina e favorece formação de fluorapatita, prevenindo cáries dentárias. |
| Sr | -Regula reabsorção óssea e osteoclastogênese; -Possível agente para tratamento de osteoporose. |
| Zn | -Estimula a formação óssea osteoblástica e inibe a reabsorção óssea osteoclástica; -Protege contra respostas inflamatórias; Importante para metaloenzimas que são vitais para formação do novo osso. |
| Mg | -Essencial no metabolismo ósseo, estimulando formação de novo tecido; -Aumenta adesão celular e estabilidade ao interagir com integrinas de osteoblastos; - Estabiliza enzimas e está envolvido na síntese de lipídios, proteínas, ácido nucleico e coenzimas. |
| Mn | -Cofator de enzimas envolvidas na remodelação da matriz extracelular e influencia ativação de integrinas, aumentando adesão celular; -Influencia a inibição da reabsorção óssea induzida por radicais livres; -Deficiência de Mn pode levar à redução da incorporação de cálcio no tecido ósseo. |
| Cu | -Atividade antibacteriana; -Auxilia na vascularização. |
| Ag | -Atividade antibacteriana; |

| | |
|----|---|
| | -Reduz efeitos inflamatórios de feridas |
| Ga | -Modula resposta de osteoclastos, sem afetar os osteoblastos; -Tratamento da osteoporose e hipercalcemia associada com metástases tumorais no osso; -Atividade antibacteriana. |
| Ce | -Atividade antioxidante, funcionando como um agente neuroprotector; -Ampla espectro de atividade antibacteriana; -Aumenta diferenciação de osteoblastos e produção de colágeno. |
| B | -Aumenta o total de RNA funcional em fibroblastos; -Afeta proliferação e expressão de colágeno tipo I e fator de transcrição de osteoblastos. |

Fonte: BARRIONI; OLIVEIRA; PEREIRA, 2016 ¹¹⁹.

O cálcio constitui um dos principais componentes de vidros bioativos, sendo considerado um mensageiro intracelular quase universal, que tem efeitos sobre uma ampla gama de proteínas e regula uma grande variedade de processos celulares ¹²⁰. No metabolismo ósseo, o cálcio atua como uma molécula de sinalização que afeta funções das células e expressão de genes através da ativação de quinases extracelulares ¹²¹. O cálcio é um dos principais componentes da fase inorgânica do osso, desempenhando um papel essencial na formação e reabsorção óssea, favorecendo a diferenciação de osteoblastos e precipitação da apatita, podendo também aumentar a expressão de fatores de crescimento semelhantes à insulina, que regulam a proliferação de osteoblastos humanos ^{20,112,122}. Assim como o cálcio, o magnésio (Mg) também é vital para as células, estimulando a formação de novo tecido ósseo ^{123,124}. Estudos indicam que o magnésio associado ao vidro bioativo pode estimular a diferenciação celular no tecido ósseo, com boa aderência e proliferação de osteoblastos, potencializando a regeneração óssea ¹²³.

A funcionalidade biológica do estrôncio está relacionada à sua similaridade química com o cálcio e outros elementos do grupo 2A, que possuem afinidade com células

ósseas. Íons de estrôncio podem deslocar íons Ca^{2+} em processos mediados por osteoblastos devido à sua similaridade de carga e tamanho com Ca^{2+} ¹²⁴, sendo incorporado na matriz óssea por trocas em sua superfície, com a adesão de Sr^{2+} à estrutura mineral óssea ou substituição iônica com Ca^{2+} ¹²⁵. A incorporação de estrôncio em vidros bioativos tem demonstrado estimular a proliferação de osteoblastos, e também prevenir a reabsorção óssea pelos osteoclastos ²⁰. Assim como o estrôncio, o zinco também apresenta papel fundamental no metabolismo ósseo, também estimulando a proliferação de osteoblastos e inibindo reabsorção por osteoblastos, consequentemente aumentando a massa óssea ¹²⁶. Vidros bioativos com adição de zinco apresentaram melhor adesão e diferenciação celular, além de efeito antiinflamatório ^{127,128}. No entanto, zinco pode reduzir a taxa de degradação de vidros bioativos ¹²⁹. A Figura 3.6 apresenta um resumo do efeito terapêutico desses íons na regeneração óssea.

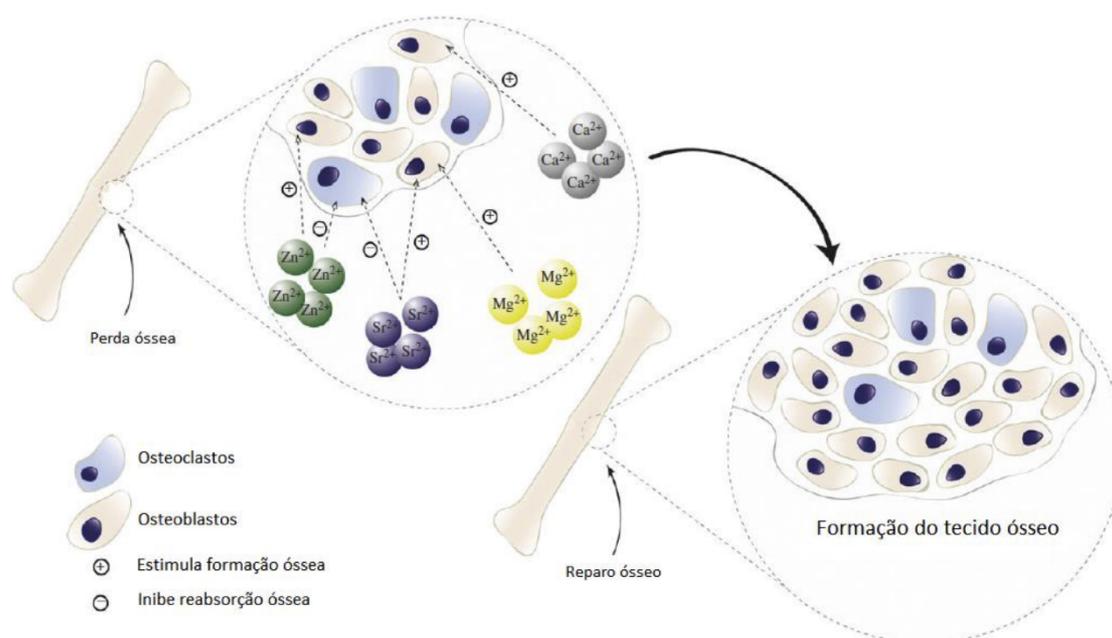


Figura 3-6. Desenho esquemático do efeito de íons com potencial terapêutico na regeneração óssea. Fonte: adaptado de: MOURINO; CATTALINI; BOCCACCINI, 2012 ¹¹⁰.

3.4.1 Materiais dopados com cobalto

O Co é um elemento naturalmente presente na dieta humana, sendo um micronutriente essencial na forma da vitamina B₁₂ (hidroxicobalamina), porém esse elemento na forma inorgânica não é necessário na dieta humana, e sua deficiência não é relatada ¹³⁰. Após uma dose única de cobalto, a concentração no sangue e no soro é inicialmente elevada, mas decresce rapidamente e gradualmente, devido à absorção pelos tecidos, especialmente no fígado e nos rins, combinada com a excreção fecal e urinária,

atingindo um baixo nível em 24 horas ¹³¹. Co é também conhecido por ser um poderoso agente angiogênico, influenciando na formação de novos vasos sanguíneos, tendo, portanto, um papel importante na regeneração de tecidos.

Materiais dopados com cobalto têm mostrado potencial para estimular a angiogênese em meio fisiológico. O Co é um conhecido agente angiogênico, devido ao efeito estabilizante no fator induzível por hipóxia subunidade 1 A (HIF1A), e resulta na ativação de uma cascata de genes pró-vasculogênicos críticos para a angiogênese, incluindo VEGFA, mimetizando assim a resposta regenerativa normal, conforme relatado para vidros bioativos contendo esse íon. Vidros bioativos contendo cobalto demonstraram também liberação controlada desse íon, adesão e proliferação de células tronco mesenquimais da medula óssea, e nenhum efeito citotóxico aparente ²³ (Figura 3.7).

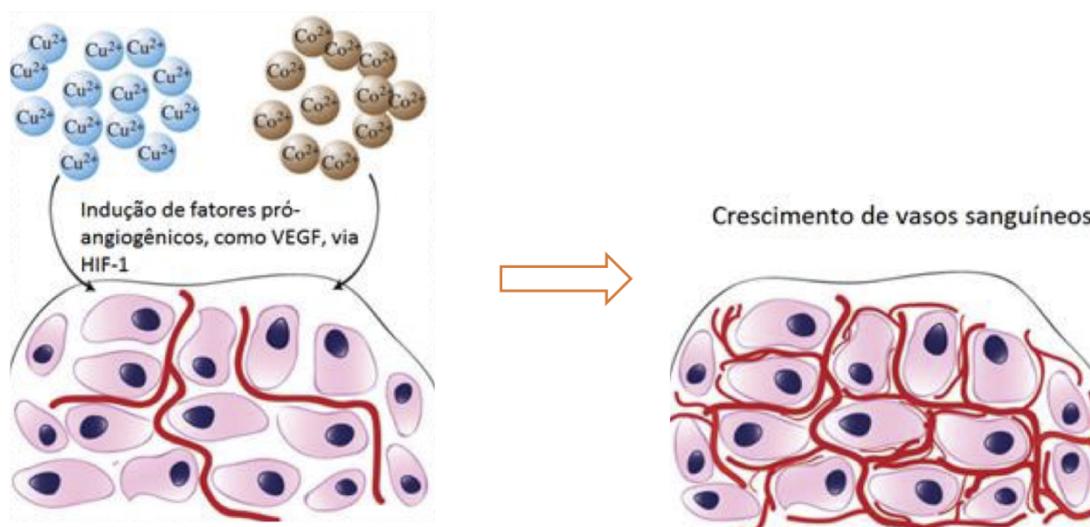


Figura 3-7. Efeito estimulador da angiogênese através dos íons Cu e Co.
Fonte: WALLACE et al., 1999 ¹³².

Vidros bioativos derivados do processo sol-gel foram sintetizados contendo diferentes concentrações de cobalto, utilizando CoCl_2 como fonte de cobalto, demonstrando uma liberação controlada de íons, além do suporte à fixação e crescimento de células-tronco da medula óssea (BMSCs- bone marrow stromal cells), sem nenhuma citotoxicidade aparente ²⁴. *Scaffolds* desses materiais foram preparados, e resultados demonstraram que houve aumento significativo na expressão de VEGFA e HIF1A por células-tronco da medula óssea quando comparados com o mesmo material sem a presença de cobalto ¹³³. Propriedades angiogênicas e osteogênicas também foram observadas em compósitos

contendo micropartículas de vidro bioativo dopadas com cobalto, onde matrizes tridimensionais demonstraram capacidade de contornar a falta de vascularização normalmente visto no campo de engenharia de tecidos ²⁴.

3.4.2 Vidro bioativo em *scaffolds* híbridos

A engenharia de tecidos possui desafios, como o desenvolvimento de estruturas tridimensionais porosas, denominadas *scaffolds*, que permitam a adesão e proliferação celular, crescimento e proliferação ^{109,134}. Esse material deve possuir estrutura porosa aberta e interconectada, permitindo a penetração de células, crescimento de tecidos e eventualmente vascularização, além de ter boa biocompatibilidade, taxa de degradação controlada, e um suporte biomecânico inicial que permita a geração da matriz extracelular ^{135,136}.

A associação de materiais poliméricos com biocerâmicas tem chamado bastante atenção nas últimas décadas, aliando a flexibilidade de polímeros com o caráter bioativo de vidros, levando à formação de diversos compósitos ou híbridos ¹³⁷. *Scaffolds* híbridos podem ser produzidos tendo como base materiais poliméricos, seja de origem natural (proteínas, como o colágeno; polissacarídeos, como o ácido hialurônico, quitosana e outros) ou de origem sintética (poliésteres biodegradáveis, poliéteres, poliuretanos, dentre outros) ^{138,139}.

Compósitos convencionais geralmente não representam uma verdadeira sinergia de seus materiais constituintes. Isso é evidente em aplicações de biomateriais, onde os dispositivos devem interagir com as células, resistir a cargas cíclicas e biodegradar com segurança. Um híbrido é diferente de um nanocompósito porque os componentes são indistinguíveis um do outro na nanoescala e acima, enquanto em um nanocompósito, nanopartículas ou fibras são componentes discretos dispersos em uma matriz polimérica. As interações entre os componentes em um híbrido têm potencial para criar maior sinergia, pois o híbrido pode atuar como uma fase única com comportamento físico-químico congruente e propriedades mecânicas personalizadas ¹⁴⁰. Consequentemente, híbridos inorgânico-orgânicos podem encontrar diversas aplicações (eletrônica, ópticas, revestimentos, biomédicas, etc.) ¹⁴¹⁻¹⁴³.

São diversos os exemplos de híbridos que combinam as propriedades de polímeros e

biocerâmicas para o desenvolvimento de materiais para a engenharia de tecidos, como por exemplo, *scaffolds* e membranas produzidas a partir de policaprolactona (PCL), poliuretano (PU), ácido polilático (PLA), poliálcool vinílico (PVA), gelatina, quitosana, dentre outros polímeros, utilizados como matrizes, e hidroxiapatita, fosfato de cálcio ou vidro bioativo como fase de preenchimento ¹³⁸.

Atualmente, o PVA figura como um dos polímeros sintéticos mais frequentemente utilizados em aplicações farmacêuticas e biomédicas avançadas, devido à sua alta disponibilidade, baixo custo e, principalmente, pela boa biocompatibilidade. São exemplos de aplicações relatadas para o PVA os sistemas de liberação de fármacos, tratamento tópico de feridas, produção de órgãos artificiais, lentes de contato, dentre outros ¹⁵.

O PVA é a resina sintética produzida em maior volume no mundo. Foi obtido pela primeira vez em 1924, por Herman e Haehnel, pela hidrólise do poliacetato de vinila, que é a forma de obtenção comercial utilizada até hoje (Figura 3.8) ¹⁴⁴. O PVA tem uma cadeia de carbono vinílico e um grupo lateral hidroxila, que se liga facilmente às partículas de óxido ¹⁴⁵ e se destaca por suas características favoráveis para aplicações médicas como elevada hidrofília, formação de filmes e processabilidade ^{11,146}.

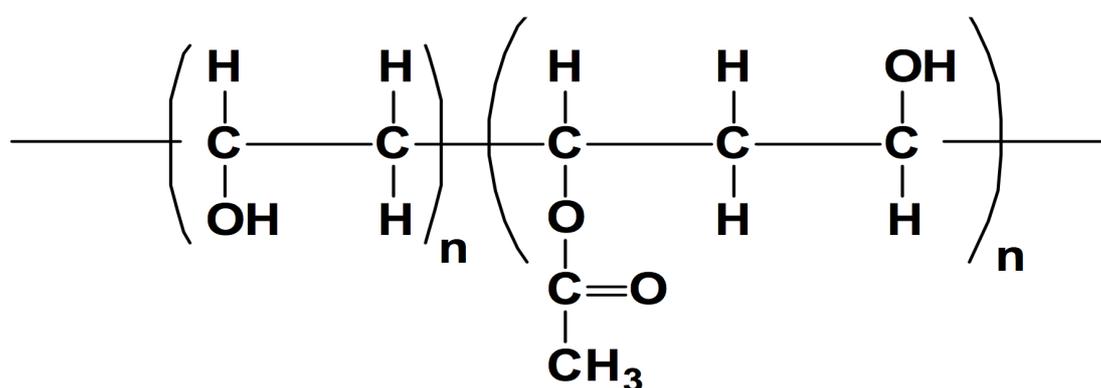


Figura 3-8. Fórmula química do poli (álcool vinílico-co-acetato de vinila).
Fonte: COSTA, 2010.

O PVA, como outros polímeros não aniônicos solúveis em água, é caracterizado pela baixa toxicidade ¹⁴⁷. Ele também apresenta propriedades elásticas favoráveis e disponibilidade de sítios para adesão de moléculas bioativas ^{11,148-150}. Dentre as várias aplicações, o PVA tem sido proposto como biomaterial promissor para ser empregado

como cartilagem ^{17,151}, córneas oculares ¹⁵², cicatrização de feridas ¹⁵³ e na engenharia de tecido ¹⁴⁸.

Scaffolds de PVA e vidro bioativo em diferentes composições foram obtidos por Pereira e colaboradores ¹⁵⁴, com porosidade variando de 60 a 90% e diâmetro de poro entre 30 e 500µm. O potencial osteogênico *in vitro* e *in vivo* de espumas porosas contendo 50%PVA e 50% vidro bioativo, neutralizadas utilizando solução alcoólica de acetato de cálcio, foram avaliadas utilizando células mesenquimais da medula óssea de ratos, resultando no aumento da proliferação celular e diferenciação osteogênica quando comparada com o controle, aumentando a mineralização ⁹³.

Este trabalho tem como objetivo estudar o estímulo angiogênico com a incorporação do íon terapêutico Co ao VB e ao *scaffold* híbrido de PVA-VB. Para isso, materiais a base de PVA e VB contendo Co foram sintetizados, avaliando-se o efeito dessa incorporação nas propriedades térmicas e estruturais dos *scaffolds* híbridos, bem como sua biocompatibilidade tecidual, viabilidade celular e expressão de marcadores angiogênicos, com objetivos futuros de aplicação desses biomateriais como promotores eficazes da angiogênese.

Capítulo 4 . EFEITO SOBRE A ANGIOGÊNESE DE PASTILHAS DE VIDRO BIOATIVO CONTENDO COBALTO - ESTUDOS *IN VITRO* E *IN VIVO*

4.1 Introdução

O desenvolvimento de biomateriais que possam substituir os ossos e tecidos articulares tem sido estimulado através de abordagens terapêuticas para o tratamento de fraturas, tumores e distúrbios degenerativos da cartilagem que prejudicam as atividades funcionais de vida diária das pessoas ¹⁵⁵⁻¹⁵⁷. Dentre os biomateriais em estudo, os vidros bioativos (VB) têm demonstrado grande potencial para regeneração tecidual, e sua flexibilidade de composição permite a incorporação de diferentes íons com atividades fisiológicas e propriedades terapêuticas na rede de vidro ³⁰. Entre os muitos íons que poderiam ser incorporados, o cobalto (Co) é conhecido como um íon que mimetiza a hipóxia ²⁴, influenciando a formação de novos vasos sanguíneos pelo fator de crescimento endotelial vascular A (VEGFA) e estabilizando o fator induzível por hipóxia subunidade 1 A (HIF1A), um ativador de genes relacionados à angiogênese ^{158,159}, que é de grande interesse para aplicações de engenharia de tecidos. No entanto, apesar de suas propriedades promissoras, a biocompatibilidade de vidros incorporados com Co não foi estudada em detalhes, bem como a associação à indução da produção de fatores de crescimento.

Este trabalho teve como objetivo produzir e caracterizar pastilhas de VB incorporadas com Co através do método sol-gel, e avaliar a resposta angiogênica *in vitro* e *in vivo* através da avaliação da expressão gênica de fatores de crescimento envolvidos no processo de angiogênese.

4.2 Materiais e Métodos

4.2.1 Síntese de pastilhas de vidro bioativo (BG) e cobalto (Co).

Os produtos químicos utilizados na síntese de BG foram: tetraetil ortossilicato a 98% (TEOS) e trietil fosfato a 99% (TEP) (Sigma-Aldrich, EUA), nitrato de cálcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) e cloreto de cobalto ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (Synth, Brasil) e ácido nítrico (HNO_3 68%) (Vetec, Brasil). Os vidros bioativos (VBs) foram produzidos através do método sol-gel, conforme descrito anteriormente³⁰, com base na composição 58S (60% SiO_2 , 36% CaO , 4% P_2O_5 , em% molar). Resumidamente, TEOS e TEP foram hidrolisados em meio ácido contendo água deionizada (razão molar $\text{H}_2\text{O} / \text{TEOS} = 12$), com agitação magnética por 1 hora. Em seguida, o nitrato de cálcio foi dissolvido no sol e misturado por mais uma hora. O gel obtido foi envelhecido por 72 horas em um recipiente selado de Teflon a 60 ° C, seguido de secagem com um aumento de temperatura de 10 ° C a cada 24 horas até atingir 120 ° C.

Para amostras contendo cobalto, o $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ foi dissolvido no sol antes do nitrato de cálcio. O Co foi incorporado para substituir parcialmente o teor de Ca nas amostras de VB. Neste trabalho, uma amostra de referência sem conteúdo de Co foi produzida (VB) e outra amostra produzida com 2,5% de CoO (VB-2,5Co). Essa concentração de cobalto mostrou uma liberação de até 4ppm em um estudo anterior³⁰ que foi suficiente para a produção de vasos sanguíneos, sendo portanto, promissora para o estudo da angiogênese neste trabalho. A temperatura do tratamento térmico foi ajustada para 650 °C por 3 horas (2 °C.min⁻¹). As amostras foram então peneiradas para obter partículas variando de 38 a 150 µm. O pó de vidro foi utilizado para obter pastilhas de vidro bioativo (5 mm de diâmetro e 2 mm de espessura), utilizando prensa de parafuso e matriz hidráulica (Pike Technologies).

4.2.2 Caracterização estrutural das pastilhas de VB e VB-2.5Co

4.2.2.1 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Para obtenção do FTIR as pastilhas foram maceradas para melhor leitura do espectro no equipamento. A avaliação da estrutura química foi realizada por Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), utilizando a técnica de refletância,

com comprimentos de onda entre 400 e 4000 cm^{-1} em equipamento Alpha Bruker, utilizando 128 varreduras e resolução de 4 cm^{-1} .

4.2.2.2 Difração de raios X (DRX)

A análise por Difração de Raios X (DRX) foi empregada para verificar a organização estrutural das amostras produzidas. Os difratogramas foram coletados no equipamento Philips PW1700 usando radiação Cu-K α ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$) a 40 kV / 40 mA. Os dados foram coletados entre 4,05 e 89,95 (2θ) com passo de 0,06° e tempo de incidência de 1,5 s.

4.2.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM) e Espectroscopia por Dispersão de Energia de Raios X (EDS)

As morfologias da superfície das pastilhas foram examinadas com um microscópio eletrônico de varredura (SEM) FEI-INSPECT S50, equipado com o EDAX Genesis Dispersive Energy Spectrometer (EDS), que é usado para avaliar qualitativamente a composição química elementar da superfície das amostras. As amostras foram revestidas com carbono e analisadas à uma tensão de 15kV.

4.2.2.4 Microtomografia de Raios X (Micro-CT)

A microestrutura e a distribuição do tamanho dos poros foram investigadas por Microtomografia de raios X (Micro-CT) usando um scanner de Micro-CT de mesa compacto (SkyScan 1174, Bruker Micro-CT, Bélgica) com uma fonte de tensão de 40 kV, corrente de 800 μA e tamanho de pixel de 10 μm sem filtro. As amostras foram colocadas em um suporte, giradas a 180°, e aquisição de imagens a cada 0,7°. As projeções de sombra adquiridas (formato TIFF de 16 bits) foram reconstruídas em fatias 2D usando a interface do software NRecon (v.1.6.1.18, Bruker Micro-CT, Bélgica) e o software CT Analyzer (v. 1.15.4.0. Skyscan, Bruker Micro-CT, Bélgica) foi usado para análise 3D e reconstrução e interpretação da superfície 3D. Para visualização volumétrica 3D, foi utilizado o software da versão CT Vol 2.3.1.0 (Skyscan, Bruker Micro-CT, Bélgica).

4.2.3 Estudos *in vitro*

Todas as amostras foram esterilizadas para os ensaios biológicos. A esterilização foi por radiação gama a 4 kilogray (4 kGy) ^{160,161}.

4.2.3.1 Cultura de células endoteliais da veia do cordão umbilical humano (HUVECs)

Células endoteliais da veia do cordão umbilical humano (HUVECs - ATCC) foram cultivadas em meio com DMEM (47%; Gibco, Massachusetts, EUA), DMEM F12 (47%; Gibco, Massachusetts, EUA), FBS (5% v / v; Gibco, Massachusetts, EUA) e penicilina / estreptomicina (1% v / v; Invitrogen, Califórnia, EUA). As células foram incubadas em atmosfera umidificada de CO₂ a 5% a 37 ° C e ressuspensas da garrafa para plaqueamento e realização dos experimentos a 90% de confluência usando tripsina-EDTA (0,25%; Gibco, Massachusetts, EUA) ³⁰.

4.2.3.2 Preparação do produto iônico (PI)

As pastilhas de VB foram suspensas em PBS 1x (20 mg / mL), agitado durante 1 minuto e refrigerado a 7 °C por 72 horas. Posteriormente, o sobrenadante foi removido e este produto iônico foi distribuído em placas de 48 poços previamente preparadas para os ensaios de MTT, ensaio de formação de vasos sanguíneos e PCR em tempo real. O meio controle conteve apenas PBS 1x que também foi mantido sob as mesmas condições de preparo ³⁰.

4.2.3.3 Teste de citotoxicidade

A biocompatibilidade de VB e VB-2,5Co foi avaliada através do ensaio de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) (Invitrogen, Califórnia, EUA), como descrito previamente ¹⁶². O ensaio MTT quantifica a atividade mitocondrial com base na redução de um sal de tetrazólio em cristais de formazan em células vivas. Neste estudo, as HUVECs foram expostas à produtos iônicos de vidro bioativos em diferentes períodos de tempo. Em resumo, 1×10^4 HUVECs foram plaqueadas por poço em placas de 48 poços (Sarstedt, Nümbrecht, Alemanha). Após cultura celular por 24 h, as células foram tratadas com produtos iônicos (PIs) do VB e VB-2,5Co. As concentrações finais escolhidas de 1000, 1500 e 2000 µg / mL foram baseadas na literatura ³⁰, sendo calculadas a partir da concentração do estoque dos PIs. O controle negativo recebeu

apenas PBS 1x. Após o tratamento, os grupos celulares foram avaliados no final em três tempos (24, 48 e 72h). O meio foi então removido e uma solução contendo 130 μ L de DMEM (Gibco, Massachusetts, EUA) e 100 μ L de MTT (5 mg / mL) foi adicionada por poço. Após 2 h, os cristais de formazan foram visualizados em um microscópio óptico e depois dissolvidos em 130 μ L de SDS a 10% em HCl 0,01 M (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA). Para todas as etapas acima mencionadas, as placas de cultura foram incubadas a 37 °C em uma atmosfera umidificada de CO₂ a 5%. Após 18h, 100 μ L da solução foram transferidos para uma placa de 96 poços e uma leitura da densidade óptica foi realizada a 595 nm. Os experimentos foram realizados em triplicatas biológicas.

4.2.3.4 Ensaio de formação de tubo endotelial

Amostras de micropartículas VB e VB-2,5Co foram usadas para verificar o potencial angiogênico através do ensaio de formação de tubos usando as HUVECs^{45,163}. As concentrações usadas para VB e VB-2,5Co foram 10, 100 e 1000 μ g / mL. Para este ensaio, usamos apenas VEGFA, pois o HIF1A é uma proteína intracelular e não pôde ser analisado. As etapas do protocolo utilizadas são descritas a seguir: preparação de placas de 96 poços com matrigel; uma placa de 96 poços foi mantida no freezer por 30 minutos; O matrigel foi descongelado em gelo até ficar líquido; na placa fria foram adicionados 50 μ l / poço de matrigel para cobrir toda a superfície do poço. A placa foi transferida para a incubadora (37 °C), onde permaneceu por 30 minutos. As HUVECs foram tripsinizadas e ressuspensas em DMEM / F12 5% FBS, contadas no hemocítmetro, centrifugadas por 5 minutos a 300 xg e o pellet ressuspensado em meio a uma concentração de 3×10^5 células/ mL (cálculo para placa de 96 poços). 50 μ l da solução celular foram transferidos para tubos de microcentrífuga, onde 200 μ g / mL de solução VEGFA, 200 μ L de DMEM / F-12 com 1ng / mL de EGF como controle positivo e 200 μ L de DMEM / F-12 como controle negativo foram adicionados. O conteúdo do tubo (250 μ L) foi transferido para os poços da placa de 96 poços e colocado em uma incubadora. Dessa forma, foram plaqueadas 1×10^4 células por poço. Para avaliar a formação de tubos, as células foram incubadas com 1 nM de calceína AM em DMEM / F-12 por 5 minutos em células, sendo em seguida lavadas com PBS 1x e mantidas em PBS ou meio fotográfico de campo, luz e fluorescência. As células foram monitoradas a cada 60 minutos por 24 horas para verificar a formação de tubos.

4.2.3.5 Ensaio RT-qPCR

Antes do ensaio de RT-qPCR, as HUVECs foram plaqueadas com densidade de $2,5 \times 10^5$ em uma placa de 12 poços revestida com 550 μL de matrigel previamente solidificado (Corning, Nova York, EUA). As células foram plaqueadas com uma solução de tratamento composta por meio de cultura + PI dos biomateriais VB e VB-2,5Co a uma concentração de 2000 $\mu\text{g} / \text{mL}$ por 14 e 20 horas. As células tratadas com 10 ng / mL de VEGFA foram usadas como controle positivo, enquanto as células não tratadas foram usadas como controle negativo. Durante todo o período do experimento, as placas foram mantidas em uma incubadora a 37 °C em 5% de CO_2 . No final do experimento, o isolamento do RNA foi realizado.

Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores

Os ensaios de RT-qPCR foram realizados com os genes alvos *HIF1A* (*hypoxia inducible factor 1 subunit alpha*) e *VEGFA* (*vascular endothelial growth factor A*) e para normalização dos dados foram utilizados os genes de referência *HPRT1* (*hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1*) e *YWHAZ* (*tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta*). Os oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados utilizando o programa *Primer 3*, versão 0.4.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) e análises de parâmetros tais como conteúdo GC, formação de homodímero, heterodímero e *hairpins* foram realizadas usando o *software* *OligoAnalyzer 3.1* (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>). A especificidade das sequências desenhadas foi confirmada usando o programa *Primer-BLAST* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), de forma a garantir que os iniciadores amplificavam somente a região genômica de interesse. As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores e o tamanho esperado de cada *amplicon* são apresentados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores e tamanho esperado dos amplicons.

| Gene | Número de acesso (<i>GenBank</i>) | Sequência (5'-3') | Tamanho do amplicon (pb) |
|--------------|-------------------------------------|--|--------------------------|
| <i>HIF1A</i> | NM_001530.3 | F: TTTTGGCAGCAACGACACAG R: TTCAGCGGTGGGTAATGGAG | 136 |
| <i>VEGFA</i> | NM_001171623.1 | F: GGAGGGCAGAATCATCACGAAG R: GGATGGCTTGAAGATGTACTCG | 132 |
| <i>HPRT1</i> | NM_000194.2 | F: TGGCGTCGTGATTAGTGATGA R: CATCTCGAGCAAGACGTTTCAGT | 140 |
| <i>YWHAZ</i> | NM_003406.3 | F: CGAGCAGGCTGAGCGATATG R: CCTCCAAGATGACCTACGG | 142 |

pb: pares de bases. GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)

Extração de RNA total e tratamento com DNase I

Células HUVEC dos grupos controle negativo (CN), controle positivo (CP), vidro bioativo (VB) e vidro bioativo com 2,5% de Co (VB-2,5Co) foram submetidas à extração de RNA total usando o reagente TRIzol® (Invitrogen), de acordo com o seguinte protocolo: 200 µL de clorofórmio foram adicionados por 1 mL de TRIzol® e os microtubos foram agitados vigorosamente com as mãos por 15 segundos, seguido de incubação à temperatura ambiente por 3 minutos e centrifugação a 15.000 ×g por 15 minutos a 4 °C. A fase superior aquosa foi transferida para novo microtubo onde foram adicionados 500 µL de álcool isopropílico e 1 µL de acrilamida linear. As amostras foram incubadas por 3 horas a -70 °C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 15000 ×g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com 1 mL de etanol 75%. Após rápida agitação em vórtex, foi feita nova centrifugação a 15000 ×g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o microtubo mantido à temperatura ambiente para completa evaporação do álcool. O *pellet* de RNA foi ressuscitado em 25 µL de água *nuclease-free*, seguido de incubação a 65 °C por 15 minutos para garantir a completa dissolução do RNA. As amostras foram quantificadas usando o aparelho *Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer* (Thermo Scientific) e estocadas a -70 °C até o momento de uso.

Posteriormente, as amostras de RNA total foram tratadas com DNase I (Promega), conforme as recomendações do fabricante. Foram adicionados 2,5 µg de RNA; tampão *RQ1 RNase-Free DNase 10X Reaction Buffer* (Promega); 2,5 U da enzima *RQ1 RNase-Free DNase* (Promega) e água *nuclease-free*, totalizando um volume de 10 µL. As reações foram incubadas a 37 °C por 30 minutos, seguido da adição de 1 µL do reagente *Stop Solution* e incubação a 70 °C por 10 minutos. As amostras foram quantificadas usando o aparelho *Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer* (Thermo Scientific) e estocadas a -70 °C até o momento de uso.

Síntese de cDNA e amplificação por RT-PCR (transcrição reversa-reação em cadeia da polimerase)

A primeira fita de cDNA foi sintetizada usando o *kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems), em que foi feito um *mix* contendo 2 µL de *10X RT Buffer*, 0,8 µL de *25X dNTP Mix* (100 mM), 2 µL de *10X RT Random Primers*, 1 µL de *MultiScribe™ Reverse Transcriptase*, 1,5 µg de RNA tratado com DNase e água *nuclease-free*, totalizando um volume de 20 µL. As reações foram incubadas a 25 °C por 10 minutos, 37 °C por 2 horas e, em seguida, a enzima foi inativada a 85 °C por 5 minutos. As amostras foram quantificadas usando o aparelho *Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer* (Thermo Scientific).

Aproximadamente 50 ng de cDNA foram utilizados nas reações de PCR com 1,5 mM de MgCl₂; tampão *5X Colorless GoTaq® Flexi Buffer* (Promega); 0,2 mM de cada um dos quatro dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); 0,25 µM de *primers* específicos para cada gene e 1 U de *GoTaq® DNA Polymerase* (Promega), totalizando um volume final de 20 µL. Os ciclos de amplificação foram constituídos de uma etapa inicial de desnaturação a 94 °C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de: 94 °C por 30 segundos (desnaturação), 60 °C por 30 segundos (anelamento) e 72 °C por 30 segundos (extensão). Uma última etapa de extensão foi realizada a 72 °C por 5 minutos. Em todas as reações foi feito um controle branco de amplificação para cada par de oligonucleotídeos iniciadores, onde água estéril foi acrescentada no lugar de cDNA. Os produtos de PCR e o marcador *50 pb DNA Step Ladder* (Sigma) foram aplicados em géis de agarose (2%) corados com brometo de etídeo para confirmação do tamanho dos *amplicons*.

Ensaio de PCR Quantitativa em Tempo Real (RT-qPCR) e análises dos dados

Cada reação de RT-qPCR continha 5 µL de *GoTaq[®] qPCR Master Mix 2X* (Promega); 0,1 µL de *CXR Reference Dye* (Promega); 60 ng de cDNA; cada par de oligonucleotídeos iniciadores em sua concentração ótima e água *nuclease-free*, totalizando um volume final de 10 µL. As condições de amplificação foram de uma etapa inicial de desnaturação a 95 °C por 2 minutos, seguido de 40 ciclos de: 95 °C por 15 segundos (desnaturação) e uma etapa única de anelamento e extensão a 60 °C por 1 minuto. Após os 40 ciclos de amplificação, todas as amostras foram submetidas à desnaturação gradual para determinação da curva de dissociação (*melting curve*). Em todas as reações foi feito um controle branco de amplificação para cada par de *primers*, onde água estéril foi acrescentada no lugar de cDNA. As corridas foram feitas no equipamento *ABI PRISM[®] 7900HT Sequence Detection System* (Applied Biosystems) e os dados processados utilizando o *software SDS*, versão 2.4 (Applied Biosystems).

A concentração ótima de cada oligonucleotídeo iniciador foi determinada por meio do teste de concentração de *primers*, em que foram testadas as concentrações 0,1; 0,15; 0,2; 0,3 e 0,4 µM. A partir desse teste, foram padronizadas as concentrações de cada iniciador *forward* (F) e *reverse* (R) a serem utilizadas nos ensaios de RT-qPCR: 0,1 µM (F)/0,1 µM (R) para *VEGFA*; 0,15 µM (F)/0,15 µM (R) para *HPRT1*; 0,3 µM (F)/0,3 µM (R) para *HIF1A* e *YWHAZ*.

Curvas padrão para cada marcador foram obtidas por meio de reações envolvendo diluições logarítmicas seriadas de cDNA. Os valores de *slope* (coeficiente angular da reta) foram utilizados no cálculo da eficiência de amplificação da reação de RT-qPCR para cada marcador [Eficiência = $(10^{-1/\text{slope}} - 1)$]. A partir desse teste padronizou-se a quantidade de cDNA a ser utilizada em todos os ensaios de RT-qPCR (60 ng/amostra). A especificidade de amplificação de cada par de oligonucleotídeos iniciadores foi confirmada por meio de análises das curvas de dissociação.

A expressão relativa dos genes alvos foi determinada usando o método descrito por Pfaffl¹⁶⁴, no qual a quantificação relativa é calculada utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\text{Expressão Relativa} = \frac{(E_{\text{alvo}})^{\Delta\text{CT}_{\text{alvo}}}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta\text{CT}_{\text{ref}}}}$$

onde:

E_{alvo} = eficiência de amplificação do par de *primers* do gene alvo;

E_{ref} = eficiência de amplificação do par de *primers* do gene de referência;

ΔCt = Ct calibrador – Ct amostra.

A amostra calibradora correspondeu ao cDNA sintetizado a partir do RNA extraído de células HUVEC do grupo controle negativo.

4.2.4 Estudos *in vivo*

4.2.4.1 Cirurgia animal

Implantes subcutâneos (pastilhas de 2 mm x 5 mm) foram inseridos na região dorsal (próximo às escápulas) de ratos Wistar, previamente pesados, anestesiados com uma combinação de cloridrato de cetamina a 10% (Syntec São Paulo, Brasil) e cloridrato de xilazina a 2% (Syntec São Paulo, Brasil), na proporção de 0,1 mL para cada 100 g/animal. Foram utilizados quinze ratos Wistar machos, pesando 210–240 g (8 semanas de idade). A tricotomia foi realizada seguida de assepsia cutânea da região de implantação com álcool iodado a 10% (Rioquímica, São Paulo, Brasil). Posteriormente, foi realizada uma incisão transversal na região dorsal do animal (2 centímetros abaixo do ângulo inferior das escápulas). A pele foi divulsionada e os implantes foram inseridos na região subcutânea. Os implantes foram atribuídos aos seguintes grupos (n = 5 implantes para cada grupo): (1) cirurgia sem implante (controle); (2) cirurgia com pastilha de VB; (3) cirurgia com pastilha de VB - 2,5Co. Nos animais controle, o procedimento foi realizado exatamente como descrito acima, no entanto, não houve inserção do implante. O procedimento foi concluído com a sutura da pele do dorso. A Figura 4.1 descreve o procedimento acima descrito. Todos os procedimentos descritos acima foram adaptados de Ribeiro-Neto et al. ¹⁶⁵.

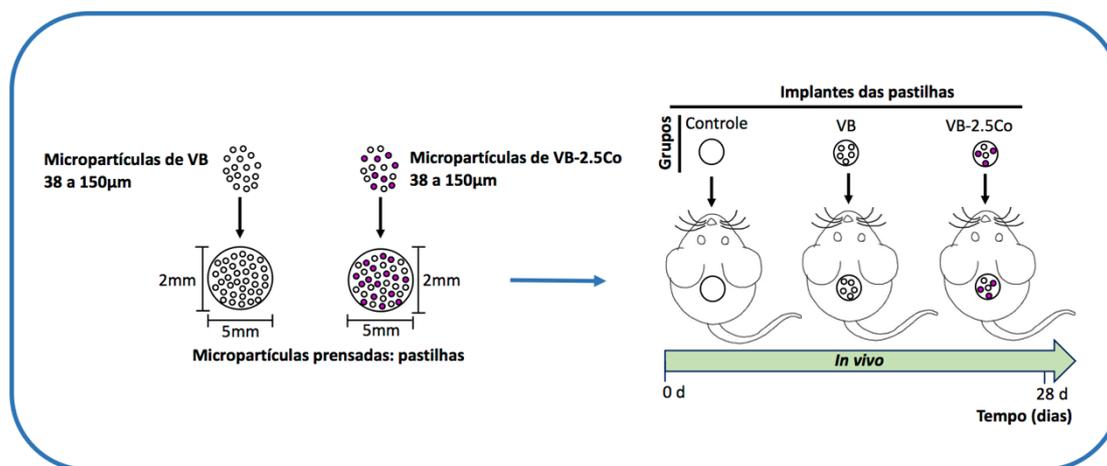


Figura 4-1. Metodologia esquemática da parte cirúrgica da implantação das pastilhas para os grupos controle, VB e VB-2.5Co.

4.2.4.2 Imunohistoquímica do VEGFA e HIF1A

As reações imunohistoquímicas para os marcadores angiogênicos VEGFA e HIF1A foram realizadas utilizando o protocolo padrão estreptavidina-biotina¹⁶⁶. Os ratos foram eutanasiados 28 dias após a colocação dos implantes subcutâneos. As amostras de pele foram obtidas, fixadas em solução de formalina neutra tamponada a 10% (pH 7,2, por 48 h), processadas e embebidas em parafina. Seções de 5 mm de espessura foram coletadas em lâminas de vidro (StarFrost, Suffolk, Reino Unido) para realização de reações imunohistoquímicas para as proteínas de interesse, segundo descrito previamente¹⁶⁷. As lâminas foram desparafinizadas, hidratadas com concentrações decrescentes de etanol e lavadas em tampão citrato (pH 6,0; Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) por 20 minutos a 82 °C para recuperação antigênica. Logo depois, as seções foram incubadas com peróxido de hidrogênio a 3% diluído em solução salina tamponada com fosfato (PBS; pH 7,4) por 30 minutos para bloquear a peroxidase endógena e, em seguida, receberam solução Protein Block (Abcam, Cambridge, Reino Unido) por 5 minutos para bloquear ligações inespecíficas. As amostras foram incubadas a 4 °C overnight em uma câmara umidificada com um anticorpo monoclonal anti-VEGFA de camundongo (SC7269; Califórnia, EUA; 1:50) ou anticorpo monoclonal anti-HIF (NB100-105SS; Novus Biologicals, Littleton, EUA; 1:20) em albumina de soro bovino com PBS a 1% (PBS-BSA). Após a incubação com o anticorpo primário, as seções foram lavadas em PBS e tratadas com Advance HRP Link (K4068, Dako, Glostrup, Dinamarca) e Advance HRP Enzyme (K4068, Dako, Glostrup, Dinamarca) por 30 minutos em temperatura ambiente, seguindo as instruções do

fabricante. A coloração foi detectada por uma solução de 3,3 - diaminobenzidina a 0,05% e H₂O₂ a 0,2%. Finalmente, as lâminas foram montadas. Os controles negativos consistiram em seções nas quais os anticorpos primários foram substituídos por PBS-BSA.

4.2.4.3 Análise de imagem

Fotos das lâminas marcadas com VEGFA ou HIF1A foram tiradas no microscópio Olympus BX53 com a câmera Olympus Q color 5 conectada, usando o programa Q Capture pro 7, com ampliação de 10x e 40x. A quantificação de vasos sanguíneos e núcleos celulares na região profunda da derme foi realizada usando o software Image J (National Institutes of Health, (NIH), EUA), nas condições detalhadas na subseção abaixo.

4.2.4.4 Morfometria VEGFA e HIF1A

A área selecionada para contagem de vasos sanguíneos e núcleos celulares estava na região profunda da derme, próximo ao local onde os implantes foram inseridos. Os vasos sanguíneos totais corados com VEGFA foram contados, assim como os núcleos celulares totais corados com HIF1A. O número de vasos e núcleos celulares foi quantificado através de fotos das seções capturadas no microscópio em campos selecionados aleatoriamente na área determinada para análise em cada grupo. Vinte fotos (aumento de 40 x) foram tiradas de cada seção histológica para cada animal dos grupos amostrais.

A quantidade de vasos sanguíneos e núcleos celulares foi calculada em relação à área total de tecido analisada, demonstrada pelas equações descritas abaixo. A área de tecido analisada foi calculada usando o software Image J (National Institutes of Health, (NIH), EUA).

$$\text{Quantidade total de núcleos celulares} = \frac{\text{núcleos celulares totais}}{\text{Area mm}^2}$$

$$\text{Núcleos corados com HIF1A} = \frac{\text{total de núcleos corados com HIF1A}}{\text{Area mm}^2}$$

$$\text{Quantidade total de vasos sanguíneos} = \frac{\text{vasos sanguíneos totais}}{\text{Area mm}^2}$$

$$\text{Vasos sanguíneos corados com VEGFA} = \frac{\text{total de vasos sanguíneos corados com VEGFA}}{\text{Area mm}^2}$$

4.2.5 Análise estatística

Os dados dos ensaios de viabilidade celular, formação de tubos e qPCR foram expressos como média \pm DP. Testes de normalidade foram realizados para confirmar a distribuição normal dos dados. Em seguida, foram realizadas as análises estatísticas usando-se o teste one-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey. Para isso, foi utilizado o software GraphPad Prism 8 (Califórnia, EUA). Resultados com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4.2.6 Declaração de ética.

Os experimentos em animais envolvendo implantes de vidro bioativo e vidro bioativo com cobalto foram conduzidos de acordo com os regulamentos éticos e de bem-estar animal do governo brasileiro (lei 11794 / 2008). O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais (Protocolo nº 22/2018).

4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A avaliação estrutural das partículas de VB e VB-2,5Co foi realizada usando FTIR, como mostrado na Figura 4.2. Bandas típicas de absorção de vidro bioativo podem ser observadas em ambas as amostras. A vibração de 450-470 cm^{-1} é frequentemente relacionada à flexão das ligações Si-O-Si, observadas principalmente nas estruturas amorfas de SiO_2 ¹⁶⁸⁻¹⁷¹. O alongamento simétrico das ligações Si-O pode ser observado entre 725 e 830 cm^{-1} ¹⁶⁸, enquanto a absorbância entre 1000 e 1150 cm^{-1} pode ser atribuída ao alongamento assimétrico da ligação Si-O-Si¹⁷⁰. A absorbância em 530 e

610 cm^{-1} é típica da flexão de P-O nos grupos fosfato, enquanto em 1200 cm^{-1} pode ser observado um alongamento dos grupos de P-O ¹⁶⁸. A absorção observada na faixa de 1400 a 1550 cm^{-1} e 1635 cm^{-1} está relacionada aos grupos carbonato e água molecular, respectivamente, que podem ser absorvidos pela superfície do vidro ¹⁷². A banda pequena em 1455 cm^{-1} pode ser atribuída ao modo de vibração C-O. Picos típicos semelhantes também foram relatados nos estudos de Che et al. ¹⁷³. Vidros contendo Co não mostraram grandes mudanças nas bandas do espectro infravermelho, indicando que a rede principal foi mantida apesar da incorporação de cobalto no vidro bioativo.

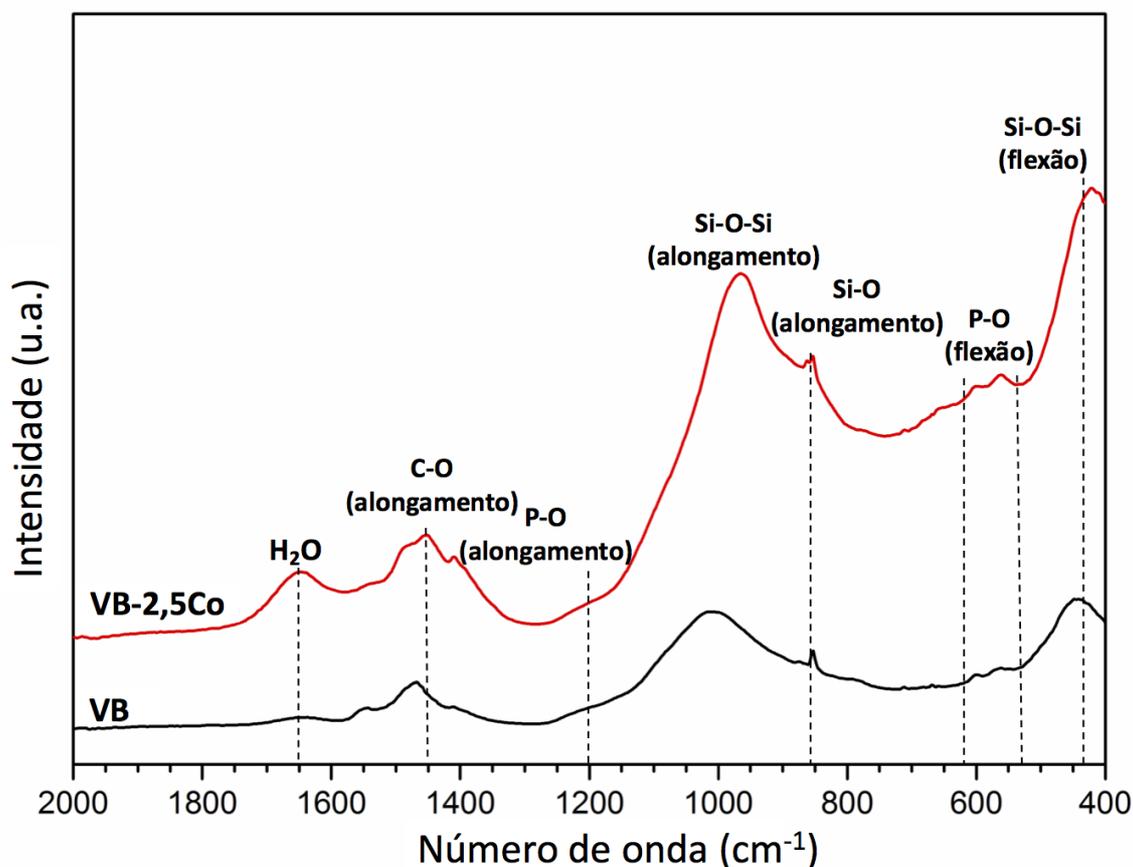


Figura 4-2. FTIR para amostras de VB e VB-2,5Co tratadas a 650 °C.

4.3.2 Difração de Raios X (DRX)

O padrão de difração das amostras de VB e VB-2,5Co após tratamento térmico a 650 °C é mostrado na Figura 4.3. A banda larga observada na faixa de 15 a 35 ° (2 θ) confirma a estrutura principalmente amorfa de ambas as amostras ¹⁷³. Na faixa de 30 a 33 ° (2 θ), observou-se um halo mais pronunciado que pode estar relacionado a uma organização inicial da estrutura do vidro que geralmente está relacionada a um pequeno núcleo de apatita ¹⁷². A sílica amorfa contém alta densidade de grupos silanol (Si-OH)

que são favoráveis ao crescimento de hidroxiapatita e formação óssea em vidros bioativos. Os grupos silanóis presentes nos vidros induzem a formação de hidroxiapatita em maior extensão do que as superfícies de sílica cristalina ¹⁷⁴. Embora observado um halo pronunciado que pode estar relacionado à organização inicial dos núcleos de apatita, o caráter amorfo do vidro foi mantido e não foram observadas diferenças qualitativas entre VB e VB-2,5Co, indicando que a incorporação de Co não afeta a estrutura amorfa do vidro. Além disso, picos cristalinos relacionados aos sais precursores de cálcio e cobalto não foram detectados por esta técnica, o que é indicativo da incorporação bem-sucedida desses íons na rede de vidro.

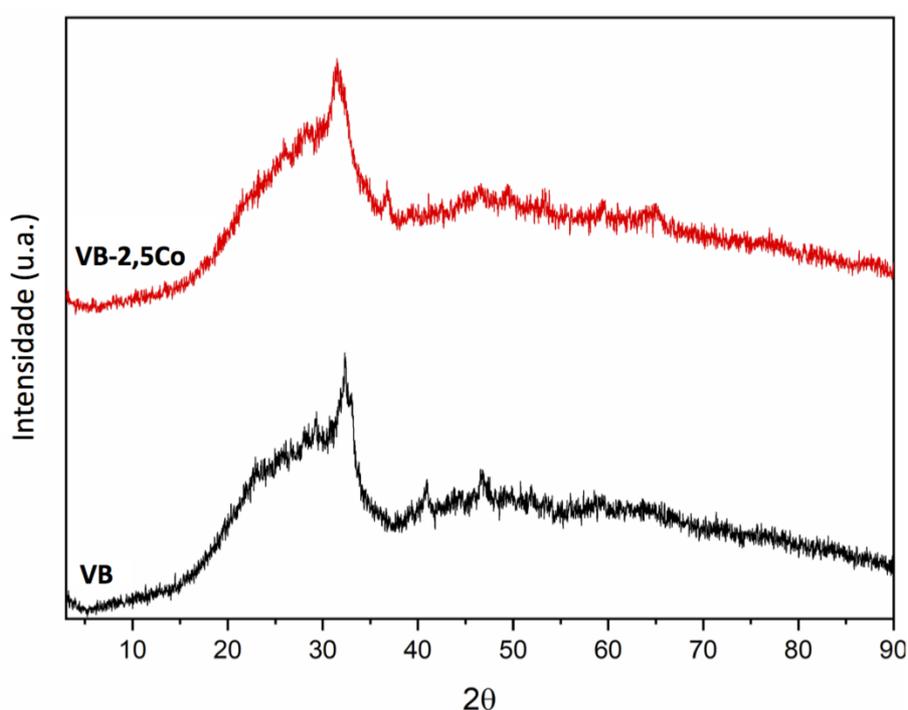


Figura 4-3. DRX para as amostras VB e VB-2,5Co tratadas a 650 °C.

4.3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia por Dispersão de Energia de Raios X (EDS)

A Figura 4.4 (A) mostra imagem de MEV de VB-2.5Co, e o mapeamento de raios-X para Co é mostrado na Figura 4.5 (B). A distribuição de Co é destacada em roxo, onde observa-se a presença do íon Co espalhado de maneira uniforme e homogênea por toda a superfície da amostra.

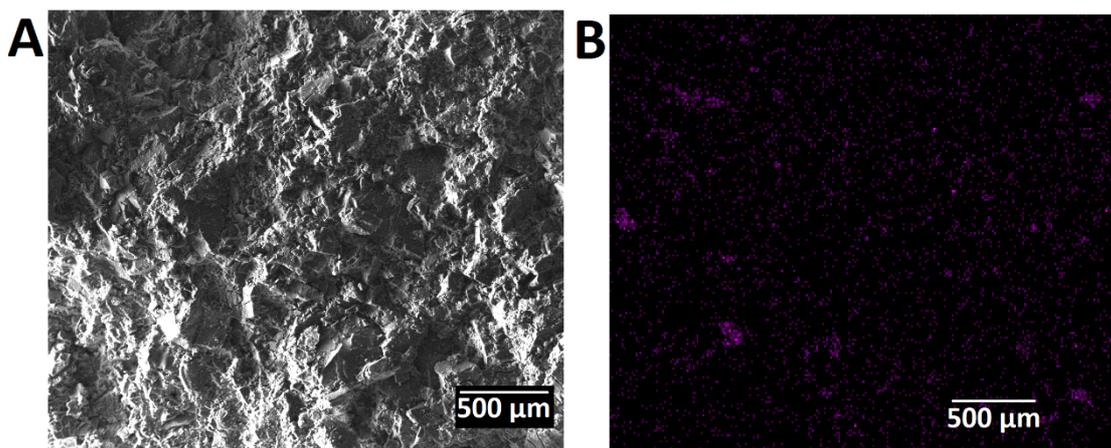


Figura 4-4. MEV das pastilhas de (A) VB-2,5Co, 200 x e B) Mapeamento de Raios X de Co na amostra VB-2.5Co, 200 x. Barra de escala: 500 µm.

Os principais constituintes do vidro foram observados por EDS, como mostrado na Figura 4.5 (A) para VB e na Figura 4.5 (B) para VB-2.5Co. A presença de Co na amostra de VB-2.5Co foi confirmada, porém o Cl residual também foi observado e pode estar relacionado ao cloreto de cobalto ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), usado como precursor de Co na síntese sol-gel.

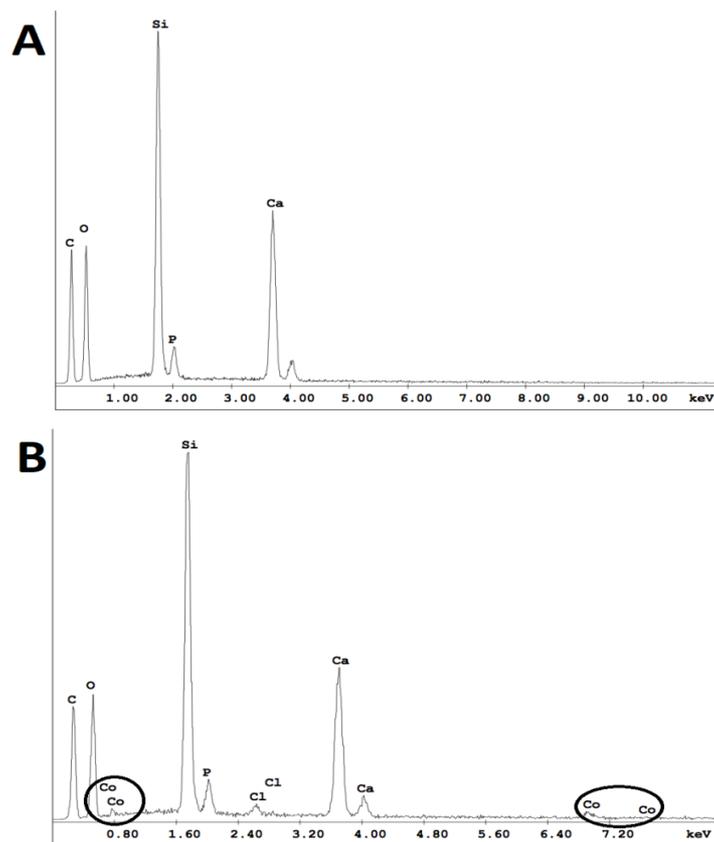


Figura 4-5. Espectro de EDS das amostras de (A) VB e (B) VB-2.5Co.

4.3.4 Avaliação da microestrutura e distribuição do tamanho dos poros por Microtomografia (micro-CT)

A Figura 4.6 mostra os modelos 3D obtidos por micro-CT para as amostras VB (Figura 4.6 A) e VB-2,5Co (Figura 4.6 B) e a distribuição do tamanho dos poros (Figura 4.6 C) e enquanto a porosidade total, porosidade aberta e tamanho médio dos poros são mostrados na Tabela 4.2. O tamanho de poros variou entre as amostras. Na amostra VB o tamanho de poros foi de 16,38 μm , sendo que, com a adição de Co, essa distribuição foi maior, 21,08 μm . A porosidade total se manteve similar para ambas amostras de VB e VB-2.5Co. A análise mostra uma baixa fração de poros abertos na estrutura das pastilhas para as amostras, o que pode ser justificado pelo fato de as micropartículas terem sido prensadas para se obter as pastilhas.

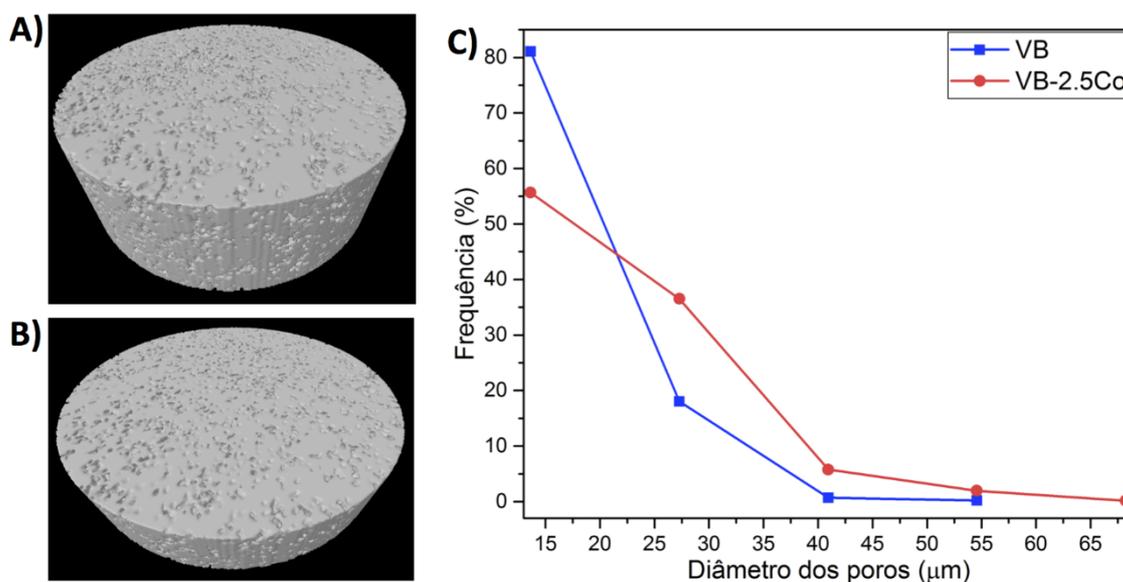


Figura 4-6. Modelos de micro-CT 3D e distribuição do tamanho dos poros obtidos dos *scaffolds* híbridos de VB e VB-2,5Co.

Tabela 4.2. Dados da análise tridimensional das amostras VB e VB-2,5Co.

| Parâmetro | Amostras | |
|-----------------------|----------|----------|
| | VB | VB-2,5Co |
| Tamanho de poro (μm) | 16,38 | 21,08 |
| Porosidade aberta (%) | 9,03 | 8,25 |
| Porosidade Total (%) | 10,72 | 10,74 |

4.3.5 Teste de citotoxicidade

Neste estudo, as HUVECs foram expostas a diferentes concentrações do PI de VB e VB-2,5Co (1000 μg / mL, 1500 μg / mL, 2000 μg / mL) em diferentes períodos de tempo, e os resultados da viabilidade celular são mostrados na Figura 4.7 A e B. Não foi observada citotoxicidade, mesmo após 72 horas de exposição do produto iônico às células. A liberação de Co das pastilhas não influenciou na atividade mitocondrial dos HUVECs. Após 24 horas, células estimuladas com VB-2,5Co com concentração de 2000 μg / mL apresentaram aumento significativo na viabilidade celular quando comparadas às células do grupo controle (Figura 4.7 B).

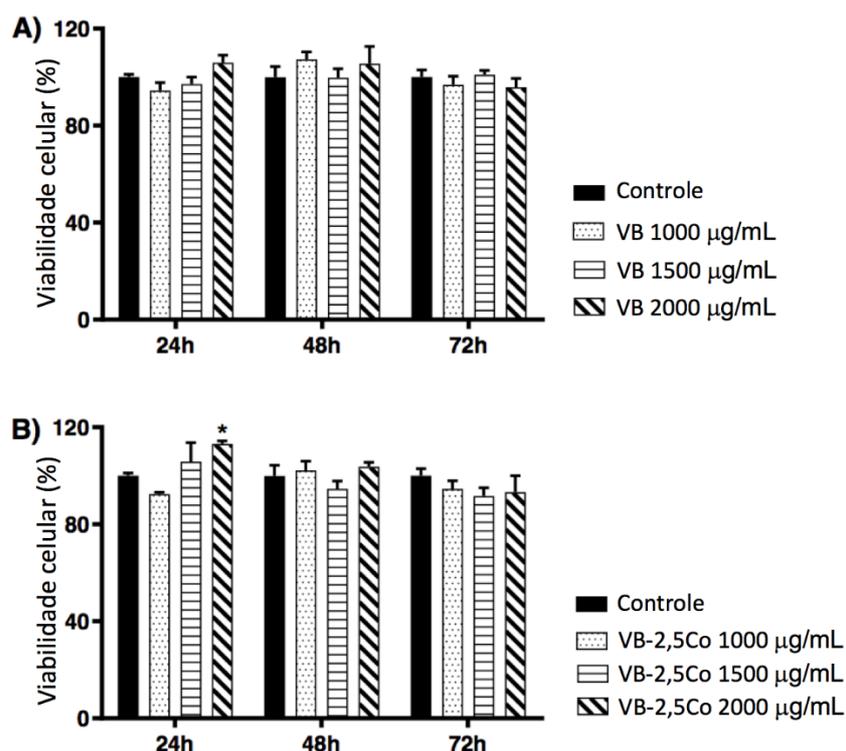


Figura 4-7. Viabilidade de HUVECs determinada pelo ensaio MTT para (A) VB e (B) VB-2,5Co.

Viabilidade celular média normalizada pela viabilidade média do grupo controle. Barras de erro indicam \pm DP, e significância estatística foi verificada através do one-way ANOVA com $p < 0,05$ e um pós-teste de Tukey. (* $p < 0,05$ versus Controle).

A biocompatibilidade e citotoxicidade das pastilhas de VB e VB-2,5Co foi avaliada por meio de PI em contato com HUVECs. Os VBs têm sido investigados e aplicados há décadas na regeneração óssea. Um estudo recente demonstrou a capacidade dos VBs em estimular a vascularização¹⁷⁵. Vidros incorporados com Co são bioativos, desenvolvem uma camada de Hidroxiapatita (HCA) nas superfícies de fluido corporal simulado (SBF) e mostram melhor angiogênese quando implantados¹⁷⁶. Através da angiogênese, os tecidos lesionados podem ser regenerados com o surgimento de novos vasos sanguíneos, fornecendo suprimento sanguíneo, oxigenação e nutrientes ao local da lesão^{177,178}. As células endoteliais podem auxiliar na resposta inflamatória, colaborando com o processo angiogênico, uma vez que essas células podem formar rapidamente novos vasos sanguíneos. Durante a inflamação, há alterações nos vasos sanguíneos que permitem os neutrófilos e monócitos aderirem às células endoteliais. Após aderir às paredes dos vasos, os leucócitos migram para os tecidos adjacentes através de fendas entre as células endoteliais, onde ocorre proliferação e reorganização das células endoteliais para formar o tubo capilar^{44,179,180}. As HUVECs são frequentemente usadas em testes *in vitro* para examinar diferentes processos angiogênicos¹⁸¹.

A liberação de Co de VB-2,5Co não mostrou influência na atividade mitocondrial de HUVECs. Estudos anteriores indicaram que o Co em altas concentrações pode causar citotoxicidade celular¹⁸²⁻¹⁸⁴, o que não ocorreu nas concentrações avaliadas neste estudo. A avaliação do MTT mostrou que VB e VB-2,5Co poderiam ser aplicados como material potencial para a engenharia de tecidos, uma vez que não foi observada citotoxicidade nas diferentes concentrações analisadas.

4.3.6 Ensaio de formação de tubo endotelial

O uso potencial de VB com e sem Co para angiogênese foi avaliado pelo ensaio de formação de tubos. Após 24 horas de análise, foram observadas formações tubulares com um tempo de tratamento de 20 horas a uma concentração de 1000 mg / mL (Figura 4.8).

Para este ensaio de formação de tubos, os grupos foram divididos em controle negativo (contendo apenas HUVECs), controle positivo (HUVECs + VEGFA), VB (VB + HUVECs) e VB-2.5Co (VB-2.5Co + HUVECs). No controle negativo (Figura 4.8 (A) e (B)), é possível observar HUVECs viáveis, enquanto o grupo controle positivo (Figura 4.8 (C) e (D)) apresentou, conforme esperado, formação de tubos induzida por VEGFA. Células tratadas com VB (Figura 4.8 (E) e (F)) resultaram em ramificação das HUVECs, demonstrando maior capacidade de formação de tubos quando comparados ao controle negativo. O tratamento com VB-2,5Co (Figura 4.8 (G) e (H)) aumentou significativamente os ramos celulares das HUVECs, proporcionando formações mais tubulares quando comparadas ao grupo VB e demonstrando aumento significativo quando comparado ao controle negativo. A formação de tubos do grupo VB-Co tende a ser semelhante ao controle positivo. Wang et al.¹⁸⁵ relataram que a regulação de fatores de crescimento como o VEGFA pode melhorar a angiogênese. Resultados do ensaio de formação de tubos deste trabalho indicaram que o VB, na presença de Co, melhora a formação de tubos de maneira semelhante ao VEGFA. Portanto, pode-se afirmar que o VB estimulou a formação de vasos sanguíneos e a adição de 2,5% de CoO potencializa esse efeito sem afetar as funções normais das HUVECs.

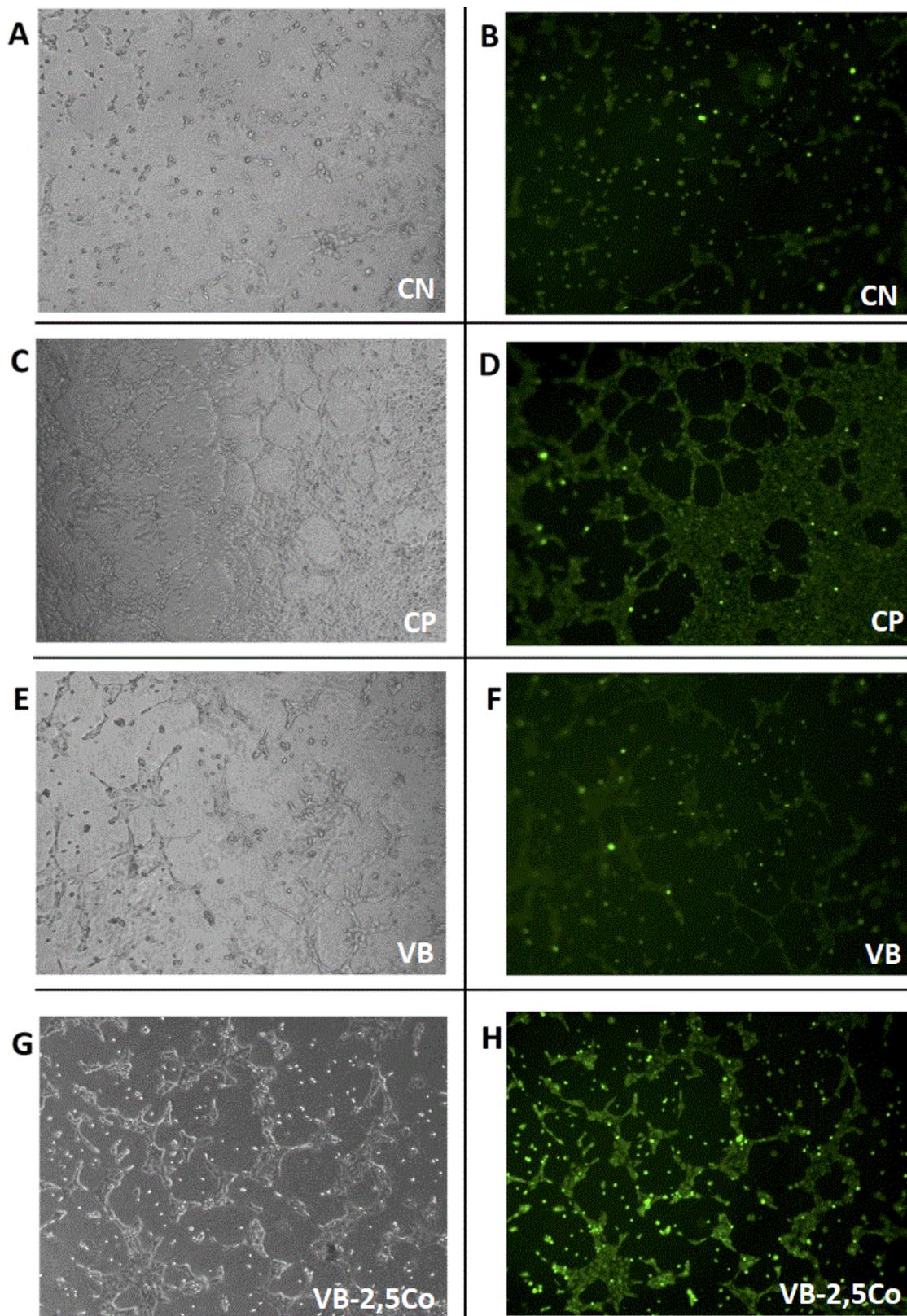


Figura 4-8. Ensaio de formação de tubo endotelial realizado na presença de HUVECs. A) e B) controle negativo em campo claro e corado com calceína verde; C) e D) controle positivo em campo claro e corado com calceína verde; E) e F) VB em campo claro e corado com calceína verde e G e H) VB-2,5Co em campo claro e corado com calceína verde. Tamanho da imagem: 40x.

4.3.7 Ensaio qPCR

O qRT-PCR é uma técnica de precisão e sensibilidade que normaliza o gene de interesse contra um gene de controle endógeno cuja expressão é inalterada nas amostras analisadas^{186,187}. Dois marcadores foram escolhidos para investigar os efeitos da VB e VB-2,5Co no processo de angiogênese: *HIF1A* e *VEGFA*^{163,188}, o principal interesse neste estudo. A Figura 4.9 mostra a expressão gênica de *VEGFA* e *HIF1A* para controle negativo (CN), controle positivo (CP), VB e VB-2,5Co às 14 e 20h. Para *HIF1A* às 14h (Figura 4.9 (A)), as células estimuladas por VB não mostraram aumento significativo na expressão do gene *HIF1A* quando comparadas às células não estimuladas em CN. Quando comparadas ao CP, as células estimuladas por VB mostraram uma expressão significativamente reduzida de *HIF1A*. Por outro lado, as células estimuladas por VB-2,5Co apresentaram expressão gênica do *HIF1A* significativamente maior quando comparadas às não estimuladas no CN, atingindo valores semelhantes às células do grupo CP. Quando comparado ao grupo CN, a expressão de *HIF1A* aumentou 2,7 vezes no grupo VB-2,5Co, enquanto no grupo VB esse gene foi regulado positivamente por um fator de 1,4 ($p < 0,05$). Na Figura 4.9 (B), após 20h de exposição ao PI dos biomateriais, as amostras de VB e VB-2,5Co apresentaram menor expressão gênica em relação aos grupos controle (CN e CP) e não apresentaram diferenças significativas na expressão gênica entre si.

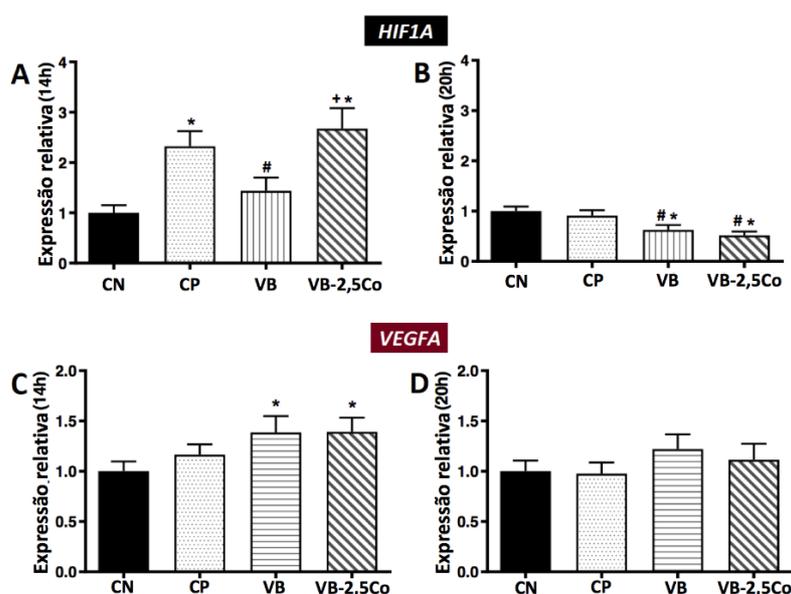


Figura 4-9. Expressão relativa dos genes (A, B) *HIF1A* e (C, D) *VEGFA* em amostras de VB e VB-2,5Co em dois tempos de análise: 14h e 20h.

Os genes *YWHAZ* e *HPRT1* foram utilizados para normalizar os dados e o grupo CN foi utilizado como calibrador. One-way ANOVA com $p < 0,05$ e pós-teste de Tukey. (* $p < 0,05$ versus CN; # $p < 0,05$ versus CP; + $p < 0,05$ versus VB).

Para o *HIF1A*, após 14h, o grupo VB-2.5Co apresentou expressão gênica significativamente maior em relação à CN e assemelhava-se à expressão do grupo CP, diferentemente do grupo VB. O grupo VB-2,5Co desempenhou um papel importante no aumento da expressão do gene *HIF1A*, assemelhando-se aos valores apresentados pelo grupo CP. O grupo VB não apresentou pico de expressão do gene *HIF1A* quando comparado aos grupos CP e VB-2,5Co, onde reafirmamos a importância do Co na expressão do gene *HIF1A*. Após 20h, a expressão do gene *HIF1A* estava significativamente menor nas células estimuladas com VB e VB-2,5Co em comparação ao grupo CN, o que significa que o pico de expressão dessa proteína já ocorreu.

Na Figura 4.9 (C), podemos ver a expressão de *VEGFA* após 14 h de tratamento das células e os grupos VB e VB-2.5Co apresentaram expressão gênica significativamente maior que as amostras de CN. Quando comparada ao grupo CN, a expressão do *VEGFA* aumentou 1,4 vezes nos grupos VB e VB-2,5Co ($p < 0,05$). Após 20 horas de tratamento das células (Figura 4.9 (D)), não houve diferenças significativas entre os grupos analisados. Os grupos VB e VB-2,5Co aumentaram significativamente a expressão do gene *VEGFA* em comparação com os grupos controle às 14h, mas não houve diferenças significativas na expressão entre eles. Este resultado mostra que o gene *VEGFA* possui um pico de expressão gênica precoce (14h) e o VB e o VB-2,5Co foram capazes de melhorar este parâmetro, o que não se confirmou no período de 20h.

De acordo com Tanaka et al.¹⁸⁹, o VEGFA induz a migração, proliferação e impermeabilidade das células endoteliais e segundo Fernandez-Torres et al.⁵², o HIF é essencial para a homeostase e é extremamente importante para a sobrevivência dos condrócitos. Portanto, nossas descobertas mostraram que nossos biomateriais VB e VB-2,5Co são biomateriais promissores para auxiliar as células endoteliais e são biomateriais que podem ser usados como uma alternativa para melhorar a angiogênese e, assim, ser futuramente aplicado no campo da engenharia tecidual óssea.

4.3.8 Estudo *in vivo* - Coloração imunohistoquímica

Cortes histológicos foram imunomarcados para VEGFA ou HIF1A, fatores reconhecidamente envolvidos no processo de angiogênese. Foram avaliados cortes histológicos da camada mais profunda da derme, próximo ao local onde o implante foi inserido (Figuras 4.10 e 4.11). Nesta região foi observada a presença de células com

morfologia mononuclear típica em todos os grupos, indicando inflamação crônica no local do implante.

A Figura 4.10 representa imagens histológicas para a coloração Imunohistoquímica de HIF1A para os grupos Controle (Figura 4.10 (A)), VB (Figura 4.10 (B)) e VB-2,5Co (Figura 4.10 (C)). Observamos um aumento no número de núcleos celulares nos grupos VB e VB-2,5Co (Figura 4.10 (D)), mas houve um aumento significativo nos núcleos corados com HIF1A para o grupo VB-2,5Co (Figura 4.10 (E)). As setas amarelas indicam núcleos celulares de HUVECs corados com HIF1A.

Através da inserção de pastilhas de VB e VB-2,5Co observamos a presença de células no local do implante. Conforme relatado em estudos anteriores ^{139,184,190}, essas células são compatíveis com a inflamação local que ocorre após a inserção do implante, uma reação do organismo relacionada à interface do biomaterial implantado durante o processo de cicatrização local. O aumento da inflamação também pode estar relacionado à propriedade angiogênica do cobalto, pois a via HIF1A pode recrutar células inflamatórias e ajudar a coordenar a resposta do corpo após a lesão ⁵⁶.

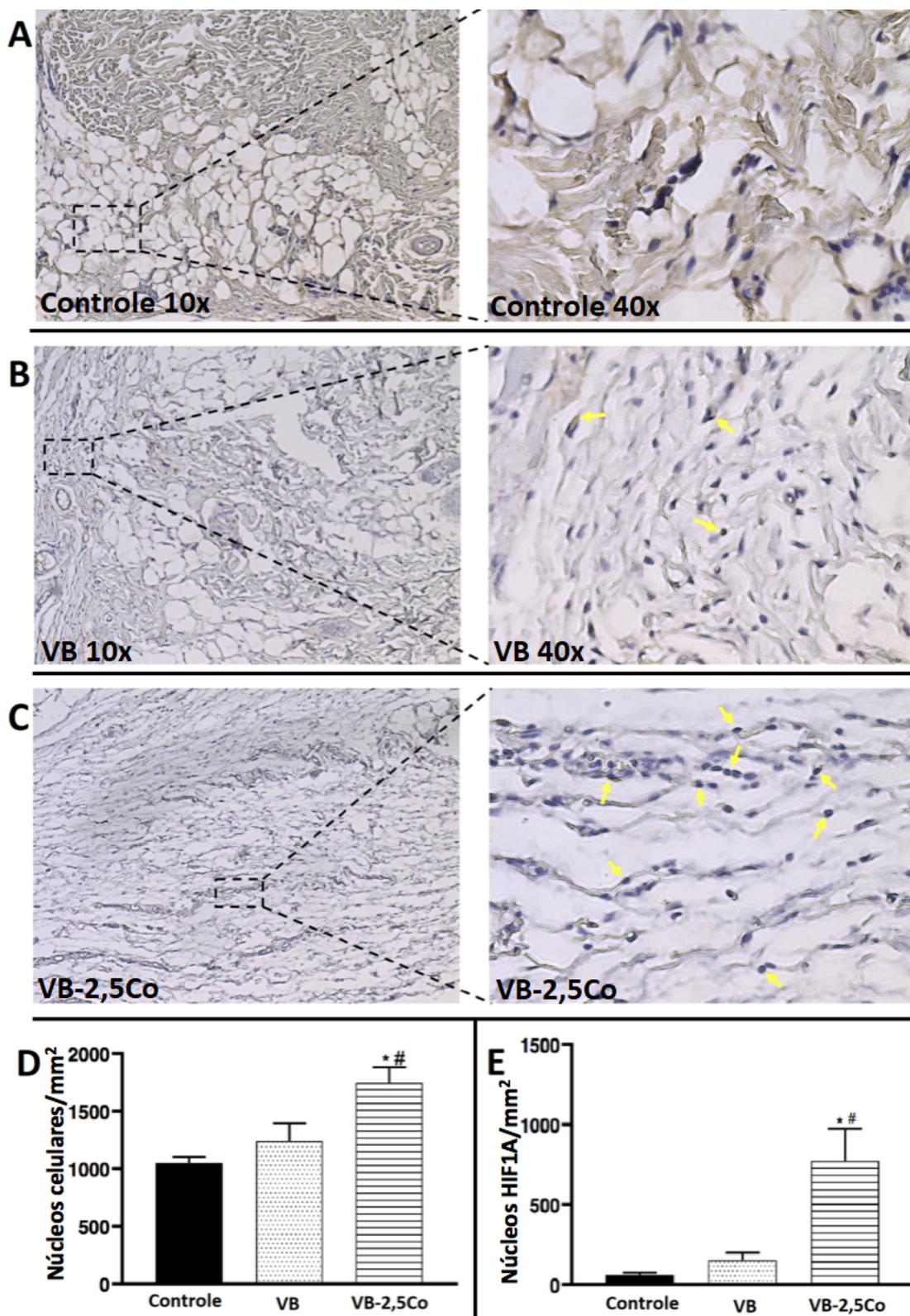


Figura 4-10. Imagens representativas (10x e 40x) contendo coloração HIF1A. (A) controle; (B) VB e (C) VB-2,5Co. Morfometria total para contagem dos núcleos celulares (D) e núcleos celulares corados com HIF1A (E) em relação à área (mm²). As setas amarelas indicam núcleos celulares de células HUVECs coradas com HIF1A. Barras de erro indicam \pm DP, e significância estatística foi verificada através do one-way ANOVA com $p < 0,05$ e um pós-teste de Tukey. (* $p < 0,05$ versus Controle e # $p < 0,05$ versus VB).

A Figura 4.11 mostra o total de vasos sanguíneos e vasos sanguíneos corados com VEGFA avaliados por histologia e morfometria. As imagens revelaram a presença de vasos sanguíneos na região próxima ao implante para os grupos Controle (Figura 4.11 (A)), VB (Figura 4.11 (B)) e VB-2,5Co (Figura 4.11 (C)). Não houve diferença entre os grupos na contagem total de vasos sanguíneos (Figura 4.11 (D)). Contudo, houve um aumento significativo nos vasos sanguíneos corados com VEGFA no grupo VB-2.5Co em comparação com os grupos VB e controle (Figura 4.11 (E)).

A região profunda da derme mostrou uma marcação moderada de VEGFA e HIF1A em contato com VB e uma marcação forte na presença de VB-2,5Co. Essa marcação pode ser devido aos estímulos angiogênicos liberados na interface biomaterial / tecido após o período de implantação, conforme relatado. Houve expressão de VEGFA e HIF1A para a amostra VB, mas essa expressão foi maior na amostra VB-2,5Co em comparação com as outras amostras analisadas. A partir desses resultados, pode-se concluir que os implantes de VB e VB-2,5Co influenciaram a expressão de VEGFA e HIF1A neste estudo *in vivo*. Estes dados confirmam os resultados do ensaio de Formação de Tubos e do RT-qPCR, mostrando que a presença de Co incorporado na rede do VB aumentou a expressão de VEGFA, levando à angiogênese. Portanto, o vidro bioativo contendo cobalto é promissor para a ET e pode ser favorável ao aumento da angiogênese. Não foram observadas reações adversas como hiperemia, congestão ou necrose dos vasos sanguíneos. Isso indica que, apesar da incorporação de cobalto na estrutura do vidro, o material é biocompatível e um potencial dispositivo para promover a angiogênese.

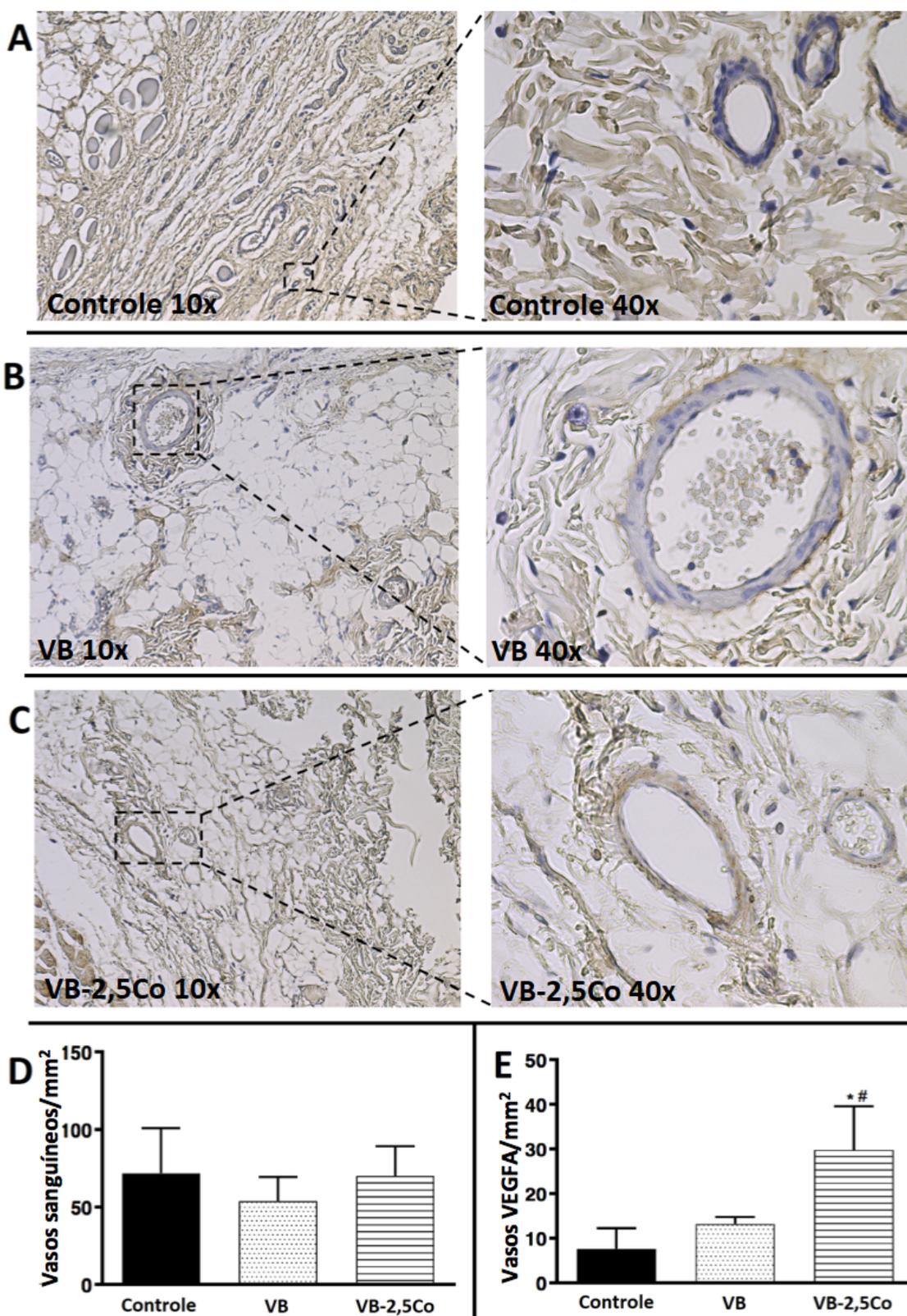


Figura 4-11. Imagens representativas (10x e 40x) contendo coloração com VEGFA. (A) controle; (B) VB e (C) VB-2,5Co. Morfometria da contagem total de vasos sanguíneos (D) e vasos corados com VEGFA (E) em relação à área (mm²). Barras de erro indicam \pm DP, e significância estatística foi verificada através do one-way ANOVA com $p < 0,05$ e um pós-teste de Tukey. (* $p < 0,05$ versus Controle e # $p < 0,05$ versus VB).

4.4 Conclusões

Através da síntese sol-gel, obtivemos vidros bioativos amorfos incorporados com Co. A adição de Co não alterou a estrutura e morfologia do vidro, e a presença e distribuição homogênea do Co através do vidro foram confirmadas por MEV e EDS, associados ao mapeamento de raios-x com dispersão de elemento químico, neste caso, o Co. As avaliações de biocompatibilidade foram realizadas pelo ensaio de viabilidade celular por MTT em HUVECs, e um ambiente favorável às células foi obtido em diferentes concentrações de PIs de vidro bioativos, sem efeito citotóxico observado apesar da incorporação de Co. Foi observada formação de tubo endotelial pelas HUVECs na presença de vidro contendo Co, semelhante à formação de tubo por adição de VEGFA, indicando que o Co poderia mimetizar os efeitos do VEGFA. A amostra VB-2,5Co induziu maior expressão do gene *VEGFA* pelas HUVECs após 14h de exposição, e a adição de Co também foi eficaz em aumentar a expressão do gene *HIF1A*. Respostas *in vivo* mostraram que o VB incorporado com Co em sua estrutura foi capaz de estimular a expressão de VEGFA e HIF1A e não mostrou reações adversas durante o estudo *in vivo*, indicando uma possível estimulação dos eventos que levam à angiogênese. Portanto, podemos afirmar que o Co incorporado à rede de vidro bioativo demonstra ser uma estratégia potencial para estimular a angiogênese e gerar o desenvolvimento de materiais superiores para uso na Engenharia de Tecidos.

Capítulo 5 . INCORPORAÇÃO DO ÍON TERAPÊUTICO COBALTO EM *SCAFFOLDS* HÍBRIDOS DE POLI (ÁLCOOL VINÍLICO) / VIDRO BIOATIVO PARA ENGENHARIA DE TECIDOS

5.1 Introdução

Devido à sua biocompatibilidade e diversas ações biológicas já descritas ^{24,109}, a utilização dos vidros bioativos surge como uma promissora estratégia para aceleração do reparo tecidual ósseo. Eles possuem composição variável, permitindo a incorporação de íons metálicos com efeito terapêutico, uma abordagem considerada inovadora na otimização de biocompósitos para a engenharia de tecidos ³⁰. Esses íons têm a vantagem de serem liberados exatamente no local do implante, potencializando o efeito terapêutico e reduzindo a ocorrência de reações adversas no paciente, pois são liberados de forma controlada durante o processo de degradação do material ¹¹⁹. O cobalto apresenta grande potencial para ser incorporado na estrutura de vidros bioativos, pois pode influenciar na formação de novos vasos sanguíneos, a partir do controle de expressão do fator de indução da hipóxia (HIF), conhecido por ativar genes relacionados à angiogênese, sendo de grande interesse, especialmente para regeneração de defeitos críticos, onde a difusão de oxigênio e nutrientes é dificultada.

Scaffolds à base de polímeros estão recebendo grande atenção devido à sua semelhança com macromoléculas biológicas, o que pode melhorar a biocompatibilidade do biomaterial ¹⁹¹. O Poli (álcool vinílico) é um polímero que possui excelente biocompatibilidade, atóxico e tem mostrado grande potencial para ser aplicado como biomateriais, devido à sua combinação de propriedades. O desenvolvimento de *scaffolds* híbridos na combinação de biocerâmica com o polímero pode melhorar o desempenho mecânico e a bioatividade do *scaffold* ¹⁵⁰, e *scaffolds* híbridos à base de PVA e vidro bioativo (VB) são subconjuntos promissores de materiais bioativos inorgânicos ¹⁹².

O estudo de *scaffolds* híbridos contendo PVA e VB associados ao Co através do processo sol-gel e método de formação de espuma permanece escasso na literatura, bem como o impacto de suas propriedades na angiogênese. Tendo isso em vista, o presente trabalho tem como principal objetivo desenvolver *scaffolds* híbridos de poli (álcool vinílico) / vidro bioativo contendo cobalto e avaliar seu efeito como potencial agente

angiogênico para a engenharia tecidual. Os *scaffolds* híbridos foram caracterizados por MEV, EDS e Micro-CT para analisar porosidade e interconectividade de poros dos *scaffolds*; FTIR, para verificar a estrutura química, e os parâmetros de cristalinidade foram analisados através de DRX. Foi realizado o estudo da influência da incorporação do Co, em substituição parcial ao teor de Ca, na cinética de liberação dos íons em solução, através do ensaio de ICP-OES. Estudos biológicos *in vitro* dos *scaffolds* híbridos foram realizados através de ensaios de MTT e crescimento celular, para avaliar a viabilidade celular e possível toxicidade dos biocompósitos.

5.2 Materiais e Métodos

5.2.1 Síntese de *scaffolds* híbridos de poli (álcool vinílico) e vidro bioativo incorporados com cobalto (Co)

Os *scaffolds* híbridos foram baseados em PVA e VB, e derivados do processo sol-gel, conforme metodologia relatada em estudo anterior¹³⁵. O PVA (Sigma Aldrich®) foi selecionado considerando aspectos como o grau de hidrólise (DH = 80%) e o peso molecular (Mw = 9.000 a 10.000 g / mol), apropriados para fins biomédicos. Água deionizada (água DI, Millipore Simplicity) com resistividade de 18 MΩ cm foi usada em todas as preparações da solução. Uma solução aquosa de PVA foi preparada a uma concentração de 28% em peso, dissolvendo o pó de PVA em banho-maria a 80 °C sob agitação constante por 2 h. O pH da solução foi ajustado para $2,0 \pm 0,1$ por solução de ácido clorídrico (HCl) 2N. Uma solução precursora de vidro bioativo com uma composição nominal de 58% em peso de SiO₂, 33% em peso de CaO, 9% em peso de P₂O₅ foi sintetizada por mistura de tetraetoxisilano (TEOS), água DI, trietilfosfato (TEP) e cloreto de cálcio. Para amostras contendo cobalto, foi adicionado cloreto de cobalto hexahidratado (CoCl₂·6H₂O) em substituição parcial do conteúdo de cloreto de cálcio nesta etapa. A razão molar de H₂O : TEOS usada foi de 12:1. Esta solução de VB foi vertida na solução de PVA e agitada mecanicamente por 5 minutos. Em seguida, lauril éter sulfato de sódio (LESS, Oxiteno 27% v / v) como agente espumante, solução de ácido fluorídrico (HF 10% v / v), como catalisador e gelificante, e glutaraldeído (solução aquosa GA, Sigma 25% em peso) foram adicionados à solução resultante. O glutaraldeído foi utilizado como reticulador químico funcional. A agitação mecânica foi interrompida e as espumas foram vazadas pouco antes da gelificação, em recipientes de plástico, e seladas. As amostras foram envelhecidas a 40 °C por 3 dias e depois secas a

60 °C por 7 dias. A composição híbrida preparada consistia em 30% em peso de vidro e 70% em peso de polímero. Esses híbridos foram referidos como PVA-VB (para amostras contendo PVA e VB), PVA-VB-5Co (para amostras contendo PVA e VB com 5% CoO) e PVA-VB-10Co (para amostras contendo PVA e VB com 10 % CoO).

Neutralização das amostras

As amostras preparadas foram imersas por 10 horas em uma solução de NH_4OH a 0,3 mol / L. O processo de neutralização foi realizado com base na proporção de 20 mL de solução estabilizadora por 1,0 g de amostra híbrida seca, à temperatura de 25 ± 2 °C. Antes dos ensaios biológicos e estruturais, todas as amostras sintetizadas e neutralizadas foram lavadas três vezes em água DI e lavadas em solução salina tamponada com fosfato (PBS 1x) durante três horas. Depois disso, as amostras foram secas em temperatura ambiente.

5.2.2 Caracterização estrutural

5.2.2.1 Caracterização Química

A composição química da fase inorgânica dos híbridos foi avaliada por espectroscopia de emissão óptica de plasma acoplada indutivamente (ICP-OES, Optima 7300 DV, PerkinElmer, EUA). Para esta análise, 0,1 g das amostras foram transferidas para um cadinho de grafite contendo 0,7 g de metaborato de lítio. Outra porção de 0,7 g de metaborato de lítio foi adicionada à mistura, que foi tratada termicamente à 950 ± 25 °C por 10 minutos. O cadinho foi removido da mufla, a mistura foi homogeneizada e, em seguida, recolocada no equipamento por mais 10 minutos à 950 ± 25 °C. Em seguida, a mistura foi transferida para um becker contendo 100 mL de ácido nítrico a 10% (v / v) e agitou-se até dissolver completamente. As concentrações de Si, Ca, P e Co foram então analisadas nas soluções resultantes por ICP-OES e as proporções de SiO_2 , CaO, P_2O_5 e CoO foram calculadas.

Para avaliar a fração orgânica e inorgânica dos *scaffolds* híbridos, as amostras foram pesadas (massa inicial, M_i) e calcinadas à 650 °C por 180 minutos, com taxa de aquecimento de 1 °C / minuto. Em seguida, as amostras calcinadas foram novamente pesadas (massa final, M_f) e as proporções de massa orgânica (% MO) e massa inorgânica (% MI) foram calculadas de acordo com as equações abaixo:

$$\% \text{ MO} = \frac{M_i - M_f}{M_i} \times 100$$

$$\% \text{ MI} = \frac{M_f}{M_i} \times 100$$

Onde % MO é a % orgânica, % MI é a % inorgânica, M_i é a massa inicial e M_f é a massa final após a calcinação.

5.2.2.2 Análise do comportamento térmico dos *scaffolds* híbridos

O estudo do comportamento térmico dos *scaffolds* híbridos produzidos foi realizado utilizando a calorimetria exploratória diferencial (DSC) e a termogravimetria (TGA). As propriedades térmicas de desidratação e perda de massa foram estudadas empregando o equipamento DSC-NETZSCH Co., Alemanha. O equipamento foi calibrado utilizando recipiente vazio de platina como referência. Após a calibração, pesaram-se 15 mg de cada amostra em recipiente de platina sem tampas. Os *scaffolds* híbridos foram aquecidos partindo de 30°C até a temperatura de 600°C a taxa de 10°C/minuto. O ensaio foi realizado em fluxo de nitrogênio à taxa de 100 mL / minuto para manter a atmosfera inerte^{193,194}.

5.2.2.3 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A caracterização química qualitativa, com base nos grupos funcionais presentes nas amostras, foi realizada por Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR). A técnica de refletância, com comprimentos de onda entre 400 e 4000 cm^{-1} , foi utilizada no equipamento Alpha Bruker, utilizando 128 varreduras com resolução de 4 cm^{-1} . As amostras foram analisadas pela técnica de refletância total atenuada (ATR) com cristal de diamante.

5.2.2.4 Difração de Raios X (DRX)

A análise por Difração de Raios X (DRX) foi empregada para verificar as características da fase e a organização estrutural das amostras produzidas. Os espectros foram coletados no equipamento Philips PW1700 usando radiação Cu-K α ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$) a 40 kV / 40 m \AA . Os dados foram coletados entre 4,05 e 89,95 (2θ) com um passo de 0,06 e tempo de incidência de 1,5 s. Os principais picos foram identificados usando o “*International Centre for Diffraction Data*, versão 2.2, 2001, código 04-0864”.

5.2.2.5 Microtomografia computadorizada (Micro-CT)

A microestrutura dos híbridos e a distribuição do tamanho dos poros foram investigadas por Microtomografia de Raios X (Micro-CT) usando um scanner de Micro-CT de mesa compacto (SkyScan 1174, Bruker Micro-CT, Bélgica) com uma fonte de tensão de 40 kV, corrente de 800 μ A e tamanho de pixel de 10 μ m, sem filtro. As amostras foram colocadas em um suporte, e giradas 180 ° com aquisição de imagens a cada 0,7 °. As projeções de sombra adquiridas (formato TIFF de 16 bits) foram reconstruídas em fatias 2D, usando a interface do software NRecon (v.1.6.1.18, Bruker Micro-CT, Bélgica), e o software CT Analyzer (v. 1.15.4.0. Skyscan, Bruker Micro-CT, Bélgica) foi usado para análise 3D e reconstrução e interpretação da superfície 3D. Para visualização volumétrica 3D, foi utilizado o software da versão CT Vol 2.3.1.0 (Skyscan, Bruker Micro-CT, Bélgica).

5.2.2.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia da superfície dos híbridos foi examinada com um Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) FEI-INSPECT S50, equipado com o EDAX Genesis Espectrofotômetro de Energia Dispersiva (EDS), usado para avaliar qualitativamente a composição química elementar da superfície das amostras. As amostras foram revestidas com carbono e analisadas a uma tensão de 15kV.

5.2.2.7 Teste de compressão mecânica

As amostras foram cortadas uniformemente da região mais homogênea dos híbridos para formar blocos cúbicos com dimensões: 10 mm x 10 mm x 10 mm. Essas amostras foram posicionadas entre placas paralelas usando o equipamento EMIC DL 3000, com velocidade de 0,5 mm / minuto e uma célula de carga de 2.000 N. Cada sistema compósito foi comprimido até uma deformação de 50%. Os resultados foram obtidos para cinco amostras (n = 5). O módulo de elasticidade foi calculado como a inclinação da porção linear inicial da curva tensão-deformação. A tensão a 50% de deformação na compressão foi determinado como o ponto máximo da curva tensão-deformação ¹⁰⁹.

5.2.3 Imersão in vitro em SBF

A solução de fluido corporal simulado (SBF) foi preparada como descrito anteriormente ^{195,196}. Sucintamente, em 700 mL de água desionizada, com agitação contínua em

banho-maria à 37 °C, os seguintes reagentes foram adicionados lentamente na ordem: 8,035 g de cloreto de sódio (NaCl 99,0%, Vetec), 0,355 g de bicarbonato de sódio (NaHCO₃ 99,7% , Fmaia), 0,255 g de cloreto de potássio (KCl 99,0%, Vetec), 0,231 g de fosfato de potássio dibásico (K₂HPO₄ · 3H₂O 98,0%, Vetec), 0,311 g de cloreto de magnésio (MgCl₂ · 6H₂O 99,0%, Synth), 38 mL de ácido clorídrico (HCl 1 M, Vetec), 0,386 g de cloreto de cálcio (CaCl₂ · 2H₂O, 99,0%, Vetec), 0,072 g de sulfato de sódio (Na₂SO₄, 99,0%, Vetec) e 6,118 g de tris (hidroximetil) aminometano (NH₂C (CH₂OH) 3, 99,8%, Synth). O pH foi monitorado durante todo o processo para evitar um rápido aumento e precipitação; depois de todos os reagentes terem sido misturados, o volume foi completado para 1 L com água deionizada. O pH foi ajustado antes do uso para 7,4 a 37 °C usando HCl. Os *scaffolds* híbridos (0,170 g cada amostra) foram imersos em solução de SBF (20 mL), em um recipiente hermético e incubados a 37 °C ¹⁹⁷. Após diferentes períodos de tempo (1 h, 3 h, 24 h, 72 h, 1 semana e 2 semanas), 1 mL da solução foi coletada a cada tempo predeterminado. A alíquota coletada foi então filtrada (0,22 µm), diluída 10 vezes em solução de ácido nítrico (2M) e analisada por ICP-OES quanto à concentração de Si, Ca, P e Co. O experimento foi realizado em triplicata.

5.2.3.1 FTIR dos *scaffolds* híbridos após 14 dias de dissolução em SBF

Após 14 dias de imersão em SBF as amostras dos *scaffolds* híbridos foram secas a temperatura ambiente e analisadas por Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR). A técnica de refletância, com comprimentos de onda entre 400 e 4000 cm⁻¹, foi utilizada no equipamento Alpha Bruker, utilizando 128 varreduras com resolução de 4 cm⁻¹. As amostras foram analisadas pela técnica de refletância total atenuada (ATR) com diamante de cristal.

5.2.3.2 DRX dos *scaffolds* híbridos após 14 dias de dissolução em SBF

Após 14 dias de imersão em SBF as amostras dos *scaffolds* híbridos foram secas a temperatura ambiente e analisadas por Difração de Raios X (DRX) para verificar as características da fase e a organização estrutural das amostras após o período de imersão. Os espectros foram coletados no equipamento Philips PW1700 usando radiação Cu-Kα ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$) a 40 kV / 40 mA. Os dados foram coletados entre 4,05 e 89,95 (2θ) com um passo de 0,06 e tempo de incidência de 1,5 s.

5.2.3.3 MEV e EDS dos *scaffolds* híbridos após 14 dias de dissolução em SBF

Após 14 dias de imersão em SBF as amostras dos *scaffolds* híbridos foram secas a temperatura ambiente e as morfologias porosas da superfície dos híbridos foram examinadas com um Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) FEI-INSPECT S50. O MEV está equipado com o EDAX Genesis Espectrofotômetro de Energia Dispersiva (EDS), que é usado para avaliar qualitativamente a composição química elementar da superfície das amostras. As amostras foram revestidas com carbono e analisadas a uma tensão de 15kV

5.2.3.4 Medida de pH

O pH das soluções de SBF após imersão dos *scaffolds* híbridos foi avaliado através da adaptação de um método descrito anteriormente ¹⁹⁷. Os *scaffolds* híbridos foram pesados para criar uma concentração suspensa de 8,5 mg / mL: especificamente, 170 mg de cada amostra foram embebidos em 20 mL de SBF. O sistema foi selado em um tubo falcon e deixado em uma estufa a 37 °C por 1, 3, 24, 72, 1 semana e 2 semanas. Em cada momento, a solução de SBF foi coletada e o pH medido usando um medidor de pH.

5.2.4 Caracterização biológica *in vitro* dos *scaffolds* híbridos

5.2.4.1 Cultura celular de células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs)

Os experimentos biológicos foram realizados utilizando a linhagem celular de HUVECs. Essas células são cultivadas em meio de cultura basal, contendo, na proporção de 1: 1, o meio DMEM / DMEM-F12 (Gibi) suplementado com 5% de FBS (Soro Fetal Bovino) (Gibco) e estreptomicina (100 µg / ml) / penicilina (500 U / ml) (Invitrogen). As células foram incubadas em uma atmosfera umidificada de 5% de CO₂ a 37 °C até 90% de confluência e foram destacadas da placa para experimentos usando tripsina-EDTA (0,25%; Gibco).

5.2.4.2 Preparação do produto iônico (IP)

Os *scaffolds* híbridos foram suspensos em PBS 1x (28 mg / mL) e refrigerados a 20 °C por 72 horas. Posteriormente, o sobrenadante foi removido e este produto iônico foi

distribuído em uma placa de 48 poços previamente preparada para MTT. O meio de controle também foi submetido aos mesmos processos.

5.2.4.3 Ensaio de crescimento bacteriano e fúngico

Para verificar a eficácia da esterilização dos *scaffolds* híbridos (4 kGy) foi realizado o teste qualitativo de crescimento bacteriano e fúngico. Para este ensaio realizamos o preparo do PI como descrito no tópico anterior, porém com tempo de preparo de 96 horas, considerado suficiente para o crescimento de fungos e bactérias, potencializando possíveis contaminações. Em uma placa petri (90 x 15 mm, Kasvi) foi colocado meio ágar com meio BHI (Brian Heart Infusion, Kasvi), que é um meio de cultura nutritivo utilizado para cultivo de estreptococos, pneumococos, meningococos, enterobactérias, não fermentadores, leveduras e fungos. As placas foram levadas à estufa para secagem. Após, 100 µl de PI de cada amostra de *scaffold* híbrido (PVA-VB, PVA-VB-5Co e PVA-VB-10Co) juntamente com o Controle (apenas o meio PBS 1x) foi estriado sobre a placa de petri contendo o meio enriquecido e posteriormente foram incubadas a 37 °C. As amostras foram avaliadas nos períodos de 24 h, 48 h, 72 h, 4 dias e 7 dias. O experimento foi realizado em triplicata biológica.

5.2.4.4 Análise da citotoxicidade e biocompatibilidade celular

A citotoxicidade dos materiais híbridos foi avaliada através da análise da viabilidade celular em contato com os produtos iônicos (PIs) dos *scaffolds* híbridos preparados (esterilizados por radiação gama 4 kGy), pelo (3- (4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) (Invitrogen), como descrito^{125,198}. O ensaio MTT quantifica a atividade mitocondrial com base na redução do sal de tetrazólio nos cristais de formazan pelas células vivas. Para este ensaio, 1×10^4 HUVECs (por poço) foram plaqueadas em placas de 48 poços por 24 h. Posteriormente, as células foram tratadas com 10, 100 e 1000 µg / mL de soluções contendo PI de biomateriais de *scaffolds* (PVA-VB, PVA-VB-5Co e PVA-VB-10Co), além do controle negativo contendo apenas PBS 1x. Após o tratamento, os grupos de células foram avaliados no final de três tempos (24, 48 e 72 horas). O meio foi então removido e uma solução contendo 130 µL de meio DMEM e 100 µL de MTT (5 mg / mL) / poço foi adicionada. Após 2 horas, os cristais de formazan foram visualizados ao microscópio óptico e depois dissolvidos em 130 µL de SDS a 10% em HCl 0,01 M (Sigma-Aldrich). Em todas as etapas da

descrição acima, as placas de cultura foram incubadas a 37 °C em uma atmosfera umidificada a 5% de CO₂. Após 18 horas, 100 µL da solução acima foram transferidos para uma placa de 96 poços e a leitura da densidade óptica a 595 nm foi realizada. O ensaio foi realizado em triplicata biológica.

5.2.4.5 Ensaio de curva de crescimento

O crescimento das HUVECs quando cultivados em uma solução contendo PI dos *scaffolds* híbridos foi avaliado pelo teste da curva de crescimento celular. Para este ensaio, foram escolhidas amostras de PVA-VB e PVA-VB-10Co para observar a reação celular na maior concentração de cobalto neste estudo. Portanto, $1,3 \times 10^4$ HUVECs (por poço) foram plaqueadas em placas de 6 poços por 24 h. Posteriormente, as células foram tratadas com 1000 µg / mL de soluções contendo as amostras PI (PVA-VB e PVA-VB-10Co), além do controle negativo que recebeu apenas PBS 1x. As placas contendo os grupos de células foram mantidas incubadas a 37 °C em atmosfera umidificada de CO₂ a 5%, e a solução de tratamento (meio basal mais PI dos *scaffolds*) foi trocada a cada dois dias. Após os tratamentos, os grupos celulares foram contados no hemocitômetro ao final de quatro tempos (1, 3, 6 e 8 dias) ^{199,200}. O ensaio foi realizado em triplicata biológica.

5.2.5 Análise estatística

Os dados dos ensaios de viabilidade celular e curva de crescimento foram expressos como média ± E.P.M. Testes de normalidade foram realizados para confirmar a distribuição normal dos dados. Em seguida, foram realizadas as análises estatísticas usando-se o teste one-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey. Para isso, foi utilizado o software GraphPad Prism 8. Resultados com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

5.3 Resultados e Discussão

5.3.1 Caracterização dos *scaffolds* híbridos - avaliação da composição química

Para verificar a fração orgânica e inorgânica, os *scaffolds* híbridos foram submetidos ao processo de calcinação. A composição química da fração inorgânica também foi analisada. As composições nominais e medidas são mostradas na Tabela 5.1. A relação

da fração orgânica/inorgânica foi semelhante para as diferentes amostras, mostrando que a fração em peso da parte orgânica estavam entre 83,9 e 84,7% e as da parte inorgânica entre 15,3 e 16,1%. Com relação à composição medida da fração inorgânica, observou-se maior teor de SiO₂ e menor teor de todos os demais componentes em relação à composição nominal. A presença de Co foi confirmada na composição química e apresentou valores de 3,8% de CoO para a amostra de PVA-VB-5Co, e de 6,8% para a amostra PVA-VB-10Co

Tabela 5.1. Composições nominais e medidas; % orgânicos e inorgânicos e composição da fase inorgânica dos híbridos PVA-BG, PVA-BG-5Co e PVA-BG-10Co determinados pelo método de dissolução de metaborato de lítio e ICP-OES.

| Samples | Orgânica (%) | Inorgânica (%) | Composição nominal (mol %) | | | | Composição medida (mol %) | | | |
|-------------|--------------|----------------|----------------------------|-------------------------------|------|------|---------------------------|-------------------------------|------|-----|
| | | | SiO ₂ | P ₂ O ₅ | CaO | CoO | SiO ₂ | P ₂ O ₅ | CaO | CoO |
| PVA-VB | 83,9 | 16,1 | 60,0 | 4,0 | 36,0 | - | 71,1 | 1,0 | 27,9 | - |
| PVA-VB-5Co | 84,3 | 15,7 | 60,0 | 4,0 | 31,0 | 5,0 | 69,4 | 1,3 | 25,5 | 3,8 |
| PVA-VB-10Co | 84,7 | 15,3 | 60,0 | 4,0 | 26,0 | 10,0 | 70,0 | 1,4 | 21,8 | 6,8 |

Embora os dados encontrados sejam semelhantes para diferentes amostras, foi observada uma diminuição de cerca de 15% na fração inorgânica em comparação com a composição nominal, que era de 70% de fração orgânica e 30% de fração inorgânica. A menor proporção da parte inorgânica do material pode ser explicada pelo processo de neutralização dos *scaffolds* híbridos, pois eles sofrem imersão em meio alcalino e em solução tampão e, durante esse processo, a liberação de íons da fração inorgânica para o meio neutralizante pode ocorrer. Além disso, a formação da rede inorgânica durante a síntese sol-gel pode não ser 100% eficaz. A proporção nominal de cobalto na amostra de PVA-VB-5Co era de 5% de CoO, e portanto houve uma redução de 24%. O mesmo ocorreu na amostra de PVA-VB-10Co, cujo teor nominal era de 10% de CoO e apresentou uma composição medida de 6,8% de CoO, com uma redução de 32%. No entanto, o Co permaneceu na composição química dos *scaffolds* híbridos, mostrando que o processo sol-gel e o método de formação de espuma, seguidos de uma etapa de neutralização, são eficazes para a permanência desse íon terapêutico na rede de *scaffolds* híbridos. Os teores de SiO₂ e CaO, embora diferentes em relação às composições nominais, são adequados para vidros bioativos. Jones²⁰¹ relatou que um vidro bioativo binário contendo 70% molar de SiO₂ e 30% molar de CaO obtido pelo método sol-gel possui porosidade inerente e alta solubilidade, e essa composição de

vidro ainda apresenta alta bioatividade. As composições medidas foram proporcionais às composições nominais, permanecendo os elementos desejáveis na estrutura dos *scaffolds* preparados neste estudo.

5.3.2 Análise do comportamento térmico

Buscando estudar as características relacionadas às composições químicas dos *scaffolds* híbridos produzidos nesse trabalho, cuja constituição apresenta fração orgânica e fração inorgânica, foram realizadas análises térmicas. Os resultados apresentados na Figura 5.1 referem-se à perda de massa ocorrida com o aumento da temperatura até 600 °C para os *scaffolds* híbridos PVA-VB, PVA-VB-5Co e PVA-VB-10Co.

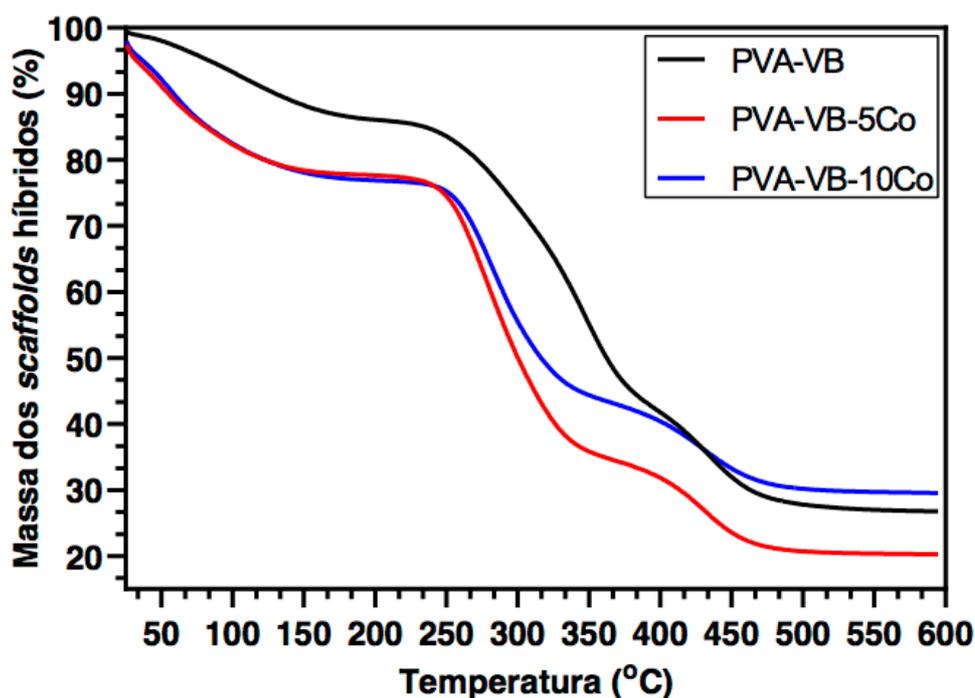


Figura 5-1. Curvas de TGA dos *scaffolds* híbridos PVA-VB, PVA-VB-5Co e PVA-VB-10Co.

A avaliação da TGA (Figura 5.1) mostra uma etapa inicial de perda de peso de aproximadamente 10 a 20% até 250 °C, que está principalmente relacionada à remoção de subprodutos do processo sol-gel, como álcoois e água adsorvida¹⁶⁸. À medida que o aquecimento progrediu houve uma segunda etapa de perda de peso observada entre 250 e 480 °C, resultando em cerca de 55% de perda de peso. Essa segunda etapa pode ser atribuída à decomposição simultânea do PVA, de resíduos de alcóxidos, precursores de silício e fósforo, e dos resíduos orgânicos do surfactante utilizado. Resultados

semelhantes foram relatados em estudos prévios ^{169,202}. A partir de 480 °C, os pesos de todas as amostras foram estabilizados, não indicando mais eliminação ou decomposição de espécies químicas até 600 °C. Como todos os híbridos testados apresentavam a mesma razão PVA/VB é de se esperar valores da massa residual próximos.

A análise DSC (Figura 5.2) mostrou uma transição endotérmica com pico em 55 °C, que está relacionada à volatilização da água e álcoois do processo sol-gel ^{168,169}. No entanto, essa transição foi menos acentuada na amostra PVA-VB e pode estar relacionada a uma taxa de volatilização mais lenta, levando a uma menor intensidade dessa transição na avaliação do DSC. O principal pico endotérmico da decomposição de orgânicos é observado a 275 °C ²⁰² e pode ser associado à decomposição de resíduos alcóxidos, resíduos orgânicos, precursores do silício e fosforo, simultaneamente à decomposição do PVA. A transição exotérmica observada acima de 375 °C está relacionada à condensação adicional de hidroxilas na superfície do material ¹⁷¹.

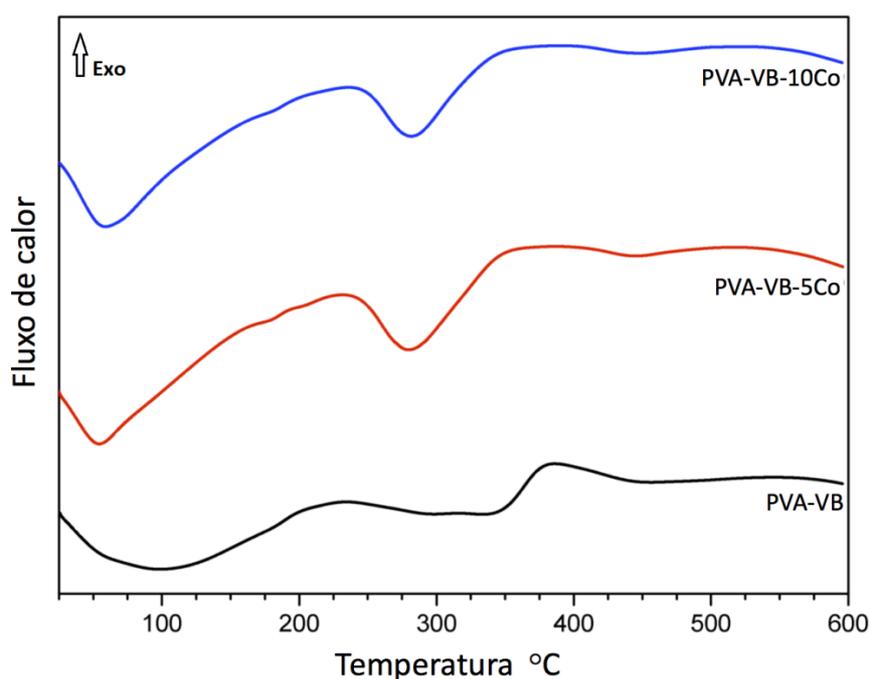


Figura 5-2. Curvas de DSC dos *scaffolds* híbridos PVA-VB, PVA-VB-5Co e PVA-VB-10Co.

5.3.3 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A análise por FTIR é uma ferramenta útil para investigar a formação de híbridos de PVA-VB-Co e como a estrutura orgânico - inorgânico se correlaciona. A Figura 5.3 mostra os espectros de FTIR para híbridos contendo PVA-VB e PVA-VB-Co. A ampla faixa de absorção observada de 3600 a 3000 cm^{-1} pode ser atribuída ao modo de

alongamento do hidroxil (OH) que se estende devido à forte ligação intramolecular e intermolecular, ao alto conteúdo de hidroxila do PVA. A banda de 2870 a 2895 cm^{-1} foi atribuída ao modo de alongamento de alquil (CH) ¹³⁵. Bandas típicas de vidro bioativo podem ser observadas em todas as amostras. A vibração a 400-470 cm^{-1} é frequentemente relacionada à flexão das ligações Si-O-Si, observadas principalmente nas estruturas amorfas de SiO_2 ^{168,203}. A absorbância entre 1000 e 1200 cm^{-1} é atribuída ao alongamento assimétrico do Si-O-Si ²⁰³. A absorbância em torno de 875 a 975 cm^{-1} é relacionada às estruturas de Si-O que contém oxigênio não ligado ^{203,204}. As bandas em 550 e 630 cm^{-1} são típicas da flexão de P-O nos grupos fosfato, enquanto o alongamento dos grupos P-O pode ser observado a 1200 cm^{-1} ¹⁹⁸. A absorção observada na faixa de 1400 a 1550 cm^{-1} e 1635 cm^{-1} está relacionada aos grupos carbonato e água molecular, respectivamente ¹⁷².

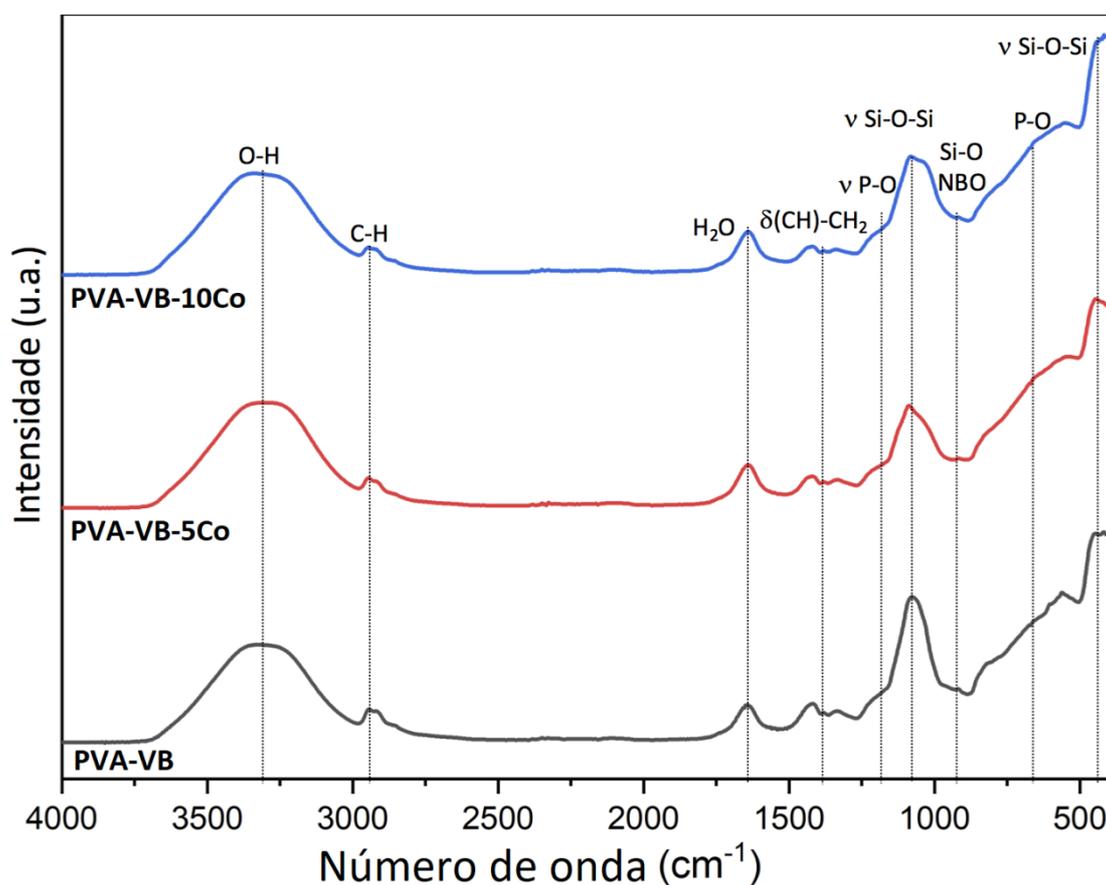


Figura 5-3. Espectro de FTIR para os *scaffolds* híbridos PVA-VB, PVA-VB-5Co e PVA-VB-10Co.

Um trabalho anterior ¹³⁵ mostrou uma banda de duplete em 2750 e 2850 cm^{-1} relacionada ao glutaraldeído residual em polímeros reticulados. Neste trabalho, não foi observada absorbância entre 2750 e 2850 cm^{-1} , indicativo de ausência do glutaraldeído

residual nos híbridos obtidos após a reação de reticulação. Pode-se dizer que a concentração de aldeído durante o processo sol-gel associado à policondensação foi eficiente para as pontes de acetal formadas com PVA. A avaliação por FTIR não mostra grandes diferenças entre as amostras, indicando que a rede principal foi mantida apesar da incorporação de Co em substituição parcial ao cálcio, e também não foi observado glutaraldeído residual após o processo de reticulação.

5.3.4 Análise por difração de raios X (DRX)

A Figura 5.4 mostra os padrões de difração de DRX dos *scaffolds* híbridos e é observada uma estrutura amorfa com picos cristalinos. Os picos de difração cristalinos são observados a 29 °, 48 °, 57 ° (2 θ) e foram identificados como correspondente ao fluoreto de cálcio (CaF₂ - JCPDS 04-0864). Halos amorfos típicos foram observados, com uma banda larga na faixa de 15 a 25 ° (2 θ) para todas as amostras.

A presença de CaF₂ pode ser justificada pela adição de ácido fluorídrico (HF) durante a síntese dos *scaffolds* híbridos. O HF tem sido utilizado como catalisador para a reação de condensação, pois promove a protonação dos grupos silanol para tornar o silício mais eletrofílico e, portanto, mais suscetível a ataques nucleofílicos^{205,206}. A taxa de dissolução é geralmente mais baixa para materiais cristalinos. Portanto, o padrão amorfo é importante para a liberação controlada de íons incorporados na rede, para que sua bioatividade seja garantida e modulada²⁰⁷. Apesar de estar presente como uma estrutura cristalina, o que pode reduzir a dissolução para a liberação de Ca²⁺ no meio, o CaF₂ é responsável pela manutenção da saúde óssea e do tecido conjuntivo, sendo utilizado na engenharia de tecidos e amplamente utilizado para fortalecer o esmalte dentário, prevenindo a cárie dentária²⁰⁸. O fluoreto de cálcio também é conhecido por influenciar a estimulação das células osteoblásticas^{209,210}. Portanto, embora o Ca não tenha sido completamente incorporado na estrutura do vidro atuando como modificador de rede, não é esperado efeito indesejável da cristalização observada. Não foram observados, nos difratogramas dos *scaffolds* híbridos incorporados com Co, picos relacionados à óxidos de Co ou ao precursor Cloreto de Cobalto, e nenhuma diferença qualitativa foi observada entre as amostras, o que pode ser uma indicação de que esse íon terapêutico esteja incorporado na estrutura do material híbrido.

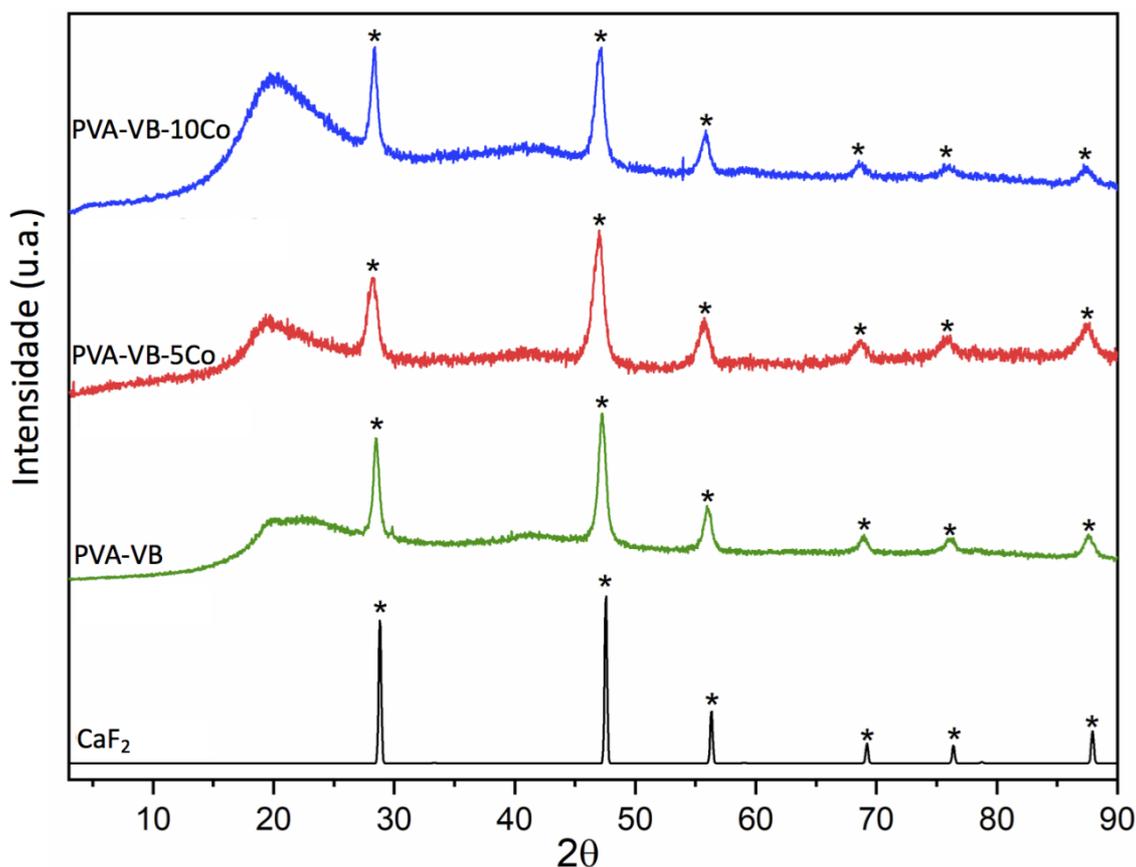


Figura 5-4. Padrões de DRX para os *scaffolds* híbridos PVA-VB, PVA-VB-5Co e PVA-VB-10Co. O asterisco (*) mostra CaF_2 (JCPDS 04-0864).

5.3.5 Avaliação dos *scaffolds* híbridos por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e análise química elementar por Espectroscopia por Dispersão de Energia (EDS)

A Figura 5.5 mostra imagens de MEV para *scaffolds* híbridos e uma estrutura porosa pode ser observada para todas as amostras. Para as mesmas condições e parâmetros do processo, houve uma variação no diâmetro dos poros (faixa de tamanho: 254 μm a 875 μm) para os *scaffolds* híbridos PVA-VB (Figura 5.6 (A)). No entanto, uma diminuição na faixa de tamanho dos poros foi encontrada nos *scaffolds* híbridos PVA-VB-5Co, variando de 100 μm a 200 μm (Figura 5.6 (B)). Para *scaffolds* híbridos PVA-VB-10Co (Figura 5.6 (C)), a faixa de tamanho de poro foi de 230 μm a 507 μm .

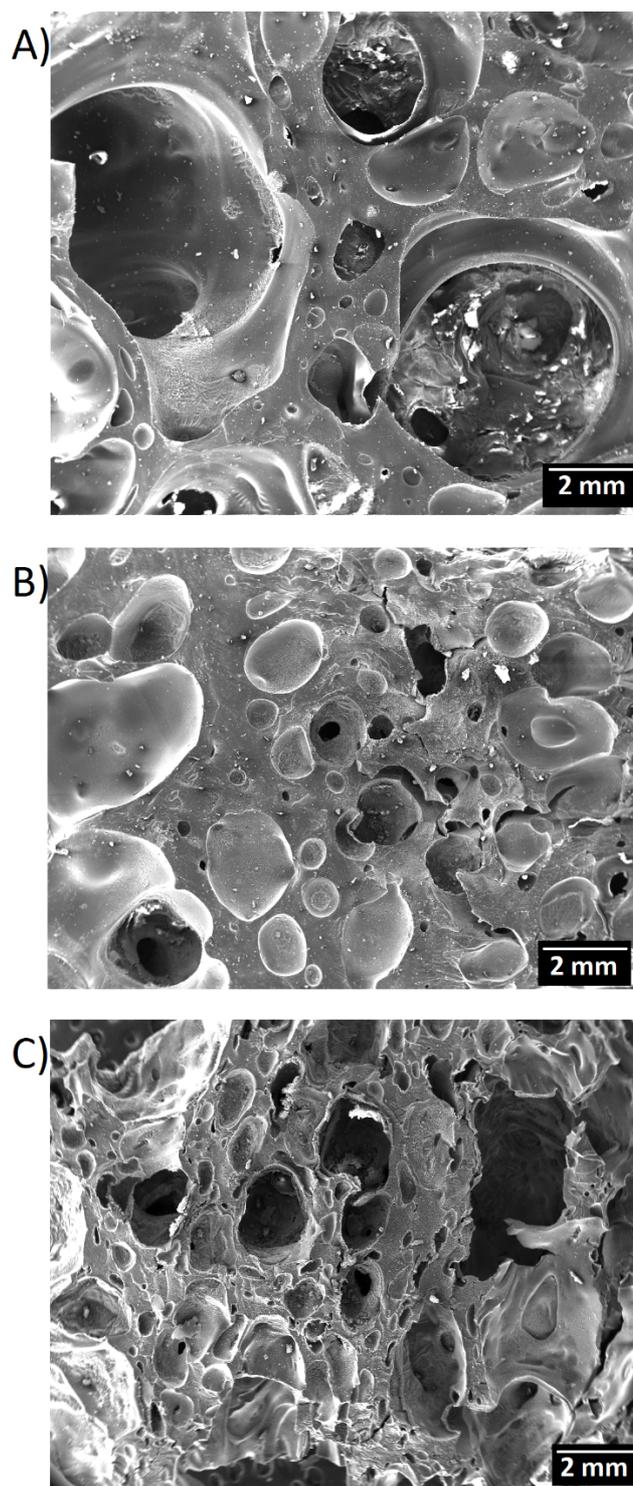


Figura 5-5. Microscopia eletrônica de varredura dos *scaffolds* híbridos de (A) PVA-VB, 60 x; (B) PVA-VB-5Co, 60 x; (C) PVA-VB-10Co, 60 x. Barra de escala = 2 mm.

A Figura 5.6 contém o mapeamento de raios-x para a presença do elemento químico Co nos *scaffolds* híbridos PVA-VB-5Co (Figura 5.6 (A) e (B)) e PVA-VB-10Co (Figura

5.6 (C) e (D)). Os resultados observados indicam que o elemento Co está uniformemente distribuído nos *scaffolds* híbridos.

A uniformidade da distribuição de Co encontrada neste estudo foi semelhante a um estudo anterior ²¹¹, fornecendo uma distribuição de íons terapêuticos adequada no *scaffold* híbrido. Pode-se dizer que esses resultados são vantajosos para essas amostras que foram submetidas a vários ciclos de imersão em diferentes soluções para neutralização e lavagem após a síntese, o que poderia causar tanto a perda de Co contida nos *scaffolds* híbridos como a alteração na sua distribuição.

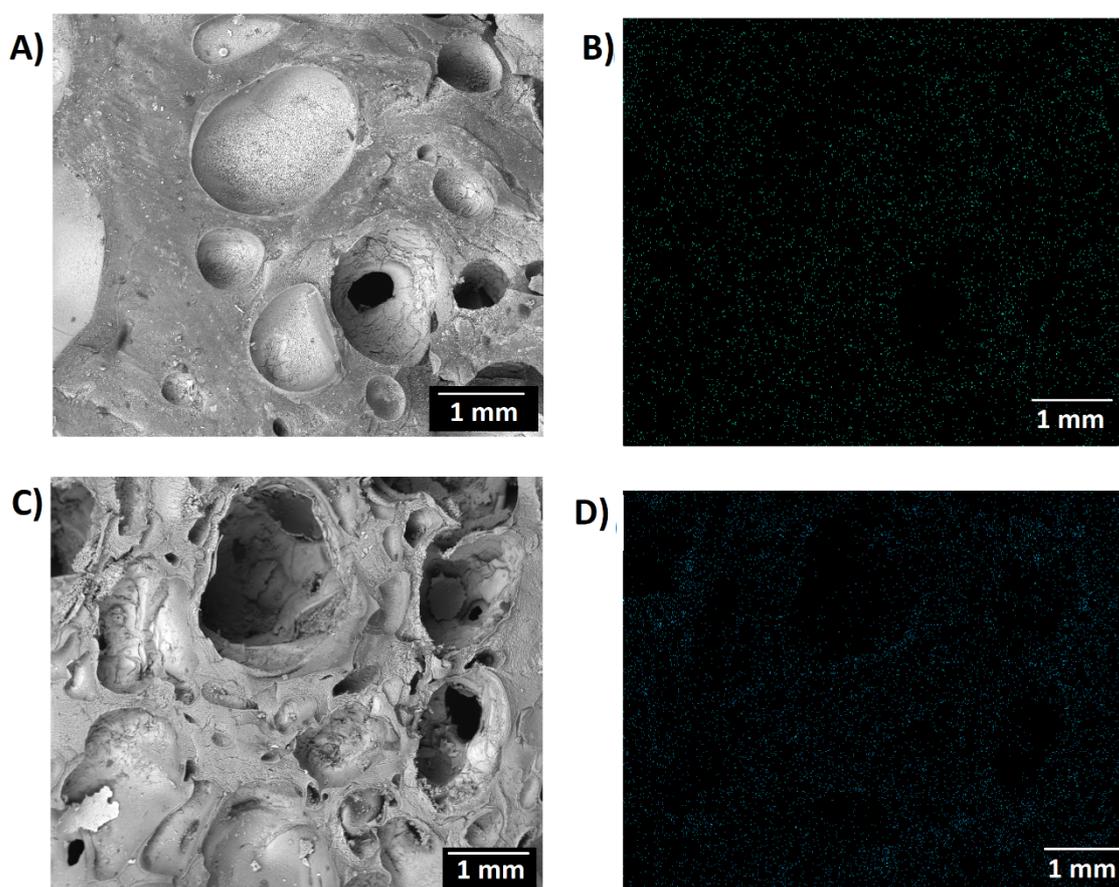


Figura 5-6. Microscopia eletrônica de varredura dos *scaffolds* híbridos de A) PVA-VB-5Co, 150 x e C) PVA-VB-10Co, 150 x; mapeamentos químicos de Co para B) PVA-VB-5Co, 150 x e D) PVA-VB-10Co, 150 x.

Barra de escala = 1 mm.

Os resultados da EDS mostram a presença de silício (Si), cálcio (Ca), fósforo (P), cloro (Cl), sódio (Na) e flúor (F) nas amostras, como mostra a Figura 5.7. A presença do elemento químico Co foi confirmado para os *scaffolds* híbridos incorporados com Co, bem como o seu aumento proporcional ao conteúdo adicionado às amostras.

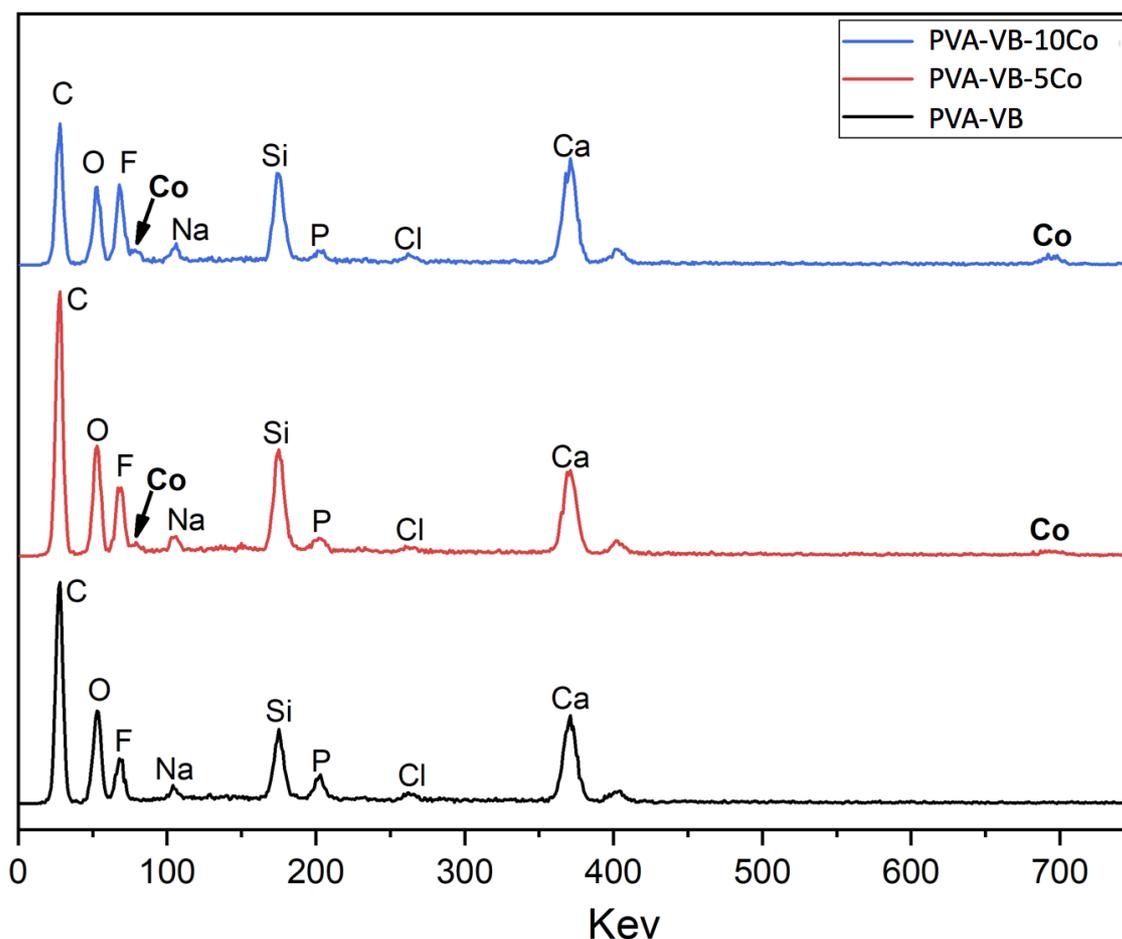


Figura 5-7. Espectro de EDS de *scaffolds* híbridos de PVA-VB, PBA-VB-5Co e PVA-VB-10Co.

Nas análises de EDS, foi encontrada a presença de F que pode estar relacionada ao ácido fluorídrico (HF) usado como catalisador durante a síntese de *scaffolds* híbridos, que levou à precipitação de CaF_2 , como mostra a análise de DRX apresentada anteriormente (Figura 5.4). Uma concentração reduzida de Cl foi observada e pode estar relacionada ao ácido clorídrico usado para controlar o pH, enquanto o Na pode ser derivado do surfactante (Lauril Éter Sulfato de Sódio) usado durante o processo de formação de espuma.

5.3.6 Avaliação da microestrutura e distribuição do tamanho dos poros dos *scaffolds* híbridos

A Figura 5.8 mostra a distribuição do tamanho dos poros e os modelos 3D obtidos por micro-CT, enquanto a porosidade total, porosidade aberta e tamanho médio dos poros são mostrados na Tabela 5.2. Uma ampla distribuição do tamanho dos poros pode ser observada em todas as amostras. A porosidade total aumentou para amostras com maior

teor de Co e a análise mostra uma alta fração de poros abertos na estrutura dos *scaffolds* para todas as amostras, indicativa de uma estrutura porosa interconectada.

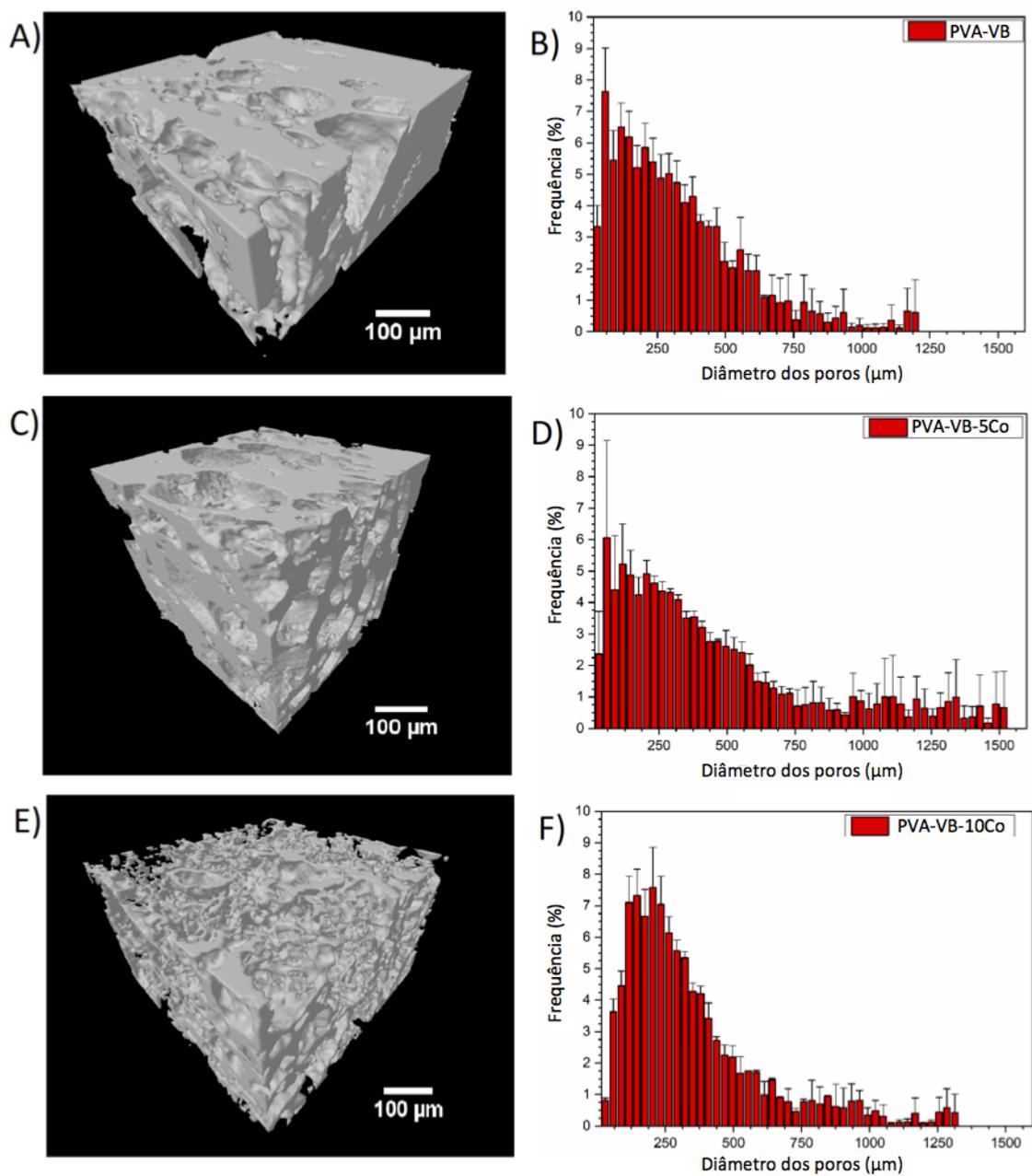


Figura 5-8. Modelos Micro-CT 3D e distribuição do tamanho dos poros obtidos dos *scaffolds* híbridos de A) e B) PVA-VB; C) e D) PVA-VB-5Co; E) e F) PVA-VB-10Co. Barra de escala: 100 μm.

Tabela 5.2. Dados da análise tridimensional, por microtomografia computadorizada, dos *scaffolds* híbridos PVA-VB, PVA-VB-5Co e PVA-VB-10Co.

| Parâmetro | Amostras | | |
|---|------------------|------------------|------------------|
| | PVA-VB | PVA-VB-5Co | PVA-VB-10Co |
| Tamanho médio de poro (μm) | 326,1 \pm 52,5 | 453,9 \pm 94,4 | 348,2 \pm 43,7 |
| Porosidade aberta (%) | 25,4 \pm 4,0 | 46,4 \pm 4,9 | 68,4 \pm 3,2 |
| Porosidade total (%) | 26,9 \pm 3,8 | 46,9 \pm 4,8 | 68,5 \pm 3,1 |

Uma estrutura porosa é necessária para os *scaffolds* na engenharia de tecidos ósseos, pois eles permitem a migração e proliferação de osteoblastos e células-tronco mesenquimais, bem como a vascularização adequada do implante ²¹². Além disso, uma superfície porosa melhora o intertravamento mecânico entre o biomaterial do implante e o osso natural circundante, proporcionando maior estabilidade mecânica nessa interface crítica ²¹³. O desenvolvimento de um *scaffold* altamente poroso com estrutura de poros interconectados é essencial para o movimento e crescimento celular, formação de matriz e vascularização de novos tecidos. Os *scaffolds* híbridos deste estudo apresentaram uma matriz tridimensional com poros interconectados. As amostras contendo Co incorporado apresentaram maior porosidade do que a amostra sem Co (68,4% para PVA-VB-10Co e 46,4% para PVA-VB-5Co). Um estudo anterior foi realizado com *scaffolds* baseados em PVA-VB através do método sol-gel, onde foi usado o sistema de formação de espuma para obtenção da porosidade dos *scaffolds*. Os autores obtiveram porosidade de 60% dos *scaffolds* ¹³⁵. Neste trabalho, a mesma composição de VB foi utilizada e a porosidade total obtida para o *scaffold* híbrido PVA-VB-10Co foi de 68,5%, mostrando uma porosidade importante que permite a migração celular, transporte de nutrientes, vascularização e crescimento de tecidos.

Os *scaffolds* com poros na faixa de 85 e 325 μm possuem uma estrutura adequada para permitir a vascularização celular ^{214,215}. Portanto, podemos afirmar que a estrutura de poros obtida nos *scaffolds* híbridos produzidos neste trabalho é propícia à engenharia de tecidos, exibindo uma rede macroporosa com distribuição adequada do tamanho dos poros. Na Tabela 6.1, podemos ver que, à medida que o conteúdo de Co adicionado ao *scaffold* híbrido aumentou, houve um aumento na porosidade e interconectividade das amostras. Os resultados para todas as amostras descrevem características morfológicas

consistentes com as necessárias para materiais utilizados como matrizes de crescimento celular ^{125,216}. Um fato importante a ser mencionado é que matrizes tridimensionais altamente macroporosas foram desenvolvidas neste trabalho por processo de formação de espuma, sendo um diferencial quando comparado a literatura ²¹⁷.

5.3.7 Comportamento mecânico: teste de compressão

A Figura 5.9 mostra a resposta à tensão compressiva para os *scaffolds* híbridos. As amostras submetidas a esses testes foram preparadas a partir da região mais homogênea das amostras para alcançar resultados mais representativos. O comportamento mecânico dos *scaffolds* híbridos macroporosos demonstra um aumento na tensão proporcional à deformação na região inicial. Há uma região, cujo limite não está claramente definido na curva, que pode ser relacionado com o comportamento plástico dos *scaffolds* híbridos. Depois, há um aumento da tensão com a deformação que pode estar relacionado à densificação dos *scaffolds* híbridos, onde as estruturas dos poros são colapsadas, uma vez que as amostras não sofreram ruptura por força de compressão, e os testes foram interrompidos com 50% de deformação.

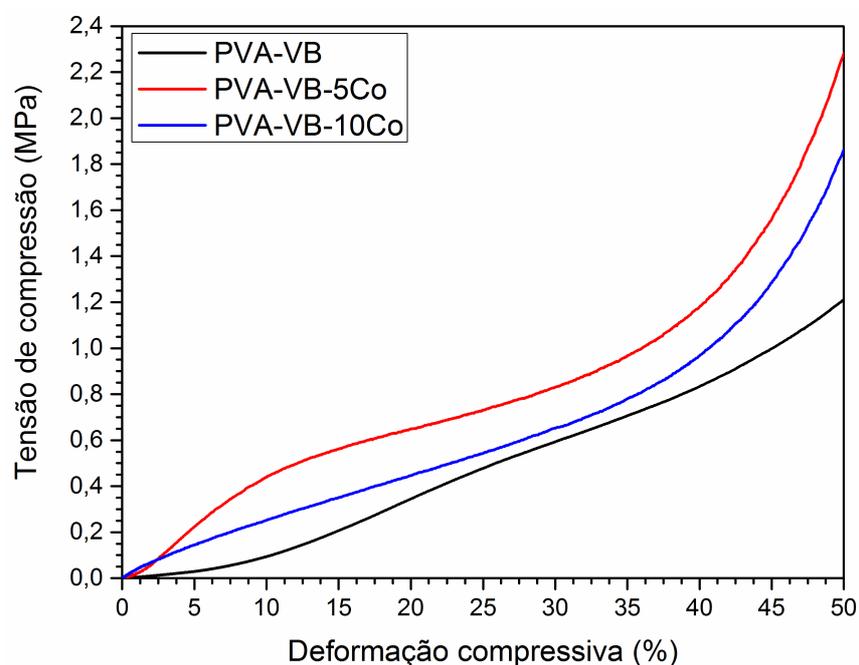


Figura 5-9. Curvas de tensão de compressão x deformação dos *scaffolds* híbridos PVA-VB, PVA-VB-5Co e PVA-VB-10Co.

A Tabela 5.3 mostra o módulo elástico e a tensão de compressão na deformação de 50%, obtidos para todas as amostras. Os *scaffolds* híbridos contendo Co apresentaram

maior módulo de elasticidade, com valor máximo de $20,2 \pm 7,1$ MPa para PVA-BG-5Co, e também maior tensão de compressão para deformação de 50%, quando comparado à amostra sem cobalto, atingindo $2,0 \pm 0,2$ MPa.

Tabela 5.3. Módulo de elasticidade e tensão à deformação de 50% para os *scaffolds* híbridos PVA-VB, PVA-VB-5Co e PVA-VB-10Co.

| Amostras | E (MPa) | $\sigma_{50\%}$ (MPa) |
|-------------|----------------|-----------------------|
| PVA-VB | $6,6 \pm 2,0$ | $1,1 \pm 0,2$ |
| PVA-VB-5Co | $20,2 \pm 7,1$ | $2,0 \pm 0,2$ |
| PVA-VB-10Co | $19,6 \pm 4,1$ | $1,5 \pm 0,5$ |

De acordo com Vyas et al. ²¹⁸, a adição de cobalto ao VB aumenta a resistência à compressão. O comportamento mecânico dos *scaffolds* híbridos macroporosos é consistente com o descrito por Gibson et al. ²¹⁹, onde na região inicial ocorre um aumento da tensão proporcional à deformação, o que pode estar relacionado à compressão elástica da estrutura porosa. O comportamento plástico observado nas amostras pode ser justificado pela alta proporção de polímero contido nas amostras (cerca de 84%) e pelas estruturas de poros sobrepostas ¹⁵⁰. O cobalto aumentou a rigidez dos *scaffolds* híbridos. O comportamento da compressão mecânica dos *scaffolds* híbridos deste trabalho é adequado para a engenharia de tecidos ósseos, uma vez que os resultados encontrados foram compatíveis com os dados da literatura para osso trabecular / esponjoso (2-12 MPa) ^{68,220}.

5.3.8 Comportamento *in vitro* após imersão em SBF

5.3.8.1 Liberação de íons em SBF

O ensaio em SBF é frequentemente realizado para avaliar o perfil de dissolução e a capacidade de formação de HCA dos vidros bioativos, sendo uma indicação preliminar de seu potencial bioativo *in vivo*. A Figura 5.10 apresenta as concentrações de Si, P, Ca e Co após imersão dos *scaffolds* híbridos no SBF por diferentes períodos de tempo, conforme avaliado pelo ICP-OES.

O processo de dissolução do vidro e as reações químicas na superfície do vidro ocorrem após a imersão em SBF, e com o passar do tempo, essas reações levam a alterações na composição química da solução, que podem ser usadas como um meio de avaliar as reações que ocorrem na superfície do vidro. Uma liberação controlada de íons é desejada para melhorar o desempenho desses materiais. A Figura 5.10 mostra uma liberação elevada de Si para ambos *scaffolds* híbridos de PVA-VB, PVA-VB-5Co e PVA-VB-10Co. A liberação de silício determinada após a primeira hora de imersão foi semelhante, estabilizando após 72 horas de imersão em todas as amostras. Observou-se uma liberação ligeiramente mais alta de Si para PVA-VB em comparação com PVA-VB-5Co e PVA-VB-10Co, criando assim uma rede mais aberta e afetando o perfil de dissolução do vidro.

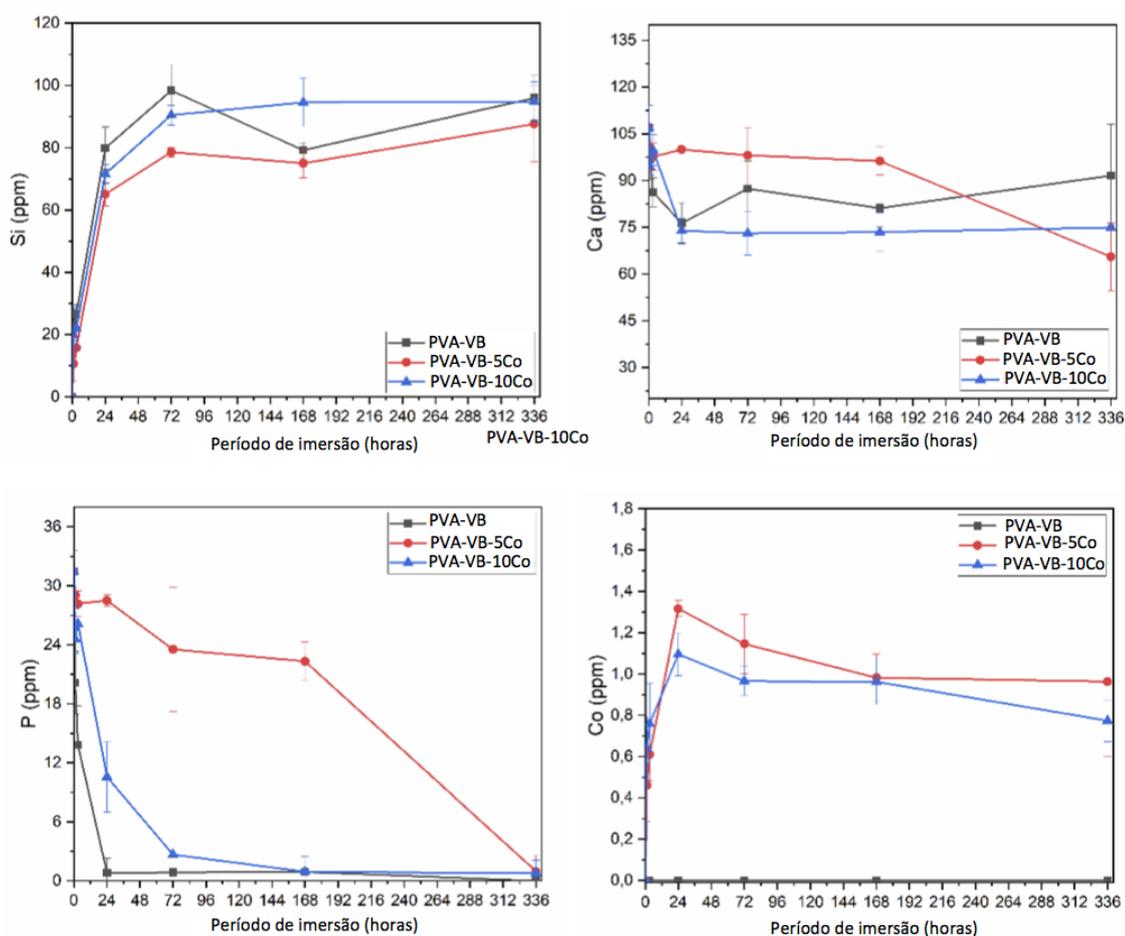


Figura 5-10. Variação no conteúdo de Si, Ca, P e Co com o tempo de imersão em uma solução de fluido corporal simulada para os *scaffolds* híbridos PVA-VB, PVA-VB-5Co e PVA-VB-10Co.

Trabalhos anteriores mostraram que a liberação de Si de 0,1 a 100 ppm poderia favorecer a citocompatibilidade, apresentando efeitos estimuladores sobre as células

^{171,221}, o que está dentro da faixa de liberação de íons observada para todas as amostras durante este estudo de liberação e dissolução em SBF. A liberação de silício também aumenta a concentração de grupos silanol (Si-OH) na superfície do vidro, que é uma etapa importante no processo de formação da camada de HCA ²²². Após a dissolução da sílica e a formação dos grupos silanol, ocorre liberação local de Ca^{2+} , e a migração de PO_4^{3-} do volume para a superfície do vidro, o que reduz a concentração de P em solução ²²². Tal fato foi observado para as amostras em análise, já que a concentração de P no SBF reduziu ao longo do tempo para todas as amostras, possivelmente associada à remoção de espécies solúveis de fosfato para formar a camada de fosfato de cálcio na superfície do híbrido ²²³. Os íons cálcio e fosfato se combinam, formando inicialmente uma camada amorfa de fosfato de cálcio, que posteriormente cristaliza para HCA.

O Ca apresentou uma liberação inicial rápida nas primeiras horas de imersão, sendo que para as amostras PVA-VB e PVA-VB-10Co houve uma liberação desse íon mais lenta até o tempo de 24h. Após 24h a amostra PVA-VB a concentração desse íon oscilou, e a amostra PVA-VB-10Co estabilizou a concentração de Ca. Até o tempo de 1 semana a amostra PVA-VB-5Co diminuiu a taxa de liberação de Ca. A concentração de Ca no SBF pode estar relacionada à liberação desse íon pela amostra e à redução no teor de Ca relacionado à formação da camada de fosfato de cálcio. A formação da camada de fosfato de cálcio também é indicada pela avaliação da concentração de íons P, que reduz ao longo do tempo para todas as amostras. Porém para a amostra PVA-VB-5Co essa redução é mais gradativa até o tempo de 1 semana. Após este período a concentração de P reduz rapidamente, confirmando que os íons P estão migrando para a superfície do vidro para formar uma camada rica em Ca-P. A concentração de P atingiu quase zero após o ensaio de 24h para PVA-VB, enquanto que para o PVA-VB-10Co esse valor foi observado após 72h e para PVA-VB-5Co após 1 semana. Portanto, a liberação de íons Ca e P mostrou que a cinética de bioatividade pode ser reduzida quando o Co é incorporado na estrutura do híbrido, embora ainda tenham sido encontradas evidências da formação da camada de HCA.

A liberação de Co dos *scaffolds* híbridos PVA-VB-5Co e PVA-VB-10Co mostrou um aumento abrupto, atingindo uma concentração máxima de 1,35 e 1,15 ppm para essas amostras em torno de 24 horas (Figura 5.10). Estudos anteriores indicaram que o Co em altas concentrações pode causar toxicidade celular ¹⁸²⁻¹⁸⁴. Tendo em vista que um

sistema controlado de liberação de íons é vital para promover a angiogênese, nossos resultados mostraram que a concentração dos íons liberados dos *scaffolds* PVA-VB-5Co e PVA-VB-10Co não excedeu 1,4 ppm, uma concentração relativamente baixa e considerada favorável, mostrando que os *scaffolds* híbridos desenvolvidos neste estudo podem ser um grande aliado na promoção de angiogênese.

5.3.8.2 FTIR após imersão in vitro em SBF

Para haver ligação entre o osso e os vidros bioativos é necessário a formação da camada de Hidroxiapatita (HCA) na superfície do vidro ¹⁹⁵, um indicativo de sua bioatividade. A F

igura 5.11 mostra espectros de FTIR dos *scaffolds* híbridos antes e após 14 dias em imersão em SBF.

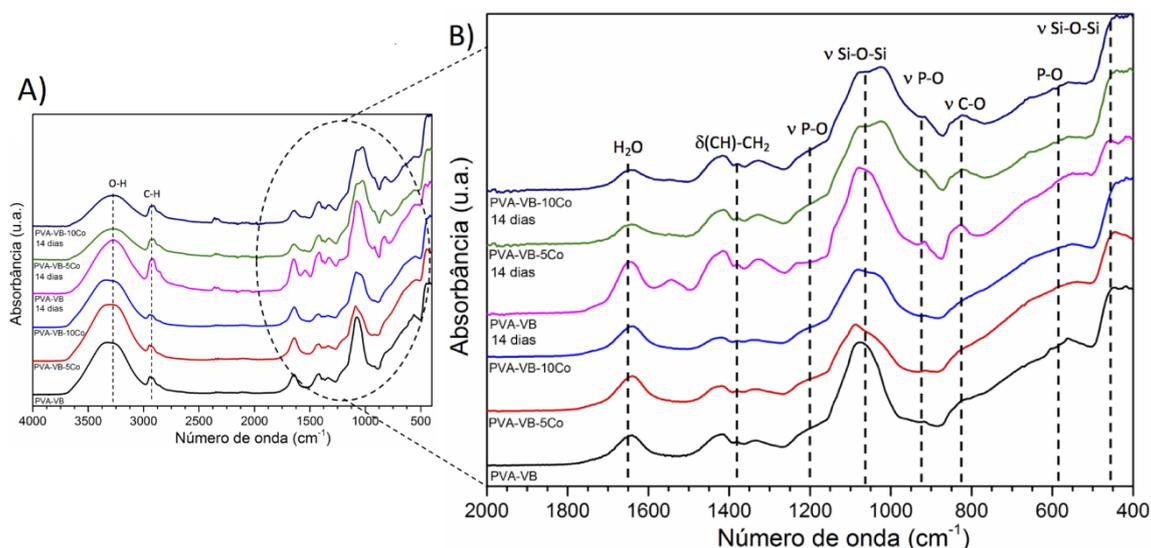


Figura 5-11. Espectro de FTIR para os *scaffolds* híbridos PVA-VB, PVA-VB-5Co e PVA-VB-10Co antes e após imersão em SBF por 14 dias.

Bandas típicas de vidro bioativo podem ser observadas em todas as amostras. A vibração a 400-470 cm⁻¹ está frequentemente relacionada à flexão das ligações Si-O-Si, observadas principalmente nas estruturas amorfas de SiO₂ ^{135,224}. A absorvância entre 1000 e 1200 cm⁻¹ é atribuída ao alongamento assimétrico do Si-O-Si ²⁰³ que teve a intensidade dos picos diminuída para os *scaffolds* híbridos PVA-VB-5Co e PVA-BG-10Co após a imersão. O aumento da intensidade do pico em 915 cm⁻¹ é referente ao alongamento de P-O, e o aumento da intensidade de absorção em 820 cm⁻¹ é atribuído à vibração de alongamento do C-O, e estão relacionados à formação de HCA na superfície de vidro durante o estudo SBF ^{30,222}. Em 550 e 630 cm⁻¹ é observado uma

leve vibração de flexão de P-O nos grupos fosfato de HCA, sugerindo o começo da precipitação da camada de fosfato de cálcio na superfície do vidro. A absorção devido aos grupos P-O também pode ser observada em 1200 cm^{-1} ¹⁹⁸ e em torno de 960 cm^{-1} ³⁰.

A banda observada entre $3600\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ pode ser atribuída à ligação OH. Foi percebido uma redução na intensidade da banda OH ocorrida nas amostras após imersão por 14 dias em água DI, aspecto não observado no FTIR anterior à imersão em SBF, o que sugere que parte do PVA em híbridos foi removida da superfície, provavelmente devido ao alto pH da solução ou devido à policondensação adicional dos grupos silanol ²²⁴. De acordo com Costa et al. ¹³⁵, essa evidência fica marcante pelo processo de degradação dos *scaffolds* híbridos. A banda de $2870\text{ a }2895\text{ cm}^{-1}$ foi atribuída ao modo de alongamento de alquil (CH). O pico centrado em 1640 cm^{-1} compatível com o da água adsorvida. A absorção observada na faixa de $1400\text{ a }1550\text{ cm}^{-1}$ e 1635 cm^{-1} está relacionada aos grupos carbonato e água molecular, respectivamente ^{152,172}.

A avaliação por FTIR indica que uma camada de HCA pode ser formada nas superfícies dos *scaffolds* híbridos após imersão em SBF, com bandas típicas associadas à estrutura HCA. O padrão de espectro se manteve antes e após a imersão em SBF para as amostras PVA-VB e PVA-VB-Co, indicando que a rede principal foi mantida.

5.3.8.3 DRX após dissolução in vitro em SBF

A Figura 5.12 mostra os padrões de difração de DRX dos *scaffolds* híbridos antes e após 14 dias em imersão em SBF e é observada uma estrutura amorfa com picos cristalinos. Como relatado anteriormente, nos *scaffolds* híbridos antes da imersão em SBF foram observados picos de difração cristalinos a 29° , 48° , 57° (2θ), que foram identificados como fluoreto de cálcio (CaF_2 - JCPDS 04-0864).

Foi observada uma banda larga amorfa na faixa de $15\text{ a }25^\circ$ (2θ) para todas as amostras. Foi observado que houve uma diminuição do halo amorfo para os *scaffolds* de PVA-VB-5Co e PVA-VB-10Co. Um pico cristalino em 32° (2θ) foi relacionado à formação de HCA ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ - JCPDS 73-9204) para todos *scaffolds* híbridos, sendo que para os *scaffolds* híbridos de PVA-VB-5Co e PVA-VB-10Co também foram detectados picos cristalinos relacionados ao HCA ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ - JCPDS 73-9204) em 45° (2θ).

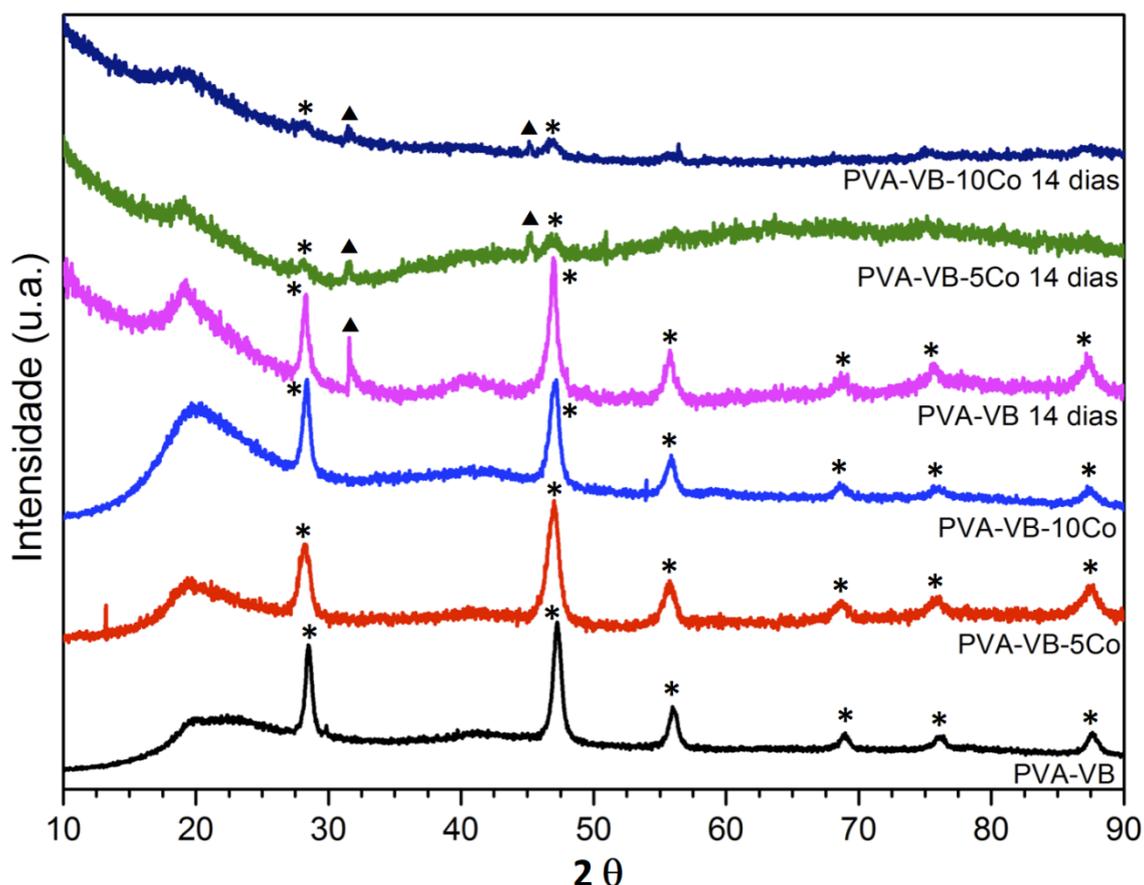


Figura 5-12. Padrões de DRX para os *scaffolds* híbridos PVA-VB, PVA-VB-5Co e PVA-VB-10Co após imersão em SBF por 14 dias.

* mostram CaF_2 (JCPDS 04-0864); ▲ mostram HCA ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$, JCPDS 73-0294).

Na amostra PVA-VB após a imersão em SBF há a prevalência dos picos cristalinos observados em 29° , 48° , 57° (2θ) identificados como fluoreto de cálcio (CaF_2 - JCPDS 04-0864) e alguns desses picos de CaF_2 também permaneceram nos *scaffolds* híbridos incorporados com Co. Não foram observados picos de difratograma relacionados ao Co nos *scaffolds* híbridos incorporados com Co após o período de imersão.

5.3.8.4 MEV e EDS após imersão *in vitro* em SBF

A Figura 5.13 mostra imagens de MEV para *scaffolds* híbridos que foram analisados por MEV após imersão em SBF por 14 dias, PVA-VB (Figura 5.13 (A)), PVA-VB-5Co (Figura 5.13 (B)) e PVA-VB-10Co (Figura 5.13 (C)). Uma estrutura porosa pode ser observada para todas as amostras, porém a amostra contendo maior teor de Co mostrou maior grau de porosidade como pode ser visto na Figura 5.13 (C). As amostras

mantiveram o padrão anterior de distribuição e tamanhos de poros, mesmo após o período de imersão.

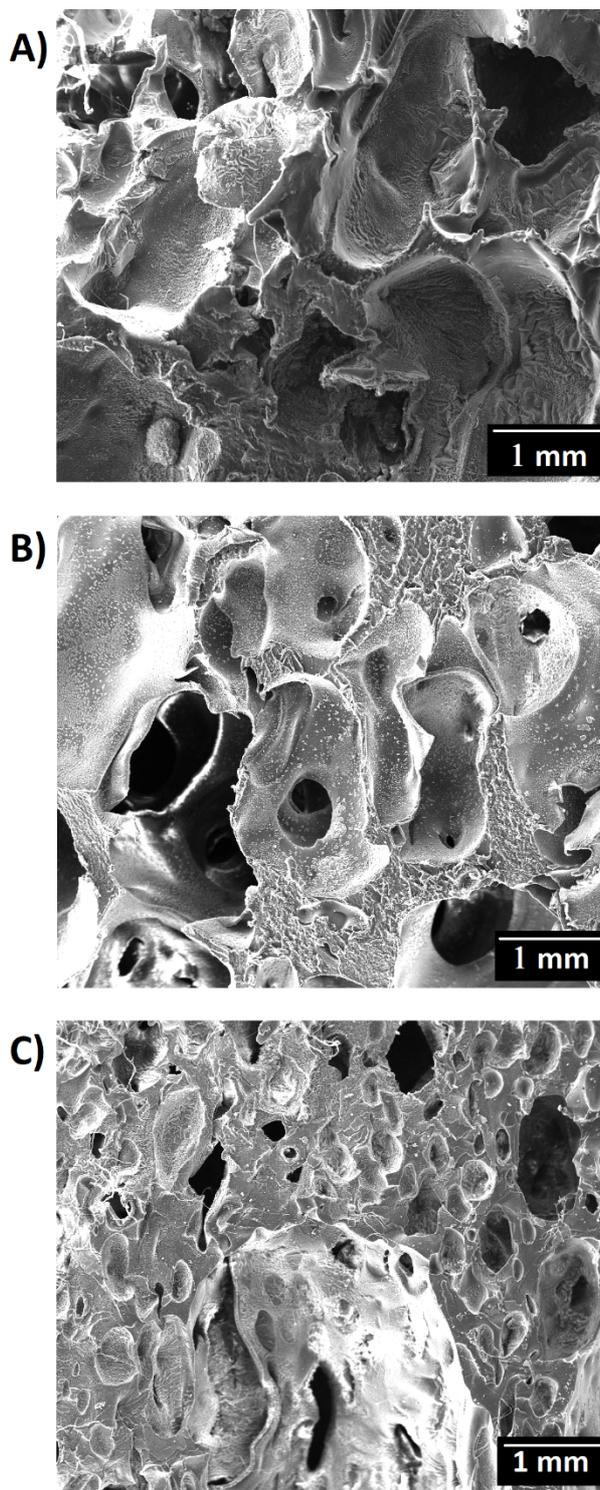


Figura 5-13. Microscopia eletrônica de varredura dos *scaffolds* híbridos de (A) PVA-VB, 150x; (B) PVA-VB-5Co, 150x; (C) PVA-VB-10Co, 150x, após 14 dias de imersão em SBF. Barra de escala = 1 mm.

A Figura 5.14 contém o mapeamento de raios-x para a presença do elemento químico Co para os *scaffolds* híbridos PVA-VB-5Co (Figura 5.14 (A) e (B)) e PVA-VB-10Co (Figura 5.14 (C) e (D)) após 14 dias de imersão em SBF. Os resultados observados indicam que o elemento Co está uniformemente distribuído nos *scaffolds* híbridos. Esse resultado se torna extremamente importante, pois, mesmo após o processo de neutralização, lavagem e imersão por 14 dias em SBF a presença do íon Co permanece distribuída por toda a amostra. Portanto, o íon Co não foi totalmente liberado, mostrando que mesmo após liberação do íon em SBF ele continua uniformemente distribuído na estrutura para liberação continuada.

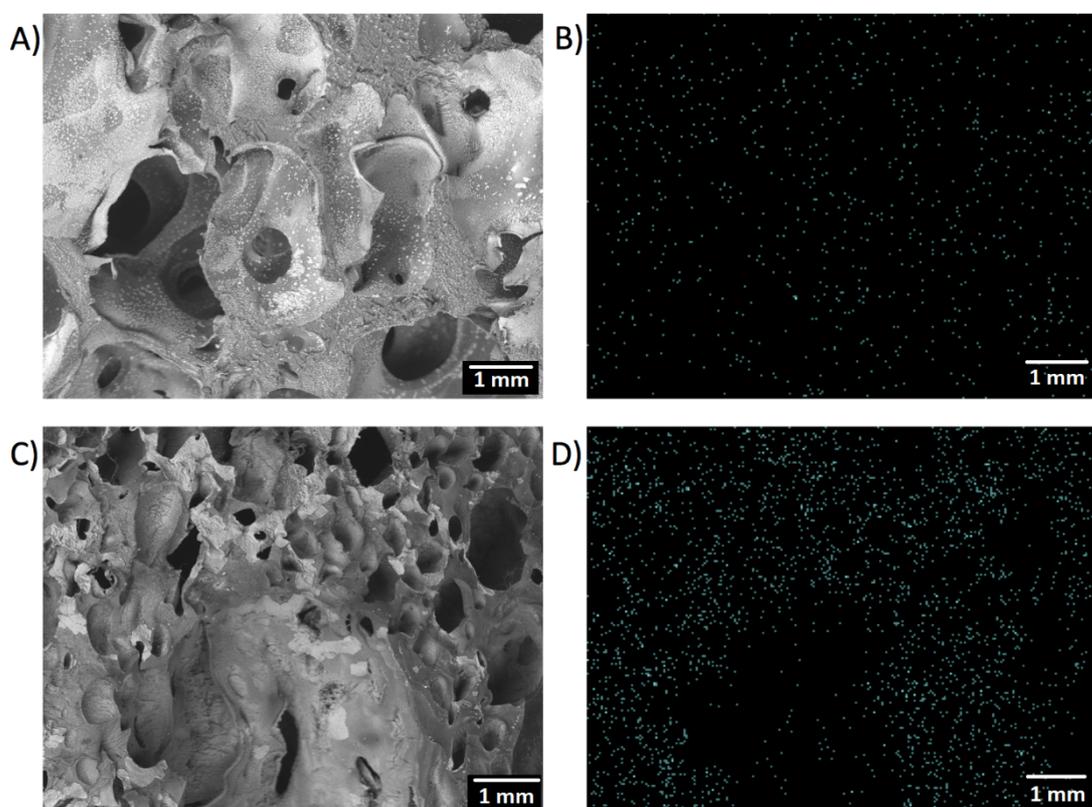


Figura 5-14. Microscopia eletrônica de varredura dos *scaffolds* híbridos de A) PVA-VB-5Co, 150 x e C) PVA-VB-10Co, 150 x; mapeamentos químicos de Co para B) PVA-VB-5Co, 150 x e D) PVA-VB-10Co, 150 x.

Barra de escala = 1 mm. MEVe mapeamento químico realizados após imersão em SBF por 14 dias.

Os resultados do EDS para os *scaffolds* híbridos após 14 dias de imersão em SBF mostram a presença de silício (Si), cálcio (Ca), fósforo (P), cloro (Cl), sódio (Na) e flúor (F) nas amostras, como mostra a Figura 5.15. A presença do elemento químico Co foi confirmado para os *scaffolds* híbridos incorporados com Co mesmo após o período de

imersão. Também houve a permanência de F nas análises de EDS após os 14 dias de imersão em SBF.

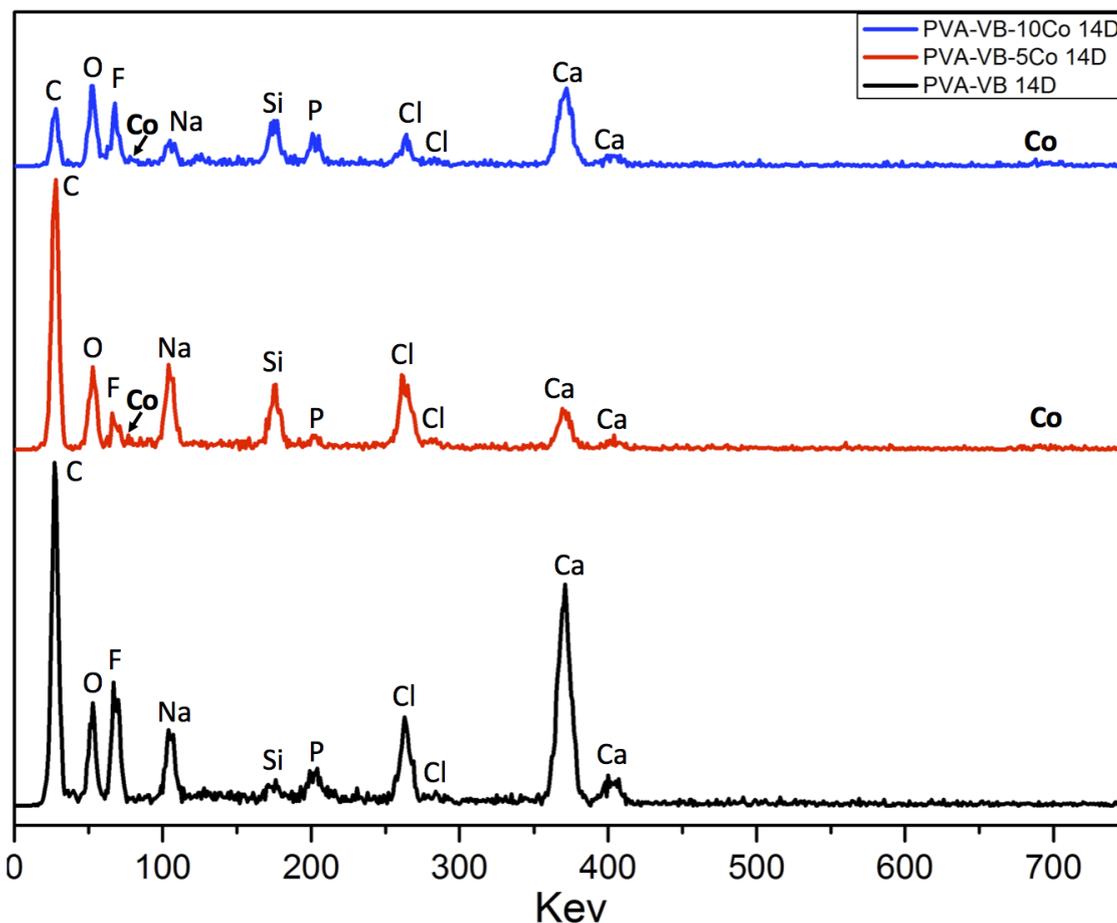


Figura 5-15. Espectro de EDS de *scaffolds* híbridos de PVA-VB, PBA-VB-5Co e PVA-VB-10Co.

5.3.8.5 Medida de pH

A Figura 5.16 mostra as medições de pH durante os 14 dias de imersão em SBF. Quando imersos, os *scaffolds* híbridos alteraram imediatamente o pH do meio, atingindo um valor máximo. Os *scaffolds* híbridos incorporados com Co demonstraram valores mais altos de pH após imersão em SBF em comparação com a amostra não incorporada ao cobalto. Após 24 h de imersão, o pH do meio caiu para todas as amostras. Após esse período, o pH manteve sua variação entre 7,54 e 7,6, com exceção da amostra PVA-VB-10Co, que após 7 dias teve uma diminuição na medição do pH para 7,46.

Os *scaffolds* híbridos incorporados com Co tiveram um pH mais básico nas primeiras horas de imersão em SBF devido à rápida liberação desse íon ¹⁹⁷. Um estudo anterior

relatou que, para a adição de óxido de cobalto ao *scaffold* híbrido, a sequência de reações que ocorrem no SBF após a imersão do vidro bioativo por vários períodos de tempo é favorável à formação de uma camada semelhante à hidroxiapatita na superfície das amostras ²¹⁸. Em geral, quanto maior a degradação, maior a bioatividade. Foi relatado que os íons metálicos de transição nos vidros bioativos geralmente mostram um perfil de dissolução amplamente controlável dentro de fluidos fisiológicos para possíveis sistemas de entrega dentro de estruturas de regeneração tecidual ²¹⁸.

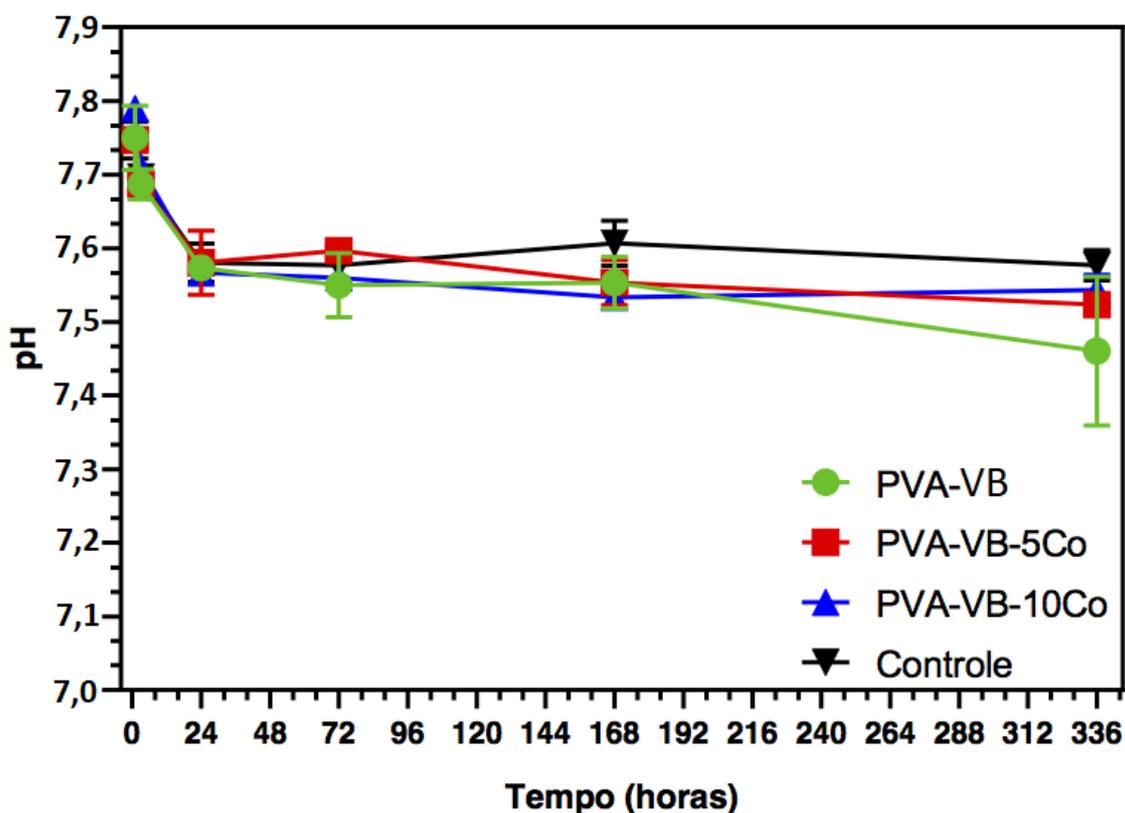


Figura 5-16. Variação do pH dos *scaffolds* híbridos da dissolução de SBF durante o período de 14 dias de imersão.

5.3.9 Ensaio de crescimento Bacteriano e fúngico

O objetivo do teste de crescimento bacteriano e fúngico foi testar a eficácia da esterilização dos *scaffolds* híbridos à 4 kGy para serem utilizados nos ensaios biológicos *in vitro*. A Figura 5.17 mostra fotos retiradas das amostras controle (CNTL), PVA-VB, PVA-VB-5Co e PVA-VB-10Co durante 7 dias de avaliação. Os períodos de avaliação escolhidos foram baseados na literatura ^{160,161}. Não foram observados crescimento de microorganismos durante o período avaliado, significando que os *scaffolds* híbridos esterilizados a 4 kGy estavam aptos para serem usados nos ensaios biológicos *in vitro*.

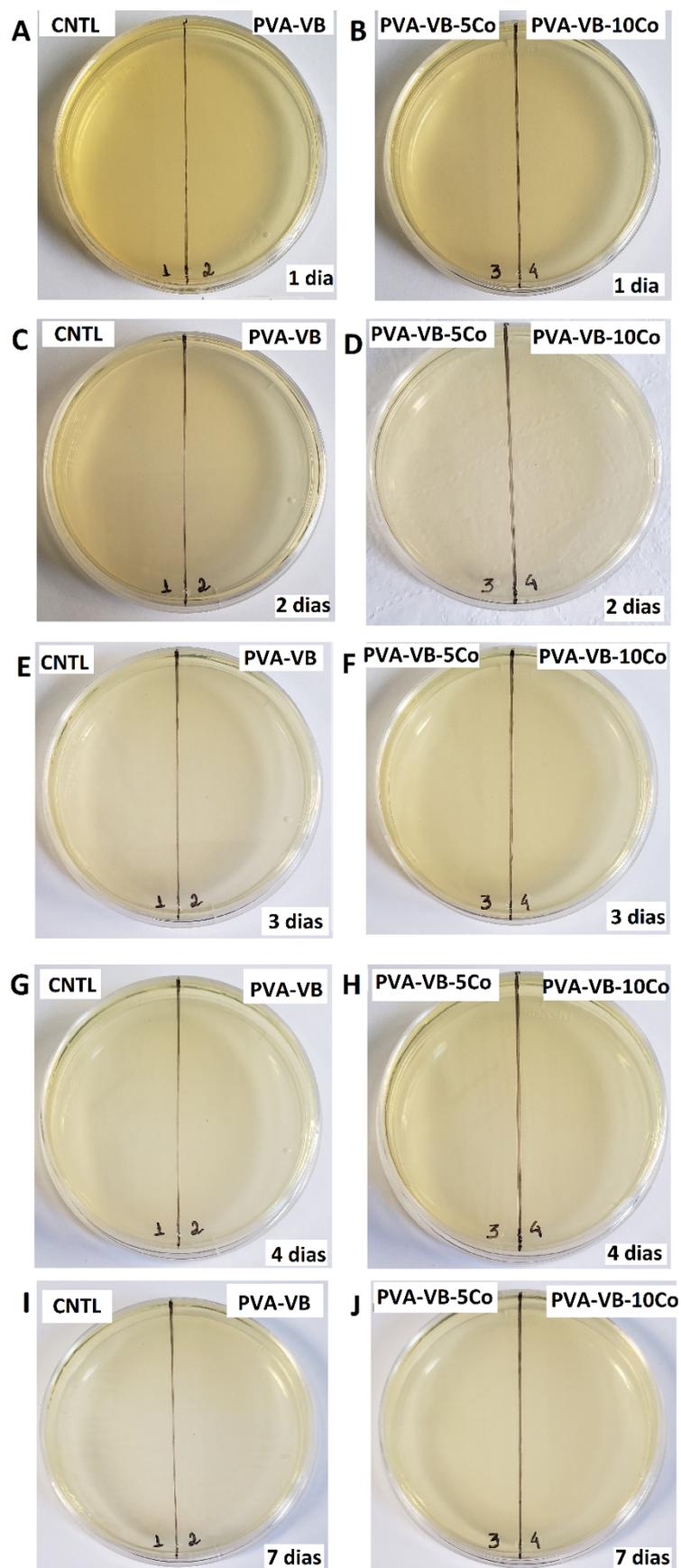


Figura 5-17. Teste de crescimento bacteriano e fúngico dos *scaffolds* híbridos PVA-VB, PVA-VB-5Co e PVA-VB-10Co nos períodos de 1 dia (A e B), 2 dias (C e D), 3 dias (E e F), 4 dias (G e H) e 7 dias (I e J).

Os biomateriais estão continuamente em contato com tecidos corporais, sendo necessário esterilizar todo o produto antes da implantação em seres vivos ²²⁵ e as propriedades dos biomateriais devem ser estáveis após a esterilização ²²⁶. Portanto, é crítico e necessário analisar a compatibilidade do método de esterilização selecionado. Entre as técnicas de esterilização, a exposição aos raios gama é a técnica mais usada para esterilizar produtos farmacêuticos e dispositivos médicos devido à sua alta capacidade de penetração e uniformidade e sem nenhum resíduo tóxico ²²⁷. Conforme recomendado pela Organização Internacional de Normalização (ISO), a dose de esterilização deve ser definida para cada tipo de produto, dependendo de sua carga biológica ²²⁸.

5.3.10 Ensaio de Citotoxicidade

Neste estudo, as HUVECs foram expostas a diferentes concentrações de PI de *scaffolds* híbridos ao longo de diferentes períodos de tempo (Figura 5.18). As análises foram realizadas em dois períodos: 24 e 48 horas, para avaliar um efeito agudo observado no início do primeiro ciclo celular após o tratamento e também um efeito de toxicidade mais crônica; e 72 horas, quando as células já atingiram uma média de 3 ciclos celulares. Não foi observada citotoxicidade para todas as amostras, mesmo após 72 horas de exposição de PI às células. A liberação de Co dos *scaffolds* híbridos não mostrou influência na atividade mitocondrial das HUVECs.

Estudos anteriores indicaram que o Co em altas concentrações pode causar citotoxicidade celular ¹⁸²⁻¹⁸⁴. No entanto, neste trabalho, mesmo o *scaffold* híbrido contendo a maior concentração de Co (PVA-VB-10Co) não prejudicou a viabilidade celular, não apresentando, portanto, um perfil citotóxico. A avaliação MTT mostrou que os *scaffolds* híbridos liberadores de Co poderiam ser aplicados como um material potencial para a engenharia de tecidos, uma vez que nenhuma citotoxicidade foi observada em diferentes concentrações de PIs.

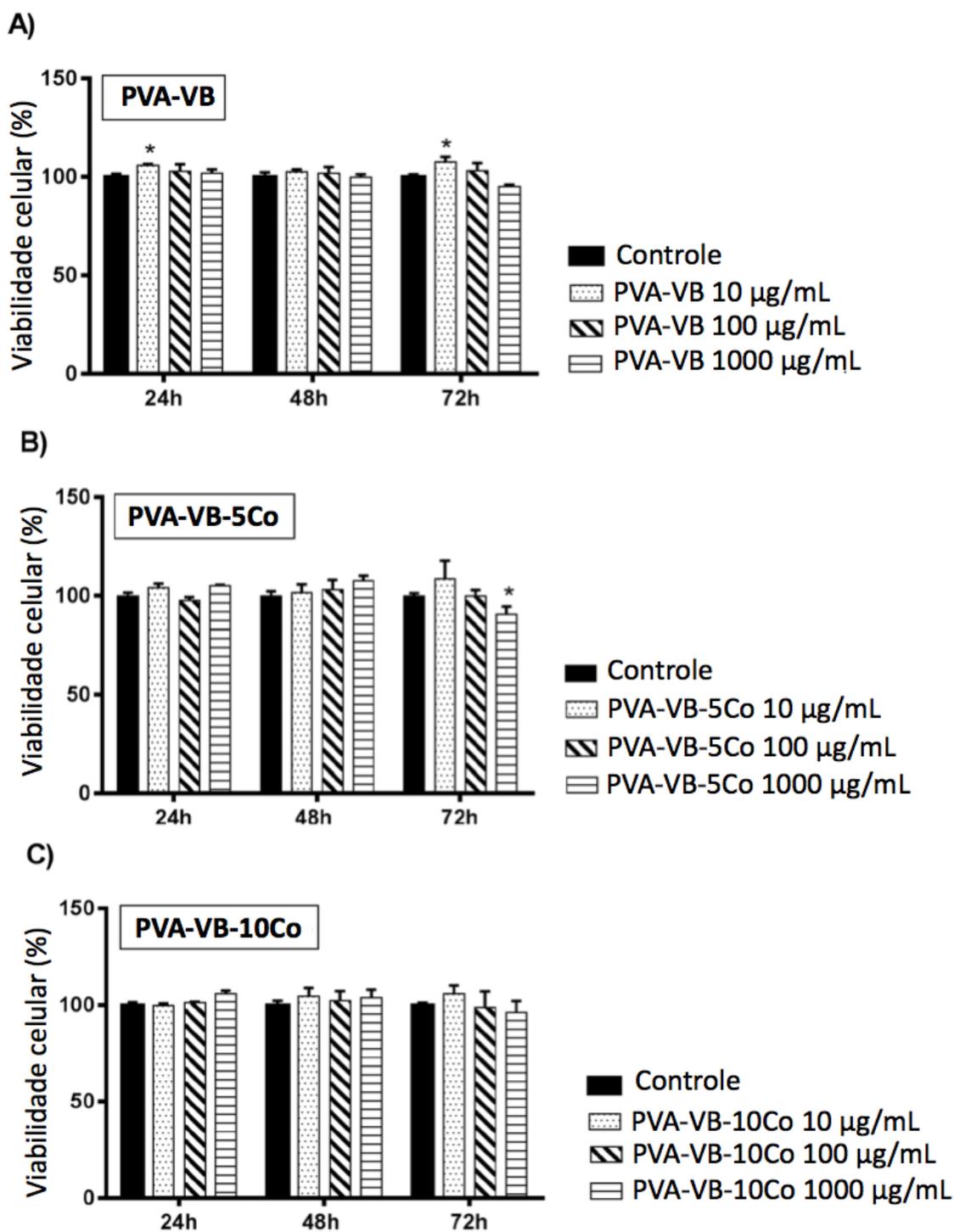


Figura 5-18. Viabilidade das HUVECs determinada pelo ensaio MTT para PVA-VB, PVA-VB-5Co, PVA-VB-10Co.

Viabilidade celular média normalizada pela viabilidade média do grupo controle. Barras de erro indicam \pm DP. Asterisco (*) indica significância estatística no nível $p < 0,05$, conforme determinado pelo One-way ANOVA seguido por um pós-teste de Tukey.

5.3.11 Curva de crescimento celular

O crescimento celular é uma avaliação importante para estudos de biomateriais. Para ensaios biológicos, os *scaffolds* híbridos foram esterilizados com radiação gama (4 kGy).

Para verificar a influência da liberação de Co no crescimento celular, o PVA-VB-10Co foi selecionado devido à maior concentração de Co e também o PVA-VB como material de referência sem Co, na concentração de 1000 $\mu\text{g} / \text{mL}$. O resultado apresentado na Figura 5.19 mostrou crescimento celular eficaz das HUVECs, e particularmente o *scaffold* híbrido PVA-VB-10Co que mostrou uma diferença significativa quando comparado ao *scaffold* híbrido PVA-VB e controle.

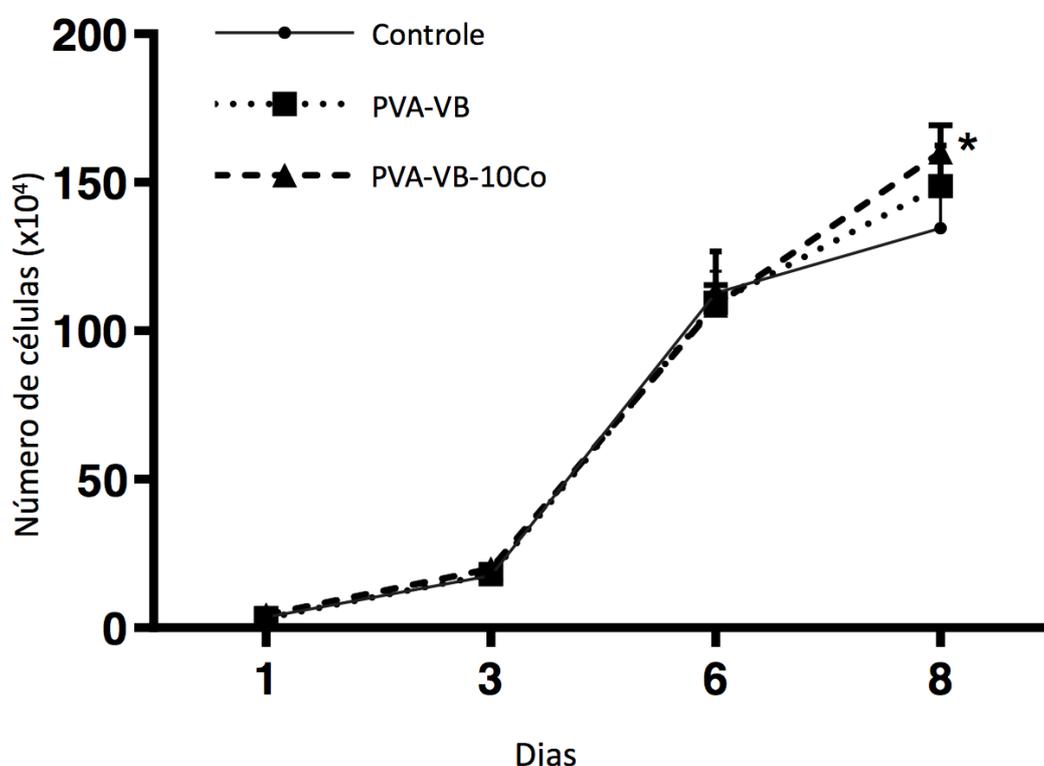


Figura 5-19. Curva de crescimento celular na presença de PI dos *scaffolds* híbridos. O asterisco (*) representa a diferença entre o grupo PVA-VB-10Co em relação ao controle.

Quando há crescimento celular na presença do material em análise, significa que esse material tem compatibilidade e não é citotóxico, promovendo um ambiente favorável ao crescimento celular. O ensaio da curva de crescimento mede o crescimento celular contando as células ao longo do tempo na presença do material de teste⁵³. Neste estudo, o ensaio de crescimento de HUVECs contendo a maior concentração de Co em *scaffolds* híbridos não mostrou impacto negativo no crescimento celular, indicando

biocompatibilidade para estudos terapêuticos. Esses resultados corroboram o ensaio MTT, mostrando mais uma vez que os *scaffolds* híbridos são promissores para uso potencial na Engenharia de Tecidos.

5.4 Conclusões

Novos *scaffolds* híbridos à base de PVA-VB incorporados com cobalto foram produzidos pelo método sol-gel e pelo método de formação de espuma. A incorporação de íons na estrutura híbrida foi alcançada através de um controle cuidadoso da química do processo sol-gel. Os *scaffolds* híbridos macroporosos foram obtidos com estrutura predominantemente amorfa, mas picos cristalinos relacionados à precipitação de fluoreto de cálcio também foram observados. A liberação de íons Co foi observada após imersão em SBF, apresentando liberação rápida nas primeiras horas de estudo, porém uma liberação controlada posteriormente. Observou-se a formação de HCA nas amostras contendo Co após imersão em SBF, sendo um indicativo de bioatividade. Os *scaffolds* híbridos também mostraram um módulo de elasticidade e tensão de compressão para 50% de deformação na faixa de osso esponjoso.

As avaliações de biocompatibilidade foram realizadas pelo ensaio de viabilidade celular por MTT e estudos de crescimento celular, e um ambiente favorável às células foi observado para diferentes concentrações dos PIs de *scaffolds* híbridos, sem efeito citotóxico observado, apesar da incorporação de cobalto. Portanto, a incorporação de Co nos *scaffolds* híbridos PVA-VB, via rota sol-gel e método de formação de espuma, apresentou-se como uma estratégia potencial para o desenvolvimento de materiais superiores para osteogênese e angiogênese combinadas na Engenharia de Tecidos.

Capítulo 6 . CONSIDERAÇÕES FINAIS.

Neste trabalho foi realizada a avaliação de vidros bioativos obtidos pelo processo sol-gel a partir da incorporação de cobalto, íon metálico com potencial efeito terapêutico para aplicações na engenharia de tecidos. Os efeitos da incorporação desse íon na estrutura, biocompatibilidade, citotoxicidade, além dos efeitos angiogênicos dos vidros bioativos derivados da composição 58S foram avaliados. Através das micropartículas dos vidros bioativos, incorporadas ou não com 2,5% de CoO, foram obtidas pastilhas que foram submetidas à caracterização estrutural e biológica *in vitro* e *in vivo*. Foi observado que não houve alteração significativa na estrutura e morfologia do vidro com a adição de Co, e que o material se manteve predominantemente amorfo. A presença e distribuição homogênea do Co através do vidro bioativo foram confirmadas por MEV e EDS, associados ao mapeamento de raios-X com dispersão de elemento químico. Através do ensaio de MTT em HUVECs foi avaliada a viabilidade celular, onde foi observado um ambiente favorável às células em diferentes concentrações de produtos iônicos, sem efeitos citotóxicos apesar da incorporação de Co. Observamos através do ensaio de formação de tubos que o vidro bioativo contendo 2,5% de CoO mimetiza o desempenho do VEGFA na indução de formação de vasos sanguíneos. Além disso, essa mesma amostra apresentou expressão máxima do gene VEGFA após 14h, e a adição de Co foi eficaz na expressão do gene HIF1A também após 14h. Através dos estudos *in vivo*, o vidro bioativo incorporado com Co em sua estrutura foi capaz de aumentar a expressão de VEGFA e HIF1A, caracterizando uma estimulação do processo de angiogênese devido à liberação de Co. Esses dados foram confirmados através das análises histológicas e morfométricas, mostrando que o Co na estrutura do VB foi capaz de estimular o número de vasos que expressavam VEGFA e o número de núcleos positivamente marcados para HIF1A. As pastilhas formadas a partir de micropartículas de VB incorporadas com Co possuem propriedades promissoras para a Engenharia de Tecidos.

Em uma segunda etapa deste trabalho foram obtidos novos *scaffolds* híbridos de poli (álcool vinílico) e vidro bioativo incorporados com cobalto pelo método sol-gel e método de formação de espuma. Os *scaffolds* híbridos apresentaram estrutura predominantemente amorfa, com picos cristalinos relacionados à precipitação de fluoreto de cálcio. A liberação de íons Co em SBF apresentou caráter de liberação rápida nas primeiras horas e liberação controlada posteriormente. Indícios da formação

da camada de HAC foram observados após 14h. Os *scaffolds* híbridos também mostraram um módulo de elasticidade e tensão de compressão para 50% de deformação na faixa de osso esponjoso. A esterilização dos *scaffolds* híbridos foi eficaz a 4 kGy e através do ensaio de MTT e estudos de crescimento celular, um ambiente favorável às células foi observado para diferentes concentrações dos PIs dos *scaffolds* híbridos. Portanto, a incorporação de Co nos *scaffolds* híbridos PVA-VB, via rota sol-gel e método de formação de espuma, apresentou-se como uma estratégia potencialmente favorável para o desenvolvimento de materiais superiores no sentido de estimular a angiogênese, devendo ser alvo de novas pesquisas no futuro.

Capítulo 7 . SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Síntese e caracterização de pastilhas com maiores dosagens de Co incorporadas à sua estrutura para avaliar os limites da concentração iônica terapêutica;
- Continuidade dos ensaios de expressão gênica, com avaliação de outros genes envolvidos na angiogênese e osteogênese;
- Avaliação da expressão de outros marcadores envolvidos na angiogênese e também na osteogênese;
- Avaliação *in vivo* das pastilhas obtidas de VB e VB-Co através de implantes em defeitos ósseos críticos em períodos de tempo diferentes;
- Associação de outros íons terapêuticos além do Co na estrutura do vidro bioativo na composição 58S e nos *scaffolds* híbridos, avaliando possíveis melhorias e efeitos cumulativos associados à esses biomateriais, o que ampliaria suas aplicações no contexto da engenharia de tecidos;
- Síntese de nanopartículas de vidros bioativos e *scaffolds* híbridos contendo Co em diferentes composições para aplicações em sistemas injetáveis e nanocompósitos, aliando as propriedades específicas de nanopartículas com o potencial de liberação de íons terapêuticos;
- Análise de XPS e RMN dos *scaffolds* híbridos de PVA-VB e PVA-VB-Co para analisar as possíveis ligações químicas presentes no material.

Capítulo 8 . REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lewis, D. M. & Gerecht, S. Microfluidics and biomaterials to study angiogenesis. *Curr. Opin. Chem. Eng.* 11, 114–122 (2016).
2. Zhou, Y. *et al.* Strategies to direct vascularisation using mesoporous bioactive glass-based biomaterials for bone regeneration. *International Materials Reviews* 62, 392–414 (2017).
3. Li, B. & Xiu, R. Angiogenesis: From molecular mechanisms to translational implications. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 54, 345–355 (2013).
4. Nosrati, H., Pourmotabed, S. & Sharifi, E. A Review on Some Natural Biopolymers and Their Applications in Angiogenesis and Tissue Engineering. *J. Appl. Biotechnol. Reports* 5, 81–91 (2018).
5. Kanniyappan, H., Thangavel, P., Chakraborty, S., Arige, V. & Muthuvijayan, V. Design and evaluation of Konjac glucomannan-based bioactive interpenetrating network (IPN) scaffolds for engineering vascularized bone tissues. *Int. J. Biol. Macromol.* 143, 30–40 (2020).
6. Katari, R. S., Peloso, A. & Orlando, G. Tissue Engineering. *Adv. Surg.* 48, 137–154 (2014).
7. Kim, I. Y. *et al.* Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. *Biotechnology Advances* 26, 1–21 (2008).
8. Moore, E. M. & West, J. L. Harnessing Macrophages for Vascularization in Tissue Engineering. *Ann. Biomed. Eng.* 47, 354–365 (2019).
9. Gupta, R. & Kumar, A. Bioactive materials for biomedical applications using sol–gel technology. *Biomed. Mater.* 3, 034005 (2008).
10. Chen, S. *et al.* Multiporous microstructure for enhancing the water absorption and swelling rate in poly(sodium acrylic acid) superabsorbent hydrogels based on a novel physical and chemical composite foaming system. *Journal of Applied Polymer Science* 133, (2016).
11. Mansur, H. S. & Costa, H. S. Nanostructured poly(vinyl alcohol)/bioactive glass and poly(vinyl alcohol)/chitosan/bioactive glass hybrid scaffolds for biomedical applications. *Chemical Engineering Journal* 137, 72–83 (2008).
12. Jones, J. R., Ehrenfried, L. M. & Hench, L. L. Optimising bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 27, 964–973 (2006).
13. Sanchez, C. *et al.* ‘Chimie douce’: A land of opportunities for the designed

- construction of functional inorganic and hybrid organic-inorganic nanomaterials. *Comptes Rendus Chimie* 13, 3–39 (2010).
14. Tallia, F. *et al.* Bouncing and 3D printable hybrids with self-healing properties. *Mater. Horizons* 5, 849–860 (2018).
 15. Rodríguez-Rodríguez, R., García-Carvajal, Z. Y., Jiménez-Palomar, I., Jiménez-Avalos, J. A. & Espinosa-Andrews, H. Development of gelatin/chitosan/PVA hydrogels: Thermal stability, water state, viscoelasticity, and cytotoxicity assays. *J. Appl. Polym. Sci.* 136, 47149 (2019).
 16. de Carvalho, S. M. *et al.* PVA antioxidant nanocomposite films functionalized with alpha-tocopherol loaded solid lipid nanoparticles. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 581, 123793 (2019).
 17. Jones, J. R. Review of bioactive glass: From Hench to hybrids. *Acta Biomater.* 9, 4457–4486 (2013).
 18. Gerhardt, L.-C. & Boccaccini, A. R. Bioactive Glass and Glass-Ceramic Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Materials (Basel)*. 3, 3867–3910 (2010).
 19. Baino, F. Bioactive glasses – When glass science and technology meet regenerative medicine. *Ceram. Int.* 44, 14953–14966 (2018).
 20. Brauer, D. S. Bioactive glasses - Structure and properties. *Angew. Chemie - Int. Ed.* 54, 4160–4181 (2015).
 21. Malda, J., Klein, T. J. & Upton, Z. The Roles of Hypoxia in the In Vitro Engineering of Tissues. *Tissue Eng.* 13, 2153–2162 (2007).
 22. Buttyan, R. *et al.* Acute intravesical infusion of a cobalt solution stimulates a hypoxia response, growth and angiogenesis in the rat bladder. *Journal of Urology* 169, 2402–2406 (2003).
 23. Hoppe, A. *et al.* Cobalt-releasing 1393 bioactive glass-derived scaffolds for bone tissue engineering applications. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 6, 2865–2877 (2014).
 24. Quinlan, E. *et al.* Hypoxia-mimicking bioactive glass/collagen glycosaminoglycan composite scaffolds to enhance angiogenesis and bone repair. *Biomaterials* 52, 358–366 (2015).
 25. Littmann, E. *et al.* Cobalt-containing bioactive glasses reduce human mesenchymal stem cell chondrogenic differentiation despite HIF-1 α stabilisation. *J. Eur. Ceram. Soc.* 38, 877–886 (2018).
 26. Schoubben, A., Blasi, P., Giovagnoli, S., Rossi, C. & Ricci, M. Development of a

- scalable procedure for fine calcium alginate particle preparation. *Chemical Engineering Journal* 160, 363–369 (2010).
27. Hu, X. *et al.* Transplantation of hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells improves infarcted heart function via enhanced survival of implanted cells and angiogenesis. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 135, 799–808 (2008).
 28. Azevedo, M. M. *et al.* Synthesis and characterization of hypoxia-mimicking bioactive glasses for skeletal regeneration. *J. Mater. Chem.* 20, 8854–8864 (2010).
 29. Azevedo, M. M. *et al.* Hypoxia Inducible Factor-Stabilizing Bioactive Glasses for Directing Mesenchymal Stem Cell Behavior. *Tissue Eng. Part A* 21, 382–389 (2015).
 30. Barrioni, B. R. *et al.* Evaluation of in vitro and in vivo biocompatibility and structure of cobalt-releasing sol-gel bioactive glass. *Ceram. Int.* 44, 20337–20347 (2018).
 31. John Street*†, Min Bao†‡, Leo deGuzman§, Stuart Bunting§, Franklin V. Peale, Jr.§, Napoleone Ferrara‡, Hope Steinmetz§, John Hoeffel§, Jeffrey L. Cleland‡, Ann Daugherty‡, Nicholas van Bruggen§, H. Paul Redmond*, Richard A. D. Carano§, and E. H. F. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Appl. Biol. Sci.* 99, 9656–9661 (2002).
 32. John Street, MD*,**; Desmond Winter, MD*; Jiung Huai Wang, PhD*; Abel Wakai, MD*; Anthony McGuinness, MCh*; and H. Paul Redmond, Mc. Is Human Fracture Hematoma Inherently Angiogenic? *Clin. Orthop. Relat. Res.* 378, 224–237 (2000).
 33. Robert Langer; Joseph P. Vacanti. Tissue engineering. *Science (80-)*. 260, 920–926 (1993).
 34. Fu, Q., Saiz, E., Rahaman, M. N. & Tomsia, A. P. Bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering: state of the art and future perspectives. *Mater. Sci. Eng. C* 31, 1245–1256 (2011).
 35. Nerem 1991.Pdf. *Ann. ofBiomedicalEngineering* 19, 529–545 (1991).
 36. Lavine_et_al-1990(M-2338).pdf. *Science (80-)*. 338, 899 (2012).
 37. Dawson, D. R., El-Ghannam, A., Van Sickels, J. E. & Naung, N. Y. Tissue

- Engineering - what is new? *Dent. Clin. North Am.* 63, 433–445 (2019).
38. Dong, R., Ma, P. X. & Guo, B. Conductive biomaterials for muscle tissue engineering. *Biomaterials* 229, 119584 (2020).
 39. Anderson, Berg, 2004.pdf. *Miniaturization Chem. Biol. Bioeng.* 4, 98–103 (2004).
 40. Cheung, H.-Y., Lau, K.-T., Lu, T.-P. & Hui, D. A critical review on polymer-based bio-engineered materials for scaffold development. *Compos. Part B Eng.* 38, 291–300 (2007).
 41. Herve Petite*, Veronique Viateau, Wassila Bensaïd, Alain Meunier, Cindy de Pollak, Marianne Bourguignon, Karim Oudina, Laurent Sedel, and G. G. Tissue-engineered bone regeneration. *Herve Petite*, Veronique Viateau, Wassila Bensaïd, Alain Meunier, Cindy de Pollak, Marianne Bourguignon, Karim Oudina, Laurent Sedel, and Genevieve Guillemain* 18, 959–963 (2000).
 42. Won, J.-E. *et al.* Hierarchical microchanneled scaffolds modulate multiple tissue-regenerative processes of immune-responses, angiogenesis, and stem cell homing. *Biomaterials* 227, 119548 (2020).
 43. Ryan, E. J. *et al.* Collagen scaffolds functionalised with copper-eluting bioactive glass reduce infection and enhance osteogenesis and angiogenesis both in vitro and in vivo. *Biomaterials* 197, 405–416 (2019).
 44. Folkman, J. Angiogenesis inhibitors generated by tumors. *Mol. Med.* 1, 120–122 (1995).
 45. Zhou, Y. *et al.* Accelerated host angiogenesis and immune responses by ion release from mesoporous bioactive glass. *J. Mater. Chem. B* 6, 3274–3284 (2018).
 46. Harris, G. M., Rutledge, K., Cheng, Q., Blanchette, J. & Jabbarzadeh, E. Strategies to Direct Angiogenesis within Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Curr. Pharm. Des.* 19, 3456–3465 (2013).
 47. Carmeliet, P. & Jain, R. K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 473, 298–307 (2011).
 48. Senger, D. R. & Davis, G. E. Donald R. Senger 1 and George E. Davis 2 1. 1–19 (2011).
 49. The Angiogenesis Foundation announces. *Wound Repair and Regeneration* 1–3 (2016). doi:10.1111/j.1067-1927.2004.012221b.x
 50. Swift, M. R. & Weinstein, B. M. Arterial–Venous Specification During Development. *Circ. Res.* 104, 576–588 (2009).

51. Judah Folkman, C. C. H. and B. R. Z. Long-term culture of capillary endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. United States Am. - cell Biol.* 76, 5217–5221 (1979).
52. Fernández-torres, J., Martínez-nava, G. A., Gutiérrez-ruíz, M. C., Gómez-quiros, L. E. & Gutiérrez, M. Review article Role of HIF-1 α signaling pathway in osteoarthritis : *Rev. Bras. Ortop. (English Ed.* 57, 162–173 (2016).
53. Sun, M. *et al.* The influences of purple sweet potato anthocyanin on the growth characteristics of human retinal pigment epithelial cells. *Food Nutr. Res.* 59, 1–9 (2015).
54. Wanyin Zhai a, 1, Hongxu Lu b, c, 1, Lei Chen a, Xiaoting Lin b, c, Yan Huang d, Kerong Dai d, Kawazoe Naoki b, c, Guoping Chen b, c,†, J. C. a. Silicate bioceramics induce angiogenesis during bone regeneration *Wanyin.* 8, 341–349 (2012).
55. He, X. *et al.* Rubidium-containing mesoporous bioactive glass scaffolds support angiogenesis, osteogenesis and antibacterial activity. *Mater. Sci. Eng. C* 105, 110155 (2019).
56. Wan, C. *et al.* Activation of the hypoxia-inducible factor-1 α pathway accelerates bone regeneration. (2008).
57. González, R. P. *et al.* Método para o estudo in vivo da angiogênese: indução de neovascularização na córnea de coelho. *Acta Cir. Bras.* 15, 168–173 (2000).
58. Murfee, W. When angiogenesis is not good enough. *J. Physiol.* 595, 1439–1439 (2017).
59. Ikada, Y. Challenges in tissue engineering. *J. R. Soc. Interface* 3, 589–601 (2006).
60. Rakesh K. Jain, Patrick Au, Josh Tam, D. G. D. and D. F. Engineering Vascularized Tissue. *Nat. Biotechnol.* 23, (2005).
61. Gepstein, L. Derivation and Potential Applications of Human Embryonic Stem Cells. *Circ. Res.* 91, 866–876 (2002).
62. A. J. FRIEDENSTEIN, K. . C. N. K. S. L. The development o f. *Development* 3, 393–403 (1970).
63. LINDOLFO DA SILVA MEIRELLES, a ARNOLD I. CAPLAN, b N. B. Nardi. *Meirelles_et_al-2008-STEM_CELLs.pdf.* 26, 2287–2289 (2008).
64. Hipp, J. & Atala, A. Sources of stem cells for regenerative medicine. *Stem Cell Reviews* 4, 3–11 (2008).

65. VALIM, V. D. S. Estudo sobre condições do cultivo de células-tronco mesenquimais para aplicações clínicas. *Journal of Chemical Information and Modeling* 1–58 (2012).
66. Le Blanc, K. & Mougiakakos, D. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 383–396 (2012).
67. Dominici, M. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315–317 (2006).
68. James A. Thomson,* Joseph Itskovitz-Eldor, Sander S. Shapiro, Michelle A. Waknitz, Jennifer J. Swiergiel, Vivienne S. Marshall, J. M. J. & Human. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *SCIENCE* 282, 1145–1148 (1998).
69. Fischbach, G. D. & Fischbach, R. L. Stem cells: Science, policy, and ethics. *Journal of Clinical Investigation* 114, 1364–1370 (2004).
70. Lygia da Veiga Pereira. The importance of the use of stem cells for public health. *Ciência e Saúde Coletiva* 1–7 (2008).
71. Gokhale, P. J. & Andrews, P. W. Human embryonic stem cells: 10 years on. *Lab. Investig.* 89, 259–262 (2009).
72. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* 126, 663–676 (2006).
73. Fauza, D. Amniotic fluid and placental stem cells. *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology* 18, 877–891 (2004).
74. da Silva Meirelles, L., Chagastelles, P. C. & Nardi, N. B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of Cell Science* 119, 2204–2213 (2006).
75. De Coppi, P. *et al.* Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nature Biotechnology* 25, 100–106 (2007).
76. Romanov, Y. A., Darevskaya, A. N., Merzlikina, N. V. & Buravkova, L. B. Mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue: Isolation, characterization, and differentiation potentialities. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 140, 138–143 (2005).
77. Planat-Benard, V. *et al.* Plasticity of Human Adipose Lineage Cells Toward Endothelial Cells. *Circulation* 109, 656–663 (2004).

78. Strem, B. M. *et al.* Expression of cardiomyocytic markers on adipose tissue-derived cells in a murine model of acute myocardial injury. *Cytotherapy* 7, 282–291 (2005).
79. Timper, K. *et al.* Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 341, 1135–1140 (2006).
80. Anghileri, E. *et al.* Neuronal Differentiation Potential of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Dev.* 17, 909–916 (2008).
81. Aurich, H. *et al.* Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from human adipose tissue in vitro promotes hepatic integration in vivo. *Gut* 58, 570–581 (2009).
82. Awad, H. A., Wickham, M. Q., Leddy, H. A., Gimble, J. M. & Guilak, F. Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate, and gelatin scaffolds. *Biomaterials* 25, 3211–3222 (2004).
83. Wei, Y. *et al.* A novel injectable scaffold for cartilage tissue engineering using adipose-derived adult stem cells. *J. Orthop. Res.* 26, 27–33 (2008).
84. Franklin T. Moutos, Ph.D., and Farshid Guilak, P. D. & Articular. Moutos, Guilak et al., 2010.pdf. 16, 1291–1301 (2010).
85. Ye, C. *et al.* PHB/PHBHHx scaffolds and human adipose-derived stem cells for cartilage tissue engineering. *Biomaterials* 30, 4401–4406 (2009).
86. Flynn, L. E., Prestwich, G. D., Semple, J. L. & Woodhouse, K. A. Proliferation and differentiation of adipose-derived stem cells on naturally derived scaffolds. *Biomaterials* 29, 1862–1871 (2008).
87. Heydarkhan-hagvall, S., Schenke-layland, K. & Yang, J. Q. Human Adipose Stem Cells : A Potential Cell Source for. 187, 263–274 (2008).
88. Mizuno, H. Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: Ten years of research and a literature review. *Journal of Nippon Medical School* 76, 56–66 (2009).
89. Cowan, C. M. *et al.* Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects. *Nature Biotechnology* 22, 560–567 (2004).
90. Gabbay, J. S. *et al.* Osteogenic potentiation of human adipose-derived stem cells in a 3-dimensional matrix. *Annals of Plastic Surgery* 57, 89–93 (2006).
91. Hattori, H. *et al.* Bone formation using human adipose tissue-derived stromal cells and a biodegradable scaffold. *Journal of Biomedical Materials Research -*

- Part B Applied Biomaterials* 76, 230–239 (2006).
92. Haimi, S. *et al.* Characterization of zinc-releasing three-dimensional bioactive glass scaffolds and their effect on human adipose stem cell proliferation and osteogenic differentiation. *Acta Biomater.* 5, 3122–3131 (2009).
 93. Gomide, V. S. *et al.* In vitro and in vivo osteogenic potential of bioactive glass–PVA hybrid scaffolds colonized by mesenchymal stem cells. *Biomed. Mater.* 7, 015004 (2012).
 94. MURRAY, 'MARGARET R. & KOPECH, G. A Bibliography of the Research in Tissue Culture. *B. REVIEWS AND J. NOTES* 2, 386–387 (1953).
 95. Thorin, E. & Shreeve, S. M. Heterogeneity of vascular endothelial cells in normal and disease states. *Pharmacology and Therapeutics* 78, 155–166 (1998).
 96. An, N. *et al.* Proliferation, behavior, and cytokine gene expression of human umbilical vascular endothelial cells in response to different titanium surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* 93, 364–372 (2010).
 97. Ferrara, N. *et al.* Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. *Nature Medicine* 4, 336–340 (1998).
 98. Pillay, S., Byrne, H. M. & Maini, P. K. Modeling angiogenesis: A discrete to continuum description. *Physical Review E* 95, (2017).
 99. A DAM J. SINGER , M.D., AND R ICHARD A.F. CLARK, M. D. Mechanisms of Disease F - CUTANEOUS WOUND HEALING. *New Engl. J. Med. Rev.* 341, (1999).
 100. Kirkpatrick2003_Article_ExperimentalApproachesToStudyV.pdf. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 14, 677–681 (2003).
 101. Bianchi, F. *et al.* Microfabrication of fractal polymeric structures for capillary morphogenesis: Applications in therapeutic angiogenesis and in the engineering of vascularized tissue. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials* 81, 462–468 (2007).
 102. Kaji, H., Camci-Unal, G., Langer, R. & Khademhosseini, A. Engineering systems for the generation of patterned co-cultures for controlling cell–cell interactions. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1810, 239–250 (2011).
 103. Karla Lehle, 1 Johannes Buttstaedt, 2 Dietrich E. Birnbaum1. Lehle_ et _al-2003- Journal_of_Biomedical_Materials_Research_Part_A.pdf. *Biocompat. TITANIUM-COATED Polym.* 393–401 (2002).
 104. De, S. *et al.* Plasma treatment of polyurethane coating for improving endothelial

- cell growth and adhesion. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 16, 973–989 (2005).
105. Hench, L. L. The story of Bioglass®. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 17, 967–978 (2006).
 106. HENCH, L. L.; HENCH, J. W.; GREENSPAN, D. C. Bioglass(R): a short history and bibliography. *Mater. Sci.* 40, 1–42 (2004).
 107. Nasser Neto, B. *et al.* O uso do vidro bioativo na terapia regenerativa periodontal: revisão da literatura TT - The use of the bioactive glass in the regenerative periodontal therapy: a literature review. *RSBO* 5, 82–89 (2008).
 108. Guimarães, F. B. A. P., Barrioni, B. R., Oliveira, A. C. X., Oliveira, A. A. R. & Pereira, M. M. Síntese sol-gel de scaffolds porosos de vidro bioativo com adição de agente porogênico. *Cerâmica* 62, 328–337 (2016).
 109. Martins, T. *et al.* Novel 3D composites with highly flexible behavior based on chitosan and bioactive glass for biomedical applications. *Mater. Chem. Phys.* 189, 1–11 (2017).
 110. Mouriño, V., Cattalini, J. P. & Boccaccini, A. R. Metallic ions as therapeutic agents in tissue engineering scaffolds: An overview of their biological applications and strategies for new developments. *J. R. Soc. Interface* 9, 401–419 (2012).
 111. El-Fiqi, A. *et al.* Capacity of mesoporous bioactive glass nanoparticles to deliver therapeutic molecules. *Nanoscale* 4, 7475–7488 (2012).
 112. Hoppe, A., Güldal, N. S. & Boccaccini, A. R. A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. *Biomaterials* 32, 2757–2774 (2011).
 113. AVENELL, J. H. B. A. A. TRACE ELEMENT NUTRITION AND BONE METABOLISM. *Nutr. Resarch Rrvien.s* 167–188 (1992).
 114. Martin, R. A. *et al.* Characterizing the hierarchical structures of bioactive sol–gel silicate glass and hybrid scaffolds for bone regeneration. *Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* 370, 1422–1443 (2012).
 115. Mercier, C., Follet-Houttemane, C., Pardini, A. & Revel, B. Influence of P₂O₅ content on the structure of SiO₂-Na₂O-CaO-P₂O₅ bioglasses by ²⁹Si and ³¹P MAS-NMR. *Journal of Non-Crystalline Solids* 357, 3901–3909 (2011).
 116. Ali, S., Farooq, I. & Iqbal, K. A review of the effect of various ions on the properties and the clinical applications of novel bioactive glasses in medicine and dentistry. *Saudi Dental Journal* 26, 1–5 (2014).

117. Day, R. M. Bioactive Glass Stimulates the Secretion of Angiogenic Growth Factors and Angiogenesis in Vitro. 11, (2005).
118. Evidences, E. of B. G. on A. A. R. of I. V. and I. V. & Alejandro A. Gorustovich, D.D.S., Cert. Perio., Ph.D., 1, 2 Judith A. Roether, M.Sc., Ph.D., 3 and Aldo R. Boccaccini, P. D. . Effect of Bioactive Glasses on Angiogenesis: A Review of In Vitro and In Vivo Evidences. *TISSUE Eng. Part B* 16, 199–207 (2010).
119. BARRIONI, B. R.; OLIVEIRA, A. A. R.; PEREIRA, M. M. The evolution, control, and effects of the compositions of bioactive glasses on their properties and applications. 85–117 (2016).
120. Bolsover, S. R. Calcium signalling in growth cone migration. *Cell Calcium* 37, 395–402 (2005).
121. Zhou, H. *et al.* The bio-functional role of calcium in mesoporous silica xerogels on the responses of osteoblasts in vitro. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 21, 2175–2185 (2010).
122. Marie, P. J. The calcium-sensing receptor in bone cells: A potential therapeutic target in osteoporosis. *Bone* 46, 571–576 (2010).
123. Castiglioni, S., Cazzaniga, A., Albisetti, W. & Maier, J. Magnesium and Osteoporosis: Current State of Knowledge and Future Research Directions. *Nutrients* 5, 3022–3033 (2013).
124. Bose, S., Fielding, G., Tarafder, S. & Bandyopadhyay, A. Trace element doping in calcium phosphate ceramics to understand osteogenesis and angiogenesis. *Trends Biotechnol* 18, 1199–1216 (2013).
125. Wu, C. *et al.* Hypoxia-mimicking mesoporous bioactive glass scaffolds with controllable cobalt ion release for bone tissue engineering. *Biomaterials* 33, 2076–2085 (2012).
126. Yamaguchi, M. Role of nutritional zinc in the prevention of osteoporosis. *Molecular and Cellular Biochemistry* 338, 241–254 (2010).
127. Oki, A., Parveen, B., Hossain, S., Adeniji, S. & Donahue, H. Preparation and in vitro bioactivity of zinc containing sol-gel-derived bioglass materials. *J. Biomed. Mater. Res.* 69A, 216–221 (2004).
128. Kwun, I.-S. *et al.* Zinc deficiency suppresses matrix mineralization and retards osteogenesis transiently with catch-up possibly through Runx 2 modulation. *Bone* 46, 732–741 (2010).
129. Aina, V., Malavasi, G., Fiorio Pla, A., Munaron, L. & Morterra, C. Zinc-

- containing bioactive glasses: Surface reactivity and behaviour towards endothelial cells. *Acta Biomaterialia* 5, 1211–1222 (2009).
130. Santerre, J. P., Woodhouse, K., Laroche, G. & Labow, R. S. Understanding the biodegradation of polyurethanes: From classical implants to tissue engineering materials. *Biomaterials* 26, 7457–7470 (2005).
 131. Simonsen, L. O., Harbak, H. & Bennekou, P. Cobalt metabolism and toxicology—A brief update. *Sci. Total Environ.* 432, 210–215 (2012).
 132. K. E. WALLACE, R.G.HILL Department of Materials Science and Technology, University of Limerick, Limerick, I. E. katherine.wallace@ul.ie & J. T. PEMBROKE Department of Chemical and Environmental Science, University of Limerick, Limerick, Ireland C. J. BROWN Department of Oral Surgery, School of Clinical Dentistry, University of Sheffield, Sheffield, UK P. V. HATTON Department of Restorative Dentistry, U. Influence of sodium oxide content on bioactive glass properties. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 10, 697–701 (1999).
 133. Zhang, M. *et al.* Preparation, characterization and in vitro angiogenic capacity of cobalt substituted β -tricalcium phosphate ceramics. *J. Mater. Chem.* 22, 21686–21694 (2012).
 134. Gu, Y. *et al.* Biodegradable borosilicate bioactive glass scaffolds with a trabecular microstructure for bone repair. *Mater. Sci. Eng. C* 36, 294–300 (2014).
 135. Costa, H. S., Mansur, A. A. P., Pereira, M. M. & Mansur, H. S. Engineered hybrid scaffolds of poly(vinyl alcohol)/bioactive glass for potential bone engineering applications: Synthesis, characterization, cytocompatibility, and degradation. *J. Nanomater.* 2012, (2012).
 136. Depan, D., Venkata Surya, P. K. C., Girase, B. & Misra, R. D. K. Organic/inorganic hybrid network structure nanocomposite scaffolds based on grafted chitosan for tissue engineering. *Acta Biomater.* 7, 2163–2175 (2011).
 137. Boccaccini, A. R. *et al.* Polymer/bioactive glass nanocomposites for biomedical applications: A review. *Compos. Sci. Technol.* 70, 1764–1776 (2010).
 138. Ródenas-Rochina, J., Ribelles, J. L. G. & Lebourg, M. Comparative study of PCL-HAp and PCL-bioglass composite scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 24, 1293–1308 (2013).
 139. Medeiros, E. L. G., Santos, A. M. C., Medeiros, E. S. & Menezes, R. R. Scaffolds de Vidros Bioativos: Desenvolvimento de Estruturas Bioativas Nanoestruturadas. *Rev. eletrônica Mater. e Process.* 12, 152–167 (2017).

140. Novak, B. M. Hybrid Nanocomposite Materials—between inorganic glasses and organic polymers. *Adv. Mater.* 5, 422–433 (1993).
141. Kickelbick, G. Hybrid Materials – Past, Present and Future. *Hybrid Mater.* 1, 39–51 (2014).
142. Clément Sanchez, Beatriz Julián, Philippe Belleville, M. P. Applications of hybrid organic–inorganic nanocomposites. *J. Mater. Chem.* 15, 3559–3592 (2005).
143. Sanchez, C., Belleville, P., Popall, M. & Nicole, L. Applications of advanced hybrid organic–inorganic nanomaterials: from laboratory to market. *Chem. Soc. Rev.* 40, 696 (2011).
144. Aranha, I. B. & Lucas, E. F. Poli(Álcool Vinílico) Modificado com Cadeias Hidrocarbônicas: Avaliação do Balanço Hidrófilo/Lipófilo. *Polímeros* 11, 174–181 (2001).
145. Say, C. A., Earl, D. A. & Thompson, M. J. Optimization of the sintered density of aluminum oxide compacts. *Materials Letters* 53, 262–267 (2002).
146. Kaneo, Y. *et al.* Pharmacokinetics and biodisposition of poly(vinyl alcohol) in rats and mice. *Drug metabolism and pharmacokinetics* 20, 435–442 (2005).
147. Karageorgiou, V. & Kaplan, D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* 26, 5474–5491 (2005).
148. T. V. Thamaraielsi; S.Rajeswari. Biological Evaluation of Bioceramic Materials - a review. *Trends Biomater. Artif. Organs* 18, 9–17 (2004).
149. Andrade, G. I., Barbosa-Stancioli, E. F., Mansur, A. A. P., Vasconcelos, W. L. & Mansur, H. S. Small-angle X-ray scattering and FTIR characterization of nanostructured poly (vinyl alcohol)/silicate hybrids for immunoassay applications. *Journal of Materials Science* 43, 450–463 (2008).
150. Costa, H. S., Mansur, A. A. P., Barbosa-Stancioli, E. F., Pereira, M. M. & Mansur, H. S. Morphological, mechanical, and biocompatibility characterization of macroporous alumina scaffolds coated with calcium phosphate/PVA. *J. Mater. Sci.* 43, 510–524 (2008).
151. Hench, L. L. Bioceramics: From Concept to Clinic. *Journal of the American Ceramic Society* 74, 1487–1510 (1991).
152. Mansur, H. S., Oréfice, R. L. & Mansur, A. A. P. Characterization of poly(vinyl alcohol)/poly(ethylene glycol) hydrogels and PVA-derived hybrids by small-angle X-ray scattering and FTIR spectroscopy. *Polymer* 45, 7193–7202 (2004).

153. Bandyopadhyay, A., De Sarkar, M. & Bhowmick, A. K. Structure-property relationship in sol-gel derived polymer/silica hybrid nanocomposites prepared at various pH. *Journal of Materials Science* 41, 5981–5993 (2006).
154. Pereira, M. M., Al-Saffar, N., Selvakumaran, J. & Hench, L. L. Cytotoxicity evaluation of bioactive glass-polyvinyl alcohol hybrid foams prepared by the sol-gel method. *Key Engineering Materials* 284–286, 589–592 (2005).
155. Shahgholi, M. *et al.* Mechanical characterization of glass-ceramic scaffolds at multiple characteristic lengths through nanoindentation. *J. Eur. Ceram. Soc.* 36, 2403–2409 (2016).
156. Midha, S. *et al.* Preconditioned 70S30C bioactive glass foams promote osteogenesis in vivo. *Acta Biomater.* 9, 9169–9182 (2013).
157. Wang, X. sheng, Lu, Z. lin, Jia, L. & Chen, J. xian. Preparation of porous titanium materials by powder sintering process and use of space holder technique. *Journal of Iron and Steel Research International* 24, 97–102 (2017).
158. Sankar, K. S., Altamentova, S. M. & Rocheleau, J. V. Hypoxia induction in cultured pancreatic islets enhances endothelial cell morphology and survival while maintaining beta-cell function. *PLoS One* 14, e0222424 (2019).
159. Boldbaatar, K. *et al.* Dual-ion delivery for synergistic angiogenesis and bactericidal capacity with silica-based microsphere. *Acta Biomater.* 83, 322–333 (2019).
160. Kota, S., Charaka, V. K. & Misra, H. S. PprA, a pleiotropic protein for radioresistance, works through DNA gyrase and shows cellular dynamics during postirradiation recovery in *Deinococcus radiodurans*. *J. Genet.* 93, 349–354 (2014).
161. Osaili, T. M., Al-Nabulsi, A. A., Aljaafreh, T. F. & Olaimat, A. N. Use of gamma radiation to inactivate stressed *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in tahini halva. *Lwt* 98, 438–443 (2018).
162. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63 (1983).
163. Chen, Y., Chen, S., Kawazoe, N. & Chen, G. Promoted Angiogenesis and Osteogenesis by Dexamethasone-loaded Calcium Phosphate Nanoparticles/Collagen Composite Scaffolds with Microgroove Networks. *Sci. Rep.* 8, 1–12 (2018).

164. Michael W. Pfaffl*, G. W. H. and L. D. & Institute. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucl. acids Res.* 30, 10 (2002).
165. Ribeiro Neto, W. A. *et al.* Poly (butylene adipate-co-terephthalate)/hydroxyapatite composite structures for bone tissue recovery. *Polym. Degrad. Stab.* 120, 61–69 (2015).
166. Ribeiro Souto, G., Queiroz, C. M., Nogueira Guimarães De Abreu, M. H., Oliveira Costa, F. & Alves Mesquita, R. Pro-inflammatory, Th1, Th2, Th17 cytokines and dendritic cells: A cross-sectional study in chronic periodontitis. *PLoS One* 9, (2014).
167. Alves, D. P. *et al.* Inflammation mobilizes local resources to control hyperalgesia: The role of endogenous opioid peptides. *Pharmacology* 89, 22–28 (2012).
168. El-Kady, A. M. & Ali, A. F. Fabrication and characterization of ZnO modified bioactive glass nanoparticles. *Ceram. Int.* 38, 1195–1204 (2012).
169. Siqueira, R. L. & Zanotto, E. D. The influence of phosphorus precursors on the synthesis and bioactivity of SiO₂-CaO-P₂O₅ sol-gel glasses and glass-ceramics. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 24, 365–379 (2013).
170. Pirayesh, H. & Nychka, J. A. Sol-gel synthesis of bioactive glass-ceramic 45S5 and its in vitro dissolution and mineralization behavior. *J. Am. Ceram. Soc.* 96, 1643–1650 (2013).
171. Gentleman, E. *et al.* The effects of strontium-substituted bioactive glasses on osteoblasts and osteoclasts in vitro. *Biomaterials* 31, 3949–3956 (2010).
172. Moreira, C. D. F., Carvalho, S. M., Mansur, H. S. & Pereira, M. M. Thermogelling chitosan-collagen-bioactive glass nanoparticle hybrids as potential injectable systems for tissue engineering. *Mater. Sci. Eng. C* 58, 1207–1216 (2016).
173. Che, H., Liu, A., Fu, Q. & Jiang, R. Facile synthesis of porous cobalt oxide microdiscs and their catalytic property in CO oxidation. *Mater. Lett.* 93, 240–242 (2013).
174. Andrade, Â. L. & Domingues, R. Z. Cerâmicas bioativas - Estado da arte. *Quim. Nova* 29, 100–104 (2006).
175. Rahaman, M. N. *et al.* Bioactive glass in tissue engineering. *Acta Biomater.* 7, 2355–2373 (2011).

176. Fernandes, H. R. *et al.* Bioactive glasses and glass-ceramics for healthcare applications in bone regeneration and tissue engineering. *Materials (Basel)*. 11, 1–54 (2018).
177. Vandekeere, S., Dewerchin, M. & Carmeliet, P. Angiogenesis Revisited: An Overlooked Role of Endothelial Cell Metabolism in Vessel Sprouting. *Microcirculation* 22, 509–517 (2015).
178. Lamalice, L., Le Boeuf, F. & Huot, J. Endothelial cell migration during angiogenesis. *Circ. Res.* 100, 782–794 (2007).
179. Peter Libby, MD, a Joseph Loscalzo, MD, PHD, a Paul M Ridker, MD, MPH, a Michael E. Farkouh, MD, MSC, B. & Priscilla Y. Hsue, MD, PHD, c Valentin Fuster, MD, PHD, d Ahmed A. Hasan, MD, PHD, e Salomon Amar, DDS, PhD. Inflammation, Immunity, and Infection in Atherothrombosis. 72, (2018).
180. Campos, A. C. L., Borges-branco, A. & Groth, A. K. meu tcc parece igual Wound healing. *Arq. Bras. Cir. Dig.* 20, 51–58 (2007).
181. Haro Durand, L. A. *et al.* In vitro human umbilical vein endothelial cells response to ionic dissolution products from lithium-containing 45S5 bioactive glass. *Materials (Basel)*. 10, (2017).
182. Fleury, C. *et al.* Effect of cobalt and chromium ions on human MG-63 osteoblasts in vitro: Morphology, cytotoxicity, and oxidative stress. *Biomaterials* 27, 3351–3360 (2006).
183. Daou, S. *et al.* The potential role of cobalt ions released from metal prosthesis on the inhibition of Hv1 proton channels and the decrease in Staphylococcus epidermidis killing by human neutrophils. *Biomaterials* 32, 1769–1777 (2011).
184. Patntirapong, S., Habibovic, P. & Hauschka, P. V. Effects of soluble cobalt and cobalt incorporated into calcium phosphate layers on osteoclast differentiation and activation. *Biomaterials* 30, 548–555 (2009).
185. Wang, X. J. *et al.* Astaxanthin inhibits homocysteine-induced endothelial cell dysfunction via the regulation of the reactive oxygen species-dependent VEGF - VEGFR2-FAK signaling pathway. *Mol. Med. Rep.* 19, 4753–4760 (2019).
186. Egidi, M. G. *et al.* Stability assessment of candidate reference genes in urine sediment of prostate cancer patients for miRNA applications. *Dis. Markers* 2015, (2015).
187. Derveaux, S., Vandesompele, J. & Hellemans, J. How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. *Methods* 50, 227–230 (2010).

188. Zhang, Q. *et al.* ACE2 inhibits breast cancer angiogenesis via suppressing the VEGFa/VEGFR2/ERK pathway. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 38, 1–12 (2019).
189. Tanaka, T. *et al.* ETV2-TET1/TET2 Complexes Induce Endothelial Cell-Specific Robo4 Expression via Promoter Demethylation. *Sci. Rep.* 8, 1–10 (2018).
190. Anderson, J. M., Rodriguez, A. & Chang, D. T. Foreign body reaction to biomaterials. *Semin. Immunol.* 20, 86–100 (2008).
191. Holzapfel, B. M. *et al.* How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65, 581–603 (2013).
192. Costa, H. S. *et al.* Sol–gel derived composite from bioactive glass–polyvinyl alcohol. *J. Mater. Sci.* 43, 494–502 (2008).
193. Santos, J. E. dos. Preparação, caracterização e estudos termoanalíticos de bases de shift biopoliméricas e seus complexos de cobre. *Departamento De Química Programa De Pós-Graduação Em Química Preparação* 124 (2004).
194. P. Wu, E.A. Nelson, W.H. Reid*, C. V. R. and J. D. S. G. Water vapour transmission rates in burns and chronic leg ulcers: influence of wound dressings and comparison with in vitro evaluation. *Biomaterials* 17, 1373–1377 (1996).
195. Maçon, A. L. B. *et al.* A unified in vitro evaluation for apatite-forming ability of bioactive glasses and their variants. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 26, 1–10 (2015).
196. Kokubo, T. & Takadama, H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials* 27, 2907–2915 (2006).
197. Farano, V. *et al.* Bioactivity evaluation of collagen-based scaffolds containing a series of Sr-doped melt-quench derived phosphate-based glasses. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 29, (2018).
198. Xu, M., Zhai, D., Chang, J. & Wu, C. In vitro assessment of three-dimensionally plotted nagelschmidite bioceramic scaffolds with varied macropore morphologies. *Acta Biomater.* 10, 463–476 (2014).
199. Haridas, D. *et al.* Laboratory growth of denitrifying water column microbial consortia from deep-sea shipwrecks in the northern Gulf of Mexico. *Frontiers in Microbiology* 9, 1834 (2018).
200. Addis, R. *et al.* Human umbilical endothelial cells (HUVECs) have a sex: Characterisation of the phenotype of male and female cells. *Biol. Sex Differ.* 5, 1–12 (2014).
201. Jones, J. R. Review of bioactive glass: From Hench to hybrids. *Acta Biomater.* 9, 4457–4486 (2013).

202. Holland, B. J. & Hay, J. N. The thermal degradation of poly(vinyl alcohol). *Polymer* 42, 6775–6783 (2001).
203. Atkinson, I. *et al.* Influence of ZnO addition on the structural, in vitro behavior and antimicrobial activity of sol–gel derived CaO–P₂O₅–SiO₂ bioactive glasses. *Ceram. Int.* 42, 3033–3045 (2016).
204. Serra, J. *et al.* FTIR and XPS studies of bioactive silica based glasses. *J. Non. Cryst. Solids* 332, 20–27 (2003).
205. Cecilia, J. A., Moreno Tost, R. & Retuerto Millán, M. Mesoporous Materials: From Synthesis to Applications. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 3213 (2019).
206. Rabiee, S. M., Nazparvar, N., Azizian, M., Vashae, D. & Tayebi, L. Effect of ion substitution on properties of bioactive glasses: A review. *Ceram. Int.* 41, 7241–7251 (2015).
207. Lins, C. E. C., De Carvalho, S. M., De Oliveira, A. A. R. & De Magalhães Pereira, M. Application of fluorine containing bioactive glass nanoparticles in dentin hypersensitivity treatment. *Key Eng. Mater.* 696, 103–107 (2016).
208. Abbasi, Z., Bahrololum, M. E., Shariat, M. H. & Bagheri, R. Bioactive Glasses in Dentistry : A Review. *J. Glas. Dent. A Rev.* 2, 1–9 (2015).
209. Baino, F., Hamzehlou, S. & Kargozar, S. Bioactive glasses: Where are we and where are we going? *J. Funct. Biomater.* 9, (2018).
210. Shah, F. A., Brauer, D. S., Hill, R. G. & Hing, K. A. Apatite formation of bioactive glasses is enhanced by low additions of fluoride but delayed in the presence of serum proteins. *Mater. Lett.* 153, 143–147 (2015).
211. Zhang, D. *et al.* Fabrication of platinum-loaded cobalt oxide/molybdenum disulfide nanocomposite toward methane gas sensing at low temperature. *Sensors Actuators, B Chem.* 252, 624–632 (2017).
212. Kuboki, Y. *et al.* BMP-induced osteogenesis on the surface of hydroxyapatite with geometrically feasible and nonfeasible structures: Topology of osteogenesis. *J. Biomed. Mater. Res.* 39, 190–199 (1998).
213. Story, B. J., Wagner, W. R., Gaisser, D. M., Cook, S. D. & Rust-Dawicki, A. M. In vivo performance of a modified CSTi dental implant coating. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 13, 749–57 (1998).
214. Lulevich, V., Yang, H. ya, Isseroff, R. R. & Liu, G. yu. Single cell mechanics of keratinocyte cells. *Ultramicroscopy* 110, 1435–1442 (2010).
215. Murphy, C. M., Haugh, M. G. & O'Brien, F. J. The effect of mean pore size on

- cell attachment, proliferation and migration in collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 31, 461–466 (2010).
216. Ignjatovic, N. *et al.* Synthesis and properties of hydroxyapatite/poly-L-lactide composite biomaterials. *Biomaterials* 20, 809–816 (1999).
217. Oki, A., Qiu, X., Alawode, O. & Foley, B. Synthesis of organic-inorganic hybrid composite and its thermal conversion to porous bioactive glass monolith. *Mater. Lett.* 60, 2751–2755 (2006).
218. Vyas, V. K., Kumar, A. S., Sunil, P., Singh, S. P. & Pyare, R. Bioactivity and mechanical behaviour of cobalt oxide-doped bioactive glass. *Bull. Mater. Sci.* 38, 957–964 (2015).
219. Gibson, L. J. Biomechanics of cellular solids. *J. Biomech.* 38, 377–399 (2005).
220. Montjovent, M. *et al.* Biocompatibility of Bioresorbable Poly(L-lactic acid) Composite Scaffolds Obtained by Supercritical Gas Foaming with Human Fetal Bone Cells. *Tissue Eng.* 11, 1640–1649 (2005).
221. Goel, A., Rajagopal, R. R. & Ferreira, J. M. F. Influence of strontium on structure, sintering and biodegradation behaviour of CaO-MgO-SrO-SiO₂-P₂O₅-CaF₂ glasses. *Acta Biomater.* 7, 4071–4080 (2011).
222. De Oliveira, A. A. R. *et al.* Synthesis, characterization and cytocompatibility of spherical bioactive glass nanoparticles for potential hard tissue engineering applications. *Biomed. Mater.* 8, (2013).
223. Souza, L. *et al.* Comprehensive in vitro and in vivo studies of novel melt-derived Nb-substituted 45S5 bioglass reveal its enhanced bioactive properties for bone healing. *Sci. Rep.* 8, 1–15 (2018).
224. Costa, H. S., Stancioli, E. F. B., Pereira, M. M., Oréface, R. L. & Mansur, H. S. Synthesis, neutralization and blocking procedures of organic/inorganic hybrid scaffolds for bone tissue engineering applications. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 20, 529–535 (2009).
225. Türker, N. S. *et al.* The effect of gamma radiation sterilization on dental biomaterials. *Tissue Eng. Regen. Med.* 11, 341–349 (2014).
226. Hamouda. Current perspectives of nanoparticles in medical and dental biomaterials. *J. Biomed. Res.* 26, (2012).
227. Nieminen, T. *et al.* In vivo and in vitro degradation of a novel bioactive guided tissue regeneration membrane. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 35, 727–732 (2006).

228. Khurshid, S. J. Bioburden and Theoretical Sterility Dose Calculation for Radiation Sterilization of Surgical Cotton and Bandages. 43, 1–5 (1993).
229. Karen K. Hirschi, P. A. D. A. '. Pericytes in the microvasculature Karen. *Cardiovasc. Res.* 32, 687–698 (1996).
230. Ciocca, G. A. P. Isolamento, proliferação e caracterização de pericitos originados de placentas humanas. 1–17 (2008).

Capítulo 9 . ANEXOS**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS****CEUA**
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 22/2018

Título do projeto: Avaliação Estrutural e Citotóxica de Vidros Bioativos contendo Cobalto como Estratégia Potencial para Engenharia de Tecidos

Finalidade: Pesquisa

Pesquisador responsável: Marcos Augusto de Sa

Unidade: Instituto de Ciências Biológicas

Departamento: Departamento de Morfologia

Situação atual: [Decisão Final - Aprovado](#)

Aprovado com recomendação na reunião do dia 07/05/2018. Validade: 07/05/2018 à 06/05/2023

Prezado(a) pesquisador(a) o biotério onde sua pesquisa será realizada não está com cadastro e credenciamento finalizado no novo site do CIUCA/CONCEA. Solicitamos informar ao responsável pelo biotério para concluir o cadastro, porque em breve somente poderemos aprovar os que estiverem devidamente cadastrados e credenciados.

Belo Horizonte, 07/05/2018.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516

www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br