

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 30/09/2023.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Efeitos parácrinos e metabólicos do meio enriquecido com cobalto em células endoteliais e osteoblastos

Suelen Aparecida Teixeira

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências, Campus de Botucatu, UNESP,
para obtenção do título de Mestre pelo
Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia.

Prof. Dr. Willian Fernando Zambuzzi

BOTUCATU – SP
2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Efeitos parácrinos e metabólicos do meio enriquecido com cobalto em células endoteliais e osteoblastos

Suelen Aparecida Teixeira

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências, Campus de Botucatu, UNESP,
para obtenção do título de Mestre pelo
Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia.

Prof. Dr. Willian Fernando Zambuzzi

BOTUCATU – SP
2022

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Teixeira, Suelen Aparecida.

Efeitos parácrinos e metabólicos do meio enriquecido com cobalto em células endoteliais e osteoblastos / Suelen Aparecida Teixeira. - Botucatu, 2022

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Willian Fernando Zambuzzi

Capes: 90300009

1. Cobalto. 2. Ligas de cromo. 3. Hipóxia. 4. Células endoteliais. 5. Osteointegração. 6. Osteoblastos.

Palavras-chave: Cobalto; Hipóxia; Liga de cobalto cromo; Osteointegração.

AGRADECIMENTOS:

Agradeço primeiramente ao meu pai, que sozinho me criou para lidar com o mundo;

Agradeço a todos os meus professores que tive até aqui, que me deram base para conhecer e entender como tudo funciona;

Agradeço a doutora Adele Caterino-de-Araújo, minha orientadora de iniciação científica, que foi quem me apresentou a pesquisa e o universo de possibilidades que ela pode conter;

Agradeço ao meu atual orientador Willian Fernando Zambuzzi por ter me guiado por esse caminho do mestrado, em meio a uma pandemia e com tantas coisas para lidar;

Agradeço ao Célio pelo grande apoio e execução das técnicas laboratoriais;

Agradeço imensamente aos meus colegas de laboratório, não só pela contribuição pelo projeto, como por todas as vezes que me fizeram sorrir. Foram anos atípicos, mas com a presença de todos pude seguir e me redescobrir, como pessoa e como profissional;

A FAPESP: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (2019/26854-2);

A CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes);

Ao CNPQ: Centro Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

“Para cultivar a sabedoria, é preciso força interior. Sem crescimento interno, é difícil conquistar a autoconfiança e a coragem necessárias. Sem elas, nossa vida se complica. O impossível torna-se possível com a força de vontade”.

(Dalai Lama)

SUMÁRIO

CAPITULO 1

INTRODUÇÃO.....	13
MICROAMBIENTE ÓSSEO.....	14
BIOMATERIAIS	17
LIGA CoCr.....	20
ANGIOGÊNESE.....	22
OBJETIVO	24

CAPITULO 2

Metabolic effects of CoCr-enriched medium on shear-stressed endothelial cell and osteoblasts: a possible mechanism involving a hypoxic condition on bone healing.....	25
INTRODUCTION.....	27
MATERIAL AND METHODS.....	28
RESULTS.....	33
DISCUSSION.....	42
REFERENCES	45
DISCUSSÃO.....	54
REFERÊNCIAS	57

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO 1

Fig.1. Esquema do microambiente ósseo demonstrando estrutura e tipos celulares.....	15
Fig.2. Evolução da funcionalidade e da capacidade regenerativa dos biomateriais.....	18
Fig.3. Esquema do microambiente arterial demonstrando a estrutura e o tipo celular utilizado	23

CAPITULO 2

Fig.1. Schematization of the experimental design performed in this study	31
Fig.S1. Differences in Co concentration in the culture medium	32
Fig.2. CoCr-enriched medium modulates the expression of genes involved with angiogenesis	33
Fig.3. Protein carbonylation of endothelial cells subjected to Co-Cr-enriched medium	34
Fig.4. Pivotal marker genes in osteogenic differentiation were evaluated.....	35
Fig.5. ECM remodeling-related genes	37
Fig.6. Gelatinolytic activities were measured by zymography	38

LISTA DE TABELAS

CAPITULO 2

Tabela 1. Primers sequences and quantitative polymerase chain reaction cycle conditions	33
---	----

LISTA DE ABREVIACÕES

AKT - serine/threonine protein kinase

ALP – Fosfatase alcalina

ANOVA – Análise de variância

ARMD – Adverse reaction to metal debris

BMU's – Basic Multicellular Units

BSP - Bone sialoprotein

CaCl₂ – Cloreto de cálcio

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior

cDNA – fita complementar de ácido desoxiribonucleico

CNPq – Conselho nacional de desenvolvimento científico e tecnológico

Co - Cobalto

CoCr – Liga Cobalto-Cromo

Col1a1 – Cadeia alpha 1 de colágeno tipo 1

Col3a1 – Cadeia alpha 3 de colágeno tipo 1

Cr - Cromo

Ctrl - Control

DAE - Dual Acid-Etched

DNA – Ácido desoxiribonucleico

DNPH - 2,4-Dinitrophenylhydrazine

ECM - Extracellular matrix

eNOS - Endothelial nitric oxide synthase

FAPESP – Fundação de amparo à pesquisa do estado de São Paulo

FBS – Fetal Serum Bovine

GAPDH – Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

GFAAS - Graphite furnace atomic absorption spectrometry

HIF – Fator induzível por hipoxia

HIF1 α - Fator induzível por hypoxia 1 alfa

HIF2 α - Fator induzível por hypoxia 2 alfa

HUVEC – Human umbilical vein endothelial cells

MC3T3-E1 – Pre-osteoblasts cell

MMP2 – metalloproteinase 2

MMP9 – metalloproteinase 9

MMPs - metalloproteinases

MOM – Metal-on-metal

mRNA - Messenger ribonucleic acid

nNOS - neural nitric oxide synthase

OM –Osteogenic Medium

Osterix - transcription factor for osteoblast differentiation

qPCR – quantitative real time Polymerase Chain Reaction

ROS – Reative oxygen stress

RUNX2 - Runt-related transcription factor 2

SUS – Sistema único de saúde

Ti - Titanium

TIMP1 - metallopeptidase inhibitor 1

TIMP2 - metallopeptidase inhibitor 2

VEGF - Vascular endothelial growth factor

W – with

Wo – without

RESUMO

As ligas à base de cobalto-cromo (CoCr) surgiram como um biomaterial interessante acerca do campo biomédico, principalmente considerando sua biocompatibilidade, resistência à corrosão e ausência de magnetismo; entretanto, seu efeito no metabolismo celular é pouco conhecido e isso nos levou a avaliar melhor se o meio enriquecido com CoCr afeta o metabolismo tanto de osteoblastos quanto de células endoteliais, e também se há um acoplamento entre elas. Também foi considerado aqui o efeito já conhecido do Cobalto (Co) como um elemento hipóxico, estabelecendo um modelo *in vitro* importante. Discos de CoCr foram incubados em meio de cultura livre de Soro Fetal Bovino (FBS) por 24 horas. Este meio enriquecido com CoCr foi utilizado para tratar culturas de células endoteliais sob tensão de cisalhamento por 72 horas. Depois disso, o meio condicionado contendo metabólitos de células endoteliais foi ainda utilizado para submeter as culturas de osteoblastos, quando as amostras foram adequadamente colhidas para permitir a análise moleculares. Nossos dados mostram que o meio enriquecido com CoCr contém 1,5-2,0ng/mL de Co, que foi capturado pelas células endoteliais e osteoblastos em cerca de 30% em quantidade e parece modular suas vias metabólicas: as células endoteliais expressaram maior perfil dos genes HIF1 α , VEGF e nNOS, enquanto seu perfil global de carbonilação proteica foi inferior ao das culturas de controle, sugerindo menor comprometimento com o estresse oxidativo. Além disso, os osteoblastos respondendo aos metabólitos das células endoteliais com CoCr apresentam expressão dinâmica dos genes marcadores na diferenciação osteogênica, como genes da fosfatase alcalina (ALP), osteocalcina e sialoproteína óssea (BSP), estando significativamente aumentados. Além disso, as forças de tensão de cisalhamento diminuem o estímulo à expressão do ColA1 gene nos osteoblastos respondendo aos metabólitos das células endoteliais, bem como modulação importante de genes relacionados à remodelação da matriz extracelular. Por fim, analisando as atividades das metaloproteinases de matriz (MMPs), os dados mostram que os metabólitos das células endoteliais com tensão de cisalhamento aumentam as atividades tanto do MMP9 quanto do MMP2 nos osteoblastos. Ao todo, nossos dados mostram pela primeira vez que os metabólitos de células endoteliais respondendo aos discos CoCr contribuem para o fenótipo osteogênico *in vitro*, e isto prediz uma interação ativo entre a angiogênese e a osteogênese durante a osseointegração da liga CoCr, podendo ser relacionada em mecanismos de regeneração do osso, guiado pela condição de hipóxia experimental provocado pelo cobalto.

ABSTRACT

Cobalt-chromium (CoCr)-based alloys have emerged as an interesting biomaterial within biomedical field, mainly considering their biocompatibility, resistance to corrosion and absence of magnetism; however, its effect on cell metabolism is barely known and this prompted us better evaluating whether CoCr-enriched medium affects the metabolism of both osteoblast and endothelial cells, and also if there is a coupling between them. This is also considered here the already-known effect of Cobalt (Co) as a hypoxic element. Firstly, discs of CoCr [subjecting (W) or not (Wo) to dual acid-etched (DAE)] were incubated into FBS-free cell culture medium up to 24 hours (37°C). This CoCr-enriched medium was further used to treat shear-stressed endothelial cells cultures up to 72 hours. Thereafter, the conditioned medium containing metabolites of shear-stressed endothelial cells in response to CoCr-enriched medium was further used to subject osteoblast's cultures, when the samples were properly harvested to allow the analysis of the molecular issues. Our data shows that CoCr-enriched medium contains 1.5-2.0ng/mL of Co, which was captured by endothelial cells and osteoblasts in about 30% in amount and it seems modulate their metabolic pathways: shear-stressed endothelial cells expressed higher profile of HIF1 α , VEGF and nNOS genes, while their global profile of protein carbonylation was lower than the control cultures, suggesting lower oxidative stress commitment. Additionally, osteoblasts responding to metabolites of CoCr-challenged endothelial cells show dynamic expression of marker genes in osteogenic differentiation, with alkaline phosphatase (ALP), osteocalcin, and bone sialoprotein (BSP) genes being significantly increased. Additionally, tensional shear-stress forces decrease the stimulus for ColA1 gene expression in osteoblasts responding to endothelial cells metabolites, as well as modifying the extracellular matrix remodeling related genes. Analyzing the activities of matrix metalloproteinases (MMPs), the data shows that shear-stressed endothelial cells metabolites increase the activities of both MMP9 and MMP2 in osteoblasts. Altogether, our data shows for the first time that shear-stressed endothelial metabolites responding to CoCr discs contribute to osteogenic phenotype in vitro, and this predicts an active crosstalk between angiogenesis and osteogenesis during osseointegration of CoCr alloy and bone healing, maybe guided by the Co-induced hypoxic condition.

CAPITULO 1

INTRODUÇÃO

Visando uma melhor compreensão do microambiente peri-implante, é importante ressaltar o processo de osteointegração, o qual leva em conta mecanismos celulares e moleculares ao redor do implante. Parte dos mecanismos deste processo remetem a osteogênese original, e é responsável por conectar à superfície do implante ao tecido ósseo. Para que isso ocorra de maneira eficiente, a superfície do implante deve possuir características que estimulem respostas biológicas adequadas, e que favoreçam o processo de ancoragem das células ósseas em sua superfície, permitindo a síntese e mineralização correta da matriz, garantindo assim a homeostase do tecido. Contudo, para que se chegue no estágio final de cicatrização, ocorrem vários eventos a partir da colocação cirúrgica do implante. Neste processo, ocorre a ruptura de vasos locais e o contato direto do sangue do paciente com o implante. A superfície implantar é recoberta por proteínas séricas, que permitem ativação de plaquetas e fibrinas, criando um coágulo sanguíneo. Vale ressaltar que um ambiente rico em plaquetas disponibiliza uma alta concentração de fatores de crescimento, sendo favorável ao desenvolvimento ósseo (BRESSAN; UNIVERSIDADE, 2019; OLIVEIRA, 2010; SILVA et al., 2016).

Posteriormente, ocorrerá o recrutamento de células inflamatórias e células tronco mesenquimais, que liberam enzimas para quebra dirigida do coágulo. Neste contexto, há liberação de diversos fatores presentes no coágulo o qual torna o microambiente biocompatível, permitindo assim a adesão das células tronco mesenquimais e, por meio da interação de uma infinidade de vias de sinalização, ocorre a diferenciação celular com desfecho osteogênico. Uma vez diferenciada, estas células assumem fenótipo de osteoblastos, ocorrendo a deposição de fosfato de cálcio na matriz extracelular pre-sintetizada, realizando-se então o processo de mineralização. Acoplado a isso, o mecanismo da angiogênese se desenrola formando novos vasos para o transporte de nutrientes até o tecido em desenvolvimento. Da visão histológica, células endoteliais tem um forte papel na regulação de osteoblastos e consequentemente no crescimento e remodelamento ósseo. Assim, cabe destacar que o microambiente periimplantar requer a interação de células endoteliais e células ósseas, envolvendo mecanismos celulares e moleculares integrados e que favorece e dirige a osseointegração (BRESSAN; UNIVERSIDADE, 2019; OLIVEIRA, 2010; SILVA et al., 2016).

REFERÊNCIAS

- ABE, J.; BERK, B. C. Novel mechanisms of endothelial mechanotransduction. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 34, n. 11, p. 2378–86, nov. 2014.
- ACCORSI-MENDONÇA, T. et al. Expression of matrix metalloproteinases-2 and -9 and RECK during alveolar bone regeneration in rat. **Journal of molecular histology**, v. 39, n. 2, p. 201–208, abr. 2008.
- AFONSO, S. Biomateriais E. 1998.
- ALBREKTSSON, T. et al. Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. **Acta orthopaedica Scandinavica**, v. 52, n. 2, p. 155–170, 1981.
- ALBUQUERQUE, D. F. UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE-UFRN CENTRO DE BIOCÊNCIAS-CB PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ESTRUTURAL E FUNCIONAL-PPGBioEF EFEITO DA FOTOBIMODULAÇÃO NA PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE DE CÉLULAS ENDOTELIAIS DA VEIA UMBILICAL HUMANA (HUVEC. 2019.
- ALLEN, M. J. et al. THE EFFECTS OF PARTICULATE COBALT, CHROMIUM AND COBALT-CHROMIUM ALLOY ON HUMAN OSTEOBLAST-LIKE CELLS IN VITRO. <https://doi.org/10.1302/0301-620X.79B3.0790475>, v. 79-B, n. 3, p. 475–482, 1 maio 1997.
- ARIAS, C. F. et al. Bone remodeling: A tissue-level process emerging from cell-level molecular algorithms. **PLoS ONE**, v. 13, n. 9, 2018.
- AZEVEDO, V. V. C. et al. Materiais cerâmicos utilizados para implantes. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 1, p. 31–39, 2008.
- BARCELOUX, D. G. **CobaltJournal of Toxicology - Clinical Toxicology**, 1999.
- BARONCELLI, M. et al. Human mesenchymal stromal cells in adhesion to cell-derived extracellular matrix and titanium: Comparative kinome profile analysis. **Journal of cellular physiology**, v. 234, n. 3, p. 2984–2996, mar. 2019.
- BARUAH, J.; WARY, K. K. Exosomes in the Regulation of Vascular Endothelial Cell Regeneration. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 7, p. 353, jan. 2019.
- BEBER, G. M. M. **Interação músculo-osso: papel do IGF-1 de origem muscular no esqueleto**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2021.
- BEZERRA, F. et al. Nano hydroxyapatite-blasted titanium surface affects pre-osteoblast morphology by modulating critical intracellular pathways. **Biotechnology and**

Bioengineering, v. 114, n. 8, p. 1888–1898, 1 ago. 2017.

BLANK, M.; SIMS, N. A. Cellular Processes by Which Osteoblasts and Osteocytes Control Bone Mineral Deposition and Maturation Revealed by Stage-Specific EphrinB2 Knockdown. **Current Osteoporosis Reports**, v. 17, n. 5, p. 270–280, 2019.

BRANEMARK, P. I. et al. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. **Scandinavian journal of plastic and reconstructive surgery. Supplementum**, v. 16, p. 1–132, 1977.

BRESSAN, J.; UNIVERSIDADE, M. Novas Abordagens No. 2019.

BRUCE ALBERTS, DENNIS BRAY, KAREN HOPKIN, ALEXANDER JOHNSON, JULIAN LEWIS, MARTIN RAFF, KEITH ROBERTS, P. W. **Fundamentos da Biologia Celular**. [s.l: s.n.].

CARDOSO, A. C. F. Consequências da exposição de células de melanoma ao shear stress para o remodelamento da microvasculatura intratumoral Consequências da exposição de células de melanoma ao shear stress para o remodelamento da microvasculatura intratumoral. p. 86, 2018.

CHEN, F.-M.; LIU, X. Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering. **Progress in polymer science**, v. 53, p. 86–168, fev. 2016a.

CHEN, F. M.; LIU, X. **Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering** **Progress in Polymer Science** Elsevier Ltd, , 1 fev. 2016b.

CHIM, S. M. et al. EGFL7 Is Expressed in Bone Microenvironment and Promotes Angiogenesis via ERK, STAT3, and Integrin Signaling Cascades. **Journal of Cellular Physiology**, v. 230, n. 1, p. 82–94, 1 jan. 2015.

COSTA FERNANDES, C. J. DA; ZAMBUZZI, W. F. Fibroblast-secreted trophic factors contribute with ECM remodeling stimulus and upmodulate osteocyte gene markers in osteoblasts. **Biochimie**, v. 168, p. 92–99, jan. 2020.

COSTA, J. H. A. et al. Perfil Dos Pacientes Submetidos Ao Tratamento Cirúrgico Para Fraturas Do Fêmur Proximal E Seu Impacto Econômico Na Saúde Pública Do Estado De São Paulo. **Journal of Medical Resident Research**, v. 1, n. 1, p. 27–32, 2021.

CRUZ, OLGA MARTIZ. INTER, X. M. Cruz, Iter 2017. **Managing technologies**, p. 47, 2017.

CS, M. et al. Simplified 2,4-dinitrophenylhydrazine spectrophotometric assay for quantification of carbonyls in oxidized proteins. **Analytical biochemistry**, v. 458, p. 69–71, ago. 2014.

DA COSTA FERNANDES, C. J. et al. Titanium-enriched medium drives low profile of

ECM remodeling as a pre-requisite to pre-osteoblast viability and proliferative phenotype. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 50, n. February, p. 339–346, 2018a.

DA COSTA FERNANDES, C. J. et al. Titanium-enriched medium drives low profile of ECM remodeling as a pre-requisite to pre-osteoblast viability and proliferative phenotype. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, 2018b.

DA COSTA FERNANDES, C. J. et al. Zirconia stimulates ECM-remodeling as a prerequisite to pre-osteoblast adhesion/proliferation by possible interference with cellular anchorage. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 29, n. 4, 2018c.

DA COSTA FERNANDES, C. J. et al. Metabolic effects of CoCr-enriched medium on shear-stressed endothelial cell and osteoblasts: A possible mechanism involving a hypoxic condition on bone healing. **Materials Science and Engineering C**, v. 128, 1 set. 2021.

DA S. FELTRAN, G. et al. Differential inflammatory landscape stimulus during titanium surfaces obtained osteogenic phenotype. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 107, n. 8, p. 1597–1604, ago. 2019.

DA SILVA, L. R. R. et al. **A comprehensive review on additive manufacturing of medical devices**. [s.l.] Springer International Publishing, 2021. v. 6

DA SILVA, R. A. et al. The role of triiodothyronine hormone and mechanically-stressed endothelial cell paracrine signalling synergism in gene reprogramming during hBMSC-stimulated osteogenic phenotype in vitro. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 478, p. 151–167, dez. 2018.

DA SILVA, R. A. et al. Laminar shear stress-provoked cytoskeletal changes are mediated by epigenetic reprogramming of TIMP1 in human primary smooth muscle cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 5, p. 6382–6396, 2019.

DE ALMEIDA, G. S. **ESTUDO GLOBAL DO PERFIL TRANSCRIPTÔMICO ENVOLVIDO COM RESPOSTAS ADAPTATIVAS Á BIOMATERIAIS**. [s.l.] Universidade Estadual Paulista, 2020.

DELA PAZ, N. G. et al. Role of shear-stress-induced VEGF expression in endothelial cell survival. **Journal of Cell Science**, v. 125, n. 4, p. 831–843, 2012.

DIOMEDE, F. et al. Functional Relationship between Osteogenesis and Angiogenesis in Tissue Regeneration. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 9, maio 2020.

DOMEZI, J. P. **Efeito das células endoteliais mediadas pelo LTB 4 em células ósseas**.

Bauru: Universidade de São Paulo, 2018.

DUX, K. E. Implantable Materials Update. **Clinics in Podiatric Medicine and Surgery**, v. 36, n. 4, p. 535–542, 1 out. 2019.

ELIAZ, N. **Corrosion of metallic biomaterials: A review** **Materials** MDPI AG, , 28 jan. 2019.

FELTRAN, S. “ JULIO DE MESQUITA FILHO ” Geração e caracterização de tecido equivalente endotelial e seu potencial osteopromotor. p. 100, 2019.

FERNANDES, C. J. C. et al. Nano hydroxyapatite-blasted titanium surface creates a biointerface able to govern Src-dependent osteoblast metabolism as prerequisite to ECM remodeling. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 163, p. 321–328, mar. 2018a.

FERNANDES, C. J. C. C. et al. CoCr-enriched medium modulates integrin-based downstream signaling and requires a set of inflammatory genes reprogramming in vitro. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 106, n. 3, p. 839–849, mar. 2018b.

FERNANDES, C. J. DA C. et al. Modulatory effects of silibinin in cell behavior during osteogenic phenotype. **Journal of cellular biochemistry**, v. 120, n. 8, p. 13413–13425, ago. 2019.

FURTADO, B. N. DA C. Avaliação Dos Diferentes Biomateriais Aplicados À Composição De Próteses Ortopédicas. **Revista Uniandrade**, v. 21, n. 1, p. 37–43, 2019.

GANSS, B.; KIM, R. H.; SODEK, J. Bone sialoprotein. **Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists**, v. 10, n. 1, p. 79–98, 1999.

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

GERMAINI, M. M. et al. Osteoblast and osteoclast responses to A/B type carbonate-substituted hydroxyapatite ceramics for bone regeneration. **Biomedical Materials (Bristol)**, v. 12, n. 3, 2017.

GHASEMI-MOBARAKEH, L. et al. **Key terminology in biomaterials and biocompatibility** **Current Opinion in Biomedical Engineering** Elsevier B.V., , 1 jun. 2019.

GLUHCHEVA, Y. et al. The Impact of Perinatal Cobalt Chloride Exposure on Extramedullary Erythropoiesis, Tissue Iron Levels, and Transferrin Receptor Expression in Mice. **Biological Trace Element Research**, v. 194, n. 2, p. 423–431, 1 abr. 2020.

GOMES, O. P. et al. A novel BSA immobilizing manner on modified titanium surface ameliorates osteoblast performance. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 190, p. 110888, fev. 2020.

HANNAH, S. S. et al. “Take My Bone Away?” Hypoxia and bone: A narrative review. **Journal of cellular physiology**, jul. 2020.

HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical biochemistry**, v. 48, n. 2, p. 422–427, ago. 1972.

HEATH, J. C.; FREEMAN, M. A. R.; SWANSON, S. A. V. CARCINOGENIC PROPERTIES OF WEAR PARTICLES FROM PROSTHESES MADE IN COBALT-CHROMIUM ALLOY. **The Lancet**, v. 297, n. 7699, p. 564–566, 20 mar. 1971.

HILDEBRAND, H. F. Biomaterials - a history of 7000 years. **BioNanoMaterials**, v. 14, n. 3–4, p. 119–133, 1 dez. 2013.

J, M.-S.; ME, C.-C. The use of cobalt chloride as a chemical hypoxia model. **Journal of applied toxicology : JAT**, v. 39, n. 4, p. 556–570, abr. 2019.

JING, X. et al. Role of hypoxia in cancer therapy by regulating the tumor microenvironment. **Molecular Cancer** 2019 18:1, v. 18, n. 1, p. 1–15, 11 nov. 2019.

KARSENTY, G. UPDATE ON THE BIOLOGY OF OSTEOCALCIN. **Endocrine practice : official journal of the American College of Endocrinology and the American Association of Clinical Endocrinologists**, v. 23, n. 10, p. 1270–1274, out. 2017.

KARSENTY, G.; FERRON, M. The contribution of bone to whole-organism physiology. **Nature**, v. 481, n. 7381, p. 314–320, jan. 2012.

KOLB, A. D.; BUSSARD, K. M. The bone extracellular matrix as an ideal milieu for cancer cell metastases. **Cancers**, v. 11, n. 7, 2019.

KRUGER, T. E.; MILLER, A. H.; WANG, J. Collagen scaffolds in bone sialoprotein-mediated bone regeneration. **TheScientificWorldJournal**, v. 2013, p. 812718, 2013.

KUMON, K. et al. Differentiation of cancer stem cells into erythroblasts in the presence of CoCl₂. **Scientific Reports** |, v. 11, p. 23977, 2021.

KUSUMBE, A. P.; ADAMS, R. H. Osteoclast progenitors promote bone vascularization and osteogenesis. . nov. 2014, p. 1238–1240.

KUSUMBE, A. P.; RAMASAMY, S. K.; ADAMS, R. H. Coupling of angiogenesis and osteogenesis by a specific vessel subtype in bone. **Nature**, v. 507, n. 7492, p. 323–328, 2014.

KUX, H. Sobre a origem da nomenclatura alemã na mineralogia brasileira. **Estudos Germânicos**, v. 1, n. 1, p. 19–23, 30 nov. 1980.

LACAUD, G.; KOUSKOFF, V. **Hemangioblast, hemogenic endothelium, and primitive versus definitive hematopoiesis** *Experimental Hematology* Elsevier Inc., 1 maio 2017.

LANDUCI, M. C. *Mecânicas De Biomateriais Metálicos*. 2016.

LASSEN, N. E.; ANDERSEN, T. L.; PLOEN, G. G., SOE, K.; HAUGE, E. M.; HASRVING, S.; ESCHEN, G. E. T., DELAISSE, J. M. Tethering Formation to Resorption: Reversal Revisited. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 32, n. 7, p. 1389–1390, 2017.

LEE, B. E. J. et al. A Bioprinted In Vitro Model for Osteoblast to Osteocyte Transformation by Changing Mechanical Properties of the ECM. **Advanced Biosystems**, v. 3, n. 10, p. 1–9, 2019.

LEE, N. K.; KARSENTY, G. Reciprocal regulation of bone and energy metabolism. **Trends in endocrinology and metabolism: TEM**, v. 19, n. 5, p. 161–166, jul. 2008.

LEE, P.; CHANDEL, N. S.; SIMON, M. C. Cellular adaptation to hypoxia through hypoxia inducible factors and beyond. **Nature Reviews Molecular Cell Biology** 2020 **21:5**, v. 21, n. 5, p. 268–283, 6 mar. 2020.

LEFEBVRE, V.; PEETERS-JORIS, C.; VAES, G. Production of gelatin-degrading matrix metalloproteinases ('type IV collagenases') and inhibitors by articular chondrocytes during their dedifferentiation by serial subcultures and under stimulation by interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1094, n. 1, p. 8–18, ago. 1991.

LISON, D. Cobalt. In: **Handbook on the Toxicology of Metals**. [s.l.] Elsevier, 2022. p. 221–242.

LIU, Y. et al. Robust bone regeneration through endochondral ossification of human mesenchymal stem cells within their own extracellular matrix. **Biomaterials**, v. 218, n. July, 2019.

MABILLEAU, G. et al. Metal-on-metal hip resurfacing arthroplasty: A review of periprosthetic biological reactions. **Acta Orthopaedica**, v. 79, n. 6, p. 734–747, jan. 2008.

MACHADO, M. I. P. et al. Cobalt-chromium-enriched medium ameliorates shear-stressed endothelial cell performance. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 54, n. April, p. 163–171, jul. 2019.

MACHADO, N. E. DA S. et al. Biomateriais usados na revascularização pulpar: revisão de literatura. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 1, p. e55410112017, 2021.

MADATHIL, B. K. et al. Hypoxia-like effect of Cobalt Chromium alloy micro particles on fibroblasts in vitro. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 28, n. 10, p. 1360–1367, 1 out. 2010.

MAIA, C. **Repositório Institucional da UFMG: Complexos de rênio(I) e cobalto(III) como candidatos a metalofármacos antitumorais**. Disponível em: <<https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/SFSA-ALSQ3U>>. Acesso em: 14 jun. 2022.

MARTINS, F. et al. Obtenção E Caracterização De Células Multipotentes Mesenquimais Estromais De Medula Óssea Para Estudo Do Potencial Terapêutico Em Doenças Cardiovasculares. p. 1–28, 2017.

MARUMOTO, A. et al. Phosphoproteome analysis reveals a critical role for hedgehog signalling in osteoblast morphological transitions. **Bone**, v. 103, p. 55–63, 2017.

MOLLER, A. M. J. et al. Fusion potential of human osteoclasts in vitro reflects age, menopause, and in vivo bone resorption levels of their donors—a possible involvement of dc-stamp. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 17, p. 1–16, 2020.

MUÑOZ-SÁNCHEZ, J.; CHÁNEZ-CÁRDENAS, M. E. **The use of cobalt chloride as a chemical hypoxia model** *Journal of Applied Toxicology* John Wiley and Sons Ltd, 1 abr. 2019.

OKINO-DELGADO, C. H. et al. Bioremediation of cooking oil waste using lipases from wastes. **PloS one**, v. 12, n. 10, p. e0186246, 2017.

OLIVEIRA, L. S. DE. **Quantificação Do Processo De Osteogenese Em Implantes Dentários. Tese apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Engenharia Mecânica da Universidade Federal de Uberlândia, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR EM ENGENHARIA MECÂNICA.**, 2010.

ORIENTADOR, T.; GUARNIERO, R. Carlos Eduardo Sanches Vaz Avaliação do efeito de centrifugado osteogênico de medula óssea na consolidação de fratura: estudo experimental em coelhos São Paulo Carlos Eduardo Sanches Vaz Avaliação do efeito de centrifugado osteogênico de medula óssea na . 2006.

PEIXOTO CABRAL, J. M. Sobre a história do cobalto e da sua relação com a indústria do vidro no Bronze Final. **QUÍMICA**, v. 43, 2019.

PERCIVAL, C. J.; RICHTSMEIER, J. T. Angiogenesis and intramembranous osteogenesis. **Developmental Dynamics**, v. 242, n. 8, p. 909–922, 2013.

PINTO, T. S. et al. c-Src kinase contributes on endothelial cells mechanotransduction in

a heat shock protein 70-dependent turnover manner. **Journal of cellular physiology**, v. 234, n. 7, p. 11287–11303, jul. 2019.

PIRES, A. L. R.; BIERHALZ, A. C. K.; MORAES, Â. M. Biomaterials: Types, applications, and market. **Quimica Nova**, v. 38, n. 7, p. 957–971, 2015.

PIRET, J. P. et al. **CoCl₂, a chemical inducer of hypoxia-inducible factor-1, and hypoxia reduce apoptotic cell death in hepatoma cell line HepG2**. Annals of the New York Academy of Sciences. **Anais...New York Academy of Sciences**, 2002.

PRGEETH PANDULA, P. K. C. et al. Human umbilical vein endothelial cells synergize osteo/odontogenic differentiation of periodontal ligament stem cells in 3D cell sheets. **Journal of Periodontal Research**, v. 49, n. 3, p. 299–306, jun. 2014.

PRIDEAUX, M.; FINDLAY, D. M.; ATKINS, G. J. Osteocytes: The master cells in bone remodelling. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 28, p. 24–30, 2016.

RAMASAMY, S. K. et al. Blood flow controls bone vascular function and osteogenesis. **Nature Communications**, v. 7, dez. 2016.

RAMOS, A. P. et al. Biomedical applications of nanotechnology. **Biophysical reviews**, v. 9, n. 2, p. 79–89, 1 abr. 2017.

RIZOV, M.; ANDREEVA, P.; DIMOVA, I. Molecular regulation and role of angiogenesis in reproduction. **Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 56, n. 2, p. 127–132, 2017.

RODRIGUES MARTINS, B. et al. PI3K/AKT signaling drives titanium-induced angiogenic stimulus. [s.d.].

ROSSI, M. C. et al. Titanium-released from dental implant enhances pre-osteoblast adhesion by ROS modulating crucial intracellular pathways. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 105, n. 11, p. 2968–2976, nov. 2017.

S, N.; A, R. Stabilization of hypoxia inducible factor by cobalt chloride can alter renal epithelial transport. **Physiological reports**, v. 5, n. 24, dez. 2017.

SALSOSO, R. et al. **Adenosine and preeclampsia** *Molecular Aspects of Medicine* Elsevier Ltd, , 1 jun. 2017.

SAMELKO, L. et al. Cobalt-Alloy Implant Debris Induce HIF-1 α Hypoxia Associated Responses: A Mechanism for Metal-Specific Orthopedic Implant Failure. **PLOS ONE**, v. 8, n. 6, p. e67127, 20 jun. 2013.

SHAH, K. M. et al. Osteocyte physiology and response to fluid shear stress are impaired following exposure to cobalt and chromium: Implications for bone health following joint replacement. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 35, n. 8, p. 1716–1723, ago. 2017.

SILVA, F. A. et al. Determination of chromium by GFAAS in slurries of fish feces to estimate the apparent digestibility of nutrients in feed used in pisciculture. **Talanta**, v. 69, n. 4, p. 1025–1030, 2006.

SILVA, F. L. E et al. Tratamento de superfície em implantes dentários: uma revisão de literatura. **Revista da Faculdade de Odontologia - UPF**, v. 21, n. 1, p. 136–142, 2016.

SUZUKI, Y. J.; CARINI, M.; BUTTERFIELD, D. A. Protein Carbonylation. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 12, n. 3, p. 323, fev. 2010.

TOKUHARA, C. K. et al. Updating the role of matrix metalloproteinases in mineralized tissue and related diseases. **Journal of Applied Oral Science**, v. 27, 2019.

UDA, Y. et al. **Osteocyte Mechanobiology** **Current Osteoporosis Reports** **Current Medicine Group LLC** 1, , 1 ago. 2017.

VAICELYTE, A. et al. Cobalt–Chromium Dental Alloys: Metal Exposures, Toxicological Risks, CMR Classification, and EU Regulatory Framework. **Crystals** **2020, Vol. 10, Page 1151**, v. 10, n. 12, p. 1151, 18 dez. 2020.

VAN OERS, R. F. M.; WANG, H.; BACABAC, R. G. Osteocyte Shape and Mechanical Loading. **Current Osteoporosis Reports**, v. 13, n. 2, p. 61–66, 2015.

WAGATSUMA, A. et al. Cobalt chloride, a chemical hypoxia-mimicking agent, suppresses myoblast differentiation by downregulating myogenin expression. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 470, n. 1–2, p. 199–214, jul. 2020.

WEI, J.; KARSENTY, G. An overview of the metabolic functions of osteocalcin. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 16, n. 2, p. 93–98, jun. 2015.

WILLETT, T. L. et al. Bone collagen network integrity and transverse fracture toughness of human cortical bone. **Bone**, v. 120, n. July 2018, p. 187–193, 2019.

XU, J. et al. Cobalt (II) ions and nanoparticles induce macrophage retention by ROS-mediated down-regulation of RhoA expression. **Acta Biomaterialia**, v. 72, p. 434–446, 1 maio 2018a.

XU, R. et al. Gas signaling controls intramembranous ossification during cranial bone development by regulating both Hedgehog and Wnt/ β -catenin signaling. **Bone Research**, v. 6, n. 1, 2018b.

YANG, S. et al. Biological responses of preosteoblasts to particulate and ion forms of Co-Cr alloy. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 103, n. 11, p. 3564–3571, 1 nov. 2015.

ZAMBUZZI, W. F. et al. MMP-9 and CD68(+) cells are required for tissue remodeling in response to natural hydroxyapatite. **Journal of molecular histology**, v. 40, n. 4, p.

301–309, ago. 2009.

ZAREIDOOST, A. et al. The relationship of surface roughness and cell response of chemical surface modification of titanium. **Journal of materials science. Materials in medicine**, v. 23, n. 6, p. 1479–1488, jun. 2012.

ZHANG, H. et al. Intramembranous ossification and endochondral ossification are impaired differently between glucocorticoid-induced osteoporosis and estrogen deficiency-induced osteoporosis. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–13, 2018.

ZHANG, Q.; RIDDLE, R. C.; CLEMENS, T. L. Bone and the regulation of global energy balance. **Journal of internal medicine**, v. 277, n. 6, p. 681–689, jun. 2015.