

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 28/02/2026.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

**"POTENCIAL DA ZIRCÔNIA NA MODULAÇÃO DE CÉLULAS
ENDOTELIAIS E OSTEÓBLASTOS: PERSPECTIVAS PARA
ENGENHARIA DE TECIDOS E REGENERAÇÃO ÓSSEA"**

Beatriz de Almeida Camargo

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

**Botucatu - SP,
2024**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**"POTENCIAL DA ZIRCÔNIA NA MODULAÇÃO DE CÉLULAS
ENDOTELIAIS E OSTEÓBLASTOS: PERSPECTIVAS PARA
ENGENHARIA DE TECIDOS E REGENERAÇÃO ÓSSEA"**

Beatriz de Almeida Camargo

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

Orientador: Prof. Willian Fernando Zambuzzi

**Botucatu - SP,
2024**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA A. CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Camargo, Beatriz de Almeida.

Potencial da zircônia na modulação de células endoteliais e osteoblastos : perspectivas para engenharia de tecidos e regeneração óssea / Beatriz de Almeida Camargo. - Botucatu, 2024

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

Orientador: Willian Fernando Zambuzzi
Capes: 31302017

1. Materiais biomédicos. 2. Células Endoteliais. 3. Óxido de zircônio. 4. Osteoblastos.

Palavras-chave: Biomateriais; Células endoteliais; Osteoblastos; Shear Stress; Zircônia.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE BEATRIZ DE ALMEIDA CAMARGO, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA, DO INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS - CÂMPUS DE BÓTUCATU.

Aos 28 dias do mês de fevereiro do ano de 2024, às 08:00 horas, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de BEATRIZ DE ALMEIDA CAMARGO, intitulada **POTENCIAL DA ZIRCÔNIA NA MODULAÇÃO DE CÉLULAS ENDOTELIAIS E OSTEOBLASTOS: PERSPECTIVAS PARA ENGENHARIA DE TECIDOS E REGENERAÇÃO ÓSSEA**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. WILLIAN FERNANDO ZAMBUZZI (Orientador(a) - Participação Virtual) do(a) Departamento de Ciências Químicas e Bioquímicas / Instituto de Biociências de Botucatu Unesp, Prof. Dr. RODRIGO AUGUSTO DA SILVA (Participação Virtual) do(a) Departamento de Patologia / UNIP, Prof. Dr. RODRIGO CARDOSO DE OLIVEIRA (Participação Virtual) do(a) Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Odontologia de Bauru - USP. Após a exposição pela mestranda e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final: Aprovado. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Prof. Dr. WILLIAN FERNANDO ZAMBUZZI



AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer e dedicar este trabalho aos amores da minha vida meu marido e meus pais que me incentivaram e me apoiaram nas decisões, me deram força nos momentos bons e ruins, nunca conseguiria sem eles.

Aos meus amigos e amigas de infância e os de laboratório de Bioensaios e Dinâmica Celular, que me acompanharam durante todos esses anos, por todas as conversas e ajudas.

Para aqueles que sempre me ajudaram, ensinaram e me apoiaram, que me acolheram, como meu orientador Dr. Willian Fernando Zambuzzi, e a minha doutoranda Georgia Feltran (por tudo que fez e me ajudou em todos esses anos). Pela professora Margarida Juri Saeki que me deu a oportunidade de estar em uma sala de aula, e pelos ensinamentos. À Capes e ao Cnpq, pelo apoio financeiro, me proporcionando realizar grande parte deste trabalho.

E a Deus pela força para concluir mais uma etapa da minha vida, e nunca desistir dos meus sonhos.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Esquema das etapas do processo angiogênico e a importância das células endoteliais. Adaptado a partir de (ARAUJO; BARBOSA, 2017; ZIMTA et al., 2019) .. 2
- Figura 2:** Principais fases biológicas do microambiente celular dentário com o biomaterial..... 3
- Figura 3:** Propriedades das células endoteliais. Adaptado: (ARAUJO; BARBOSA, 2017) 6
- Figura 4:** Representação de células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC), e dos vasos sanguíneos com as células endoteliais revestindo-os. Adaptado: (BORGES, JULIANA, 2011)..... 7
- Figura 5: Design do experimento.** Foram colocadas, as pastilhas de zircônia (I), em tubos com meio de cultura para liberar suas partículas em até 24 horas (II). Depois desse condicionamento, o meio foi suplementado (10% SFB) e usado para tratar as células endoteliais (III). O estudo foi realizado de dois modos: na forma de Shear Stress (IV) e na forma Estático (V). Depois da exposição de 72 horas, foram coletadas as amostras para o estudo das análises moleculares: MTT (VI), Western Blotting (VII), Zimografia (VIII), PCR (IX) e por fim realizamos as Análises Estatísticas (X)..... 10
- Figura 6: Schematic representation of the experimental setup with ZrO₂ alloys.** (a) ZrO₂-based alloy discs are depicted prior to exposure to the culture medium. (b) These alloys are immersed in culture medium for particle release over a 24-hour incubation period. (c) The ZrO₂-conditioned medium is then fortified with Fetal Bovine Serum (FBS) and applied to treat HUVEC cultures. (d) Cells are subjected to two distinct treatment conditions: static culture and dynamic culture under shear stress. (e) After a treatment duration of 72 hours, (f) the cellular samples are harvested for subsequent molecular analysis. 16
- Figura 7: Impact of ZrO₂ alloys on endothelial cell cycle markers.** Endothelial cells were treated for 72 hours with ZrO₂ alloy-conditioned medium, after which gene and protein expressions were analyzed. (a-e) The graph depicts the expression levels of cell cycle regulatory genes Src, p15, CDK2, CDK4, and Cofilin, with normalization against housekeeping genes 18S, β-ACTIN, and GAPDH. (f-g) Western blot analysis illustrates Cofilin protein levels, normalized to the housekeeping protein GAPDH. Expression levels were quantified using the ΔΔCT method, with data presented relative to control

values. Statistical significance was determined using the T test, with * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$ 21

Figura 8: ZrO₂ influences MAPK and AKT pathways in endothelial cells subjected to shear stress. Endothelial cells were treated with a medium preconditioned with Zirconia alloys under static and shear stress conditions to examine the activation of MAPK and AKT through the TGF- β pathway (a). After 72 hours of treatment, cells were harvested using TriZOL for RNA extraction and cDNA synthesis to evaluate the expression levels of TGF- β , ERK, JNK, and AKT (b-d; g). The gene expressions were normalized against the 18S, β -ACTIN, and GAPDH housekeeping genes. Quantification was performed using the $\Delta\Delta$ CT method, with results presented relative to controls. Protein content for JNK (e-f) and AKT (h-i) was also assessed by SDS-PAGE and quantified by Western blotting, with GAPDH as the loading control. The statistical significance was determined using the T test, denoted by * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$ for respective levels of significance. 22

Figura 9: Extracellular matrix remodeling in response to zirconia enrichment. Endothelial cells were cultured in Zirconia-enriched medium for 72 hours, after which cellular and medium components were analyzed for ECM remodeling activity. (a-d) Real-time PCR was utilized to assess the expression of genes associated with matrix remodeling, including MMP2, MMP9, TIMP1, and TIMP2. The expression data were normalized against housekeeping genes 18S, β -ACTIN, and GAPDH. (e) Zymography was conducted on the collected medium to profile the activity of metalloproteinases. Densitometric analysis of the zymography gels allowed for the quantification of pro-MMP9 and active MMP9 (g-i), as well as pro-MMP2 and active MMP2 (f-h). Expression levels determined by the $\Delta\Delta$ Ct method were compared and displayed graphically, with values normalized to control. Statistical significance was ascertained using the T test, with * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$ indicating levels of significance. 23

Figura 10: Description of the experimental setup using ZrO₂ implants. (a) ZrO₂ implants are shown before exposure to culture medium. (b) These implants are immersed in culture medium to release particles over a 24-hour incubation period. (c) ZrO₂-conditioned medium is fortified with fetal bovine serum (FBS) and applied to MC3T3 cultures, establishing indirect contact. (d) After a 72-hour treatment, cellular samples are collected for subsequent molecular analyses. (e) In the case of hybrid contact, MC3T3 cells are cultured around the material immersed in the medium. (f) Subsequently, the

implant is removed from the medium and subjected to analysis by Scanning Electron Microscopy (SEM) to evaluate cell adhesion to the material..... 30

Figura 11: Repercussion of cytotoxicity and cell adhesion. Cells were exposed for 72 hours to medium conditioned with ZrO₂ implant, after which cytotoxicity and adhesion responses were analyzed. In (a), the graph presents viability levels related to treatment with implant-conditioned medium. In (b), data obtained in the adhesion assay are observed. Statistical significance was determined using two-tailed Student's t-test, with *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, and ****p<0.0001. 32

Figura 12: Cell cycle related genes are modulated by zirconia-enriched medium. Osteoblastic cells were treated for 72 hours with medium conditioned with ZrO₂ implant, maintaining indirect contact, and at another time, the medium was placed around the implants (hybrid contact). Then, gene expression analyses were performed by RT-qPCR. The graphs (a) Cdk2, (b) Cdk4, (c) Cdk6, (d) Hybrid Cdk2, (e) Hybrid Cdk4, and (f) Hybrid Cdk6 represent gene expressions regulating the cell cycle. Expression levels were quantified using the $\Delta\Delta$ CT method, with data presented in relation to control values. Statistical significance was determined using One-way ANOVA, corrected Tukey with *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, and ****p<0.0001. 33

Figura 13: Osteoblastic differentiation factors in the presence of medium enriched by ZrO₂ implant. MC3T3 cells were treated for 72 hours with medium conditioned with ZrO₂ implant, in which after this period, gene expression was analyzed. The graphs represent the transcriptional levels of indirect and hybrid contact of Alp (a, e), Runx2 (b, f), Sp7 (c, g), and Otc (d, h). Expression levels were quantified using the $\Delta\Delta$ CT method, with data presented in relation to control values. Statistical significance was determined using One-way ANOVA, corrected Tukey with *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, and ****p<0.0001..... 34

Figura 14: Participation of VEGF during cell-material interaction. After 72 hours of exposure, cells were collected using TRIzol for RNA extraction, and cDNA synthesis was performed. Then, transcriptional analyses of VEGF were measured, and expression levels were quantified using the $\Delta\Delta$ CT method, with data presented in relation to control values. Statistical significance was determined using One-way ANOVA, corrected by Tukey with *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, and ****p<0.0001. 35

Figura 15: Extracellular matrix remodeling in pre-osteoblasts exposed to Zirconia. Medium collected from cells exposed to ZrO₂-conditioned medium was collected and applied to electrophoresis gel for gelatinolytic degradation analysis (a). From the

densitometry analysis of the bands, we verified the MMP2 (b) and MMP9 (c) profiles. Statistical significance was determined using One-way ANOVA, corrected by Tukey with * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, and **** $p < 0.0001$ 36

Figura 16: SEM demonstrates the interaction between the biomaterial and the cell.

MC3T3-E1 cells were plated on the material surface and processed for scanning electron microscopy (SEM) after 24 hours. It is possible to note that the cells not only adhered to the material but also proliferated. 37

LISTA DE TABELAS

Table 1: Tabela 1: Expression primer sequences and PCR cycle conditions.

18

LISTA DE ABREVIÇÕES

Zr: Zircônia

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-di- fenil brometo de tetrazolina. Teste utilizado na avaliação da viabilidade celular.

ZrO₂: Dióxido de Zircônia

MEC: Matriz extracelular

SFB: Soro Fetal Bovino

MEV: Microscopia eletrônica de varredura

RT-qPCR: Reação em cadeia da polimerase quantitativa com transcrição reversa

ECL: Quimiluminescência

ERK: Quinase regulada por sinal extracelular

AKT: Proteína quinase B

GAPDH: Gliceraldeído -3 fosfato desidrogenase

JNK: Jun N-terminal quinase

TGF- β : Fator de crescimento transformador beta

CDK: Ciclina dependente de quinase

MMP: Matriz Metaloproteinase

TIMP: Inibidor de metalopeptidase

Y₂O₃: Óxido de Ítrio

HUVEC: Célula endotelial de veia umbilical humana

MC3T3-E1: Linhagem de pre-osteoblasto

ATCC: American type culture collection

RESUMO

A osteogênese desempenha um papel crucial na restauração do tecido ósseo, e biomateriais são frequentemente empregados para facilitar essa reparação. A interação inicial entre células endoteliais e biomateriais é essencial para a formação de tecido angiogênico, nutrição adequada e restauração tecidual. No entanto, nosso entendimento dessa interação ainda é limitado. Este estudo visa avaliar os efeitos do meio de cultura enriquecido com zircônia (Zr) no metabolismo das células endoteliais HUVEC, investigando múltiplas vias moleculares. A zircônia foi condicionada em meio de cultura por 24 horas, suplementada com soro fetal bovino, e posteriormente utilizada no tratamento das células endoteliais. O estudo foi realizado sob duas condições distintas: aplicando estresse de cisalhamento e em estado estático. Após 72 horas, amostras foram coletadas para análises estatísticas, Western Blotting, Zimografia e RT-qPCR. A interação célula-biomaterial demonstrou redução na expressão do gene Src e aumento na expressão de genes relacionados à transição de fases do ciclo celular e regulação da proliferação, como o gene p15, nas células tratadas com ZrO₂, independentemente da presença de estresse de cisalhamento. Houve também aumento nas concentrações de CDK2 e CDK4 nos grupos expostos ao ZrO₂. Observou-se possível reorganização do citoesqueleto, indicada pela regulação positiva da Cofilina em ambos os grupos, embora sua concentração proteica tenha diminuído sob estresse de cisalhamento. A via do TGF-β, que regula a expressão de MAP-quinases e AKT, apresentou aumento no TGF-β nos grupos tratados com zircônia, sob ambas as condições. Proteínas ERK e JNK foram superexpressas apenas no grupo sob estresse de cisalhamento, enquanto AKT, crucial na regulação da proliferação celular, teve sua expressão aumentada sob condições de ZrO₂/Shear-Stress, com redução nos níveis proteicos nos grupos tratados apenas com meio condicionado. Esses resultados destacam respostas adaptativas nas vias de adesão celular, proliferação, sobrevivência, ciclo celular e remodelação da matriz extracelular, contribuindo para a reorganização da matriz óssea através da atividade das matriz metaloproteinases e seus inibidores.

Palavras-chave: Osteogênese; Biomateriais; Células endoteliais; Zircônia; Interação célula-biomaterial.

ABSTRACT

Osteogenesis plays a crucial role in bone tissue restoration, and biomaterials are often employed to facilitate this repair. The initial interaction between endothelial cells and biomaterials is essential for angiogenic tissue formation, proper nutrition, and tissue restoration. However, our understanding of this interaction is still limited. This study aims to evaluate the effects of zirconia (Zr)-enriched culture medium on the metabolism of HUVEC endothelial cells, investigating multiple molecular pathways. Zirconia was conditioned in culture medium for 24 hours, supplemented with fetal bovine serum, and subsequently used to treat endothelial cells. The study was conducted under two distinct conditions: applying shear stress and in a static state. After 72 hours, samples were collected for statistical analyses, Western Blotting, Zymography, and RT-qPCR. The cell-biomaterial interaction showed reduced expression of the Src gene and increased expression of genes related to cell cycle phase transition and proliferation, such as the p15 gene, in cells treated with ZrO₂, regardless of the presence of shear stress. There was also an increase in the concentrations of CDK2 and CDK4 in groups exposed to ZrO₂. Possible cytoskeletal reorganization was indicated by positive regulation of Cofilin in both groups, although its protein concentration decreased under shear stress. The TGF-β pathway, which regulates the expression of MAP-kinases and AKT, showed an increase in TGF-β in groups treated with zirconia under both conditions. ERK and JNK proteins were overexpressed only in the group under shear stress, while AKT, crucial in regulating cell proliferation, had increased expression under ZrO₂/Shear-Stress conditions, with reduced protein levels in groups treated only with conditioned medium. These results highlight adaptive responses in cell adhesion, proliferation, survival, cell cycle, and extracellular matrix remodeling pathways, contributing to bone matrix reorganization through the activity of metalloproteinases and their inhibitors.

Keywords: Osteogenesis; Biomaterials; Endothelial cells; Zirconia; Cell-biomaterial interaction.

Sumário

Capítulo I	1
INTRODUÇÃO, JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	1
OBJETIVO GERAL	8
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
DESENHO EXPERIMENTAL	9
Capítulo II	11
ABSTRACT	13
INTRODUCTION	14
MATERIAL & METHODS	15
<i>Zirconia materials and alloys</i>	15
<i>Endothelial cell culture</i>	16
<i>Preparation of ZrO₂-enriched medium</i>	16
<i>In vitro laminar shear stress model</i>	17
<i>Western Blotting Analysis</i>	17
<i>mRNA Isolation and Real-Time Quantitative PCR (RT-qPCR) Analysis</i>	18
<i>Matrix Metalloproteinases (MMPs) Activity Assessment by Zymography</i>	19
<i>Statistical Analysis</i>	19
RESULTS	20
<i>Effect of Zirconia on Endothelial Cell Proliferation</i>	20
<i>Cytoskeletal Dynamics</i>	20
<i>TGF-β Pathway and Kinase Expression</i>	21
<i>Metalloproteinase Activities and ECM Remodeling</i>	22
DISCUSSION	23
ACKNOWLEDGEMENTS	25
Capítulo III	26
ABSTRACT	27
INTRODUCTION	28
MATERIALS AND METHODS	29
<i>Osteoblastic Cell Culture</i>	29
<i>Preparation of ZrO₂-Enriched Medium (Z7 – One Piece)</i>	29
<i>Cell Viability and Adhesion</i>	30
<i>Scanning Electron Microscopy</i>	31
<i>Matrix Metalloproteinase (MMP) Activity Assessment by Zymography</i>	31

<i>mRNA Isolation and Real-Time Quantitative PCR (RT-qPCR) Analysis</i>	31
<i>Statistical Analysis</i>	32
RESULTS	32
<i>Analysis of cytotoxicity and cell adhesion in osteoblastic cells treated with zirconia</i>	32
<i>Implication of ZrO₂ Implants on Osteoblastic Cell Cycle Markers</i>	33
<i>Investigation of osteoblastic differentiation factors</i>	34
<i>Performance of VEGF in both different cell contacts</i>	35
<i>Extracellular matrix degradation in the presence of ZrO₂</i>	36
<i>Direct interaction between zirconia biomaterial and pre-osteoblastic cells</i>	36
DISCUSSION	37
CONCLUSÃO	39
REFERÊNCIAS	39

Capítulo I

INTRODUÇÃO, JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

A osteogênese, processo fundamental na formação do tecido ósseo, envolve o desenvolvimento de uma matriz orgânica e sua mineralização, conferindo resistência ao tecido e auxiliando na recuperação de fraturas por meio de processos regenerativos. Este processo, que renova o osso a cada dez anos, está intrinsecamente ligado à angiogênese, definida como o crescimento de novos vasos sanguíneos a partir da ativação de células endoteliais (DIOMEDE et al., 2020; GROSSO et al., 2017; ZIMTA et al., 2019). No contexto angiogênico, inicialmente, células endoteliais são ativadas por estímulos pró-angiogênicos, secretando metaloproteinases que degradam a membrana basal e promovem a fenestração, levando à dilatação dos poros da membrana. Esse processo é seguido pela migração e proliferação dessas células, resultando na formação de brotos capilares sob a influência de diversos fatores de crescimento. A etapa final envolve a maturação das células endoteliais e a atuação de outros sinais biológicos essenciais para a estruturação e formação do novo vaso sanguíneo, conforme ilustrado na **Figura 1**. Estes novos vasos sanguíneos melhoram a irrigação do tecido, facilitando o transporte de nutrientes, citocinas, fatores de crescimento e outros componentes vitais para a manutenção da homeostase do microambiente celular (CASTRO, 2012; DIOMEDE et al., 2020; GROSSO et al., 2017; ZIMTA et al., 2019).

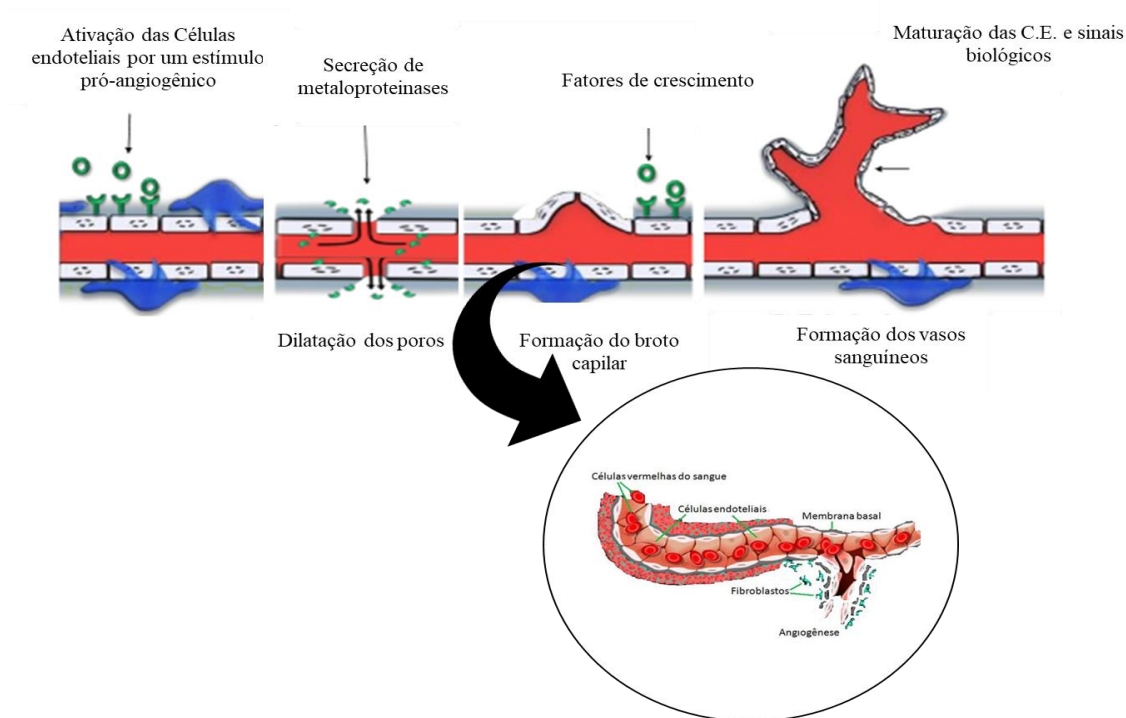


Figura 1: Esquema das etapas do processo angiogênico e a importância das células endoteliais. Adaptado a partir de (ARAÚJO; BARBOSA, 2017; ZIMTA et al., 2019)

Assim, para que haja a renovação óssea, é essencial a integração entre o tecido ósseo e o tecido endotelial; no entanto, à medida que a idade aumenta, esse acoplamento angio-osteogênico acaba diminuindo. Com o processo de envelhecimento, observamos um aumento significativo na ocorrência de defeitos ósseos, que podem manifestar-se de diversas maneiras, incluindo doenças ósseas agravadas pela idade, degeneração natural e traumas. Isso é especialmente relevante considerando que os idosos são mais suscetíveis a esses eventos, embora não se possa descartar a possibilidade de pessoas mais jovens também enfrentarem esses problemas. Diante desse cenário, tornou-se imperativo realizar estudos para identificar os materiais mais adequados para cada contexto, levando em consideração a melhor compatibilidade, processo de regeneração mais eficaz junto ao tecido, aspectos estéticos, tecnologia avançada e segurança para os pacientes. Essas considerações são cruciais, uma vez que os biomateriais, ao entrar em contato com diversos ambientes celulares, liberam partículas que influenciam nas diferentes etapas dos processos de osteointegração e regeneração. Isso é evidenciado, por exemplo, no processo de angio-osteogênese, no qual a interação entre as células e o biomaterial desempenha um papel decisivo, conforme ilustrado na **Figura 2**. Dessa forma, a regeneração de tecidos lesionados emerge como um dos desafios mais significativos a

serem abordados pela medicina e pela comunidade de pesquisa (DEMIRKIRAN, 2012; DIOMEDE et al., 2020; GROSSO et al., 2017; SANTOS; REIS, 2010; SINHORETI; VITTI; CORRER-SOBRINHO, 2013).



Figura 2: Principais fases biológicas do microambiente celular dentário com o biomaterial.

A história da evolução dos biomateriais remonta a períodos anteriores à Idade Média, quando metais como ferro e ouro foram desenvolvidos para serem aplicados em fraturas e atrofias. Outros tipos de "materiais" eram utilizados com boas intenções, embora houvesse pouco conhecimento sobre suas propriedades benéficas ao corpo humano, e ainda menos compreensão da importância da biocompatibilidade, que, em anos subsequentes, se tornaria um critério fundamental na seleção de biomateriais de alta qualidade para enxertos (PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015). Na prática odontológica contemporânea, reconhece-se a necessidade de os biomateriais oferecerem biocompatibilidade, buscando um equilíbrio ao entrar em contato com o corpo do paciente. Portanto, a odontologia busca em materiais sintéticos características como melhor aplicabilidades, respostas biológicas positivas e propriedades mecânicas vantajosas, além de minimizar processos inflamatórios para impactar de forma favorável nos tecidos bucais, buscando uma semelhança com a estrutura dentária (RATNER, 1996; SINHORETI; VITTI; CORRER-SOBRINHO, 2013)

Conforme as características descritas, os materiais sintéticos do grupo das cerâmicas: titânio, zircônia e alumina, seriam os mais indicados para obter bons resultados biológicos. Além disso, são compostos inorgânicos, que têm resistência à

construção, degradação e a ambientes ácidos, provendo também uma baixa condutividade elétrica e térmica. Podem ser divididos em mais classes, conforme a sua interação com os tecidos ao serem implantados, como: Bioativas, Bioabsorvíveis e Bioinertes (PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015; ZANELATO; GUIMARÃES, 2016).

A alumina (Al_2O_3) é um material que pode apresentar estrutura em formato de pó, no entanto, conforme suas características físico-químicas e variando seu grau de pureza e método de processamento, sua estrutura pode se modificar. Na odontologia, desde o seu desenvolvimento em 1965, a alumina vem desempenhando um papel significativo, especialmente em aplicações que demandam elevada resistência térmica e à corrosão, resistência mecânica, principalmente a grande resistência a fratura e estética. A segurança da alumina para uso em aplicações médicas e odontológicas é evidenciada pela sua biocompatibilidade e caráter não tóxico (MARTINS et al., 2010). Este composto é encontrado na proporção de 20% nos discos de óxidos, como é o caso dos utilizados neste trabalho.

Visando a aplicação desses materiais cerâmicos, e a melhorar compreensão desses biocerâmicos e sua implantação, estudos realizados, como o de (ZANELATO; GUIMARÃES, 2016), mostram que a zircônia (ZrO_2) – com 76% de composição nos discos desse trabalho, por ser bioinerte em relação ao meio e pelas suas propriedades como alta resistência a fratura e tração (mecânica); resistente a choques térmicos e baixa condutividade elétrica (física), além de ser radiopaca; apresenta resistência a produtos químicos (química). Ela é um material que sucede de um silicato de zircônia, ou seja, necessita ser processado para se obter o dióxido de zircônia, não sendo assim, encontrada pura no meio ambiente.

A Zr apresenta várias estruturas diferentes, podendo ser monoclinica, tetragonal e cúbica, e essas ‘fases’ estruturais mudam conforme as variações de temperatura, ou seja, se o material estiver em uma temperatura ambiente ele assume uma estrutura Monoclinica, se essa for aumentada acima de $1170^{\circ}C$, ela pode virar a fase Tetragonal, e o mesmo ocorre com a fase Cúbica se aumentarmos a temperatura para $2370^{\circ}C$ (PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015). Caso essas fases sofram uma mudança abrupta ocasionando a instabilidade do biomaterial, podem ser utilizados aditivos, como os diferentes óxidos: o óxido de cálcio e o óxido de magnésio e o óxido de ítrio (Y_2O_3) – 4% da composição dos discos utilizados neste trabalho – a fim de estabilizar o biomaterial (ABREU et al., 2021; BHERING, 2020; DA COSTA FERNANDES et al., 2018;

PARMIGIANI-IZQUIERDO et al., 2017; PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015; WANG et al., 2016).

Além das particularidades mencionadas, a zircônia se destaca na área odontológica devido não apenas às suas excelentes características estéticas, apresentando tonalidades como bege, branco ou até cinza claro que se assemelham aos dentes, mas também por possuir atributos benéficos para pacientes. Especialmente para aqueles que podem desenvolver doenças peri-implantares, alergias cutâneas ou doenças autoimunes durante o tratamento, condições que podem ser agravadas pelo uso de outros materiais, como o titânio, por exemplo (BHERING, 2020; ZANELATO; GUIMARÃES, 2016) .

É conhecido que os tecidos periimplantares são aqueles que circundam ou envolvem o implante. No entanto, a peri-implantite pode ocorrer durante o processo de implantação devido à presença de menor quantidade de fibroblastos, vascularização reduzida e menor taxa de renovação óssea nesses tecidos, além de torná-los mais susceptíveis a inflamações, formação de placas bacterianas, desenvolvimento de biofilmes, além de causar destruição óssea e biotribocorrosão. Assim, as particularidades dessa condição desempenham um papel crucial quando relacionadas à osseointegração (BHERING, 2020; GAPSKI; MARTINEZ, 2017)

Estudos relacionados ao acúmulo de biofilmes foram realizados por vários cientistas, e um deles (SCARANO et al., 2003), relatou que na comparação entre a zircônia e o titânio, os discos de Zr testados in vivo, tiveram um acúmulo de bactérias e formação de placas menor em relação ao segundo, assim (BHERING, 2020) confirma com ensaios microbiológicos, que a zircônia tem uma menor afinidade com esses biofilmes, então favorecendo a saúde de tecidos periimplantares. Já outro estudo in vitro, (DA COSTA FERNANDES et al., 2021) revelou que esse material demonstra baixa toxicidade celular e ainda fazem interações osteoblásticas. Com isso, temos respostas celulares em torno do biomaterial implantado, que também estão relacionadas com a osteointegração, gerando uma interação célula/implante, e com isso um processo angiogênico, e se o tecido está respondendo de forma regenerativa, conclui-se que há a entrega de nutriente, hormônios e fatores de crescimento (BHERING, 2020b; DA COSTA FERNANDES et al., 2021; GAPSKI; MARTINEZ, 2017; PARMIGIANI-IZQUIERDO et al., 2017; WANG et al., 2016; ZHAO et al., 2021).

Apesar das diversas qualidades destacadas da zircônia, atualmente, há ainda a necessidade de maior desenvolvimento para torná-la mais acessível à população. A aplicação dessa biocerâmica é mais dispendiosa em comparação ao titânio. Assim, apesar

do titânio não proporcionar algumas respostas ideais em certos aspectos, como mencionado anteriormente, ainda persiste como uma escolha muito utilizada devido ao seu custo atrativo (JOÃO et al., 2012).

Dentre todas essas reações discutidas, inflamatória, regeneração, coagulação, apoptose, doenças e infecções microbianas, as células endoteliais, são as mais utilizadas para que estudos como esses sejam realizados, já que esses tipos celulares possuem a habilidade de fazer transportes de macro e pequenas moléculas, hormônios, regulação da homeostasia primária, migração de células inflamatórias, além disso elas atuam no processo de angiogênese, participando de vários procedimentos já citados, como formação de novos vasos, enviando/liberando fatores que ajudam na maturação desses vasos, síntese de proteínas e vários outros, mostrados na **Figura 3** (BORGES, JULIANA, 2011 ; CHEUNG, 2007; CROOK, 2020; MEDINA-LEYTE et al., 2020; PINTO et al., 2019).

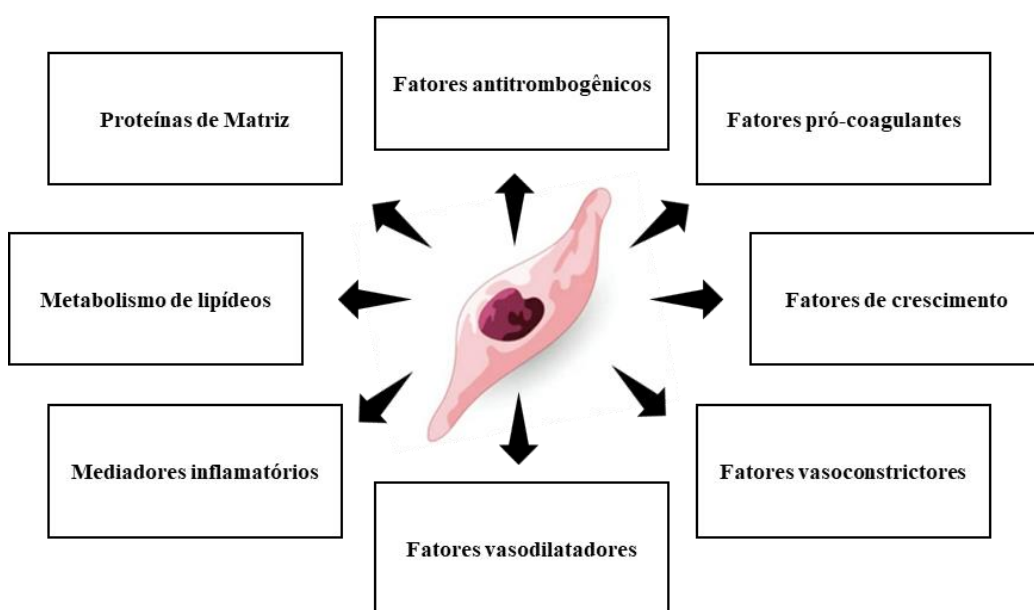


Figura 3: Propriedades das células endoteliais. Adaptado: (ARAÚJO; BARBOSA, 2017)

As células endoteliais e as células osteogênicas desempenham papéis cruciais na resposta a biomateriais osseointegrados, atuando na interface crítica entre o material implantado e o tecido hospedeiro. Elas são essenciais para a formação de novos vasos sanguíneos e para a regeneração óssea, respectivamente, influenciando diretamente o sucesso da osseointegração e da funcionalidade do implante.

As células endoteliais são células que revestem a superfície interna de vasos sanguíneos e linfáticos, formando uma barreira entre o sangue circulante e o tecido do

corpo. Elas são fundamentais para a regulação da passagem de substâncias e células do sangue para os tecidos, além de desempenharem papéis cruciais em processos como a angiogênese (formação de novos vasos sanguíneos), a homeostase vascular (manutenção do equilíbrio interno dos vasos sanguíneos), a coagulação sanguínea, e a resposta inflamatória. As células endoteliais são, portanto, essenciais para a saúde vascular e desempenham um papel importante na resposta do corpo a doenças e a biomateriais implantados. Especificamente, as HUVEC revestem intrinsecamente os vasos sanguíneos e advêm de células cultivadas diretamente de tecido humano a partir do cordão umbilical (**Figura 4**), por isso o nome células endotelial de veia umbilical humana, para daí sim depois de todo esse procedimento elas serem estudadas in vitro (ARAUJO; BARBOSA, 2017; CROOK, 2020; JAFFE et al., 1973).

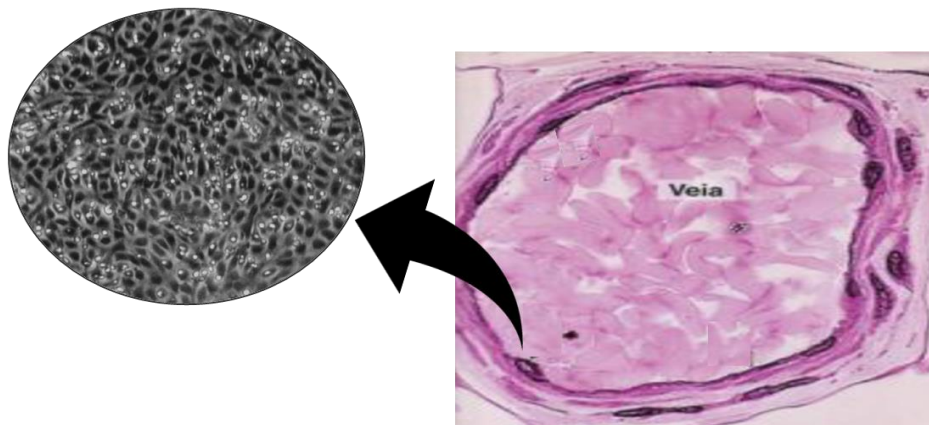


Figura 4: Representação de células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC), e dos vasos sanguíneos com as células endoteliais revestindo-os. Adaptado: (BORGES, JULIANA, 2011)

Outra célula muito utilizada para estudos com materiais cerâmicos, e que podem ter uma boa resposta referente a regeneração óssea são os osteoblastos, eles desempenham um papel crucial no processo de formação e remodelação óssea ao longo da vida. Estas células são responsáveis pela síntese e armazenamento de novo tecido ósseo, bem como pela regulação dos osteoclastos. Além de contribuírem para a produção de colágeno, proteoglicanos e glicoproteínas, componentes essenciais da parte orgânica da matriz óssea, os osteoblastos também desempenham um papel significativo na mineralização dessa matriz. A mineralização envolve a deposição de cálcio na matriz extracelular, conferindo resistência e rigidez ao tecido ósseo (ŠROMOVÁ; SOBOLA; KASPAR, 2023). Os osteoblastos secretam uma substância orgânica não mineralizada chamada

osteóide, composta principalmente por colágeno e outras proteínas. Conforme os osteoblastos continuam suas atividades, a área de formação óssea se afasta, e o osteóide passa por mineralização, depositando cristais de hidroxiapatita para tornar-se uma matriz óssea rígida. Após a formação óssea, os osteoblastos têm três destinos: alguns tornam-se osteócitos incorporados na matriz, outros transformam-se em células de revestimento ósseo e um subgrupo sofre apoptose (ŠROMOVÁ; SOBOLA; KASPAR, 2023).

A avaliação da biologia da interação entre células ósseas e endoteliais em resposta a biomateriais, como a zircônia, é de suma importância devido ao papel crucial dessas interações na osseointegração e na viabilidade de implantes biomédicos. A osseointegração refere-se à integração direta do material implantado com o osso circundante, proporcionando estabilidade e longevidade ao implante. As células ósseas, como os osteoblastos, desempenham um papel fundamental na formação e remodelação do tecido ósseo, enquanto as células endoteliais, como as HUVEC, estão envolvidas na angiogênese e na regulação da resposta inflamatória. A compreensão das interações entre essas células e biomateriais, como a zircônia, pode fornecer insights valiosos sobre a biocompatibilidade, resposta imunológica e capacidade de regeneração tecidual desses materiais. Além disso, uma melhor compreensão dessas interações pode orientar o desenvolvimento de biomateriais mais eficazes e seguros para uso em aplicações médicas e odontológicas, contribuindo assim para o avanço da medicina regenerativa e da tecnologia de implantes.

CONCLUSÃO

Este estudo destaca a capacidade da zircônia (Zr) em não apenas promover um ambiente favorável para células endoteliais HUVEC, mas também em estimular respostas positivas em osteoblastos. Esses resultados sublinham o potencial dual do Zr em aplicações de regeneração óssea, facilitando tanto a angiogênese quanto a osteogênese, muito provavelmente favorecendo ações de acoplamento. A interação sinérgica entre osteoblastos e células endoteliais na presença de Zr indica uma via promissora para a criação de *scaffolds* bioativos que suportam a regeneração tecidual óssea e vascular. Este trabalho fornece constatações valiosas para o desenvolvimento de novas estratégias em engenharia de tecidos e biomateriais, sugerindo que a zircônia pode ser um componente chave em futuras terapias regenerativas.

REFERÊNCIAS

ABE, J.; BERK, B. C. Novel Mechanisms of Endothelial Mechanotransduction. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 34, n. 11, p. 2378–2386, nov. 2014.

- ABREU, E. C. R. D. et al. Tratamentos de superfícies de implantes de titânio e zircônia: Revisão de literatura. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 9, p. e37810918197, 28 jul. 2021.
- ALBANO, C. S. UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO” INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA. 2020.
- ALBANO, C. S. et al. Biofunctionalization of titanium surfaces with alendronate and albumin modulates osteoblast performance. **Heliyon**, v. 6, n. 7, p. e04455, jul. 2020.
- ARAUJO, N.; BARBOSA, H. S. ASPECTOS CELULARES DA INTERAÇÃO DE CÉLULAS ENDOTELIAIS DA VEIA DO CORDÃO UMBILICAL HUMANO E TOXOPLASMA GONDII. n. 1, p. 119, nov. 2017.
- ARREJAIE, A. S. et al. Clinical performance of one-piece zirconia dental implants: A systematic review. **Journal of Investigative and Clinical Dentistry**, v. 10, n. 2, p. e12384, maio 2019.
- BARNEZE COSTA, S. M. et al. Infraphysiological 17β -estradiol (E2) concentration compromises osteoblast differentiation through Src stimulation of cell proliferation and ECM remodeling stimulus. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 518, p. 111027, dez. 2020.
- BARON, M. A. **Análise das metaloproteínas de matriz e seus inibidores no tecido cardíaco de pacientes com cardiomiopatia chagásica crônica**. Mestrado em Alergia e Imunopatologia—São Paulo: Universidade de São Paulo, 6 jul. 2015.
- BERTAZZO, S. et al. Bioactivation of alumina by surface modification: a possibility for improving the applicability of alumina in bone and oral repair. **Clinical Oral Implants Research**, v. 20, n. 3, p. 288–293, mar. 2009.
- BERTAZZO, S. et al. Hydroxyapatite surface solubility and effect on cell adhesion. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 78, n. 2, p. 177–184, jul. 2010a.
- BERTAZZO, S. et al. A simple method for enhancing cell adhesion to hydroxyapatite surface. **Clinical Oral Implants Research**, v. 21, n. 12, p. 1411–1413, dez. 2010b.
- BHERING, R. L. IMPLANTES OSTEOINTEGRADOS DE ZIRCÔNIA. 2020a.
- BHERING, R. L. IMPLANTES OSTEOINTEGRADOS DE ZIRCÔNIA. 2020b.
- BORGES, JULIANA**, [s.d.]. Disponível em: <extension://bocbaocobfecmglmeappambideimao/pdf/viewer.html?file=https%3A%2F%2Ffiles.cercomp.ufg.br%2Fweby%2Fup%2F67%2Fo%2Fsemi2011_Juliana_Carvalho_1c.pdf>. Acesso em: 7 mar. 2024
- CANGANI, M. P. **Caracterização microestrutural de ZrO₂ estabilizada com Y₂O₃ sinterizada a partir de pós nanocristalinos**. Mestrado em Materiais Metálicos, Cerâmicos e Poliméricos—Lorena: Universidade de São Paulo, 16 jun. 2011.
- CARREIRA, A. C. et al. Bone Morphogenetic Proteins: Structure, biological function and therapeutic applications. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 561, p. 64–73, nov. 2014.
- CARREIRA, A. C. O. et al. Bone Morphogenetic Proteins. Em: **Vitamins & Hormones**. [s.l.] Elsevier, 2015. v. 99p. 293–322.

- CASTRO, P. R. CINÉTICA DA ANGIOGÊNESE INFLAMATÓRIA INDUZIDA POR IMPLANTE DE ESPONJA NA MUSCULATURA ABDOMINAL EM CAMUNDONGOS. 2012.
- CHEUNG, A. L. Isolation and Culture of Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC). **Current Protocols in Microbiology**, v. 4, n. 1, fev. 2007.
- CHRISTENSEN, G. J. Choosing an all-ceramic restorative material. **The Journal of the American Dental Association**, v. 138, n. 5, p. 662–665, maio 2007.
- CROOK, J. M. (ED.). **CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E FUNCIONAL DAS CÉLULAS ENDOTELIAIS DE COELHOS E HUMANAS CULTIVADAS SOBRE SUPERFÍCIES METÁLICAS TRATADAS A PLASMA**. New York, NY: Springer US, 2020. v. 2140
- CRUZ, M. et al. ASPECTOS QUÍMICOS DA BIOMINERALIZAÇÃO ÓSSEA. **Química Nova**, 2021.
- 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, p. 41, abr. 2018a.
- 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, p. 41, abr. 2018b.
- 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, p. 112353, set. 2021.
- 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, maio 2019.
- DA SILVA, R. A. et al. The Impact of Bioactive Surfaces in the Early Stages of Osseointegration: An *In Vitro* Comparative Study Evaluating the HAnano® and SLActive® Super Hydrophilic Surfaces. **BioMed Research International**, v. 2020, p. 1–11, 14 set. 2020.
- DARJANKI, C. M. et al. Expression of VEGF and BMP-2 in Osteoblast cells exposed to a combination of polymethylmethacrylate (PMMA) and hydroxyapatite (HAp). **Journal of Oral Biology and Craniofacial Research**, v. 13, n. 2, p. 243–248, mar. 2023.
- DEANA, A. M. et al. The impact of photobiomodulation on osteoblast-like cell: a review. **Lasers in Medical Science**, v. 33, n. 5, p. 1147–1158, jul. 2018.
- 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, 15 fev. 2012.
- DEMIRKIRAN, H. Bioceramics for Osteogenesis, Molecular and Cellular Advances. Em: JANDIAL, R.; CHEN, M. Y. (Eds.). **Regenerative Biology of the Spine and Spinal Cord**. Advances in Experimental Medicine and Biology. New York, NY: Springer New York, 2012. v. 760p. 134–147.

- DIOMEDE, F. et al. Functional Relationship between Osteogenesis and Angiogenesis in Tissue Regeneration. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 9, p. 3242, 3 maio 2020.
- 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. 2018.
- FREITAS-RODRÍGUEZ, S.; FOLGUERAS, A. R.; LÓPEZ-OTÍN, C. The role of matrix metalloproteinases in aging: Tissue remodeling and beyond. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1864, n. 11, p. 2015–2025, nov. 2017.
- GAPSKI, R.; MARTINEZ, E. F. Behavior of MC3T3-E1 Osteoblastic Cells Cultured on Titanium and Zirconia Surfaces: An In Vitro Study. **Implant Dentistry**, v. 26, n. 3, p. 373–377, jun. 2017.
- 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, nov. 2014.
- GOMES, A. M. et al. Wortmannin targeting phosphatidylinositol 3-kinase suppresses angiogenic factors in shear-stressed endothelial cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 235, n. 6, p. 5256–5269, jun. 2020.
- GROSSO, A. et al. It Takes Two to Tango: Coupling of Angiogenesis and Osteogenesis for Bone Regeneration. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 5, p. 68, 3 nov. 2017.
- IOANNIDOU, E. et al. Angiogenesis and Anti-Angiogenic Treatment in Prostate Cancer: Mechanisms of Action and Molecular Targets. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 18, p. 9926, 14 set. 2021.
- JAFFE, E. A. et al. Culture of Human Endothelial Cells Derived from Umbilical Veins. IDENTIFICATION BY MORPHOLOGIC AND IMMUNOLOGIC CRITERIA. **Journal of Clinical Investigation**, v. 52, n. 11, p. 2745–2756, 1 nov. 1973.
- JOÃO, C. et al. Implantes dentários em zircônia: uma alternativa para o presente ou para o futuro? (Parte II). **Dental Press Implantology**, 2012.
- KOHAL, R. et al. One-piece zirconia oral implants for single-tooth replacement: Three-year results from a long-term prospective cohort study. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 45, n. 1, p. 114–124, jan. 2018.
- LI, B. et al. Synergistic Effects of Vascular Endothelial Growth Factor on Bone Morphogenetic Proteins Induced Bone Formation In Vivo: Influencing Factors and Future Research Directions. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 1–11, 2016.
- 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, p. 163–171, jul. 2019.
- MARTINS, B. R. et al. PI3K/AKT signaling drives titanium-induced angiogenic stimulus. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 32, n. 1, p. 18, jan. 2021.

- MARTINS, L. M. et al. Comportamento biomecânico das cerâmicas odontológicas: revisão. **Cerâmica**, v. 56, n. 338, p. 148–155, jun. 2010.
- MEDINA-LEYTE, D. J. et al. Use of Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) as a Model to Study Cardiovascular Disease: A Review. **Applied Sciences**, v. 10, n. 3, p. 938, 31 jan. 2020.
- MEV_Apostila.pdf**, [s.d.].
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, dez. 1983.
- OHASHI, K. Roles of cofilin in development and its mechanisms of regulation. **Development, Growth & Differentiation**, v. 57, n. 4, p. 275–290, maio 2015.
- PARMIGIANI-IZQUIERDO, J. M. et al. Zirconia implants and peek restorations for the replacement of upper molars. **International Journal of Implant Dentistry**, v. 3, n. 1, p. 5, dez. 2017.
- PEREIRA, A. L. A. et al. O papel das proteínas da matriz extracelular e das metaloproteinases em carcinomas de cabeça e pescoço: uma atualização bibliográfica. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 71, n. 1, p. 81–86, fev. 2005.
- PEREIRA, I. A. Osteoporose e Erosões Ósseas .ocais na Artrite Reumatóide: da Patogênese ao Tratamento(*). v. 44, n. 5, 2004.
- 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. **Química Nova**, 2015.
- RADY, A. A. M. et al. The role of VEGF and BMP-2 in stimulation of bone healing with using hybrid bio-composite scaffolds coated implants in animal model. **Bulletin of the National Research Centre**, v. 44, n. 1, p. 131, dez. 2020.
- RAMASAMY, S. K. et al. Endothelial Notch activity promotes angiogenesis and osteogenesis in bone. **Nature**, v. 507, n. 7492, p. 376–380, 20 mar. 2014.
- RATNER, B. D. (ED.). **Biomaterials science: an introduction to materials in medicine**. San Diego: Academic Press, 1996.
- ROSSI, M. C. EFEITOS BIOLÓGICOS INDIRETOS DISPARADOS POR IMPLANTES DENTÁRIOS COMERCIAIS EM OSTEÓBLASTOS: ESTUDO IN VITRO. 2014.
- S. WIMARDHANI, Y. et al. Chitosan exerts anticancer activity through induction of apoptosis and cell cycle arrest in oral cancer cells. **Journal of Oral Science**, v. 56, n. 2, p. 119–126, 2014.
- SANTOS, M. I.; REIS, R. L. Vascularization in Bone Tissue Engineering: Physiology, Current Strategies, Major Hurdles and Future Challenges. **Macromolecular Bioscience**, v. 10, n. 1, p. 12–27, 11 jan. 2010.
- SCARANO, A. et al. Bone Response to Zirconia Ceramic Implants: An Experimental Study in Rabbits. **Journal of Oral Implantology**, v. 29, n. 1, p. 8–12, fev. 2003.

- SIMUNOVIC, F.; FINKENZELLER, G. Vascularization Strategies in Bone Tissue Engineering. **Cells**, v. 10, n. 7, p. 1749, 11 jul. 2021.
- SINHORETI, M. A. C.; VITTI, R. P.; CORRER-SOBRINHO, L. Biomateriais na Odontologia: panorama atual e perspectivas futuras. 2013.
- SONG, M.; FINLEY, S. D. Mechanistic insight into activation of MAPK signaling by pro-angiogenic factors. **BMC Systems Biology**, v. 12, n. 1, p. 145, dez. 2018.
- ŠROMOVÁ, V.; SOBOLA, D.; KASPAR, P. A Brief Review of Bone Cell Function and Importance. **Cells**, v. 12, n. 21, p. 2576, 5 nov. 2023.
- TRELFORD, C. B.; DAGNINO, L.; DI GUGLIELMO, G. M. Transforming growth factor- β in tumour development. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 9, p. 991612, 4 out. 2022.
- VIEIRA, J. G. H. Considerações sobre os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo e sua utilidade prática. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 43, n. 6, p. 415–422, dez. 1999.
- VINILA, V. S. et al. X-Ray Diffraction Analysis of Nano Crystalline Ceramic PbBaTiO_3 ; **Crystal Structure Theory and Applications**, v. 03, n. 03, p. 57–65, 2014.
- WANG, J. et al. Good Biocompatibility and Sintering Properties of Zirconia Nanoparticles Synthesized via Vapor-phase Hydrolysis. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 35020, 11 out. 2016.
- WOOD, P. F. et al. The Action of Angiocrine Molecules Sourced from Mechanotransduction-Related Endothelial Cell Partially Explain the Successful of Titanium in Osseointegration. **Journal of Functional Biomaterials**, v. 14, n. 8, p. 415, 8 ago. 2023.
- ZAMBUZZI, W. F. et al. Intracellular signal transduction as a factor in the development of “Smart” biomaterials for bone tissue engineering. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 108, n. 6, p. 1246–1250, jun. 2011.
- ZAMBUZZI, W. F.; MILANI, R.; TETI, A. Expanding the role of Src and protein-tyrosine phosphatases balance in modulating osteoblast metabolism: Lessons from mice. **Biochimie**, v. 92, n. 4, p. 327–332, abr. 2010.
- ZANELATO, C. B.; GUIMARÃES, W. D. S. IMPLANTES DE ZIRCÔNIA NA ODONTOLOGIA: REVISÃO DE LITERATURA. 2016.
- ZHAO, Z. et al. Human Periodontal Ligament Stem Cell and Umbilical Vein Endothelial Cell Co-Culture to Prevascularize Scaffolds for Angiogenic and Osteogenic Tissue Engineering. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 22, p. 12363, 16 nov. 2021.
- ZIMTA, A.-A. et al. The Role of Angiogenesis and Pro-Angiogenic Exosomes in Regenerative Dentistry. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 2, p. 406, 18 jan. 2019.