

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Júlio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

EFEITOS DOS BIOMATERIAIS CERÂMICOS EM CÉLULAS ÓSSEAS

VITORIA REGINA DIAS FLORIANO

WILLIAN FERNANDO ZAMBUZZI

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Biotecnologia, Campus de Botucatu,
UNESP, para obtenção de Bacharel em Ciências
Biomédicas.

F635e	Floriano, Vitoria Regina Dias Efeitos dos biomateriais cerâmicos em células ósseas / Vitoria Regina Dias Floriano. -- Botucatu, 2025 27 p. : il., tabs. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biomédicas) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Botucatu Orientador: Willian Fernando Zambuzzi Coorientador: Gerson Santos de Almeida 1. Fosfatos de cálcio. 2. Regeneração óssea. 3. Biomateriais. I. Título.
-------	---

VITORIA REGINA DIAS FLORIANO

EFEITOS DOS BIOMATERIAIS CERÂMICOS EM CÉLULAS ÓSSEAS

Trabalho de Conclusão de Curso,
apresentado a Universidade Estadual
Paulista, como parte das exigências para
a obtenção do título de Bacharel, do curso
de Graduação em Ciências Biomédicas.

Botucatu, 10 de dezembro de 2025.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Willian Fernando Zambuzzi
Instituto de Biociências de Botucatu

Dr. Gerson Santos de Almeida
Instituto de Biociências de Botucatu

AGRADECIMENTOS

Agradeço a cada pessoa que viveu comigo, mesmo que fisicamente distante, a realização desse sonho.

Aos meus pais, Nelson e Helena Floriano, por serem meu porto seguro e o lembrete diário de que cada passo dessa caminhada vale a pena. Sem vocês nada disso teria sentido.

As minhas irmãs e ao meu irmão que foram meus primeiros amigos e estão sempre torcendo por mim, mesmo que a distância física exista.

Agradeço as amizades que cultivei nessa Instituição e que tornaram o meu caminhar mais leve, mesmo nos momentos mais difíceis.

As amizades que fiz no “Clube da Luta” que me apoiaram e incentivaram, sempre trazendo uma dose de humor.

Agradeço a cada integrante do Laboratório de Bioensaios e Dinâmica Celular pelo acolhimento e por cada ensinamento ao longo da minha trajetória acadêmica.

Ao Prof Dr. Willian Zambuzzi e ao Dr. Gerson Almeida pelos ensinamentos e orientação durante essa trajetória.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
1.1	Tecido ósseo.....	8
1.1.2	Células e remodelamento ósseo.....	8
1.2	Medicina regenerativa.....	10
1.3	Biomateriais	11
1.3.1	Hidroxiapatita (HA)	11
1.3.2	Monetita (CaP).....	12
1.3.3	β -fosfato tricálcico (β -TCP)	12
2	OBJETIVO	12
3	METODOLOGIA	13
3.1	Reagentes.....	13
3.2	Cultura celular.....	13
3.3	Meio condicionado.....	13
3.4	Viabilidade e adesão celular	14
3.5	Extração de mRNA e análise de RT-qPCR	14
3.6	Zimografia.....	15
3.7	Análises estatísticas	16
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
4.1	Avaliação da viabilidade e adesão celular em resposta aos biomateriais.....	17
4.2	Dinâmica da expressão de Runx2, BSP e osteocalcina durante a diferenciação osteoblástica	18
4.3	Perfil angiogênico e implicações para integração tecidual	21
4.4	Atividade das Metalloproteinases MMP-2 e MMP-9.....	22
5	CONCLUSÃO	23
	REFERÊNCIAS	25

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-Tipos de tecido conjuntivo	8
Figura 2 - Representação da distribuição de células osséas	9
Figura 3- Esquema dos métodos de interação entre os biomateriais HA, CaP e TCP em células pré-osteoblásticas. No meio condicionado, os materiais foram incubados em meio α -MEM sem soro por 3 dias e 7 dias, liberando moléculas que foram utilizadas para tratar as células. Após o experimento, as amostras foram coletadas para a realização da análise molecular, que foram: Zimografia e PCR, Análises Estatísticas.....	14
Figura 4- Análises de viabilidade e adesão celular em MC3T3 tratadas com CTRL, HA, CaP e β -TCP. A viabilidade celular foi avaliada pelos ensaios de MTT após 24 h (a) e 72 h (c), enquanto a adesão celular foi analisada pelo ensaio de Cristal Violeta após 24 h (b). Os dados de absorbância foram normalizados em relação ao grupo controle e apresentados como média $\pm$ desvio-padrão. A análise estatística foi realizada por ANOVA, considerando diferenças estatisticamente significativas quando $p < 0,05$	18
Figura 5- Gráficos de expressão gênica por PCR (Runx2, BSP, Osteocalcina, VEGF) em MC3T3 tratadas com CTRL, HA, CaP e β -TCP (3 e 7 dias). Os genes osteogênicos e angiogênicos modulam a resposta das células osteoblásticas humanas durante a mineralização. Após 3 e 7 dias de cultivo, as células osteoblásticas foram coletadas para investigar a expressão de Runx2, BSP, osteocalcina e VEGF (a–d) por RT-qPCR. Para a normalização das análises moleculares, o β -ACTINA foi considerado como gene endógeno. Os dados foram apresentados como média $\pm$ desvio-padrão e analisados por ANOVA. Diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando comparados ao grupo controle para: $p < 0,0332$ (*); $p < 0,0021$ (**); $p < 0,0002$ (***); $p < 0,0001$ (****).	20
Figura 6- Gráficos de expressão gênica por PCR (VEGF) em células MC3T3 tratadas com CTRL, HA, CaP e β -TCP (3 e 7 dias). O gene angiogênico VEGF modula a resposta das células osteoblásticas durante a mineralização. Após 3 e 7 dias de cultivo, as células foram coletadas para análise da expressão de VEGF (a–b) por RT-qPCR. Para a normalização das análises moleculares, o β -ACTINA foi utilizado como gene endógeno. Os dados foram apresentados como média $\pm$ desvio-padrão e analisados por ANOVA. Diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando comparados ao grupo controle para: $p < 0,0332$ (); $p < 0,0021$ (); $p < 0,0002$ (); $p < 0,0001$ (****).	21
Figura 7- Remodelação da MEC. (a.) Zimografia para MMP2 (~72 kDa) e MMP9 (~92 kDa) em 7 dias: CTRL, HA, CaP e β -TCP.. Remodelação da MEC. As células permaneceram em meio enriquecido com HA, CaP e β -TCP, separadamente, por 7 dias. Após esse período, o meio foi coletado para investigar o perfil da atividade das Metalloproteinas por Zimografia, analisamos os genes MMP2 (a), MMP9 (b). A partir da análise de densitometria das bandas, verificamos o perfil de MMP-2 e MMP-9. As análises de expressão de $\Delta\Delta Ct$ foram comparadas e normalizadas por um gene endógeno, β -ACTINA. Os dados foram apresentados como média $\pm$ desvio-padrão e analisados por ANOVA. Diferença estatística quando comparados ao grupo controle: $p < 0,0332$ (*); $p < 0,0021$ (**); $p < 0,0002$ (***); $p < 0,0001$ (****).	23

LISTA DE TABELA

Tabela 1- Sequências de expressão de primer e condições do ciclo de PCR.	15
--	----

RESUMO

Os biomateriais cerâmicos à base de fosfato de cálcio, como a hidroxiapatita (HA), a monetita (CaP) e o β -fosfato tricálcico (β -TCP), têm se destacado na medicina regenerativa devido à sua biocompatibilidade e capacidade de induzir osteogênese. Os fosfatos de cálcio por sua semelhança com a fase mineral do osso, são comumente utilizados para preenchimento de lesões ósseas, revestimentos de estruturas metálicas e na composição de biotintas e *scaffolds* para regeneração óssea. Este estudo avaliou o efeito desses biomateriais em células pré-osteoblásticas de camundongo (MC3T3-E1), com foco na regulação de genes relacionados à diferenciação osteoblástica, angiogênese e remodelação da matriz extracelular. Foram utilizados modelos experimentais de meio condicionado, seguidos de análises moleculares como RT-qPCR e zimografia, para investigar marcadores osteogênicos (Runx2, BSP, osteocalcina), angiogênicos (VEGF) e metaloproteinases (MMP-2 e MMP-9). Os resultados demonstraram que CaP e β -TCP favorecem eventos iniciais de remodelação e diferenciação, enquanto a HA apresenta maior impacto em fases tardias de mineralização. Conclui-se que os fosfatos de cálcio modulam a osteogênese de forma tempo-dependente, reforçando seu potencial como biomateriais promissores para aplicações em regeneração óssea.

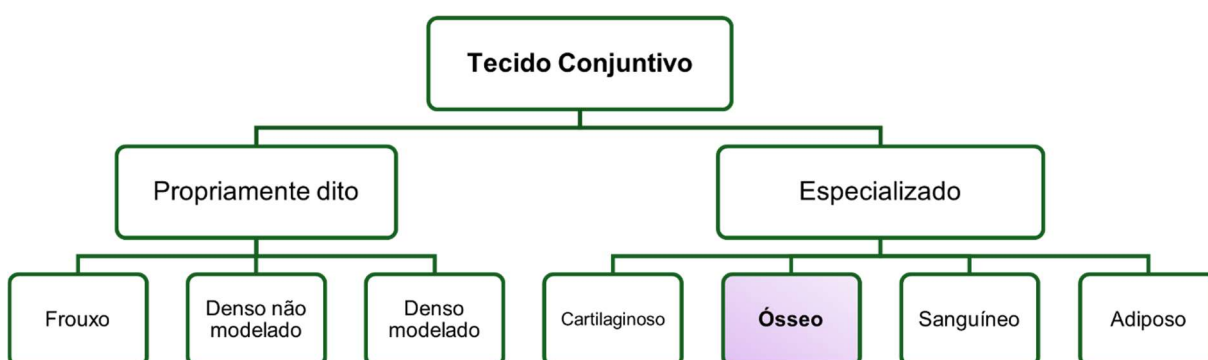
Palavras-Chaves: Fosfatos de cálcio; regeneração óssea; biomateriais.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Tecido ósseo

O tecido ósseo é um tipo especializado de tecido conjuntivo (**Figura 1**) que se destaca por sua rigidez e resistência a deformações e torções. Os ossos são órgãos metabolicamente ativos, passando por processos de remodelação contínua ao longo da vida (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2023).

Figura 1-Tipos de tecido conjuntivo



Fonte: elaborada pela autora, 2025.

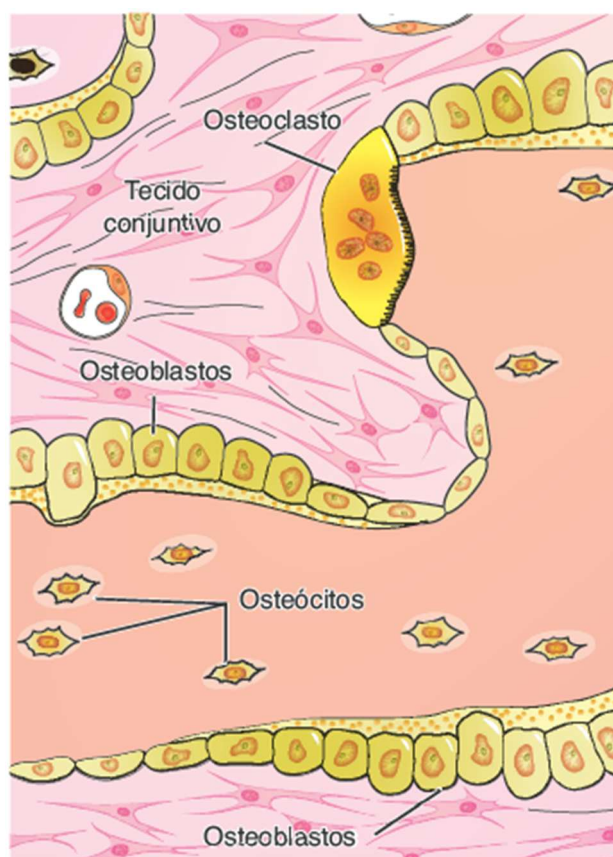
Esse tecido é composto por uma parte orgânica e uma inorgânica. Sua fração orgânica é formada principalmente por fibras de colágeno, glicoproteínas, proteoglicanos e quatro tipos principais de células: osteoblastos, osteócitos, osteoclastos e células osteoprogenitoras. A porção inorgânica, por sua vez, é constituída principalmente por nanocristais de hidroxiapatita, que resultam da interação entre fosfatos de cálcio e hidroxilas de cálcio, que confere ao osso a rigidez e resistência mecânica características (IAQUINTA et al., 2019; SOUNDARYA et al., 2018).

1.1.2 Células e remodelamento ósseo

As células ósseas são agrupadas em duas linhagens principais. A linhagem osteoblástica contempla as células osteoprogenitoras e dá origem aos osteoblastos e osteócitos, enquanto a linhagem osteoclástica é formada por precursores provenientes da medula hematopoética. As células osteoprogenitoras são precursoras de osteoblastos e participam de forma ativa da renovação óssea. Os osteoblastos sofrem diferenciação mediada principalmente pelo fator de transcrição Runx2, e são responsáveis pela formação da matriz óssea por meio da síntese e

secreção de componentes orgânicos, como colágeno, proteínas não colágenas, glicosaminoglicanos, proteoglicanos e glicoproteínas. Além disso, são os responsáveis pela produção de fatores de crescimento que favorecem a mineralização através da deposição de fosfato de cálcio. Os osteoblastos e as células osteoprogenitoras são as células distribuídas através da superfície óssea, tendo como função o revestimento da mesma. Uma vez incorporado a matriz, os osteoblastos passam por processo de diferenciação, se tornando osteócitos. Essas células são essenciais para manutenção do tecido, além de serem responsáveis pela comunicação celular. Os osteoclastos, por sua vez, tem origem nos precursores hematopoiéticos, e sua função é a reabsorção da matriz óssea. Eles atuam de forma regulada conforme a necessidade do tecido, e podem ficar apoiados na superfície externa ou interna do tecido ósseo (**Figura 2**) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2023; TSUKASAKI; TAKAYANAGI, 2019).

Figura 2 - Representação da distribuição de células ósseas



Fonte: (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2023).

A remodelação óssea é um processo necessário que reorganiza a estrutura com a finalidade atender as diversas necessidades do corpo. É necessário que exista um equilíbrio

contínuo entre a deposição e a reabsorção óssea para que tudo ocorra de forma eficiente. Esse processo é dependente de mecanismos fisiológicos complexos, tendo como protagonistas os osteoblastos, responsáveis pela formação óssea; os osteoclastos, que realizam a absorção; e osteócitos, que regulam o fluxo de fluidos e a transmissão de sinais sobre a fisiologia óssea (PONZETTI; RUCCI, 2021; ROWE; KOLLER; SHARMA, 2018).

Além das células, alguns hormônios possuem papel fundamental na regulação desse mecanismo. O hormônio da paratireoide (PTH) é o principal regulador do cálcio sérico, e sua liberação é dependente da hipocalcemia, que estimula a atividade osteoclástica por meio do aumento da atividade do receptor RANKL. Em contrapartida, a calcitonina, produzida pelas células C da tireoide, inibe a reabsorção óssea em resposta à hipercalcemia se ligando aos receptores de calcitonina nos osteoclastos. A deficiência de estrogênio estimula a remodelação óssea fazendo com que a atividade dos osteoclastos seja superior à dos osteoblastos, o que resulta na redução da massa óssea. O hormônio do crescimento (GH) estimula a proliferação e atividade de osteoblastos, o que favorece a formação e reabsorção óssea direta e indiretamente via fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs). Por fim, os hormônios tireoidianos (T3 e T4) atua em osteoblastos e osteoclastos, modulando a atividade dessas células, o que pode acelerar ou reduzir a remodelação conforme seus níveis circulantes (ROWE; KOLLER; SHARMA, 2018).

1.2 Medicina regenerativa

O impacto de doenças degenerativas tem sido crescente, o que acentua a necessidade de busca por métodos alternativos que sejam eficazes no processo de reparação óssea. Nesse sentido, a medicina regenerativa surge como um campo promissor. Entre essas doenças, se destaca a osteoporose, que apresenta um elevado risco de fraturas devido a fragilidade causada pela considerável perda óssea. Apesar de geralmente ser associada com o processo de envelhecimento, a osteoporose também pode ser consequência de falhas no processo de remodelação e reparação óssea. Essa doença tem uma prevalência alta com o aumento da idade e o estimado é que aproximadamente 50% da população feminina e 20% da população masculina sofra com fraturas osteoporóticas após os 50 anos (CLINES, 2010; GORTER et al., 2021; HAKAMI, 2024; ZHANG et al., 2022). Diante disso, busca-se desenvolver tratamentos acessíveis que proporcionem uma cicatrização óssea completa e adequada, a fim de garantir a homeostase do corpo e qualidade de vida.

Nesse contexto, a medicina regenerativa atua com o objetivo de estimular a capacidade de reparação tecidual através de técnicas inovadoras, como o uso de biomateriais e a engenharia

de tecidos, buscando reduzir a necessidade de fármacos e próteses (PORCELLINI, 2009; NII; KATAYAMA, 2021).

Considerando que o componente inorgânico do osso é formado majoritariamente por fosfato de cálcio, a busca por biomateriais a base de fosfato de cálcio tem demonstrado grande potencial na regeneração óssea, uma vez que apresentam boa capacidade de osteocondução e osteoindução, processos essenciais para o crescimento e para a mineralização óssea, respectivamente (CHEN et al., 2023; JEONG, 2019).

1.3 Biomateriais

Os biomateriais se destacam por apresentar características essenciais para a implantação: biocompatibilidade, resistência mecânica e capacidade de reabsorção controlada, evitando processos inflamatórios e rejeição ao corpo estranho (BELLUOMO; KHODAEI; AMIN YAVARI, 2023; LI; SUN, 2022).

Considerando esses critérios, as cerâmicas à base de fosfato de cálcio surgem como biomateriais adequados pois além de apresentarem propriedades osteocondutoras e osteoindutoras, auxiliam na diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais. Seu mecanismo de ação envolve a degradação do material que, por sua vez, libera íons cálcio e fosfato no meio local, estimulando a formação de minerais ósseos. Esse processo também modula a expressão de marcadores de diferenciação osteoblástica, como Runx2, um fator de transcrição essencial para a diferenciação de osteoblastos; BMPs, proteínas morfogenéticas ósseas fundamentais para a regeneração; e osteocalcina, um marcador bioquímico do processo de osteogênese (JEONG et al., 2019).

Esses mecanismos justificam a utilização dos fosfatos de cálcio como uma das principais classes de biocerâmicas utilizadas na regeneração óssea. As biocerâmicas são desenvolvidas especificamente para aplicações médicas, sendo classificadas como bionertes, bioativas e biodegradáveis (CINICI et al., 2024; KAWACHI et al., 2000). Entre as biodegradáveis estão os fosfatos de cálcio, que apresentam microporosidade, o que contribui para a absorção e incorporação ao tecido original, resultando na formação de um novo tecido (DALLABRIDA et al., 2018).

1.3.1 Hidroxiapatita (HA)

Além de ser o principal componente mineral do tecido ósseo, a hidroxiapatita (HA), representada pela fórmula molecular $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, pode ser fabricada de forma artificial, sendo utilizada como biocerâmica para tratamentos ósseos. Devido à similaridade com os

minerais que constituem os dentes e ossos humanos, a HA é um fosfato de cálcio que se destaca pela maior biocompatibilidade dentre os biomateriais cerâmicos. Suas características de interesse incluem a ausência de reações alergênicas, tóxicas e carcinogênicas (TAGLIARI et al., 2023; TRZASKOWSKA; VIVCHARENKO; PRZEKORA, 2023).

1.3.2 Monetita (CaP)

A monetita (CaP), também chamada de fosfato dicálcico anidro (CaHPO_4), é a forma anidra do cimento conhecido como brushita ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). A CaP tem se destacado por sua estabilidade e por favorecer a formação óssea, preservando a estabilidade mecânica (ZHOU et al., 2021). Quando é autoclavada e submetida a tratamentos térmicos, a brushita é convertida em monetita devido à alteração da estrutura cristalina e, conseqüentemente, de suas propriedades físicas (MOTAMENI; ALSHEMARY; EVIS, 2021).

1.3.3 β -fosfato tricálcico (β -TCP)

O fosfato tricálcico (TCP) possui duas formas polimórficas: α -TCP, que é formado a 1125 °C ou mais; e o β -TCP, que é formado em um intervalo entre 900 e 1100 °C. O β -TCP, representado pela fórmula química $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, é o objeto de interesse na regeneração óssea por apresentar maior estabilidade, além de promover a proliferação de células osteoprecursoras, como osteoblastos e células estromais da medula óssea (JEONG et al., 2019).

2 OBJETIVO

Avaliar os efeitos de diferentes fosfatos de cálcio em células de pré-osteoblastos de camundongo, a fim de compreender sua atuação nos processos celulares relacionados à osteogênese e ao potencial desses biomateriais para aplicações em regeneração óssea.

3 METODOLOGIA

3.1 Reagentes

Todas as placas e frascos de cultura celular foram adquiridos da TPP (Trasadingen, Suíça) e os meios nutricionais para experimentos celulares da Nutricell (Campinas, São Paulo, Brasil). Para a técnica de qPCR, os primers foram adquiridos da Exxtend Oligo Solutions (Paulínia, São Paulo, Brasil), o SYBR Green Master Mix foi adquirido da PROMEGA (Madison, Wisconsin, EUA). Todos os produtos químicos de grau analítico foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

3.2 Cultura celular

Células de pré-osteoblastos de camundongos (MC3T3-E1) foram cultivadas em meio Alpha MEM suplementado com antibióticos (100U/ml penicilina, 100mg/ml estreptomicina), e 10% de Soro Fetal Bovino (SFB, Laborclin, Pinhais, PR, Brazil). As células foram mantidas a 37°C e à atmosfera de 5% de CO₂.

3.3 Meio condicionado

Foram utilizados 3 biomateriais cerâmicos (hidroxiapatita, monetita e beta-fosfato tricálcico) (Sigma-Aldrich) para condicionar o meio de cultura, seguindo a ISO 10993 (0.2 g/mL). O meio de cultura foi condicionado por 24 horas, seguido de suplementação com Soro Fetal Bovino (10%).

Após a subcultura, as células foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) e posteriormente foram tripsinizadas e semeadas em placas de 24 e 96 poços. Após a confluência as células foram tratadas com o meio condicionado pelos materiais e cultivadas por 3 e 7 dias, quando as amostras foram coletadas para os experimentos. Como grupo controle, as células foram cultivadas com o meio padrão de cultura,

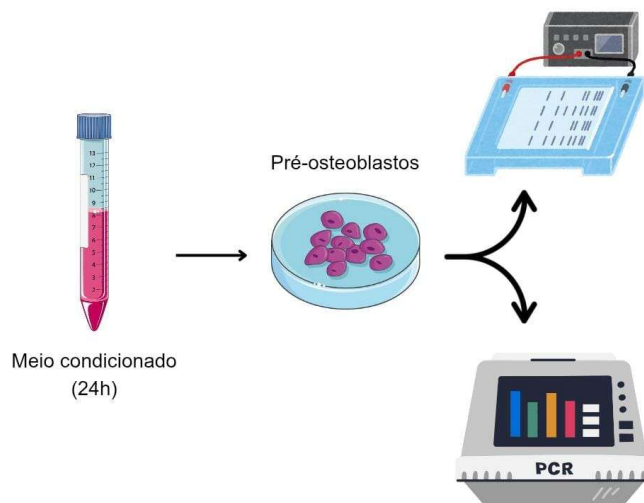


Figura 3- Esquema dos métodos de interação entre os biomateriais HA, CaP e TCP em células pré-osteoblásticas. No meio condicionado, os materiais foram incubados em meio α -MEM sem soro por 24 horas, liberando partículas e moléculas que foram utilizadas para tratar as células por 3 e 7 dias. Após o experimento, as amostras foram coletadas para a realização da análise molecular, que foram: Zimografia e PCR, Análises Estatísticas.

3.4 Viabilidade e adesão celular

As células foram semeadas a 5×10^4 células por mL em placas de 96 poços. Após a adesão celular, as células foram tratadas por 24 horas com o meio condicionado, e a viabilidade celular e adesão celular foram avaliadas.

Para determinar a viabilidade celular, o meio de cultura condicionado foi retirado (após 24 e 72 horas) e um meio contendo MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) foi adicionado. Após 3 horas, esse meio foi retirado para que o formazan produzido fosse diluído em DMSO, o qual foi medido em leitor de microplacas (SYNERGY-HTX multi-mode reader, Biotek, USA) a absorvância de 570 nm em relação ao grupo controle.

Na avaliação de adesão celular, o ensaio utilizado foi o Cristal Violeta. Após 24 horas o meio utilizado para tratar as células foi removido, e elas foram lavadas duas vezes com PBS aquecido. Em seguida, adicionou-se 100 μ L da solução fixadora de etanol e ácido acético (3:1) por 10 minutos. Após a fixação, os poços receberam 100 μ L da solução de Cristal Violeta a 0,1% por mais 10 minutos. O excesso de corante foi removido por lavagem com água destilada. Após secagem, o corante retido foi solubilizado com 100 μ L de ácido acético 10%. Uma coluna adicional contendo apenas o solvente foi utilizada como branco. A absorvância foi lida a 540 nm no leitor de microplacas (SYNERGY-HTX multi-mode reader, Biotek, USA). Os valores foram normalizados em relação ao grupo controle.

3.5 Extração de mRNA e análise de RT-qPCR

Após o tratamento com o meio condicionado e seu respectivo grupo-controle, as células foram submetidas a rotina de extração de mRNA, para investigação de transcritos (Runx2, BSP,

osteocalcina, VEGF) envolvidos com o fenótipo osteogênico. Assim, as células foram coletadas, homogeneizadas em TRIzol® e armazenadas em biofreezer a -80°C. Para isolar o RNA total foi utilizado o método TRIzol®/Clorofórmio/Isopropanol, de acordo com as especificações do fabricante. A quantidade e pureza do RNA extraído foram estimadas em aparelho de espectrofotometria, utilizando as razões OD 260/280 ($\geq 1,8$) e OD 260/230 ($\geq 1,0$) (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, Uniscience). A transcrição reversa dos RNAs foi realizada com o kit SuperScript First Strand.

As reações para o estudo do padrão de expressão de genes relacionados à diferenciação osteoblástica foram realizadas em triplicata utilizando SYBR Green I Master (LightCycler® 480, Roche Applied Science) e iniciadores específicos (Primers). Para o cálculo da quantidade relativa foi utilizado o método limiar crítico comparativo $2^{-\Delta Ct}$, sendo os resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão de 3 experimento independentes realizados em duplicata e como controle interno o gene β -Actina.

Tabela 1- Sequências de expressão de primer e condições do ciclo de PCR.

GENE	PRIMER	5'-3' SEQUENCE	REACTION CONDITION
RUNX2	Forward	GGA CGA GGC AAG AGT TTC A	55.2 e 57.3°C
	Reverse	TGG TGC AGA GTT CAG GGA G	
BSP	Forward	GTA CCG GCC ACG CTA CTT TCT	59.5 e 57.5°C
	Reverse	GTT GAC CGC CAG CTC GTT TT	
OSTEOCALCINA (OTC)	Forward	AGA CTC CGG CGC TAC CTT	57.2 e 57.6°C
	Reverse	CTC GTC ACA AGC AGG GTT AAG	
VEGF	Forward	CCA CGT CAG AGA GCA ACA TCA	66.5 e 65.00°C
	Reverse	TCA TTC TCT CTA TGT GCT GGC TTT	

3.6 Zimografia

O meio de cultura condicionado foi centrifugado a 14000 rpm por 15 min e a concentração proteica foi determinada pelo método de Lowry (Lowry et al., 1951). Aplicou-se 100ug de proteína em um gel de poliacrilamida a 12% contendo 4% de gelatina. Determinou-se a atividade gelatinolítica das proteínas envolvidas, através da renaturação utilizando solução aquosa de Triton X-100 (2%p/v) 3h sob agitação à 37°C, e tampão de proteólise (Tris CaCl₂) incubado por 18h também a 37°C. Em seguida, o gel foi corado com solução corante de Coomassie Blue R-250 0,05% por 3 h (Shapiro et al., 2001). Posteriormente, o gel foi lavado em solução de metanol a 30% (v/v) e ácido acético glacial a 10% (v/v). A coloração oposta foi obtida nos géis exatamente onde havia a atividade gelatinolítica (bandas) de MMP-2 (~62kDa)

e MMP-9 (~84kDa), e então eles foram analisados usando o software ImageJ (Bethesda, MD) estudo (LEFEBVRE; PEETERS-JORIS; VAES, 1991).

3.7 Análises estatísticas

Gráficos e testes estatísticos foram realizados no GraphPad Prism. Os testes estatísticos foram escolhidos de acordo com o desenho de cada experimento, sendo sempre observadas a normalidade e a homocedasticidade dos dados utilizando o teste de Shapiro-Wilk e o teste de Levene (ou Bartlett). Os valores significativos foram considerados para $P < 0.05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação da viabilidade e adesão celular em resposta aos biomateriais

Para investigar a resposta funcional inicial da MC3T3-E1 em resposta aos biomateriais, foi realizada a avaliação de viabilidade celular através do ensaio de MTT (24 e 72 horas) e a adesão das células pela coloração de Cristal Violeta (24 horas) nos grupos controle, CaP, HA e β -TCP.

O ensaio de MTT se baseia na redução do sal tetrazólio pela atividade das desidrogenases mitocondriais, formando cristais de formazan cuja absorbância é proporcional ao número de células viáveis (GHASEMI et al., 2021). Já o ensaio de CV quantifica a adesão celular a partir da retenção do corante ligado ao DNA, permitindo estimar o número de células aderidas à superfície do poço (FEOKTISTOVA; GESERICK; LEVERKUS, 2016).

Após 24 horas, o MTT revelou aumento significativo da viabilidade no grupo β -TCP (**Figura 4a**), indicando que esse biomaterial favorece a atividade metabólica inicial de MC3T3-E1. Os grupos HA e CaP não apresentaram diferença significativa, o que sugere que seus efeitos sobre o metabolismo celular não são imediatos.

A análise de adesão celular pelo ensaio de Cristal Violeta (**Figura 4b**) mostrou diferença significativa em todos os grupos quando comparados ao controle. Esse aumento global da adesão sugere que os três biomateriais estudados fornecem uma superfície favorável à fixação inicial das MC3T3-E1 nos primeiros momentos. O comportamento semelhante entre HA, CaP e β -TCP nesse ensaio sugere que, independentemente da taxa de reabsorção, a composição mineral é suficiente para sustentar a adesão celular.

Após 72 horas, o ensaio de MTT (**Figura 4c**) evidenciou aumento significativo da viabilidade no grupo HA, enquanto os demais grupos apresentaram valores semelhantes ao controle. Esse resultado sugere que a HA, apesar de não estimular a atividade metabólica nas primeiras 24 horas, promove um ambiente mais favorável à manutenção e adaptação celular em períodos mais longos. A estabilidade superficial da HA pode favorecer a organização progressiva da matriz e um metabolismo celular mais estável ao longo do tempo.

De modo geral, os resultados funcionais obtidos pelos ensaios de MTT e Cristal Violeta indicam que os biomateriais modulam de forma distinta as etapas iniciais da resposta celular. Enquanto o β -TCP exerce efeito mais imediato sobre a atividade metabólica, os três materiais aumentam a adesão inicial, e a HA demonstra impacto mais tardio na viabilidade. Esses resultados iniciais sugerem que diferentes biomateriais modulam a atividade celular por

mecanismos associados à superfície e à liberação de íons, o que pode refletir em alterações posteriores na expressão de genes relacionados à osteogênese.

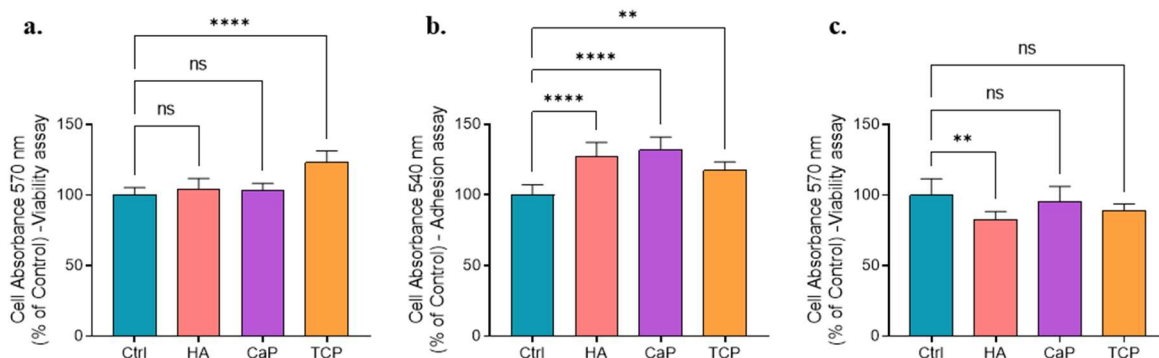


Figura 4- Análises de viabilidade e adesão celular em MC3T3 tratadas com CTRL, HA, CaP e β -TCP. A viabilidade celular foi avaliada pelos ensaios de MTT após 24 h (a) e 72 h (c), enquanto a adesão celular foi analisada pelo ensaio de Cristal Violeta após 24 h (b). Os dados de absorbância foram normalizados em relação ao grupo controle e apresentados como média $\pm$ desvio-padrão. A análise estatística foi realizada por ANOVA, considerando diferenças estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

4.2 Dinâmica da expressão de Runx2, BSP e osteocalcina durante a diferenciação osteoblástica

Para compreender os eventos iniciais da diferenciação osteoblástica, avaliou-se a expressão dos genes Runx2, BSP e osteocalcina (OCN) nos períodos de 3 e 7 dias, comparando os grupos controle, CaP, β -TCP e HA. A normalização foi realizada utilizando a expressão de β -actina como referência.

O gene Runx2 (**Figura 5a**), fator de transcrição essencial para a determinação da linhagem osteoblástica a partir de precursores mesenquimais, apresentou aumento significativo aos 3 dias nos grupos CaP e, principalmente, β -TCP, seguido por HA, em relação ao controle. Esse padrão indica ativação precoce do programa osteogênico. Aos 7 dias, observou-se redução da expressão de Runx2 (**Figura 5b**) em todos os grupos, comportamento esperado à medida que as células avançam para estágios mais maduros, uma vez que sua função está associada à regulação de genes da matriz óssea, como colágeno tipo I, osteopontina e osteocalcina (KOMORI, 2019; BRUDERER et al., 2014).

Em contrapartida, os genes BSP (**Figura 5c**) e OCN (**Figura 5d**), marcadores característicos de osteoblastos maduros, exibiram aumento expressivo aos 7 dias, especialmente nos grupos β -TCP e HA, seguidos por CaP. A BSP desempenha papel fundamental na nucleação de cristais de hidroxapatita, enquanto a osteocalcina contribui para a organização da matriz mineralizada (KOMORI, 2019; ARIFFIN et al., 2022). Esse padrão confirma a transição

para estágios tardios da osteogênese, associados à mineralização (SCHROEDER; JENSEN; WESTENDORF, 2005; ZHANG et al., 2024).

A elevação de BSP (**Figura 5e**) aos 7 dias reforça o avanço na formação da matriz óssea, considerando que essa proteína favorece a adesão dos osteoblastos à matriz em desenvolvimento. Evidências indicam que a BSP, juntamente com outras proteínas da família SIBLING, interage tanto com colágeno quanto com cálcio, promovendo o acoplamento entre matriz orgânica e depósito mineral. Esse papel é particularmente relevante em sistemas contendo fosfatos de cálcio, nos quais a superfície mineral pode facilitar a adsorção inicial de proteínas reguladoras (BERNARDS; QIN; JIANG, 2008). O aumento mais pronunciado no grupo CaP sugere que esse biomaterial cria um microambiente mais favorável à deposição proteica e ao início da mineralização, possivelmente devido à sua maior reatividade superficial.

De forma geral, a maior expressão dos genes osteogênicos nos grupos β -TCP e HA indica que biomateriais com maior capacidade de reabsorção ou interação com a matriz não apenas favorecem a remodelação inicial, mas também estimulam a maturação osteoblástica e a formação óssea.

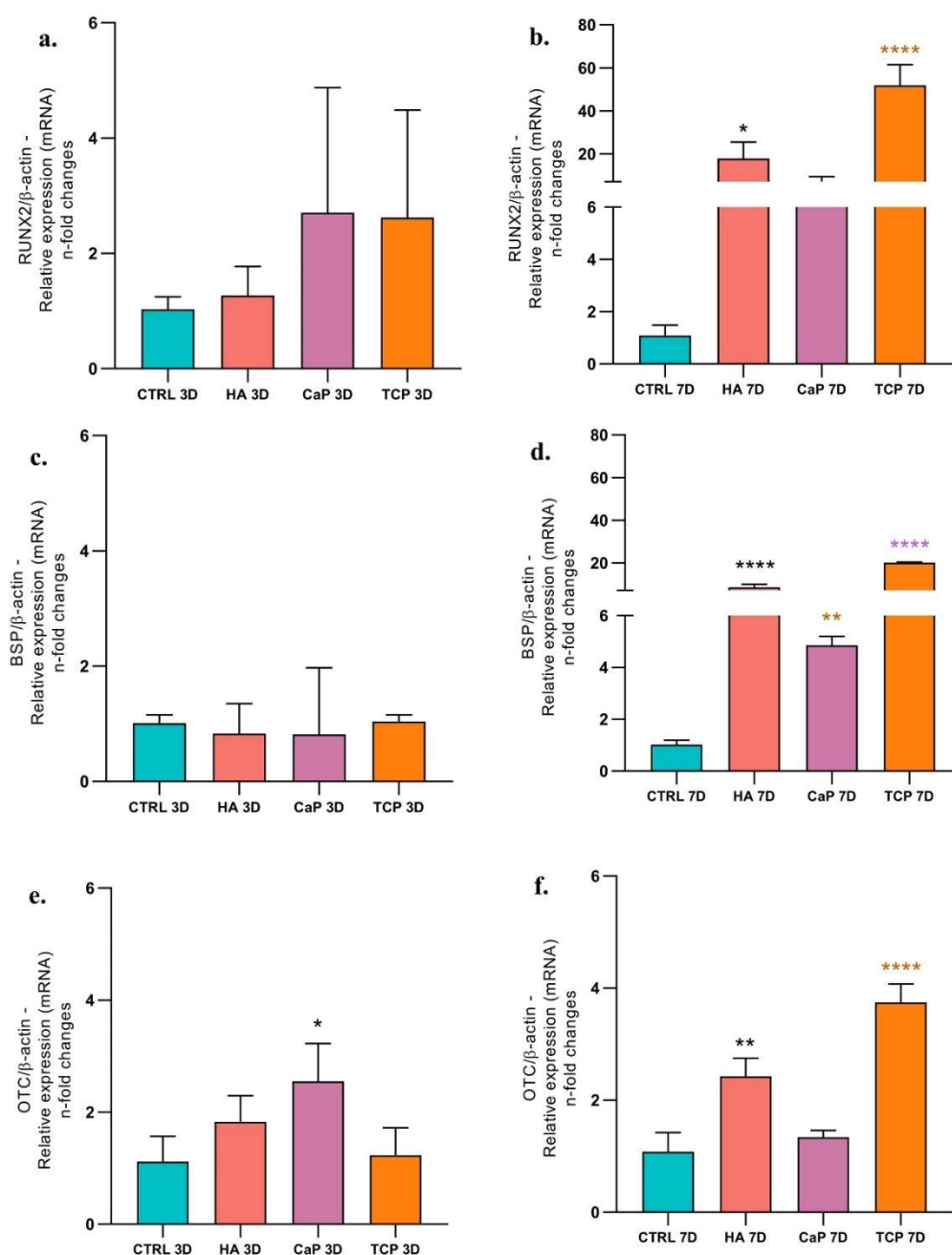


Figura 5 - Gráficos de expressão gênica por PCR (Runx2, BSP, Osteocalcina, VEGF) em MC3T3 tratadas com CTRL, HA, CaP e β -TCP (3 e 7 dias). Os genes osteogênicos e angiogênicos modulam a resposta das células osteoblásticas humanas durante a mineralização. Após 3 e 7 dias de cultivo, as células osteoblásticas foram coletadas para investigar a expressão de Runx2, BSP, osteocalcina e VEGF (a–d) por RT-qPCR. Para a normalização das análises moleculares, o β -ACTINA foi considerado como gene endógeno. Os dados foram apresentados como média $\pm$ desvio-padrão e analisados por ANOVA. Diferenças estatísticas foram consideradas

significativas quando comparados ao grupo controle para: $p < 0,0332$ (*); $p < 0,0021$ (**); $p < 0,0002$ (***); $p < 0,0001$ (****).

4.3 Perfil angiogênico e implicações para integração tecidual

A expressão de VEGF apresentou aumento significativo nos grupos CaP e β -TCP, indicando estímulo à angiogênese, processo essencial para o acoplamento angio-osteogênico e para o suprimento metabólico durante a regeneração óssea. A formação de novos vasos é crítica para sustentar a diferenciação e a atividade osteoblástica, garantindo aporte de nutrientes, oxigênio e células especializadas para o reparo tecidual (HU et al., 2016).

Além de sua função na formação vascular, o VEGF participa da conversão de regiões imaturas em matriz óssea, contribuindo para a progressão osteogênica. O aumento observado nos grupos HA e CaP sugere que esses biomateriais favorecem um microambiente propício à vascularização, etapa indispensável para consolidar as fases tardias da diferenciação, especialmente quando proteínas como BSP e osteocalcina encontram-se elevadas. Essa modulação positiva indica que, além de induzirem diferenciação osteoblástica, esses materiais podem otimizar a integração tecidual por meio da melhoria da nutrição, oxigenação e organização celular, promovendo uma regeneração óssea mais eficiente.

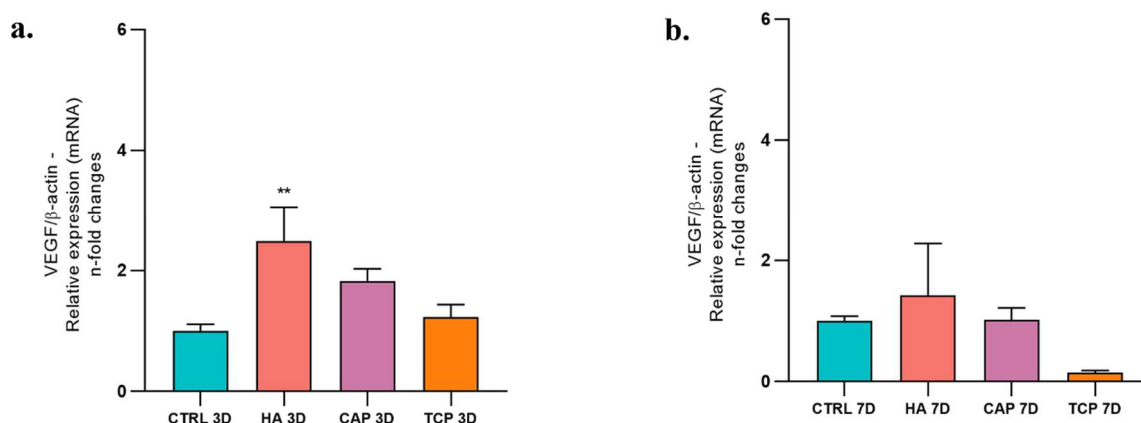


Figura 6- Gráficos de expressão gênica por PCR (VEGF) em células MC3T3 tratadas com CTRL, HA, CaP e β -TCP (3 e 7 dias). O gene angiogênico VEGF modula a resposta das células osteoblásticas durante a mineralização. Após 3 e 7 dias de cultivo, as células foram coletadas para análise da expressão de VEGF (a-b) por RT-qPCR. Para a normalização das análises moleculares, o β -Actina foi utilizado como gene endógeno. Os dados foram apresentados como média $\pm$ desvio-padrão e analisados por ANOVA. Diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando comparados ao grupo controle para: $p < 0,0332$ (); $p < 0,0021$ (); $p < 0,0002$ (); $p < 0,0001$ (****).

4.4 Atividade das Metalloproteinasas MMP-2 e MMP-9

As metalloproteinasas MMP-2 e MMP-9 desempenham funções essenciais na remodelação da matriz óssea, pois ambas são capazes de degradar componentes do colágeno tipo I, elemento fundamental para a organização e resistência do tecido ósseo. A literatura indica que a ausência ou redução dessas enzimas compromete propriedades estruturais e mecânicas do osso, reforçando seu papel na manutenção da qualidade tecidual.

A MMP-9 é expressa principalmente por osteoclastos, estando envolvida na remodelação inicial e no recrutamento celular durante o desenvolvimento e reparo ósseo. A MMP-2, por sua vez, é de origem osteoblástica e contribui para a organização da matriz não mineralizada. Além das funções diretas na degradação da matriz, essas gelatinases participam da ativação de fatores de crescimento, como o fator de crescimento transformador β (TGF- β), modulando processos de formação, reabsorção e remodelação óssea. Assim, a atividade combinada dessas enzimas influencia tanto o turnover quanto a estrutura final do tecido mineralizado (NYMAN et al., 2011).

Nos resultados obtidos por zimografia após 7 dias de exposição aos biomateriais, observou-se diferenças significativas entre os grupos. Para MMP-2, verificou-se maior atividade no grupo CaP, seguido por β -TCP, enquanto o grupo HA apresentou redução expressiva ($p < 0,0001$) em relação ao controle. Esse comportamento indica que materiais com maior capacidade de reabsorção, como CaP e β -TCP, estimulam processos iniciais de reorganização da matriz extracelular, favorecendo a adaptação celular e a preparação para mineralização.

Em relação à MMP-9, os grupos CaP e β -TCP também apresentaram atividade elevada ($p < 0,0001$) quando comparados ao controle, sugerindo que esses biomateriais promovem um ambiente mais dinâmico, capaz de estimular migração celular e diferenciação osteoblástica. Por outro lado, o grupo HA manteve níveis baixos para ambas as MMPs, o que está de acordo com sua maior estabilidade estrutural e menor capacidade de reabsorção.

Esse perfil indica maior remodelação inicial da matriz extracelular nos materiais com maior capacidade de reabsorção, como CaP e β -TCP, enquanto o grupo HA apresentou atividade reduzida das metalloproteinasas, consistente com sua estabilidade estrutural (BRUM et al., 2024).

De forma geral, os dados sugerem que biomateriais com maior capacidade de reabsorção induzem uma remodelação inicial mais intensa da matriz extracelular, criando condições favoráveis para eventos subsequentes de mineralização e osteogênese. O aumento da atividade de MMP-9 nos grupos CaP e, principalmente, β -TCP reforça que esses materiais estimulam

uma remodelação mais ativa, compatível com a literatura que relaciona MMP-9 a processos de reabsorção e ajustes estruturais iniciais do tecido (KHOSWANTO, 2023). Assim, o padrão enzimático encontrado apoia os demais resultados do estudo, mostrando que biomateriais com maior capacidade de reabsorção geram um microambiente mais ativo e propício à formação óssea.

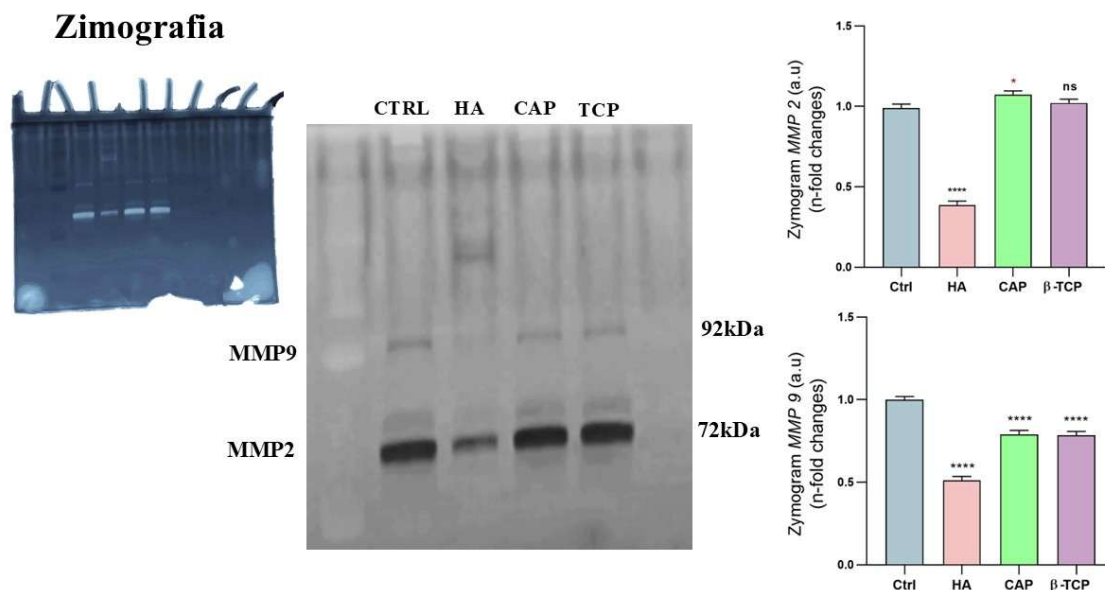


Figura 7- Remodelação da MEC. (a.) Zimografia para MMP2 (~72 kDa) e MMP9 (~92 kDa) em 7 dias: CTRL, HA, CaP e β-TCP.. Remodelação da MEC. As células permaneceram em meio enriquecido com HA, CaP e β-TCP, separadamente, por 7 dias. Após esse período, o meio foi coletado para investigar o perfil da atividade das Metalloproteinases por Zimografia, analisamos os genes MMP2 (b), MMP9 (c). A partir da análise de densitometria das bandas, verificamos o perfil de MMP-2 e MMP-9. As análises de expressão de $\Delta\Delta Ct$ foram comparadas e normalizadas por um gene endógeno, β -ACTINA. Os dados foram apresentados como média $\pm$ desvio-padrão e analisados por ANOVA. Diferença estatística quando comparados ao grupo controle: $p < 0,0332$ (*); $p < 0,0021$ (**); $p < 0,0002$ (***); $p < 0,0001$ (****).

5 CONCLUSÃO

Os resultados indicam que os biomateriais à base de fosfato de cálcio influenciam a diferenciação osteoblástica de forma dependente do tempo. B-TCP e CaP mostraram maior impacto na fase inicial, enquanto a hidroxiapatita apresentou melhor desempenho na fase de maturação. A atividade enzimática observada confirma a importância da remodelação da matriz para o processo de formação óssea. Esses achados reforçam o potencial desses materiais para

aplicações em regeneração óssea, sugerindo que sua escolha deve considerar o estágio do reparo desejado.

REFERÊNCIAS

- ARIFFIN, Shahrul Hisham Zainal et al. Gene expression profiles for in vitro human stem cell differentiation into osteoblasts and osteoclasts: a systematic review. **PeerJ**, v. 10, p. e14174, 2022.
- BELLUOMO, R.; KHODAEI, A.; AMIN YAVARI, S. Additively manufactured Bi-functionalized bioceramics for reconstruction of bone tumor defects. **Acta Biomaterialia**, v. 156, p. 234–249, 15 jan. 2023.
- BERNARDS, Matthew T.; QIN, Chunlin; JIANG, Shaoyi. MC3T3-E1 cell adhesion to hydroxyapatite with adsorbed bone sialoprotein, bone osteopontin, and bovine serum albumin. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 64, n. 2, p. 236-247, 2008.
- BOHNER, Marc; SANTONI, Bastien Le Gars; DÖBELIN, Nicola. β -tricalcium phosphate for bone substitution: Synthesis and properties. **Acta biomaterialia**, v. 113, p. 23-41, 2020.
- BRUDERER, M. et al. Role and regulation of RUNX2 in osteogenesis. **Eur Cell Mater**, v. 28, n. 28, p. 269-86, 2014.
- CHEN, Xin et al. Calcium phosphate-based nanomaterials: preparation, multifunction, and application for bone tissue engineering. **Molecules**, v. 28, n. 12, p. 4790, 2023.
- CINICI, Bilal et al. Fabrication strategies for bioceramic scaffolds in bone tissue engineering with generative design applications. **Biomimetics**, v. 9, n. 7, p. 409, 2024.
- CLINES, G. A. Prospects for osteoprogenitor stem cells in fracture repair and osteoporosis. **Current Opinion in Organ Transplantation**, v. 15, n. 1, p. 73–78, fev. 2010.
- DALLABRIDA, A. L. et al. Bioceramic characterization of calcium phosphates microstructured in different composition in sheep. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 38, n. 7, p. 1327–1336, 2018.
- DE ALMEIDA, G. S. et al. Combination of in silico and cell culture strategies to predict biomaterial performance: Effects of sintering temperature on the biological properties of hydroxyapatite. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 112, n. 2, p. e35389, 14 fev. 2024.
- FEOKTISTOVA, Maria; GESERICK, Peter; LEVERKUS, Martin. Crystal violet assay for determining viability of cultured cells. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2016, n. 4, p. pdb. prot087379, 2016.
- GHASEMI, Mahshid et al. The MTT assay: utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 23, p. 12827, 2021.
- GORTER, E. A. et al. The effect of osteoporosis and its treatment on fracture healing a systematic review of animal and clinical studies. **Bone Reports**, v. 15, p. 101117, 1 dez. 2021.

HAKAMI, I. A. An Outline on the Advancements in Surgical Management of Osteoporosis-Associated Fractures. **Cureus**, 26 jun. 2024.

HU, Kai et al. Osteoblast-derived VEGF regulates osteoblast differentiation and bone formation during bone repair. **The Journal of clinical investigation**, v. 126, n. 2, p. 509-526, 2016.

IAQUINTA, M. R. et al. Innovative biomaterials for bone regrowth. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 3, p. 1–17, 2019.

JEONG, Jiwoon et al. Bioactive calcium phosphate materials and applications in bone regeneration. **Biomaterials research**, v. 23, n. 1, p. 4, 2019.

JUNQUEIRA, Luiz Carlos U.; CARNEIRO, José. **Histologia Básica: Texto e Atlas**. 14. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2023.

KAWACHI, E. Y. et al. Biocerâmicas: Tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 518–522, 2000.

KHOSWANTO, C. Role of matrix metalloproteinases in bone regeneration: Narrative review. **Journal of Oral Biology and Craniofacial Research**, v. 13, n. 5, p. 539-543, 2023.

KOMORI, Toshihisa. Regulation of proliferation, differentiation and functions of osteoblasts by Runx2. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 7, p. 1694, 2019.

KOMORI, Toshihisa. What is the function of osteocalcin?. **Journal of oral biosciences**, v. 62, n. 3, p. 223-227, 2020.

LI, G.; SUN, S. Silk fibroin-based biomaterials for tissue engineering applications. **Molecules**, v. 27, n. 9, p. 2757, 2022.

MOTAMENI, A.; ALSHEMARY, A. Z.; EVIS, Z. A review of synthesis methods, properties and use of monetite cements as filler for bone defects. **Ceramics International**, v. 47, n. 10, p. 13245–13256, 15 maio 2021.

NII, Teruki; KATAYAMA, Yoshiki. Biomaterial-assisted regenerative medicine. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 16, p. 8657, 2021.

NYMAN, Jeffry S. et al. Differential effects between the loss of MMP-2 and MMP-9 on structural and tissue-level properties of bone. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 26, n. 6, p. 1252-1260, 2011.

PONZETTI, Marco; RUCCI, Nadia. Osteoblast differentiation and signaling: established concepts and emerging topics. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 13, p. 6651, 2021.

PREETHI SOUNDARYA, S. et al. Bone tissue engineering: Scaffold preparation using chitosan and other biomaterials with different design and fabrication techniques. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 119, p. 1228–1239, 1 nov. 2018.

ROWE, Paul; KOLLER, Adam; SHARMA, Sandeep. Fisiologia, remodelação óssea. 2018.

SASKA, S. et al. Bioresorbable polymers: Advanced materials and 4D printing for tissue engineering. **Polymers**, v. 13, n. 4, p. 1–24, 2021.

SCHROEDER, Tania M.; JENSEN, Eric D.; WESTENDORF, Jennifer J. Runx2: a master organizer of gene transcription in developing and maturing osteoblasts. **Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews**, v. 75, n. 3, p. 213-225, 2005.

TAGLIARI, Ivânio et al. Biocomponents Based on Hydroxiapatite: Influence of Sterilization on the Mechanical Resistance. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 57, p. 1051-1059, 2023.

TRZASKOWSKA, Marta; VIVCHARENKO, Vladyslav; PRZEKORA, Agata. The impact of hydroxyapatite sintering temperature on its microstructural, mechanical, and biological properties. **International journal of molecular sciences**, v. 24, n. 6, p. 5083, 2023.

TSUKASAKI, M.; TAKAYANAGI, H. Osteoimmunology: evolving concepts in bone immune interactions in health and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 19, n. 10, p. 626–642, 11 jun. 2019.

TU, Qisheng et al. Haploinsufficiency of Runx2 results in bone formation decrease and different BSP expression pattern changes in two transgenic mouse models. **Journal of cellular physiology**, v. 217, n. 1, p. 40-47, 2008.

ZHANG, K. et al. Evidence-based biomaterials research. **Bioactive Materials**, v. 15, p. 495-503, 1 set. 2022.

ZHANG, Xin et al. Enhancing Osteogenic Differentiation of Dental Pulp Stem Cells with Covalently Bonded All-Carbon Scaffolds. **Advanced Functional Materials**, v. 34, n. 30, p. 2400766, 2024.

ZHOU, H. et al. Monetite, an important calcium phosphate compound—Its synthesis, properties and applications in orthopedics. **Acta Biomaterialia**, v. 127, p. 41-55, 2021.