

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

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

Suelen Aparecida Teixeira

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

Prof. Dr. Willian Fernando Zambuzzi

BOTUCATU – SP
2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

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

Suelen Aparecida Teixeira

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

Prof. Dr. Willian Fernando Zambuzzi

BOTUCATU – SP
2022

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

Teixeira, Suelen Aparecida.

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

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

Orientador: Willian Fernando Zambuzzi

Capes: 90300009

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

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

AGRADECIMENTOS:

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

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

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

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

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

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

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

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

Ao CNPQ: Centro Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

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

(Dalai Lama)

SUMÁRIO

CAPITULO 1

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

CAPITULO 2

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

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO 1

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

CAPITULO 2

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

LISTA DE TABELAS

CAPITULO 2

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

LISTA DE ABREVIACÕES

AKT - serine/threonine protein kinase
ALP – Fosfatase alcalina
ANOVA – Análise de variância
ARMD – Adverse reaction to metal debris
BMU's – Basic Multicelular Units
BSP - Bone sialoprotein
CaCl₂ – Cloreto de cálcio
CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior
cDNA – fita complementar de ácido desoxiribonucleico
CNPq – Conselho nacional de desenvolvimento científico e tecnológico
Co - Cobalto
CoCr – Liga Cobalto-Cromo
Col1a1 – Cadeia alpha 1 de colágeno tipo 1
Col3a1 – Cadeia alpha 3 de colágeno tipo 1
Cr - Cromo
Ctrl - Control
DAE - Dual Acid-Etched
DNA – Ácido desoxiribonucleico
DNPH - 2,4-Dinitrophenylhydrazine
ECM - Extracellular matrix
eNOS - Endothelial nitric oxide synthase
FAPESP – Fundação de amparo à pesquisa do estado de São Paulo
FBS – Fetal Serum Bovine
GAPDH – Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GFAAS - Graphite furnace atomic absorption spectrometry
HIF – Fator induzível por hipoxia
HIF1 α - Fator induzível por hypoxia 1 alfa
HIF2 α - Fator induzível por hypoxia 2 alfa
HUVEC – Human umbilical vein endothelial cells
MC3T3-E1 – Pre-osteoblasts cell
MMP2 – metalloproteinase 2
MMP9 – metalloproteinase 9

MMPs - metalloproteinases

MOM – Metal-on-metal

mRNA - Messenger ribonucleic acid

nNOS - neural nitric oxide synthase

OM –Osteogenic Medium

Osterix - transcription factor for osteoblast differentiation

qPCR – quantitative real time Polymerase Chain Reaction

ROS – Reative oxygen stress

RUNX2 - Runt-related transcription factor 2

SUS – Sistema único de saúde

Ti - Titanium

TIMP1 - metallopeptidase inhibitor 1

TIMP2 - metallopeptidase inhibitor 2

VEGF - Vascular endothelial growth factor

W – with

Wo – without

RESUMO

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

ABSTRACT

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

CAPITULO 1

INTRODUÇÃO

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

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

MICROAMBIENTE ÓSSEO

Desde o desenvolvimento embrionário, o osso tem um papel ativo no corpo. A embriogênese do esqueleto obedece a mecanismos muito bem definidos, sendo classificados em 2 tipos de ossificação: endocondral e a intramembranosa (SIMÕES, 2010; VAZ, 2006):

1. A ossificação endocondral é guiada por um molde cartilaginoso, acarretando na formação de ossos longos. As células progenitoras do pericôndrio se diferenciam em osteoblastos que induzem a ossificação da matriz do pericôndrio para as extremidades, inibindo a produção de cartilagem. Os vasos sanguíneos tomam o espaço deixado pela mineralização, auxiliando condroblastos a reabsorverem os resquícios cartilagosos, aumentando a vascularização óssea, cujo processo forma a cavidade medular;
2. A ossificação intramembranosa ocorre por meio de células mesenquimais que se diferenciam em osteoblastos. Essas passam por um processo de despolarização por conta da atividade constante no tecido ósseo. As células fazem a deposição de matriz no meio ao seu redor, o que culmina em seu aprisionamento e induz a uma mudança fenotípica, formando os chamados osteócitos, que constituem cerca de 95% das células ósseas. Essas células são responsáveis pela homeostase do osso, por contribuir com a osteoclastogênese, através da síntese de RANKL (LIU et al., 2019; PERCIVAL; RICHTSMEIER, 2013; XU et al., 2018b; ZHANG et al., 2018).

No osso, as características de remodelamento se devem, basicamente, a atividade coordenada de dois tipos celulares: 1. Osteoblastos, que são responsáveis pela formação de matriz óssea e 2. Osteoclastos, que promovem a reabsorção de determinada porção do tecido já formado (ARIAS et al., 2018; GERMAINI et al., 2017).

Os osteoclastos são formados a partir da fusão de monócitos, e por isso apresentam característica de células multinucleares, além de apresentar borda em escova (porção da célula em contato com sítio de reabsorção) onde libera metabolitos que degradam a parte inorgânica e orgânica da matriz (MARTINS et al., 2017; MOLLER et al., 2020).

Osteoblastos se originam a partir de células mesenquimais presentes no estroma da medula óssea. São células de morfologia cúbica, altamente polarizadas que se

encontram sobre a superfície do osso, regulando fluxo de íons, realizando síntese e secreção de proteínas como osteopontina e osteocalcina, fundamentais no processo de mineralização, atuando também na síntese de fatores de crescimento (KOLB; BUSSARD, 2019; MARTINS et al., 2017).

A **figura 1** esquematiza a atividade celular encontrada no osso, onde cabe destacar que em fase final de maturação, osteoblastos podem entrar em processo de apoptose ou se aprisionar na matriz, promove mudanças morfológicas importantes que podem ser identificadas como assinaturas no processo de transição osteoblastos – osteócitos (BLANK; SIMS, 2019; LEE et al., 2019). Os osteócitos, de dentro da matriz calcificada, realizam a comunicação celular através de dendritos, cuja sinalização química é responsável por mudanças do tecido ósseo, envolvidas no recrutamento de osteoblastos e osteoclastos para o remodelamento, e na regeneração do tecido em condições de traumas (PRIDEAUX; FINDLAY; ATKINS, 2016; SHAH et al., 2017; UDA et al., 2017; VAN OERS; WANG; BACABAC, 2015).

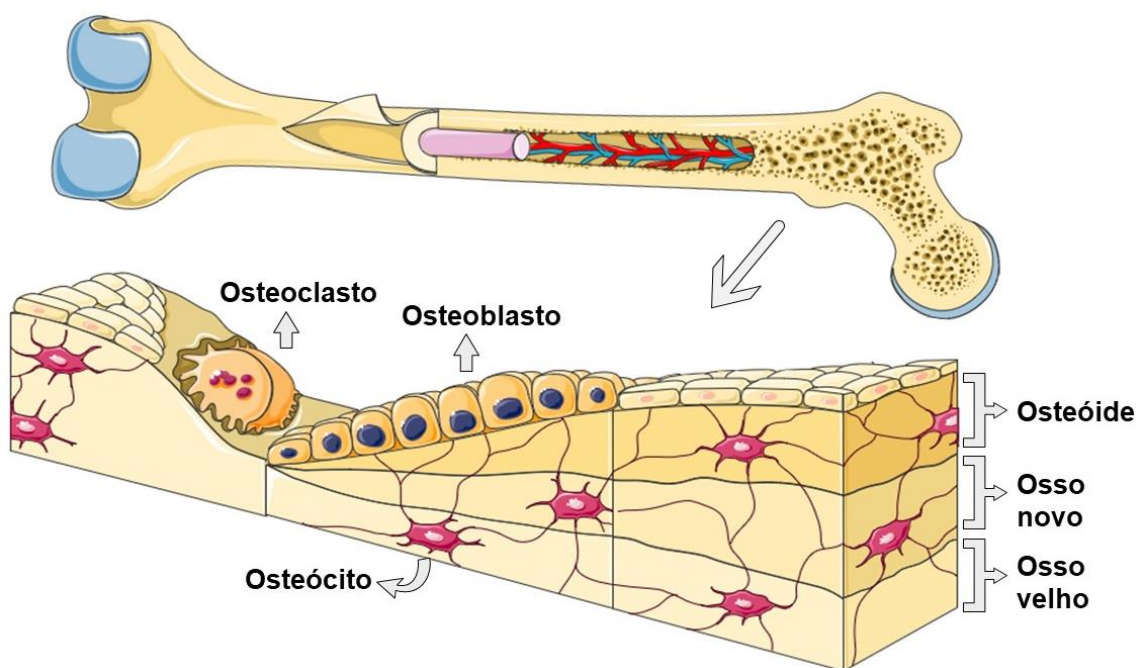


Figura 1 – Esquema do microambiente ósseo demonstrando estrutura e tipos celulares: no microambiente ósseo os osteoblastos são responsáveis pela síntese de novas estruturas, enquanto os osteoclastos são responsáveis pela reabsorção da estrutura já existente, caracterizando o processo de remodelamento ósseo, cuja mediação é feita pelos osteócitos através dos dendritos que os interligam. A fase ativa onde se encontram os osteoblastos é chamada de osteóide, após o processo de mineralização da matriz

extracelular é que ocorre a nova formação óssea e o aprisionamento dos osteoblastos e mudança fenotípica para osteócitos (Imagens obtidas em <https://smart.servier.com/>).

Os processos de comunicação celular são classificados de acordo com o tipo de interação, tecido e células comunicantes. A comunicação parácrina observada nas células ósseas é caracterizada pela liberação de uma molécula sinalizadora que se difunde localmente no meio extracelular, e possui o potencial de ativar as células vizinhas que expressão o receptor ligante. É o tipo de sinalização observada em casos de injúria onde ocorre cicatrização e regulação de inflamação local (BEBER, 2021; BRUCE ALBERTS, DENNIS BRAY, KAREN HOPKIN, ALEXANDER JOHNSON, JULIAN LEWIS, MARTIN RAFF, KEITH ROBERTS, 2013; DOMEZI, 2018; FELTRAN, 2019).

Em eventos de cicatrização óssea é possível visualizar ambos mecanismos de ossificação citados anteriormente, cujo processo de regeneração tecidual trabalha para o restabelecimento de propriedades originais do tecido (MARTINS et al., 2017).

Mesmo tendo aparência estática, a deposição e reabsorção ósseas por meio de mecanismos de modelação e remodelação tornam o osso um tecido dinâmico. Este processo ocorre por meio de fatores de regulação, que fazem adaptações da microestrutura óssea de acordo com a necessidade, e estas são feitas principalmente por BMU's (*Basic Multicellular Units*). Este processo diminui com o avanço da idade, deixando o tecido mais suscetível a fraturas e torna a regeneração tecidual menos eficiente (BEZERRA et al., 2017; LASSEN, N. E.; ANDERSEN, T. L.; PLOEN, G. G., SOE, K.; HAUGE, E. M.; HASRVING, S.; ESCHEN, G. E. T., DELAISSE, 2017; WILLETT et al., 2019).

Por conta do avanço da medicina houve um considerável aumento da expectativa de vida humana e, em decorrência disso, houve também um grande crescimento na ocorrência de fraturas ósseas relacionadas ao envelhecimento populacional, além da causa de acidentes comuns, muitas vezes domésticos. Isso impacta diretamente os sistemas de saúde no mundo todo, elevando consideravelmente os gastos para o atendimento de tais pacientes. Em 2020, uma avaliação mundial estimou que os cuidados pós-fratura geravam um custo entre 3 mil e 31 mil dólares por paciente, incluindo todos os procedimentos necessários. No caso do Brasil, o sistema único de saúde (SUS) garante grande parte dos casos de fratura no país. Há registro de que somente com fraturas de fêmur no ano de 2018 houve um gasto público cerca de R\$ 1,097 bilhão para o tratamento. Muitos dos procedimentos para o tratamento de fraturas ósseas incluem o uso de por exemplo pinos

e chapas para dar suporte ao osso danificado. Tais materiais de suporte são confeccionadas com o que chamamos de biomateriais (COSTA et al., 2021; FURTADO, 2019; Vilela, 2021).

BIOMATERIAIS

Ao longo da história humana pode-se observar uma série de tentativas de substituição de tecidos ou órgãos com dispositivos protéticos. Com o avanço da medicina regenerativa, tanto na parte cirúrgica quanto na confecção das próteses, foi possível elevar a qualidade de vida de pacientes, que antes poderiam inclusive perder a função de seus membros. No decorrer dos estudos, inclusive os materiais antes aplicados apenas em próteses, passaram a ser melhor elaborados, sendo estudados principalmente quando a interação biológica, permitindo assim sua utilização nos mais diversos tecidos do corpo, não apenas para substituições de membros (AFONSO, 1998; FURTADO, 2019; HILDEBRAND, 2013).

Cada vez mais os biomateriais destacam-se pela sua capacidade de aprimorar o potencial regenerativo em tecidos e órgãos que precisam restabelecer sua função normal. De acordo com a conferência de Chengdu em 2018, biomaterial define-se como “um material projetado para tomar uma forma que possa direcionar, através de interações com sistemas vivos, o curso de qualquer procedimento terapêutico ou diagnóstico” (CHEN; LIU, 2016b; GHASEMI-MOBARAKEH et al., 2019).

Com uma ampla gama de aplicação, os biomateriais podem ser utilizados na confecção de próteses, tubos de circulação extracorpórea, enxertos, lentes, stents, implantes dentários, parafusos ortopédicos, dentre outros. A **figura 2** mostra que a maioria dos materiais utilizados são caracterizados como bioativos, biodegradáveis e biocompatíveis. Tamaña gama de aplicações exige estudos elaborados para garantir a durabilidade do biomaterial, prezando assim qualidade de vida dos pacientes que o utilizam. De acordo com a **figura 2**, os biomateriais bioativos, biomiméticos e biocompatíveis são os mais estudados (DA SILVA et al., 2021; PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015; RAMOS et al., 2017).

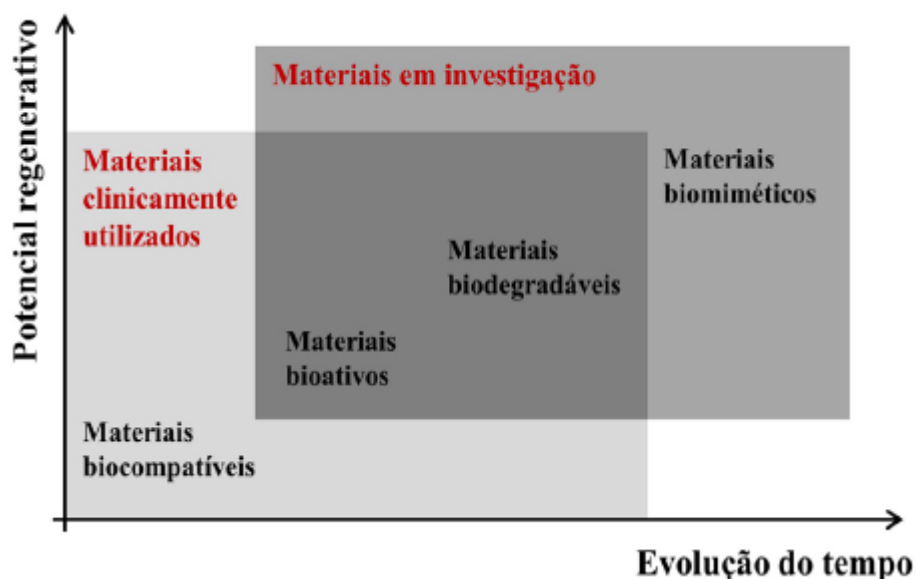


Figura 2 - Evolução da funcionalidade e da capacidade regenerativa dos biomateriais (PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015). Materiais biocompatíveis, bioativos, biodegradáveis e biomiméticos são escalados com relação a potencial regenerativo e evolução do tempo, sendo classificados nos que são mais clinicamente utilizados e quais são mais investigados.

Uma característica importante de um biomaterial é sua biocompatibilidade, ou seja, a capacidade que este tem de executar as funções desejadas sem o risco de rejeição, toxicidade ou efeitos indesejáveis ao hospedeiro. A biocompatibilidade é uma grande motivação para pesquisas no campo de biomateriais, pois há sempre uma busca pela otimização dos biomateriais já existentes ou a criação de novos (FURTADO, 2019; GHASEMI-MOBARAKEH et al., 2019).

Com relação a utilizado de biomateriais metálicos, naturalmente ocorre a liberação de íons. No caso de um íon ativo, imediatamente ocorre a interação com ânions inorgânicos ou biomoléculas presentes no ambiente implantar. Apesar da busca constante por biocompatibilidade, em consequência do uso de biomateriais metálicos, surgiu a patogênese ARMD (adverse reaction to metal debris), que é basicamente uma reação do corpo aos debris liberados pelos biomateriais metálicos utilizados em certos tipos de próteses, geralmente sendo produtos da corrosão do mesmo. Por esse motivo, os biomateriais metálicos devem ser analisados com relação a: resistência a corrosão do material como um todo, o quando o desgaste e a corrosão liberam de íons, o efeito gerado por essa liberação e a toxicidade do íon em específico. Todas essas informações são

relevantes para o entendimento e o melhoramento dos biomateriais utilizados (ELIAZ, 2019; XU et al., 2018a).

Apesar da busca por biomateriais ideais, muitas instituições de saúde optam pelo custo benefício na escolha dos materiais para próteses e implantes. Prezando o baixo custo, por exemplo, o SUS faz a utilização de aço inoxidável em próteses ortopédicas. Porém, como cita Furtado e colaboradores (2019), ocasionalmente ocorrem casos de rejeição e é necessária a substituição da prótese. Do ponto de vista biológico, a prótese ideal seria feita com um biomaterial que permitisse o crescimento ósseo e, partindo desta premissa, destaca-se a importância dos estudos de biomateriais. Estes são projetados para permitir a recuperação tecidual e funcional de determinadas partes do corpo que necessitam de reparo ou substituição. A busca por uma melhor resposta biológica em equilíbrio com o custo, beneficia principalmente os pacientes. A estabilidade físico-química é essencial para a preservação celular e manutenção de um microambiente apropriado, gerando como resultado o crescimento celular e a regeneração tecidual (DE ALMEIDA, 2020; FURTADO, 2019; MACHADO et al., 2021).

Além do aço inoxidável, muitos são os materiais aplicados na confecção de próteses, principalmente metálicos, dos quais pode-se citar titânio, alumina, zircônia, dentre outros. A utilização de ligas, combinando proporções de diferentes metais, visa melhorar as propriedades dos implantes, principalmente com relação a durabilidade e bioestimulação. Como principal exemplo temos a liga de CoCr, o qual tem mostrado ter propriedades biológicas importantes (AZEVEDO et al., 2008).

COBALTO

Elemento químico de símbolo Co, o Cobalto possui número atômico 27, é um metal que se assemelha a ferro e níquel em termo de propriedades químicas. Os compostos envolvendo este elemento se encontram em sua maioria em dois estados de valência, sendo eles Co(II) e Co(III). Considerado um elemento relativamente raro, o cobalto é encontrado na natureza como arseniats, óxidos e sulfetos. É comumente utilizado em forma metálica, principalmente em ligas, possuindo diversas aplicações (BARCELOUX, 1999; LISON, 2022; MUÑOZ-SÁNCHEZ; CHÁNEZ-CÁRDENAS, 2019).

Classificado como elemento por volta da década de 1730, o Cobalto foi primeiramente isolado por George Brant (1694 – 1768). Farmacêutico e metalúrgico, seu

interesse nesse metal se deu pelo fato de suas propriedades serem diferentes dos metais utilizados até então, não enferrujando como o ferro, mesmo possuindo propriedades de atração magnética. Assim como muitas nomenclaturas usadas na mineralogia, o nome “Cobalto” vem do alemão, “Kobalt”, um demônio da mitologia alemã. De acordo com Cabral (2019), este nome foi referenciado aos mineiros saxônicos, que receavam quando encontravam o minério, pois provocava-lhes lesões nos olhos, pés e mãos, por conta do arsênico contido na mistura. Os mineradores acreditavam que tais injúrias eram causadas por espíritos que passeavam pelas minas para atormenta-los, segundo as crenças da região (CRUZ, OLGA MARTIZ. INTER, 2017; KUX, 1980; PEIXOTO CABRAL, 2019).

Mesmo antes de se ter conhecimento, este elemento já era utilizado. As descobertas mais antigas foram feitas na tumba de Tutancâmon, que datam de 1358 a.c. Foram encontradas peças de vidro de coloração azul e outros objetos que, ao serem submetidos a análise espectrográficas, depois da abertura da tumba em 1922, demonstraram possuir traços de Cobalto, que era utilizado como corante para dar a tonalidade azulada encontrada nas peças (CRUZ, ITER 2017; MOTA, 2020).

O cobalto é fonte de grande debate, pois ao mesmo tempo que pode apresentar um risco à saúde, também é um elemento essencial ao organismo. Diariamente humanos ingerem cerca de 5 a 50 µg de Cobalto, principalmente na forma inorgânica. Um meio de biodisponibilidade de cobalto é sob a forma do micronutriente cobalamina (Vitamina B12), que é responsável por uma pequena porcentagem da ingestão do composto. A cobalamina é utilizada como cofator de enzimas essenciais e sua ingestão correta previne doenças como anemia megaloblástica. De acordo com a solubilidade em água dos compostos inorgânicos de cobalto, sua biodisponibilidade pode variar de 5 a 45% (GLUHCHEVA et al., 2020; LISON, 2022).

LIGA CoCr

O uso de cobalto em ligas com cromo foi patenteado em 1906, por E. Haynes. Em 1907 foi patenteada a liga Stelliteh, composta de Cobalto, cromo e molibdênio, que apresentou melhor resistência a corrosão e oxidação, características do cobalto e cromo. A partir disso a associação de cobalto e cromo passou a ser aplicada em diversos usos, inclusive no âmbito de biomateriais (CRUZ, OLGA MARTIZ. INTER, 2017; LANDUCI, 2016).

Na literatura, o uso de metais na área de saúde tem dados controversos. Nos anos 70, Heath e colaboradores identificaram em seus estudos que o desgaste de próteses que utilizavam liga de cobalto, cromo e molibdênio poderiam estar associados a sarcomas em ratos. No decorrer dos anos seguintes, os avanços em pesquisas melhoraram consideravelmente as técnicas utilizadas na fabricação de implantes, inclusive utilizando revestimentos e tratamentos que possibilitassem uma interação biológica melhor. Um exemplo é o estudo feito por Allen e colaboradores no final dos anos 90, onde foram comparados o cobalto e o cromo, de maneira separada, assim como da liga de cobalto-cromo, e quais o efeito teriam sobre linhagens de osteoblastos humanos. Testaram-se diferentes concentrações e concluiu-se que os detritos desses materiais tinham a capacidade de modificar vias de sinalização ósseas, onde concentrações mais altas de cromo modularam negativamente proteínas importantes para o remodelamento ósseo, tendo como consequência uma atividade osteoblástica reduzida e relatando que são necessários mais estudos para o melhoramento de próteses e implantes (ALLEN et al., 1997; DUX, 2019; HEATH; FREEMAN; SWANSON, 1971). Resultados anteriores do nosso grupo de pesquisa mostra resultados interessantes do meio enriquecido com cobalto no fenótipo de células endoteliais e células ósseas (DA COSTA FERNANDES et al., 2021; FERNANDES et al., 2018b; MACHADO et al., 2019).

Cada vez mais a liga de CoCr vem sendo utilizada no âmbito de próteses e implantes. Esta liga em específico possui uma ótima biocompatibilidade por conta de propriedades mecânicas, como resistência a corrosão e alta rigidez. Inclusive, os estudos de Yang e colaboradores (2015), fornecem evidências de que as partículas liberadas pela liga CoCr interferem no crescimento, maturação e funções de células pré-osteoblastos de camundongo, além de exibir também uma mudança nos efeitos inflamatórios (VAICELYTE et al., 2020; YANG et al., 2015).

Com relação ao efeito biológico induzido pela liga de CoCr, os estudos de Madathil e colaboradores (2010) mostraram que, quando este é colocado sob interação com fibroblastos, isso induz a célula a um estado de hipóxia e estresse oxidativo. Pensando num microambiente periimplantar, o estudo do estado de hipóxia seria de grande interesse no âmbito de biomateriais (MADATHIL et al., 2010; SAMELKO et al., 2013).

HIPOXIA

O fator induzível por hipóxia-1 α (HIF-1 α) é uma proteína importante na resposta a mudanças metabólicas em condição de baixa disponibilidade de oxigênio. A condição de hipóxia é a diminuição da concentração de oxigênio, que ativa mecanismos de sobrevivência celular, angiogênese, glicólise, etc. Isso influencia a síntese proteica, assim como metabolismo de lipídios, energético e respiração mitocondrial, fazendo com que a célula sofra uma adaptação à nova condição. Um exemplo dessa condição, é no caso de câncer em estados avançados, cujo estado de hipóxia permite ativar o mecanismo de angiogênese, levando assim mais nutrientes as células modificadas e permitindo a proliferação celular e metástase (JING et al., 2019; LEE; CHANDEL; SIMON, 2020; SAMELKO et al., 2013).

Dependendo dos íons associados, o Cobalto influencia a fisiologia e homeostase de diferentes maneiras. Estudos de Kumon e colaboradores (2021) demonstram que a utilização de CoCl₂ para indução de hipóxia química em cultura celular interfere no perfil de diferenciação de células tronco cancerígenas. Observa-se mudanças nos níveis de expressão de vias de sinalização celulares, induzindo diferenciação à linhagem de eritroblastos e eritrócitos. Levando em conta o Cobalto como um indutor de hipóxia química, quando relacionado com elemento cromo, no âmbito de próteses e implantes, torna-se um elemento interessante para estudo, pois apesar de toda a pesquisa acerca do assunto, ainda há diversas questões a serem respondidas sobre como a liga interfere no metabolismo (DA COSTA FERNANDES et al., 2021; KUMON et al., 2021; MAIA, 2017).

ANGIOGÊNESE

A formação dos vasos sanguíneos é um processo crucial na irrigação dos diferentes tecidos do corpo, levando nutrientes, oxigênio e fatores de crescimento essenciais para o desenvolvimento do organismo. Sua gênese está relacionada a dois refinados processos: vasculogênese e angiogênese. O primeiro é a formação de vasos primitivos por angioblastos no período de embriogênese. O segundo está relacionado com o estabelecimento de artérias, veias e capilares a partir de vasos primitivos, formando-se pela justaposição de células a partir da luz do vaso (CARDOSO, 2018; RIZOV; ANDREEVA; DIMOVA, 2017).

Para controle da pressão e passagem sanguínea há a necessidade fisiológica de contração e relaxamento dos vasos. Tal capacidade se deve a estrutura das artérias que pode ser vista no esquema da **figura 3**, sendo que essa característica de contração é regulada pela atividade das células de tecido muscular liso. Esta camada celular, externa ao vaso, também confere maior resistência a possíveis danos. A camada de tecido epitelial localizada na parte interna é quem fazer o revestimento das artérias e veias, é a responsável por iniciar o processo de angiogênese nos casos de por exemplo injúria e se adapta aos tecidos em que se encontra, conforme a necessidade de receptores e sinalização (ALBUQUERQUE, 2019; LACAUD; KOUSKOFF, 2017; SALSOSO et al., 2017).

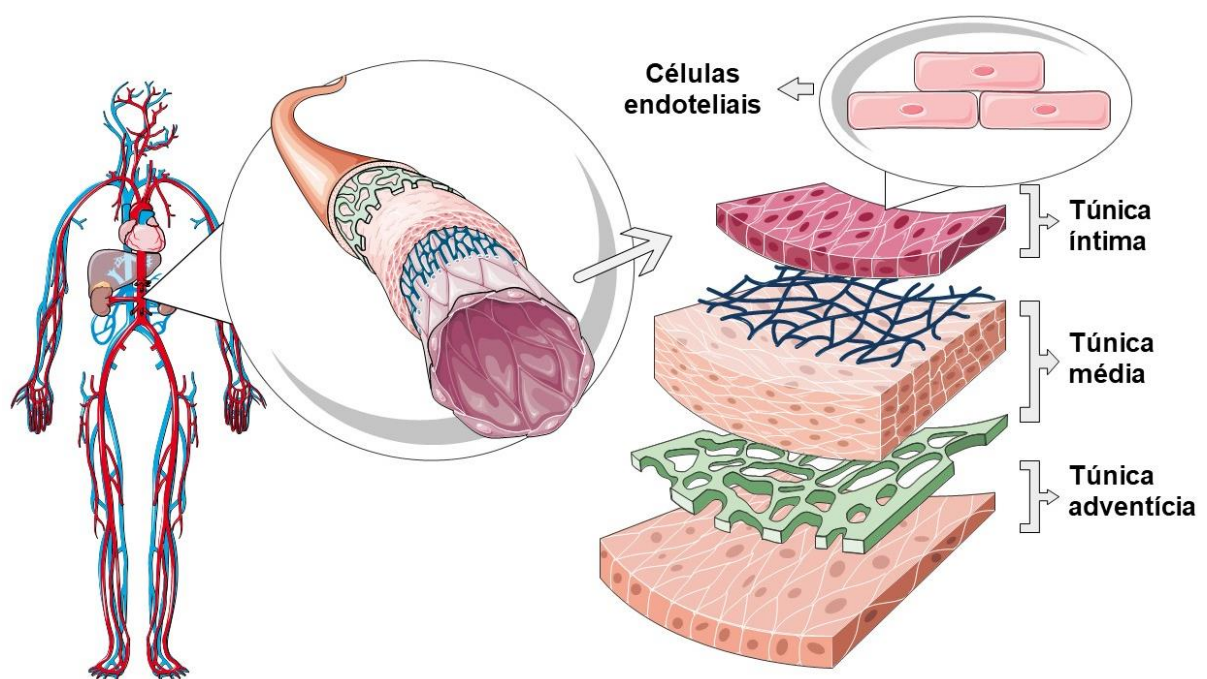


Figura 3 – Esquema do microambiente arterial demonstrando a estrutura e o tipo celular utilizado. As células endoteliais são obtidas da túnica média arterial localizada na região umbilical (Imagens obtidas em <https://smart.servier.com/>).

A relação angiogênese-osteogênese foi estudada pela primeira vez em 1763, quando foi sugerido pela primeira vez que vasos sanguíneos tinham um papel no reparo de lesões ósseas. Desde então cada vez mais estudos tem constatado a importância que a angiogênese desempenha na formação, remodelamento e cicatrização ósseas. A regulação dessa interação é complexa e ocorre via comunicação intercelular por meio de vias específicas de proteína (ARANTES, 2011; CHIM et al., 2015).

Deste modo, avaliar se a condição de hipóxia promovida pelo cobalto no microambiente periimplantar nos parece importante na perspectiva de propor novos materiais para uso em biomedicina, uma vez que nossa hipótese é que a liberação de cobalto favorece o metabolismo de células endoteliais e reforça mecanismos parácrinos com osteoblastos, favorecendo a osteogênese e regeneração óssea periimplante.

OBJETIVO

Avaliar se o cobalto liberado por ligas de Cobalto-Cromo é capaz de promover alterações metabólicas em osteoblastos e se há interferência em mecanismos parácrinos com osteoblastos.

CAPITULO 2

da Costa Fernandes CJ, de Almeida GS, Pinto TS, Teixeira SA, Bezerra FJ, Zambuzzi WF. Metabolic effects of CoCr-enriched medium on shear-stressed endothelial cell and osteoblasts: A possible mechanism involving a hypoxic condition on bone healing. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2021 Sep;128:112353. doi: 10.1016/j.msec.2021.112353. Epub 2021 Jul 31. PMID: 34474901.

Metabolic effects of CoCr-enriched medium on shear-stressed endothelial cell and osteoblasts: a possible mechanism involving a hypoxic condition on bone healing

Célio Junior da Costa Fernandes¹; Gerson Santos de Almeida¹; Thais Silva Pinto¹;
Suelen Aparecida Teixeira¹; Fábio J Bezerra¹; Willian Fernando Zambuzzi^{1,#}

¹Lab. of Bioassays and Cell Dynamics, Department of Chemical and Biological Sciences, Institute of Biosciences, UNESP - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, 18618-970, Brazil;

[#]Corresponding author:

Prof. Willian F. Zambuzzi - email: w.zambuzzi@unesp.br

ABSTRACT

Cobalt-chromium (CoCr)-based alloys have emerged as an interesting biomaterial within biomedical field, mainly considering their biocompatibility, resistance to corrosion and absence of magnetism; however, its effect on cell metabolism is barely known and this prompted us better evaluating whether CoCr-enriched medium affects the metabolism of both osteoblast and endothelial cells, and also if there is a coupling between them. This is also considered here the already-known effect of Cobalt (Co) as a hypoxic element. Firstly, discs of CoCr [subjecting (W) or not (Wo) to dual acid-etched (DAE)] were incubated into FBS-free cell culture medium up to 24 h (37 °C). This CoCr-enriched medium was further used to treat shear-stressed endothelial cells cultures up to 72 h. Thereafter, the conditioned medium containing metabolites of shear-stressed endothelial cells in response to CoCr-enriched medium was further used to subject osteoblast's cultures, when the samples were properly harvested to allow the analysis of the molecular issues. Our data shows that CoCr-enriched medium contains 1.5–2.0 ng/mL⁻¹ of Co, which was captured by endothelial cells and osteoblasts in about 30% in amount and it seems modulate their metabolic pathways: shear-stressed endothelial cells expressed higher profile of HIF1 α , VEGF and nNOS genes, while their global profile of protein carbonylation was lower than the control cultures, suggesting lower oxidative stress commitment. Additionally, osteoblasts responding to metabolites of CoCr-challenged endothelial cells show dynamic expression of marker genes in osteogenic differentiation, with alkaline phosphatase (ALP), osteocalcin, and bone sialoprotein (BSP) genes being significantly increased. Additionally, tensional shear-stress forces decrease the stimulus for ColA1 gene expression in osteoblasts responding to endothelial cells metabolites, as well as modifying the extracellular matrix remodeling related genes. Analyzing the activities of matrix metalloproteinases (MMPs), the data shows that shear-stressed endothelial cells metabolites increase the activities of both MMP9 and MMP2 in osteoblasts. Altogether, our data shows for the first time that shear-stressed endothelial metabolites responding to CoCr discs contribute to osteogenic phenotype in vitro, and this predicts an active crosstalk between angiogenesis and osteogenesis during osseointegration of CoCr alloy and bone healing, maybe guided by the Co-induced hypoxic condition.

Key-words: Bone; Osteoblast; Bone healing; Endothelial cells; Biomaterials; Cobalt; Shear-stress; Hypoxia; Cell signaling.

INTRODUCTION

Metallic-based alloys are widely used as implants or prosthesis within biomedical field, being the titanium (Ti) the most common material used for bone purposes (ALBREKTSSON et al., 1981; BEZERRA et al., 2017; BRANEMARK et al., 1977; DA COSTA FERNANDES et al., 2018a). An alternative to classical titanium alloy is the development of a metal-on-metal (MOM) material such as Cobalt-Chromium (CoCr), mostly used in MOM prosthesis, and with already known properties as adequate biocompatibility and others (e.g. nonmagnetic, mechanical strength and resistance to wear, corrosion, and heat) (YANG et al., 2015). Importantly, a biomaterial must present biocompatibility and ought develops functional and original roles, being able to generate its adequate osseointegration (CHEN; LIU, 2016a; DA COSTA FERNANDES et al., 2018a; MACHADO et al., 2019). Still considering CoCr properties, it is known that Co is a hypoxia inducing element because it stabilizes hypoxia inducible factors (HIF) 1 α and 2 α (PIRET et al., 2002; S; A, 2017). Based on this statement, CoCl₂ has been widely used as a hypoxia model in cell culture which has allowed the characterization of the hypoxia response at the cellular, biochemical and molecular levels (J; ME, 2019).

Although with already known properties, there is a lack of understanding about the molecular responses of cells to CoCr alloy, and better evaluating CoCr-based alloys at metabolic glance seems being important issue to be addressed. Previously, we have reported that biomaterials interact with cells, tissue or body involving a very dynamic mechanism and those materials release molecules and debris able to affect surrounding and interacting cells by interfering on cell adhesion, proliferation and differentiation in bone microenvironment (DA COSTA FERNANDES et al., 2018b; DA S. FELTRAN et al., 2019; ROSSI et al., 2017). Still considering the reactional tissue surrounding the implanted devices, several cell types should be affected by the implant-released molecules such as osteogenic and endothelial cells.

Taken into account bone as a dynamic and regenerative tissue, in some special clinical conditions there is a need for additional support by using appropriate biomaterial in order to recover faster the patients. Conversely, during the bone growth and regeneration it is required a dynamic coupling between angiogenesis and osteogenesis (KUSUMBE; ADAMS, 2014; KUSUMBE; RAMASAMY; ADAMS, 2014; RAMASAMY et al., 2016), which should be better investigated during osseointegration. Overall, the vascular tissue plays essential roles during regenerative processes and its role in biomaterial-related osseointegration is barely known (PRGEETH PANDULA et al.,

2014; RODRIGUES MARTINS et al., [s.d.]) , as well as its influence on extracellular matrix remodeling by considering matrix metalloproteinases (MMPs) activities, which they have already been reported in bone tissue healing (TOKUHARA et al., 2019). Satisfactorily, the modulation of the MMPs activities seems regulate this coupling between angiogenesis and osteogenesis and needs to be better addressed in biomaterial-related reactional tissue remodeling.

Considering the multifactorial factors of bone healing, osteogenesis is indispensable for the regenerative fracture purposes and its potential coupling with angiocrine signals (metabolites) during implant-related osteointegration seems play an important hub. In order to better address this issue by using in vitro strategies, we have identified a new mechanism involving endothelial cell metabolites in providing a repertoire of angiocrine signals to drive osteoblast differentiation in response to CoCr-enriched medium. In this study, we also considered to mimic vascular performance by subjecting endothelial cells to a shear stress model, as reported previously elsewhere (PINTO et al., 2019).

MATERIAL AND METHODS

Materials and CoCr discs.

The CoCr alloy discs were obtained from S.I.N. (São Paulo, SP, Brazil). To distinguish the surfaces evaluated in this study, a supplemental surface treatment was conducted by subjecting the CoCr discs to conventional Dual Acid-Etched (DAE), as widespread described (ZAREIDOOST et al., 2012). The cell culture flasks were purchased from TPP (Trasadingen, Switzerland) and the cell culture media and reagents from Nutricell (Campinas, São Paulo, Brazil). The primers were purchased from Exxtend - Soluções em Oligos (Paulinia, São Paulo, Brazil), Gotaq qPCR master mix (A6002) was from PROMEGA (Madison, Wisconsin, EUA), and all other chemicals were of analytical grade and they were from Sigma – Aldrich Co (St. Louis, MO).

Cell cultures.

The Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) and pre-osteoblasts (MC3T3-E1, subclone 4) were obtained from ATCC and maintained in this study as recommended by the manufacturer guidelines. Briefly, the cells were maintained at 37°C and 95% humidity in 5% of CO₂ in incubator with the specific cell culture medium

containing antibiotics (100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin) and supplemented with 10% Fetal Serum Bovine (FBS) (Nutricell, Campinas, SP, Brazil). The cells were subjected to CoCr-enriched medium – to evaluate the cell metabolism by investigating specific gene markers. The **Fig.1** depicts the experimental design proposed in this study and summarizes the experimental groups evaluated as follows:

1. Firstly, endothelial cells were subjected to CoCr-enriched medium up to 72 hours under shear stress or not (dynamic and static, respectively), the following groups were considered: 1. Control (Ctrl) – culture cells grown in classical cell culture medium; 2. Wo/DAE - endothelial cells were subjected to CoCr (Wo/DAE)-enriched medium; 3. W/DAE: endothelial cells were subjected to CoCr (W/DAE)-enriched medium;
2. Secondly, the metabolites of endothelial cell were used to further challenge osteoblasts up to 72 hours, and the following groups were considered: 1. Control (Ctrl): osteoblasts were cultured in classical cell culture medium; 2. HUVEC: osteoblasts were maintained in endothelial cell-conditioned medium (also considered an internal control); 3. HUVEC (Wo/DAE): osteoblasts were treated with endothelial cell metabolites released in response to CoCr (Wo/DAE)-enriched medium; 4. HUVEC (W/DAE): osteoblasts were treated with endothelial cell metabolites released in response to CoCr (W/DAE)-enriched medium.

Preparation of CoCr-enriched medium

Previously, CoCr discs presenting dual acid-etching (DAE) treating surface (w/DAE; n=6) and the machined surfaces (wo/DAE; n=6) were incubated in cell FBS-free culture media up to 24 h at 37°C into a CO₂ incubator, according to the ISO 10993:2016 guideline with slight modifications (0.2 g/mL w/v) to prepare the CoCr-enriched medium. Thereafter, the CoCr-enriched medium was properly harvested to further subject endothelial cells (MACHADO et al., 2019). To better mimic physiological hemodynamic forces of blood flow, we considered subjecting endothelial cells to shear stress *in vitro* up to 72h, as we have proposed earlier elsewhere (please, see 2.4 section for details). Thereafter, the endothelial-containing metabolites was late harvested to subject osteoblasts up to 72 hours (**Fig.1**).

Laminar shear-stress tensional forces model in vitro

Modified 100mm of diameter culture dishes (**Fig.1c-d**) were previously prepared to subject HUVECs to the shear-stress model at the peripheral ring. These modified culture dishes were developed by bonding at the bottom a 60mm culture dishes at the

center of the 100mm culture dishes using medical silicone and thereafter the dishes were sterilized using UV light for 30 min. We have previously tested the toxicity of the medical silicone and any cytotoxicity was found (data not shown). Confluent HUVEC cultures, previously seeded onto the peripheral ring of the culture dishes, were subjected to the tensional forces induced by an orbital shear-stress as previous studies (ABE; BERK, 2014; DA SILVA et al., 2019; DELA PAZ et al., 2012; PINTO et al., 2019) by using an orbital shaker (Scilogex, Rocky Hill, CT) positioned inside of the cell culture incubator at 37°C in the presence of CO₂. To achieve the physiologic flow pressure the shear-stress across each monolayer was calculated approximately as the maximal shear-stress: $\tau_{\max} = \alpha \sqrt{\rho \eta (2\pi f)^3}$, in which $\tau_{\max}$ (Pascal) is the shear-stress, α is the radius of the orbital rotation (12 cm), ρ is the density of the cell culture medium (937.5kg/m³), η is the viscosity of the cell culture medium (7.5 x 10⁻⁴ Pa s) and f is the frequency of rotation. By using this equation, a pressure of ~3 Pa was attained at a rotating frequency of 100 rpm, which is within the range of physiological arterial shear-stress, normal pressure (~1-4 Pa).

Quantification of Co by graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS).

To quantify cobalt (Co), 10 µL of each sample was followed to the analysis of Co content in the Co-Cr-enriched medium. The first analysis was made with the CoCr-enriched medium before the treatments, and then after the culture medium was used to treat the endothelial cell some aliquots were collected to do another evaluation. Finally, the CoCr-enriched medium used to treat osteoblasts was later investigated regarding the Co amount, totalizing three independent measurements. The evaluation was carried out by GFAAS using SHIMADZU model AA-6800 atomic absorption spectrometer. This spectrometer was equipped with a background absorption corrector with a self-reverse system (SR) a pyrolytic graphite tube with an integrated platform and an ASC-6100 automatic sampler. They were used Shimadzu hollow cathode lamp of Co operated at a minimum current of 12 mA and a maximum current of 400 mA (currently used in background correction – BG). The wavelength used was 357.9 nm for cobalt, and the spectral resolution was 0.5 nm. Argon was used as the inert gas, and a constant flow of 1 L min⁻¹ was maintained during the entire heating program except for the atomization stage, during which the gas flow was stopped. The absorbance measurements (based on the peak area) were carried out in triplicate. The graphite tube's heating program optimized for cobalt determination was based on the procedure described by Silva et al.

(2006) (SILVA et al., 2006) with some modification and it is described in following: Drying temperature – 120/250°C; Pyrolysis temperature – 900/1400°C; Atomization temperature – 2600°C and Cleanup temperature – 2800°C.

Protein carbonylation

HUVECs were grown in Co-Cr enriched medium and properly harvested for evaluating the protein's carbonylation as an indicator of oxidative stress using the alkaline method as described by Mesquita et al. (2014) (CS et al., 2014). The protein carbonyl concentrations were based on the average absorbances and the micromolar extinction coefficient of 2,4-Dinitrophenylhydrazine (DNPH) reagent under alkaline conditions ($0.022308 \mu\text{mol cm}^{-1}$ at 450 nm). Carbonylated proteins levels are expressed in nmol of DNPH/mg of protein.

mRNA isolation and RTqPCR analysis

The CoCr-enriched medium containing metabolites from HUVECs (under both static and dynamic conditions) was used to challenge semiconfluent cultures of osteoblasts up to 72 hours (**Fig.1**), when the cells and the medium were harvested using TriZOL (Life Sciences, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA). To properly isolate the total mRNA, the DNase I (Invitrogen, Carlsbad, CA) was added, and the quantification accomplished using a microplate reader (Synergyhtx multi-mode reader, Biotek, USA). Thereafter, complementary DNA (cDNA) synthesis was performed with High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) according to the manufacturer's instructions. The Real-Time qPCR was carried out to evaluate the expression of the specific genes, listed in **Table 1**, in a total of 10 μL , containing PowerUpTM SYBRTM Green Master Mix 2x (5 μL ; Applied Biosystems, Foster City, CA), 0,4 μM of each primer, 50 ng of cDNA and nuclease free water. The results were expressed as relative amounts of the transcripts using glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as a housekeeping gene, using the cycle threshold (Ct) method.

TABLE 1. Primers sequences and quantitative polymerase chain reaction cycle conditions.

Gene	Primer	5'-3' Sequence	Reaction condition
Runx2	Forward	GGACGAGGCAAGAGTTTCA	95°C - 15s; 60°C - 30s; 72°C - 60s
	Reverse	TGGTGCAGAGTTCAGGGAG	
Osterix	Forward	CCCTTCCCTCACTCATTTC	95°C - 15s; 60°C - 30s; 72°C - 60s
	Reverse	CAACCGCCTTGGGCTTAT	
ALP	Forward	GAAGTCCGTGGGCATCGT	95°C - 15s; 60°C - 30s; 72°C - 60s
	Reverse	CAGTGCGGTTCAGACATAG	
Osteocalcin	Forward	AGACTCCGGCGCTACCTT	95°C - 15s; 60°C - 30s; 72°C - 60s
	Reverse	CTCGTCACAAGCAGGGTTAAG	
BSP	Forward	GTACCGGCCACGCTACTTTCT	95°C - 15s; 60°C - 30s; 72°C - 60s
	Reverse	GTTGACCGCCAGCTCGTTTT	
Col1a1	Forward	ATGACGTGATCTGTGACGAGAC	95°C - 15s; 60°C - 30s; 72°C - 60s
	Reverse	TTCTTGGTTCGGTGGGTGAC	
Col3a1	Forward	GACCTGAAATTCTGCCATCC	95°C - 15s; 60°C - 30s; 72°C - 60s
	Reverse	GCATGTTTCCCCAGTTTCC	
Mmp2	Forward	AACTTTGAGAAGGATGGCAAGT	95°C - 15s; 60°C - 30s; 72°C - 60s
	Reverse	TGCCACCCATGGTAAACAA	
Mmp9	Forward	TGTGCCCTGGAATCACACGAC	95°C - 15s; 60°C - 30s; 72°C - 60s
	Reverse	ACGTCGTCCACCTGGTTCACCT	
Timp1	Forward	ATCCTCTTGTTGCTATCACTG	95°C - 15s; 60°C - 30s; 72°C - 60s
	Reverse	GGTCTCGTTGATTTCTGGG	
Timp2	Forward	GCAACAGGCGTTTTGCAATG	95°C - 15s; 60°C - 30s; 72°C - 60s
	Reverse	CGGAATCCACCTCCTTCTCG	
HIF1 α	Forward	CATAAAGTCTGCAACATGGAAG GT	95°C - 15s; 60°C - 30s; 72°C - 60s
	Reverse	ATTTGATGGGTGAGGAATGGGT T	
VEGF	Forward	TGCAGATTATGCGGATCAAACC	95°C - 15s; 60°C - 30s; 72°C - 60s
	Reverse	TGCATTACATTTGTTGTGCTGT AG	
nNOS	Forward	GGATCACATGTTTCGGTGTTCAG	95°C - 15s; 60°C - 30s; 72°C - 60s
	Reverse	CCCAACTTTGCGCTTGAAGA	
eNOS	Forward	TATTTGATGCTCGGGACTGC	95°C - 15s; 60°C - 30s; 72°C - 60s
	Reverse	AAGATTGCCTCGGTTTGTG	
Gapdh	Forward	AGGCCGGTGCTGAGTATGTC	95°C - 15s; 60°C - 30s; 72°C - 60s
	Reverse	TGCCTGCTTC ACCACCTTCT	

MMPs-2 and -9 activities were determined by a gelatin proteolysis-based zymography

Conditioned medium was harvested during the timeline of the experimental design to estimate the extracellular matrix remodeling stimulus by measuring the MMPs activities through the zymography technology (GOMES et al., 2020; OKINO-DELGADO et al., 2017). The osteoblast-obtained culture medium was centrifugated at 14,000 rpm for 15 min to avoid cell debris and later the protein concentration was determined by the Lowry method (HARTREE, 1972). The same amount of protein was resolved into a 12% polyacrylamide gel containing 4% gelatin. The gelatinolytic activity was evaluated in the resolved proteins gels, thereafter their renaturation using Triton X-100 aqueous solution (2% w/v), incubated for 18 hours in proteolysis buffer (Tris – CaCl₂) at 37°C and then stained with Coomassie Blue R- 250 dye solution 0.05% for 3 hours, when the gels were washed in a 30% methanol (v/v) and 10% glacial acetic acid solution (v/v). The opposite staining was obtained in the gels exactly where was the gelatinolytic activity (bands) of metalloproteinases 2 (MMP2, ~62 kDa) and 9 (MMP9, ~84 kDa), and then they were analyzed using software ImageJ (Bethesda, MD), following a previous study (LEFEBVRE; PEETERS-JORIS; VAES, 1991).

Statistical analysis

Results are represented as mean $\pm$ standard error of the mean of the replicates of each experiment (n = 3). The samples assumed a normal distribution with $p < 0.05$ considered statistically significant and $p < 0.001$ considered highly significant. The statistical analyses were performed using analysis of variance (two – way ANOVA) with multiple comparisons, in order to compare all pairs of groups, combined with appropriate Bonferroni's correction posttest, or nonparametric analysis. In this case, the significance level was considered when $\alpha = 0.05$ (95% confidence interval). The software used was GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, La Jolla, CA).

RESULTS

Changes on cobalt amount into cell cultures suggest endothelial cells and osteoblasts capture

Firstly, in order to evaluate whether CoCr discs interacts with the medium,

concentration of cobalt (Co) was measured through the GFAAS technology. Importantly, our data shows a significant release of Co by the both CoCr w/DAE and CoCr wo/DAE discs, when compared with the control (Ctrl) - it being about 1.5 and 1.7 ng/mL of Co released by wo/DAE and w/DAE discs, respectively (**Fig.1a**). Thereafter, this CoCr-enriched medium was later used to treat endothelial cells up to 72 hours; thereafter, the cell culture medium was collected to measure the Co amount again in order to estimate whether endothelial cells were able to capture Co. Surprisingly, the data shows that HUVEC captures about 30% of the Co amount, once the concentration of Co was significantly decreased to about 1 and 1.4 ng/mL in wo/DAE and w/DAE, respectively (**Fig.1b; Fig.S1a**). As endothelial cell modulates osteoblast performance, we decided harvest the endothelial cell-conditioned medium to later treat pre-osteoblasts up to 72h. Thereafter treating osteoblasts, the conditioned medium was newly harvested to evaluate Co amount and the data shows that osteoblast also is able to capture significant content of Co, as it being the concentration decreased from 1 and 1.4 to about 0.57 and 0.7 ng/mL in the wo/DAE and w/DAE, respectively (**Fig.1c; Fig.S1b**).

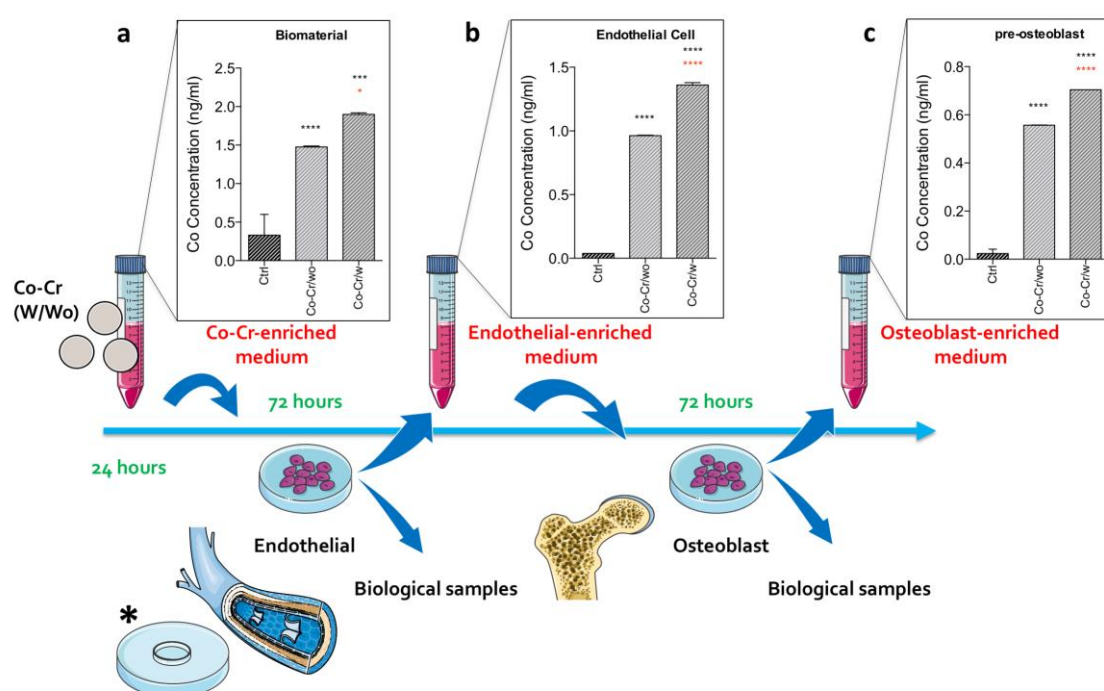


Fig.1. Schematization of the experimental design performed in this study. Discs of Cobalt-Chromium without DAE (CoCr/wo) and with DAE (CoCr/w) on their surfaces were used to enrich the culture medium for 24h, when the Co (Cobalt) content was measured (**a**). The human umbilical vein endothelial cells (passage <10) were seeded in the periphery of modified 100-mm culture dishes (*), treated with the CoCr-enriched

medium and subjected or not to shear-stress up to 72 h, when the culture medium was collected to allow Co content measurement **(b)**. Thereafter, the HUVEC metabolites responding to CoCr-enriched medium was used to treat pre-osteoblasts MC3T3-E1 (passage < 10) up to 72h, when samples were newly collected to measure Co content **(c)**. Statistics: * $p < 0.05$; *** $p < 0.0002$; **** $p < 0.0001$; **** $p < 0.0001$. Note: This figure was created using Servier Medical Art templates, which are licensed under a Creative Commons Attribution 3. Unported License; <https://smart.servier.com>.

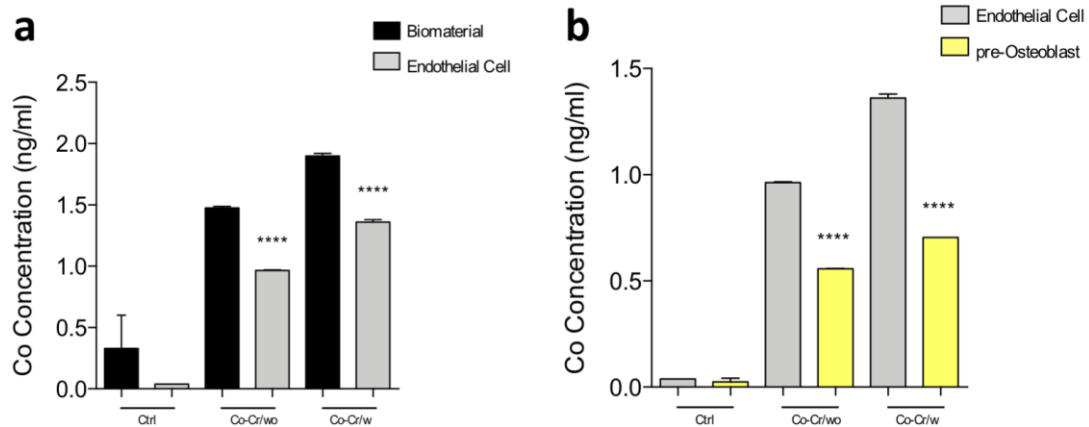


Figure S1. Differences in Co concentration in the culture medium. The graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS) shows variations in Cobalt content through different conditions, the graphs show the comparisons and the significant changes between measurements, firstly, as expected the Co-Cr-enriched medium showed significant more content of cobalt when compared with Ctrl, being the Co-Cr/Wo and Co-Cr/W group about 1.5 and 1.7 ng/ml respectively (black bars), and after the endothelial cell treatment (static) another measurement was carried out and showed a decrease in the content of the Cobalt concentration to about 1 and 1.4 ng/ml respectively (gray bars)(a). A comparison of dosages, after endothelial cell conditioning (gray bars) and after osteoblast treatments (yellow bar) revealed more differences in Cobalt content measurements, the values of Co content in culture medium after be conditionate by endothelial cell, and be used to treat osteoblasts for 72 h show a decrease in Co concentration to about 0.57 and 0.7 ng/mL in the Wo/DAE and W/DAE, respectively **(b)**. Statistics: **** $p < 0.0001$.

Endothelial cell gene biomarkers are up-expressed in HUVECs responding to CoCr-enriched medium

Endothelial cells were subjected to CoCr-enriched medium up to 72 hours, when biological samples were collected to allow analyzing specific genes related to endothelial phenotype, such as HIF1a, VEGF, nNOS and eNOS. HIF1a gene was up-expressed in

response to w/DAE and shear stress (Dynamic), while considering the static condition both wo/DAE and w/DAE promoted down-expression (**Fig.2a**). Importantly, VEGF gene was significantly up-expressed in response to wo/DAE-conditioned medium, mainly considering the shear stress (**Fig.2b**). Considering Nitric Oxide Synthases (NOS), we have investigated eNOS and nNOS, and our data shows that CoCr-enriched medium associated with shear stress mechanism promotes significant higher expression of nNOS, it being about 5-fold changes in response to wo/DAE and about 10-fold changes in response to w/DAE (**Fig.2c**), while eNOS was up-expressed in response to wo/DAE at static condition (**Fig.2d**).

Fig.2. CoCr-enriched medium modulates the expression of genes involved with angiogenesis. Endothelial cells were subjected to CoCr-enriched medium up to 72 hours, when the samples were harvested to perform qPCR technology. Endothelial cell phenotype-related genes were as follows: **a)** HIF-1a; **b)** VEGF, **c)** nNOS, and **d)** eNOS. GAPDH gene was a housekeeping gene and the data used to normalize the results. Significances were considered when: * $p < 0.0265$; *** $p < 0.003$; **** $p < 0.0001$, ^e $p < 0.0305$; ^{ee} $p < 0.0038$; ^{eee} $p < 0.001$; ^{eeee} $p < 0.0001$; ^{bbb} $p < 0.0003$; ^{bbbb} $p < 0.0001$; ^c $p < 0.0171$; ^{cccc} $p < 0.0001$.

Importantly, the **Fig.3** brings that endothelial cells subjected to CoCr-enriched medium up to 72 hours presented a lower profile of protein carbonylation, it being more significant in endothelial cells subjected to W/DAE. To note, the **Fig.1** shows that CoCr/w group was the biomaterial that released higher amount of cobalt.

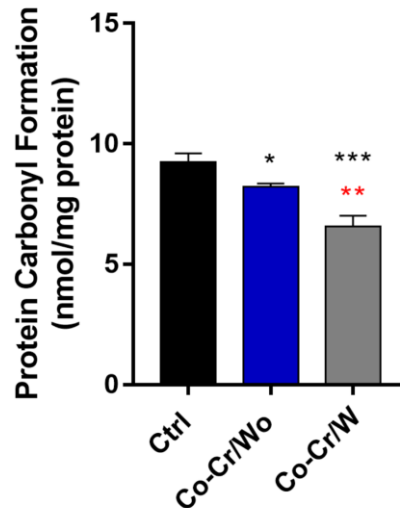


Fig.3. Protein carbonylation of endothelial cells subjected to Co-Cr-enriched medium. Protein carbonyl formation ($\pm$ SE) of HUVECs subjected to different conditions: control cultures (Ctrl), Co-Cr-without dual acid-etched (Co-Cr/Wo)-enriched medium, and Co-Cr-with dual acid-etched (Co-Cr/W)-enriched medium. Comparison by One-way ANOVA with Tukey or Kruskal- Wallis post-hoc. Statistics: * $p = 0.0208$; ** $p = 0.0021$; *** $p = 0.0001$).

Pivotal marker genes in osteogenic differentiation were evaluated in osteoblasts responding to HUVEC metabolites

Gene expression analysis is a very interesting strategy to evaluate whether environmental changes modulates cell phenotype. In this study, we have used qPCR technology to evaluate whether osteogenic gene markers were modulated in response to endothelial cell metabolites produced in response to CoCr-enriched medium. Technically, we have included 3 reference control groups as follows: osteoblasts cultures grown in conventional cell culture media (Ctrl), osteoblast cultures grown in osteogenic medium (O.M.), and osteoblast cultures grown in conditioned medium by HUVEC (without any treatment).

Firstly, the both major transcription factors of osteoblast differentiation, Runx2 and Osterix genes, were evaluated in this study, and our data shows there is a significant activation of Runx2 gene by osteoblasts responding to HUVEC-conditioned medium

subjected to shear stress and concomitant to CoCr-w/DAE, while the positive control (O.M.) activates Osterix gene (**Fig.4a-b**), and this expression validates the osteogenic profile of this lineage. Importantly, HUVEC-conditioned medium (without any treatment with CoCr-enriched medium) does not stimulate the expression of both Runx2 and Osterix genes. Later, others marker genes in osteogenic differentiation were also investigated in this study, and Alkaline Phosphate (ALP) gene was significantly changed by metabolites of endothelial cells responding to CoCr-enriched medium (about 15-fold changes), and this difference was even more significant considering the metabolites of shear-stressed endothelial cells responding to w/DAE (**Fig.4c**). Osteogenic Medium (O.M.) promoted higher expression of ALP gene comparing to Ctrl cultures (about 5-fold changes). Additionally, osteocalcin gene was significantly higher in osteoblasts responding to shear stressed HUVEC (about 5-fold changes) and shear stressed HUVEC subjected to w/DAE (about 15-fold changes), while O.M. also promotes its up-expression (**Fig.4d**).

Finally, the Bone Sialoprotein (BSP) gene was significantly changed in response to the CoCr-enriched medium (**Fig.4e**). Specifically, BSP was up-expressed in response to O.M., and significantly higher in osteoblasts responding to wo/DAE and w/DAE, both when HUVECs were maintained under shear-stress condition (Dynamic). To note, BSP gene is related with late processes of osteoblast differentiation and mineralization (GANSS; KIM; SODEK, 1999; KRUGER; MILLER; WANG, 2013).

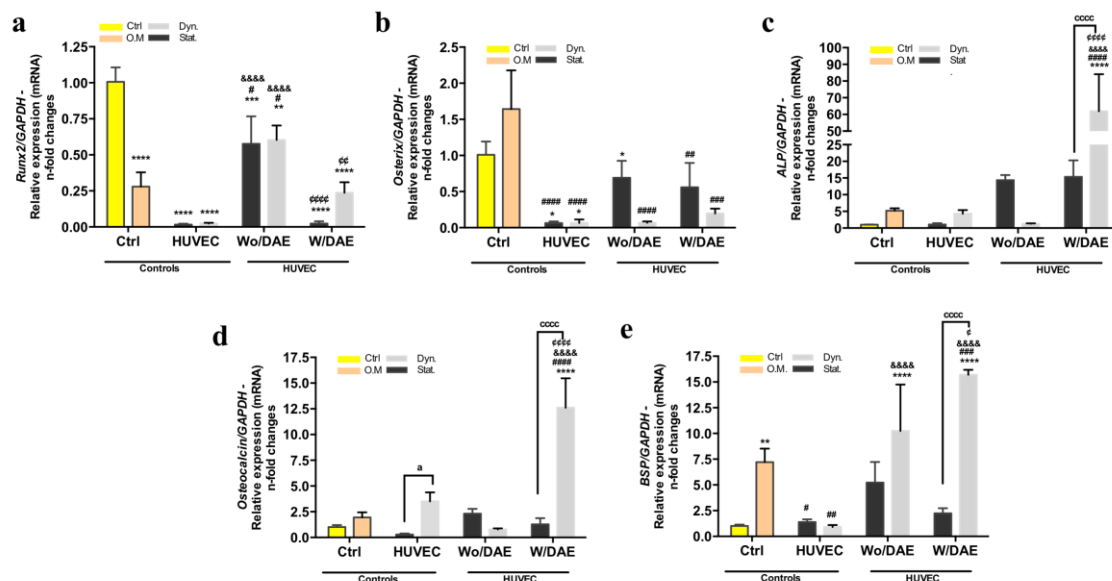


Fig.4. Pivotal marker genes in osteogenic differentiation were evaluated. qPCR technology was run to evaluate genes related with osteoblast differentiation, as follows: Runx2 (a), Osterix (b), ALP (c), Osteocalcin (d), and BSP (e). The data shows strong involvement of those genes in response to Shear-Stressed endothelial metabolites responding to W/DAE. GAPDH gene was a housekeeping gene and the data used to normalize the results. Significances were considered when: *p<0.0220; **p<0.0012; ***p<0.0005; ****p<0.0001; #p<0.0128; ##p<0.0033; ###p<0.0002; ####p<0.0001; &&&p<0.0001; ¢p<0.0335; ¢¢p<0.0062; ¢¢¢p<0.0005; ¢¢¢¢p<0.0001; ¢p<0.0350; aaaaap<0.00001; bbbbp<0.0001; ccccp<0.0001.

Metabolic effects of CoCr-enriched medium in ECM remodeling stimulus

We have extensively reported earlier the importance of the ECM remodeling during osteoblast adhesion, proliferation and differentiation responding to different biomaterials in vitro (ACCORSI-MENDONCA et al., 2008; COSTA FERNANDES; ZAMBUZZI, 2020; FERNANDES et al., 2018a; TOKUHARA et al., 2019; ZAMBUZZI et al., 2009). In this study, we have tested this hypothesis by analyzing MMPs-2 and -9 at transcriptional pattern as well as their enzymatic activities. Additionally, tissue inhibitors of MMPs (TIMP1 and TIMP2 genes) were also investigated by RT-qPCR technology. Considering ECM remodeling, we firstly analyzed the expression of Col1A1 (Fig.5a) and Col3A1 genes (Fig.5b). Col1A1 gene was up-expressed in response to O.M. as expected, and this gene was significantly higher when osteoblasts were subjected to HUVEC metabolites responding to wo/DAE at static condition. Shear-stressed endothelial cells metabolites seem abrogate the Col1A1 gene expression, while Col3A1 gene was significantly down-expressed in response to CoCr-enriched medium.

Secondly, MMP-2 and MMP-9 genes were investigated (Fig.5c,d), and only HUVEC metabolites responding to wo/DAE at static condition promoted up-expression of MMP-9 gene. Conversely, CoCr-enriched medium was identified up-modulating the expression of MMPs inhibitors: TIMP1 gene was about 50-fold changes higher in osteoblasts responding to wo/DAE at static condition (Fig.5e), while w/DAE promoted about 40-fold changes at dynamic condition (shear-stress). TIMP2 gene presented a very similar profile, both wo/DAE and w/DAE promoted higher mRNA profile (Fig.5f).

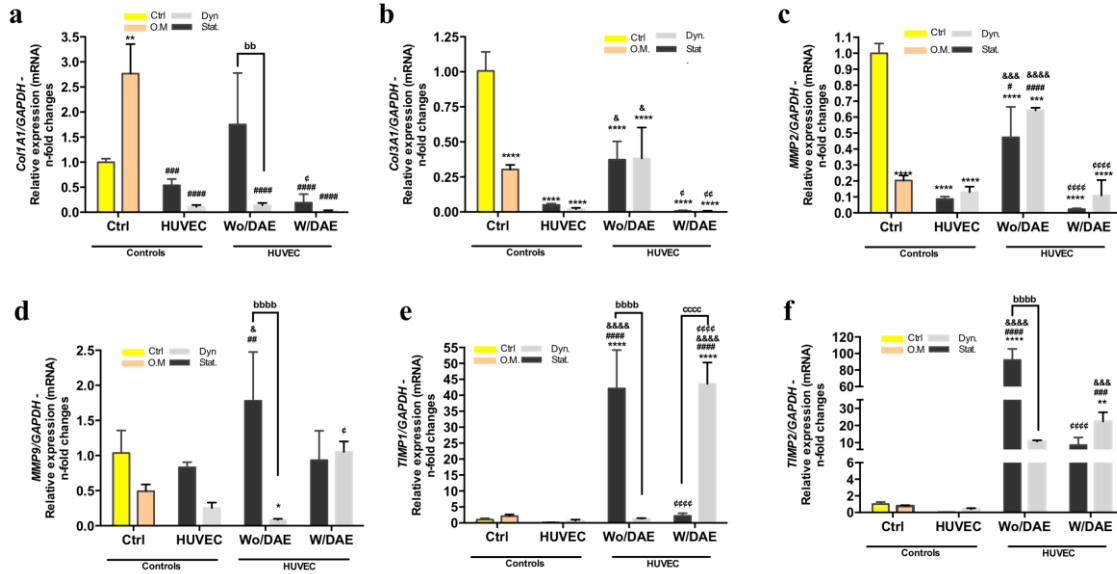


Fig.5. ECM remodeling-related genes. To investigate ECM remodeling-related genes expression profile, mRNA of Col1a1 (a), Col3a1 (b), Mmp2 (c), Mmp9 (d), as well as the MMPs inhibitors Timp1 (e), and Timp2 (f) were investigated. Statistics: * $p < 0.0370$; ** $p < 0.0024$; **** $p < 0.0001$; # $p < 0.0019$; ## $p < 0.0061$; ### $p < 0.0010$; #### $p < 0.0001$; & $p < 0.0294$; && $p < 0.0064$; &&& $p < 0.0008$; &&&& $p < 0.0001$; € $p < 0.0335$; €€ $p < 0.0062$; €€€ $p < 0.0005$; €€€€ $p < 0.0234$; €€€€€ $p < 0.0086$; €€€€€€ $p < 0.0008$; €€€€€€€ $p < 0.0001$; bb $p < 0.0072$; bbbb $p < 0.0001$; cc $p < 0.0045$; ccccc $p < 0.0001$.

Finally, zymography methodology was later used to evaluate the enzymatic activities of both MMPs-2 and -9. Zymogram analysis reveals a differential behavior of MMPs activities in response to metabolites of HUVEC under static (**Fig.6a**) and dynamic (shear-stress; **Fig.6b**) conditions, also considering if subjected with wo/DAE and w/DAE. Both MMP-2 and MMP-9, at their active form, were up-activated in response to shear-stressed endothelial cells (**Fig.6c-e**).

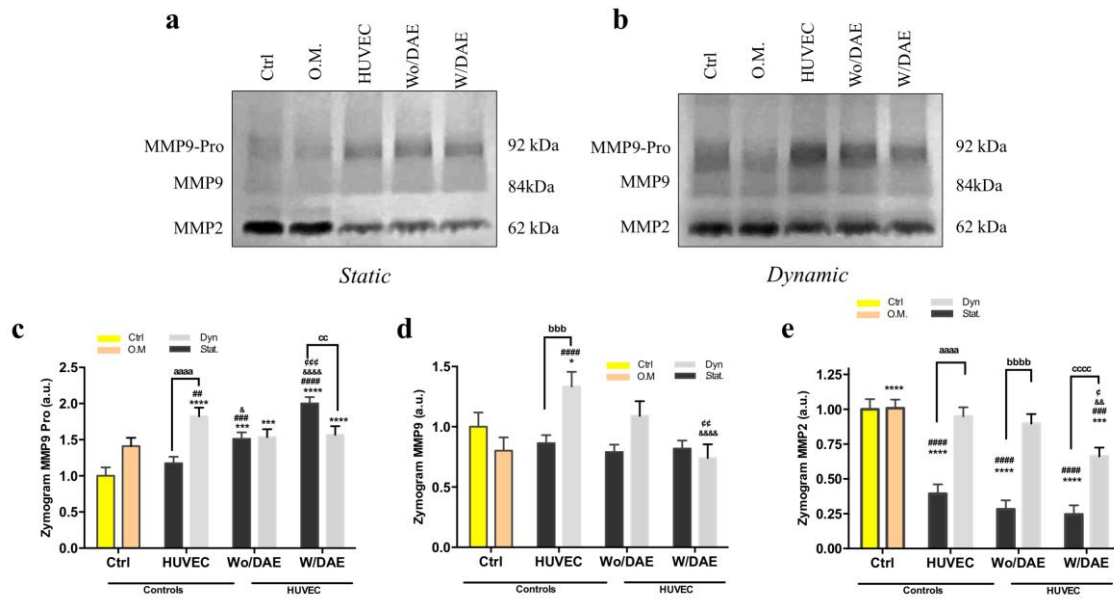


Fig.6. Gelatinolytic activities were measured by zymography. The gelatinolytic activities of MMPs 2 and 9 were analyzed by the zymography technique. The conditioned medium was harvested from osteoblasts cultures responding to metabolites of endothelial cells. Thereafter, proteins were resolved, considering Static (a) and dynamic (b) conditions. Gels were stained and the bands analyzed by densitometric measurements. Statistics: * $p < 0.0319$; ** $p < 0.0043$; *** $p < 0.0002$; **** $p < 0.0001$; ## $p < 0.0041$; ### $p < 0.0005$; ##### $p < 0.0001$; & $p < 0.0461$; && $p < 0.0047$; &&& $p < 0.0005$; &&&& $p < 0.0001$; € $p < 0.0160$; €€ $p < 0.0038$; €€€ $p < 0.0009$; €€€€ $p < 0.0001$; aaa $p < 0.0001$; aaaa $p < 0.00001$; bbb $p < 0.003$; bbbb $p < 0.0001$; cc $p < 0.0092$; cccc $p < 0.0001$.

DISCUSSION

Bone growth and healing require a well-orchestrated mechanism involving coupled signals by active cells such as osteoblasts and endothelial cells, which play decisive roles during bone remodeling and this is hypothesized surrounding dental implants driving the osseointegration. Besides releasing active angiocrine signals (DIOMEDE et al., 2020), endothelial cells also are involved with the vascular network surrounding the biomaterials offering nutrients, oxygen and the traffic of undifferentiated cells. Importantly, we have previously reported that implantable biomaterials are able to regulate cell metabolism away by releasing active molecules which are decisive to organize the implant-related microenvironment to later favor osteoblast differentiation and osteogenesis (DA COSTA FERNANDES et al., 2018c, 2018a; DA SILVA et al., 2018; FERNANDES et al., 2018b; MACHADO et al., 2019). Although some progress has been made regarding the comprehension of biological behavior in response to titanium alloys, very few is known about CoCr alloy. This prompted us to investigate the metabolite effect of CoCr-induced endothelial cells on marker genes in osteogenic differentiation and ECM remodeling process, important issues occurring during bone healing and osseointegration (GEMINI-PIPERNI et al., 2014).

CoCr-enriched medium was obtained by incubating CoCr discs into FBS-free cell culture medium up to 24 hours (FERNANDES et al., 2018b; MACHADO et al., 2019) and this condition promoted significant release of Co amount, which was captured by endothelial cells and probable this modified their metabolism. Very important consider that cobalt is a chemical-inducing hypoxia agent and could affect cell activity (WAGATSUMA et al., 2020). In fact, the hypoxia condition seems explain the significant decrease of protein carbonylation in endothelial cells subjected to CoCr-enriched medium, once this is a type of protein oxidation that can be promoted by reactive oxygen species, forming reactive ketones or aldehydes that can be reacted by 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) to form hydrazones (SUZUKI; CARINI; BUTTERFIELD, 2010). Moreover, this hypoxia effect is also observed affecting the expression of HIF1 α in shear-stressed endothelial cells subjected to the higher amount of cobalt. Additionally, we have investigated better the effect of CoCr-enriched medium in endothelial cells by analyzing the expression of genes related with endothelial cell phenotype, such as VEGF and NOS (nNOS and eNOS). Curiously, nNOS gene was higher expressed in response to CoCr in shear-stressed endothelial cells and this NOS is expected to release nitric oxide (NO). These results corroborate with previously published

study which we have shown the up-activation of AKT in response to CoCr (MACHADO et al., 2019), once AKT is known to drive NO release and ameliorate shear-stressed endothelial cell performance.

Considering osteogenic stimulus of CoCr alloys, we have reported in this study that metabolites released by endothelial cells responding to CoCr are able to drive the activation of important genes related with osteoblast differentiation by earlier requiring Runx2. Importantly, ALP, Osteocalcin and BSP genes were also activated mainly in response to metabolites from shear-stressed endothelial cells responding to w/DAE. This difference between w/DAE and wo/DAE responses can be explained by the amount of Co released to cell culture medium in both conditions (**Fig.1**), maybe triggering differentially hypoxia-based pathways. The oxygen availability directly compromises the energy metabolism of the cells and it seems being modulate by CoCr-enriched medium (HANNAH et al., 2020). In osteoblasts, we suggest that this hypoxia environment can requires the expression of osteocalcin. This is reasonable suggest osteocalcin as a endocrine molecule able to modulate energy metabolism and the insulin secretion by β -islets in pancreas (KARSENTY, 2017; KARSENTY; FERRON, 2012; LEE; KARSENTY, 2008; ZHANG; RIDDLE; CLEMENS, 2015). In fact, osteocalcin was higher expressed in response to metabolites of shear-stressed cells responding to CoCr, and it is expected osteocalcin playing dual roles contributing with osteogenesis and energy metabolism modulation [41](MABILLEAU et al., 2008). The results presented in this study clearly show the coupling between endothelial cells and osteoblasts and this communication between them can be modulated by soluble proteins and extracellular vesicles, such as exosomes(BARUAH; WARY, 2019), but new studies are called for better investigating this hypothesis.

The remodeling of bone surrounding the implanted metal devices is an important mechanism required by the hierarchical steps of osseointegration, affecting osteoblast survival and differentiation (BARONCELLI et al., 2019; COSTA FERNANDES; ZAMBUZZI, 2020; FERNANDES et al., 2019; MARUMOTO et al., 2017). Thus, it is necessary better understand the involvement of matrix metalloproteinases (MMPs) and collagen expression in response to biomaterials. In this study, we have shown that metabolites released by endothelial responding to CoCr affect osteoblast phenotype and modulates ECM remodeling by promoting higher activities of both MMPs-2 and -9, as well as modulating the expression of TIMPs1 and 2. In conjunction, these data suggests a well-modulated mechanism of ECM remodeling in response to CoCr-enriched medium.

Taken the data into account, this study shows there is a crosstalk between endothelial cells and osteoblasts in response to CoCr-enriched medium and this communication favors osteoblast differentiation and ECM remodeling in vitro, maybe stimulated by the Cobalt-induced hypoxia. This study opens new avenues to better understand the cellular and molecular requirements during osseointegration of CoCr devices and it requires better evaluation of these outcomes in preclinical protocols by enriching biomaterials (such as hydroxyapatite and β -tricalcium phosphate) with metabolites of endothelial cells and osteoblasts responding to CoCr-enriched medium looking for enhancing bone healing in order to claim this strategy in clinical purposes in the future.

Acknowledgements

The authors are grateful to FAPESP: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (grant number: 2019/26854-2), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), and CNPq for the financial support (PQ2). Also, we would like to thank Prof. Pedro Padilha by the Cobalt quantification.

REFERENCES

- ABE, J.; BERK, B. C. Novel mechanisms of endothelial mechanotransduction. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 34, n. 11, p. 2378–86, nov. 2014.
- ACCORSI-MENDONÇA, T. et al. Expression of matrix metalloproteinases-2 and -9 and RECK during alveolar bone regeneration in rat. **Journal of molecular histology**, v. 39, n. 2, p. 201–208, abr. 2008.
- AFONSO, S. Biomateriais E. 1998.
- ALBREKTSSON, T. et al. Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. **Acta orthopaedica Scandinavica**, v. 52, n. 2, p. 155–170, 1981.
- ALBUQUERQUE, D. F. UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE-UFRN CENTRO DE BIOCÊNCIAS-CB PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ESTRUTURAL E FUNCIONAL-PPGBioEF EFEITO DA FOTOBIMODULAÇÃO NA PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE DE CÉLULAS ENDOTELIAIS DA VEIA UMBILICAL HUMANA (HUVEC. 2019).
- ALLEN, M. J. et al. THE EFFECTS OF PARTICULATE COBALT, CHROMIUM AND COBALT-CHROMIUM ALLOY ON HUMAN OSTEOBLAST-LIKE CELLS IN VITRO. <https://doi.org/10.1302/0301-620X.79B3.0790475>, v. 79-B, n. 3, p. 475–482, 1 maio 1997.
- ARIAS, C. F. et al. Bone remodeling: A tissue-level process emerging from cell-level molecular algorithms. **PLoS ONE**, v. 13, n. 9, 2018.
- AZEVEDO, V. V. C. et al. Materiais cerâmicos utilizados para implantes. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 1, p. 31–39, 2008.
- BARCELOUX, D. G. **Cobalt Journal of Toxicology - Clinical Toxicology**, 1999.
- BARONCELLI, M. et al. Human mesenchymal stromal cells in adhesion to cell-derived extracellular matrix and titanium: Comparative kinome profile analysis. **Journal of cellular physiology**, v. 234, n. 3, p. 2984–2996, mar. 2019.
- BARUAH, J.; WARY, K. K. Exosomes in the Regulation of Vascular Endothelial Cell Regeneration. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 7, p. 353, jan. 2019.
- BEBER, G. M. M. **Interação músculo-osso: papel do IGF-1 de origem muscular no esqueleto**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2021.
- BEZERRA, F. et al. Nano hydroxyapatite-blasted titanium surface affects pre-osteoblast morphology by modulating critical intracellular pathways. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 114, n. 8, p. 1888–1898, 1 ago. 2017.
- BLANK, M.; SIMS, N. A. Cellular Processes by Which Osteoblasts and Osteocytes Control Bone Mineral Deposition and Maturation Revealed by Stage-Specific EphrinB2 Knockdown. **Current Osteoporosis Reports**, v. 17, n. 5, p. 270–280, 2019.
- BRANEMARK, P. I. et al. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous

jaw. Experience from a 10-year period. **Scandinavian journal of plastic and reconstructive surgery. Supplementum**, v. 16, p. 1–132, 1977.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

DA COSTA FERNANDES, C. J. et al. Titanium-enriched medium drives low profile of ECM remodeling as a pre-requisite to pre-osteoblast viability and proliferative phenotype. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 50, n. February, p. 339–346, 2018a.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

DOMEZI, J. P. **Efeito das células endoteliais mediadas pelo LTB 4 em células ósseas**. Bauru: Universidade de São Paulo, 2018.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

KARSENTY, G. UPDATE ON THE BIOLOGY OF OSTEOCALCIN. **Endocrine**

practice : official journal of the American College of Endocrinology and the American Association of Clinical Endocrinologists, v. 23, n. 10, p. 1270–1274, out. 2017.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1094, n. 1, p. 8–18, ago. 1991.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ORIENTADOR, T.; GUARNIERO, R. Carlos Eduardo Sanches Vaz Avaliação do efeito

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

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

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

PINTO, T. S. et al. c-Src kinase contributes on endothelial cells mechanotransduction in a heat shock protein 70-dependent turnover manner. **Journal of cellular physiology**, v. 234, n. 7, p. 11287–11303, jul. 2019.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SAMELKO, L. et al. Cobalt-Alloy Implant Debris Induce HIF-1 α Hypoxia Associated

Responses: A Mechanism for Metal-Specific Orthopedic Implant Failure. **PLOS ONE**, v. 8, n. 6, p. e67127, 20 jun. 2013.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ZAMBUZZI, W. F. et al. MMP-9 and CD68(+) cells are required for tissue remodeling in response to natural hydroxyapatite. **Journal of molecular histology**, v. 40, n. 4, p. 301–309, ago. 2009.

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

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

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

DISCUSSÃO

O desenvolvimento e regeneração do osso requerem mecanismos bem orquestrados envolvendo sinais acoplados por células ativas como osteoblastos e células endoteliais, que desempenham papéis decisivos também durante sua remodelação óssea e isto é uma hipótese ao redor dos implantes dentários que dirigem a osseointegração. Além de liberar sinais angiócrinos (DIOMEDE et al., 2020) células endoteliais também estão envolvidas com a rede vascular que envolve os biomateriais oferecendo nutrientes, oxigênio e o tráfego de células indiferenciadas. É importante ressaltar que os biomateriais implantáveis são capazes de regular o metabolismo celular através da liberação de moléculas ativas que são decisivas para organizar o microambiente relacionado ao implante para posteriormente favorecer a diferenciação e osteoblastos e a osteogênese (DA COSTA FERNANDES et al., 2018a; DA SILVA et al., 2018; FERNANDES et al., 2018b; MACHADO et al., 2019). Embora algum progresso tenha sido feito em relação à compreensão do comportamento biológico em resposta às ligas de titânio, muito pouco se sabe sobre a liga CoCr. Isto nos levou a investigar o efeito metabólico das células endoteliais induzidas pelo CoCr sobre os genes marcadores na diferenciação osteogênica e no processo de remodelação do ECM, questões importantes que ocorrem durante a cicatrização óssea e a osteointegração (GEMINI-PIPERNI et al., 2014).

O meio enriquecido com CoCr foi obtido através da incubação de discos CoCr em meio de cultura celular livre de FBS por até 24 horas (FERNANDES et al., 2018b; MACHADO et al., 2019) e esta condição promoveu liberação significativa da quantidade de Co, que foi capturada pelas células endoteliais e provavelmente isso modificou seu metabolismo. Muito importante considerar que o cobalto é um agente químico indutor de hipoxia e pode afetar a atividade celular (WAGATSUMA et al., 2020). De fato, a condição de hipoxia parece explicar a diminuição significativa da carbonilação protéica nas células endoteliais submetidas ao meio enriquecido com CoCr, uma vez que este é um tipo de oxidação protéica que pode ser promovido por espécies reativas de oxigênio, formando cetonas reativas ou aldeídos que podem ser reagidos por 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) para formar hidrazonas (SUZUKI; CARINI; BUTTERFIELD, 2010). Além disso, este efeito de hipoxia também é observado afetando a expressão do HIF1 α em células endoteliais submetidas à maior quantidade de cobalto. Além disso, investigamos melhor o efeito do meio enriquecido com CoCr nas células endoteliais, analisando a expressão de genes relacionados com o fenótipo da célula

endotelial, tais como VEGF e NOS (nNOS e eNOS). Curiosamente, o gene nNOS foi expresso mais alto em resposta ao CoCr em células endoteliais com cisalhamento e espera-se que este NOS libere óxido nítrico (NO), modulando a função dos vasos. Estes resultados corroboram com o estudo publicado anteriormente, que mostramos a ativação do AKT em resposta ao CoCr (MACHADO et al., 2019), uma vez que o AKT é conhecido por impulsionar a liberação de NO e melhorar o desempenho da célula endotelial sob cisalhamento.

Considerando o estímulo osteogênico das ligas CoCr, relatamos neste estudo que os metabólitos liberados pelas células endoteliais em resposta ao CoCr são capazes de impulsionar a ativação de genes importantes relacionados com a diferenciação osteoblasto, exigindo inicialmente a expressão de Runx2. É importante notar que os genes ALP, Osteocalcina e BSP também foram ativados principalmente em resposta a metabólitos de células endoteliais com tensão de cisalhamento respondendo a c/DAE. Esta diferença biológica encontrada entre as respostas as diferentes ligas avaliadas podem ser explicadas pela quantidade de Co liberada para o meio de cultura celular em ambas as condições, talvez desencadeando caminhos baseados na hipóxia diferencial.

A disponibilidade de oxigênio compromete diretamente o metabolismo energético das células e parece estar sendo modulada pelo meio enriquecido com CoCr (HANNAH et al., 2020). Nos osteoblastos, sugerimos que este ambiente de hipóxia pode exigir a expressão da osteocalcina, modulando com o metabolismo energético com oxidação de carboidratos. Nossos resultados mostram que a osteocalcina foi mais expressa em resposta aos metabólitos das células endoteliais sob cisalhamento e desafiadas por CoCr, e espera-se que a osteocalcina desempenhe papéis duplos, contribuindo com a osteogênese e a modulação do metabolismo energético (GEMINI-PIPERNI et al., 2014; MABILLEAU et al., 2008). Os resultados apresentados neste estudo mostram claramente o acoplamento entre células endoteliais e osteoblastos e esta comunicação entre eles pode ser modulada por proteínas solúveis e vesículas extracelulares, tais como exossomos (BARUAH; WARY, 2019), mas novos estudos são necessários para melhor investigar esta hipótese.

A remodelação do osso que envolve os dispositivos metálicos implantados é um mecanismo importante exigido pelas etapas hierárquicas da osteointegração, afetando a sobrevivência e diferenciação dos osteoblastos (COSTA FERNANDES; ZAMBUZZI, 2020; FERNANDES et al., 2019; MARUMOTO et al., 2017). Assim, é necessário compreender melhor o envolvimento das metaloproteinases matriciais (MMPs) e a

expressão do colágeno em resposta aos biomateriais. Neste estudo, temos mostrado que os metabólitos liberados pela resposta endotelial ao CoCr afetam o fenótipo osteoblasto e modulam a remodelação da MMPs promovendo atividades mais elevadas tanto das MMPs-2 como das -9, bem como modulando a expressão das TIMPs1 e 2. Em conjunto, estes dados sugerem um mecanismo bem modulado de remodelação de ECM em resposta ao meio enriquecido com CoCr.

CONCLUSÃO

Levando em conta os dados obtidos, este estudo mostra que existe uma interação entre células endoteliais e osteoblastos em resposta ao meio enriquecido com CoCr e esta comunicação favorece a diferenciação dos osteoblastos e a remodelação do ECM in vitro, talvez estimulada pela hipóxia induzida pelo cobalto.

PERSPECTIVA

Este estudo abre novos caminhos para compreender melhor as exigências celulares e moleculares durante a osteointegração dos dispositivos CoCr e requer uma melhor avaliação destes resultados em protocolos pré-clínicos, enriquecendo biomateriais com metabólitos de células endoteliais e osteoblastos em resposta ao meio enriquecido com CoCr, procurando melhorar a cicatrização óssea a fim de reivindicar esta estratégia em propósitos clínicos no futuro. Seria de grande interesse também realizar a avaliação dos efeitos específicos do cromo, de como ocorre a liberação de partículas dentro dessa liga e a sua interação com o organismo.

REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Bauru: Universidade de São Paulo, 2018.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

301–309, ago. 2009.

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

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

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