UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA BIOMÉDICA

Trabalho de Conclusão de Curso

REGENERAÇÃO ÓSSEA: UMA REVISÃO SOBRE OS BIOMATERIAIS BASEADOS EM HIDROXIAPATITA

Priscila Caroline de Sousa Costa

Natal/RN
2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE

CENTRO DE TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA BIOMÉDICA

REGENERAÇÃO ÓSSEA: UMA REVISÃO SOBRE OS BIOMATERIAS BASEADOS EM HIDROXIAPATITA

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Departamento de Engenharia Biomédica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte para obtenção do título de Graduada em Engenharia Biomédica.

Graduando: Priscila Caroline de Sousa Costa

Orientador (a): Prof.ª Dr.ª Susana Margarida Gomes Moreira

Natal/RN

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE

CENTRO DE TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA BIOMÉDICA

REGENERAÇÃO ÓSSEA: UMA REVISÃO SOBRE OS BIOMATERIAS BASEADOS EM HIDROXIAPATITA

Banca Examinadora do Trabalho de Conclusão de Curso:

Profª. Drª. Susana Margarida Gomes Moreira _____

UFRN – Orientadora

Profª. Drª. Beatriz Stransky Ferreira _____

UFRN – Avaliador Interno

Ms. Francisco Carlos da Silva Júnior _____

UFRN – Avaliador Interno

Natal/RN
2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, àquele que me guiou, acompanhou e aconselhou durante toda minha vida acadêmica e extra acadêmica, me estimulando diversas vezes quando mais precisei, dando forças para continuar quando pensei não conseguir mais e me fazendo acreditar no potencial que às vezes parecia difícil de erguer e a vencer os limites que eu mesma não acreditava conseguir superar. A Deus, toda minha fé, amor e gratidão.

A minha amada mãe, Maria da Conceição, e a meu amado pai, Carlos Mendes, que sem nunca hesitar estiveram sempre dispostos a me ouvir, me aconselhar, me ajudar e a tentarem entender minha ausência e estresse acumulado durante todo o percurso. Agradeço toda a paciência, força, reciprocidade de amor e suporte que me deram durante toda a minha caminhada. A vocês devo tudo, meus exemplos de vida.

Agradeço também ao meu irmão, Carlos Júnior, que me ensinou, acompanhou, riu comigo, amou, cuidou e fez mais do que um simples papel de irmão. Me auxiliando em todo pequeno e grande cálculo ou circuito e me incentivando a sempre buscar mais e correr atrás dos meus sonhos. Por todo o apoio, todo filme assistido e exercício debatido, te agradeço. E também a minha irmã, Patrícia Catarine, por todos os momentos de descontração, por todas as risadas e todo o amor de nossa amizade e irmandade eterna. A vocês todo o meu amor e carinho.

A minha orientadora, Susana Margarida, que me acolheu às cegas e confiou, mesmo sabendo que o caminho seria árduo. Agradeço pela oportunidade, pela atenção e tempo disponível, pela paciência e pelos ensinamentos. Foram poucos meses, mas intensos de aprendizado e que venham mais pela frente. E aos colegas do LBMG que me acolheram.

A professora Caroline Vilar, por todo o incentivo e confiança para que eu seguisse meus sonhos, aos meus amigos, Juliana, Rayane, Jéssica, Nadyne, Gustavo, Júlio, Priscila, Severino, Emerson e todos os outros que fizeram do curso e da vida um bom período cheio de risadas e histórias. A Nathan, que me ajudou e incentivou nesse último momento, mostrando ser companheiro e paciente. E a todos aqueles que de alguma forma me incentivaram, apoiaram e fizeram dessa caminhada difícil uma cheia de alegrias.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 10

2. OBJETIVOS 13

2.1. GERAL 13

2.2. ESPECÍFICOS 13

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 14

3.1 MEDICINA REGENERATIVA E ENGENHARIA TECIDUAL 14

3.2 TECIDO ÓSSEO: COMPOSIÇÃO E REMODELAÇÃO 17

3.3 BIOMATERIAIS 25

3.4 HIDROXIAPATITA 34

3.5. TESTES DE CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE 42

4. CONCLUSÃO 50

5. REFERÊNCIAS 51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Diagrama representativo da relação entre ET e MR 15

Figura 2 – Representação das estratégias usadas na ET do osso 16

Figura 3 – Estrutura do tecido ósseo em escala ordenada (de micro para nano) 18

Figura 4 – Imagens histológicas de micrografias (luz e eletrônica) de osso alveolar em ratos 19

Figura 5 – Micrografias (luz e eletrônica) mostrando partes de osso alveolar de ratos 20

Figura 6 – Divisão durante o mecanismo de regeneração óssea guiada 21

Figura 7 – Esquema das células ósseas e a relação entre si junto à matriz óssea 22

Figura 8 – Terapias mais utilizadas atualmente na regeneração e reparo ósseo 24

Figura 9 – Propriedades que influenciam na reposta imunológica de diferentes tipos de biomateriais 27

Figura 10 – Comparativo entre a microestrutura das cerâmicas HA e zircônia 29

Figura 11 – Estrutura porosa de esponja em poliuretano combinado com HA-titânia 31

Figura 12 – Diferentes biomateriais utilizados na regeneração óssea 32

Figura 13 – Imagens de micrografia eletrônica de varredura de fontes de obtenção e formas naturais da HA 35

Figura 14 – Resultados histológicos de cHA, ZnCHA e cHA (ao final de 9 semanas) 39

Figura 15 – Resultados de testes de citocompatibilidade multiparamétrica de HA e Zn-HA em células MC3T3-E1 44

Figura 16 – Fotomicrografias de células analisadas no ensaio CBMN 46

Figura 17 – Etapas da realização do ensaio cometa 47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Materiais com suas aplicações e características 34

Tabela 2 – Requisitos e propriedades necessários ao uso da HA 37

Tabela 3 – Diferentes formas da HA e suas aplicações na medicina e odontologia 38

Tabela 4 – Estudos realizados para avaliação de citotoxicidade e potencial osteogênico de materiais à base de HA desenvolvidos por brasileiros que integram o grupo REGENERA 41

Tabela 5 – Levantamento quantitativo do PubMed em 25 de Novembro de 2018 47

LISTA DE ABREVIAÇÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS

AMES – Avaliação de Mutações Genéticas em Bactérias

AMO – Aspirado de Medula Óssea

B – Bone (Osso)

BLC – Bone Lining Cells (Células de revestimento ósseo)

BV – Blood Vessel (Vasos sanguíneo)

CBMN – Cytokinesis-Block MicroNucleus (Micronúcleo de bloqueio de citocinese)

DFDB – Decalcified Freeze-Dried Bone (Osso liofilizado desmineralizado)

DNA – Ácido DesoxirriboNucléico

ET – Engenharia Tecidual

GBR – Guided bone regeneration (regeneração óssea guiada)

HA – Hidroxiapatita

ISO – *International Organization for Standardization*

FDA – *Food and Drug Administration*

MO – Matriz Óssea

MOD - Matriz Óssea Desmineralizada

MR – Medicina Regenerativa

MTT – 3-(4,5-Dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil drometo de tetrazolina

NIBIB – *National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering*

NTC – Nanotubos de Carbono

OB – Osteoblasto

OBM – Osso Bovino Mineralizado

OC – Osteoclasto

OECD – Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico

OT – Osteócito

PCL – Poli e-CaproLactona

PLA – Polylactic Acid (ácido polilático)

PLDA – Poly D-Lactic Acid (Ácido Poli-D-Láctico)

PLLA – Poly-L-Lactide Acid (Ácido Poli-L-Lactídeo)

PMMA – Polymethyl Methacrylate (Polimetilmetacrilato)

RGD – Arginyl-glycyl-aspartic acid (Ácido arginil-glicil-aspártico)

TCP – Fosfato TriCálcico

UMB – Unidades Multicelulares Básicas

XTT – 2,3-Bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida

COSTA, Priscila Caroline de Sousa. **Regeneração óssea: Uma revisão sobre os biomateriais baseados em hidroxiapatita.** Trabalho de Conclusão de Curso, Graduação em Engenharia Biomédica, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 58p., 2018.

RESUMO

Os problemas relacionados com perdas de massa óssea continuam sem ter um tratamento satisfatório, e por isso ainda são muitas as pesquisas que buscam a solução para esta demanda. Dentro dos materiais mais explorados para aplicações na regeneração do osso encontramos os baseados em hidroxiapatita, uma vez que esses apresentam grande similaridade com a matriz extracelular desse tecido. Entretanto, como o osso possui particularidades estruturais e funcionais complexas, o desenvolvimento de um biomaterial que promova a sua regeneração atendendo a todas as suas exigências ainda requer uma resolução. Nesse contexto, materiais compostos à base de hidroxiapatita nanoestruturada contendo substâncias como zinco, estrôncio e carbono têm demonstrado, em ensaios preliminares, resultados promissores para uso no reparo ósseo. No entanto, qualquer material que tenha como finalidade uma aplicação clínica deve ser estudado do ponto de vista citotóxico e genotóxico. Assim, o objetivo deste trabalho será abordar a regeneração óssea na perspectiva da medicina regenerativa, focando nos biomateriais e em suas funcionalidades e propriedades, em particular na hidroxiapatita pura e associada a outros materiais, bem como revisar os estudos que abordam a citotoxicidade desses materiais seguindo as normas exigidas para avaliar sua biocompatibilidade e evidenciar o quão negligenciada tem sido a avaliação genotóxica nesse contexto.

Palavras-chave: Hidroxiapatita. Citotoxicidade. Genotoxicidade. Regeneração óssea.

COSTA, Priscila Caroline de Sousa. **Bone regeneration: A review of hydroxyapatite based biomaterials**. Conclusion Work Project, Biomedical Engineering Bachelor Degree, Federal University of Rio Grande do Norte, 58p, 2018.

ABSTRACT

The problems related to the bone loss continue without a satisfactory treatment, so there are still many researches looking for a solution to this demand. Among the most exploited materials for applications in bone regeneration are those based on hydroxyapatite, due to its similarity with the extracellular matrix of this tissue. However, as the bone tissue has complex structural and functional particularities, the development of a biomaterial that promotes its regeneration in accordance with all its requirements still requires a solution. In this context, composite materials based on nanostructured hydroxyapatite containing substances such as zinc, strontium and carbon have shown, in preliminary assays, promising results for the use in bone repair. However, any material intended for clinical application should be studied from a cytotoxic and genotoxic point of view. Thus, the objective of this work will be to revise the content involving the bone regeneraton on the regenerative medicine perspective, focusing on the biomaterials functionalities and properties. In particular, studies about cytotoxicity of materials based on pure hydroxyapatite and composites of hydroxyapatite associated with other materials will be review and it will shown how the genotoxicity evaluation has been neglected.

Key words: Hydroxyapatite. Cytotoxicity. Genotoxicity. Bone regeneration.

1. INTRODUÇÃO

Todos os anos, cerca de dois milhões de pacientes em todo o mundo necessitam de um procedimento que envolve a utilização de enxerto para reparar defeitos ósseos decorrentes de vários motivos, que incluem eventos traumáticos e não traumáticos, anormalidades congênitas ou outras doenças (BOHNER, 2010; HABIBAH et al., 2018). As técnicas hoje utilizadas nesses casos ainda possuem falhas que necessitam de respostas, como é o caso da utilização do enxerto autólogo, que além de ser um procedimento que envolve duas cirurgias, também possui problemas quanto à morbidade no local de origem da extração. Por outro lado, a utilização de enxertos alogênicos aumenta as chances de rejeição, podendo levar ao desenvolvimento de reações imunológicas, e também aumenta o risco na transmissão de doenças (BOHNER, 2010).

Nesse contexto atuam a medicina regenerativa e a engenharia tecidual, que são áreas interdisciplinares e fazem uso dos fundamentos da engenharia e das ciências da vida para desenvolver estratégias que promovam a regeneração de tecidos danificados. Assim, na engenharia tecidual os pesquisadores trabalham no desenvolvimento de implantes artificiais, produção de tecidos em laboratórios capazes de substituir partes do organismo (LANGER, 2000). E a medicina regenerativa vai ainda mais longe utilizando, além dos métodos da engenharia tecidual, as propriedades de autoregeneração do próprio organismo para promover a regeneração de tecidos e órgãos danificados (COLOMBO et al, 2017). Ambas objetivam a substituição biológica de órgãos e tecidos danificados através do desenvolvimento de novos biomateriais combinados ou não com células e moléculas bioativas (OLIVEIRA, 2010). No desenvolvimento de novos materiais para a aplicação na medicina regenerativa e engenharia tecidual vários aspectos são considerados, como a biocompatibilidade, taxa de bioreabsorção, porosidade, composição, entre outros. O impacto apresentado por essas áreas é enorme, tanto do ponto de vista terapêutico quanto econômico.(GALDINO et al., 2014; LANGER, 2000).

Uma das áreas estudadas na medicina regenerativa é o reparo ósseo, devido à complexidade estrutural e funcional apresentada por esse tecido (BROZEK; KURPISZ; KOCZOROWSKI, 2018). O osso exerce diversas funções e apresenta uma estrutura complexa e, apesar da grande capacidade de auto-regeneração observada nesse tecido, quando ele sofre

um grande dano, o organismo por si só não é capaz de auto regenerar-se. Por isso, há uma busca por tratamentos alternativos e pelo desenvolvimento de biomateriais que mimetizem o tecido ósseo, objetivando melhorar a eficiência e promoção da regeneração óssea (ORCIANI et al., 2017).

Dentre os materiais utilizados na regeneração óssea encontramos a hidroxiapatita, que é um material pioneiro nesta área. É um mineral que está presente no corpo humano como o principal constituinte da fase inorgânica desse tecido (VALENTE et al., 2016). Essa variante da apatita é amplamente utilizada em implantes e estudos para osso, por apresentar propriedades muito adequadas a esse fim, entre elas, a osteocondução (suportando assim os processos de osseointegração e osteogênese), baixa toxicidade, biocompatibilidade, bioatividade, porosidade com estrutura similar à fase mineral óssea e a capacidade de formar ligações químicas fortes com o tecido em questão (COSTA et al., 2009).

Dentre os estudos realizados, existem resultados que mostram as propriedades melhoradas de compósitos da hidroxiapatita com outros materiais (HABIBAH et al., 2018). Entre os materiais utilizados na produção desses compósitos, a associação dessa apatita com zinco, estrôncio ou carbono obteve resultados positivos e promissores (RIBEIRO et al., 2016). Neste sentido, o INCT (Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Medicina Regenerativa) - REGENERA é uma rede nacional composta por grupos multidisciplinares que propõe o desenvolvimento da Medicina Regenerativa no Brasil, utilizando três componentes como base, as células-tronco, matrizes e fatores recombinantes, na bioengenharia de órgãos e tecidos. Essa rede é composta por vários pesquisadores de 28 laboratórios associados a 21 Instituições brasileiras (incluindo o nosso grupo da UFRN), que têm buscado, dentre os seus projetos, o desenvolvimento de estratégias alternativas para a regeneração de vários tecidos, incluindo o tecido ósseo. Assim, vários materiais à base de hidroxiapatita nanoestruturada contendo os compostos já citados e têm sido desenvolvidos e a sua aplicação clínica tem sido estudado (MAVROPOULOS et al., 2013; VALIENSE et al., 2015). Esses materiais mostraram resultados promissores a nível de indução da regeneração óssea, contudo, pouco se sabe quanto à sua genotoxicidade. Uma vez que se pretende fazer a translação desses materiais para aplicações clínicas, aspectos relacionados com a genotoxicidade também precisam ser investigados, e é nessa tarefa que o nosso grupo se enquadra.

Todo biomaterial que visa uma aplicação clínica deve passar por uma série de testes, orientados e padronizados por órgãos como a *International Organization for Standardization* (ISO), *Food and Drug Administration* (FDA) e *Organization for Economic Co-operation and Development* (OECD). A ISO reune especialistas independentes de diferentes áreas para desenvolver Normas Internacionais relevantes, voluntárias, baseadas no consenso e no mercado, que apóiem a inovação e forneçam soluções para os desafios globais. A FDA é uma agência reguladora do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos, responsável pela proteção e promoção da saúde pública, estabelecendo diretrizes para controlar e supervisionar a produção de produtos farmacêuticos, alimentos, dispositivos biomédicos e outros. E a OECD é uma organização internacional que visa o crescimento econômico e estabilidade financeira, através da regulação de projetos de desenvolvimento em curto e médio prazo. Dentre os principais testes padronizados por essas e outras entidades, encontram-se os que avaliam os efeitos citotóxicos e genotóxicos, sendo assim possível avaliar a nocividade da substância em contato com as células. Neste contexto, a presente revisão de literatura objetiva abordar os princípios da engenharia tecidual e medicina regenerativa, bem como os desafios que os pesquisadores encontram para desenvolver uma estratégia que resolva os problemas relacionados com a regeneração óssea. Assim, serão descritos os biomaterias mais utilizados, com um especial enfoque nos materiais baseados em hidroxiapatita desenvolvidos pelo grupo REGENERA. Serão também revisados os principais testes utilizados para avaliar a citotoxicidade e genotoxicidade dos materiais, uma vez que esses são aspectos fundamentais para a aplicação clínica de compostos.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

Pretende-se revisar os principais materiais utilizados na regeneração óssea e as suas vantagens e limitações, focando principalmente nos materiais constituidos à base de hidroxiapatita.

2.2. ESPECÍFICOS

- Conceituar e diferenciar os principais aspectos da engenharia tecidual e medicina regenerativa, bem como as aplicações e atuações dessas áreas;
- Apresentar a complexidade estrutural e funcional do tecido ósseo;
- Revisar os principais métodos utilizados no reparo do osso;
- Apresentar os desafios relacionados com o desenvolvimento de estratégias para promover a regeneração óssea;
- Revisar os tipos de materiais existentes (metais, cerâmicas, polímeros e compósitos) e suas principais características;
- Mostrar resultados de trabalhos que utilizam materiais baseados em hidroxiapatita para a regeneração óssea;
- Discutir a importância da realização dos testes de citotoxicidade e genotoxicidade na avaliação de biomateriais que visam a aplicação clínica.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

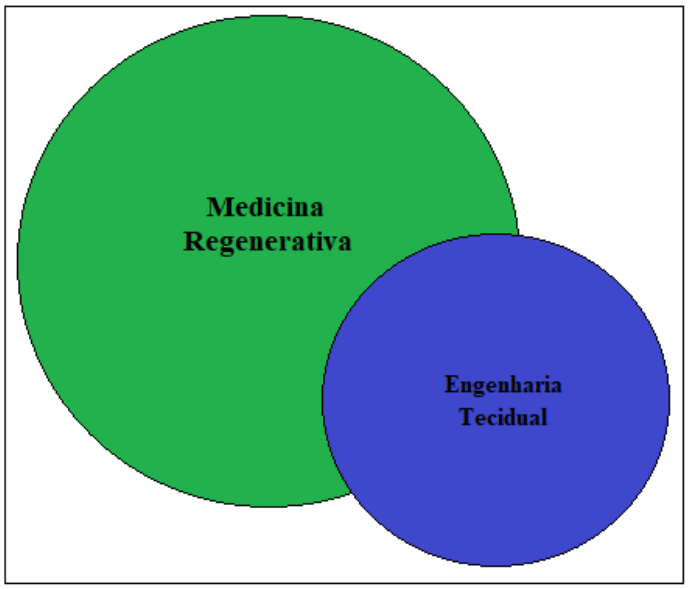
3.1 MEDICINA REGENERATIVA E ENGENHARIA TECIDUAL

Cerca de dois milhões de pessoas em todo o mundo sofrem com danos em seus órgãos e tecidos causados por doenças, defeitos congênitos (BOHNER, 2010; DZOBO et al., 2018; HABIBAH et al., 2018), acidentes, eventos traumáticos, entre outros fatores, que necessitam de transplantes para conseguir ter uma melhor qualidade de vida (ORCIANI et al., 2017). Buscando então atender a essas necessidades, as áreas da medicina regenerativa e engenharia tecidual têm crescido muito nos últimos anos, recebendo atenção de pesquisadores que objetivam solucionar as imensas filas de espera que existem para transplantes, bem como os problemas relacionados aos insucessos de tal procedimento como rejeições, complicações pós-cirúrgicas e infecções hospitalares (DAI et al., 2016).

A medicina regenerativa (MR) é um campo multidisciplinar que envolve as áreas da biologia, engenharia e medicina e objetiva substituir, restaurar, manter ou melhorar a funcionalidade dos órgãos e tecidos danificados ou com problemas de funcionamento. Esses problemas podem estar relacionados com a idade, doenças, traumas, defeitos congênitos, entre outros fatores (BAILEY et al, 2014; MAO; MOONEY, 2015; TANG et al., 2016). De acordo com o *National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering* (NIBIB) a MR, propõe explorar a autocura do organismo utilizando os próprios sistemas e mecanismos do corpo do paciente, promovendo o aumento da capacidade e eficiência de regeneração. Assim, mais do que tratar os sintomas de uma patologia, o objetivo da MR é aproveitar as próprias capacidades regenerativas do organismo para promover o seu reparo de modo que as funções perdidas sejam restauradas (DZOBO et al., 2018). Na MR são utilizados materiais, células (especialmente células-tronco) e moléculas bioativas, ou combinações desses componentes, para desenvolver estratégias que servirão de suporte estrutural e funcional para o tecido danificado auxiliando assim na sua recuperação/regeneração (ORLANDO, 2011; MAO; MOONEY, 2015).

A engenharia tecidual (ET), por sua vez, está contida na MR, e visa também a cura e melhoria de pacientes que apresentam danos em tecidos ou órgãos, buscando impedir o agravamento do seu funcionamento ou reparo desses (Figura 1). Entretanto, existem técnicas que diferenciam essas duas áreas: a ET não utiliza o autoreparo do organismo (como na MR), mas sim fatores, substâncias e materiais extras (sintéticos ou naturais), que são desenvolvidos fora do corpo (tecidos e *scaffolds*) para que posteriormente sejam implantados (GALDINO et al., 2014; KATARI et al., 2015).

Fig.1: Diagrama representativo da relação entre ET e MR. Essa última é uma área mais ampla com uso obrigatório de regeneração celular, mas não envolve totalmente a ET.



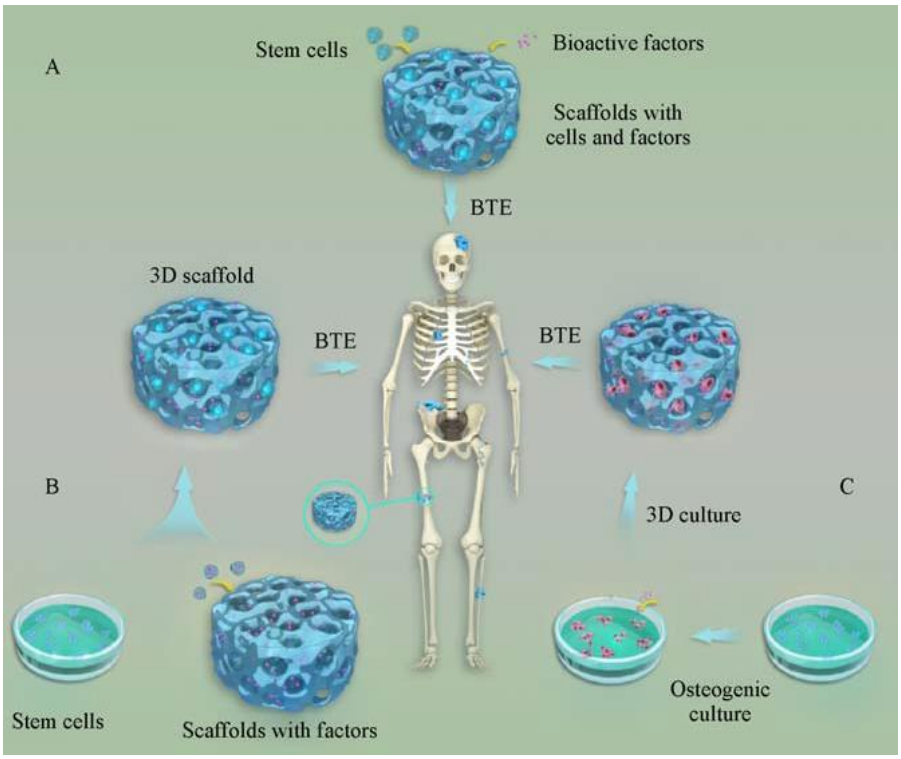
Fonte: Adaptado de Katari et al. (2015).

Dentre os procedimentos realizados na ET encontra-se o desenvolvimento de *scaffolds* (arcabouços), que são estruturas tridimensionais porosas compostas por biomateriais adequados para cada tipo de aplicação (GALDINO et al., 2014). São utilizadas nessa engenharia três abordagens fundamentais: 1) a produção de *scaffolds*, que simulam fora do corpo a base ou arcabouço do tecido ou órgão danificado; 2) a aplicação geralmente de células-tronco nos *scaffolds*, para que seja alcançado o preenchimento completo deles com células específicas de cada parte do corpo e se assemelhem com o tecido ou órgão original; e 3) a associação de moléculas biologicamente ativas, como fatores de crescimento, que

auxiliarão na formação do novo órgão ou tecido. Esses processos geralmente ocorrem por meio da expansão *in vitro* para que sejam então aplicadas (Figura 2) (JAMMALAMADAKA; TAPPA, 2018).

Para o desenvolvimento dos *scaffolds* é necessário considerar algumas características que são essenciais: a biocompatibilidade do material utilizado, incluindo a sua capacidade de induzir respostas imunogênicas, ser uma estrutura pré-vascularizada e 3D biomimética (que buscam a funcionalidade, estética e sustentabilidade na confecção da estrutura) e biodegradabilidade ajustável. Cada aplicação requer estratégias e propriedades específicas, como, por exemplo, no caso do tecido ósseo, em que existe uma preocupação com os fatores de crescimento, bem como com o cultivo de células esqueléticas e arcabouços para que sejam adequados à formação e reparo ósseo (Figura 2) (SHI et al., 2018).

Fig.2: Representação das estratégias usadas na ET do osso, incluindo o uso de células-tronco, fatores de crescimento e estruturas biocompatíveis para a confecção de *scaffolds*. (A) Associação dos *scaffolds* com as células e fatores bioativos; (B) *scaffolds* misturados com os fatores de crescimento e posteriormente com as células para consolidar uma estrutura 3D; e (C) culturas de células osteogênicas em sistemas 3D.



Fonte: SHI et al. (2018).

Dentre as técnicas mais utilizadas na confecção dos arcabouços, encontra-se a impressão 3D, um método simples que faz uso de biomateriais adequados a cada tipo de aplicação. Dentre elas encontram-se: a produção de enxerto ósseo com rede vascular (CUI et al., 2016), tecidos de órgãos complexos como o hepático (WANG; RIJFF; KHANG, 2017), bem como procedimentos diversos para o desenvolvimento de órgãos e tecidos como ovários (CORKUM; LARONDA; ROWELL, 2017), pele (LEE et al., 2014), válvulas aórticas (DUAN et al., 2013), osso e cartilagem (MARKSTEDT et al., 2015). Esse método da produção de scaffolds, porém, ainda apresenta como principal desvantagem a limitação dos biomateriais oferecidos no mercado, problema esse que chama a atenção dos pesquisadores, que têm buscado desenvolver novos materiais objetivando o uso biomédico (JAMMALAMADAKA; TAPPA, 2018).

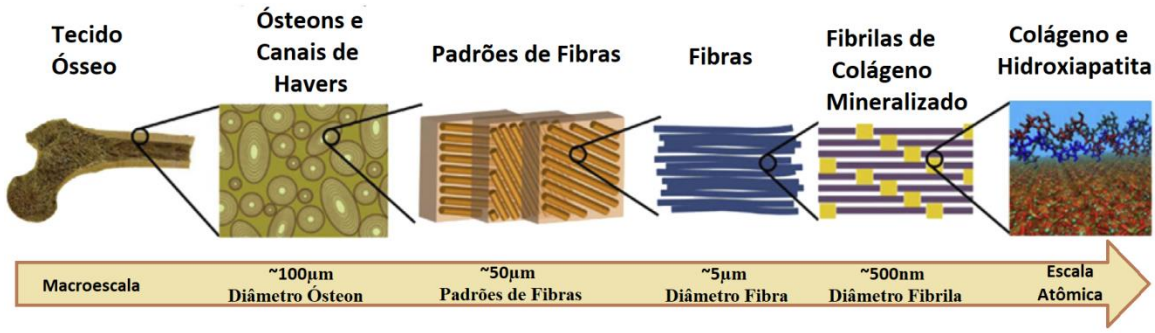
3.2 TECIDO ÓSSEO: COMPOSIÇÃO E REMODELAÇÃO

O tecido ósseo é o mais rígido do corpo apresentando um alto nível de resistência à pressão, sendo um dos mais complexos em termos estruturais, e possuindo uma organização ainda não totalmente compreendida. É capaz de suportar toda a carga oferecida pelo esqueleto, auxiliar na mobilidade do corpo, proteger os órgãos vitais, armazenar fosfato, cálcio e os componentes da hematopoiese, suportar as partes moles, acomodar a medula óssea e apoiar os músculos esqueléticos durante a locomoção (AMINI; LAURENCIN; NUKAVARAPU, 2013).

Esse tecido é composto basicamente por: 1) fase orgânica, que corresponde a cerca de 95% da matriz óssea, composta por colágeno tipo I, proteoglicanos e glicoproteínas; 2) fase inorgânica (mineral), composta predominantemente por cristais de fosfato e cálcio sob a forma de HA, que geram a rigidez do tecido, além de componentes como zinco, estrôncio, bário, fluorita, potássio, sódio, bicarbonato, citrato, carbonato e magnésio (FLORENCIO-SILVA et al., 2015); 3) fase constituída por fatores solúveis, dentre os quais encontram-se citocinas e fatores de crescimento; e 4) uma fase celular, com a presença de osteoblastos, osteoclastos, osteócitos e células de revestimento ósseo, responsáveis pela manutenção óssea. Esses elementos garantem a adequada atividade metabólica do tecido, mantendo a sua

estrutura, funcionalidade e capacidade de remodelação ideais (figura 3) (LU; KLEINE-NULEND; LI, 2017).

Fig. 3: Estrutura do tecido ósseo da maior (micro) para a menor (nano) escala, mostrando seus constituintes orgânicos e inorgânicos.

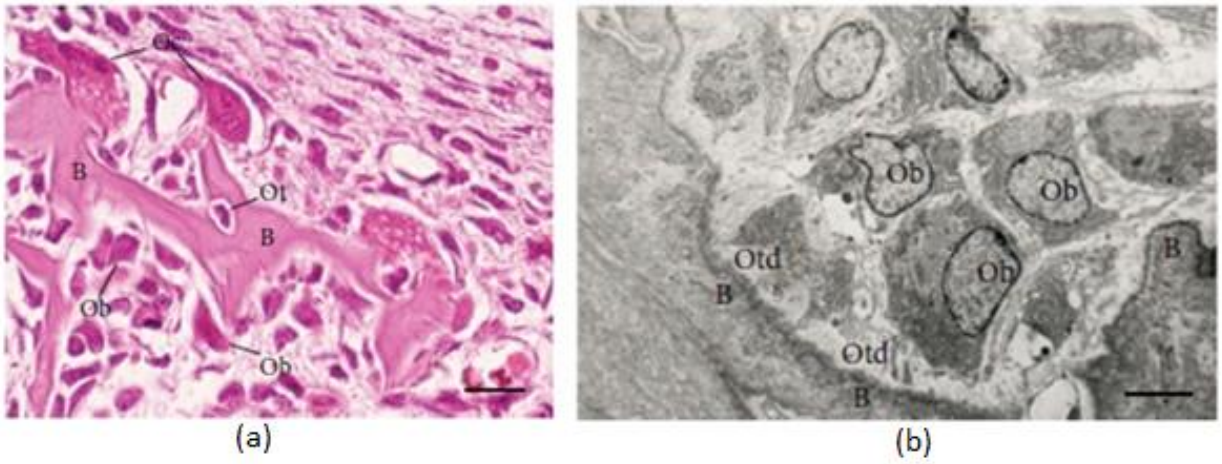


Fonte: Adaptado de Wang e Yeung (2017).

A fase celular do tecido ósseo promove o equilíbrio entre a formação de novo osso e o controle adequado dessa composição, possuindo cada célula uma especificidade funcional diferente:

1) Osteoblastos: Constituem de 4 a 6% do percentual total de células no osso, localizando-se ao longo de sua superfície. Essas células são mononucleadas e realizam a formação de novo osso (denominado osteóide) na matriz utilizando o colágeno e outras proteínas, além de controlarem os níveis de mineral e cálcio do tecido (SHI et al., 2018). Os osteoblastos sintetizam a matriz óssea através de dois processos: i) a deposição da matriz orgânica, secretando substâncias como colágenos tipo I, proteínas não colágenas e proteoglicanos; e ii) a mineralização da matriz celular, havendo a formação dos cristais de HA a partir dos íons fosfato e cálcio (Figura 4) (PATEL, 2008);

Fig. 4: Imagens histológicas de micrografias de luz (a) e eletrônica (b) de osso alveolar em ratos. (a) Superfície óssea com parte de uma trabécula óssea (B); são visualizados osteoblastos (Ob), grandes osteoclastos multinucleados (Oc) e osteócitos (Ot). (b) Superfície óssea calcificada (B) ao lado de osteóides (Otd) e osteoblastos. (Ob). (Escala = 2,7 μm).

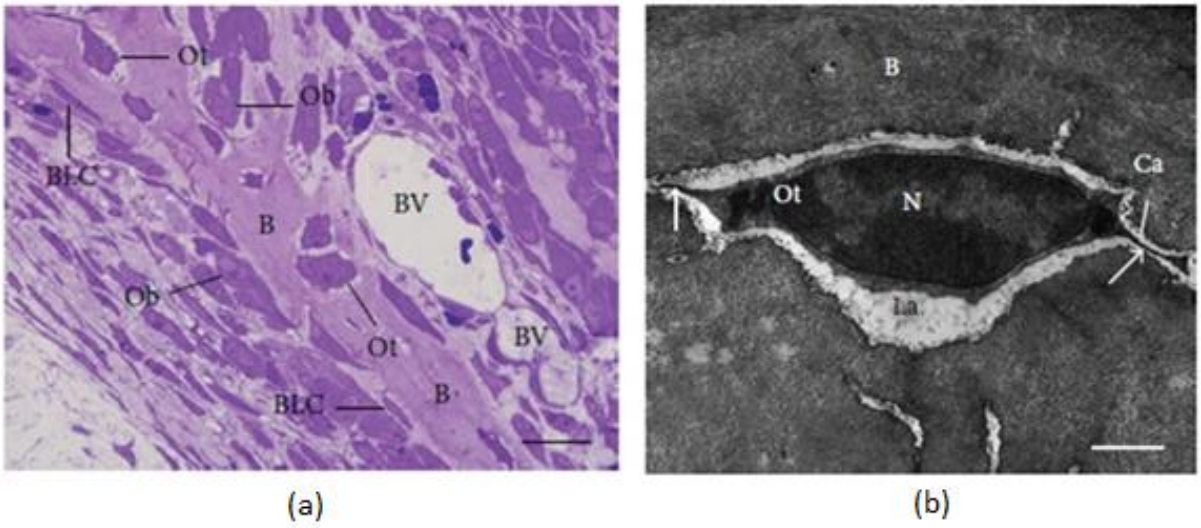


Fonte: Florencio-Silva et al. (2015).

2) Osteócitos: Abrangem cerca de 90 a 95% do montante celular do osso e estão inseridos na matriz óssea, sendo também mononucleadas (Figura 5a e 5b). Resultam da diferenciação de alguns osteoblastos depois de mineralizados e fixos à matriz do osso, tendo participação na nutrição desse tecido, além de auxiliarem no encaminhamento de células osteoclásticas quando ocorre necessidade de reabsorção óssea (WANG; YEUNG, 2017);

3) Osteoclastos: São células relacionadas aos macrófagos com capacidade de fagocitose. Os osteoclastos geralmente possuem mais de um núcleo (células multinucleadas diferenciadas) (Figura 5a) e a sua principal função é dissolver a matriz óssea e assim, juntamente com os osteoblastos, manter a homeostase do tecido. Existem problemas e doenças associadas ao desequilíbrio na formação de matriz óssea realizada pelos osteoblastos e ação de reabsorção realizada pelos osteoclastos como, por exemplo, a osteoporose (ELGALI et al., 2017);

Fig. 5: a) Micrografias de luz e b) eletrônica, mostrando partes de osso alveolar de ratos. a) uma seção com parte de uma trabécula óssea (B) e vasos sanguíneos (BV); superfície óssea onde estão presentes os osteoblastos (Ob), células de revestimento ósseo (BLC) e osteócitos (Ot) inseridos na matriz óssea. b) Detalhe da comunição entre os osteócitos (Ot) indicada pelas setas; N: Núcleo; Ca: Canalículo. (Escala = 15μm).



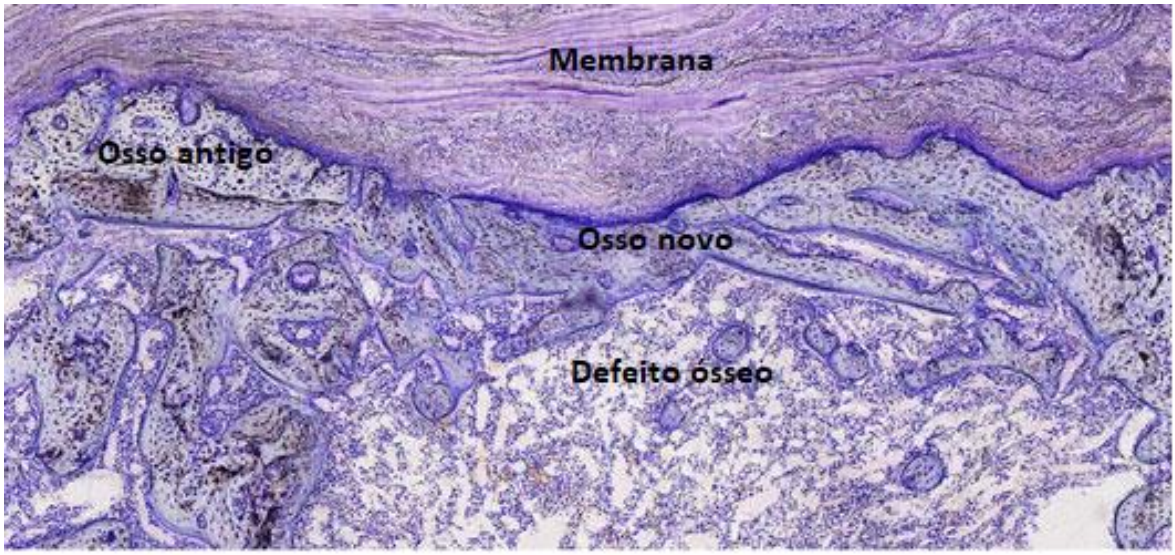
Fonte: Florencio-Silva et al. (2015).

4) Células de revestimento ósseo: Localizadas na superfície do osso, essas células são responsáveis principalmente pela entrada e saída de cálcio do tecido (Figura 5a). As ações dessas células não são totalmente conhecidas, entretanto, tem sido observado que elas intermediam o processo de reabsorção óssea e na diferenciação dos osteoclastos (FLORENCIO-SILVA et al., 2015).

O tecido ósseo apresenta um equilíbro dinâmico em sua reabsorção e renovação, mantendo assim a integridade estrutural do esqueleto, através de trocas químicas e remodelamento contínuos em sua organização que ocorrem por fatores externos e mediadores internos (como influência hormonal e mecanismos regulatórios intracelulares) (AMINI; LAURENCIN; NUKAVARAPU, 2013). Esse tecido, diferentemente de outros, possui grande capacidade de auto-regeneração, sendo continuamente remodelado com a substituição do osso antigo pelo recém formado, onde aproximadamente 25% de osso trabecular e 3% de osso cortical passa por esse processo todo ano (WANG; YEUNG, 2017). A renovação ocorre nas lacunas do osso onde há a formação de estruturas chamadas unidades multicelulares básicas

(UMBs) que contêm um grupo de osteoblastos e outro de osteoclastos além da associação indireta com os osteócitos da matriz (FLORENCIO-SILVA et al., 2015) (Figura 6).

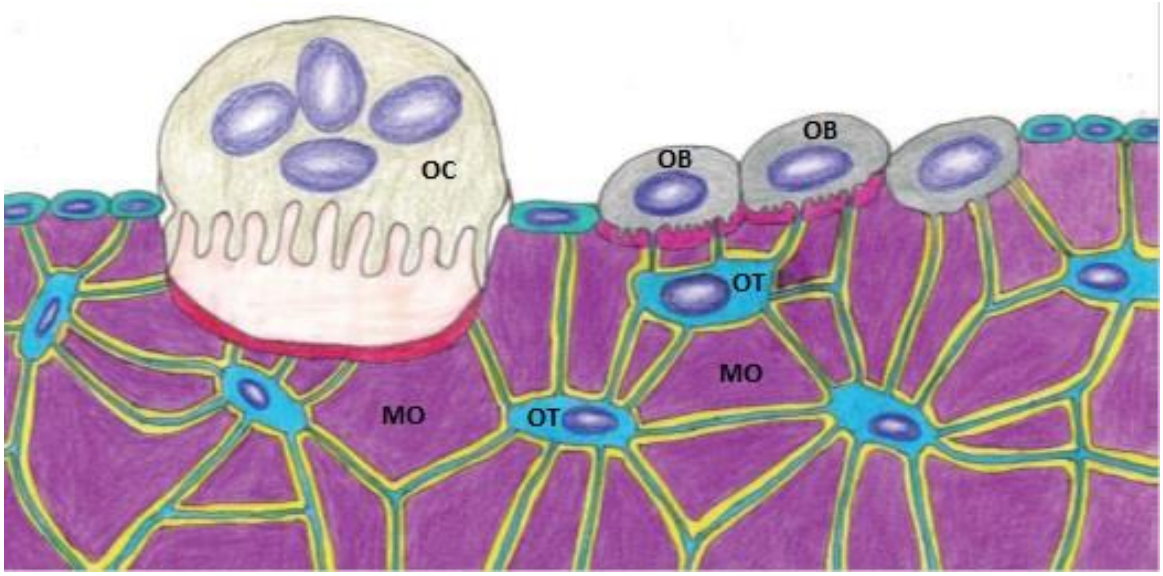
Fig. 6: Divisão durante o mecanismo de regeneração óssea guiada (GBR). Membrana de colágeno GBR aplicada em uma falha do osso, gerando a reconstrução estrutural desse defeito com osso recém-formado comparado à parte com o defeito ainda não tratado.



Fonte: Adaptado de Elgali et al. (2017).

O remodelamento do osso ocorre basicamente em três fases: 1) Inicialmente há a reabsorção óssea realizada pelos osteoclastos maduros, que deterioram a parte orgânica e mineral do osso; 2) logo em seguida há o período de transição entre a remoção do osso e consequente substituição, que é conhecida como fase de reversão, onde os osteoclastos dão lugar aos macrófagos (que não têm função totalmente compreendida); e 3) há a formação de novo osso pelos osteoblastos, que são estimulados a proliferarem pelos fatores de crescimento presentes no osso e a sintetizar a matriz óssea; havendo ainda a ação dos osteócitos e das células de revestimento ósseo para finalização do processo (Figura 7). Na fase inicial, a ação e diferenciação dos osteoblastos são inibidas por fatores expressos pelos osteoclastos, para evitar a formação óssea, objetivando a completa remoção do osso danificado ou envelhecido, ao passo que, durante a ação dos osteoblastos, fatores são expressados para inibirem a reabsorção do osso enquanto não terminar a fase de construção do novo tecido (AMADEI et al., 2006; FLORENCIO-SILVA et al., 2015).

Fig. 7: Esquema representando as células ósseas e a relação entre si junto à matriz óssea (MO). Os osteoblastos (OB) localizam-se na superfície óssea sintetizando novo osso; os osteoclastos (OC) participando da remoção de matriz antiga ou desgastada; e os osteócitos (OT) inseridos em meio à matriz óssea já mineralizada comunicando-se por meio dos canalículos.



Fonte: Adaptado de Florencio-Silva et al. (2015).

Esse processo de remodelação ocorre naturalmente durante o desenvolvimento e manutenção óssea do indivíduo, como também em casos de fraturas leves e simples. Entretanto, existem situações que levam a grandes perdas e defeitos ósseos sem a possibilidade da união do tecido pela auto-regeneração. Dentre esses casos, encontram-se os processos ortopédicos, incluindo cirurgias para pseudoartrose, artroplastia de quadril ou joelho, artrodese, retirada de tumores, grandes fraturas ósseas, procedimentos buco maxilofaciais, acidentes e eventos traumáticos, além dos problemas apresentados pela população idosa com doenças crônicas como diabetes e obesidade, sendo então necessárias alternativas para a recuperação desses problemas (WANG; YEUNG, 2017). E a técnica padrão ouro mais utilizada, até hoje, é o enxerto, que consiste no procedimento cirúrgico que retira de alguma fonte doadora uma parte do tecido ou órgão e transplanta-o para o local que se deseja reparar. O enxerto ósseo pode ser do tipo autógeno (o mais usado e considerado padrão ouro), homógeno, heterógeno ou sintético (MARTIN; BETTENCOURT, 2018):

1) Autógeno: Nesse caso o enxerto é retirado do próprio paciente, geralmente da calota craniana, crista ilíaca, tíbia ou mandíbula. É considerado o melhor procedimento para reposição óssea por apresentar fatores que impulsionam as células osteoprogenitoras a proliferem (osteocondução), a diferenciarem em osteoblastos (osteoindução), além de possuir células que geram a ação vital dos osteoblastos induzindo o desenvolvimento e formação do osso novo, com posterior ossificação e mineralização da matriz extracelular (osteogênese) (Figura 8). Entretanto, possui algumas desvantagens como a limitação da quantidade de fonte que pode ser retirada do local doador, possui remodelação acelerada (MARTIN; BETTENCOURT, 2018), além de apresentar riscos de infecção e morbidades gerados pelo procedimento cirúrgico (SUN et al., 2018);

2) Homógeno: O aloenxerto é proveniente de indivíduos da mesma espécie, porém geneticamente diferentes e, geralmente, são utilizados cadáveres para sua obtenção. São também denominados por enxerto humano desmineralizado liofilizado (DFDB) ou ainda matriz óssea desmineralizada (MOD), e possuem apenas os fatores osteocondutivos, necessitando assim de células-tronco do próprio paciente ou fatores de crescimento, esterilização e inativação de proteínas do material enxertado (WANG; YEUNG, 2017). Além disso, apresentam riscos de rejeição, transmissão de doenças e custo elevado (ORCIANI et al., 2017);

Fig. 8: Terapias mais utilizadas atualmente na regeneração e reparo ósseo. Existe ainda uma grande demanda por materiais que substituam o enxerto autógeno (procedimento considerado como padrão ouro). Abreviação: AMO: Aspirado de medula óssea.

Fonte: Adaptado de Martin; Bettencourt (2018).

3) Heterógeno: Neste caso o doador e receptor do enxerto são de espécies diferentes, sendo o osso bovino mineralizado (OBM) geralmente a fonte de doação mais utilizada. Também apresenta desvantagens, como os riscos de contaminação entre espécies, rejeição e transmissão de doenças (ORCIANI et al., 2017), exigindo assim como no enxerto homógeno, cuidados na esterilização e inativação de proteínas (PINTO et al., 2007);

4) Sintético: O enxerto aloplástico utiliza como fonte, biomateriais para suprir as falhas encontradas nos procedimentos anteriormente citados. Esse método apresenta algumas vantagens, como: fornecer maior segurança, menor custo, maior facilidade no procedimento cirúrgico, suprir a morbidade do local doador, oferecer fonte ilimitada, diminuir o tempo de cirurgia de enxertos ósseos (DANTAS et al., 2011), associar fatores de crescimento e células-tronco para a osteogenicidade e assim melhorar a incorporação de enxerto, bem como ser

capaz de ser moldado para se adequar ao local com dano (ORCIANI et al., 2017).

Nesse contexto, buscando solucionar esses desafios encontrados no reparo de grandes perdas ósseas que não são regeneradas pelo próprio organismo, a MR e a ET buscam o desenvolvimento de diversos biomateriais que mimetizem as estruturas ósseas para que seja alcançada a regeneração desse tecido através de algumas técnicas já mencionadas que utilizam biomateriais. Pesquisadores têm adicionado nanocristais a biomateriais para promover a eficácia de muitas funcionalidades, como a proliferação, diferenciação e adesão celular (LU; KLEINE-NULEND; LI, 2017).

3.3 BIOMATERIAIS

Um biomaterial pode ser definido como qualquer substância, material ou um composto, sejam eles sintéticos ou naturais, que entre em contato com o sistema biológico, objetivando tratar uma função, tecido ou órgão danificados do corpo, sem gerar reações adversas (tóxicas ou carcinogênicas) ao organismo (NETO; FERREIRA, 2018). Pode ser classificado de acordo com vários critérios: sua biodegradabilidade, biocompatibilidade, origem do material, composição química ou suas propriedades físicas. Deve-se atentar para a escolha do biomaterial adequado na confecção de *scaffolds*, que tanto servem como estrutura para suportar o crescimento celular, como também podem fornecer moléculas bioativas (como drogas, fatores de crescimento e outros sinais químicos). Sendo assim, a seleção do biomaterial passa por uma busca de condições que mimetizam os tecidos e órgãos que necessitam de substituição (JAMMALAMADAKA; TAPPA, 2018).

Os biomateriais que visam qualquer tipo de aplicação biomédica precisam atender a uma série de pré-requisitos, como descritos a seguir:

- Biocompatibilidade: É a não rejeição do biomaterial quando implantado no corpo (COSTA et al., 2009). O biomaterial não deve induzir resposta inflamatória (aguda ou crônica), e quando implantado *in vivo*, deve possuir baixo nível de reatividade no tecido, evitando assim uma possível rejeição do organismo, bem como reações

adversas, tóxicas ou carcinogênicas ao paciente (GALDINO et al., 2014; JAMMALAMADAKA; TAPPA, 2018);

- Bioreabsorção: O tempo de degradação do material deve ser compatível com o processo de regeneração ou cura do local danificado (JAMMALAMADAKA; TAPPA, 2018);
- Quimiotaxia: O material deve induzir a atração de células mesenquimais e a sua adesão, assim como a proliferação e diferenciação das células de forma eficiente (BURDICK, 2013);
- Baixo custo: Para que seja viável, o material deve ser economicamente competitivo, apresentando custos de produção semelhantes aos que são gastos com os autoenxertos, por exemplo, uma vez que esse é, atualmente, o principal procedimento usado na regeneração óssea (DENIZ, 2013);

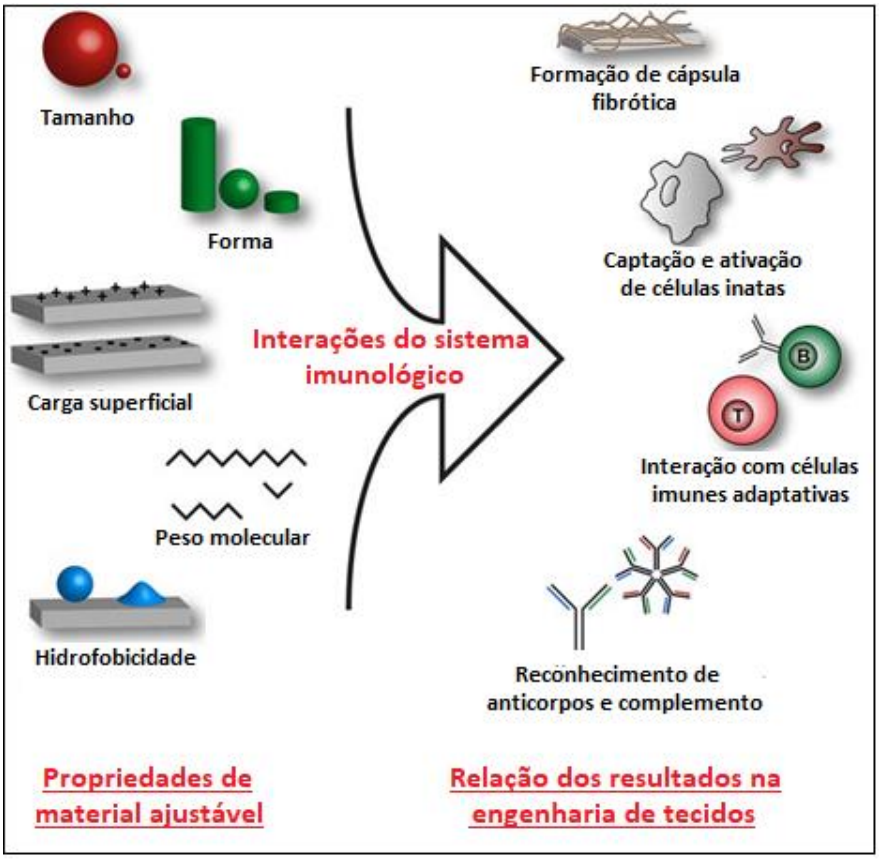
A força mecânica, a habilidade em prover agentes terapêuticos, a estabilidade direcional, a esterilização e a capacidade em ser ajustável durante o desenvolvimento são algumas características essenciais que devem ser apresentadas por biomateriais (JAMMALAMADAKA; TAPPA, 2018). Ainda dentre esses requisitos fundamentais, encontra-se a resposta imunológica adequada, que pode ser influenciada por diferentes propriedades do biomaterial, tais como: a sua forma, estabilidade, tamanho, peso molecular e particularidades superficiais, como a carga, as características químicas e a hidrofobicidade (Figura 9) (ANDORKO; JEWELL, 2017).

No caso particular de materiais para aplicação na regeneração óssea, o biomaterial deve apresentar, além dos requisitos comuns já mencionados, outras propriedades que são essenciais no reparo desse tecido específico:

- Osteocondução: Capacidade de suportar o crescimento ósseo, estimulando a migração das células osteoblásticas e osteo-progenitoras (DANTAS et al., 2011);
- Osteoindução: Capacidade de induzir a formação óssea através da diferenciação de células progenitoras (osteoblastos) formadoras do tecido ósseo (AMINI; LAURENCIN; NUKAVARAPU, 2012);

- Osteogênese: É a capacidade de osteodiferenciação que leva à formação de osso novo (ROBERTS; ROSENBAUM, 2012; BAUER; MUSCHLER, 2000);
- Porosidade: Propriedade essencial na difusão de oxigênio e nutrientes visando a sobrevivência e proliferação das células (ORCIANI et al., 2017). É importante para o processo da osseointegração, já que os poros do biomaterial geram uma eficiência na adesão entre ele e o tecido ósseo recém formado (COSTA et al., 2009);
- Angiogênese: Formação de novos vasos sanguíneos para que seja garantida uma ideal e eficiente absorção do fluido sanguíneo e auxílio na coagulação pós implante do biomaterial (MOON; WEST, 2009).

Fig. 9: Propriedades que influenciam na resposta imunológica de diferentes tipos de biomateriais: forma, tamanho, hidrofobicidade, carga superficial e peso molecular podem interferir nas interações do sistema imunológico quando implantados no organismo.



Fonte: Adaptado de Andorko e Jewell (2017).

Considerando a composição química do material (classificação citada anteriormente), ele pode ser dividido em quatro tipos: metais, cerâmicas, polímeros e compósitos, estando todos disponíveis para uso biomédico, combinados ou não com células e/ou moléculas bioativas, como por exemplo fatores antibacterianos (GASIK, 2017).

Os metais são estruturas cristalinas com excelente força de tensão, ductilidade, dureza, rigidez e fadiga, não são transparentes à luz visível, possuem uma grande quantidade de elétrons livres, sendo por isso extremamente bons condutores de eletricidade e calor. Além disso, os metais são mecanicamente resistentes, mas ainda assim são deformáveis (característica esta que amplia seu uso em diversas aplicações), possuindo também grande resistência à corrosão quando implantados (CHEN; THOUAS, 2015).

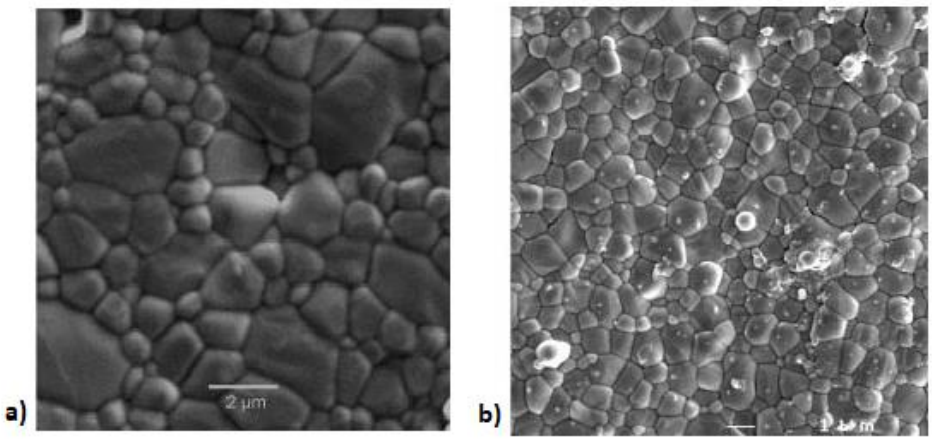
Os metais têm sido amplamente utilizados nas áreas odontológica e ortopédica, dentre os quais se destacam: os aços inoxidáveis, ligas de titânio, metais nobres (resistente à corrosão e oxidação) e cobalto-cromo. Dentre esses, o titânio apresenta grande destaque, quando comparado a outros metais, por ser considerado um material muito similar ao cálcio em suas propriedades de biocompatibilidade, boa osseointegração (DANTAS et al., 2011), além de ser resistência à corrosão, possuir excelente resistência mecânica e boa resistência à fadiga, tornando-o capaz de ser utilizado em aplicações biomédicas (ZHAO et al., 2015).

Esse tipo de material, geralmente, possui uma superfície com diversas formas de tratamento e rugosidade que promovem a osseointegração e uma proximidade ideal entre o implante e os tecidos relacionados. Podem ainda ser associados a outros compostos (como a HA e vidros bioativos) que, combinados com fatores biomecânicos, melhoram o crescimento ósseo e a osseointegração do tecido (GASIK, 2017). São estudadas, por exemplo, ligas de titânio (como o composto de titânio e nióbio Ti-16Nb) quanto ao comportamento de sinterização, quanta à sua microestrutura e às suas propriedades mecânicas. Os resultados com Ti-16Nb demonstraram a sua alta resistência à tração e baixo módulo de Young (módulo de elasticidade, que é um parâmetro mecânico responsável por avaliar a rigidez de um material sólido) (ZHAO et al., 2015).

Ao passo que as cerâmicas podem ser cristalinas ou não cristalinas. Suas ligações interatômicas são principalmente do tipo iônica (totalmente ou parcialmente), covalente ou uma combinação de ambos (KINGERY, 1976). Esse tipo de material tem como principais características: sua fragilidade e propriedade quebradiça, por não absorverem grande quantidade de energia (como ocorre nos metais), possibilitando fácil quebra em sua estrutura; possui alta dureza; é um material térmico; possui isolamento elétrico e resistência à corrosão. Além disso, são pouco resistentes por apresentarem em toda sua estrutura falhas, que, ao receberem tensão tem um aumento no estresse, causando trincas e porterior quebra do material (HUANG, 2017).

Dentre as primeiras cerâmicas utilizadas encontram-se a alumina, a HA sintética e a zircônia (em suas diferentes formas de associação a outros materiais). Essa última foi uma das primeiras a serem utilizadas em fins biomédicos, especificamente em sensores de oxigênio e eletrólitos, por apresentar condutividade iônica a alta temperatura, boa estabilidade química e dimensional e boa tenacidade comparada a outras cerâmicas (PICONI; MACCAURO, 1997). A forma microestrutural mais comum da zircônia e HA estão representadas na figura 10, onde observa-se o contorno de grãos e poros, em tamanhos variados na HA e mais padronizados na zircônia (HUANG, 2017).

Fig.10: Comparativo entre a microestrutura das cerâmicas mais utilizadas a) HA e b) zircônia. Na HA há a presença de grãos e poros de vários tamanhos e na zircônia observa-se um maior padrão de tamanho dos grãos.

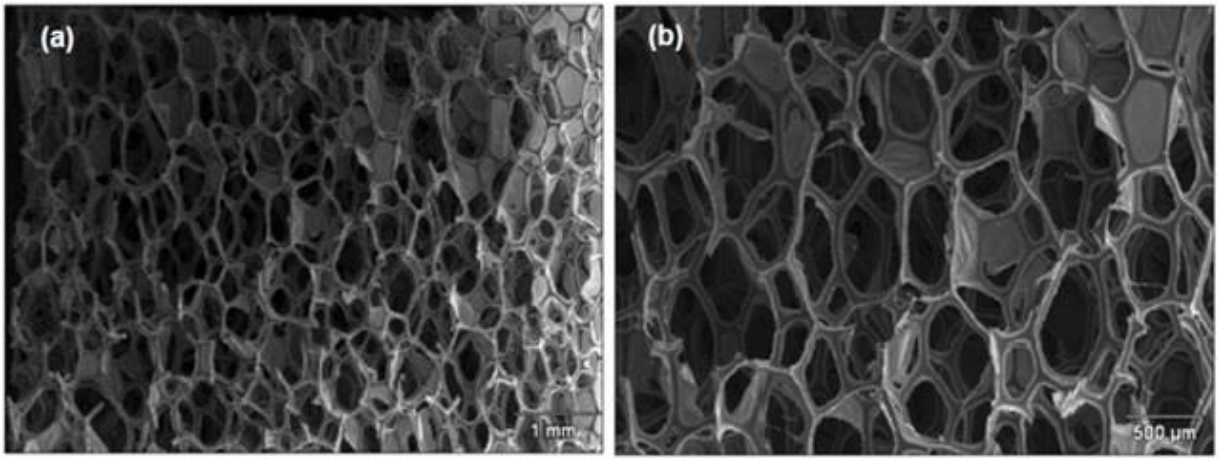


Fonte: Huang (2017).

Os polímeros, por sua vez, são grandes moléculas constituídas por monômeros (pequenas moléculas base dos polímeros) ligados covalentemente, podendo ser de origem sintética ou natural, sendo a principal característica desses últimos a sua biodegradabilidade (JAMMALAMADAKA; TAPPA, 2018). Esses materiais possuem uma grande capacidade elástica, o que permite que as cadeias poliméricas possam entre si dobrarem e entrelaçarem. Embora sejam biodegradáveis e biocompatíveis, eles não possuem, de forma geral, resistência mecânica suficiente para substituição óssea como no caso dos metais. Além disso, os polímeros sofrem redução de tamanho ao longo do tempo, muitos deles apresentam superfície hidrofóbica, e ainda podem gerar reação tóxica devido à liberação de produtos ácidos que resultam de sua degradação (WONG et al., 2010).

Os polímeros têm sido utilizados em diversas aplicações em diferentes tecidos e órgãos, incluindo fígado, rim e tecidos cardíacos, que são os órgãos mais transplantados (JAMMALAMADAKA; TAPPA, 2018). Esse tipo de material também tem aplicação em revestimentos de ligas metálicas (magnésio, por exemplo) de modo a reduzir a taxa de degradação do biomaterial que será implantado no organismo e evitar o desenvolvimento de inflamação, necrose ou acúmulo de gás hidrogênio (WONG et al., 2010). São utilizados também para produção de hidrogéis, que apresentam alta capacidade de retenção de água e, dessa forma, são capazes de mimetizar o meio dos tecidos nativos. O uso de polímeros inclui a produção de *scaffolds*, o encapsulamento de células e o desenvolvimento de sistemas na administração de medicamentos (SLAUGHTER et al., 2009). Alguns polímeros têm sido utilizados na confecção de *scaffolds* para suportar compósitos como a porosa HA-titânia (HA-TiO_2) (Figura 11) (GALDINO et al., 2014).

Fig. 11: Estrutura (*scaffold*) porosa de esponja em poliuretano (tipo de polímero), combinado com HA-titânia. (a) Apresentação de forma geral da esponja; (b) observação da estrutura em maior ampliação para visualização do detalhe da geometria dos poros do material.



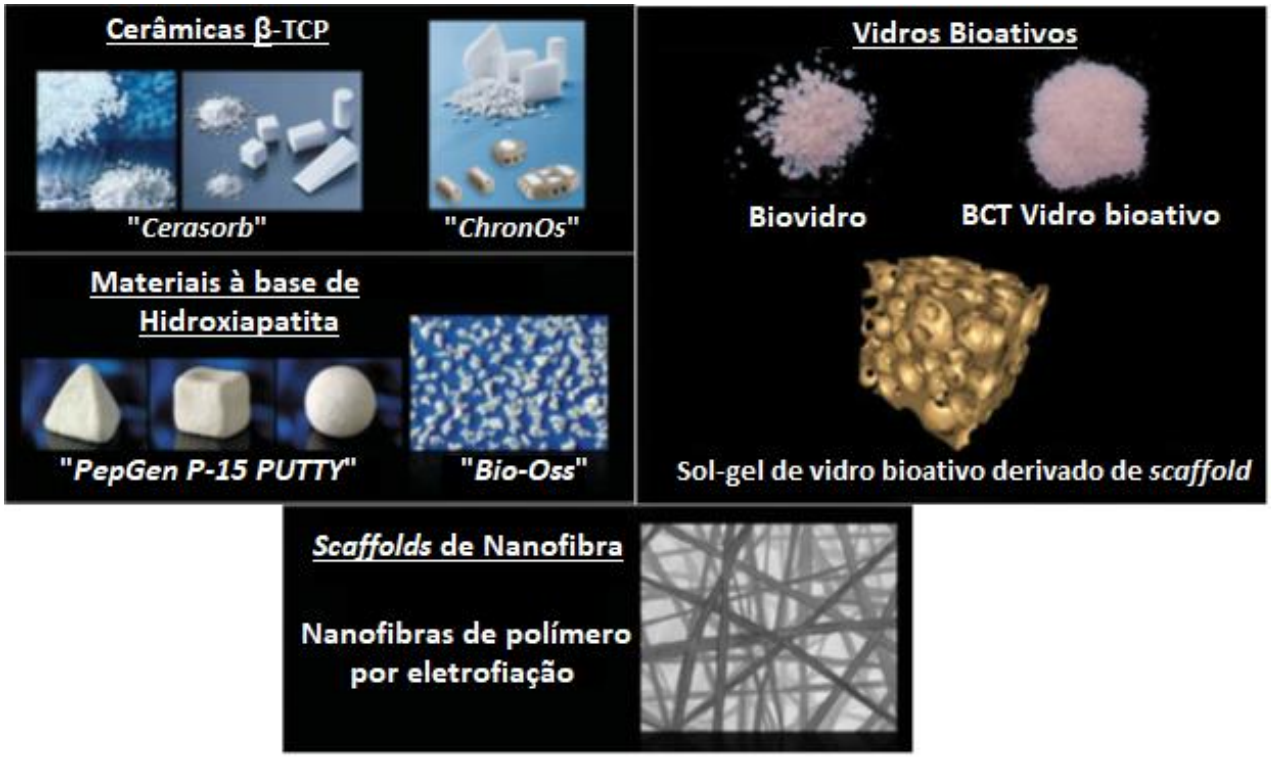
Fonte: Galdino et al. (2014).

Adicionalmente, os materiais podem ainda serem combinados entre si para que sejam produzidos os compósitos, que possuem basicamente uma matriz e uma fase dispersante. Eles têm sido a grande aposta de pesquisadores no desenvolvimento de biomateriais, por serem uma combinação multifásica, cujos constituintes são escolhidos com o objetivo de melhorar as desvantagens dos compostos utilizados, ressaltando as propriedades eficientes de cada um (FRATZL; BARTH, 2009). A variação de forma, posicionamento, tamanho e quantidade da fase dispersante alteram o material e suas características e, consequentemente, suas propriedades de forma geral (GASIK, 2017).

Materiais como polímeros naturais ou sintéticos, nanotubos de carbono, HA (OLIVEIRA; ROSSI; BAFFA, 2012) e silicatos (PATEL et al., 2005) têm sido explorados para o desenvolvimento de nanocompósitos voltados para aplicações biomédicas. Compósitos à base de isômero de ácido polilático (PLA, PLLA, PLDA) também são empregados no reparo de cartilagens devido às suas propriedades biodegradáveis (GASIK, 2017). Dentre os materiais mais utilizados em aplicações ósseas encontramos os de origem orgânica e inorgânica, tais como: polímeros (como o poli e-caprolactona, PCL), fosfato tricálcico (TCP), cerâmicas (como a HA), vidros bioativos, polimetacrilato de metila, HA-titânia, metais e

compósitos (GALDINO et al., 2014). Dentre esses, os compósitos à base de HA contendo materiais como zinco (NASCIMENTO et al., 2011), estrôncio (CARMO et al., 2018), carbono (RIBEIRO et al., 2016) e alginato de sódio (VALIENSE et al., 2015) têm demonstrado grande eficiência no reparo ósseo sem gerar citotoxicidade (Figura 12).

Fig. 12: Diferentes biomateriais que têm sido utilizados na regeneração óssea.



Fonte: Adaptado de Stevens (2008).

Pelo exposto, fica evidente que as aplicações dos biomateriais são bastante amplas. Na tabela 1, são apresentadas algumas outras dessas aplicações, além da: produção de implantes dentários, implantes para articulações (placas, joelho, etc), parafusos ortopédicos, lentes de contato, válvulas cardíacas, fios de sutura, preenchimentos utilizados em cirurgias plásticas, aparelhos intrauterinos (DANTAS et al., 2011), substitutos ósseos (WANG; YEUNG, 2017) e desenvolvimento de *scaffolds* para substituição de tecidos e órgãos danificados (ORCIANI et al., 2017).

Tabela 1: Materiais com suas aplicações e características.

Materiais	Vantagens	Desvantagens	Exemplos	Aplicações
Metais e Ligas	Alta resistência à tração, ao impacto, à fadiga e ao desgaste	Baixa biocompatibilidade, corrosão em meio fisiológico, alta densidade e diferença de propriedades mecânicas com relação a tecidos moles	Pt, Pt-Ir, Au, aços 316, 316L, ligas Co-Cr, Ti, e ligas Ti6A14V e Ti6A117Nb	Eletrodos, fios, placas, parafusos, cravos, grampos, pinos, próteses articulares e implantes dentários
Polímeros	Resistência, facilidade de fabricação, baixa densidade e boa biocompatibilidade	Baixa resistência mecânica e degradação dependente do tempo	Polietileno, poliuretano, polimetacrilato de metila, politetrafluoretileno, nylon, dracon, silicone e ácido polilático	Superfícies articulares, vasos, cartilagens, cimento ortopédico, sutura, subsituição de tecidos moles e placas de reparação óssea
Cerâmicas	Boa biocompatibilidade, resistência à corrosão, inércia química e alta resistência à compressão	Baixa resistência ao impacto, dificuldade de fabricação, baixa reprodutibilidade nas propriedades mecânicas e alta densidade	Alumina, zircônia, fosfato tricálcico, hidroxiapatita, biovidro, carbono (vítreo) e carbono pirolítico	Cabeças de fêmur, área odontológica, reconstrução óssea, ligamentos artificiais, revestimentos reabitáveis e hemocompatíveis
Compósitos	Boa biocompatibilidade, inércia química, resistência à corrosão e à tração	Dificuldade de fabricação	Teflon-carbono, carbono-carbono, nylon-poliuretano	Cartilagens, odontologia, ortopedia e substituições de tecidos moles

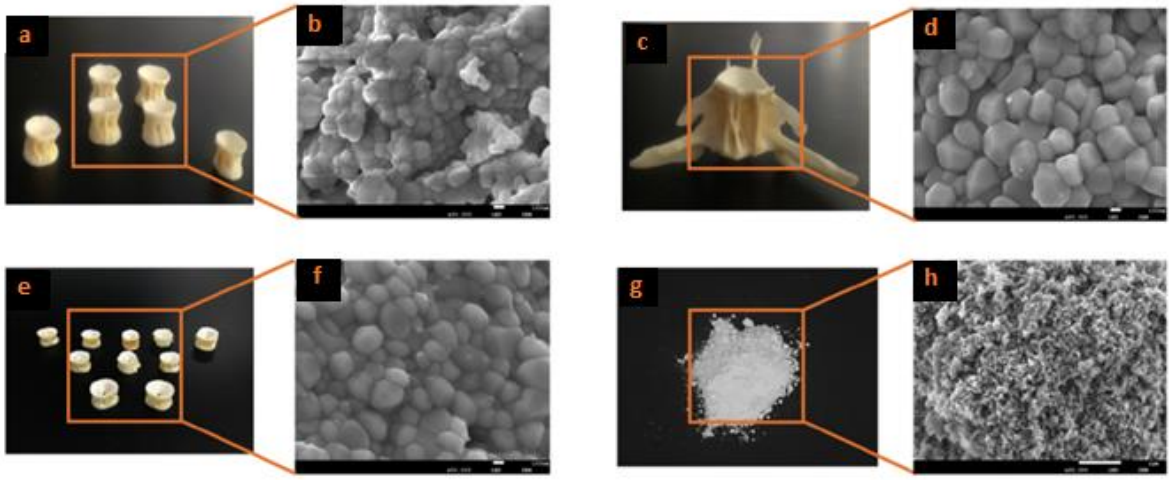
Fonte: Adaptado de Evans et al. (1999).

3.4 HIDROXIAPATITA

Há mais de seis décadas que os fosfatos de cálcio vêm sendo utilizados na regeneração de tecidos duros como o osso. Dentre esses fosfatos, encontra-se a HA, que foi um dos primeiros materiais a ser utilizado na reconstrução óssea em meados de 1950, por apresentar grande semelhança química com a parte mineral do osso (HABIBAH et al., 2018). Esse composto tem estrutura cristalina e é um constituinte mineral de fosfato de cálcio encontrado naturalmente na parte inorgânica do tecido ósseo, representando de 30 a 70% do osso e dos dentes. Tem se mostrado um biomaterial promissor e ideal na substituição óssea por ser facilmente sintetizado em laboratório (classificado como cerâmica) e por apresentar alguns dos pré-requisitos necessários para o reparo desse tecido, como a osteointegração, o fato de não apresentar alergenicidade e carcinogenicidade (COSTA et al., 2009). Adicionalmente, é um material biocompatível, bioativo (SHI et al., 2018), biodegradável, osteocondutivo e osteoindutivo (SUN et al., 2018).

A HA em sua forma pura (sem adição de outros materiais em sua composição) tem, então, sido estudada e os resultados comprovam a eficiência de suas propriedades na regeneração óssea. Foram avaliados os efeitos da HA no reparo ósseo em ratos, e, observou-se a formação de novo tecido ósseo na superfície do biomaterial, principalmente na área envolta da HA onde haviam sinais iniciais de osteogênese com formação de lamelas (organização das fibras colágenas do osso). Entretanto, também foram visualizadas áreas dispersas desse osso e partes de tecido conjuntivo fibroso (CALASANS-MAIA et al., 2008). Há também a obtenção da HA a partir de fontes naturais de osso do atum (BOUTINGUIZA et al., 2012), e de diferentes ossos de peixe (GOTO; SASAKI, 2014), que mostram resultados não citotóxicos, além de apresentarem boa atividade osteogênica, confirmando o excelente potencial para a substituição óssea no âmbito da MR e ET (Figura 13) (SHI et al., 2018).

Fig. 13: Imagens obtidas a partir da micrografia eletrônica de varredura das fontes obtenção e formas naturais da HA. a) Osso do peixe "truta arco-íris" e b) HA natural (nHAP); c) osso do peixe bacalhau e d) o extraído da nHAP; e) osso do peixe salmão e f) o extraído de nHAP; g) e h) a HA de forma sintética química.



Fonte: Shi et al., 2018.

Além das propriedades já citadas, a HA também possui grande flexibilidade (SUN et al., 2018) e uma alta capacidade em adsorver ou absorver moléculas (COSTA et al., 2009). Entretanto, apresenta algumas desvantagens, entre as quais: baixa reabsorção, que faz com que o material permaneça no organismo por muito tempo (VAMZE; PILMANE; SKAGERS, 2015) e fragilidade, não sendo tão adequada, por si só, a suportar grandes cargas. Sendo assim, é necessária a associação da HA com outros materiais para ultrapassar essas limitações, como ocorre, por exemplo, na aplicação em revestimento de materiais, principalmente os metálicos, que apresentam boa resistência mecânica e resistência à corrosão (ZHAO et al., 2015). Para isso, são estabelecidos alguns pré-requisitos pela *Food and Drug Administration* (FDA) e padrões pela *International Organization for Standardization* (ISO) (Tabela 2).

Tabela 2: Requisitos e propriedades necessários ao uso da HA.

Propriedade essencial	Requisito padronizado
Espessura	Não específico
Relação Ca/P	1.67 – 1.76
Pureza de fase	Mínimo de 95%
Cristalinidade	Mínimo de 62%
Resistência à tração	> 50.8 MPa
Força de cisalhamento	> 22 MPa
Densidade	2.98 g/cm^3
Metais pesados	< 50 ppm
Abrasão	Não específico

Fonte: Adaptado de Harun et al. (2018).

Pesquisas têm então sido realizadas com a HA combinada a outros materiais (como metais e carbono) com o intuito de vencer as desvantagens apresentadas por essa cerâmica (OLIVEIRA; ROSSI; BAFFA, 2012; NASCIMENTO et al., 2011; MACHADO et al., 2016; RIBEIRO et al., 2016). Nesse contexto, a combinação de HA e metais tem sido amplamente utilizada na ortopedia e odontologia em diversos procedimentos, apresentando-se sob diferentes formas para se adequar a cada tipo de aplicação (Tabela 3). Alguns dos exemplos de aplicação são tratamentos de tumores, traumatologia, (E'GUES et al., 2005), aumento de rebordo alveolar, reparação guiada do osso, procedimento cirúrgico de troca do globo ocular, reconstrução da região bucomaxilofacial, bem como a substituição e restauração das paredes orbitais (DANTAS et al., 2011).

Tabela 3: Diferentes formas da HA e suas aplicações na medicina e odontologia.

Aplicações	Formas
Matriz/suporte para crescimento ósseo	Grãos, porosa
Osso Artificial	Grãos, densa, porosa
Cimento ósseo	Pó com PMMA
Articulações artificiais	Metal revestido com HA
Próteses vasculares	Densa
Próteses traqueais	Porosa ou densa
Terminais pericutâneos	Densa
Sistema de liberação densa	Densa ou pó

Fonte: Adaptado de E´gues (2005).

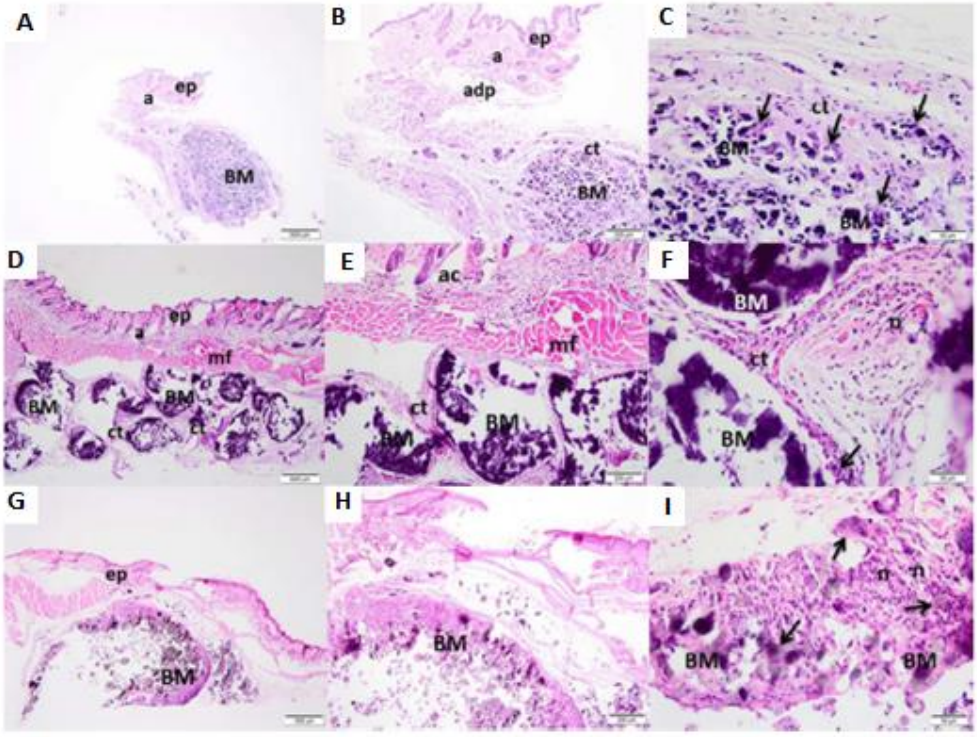
Adicionalmente, visando aplicações clínicas na regeneração óssea, um estudo realizado em 2014 mostrou resultados satisfatórios obtidos por meio de ensaios *in vitro*, onde foi avaliada a adesão, crescimento celular e a citotoxicidade do material, utilizando o compósito poroso de HA com titânio (HA-TiO_2). Foi demonstrado nesse estudo uma alta biocompatibilidade e não toxicidade do compósito, uma vez que o mesmo não foi nocivo para as células, sendo considerado, então, um biomaterial apto a receber análises *in vivo* para posterior aplicação clínica (GALDINO et al., 2014).

Também têm sido avaliados compostos de HA contendo zinco, estrôncio e carbono, com o intuito futuro da regeneração óssea. A adição desses íons traz grandes benefícios à HA (SUNIL; JAGANNATHAM, 2016), como uma bioreabsorção significativamente maior, apresentando assim menor possibilidade em causar reações a longo prazo (KAMMER et al., 2016), adsorção melhorada (DANTAS et al., 2011; MAVROPOULOS et al., 2013). Bem como a presença do carbono, que na própria apatita do corpo humano tem capacidade de promover atividades biológicas dos osteoblastos (ASTALA; STOTT, 2005).

Outro compósito que tem apresentado resultados positivos é a HA reforçada com nanotubos de carbono (HA/NTC). O carbono (C) nanoestruturado apresenta propriedades de destaque na aplicação clínica, como condutividade elétrica, alta estabilidade química e resistência mecânica, bem como facilidade em incorporar grupos funcionais para a produção de arcabouços para a sustentação celular. Analisando a biocompatibilidade, *in vitro*, desse composto HA/NTC, foram realizados testes com osteoblastos humanos, e resultados mostraram boa adesão celular e alta proliferação das células sem nenhum efeito citotóxico. Também foi avaliada a questão da atividade osteogênica do biomaterial, sendo observado um aumento da expressão relacionada à maturação e mineralização óssea (SATO, 2004). Sendo assim, tem-se a comprovação do potencial promissor da utilização desses materiais na regeneração óssea e ainda a importância da nanoestrutura nesse meio.

Nessa mesma linha de estudo, foi comparada a biocompatibilidade entre a HA nanoestruturada carbonatada contendo zinco a 3% (ZnCHA) e a HA carbonatada (cHA) em forma de esferas. Os testes realizados *in vivo* mostraram que os materiais se comportaram de forma biocompatível e que a HA carbonatada teve um biorreabsorção significativamente maior (total absorção em aproximadamente 9 semanas) quando comparada aos outros compostos baseados em HA (HA e ZncHA) (Figura 14) (RIBEIRO et al., 2016).

Fig. 14: Resultados histológicos obtidos ao final de 9 semanas. cHA (A, B, C); ZnCHA (D, E, F) e cHA (G, H, I). Anexos cutâneos (a), epitélio de revestimento (ep), biomaterial (BM), adipócitos (adp), tecido conjuntivo (ct), células gigantes (setas) e fibras musculares (mf).



Fonte: Kammer et al. (2016).

A HA também tem sido comparada a compósitos contendo fosfato α-tricálcico (HA/α-TCP) por meio de testes *in vivo*, onde os materiais foram implantados em osso de coelho. Os resultados obtidos mostraram que ambos os compostos não afetaram a produção de citocinas e proteínas do osso e nenhuma forma de inflamação foi observada em nenhum dos compostos quando analisados macroscopicamente (VAMZE; PILMANE; SKAGERS, 2015).

Outros estudos *in vitro* e *in vivo* também têm sido realizados testando biomateriais do tipo cerâmica à base de HA contendo alguns outros compostos (zinco, estrôncio, carbono e alginato de sódio). Dentre eles, encontram-se: 1) testes com zinco associado a fosfato tricálcico (ZnTCP) e HA (ZnTCP/HA) (ITO et al., 2002; COSTA et al., 2004); 2) avaliação do zinco com fosfato α-tricálcico (α-ZnTCP) (KAWAMURA et al., 2003); e 3) avaliação da HA com zinco (ZnHA) e lisina (STORRIE; STUPP, 2005); 4) e um tipo de cimento de HA contendo estrôncio mostrou ser um compósito mais eficiente do que a HA pura no que diz

respeito à biocompatibilidade, osteocondutividade e biodegradabilidade (DAGAND; KEWEI; YONG, 2008), o que pode ser vantajoso para a aplicação pretendida.

Embora muitos grupos a nível mundial pesquisem materiais à base de HA, no Brasil também têm sido realizados estudos com esses materiais (NASCIMENTO et al., 2011; RESENDE et al., 2013; DA SILVA SURUAGY et al., 2016). Em particular, o grupo REGENERA tem desenvolvido materiais à base de HA carbonatada, ou contendo metais como zinco e estrôncio. Em um desses trabalhos, realizado por esse grupo brasileiro, a biocompatibilidade e osteocondutividade de microesferas de HA nanoestruturada, contendo ou não estrôncio (SrHA) foi analisada em ovelhas e os resultados mostraram que todos os materiais induziram a formação de novo tecido ósseo nos locais defeituosos, não havendo uma significativa diferença no nível de formação do osso comparando os compostos em questão. Assim, foram demonstradas as propriedades osteocondutoras e a biocompatibilidade dos materiais, sugerindo as suas possíveis aplicações clínicas no reparo ósseo (MACHADO et al., 2016). Outros resultados obtidos, também mostram a biocompatibilidade desses biomateriais e diferenças significativas nos comparativos dos compostos (Tabela 4).

Tabela 4: Estudos realizados para avaliação de citotoxicidade e potencial osteogênico de materiais à base de HA desenvolvidos por brasileiros que integram o grupo REGENERA.

Materiais avaliados	Ensaios realizados	Resultados	Realizado por
Efeito do RGD na adesão e estimulação de osteoblastos em superfície de HA com Zinco (ZnHA)	Ensaios multiparamétricos de viabilidade celular (XTT, integridade da membrana e densidade relativa de células aderentes)	Os compostos contendo Zn apresentaram melhoria de adsorção do peptídeo RGD	MAVROPOULOS et al., 2013
HA carbonatada nanoestruturada contendo zinco a 3% (ZncHA) e a HA carbonatada (cHA)	Avaliação *in vivo* em ratos adultos	Compostos biocompatíveis e o grupo cHA mostrou bioreabsorção significativa	RIBEIRO et al., 2016

Continuação Tabela 4

HA/alginato de sódio nanoestruturada carbonatada contendo estrôncio (SrCHA) e não contendo estrôncio (CHA)	Avaliação *in vitro* (testes multiparamétricos como o XTT) e *in vivo* em coelhos	Formação óssea em ambos os grupos com biocompatibilidade, osteocondutividade e bioreabsorção significativa do SrCHA comparada ao composto CHA	VALIENSE et al., 2015
HA pura e HA contendo Zinco (ZnHA)	Avaliação da osteoindução com ensaios multiparamétricos de viabilidade celular	Ambos mostraram ser biocompatíveis e citocompatíveis, mas não apresentaram osseoindução	NASCIMENTO et al., 2011
Estrôncio contendo HA carbonatada nanoestruturada (SrcHA)	Avaliações *in vivo* em ratos	Compostos biocompatíveis, osteocondutivos e bioreabsorvíveis com formação de novo osso	CARMO et al., 2018
HA nanoestruturada e HA nanoestruturada contendo Zinco (nZnHA)	Análise histomorfométrica com testes *in vivo* em coelhos)	Ambos foram biocompatíveis e osteocondutivos, com reparo ósseo, mas sem diferenças significativas	DA SILVA SURUAGY et al., 2016
HA pura e HA contendo Zinco (ZnHA)	Testes *in vivo* com coelhos para avaliar a biocompatibilidade a longo prazo	Ambos materiais foram biocompatíveis, promoveram a osteogênese e o composto ZnHA apresentou absorção mais rápida	RESENDE et al., 2013

Fonte: Autoria própria.

Esses são alguns dos diversos estudos que mostram quão promissores são os compostos à base de HA contendo zinco, estrôncio e carbono. No entanto, embora existam muitos trabalhos que exploram as atividades osteogênicas e a citotoxicidade desses materiais à base de HA, poucos são os estudos que exploram os possíveis efeitos genótoxicos dos mesmos. Uma vez que estes materiais têm como objetivo final uma aplicação clínica, a avaliação desse último parâmetro é também fundamental e precisa ser mais avaliada.

3.5. TESTES DE CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE

Para que um biomaterial seja aprovado objetivando aplicações clínicas, deve respeitar uma série de requisitos, incluindo a avaliação de biocompatibilidade do material através de metodologias que permitem analisar os efeitos causados por determinado composto (GASIK, 2017). A avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade *in vitro* de um material é de grande importância, pois prever o comportamento biológico do composto, minimizando a quantidade de testes *in vivo* que precisarão ser realizados (OLIVEIRA, 2009). Nesse contexto, existem normas que regem os princípios fundamentais que devem ser utilizados nessas avaliações biológicas de biomateriais e dispositivos biomédicos, havendo como principal a norma da "ISO 10993-1: General Principles" (ISO 10993-1, 2009).

Segundo essa ISO, os testes de citotoxicidade devem ser os primeiros a serem realizados quando é necessário avaliar a biocompatibilidade de materiais destinado a aplicações biomédicas. Citotoxicidade é a capacidade que uma substância ou material tem de gerar efeitos tóxicos nas células, como mudanças na permeabilidade da membrana da célula, morte celular ou inibição enzimática (MÜLLER, 2008).

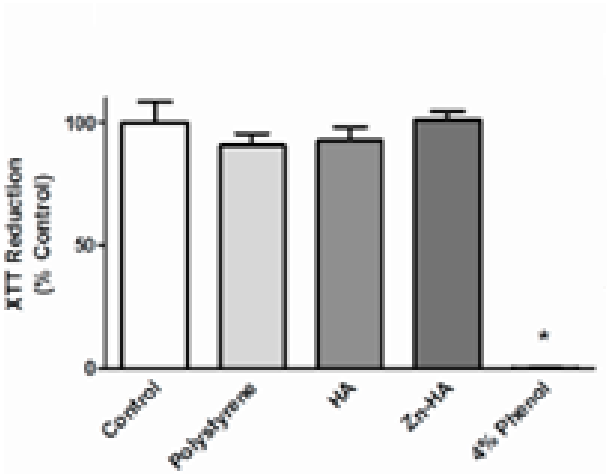
Existem diferentes métodos para analisar a citotoxicidade de materiais, dentre os quais encontra-se o de coloração com Trypan blue (Azul de Tripan) (STROBER, 1997), que é um dos testes mais simples, e utiliza um método de exclusão através da coloração com o azul de tripano para verificar a quantidade de células viáveis (RIBEIRO et al., 2005). O princípio desse teste é que células vivas possuam suas membranas íntegras, excluindo assim corantes como o azul de tripano, eosina ou iodeto de propídio. Sendo assim, por avaliação visual, as células viáveis serão aquelas que, após terem sido coradas, apresentarão seus citoplasmas sem

corante (excluiram o corante), ao passo que, as não viáveis (com membrana rompida) estarão com cor azul (LIU et al., 2016). Entretanto, esse teste pode avaliar incorretamente a viabilidade celular, caso, por exemplo, a célula esteja comprometida, mas, a sua membrana ainda está íntegra (AVELAR-FREITAS et al., 2014).

Outro teste muito utilizado para avaliar a citotoxicidade é o MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina), um ensaio colorimétrico que verifica a viabilidade celular através da atividade da enzima mitocondrial succinato desidrogenase (MOSMANN, 1983). Nesse teste, o MTT, que é um sal de tetrazólio solúvel com cor amarela, é reduzido nas células vivas a cristais de formazana, que tem uma coloração roxa (TANG et al., 2007). Assim, pode-se correlacionar a viabilidade celular com a quantidade de cristais formados, que depois de solubilizados, usando um solvente orgânico, podem ser analisados por densidade óptica em um espectrofotômetro (BHATIA; YETTER, 2008).

Seguindo esse mesmo princípio, o ensaio de XTT (2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida), também indica a viabilidade celular pelo metabolismo mitocondrial (ALTMAN, 1976; SCUDIERO, 1988). Esse teste *in vitro* foi utilizado para avaliação da atividade mitocondrial de células em contato com biomateriais como a HA nanoestruturada carbonatada contendo estrôncio (Figura 15) (VALIENSE et al., 2015). Uma das vantagens da utilização do XTT, é o fato do produto resultante da redução ser solúvel (NASCIMENTO et al., 2011), o que para algumas aplicações é fundamental.

Fig. 15: Resultados de ensaios de citocompatibilidade multiparamétricos de HA e Zn-HA em células MC3T3-E1. Atividade mitocondrial (redução XTT). Controle: células crescidas em meio de cultura; poliuretano: controle negativo; fenol: controle positivo.



Fonte: Nascimento et al. (2011).

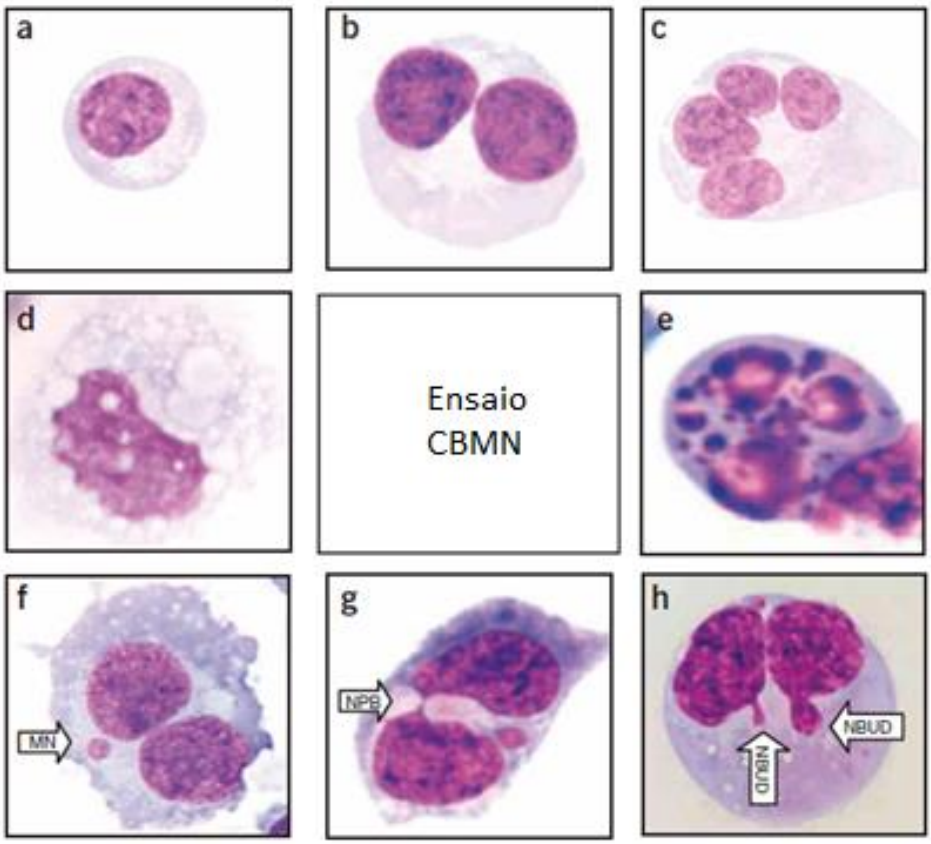
Assim como a citotoxicidade, a genotoxicidade de biomateriais também deve ser estudada quando se trata de riscos à saúde, avaliando-se o potencial genotóxico das substâncias que compõem o biomaterial. Isso é verificado através da análise de possíveis mudanças no DNA das células, que podem gerar falhas genéticas e problemas carcinogênicos quando as células são colocadas em contato com o biomaterial em estudo (SINGH et al., 2009). Essas alterações podem envolver grandes danos nos cromossomos, mutações genéticas, aneuploidia (alteração no material genético da célula com divergência de número cromossômico) e recombinação (FRÖTSCHL, 2015). Para padronizar esses testes, garantindo assim a segurança de uso dos biomateriais, a Organização de Cooperação e de Desenvolvimento Econômico (OECD) define algumas diretrizes. Dentre elas, encontra-se a necessidade da realização de pelo menos três diferentes testes para averiguar os riscos genotóxicos (FRÖTSCHL, 2015).

Nesse contexto, o primeiro teste recomendado a ser realizado é o da mutação reversa bacteriana, AMES (avaliação de mutações genéticas em bactérias) (AMES; JOYCE; YAMASAKI, 1975), que avalia a mutagenicidade de substâncias ou produtos e os riscos associados aos biomateriais, quanto à sua reatividade ou não com o DNA (ácido

desoxirribonucléico) (WAHAB et al., 2018). O ensaio de mutação reversa AMES avalia o potencial mutagênico do biomaterial, detectando danos ao material genético que levam a mutações nos genes, causando, por exemplo, o desenvolvimento de carcinomas (FRÖTSCHL, 2015), danificando potencialmente a linhagem germinativa, levando a problemas de fertilidade e à mutações em gerações futuras. Nesse teste, podem ser detectadas mutações pontuais que ocorrem na sequência de um gene importante para a produção do aminoácido histidina, mutações essas que podem ser substituições, adições ou deleções de um ou alguns nucleotídeos, o que faz com que o quadro de leitura seja alterado (OECD, 1997). Nesse ensaio, o material é colocado em contato direto com cepas de *Salmonella typhimurium*, geneticamente modificadas de forma a possuírem deficiência na produção de histidina (aminoácido importante para a viabilidade das bactérias). São utilizados, geralmente, extratos contendo enzimas de fígado de ratos que atuam de forma semelhante às do homem, fazendo assim com que seja avaliada a possível toxicidade das substâncias e compostos após sua metabolização (HAKURA et al., 2003). Ao final do ensaio o biomaterial em estudo será considerado mutagênico se alterar o DNA das bactérias, revertendo então o seu fenótipo, tornando-as novamente capazes de produzirem esse aminoácido e crescerem em meio sem histidina (MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

Entretanto esse teste (AMES) não é suficiente para a avaliação de todos os tipos de danos causados ao DNA. Sendo assim, para completar esse tipo de avaliação, existem outros ensaios como o ensaio de micronúcleo com bloqueio da citocinese, como o CBMN (*Cytokinesis-Block MicroNucleus*), que permite a avaliação de diferentes tipos de aberrações cromossômicas, como a geração de micronúcleos, pontes ou brotos. Esse ensaio de micronúcleos (formados durante a divisão celular) é utilizado com o intuito de detecção de mutações nos cromossomos, representando assim a perda de cromatina e identificando alterações no DNA (Figura 16) (MARIA; CHEQUER, 2008). O teste CBMN possui uma alta confiabilidade e boa reprodutibilidade, tornando-se assim um dos testes citogenéticos padrão na avaliação da toxicologia genética em células humanas e de mamíferos em geral (FENECH, 2011).

Fig. 16: Fotomicrografias de células coradas com Giemsa (corante azul de metileno - eosina) analisadas no ensaio CBMN. a) Célula mononucleada; b) célula binucleada (BN); c) célula multinucleada; d) célula necrótica inicial; (e) célula apoptótica tardia; (f) célula BN contendo um ou mais micronúcleos (MN); g) célula BN contendo uma ponte nucleoplasmática (NPB) (e um MN); h) célula BN contendo botões nucleares (NBUD). A frequência de células BN com micronúcleos, pontes nucleoplasmáticas ou botões nucleares fornece uma valor que mede os danos no genoma e/ou a instabilidade cromossômica.

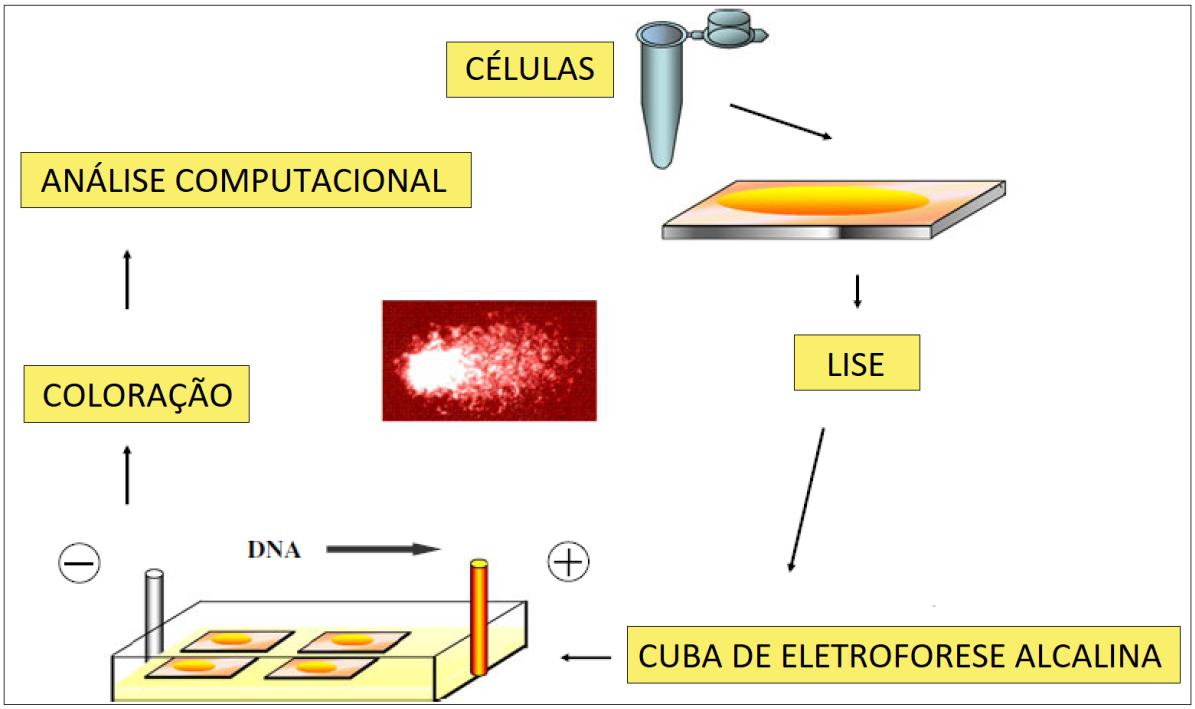


Fonte: Adaptado de Fenech (2011).

Além desses, o ensaio Cometa, também chamado de eletroforese de célula única, permite avaliar diferentes danos no DNA. Quando um agente causa quebras nas fitas do DNA, são gerados fragmentos que irão apresentar mobilidade diferente na eletroforese. O DNA é carregado negativamente e, quando recebe uma dada corrente elétrica, migra em direção ao ânodo e, caso o DNA esteja danificado, gera uma imagem semelhante a um cometa (com cauda contendo os framentos menores e cabeça o DNA com maior integridade) (AZQUETA et al., 2014). A realização desse ensaio ocorre da seguinte maneira: 1) a aplicação

de células em um gel de agarose em lâmina de microscópio; 2) as células são então tratadas com um tampão de modo a serem lisadas e os núcleos permanerecem intactos; 3) o DNA se desnatura sob condições alcalinas; 4) o DNA passa por eletroforese, possibilitando assim que fragmentos de DNA danificado migrem mais rapidamente no gel; 5) e por fim a coloração específica, que permite a análise e quantificação do DNA contido na cauda e, na cabeça do cometa, como também permite avaliar o comprimento da cauda do cometa; sendo estes os parâmetros utilizados para determinar o grau de dano causado ao DNA (Figura 17) (KARLSSON, 2010; WAHAB et al., 2018).

Fig.17: Etapas da realização do ensaio cometa.



Fonte: Adaptado de Karlsson (2010).

Seguindo as normas que definem e padronizam as avaliações de produtos e biomateriais, a ISO e a OECD, os ensaios descritos acima, quando associados, constituem testes considerados padrões na avaliação de genotoxicidade de produtos.

Além dos riscos comentados anteriormente, a genotoxicidade também é importante por ter relação com problemas como inflamação, falhas de sinalização celular e estresse oxidativo

(FRANCHI; TAKAHASHI, 2012). Mesmo assim, diante da relevância dos testes genotóxicos, para analisar danos no material genético, grande parte da atenção das avaliações realizadas com biomateriais baseados em HA tem sido voltada apenas para a toxicidade, deixando de lado o potencial genotóxico. Isso mostra a necessidade de aprofundamento e maior quantidade de estudos desses materiais para compreensão e ensaios clínicos com resultados sobre o potencial genotóxico (SINGH et al., 2009).

Ainda nesse contexto, análises quantitativas de estudos e ensaios sobre a toxicidade e genotoxicidade de materiais baseados em HA foram realizadas. Para isso foram feitas buscas na Biblioteca Nacional de Medicina dos Estados Unidos através do PubMed, que é um sistema de busca com livre acesso à base de dados MEDLINE, o qual oferece resumos de artigos e citações na área biomédica. Nessas buscas o período do levantamento desses estudos não foi limitado e foram utilizadas palavras chave, como: “hydroxyapatite”, “hydroxyapatite bone regeneration, “hydroxyapatite cytotoxicity” e “hydroxyapatite genotoxicity”. Sendo mostrado abaixo na tabela 5 esse quantitativo de pesquisas abordadas nessas áreas:

Tabela 5: Levantamento quantitativo do PubMed em 25 de Novembro de 2018.

Termos	Tipo de artigo	Quantidade
Hydroxyapatite	Ensaio clínico	642
Hydroxyapatite bone regeneration	Ensaio clínico	169
Hydroxyapatite Cytotoxicity	Todos	578
Hydroxyapatite Genotoxicity	Todos	26

Fonte: Dados retirados do sistema de busca aberto PubMed. Autoria própria.

Assim, percebe-se que existem diversos estudos voltados para a pesquisa de forma geral usando HA, entretanto, quando se trata de aplicações biomédicas, deve haver uma preocupação na realização de testes práticos que avaliem e comprovem a segurança do uso

desses biomateriais para que possam ser utilizados em fins clínicos. E, nesse contexto, existe uma discrepância entre a quantidade de pesquisas envolvendo biomateriais de HA para uso na regeneração óssea e a quantidade de pesquisas sobre a genotoxicidade dos mesmos. Não podemos esquecer que, para que sejam certificadas as propriedades desses biomateriais à base de HA, a avaliação da sua genotoxicidade é fundamental e o que se percebe é que o número de ensaios pré-clínicos é maior do que o número de ensaios genótoxicos.

4. CONCLUSÃO

Sabendo da complexidade oferecida pelo tecido ósseo e consequentes dificuldades enfrentadas em sua regeneração, diversos biomateriais são constantemente estudados para substituir e reparar o osso. Nesse contexto, destaca-se a HA, por apresentar grande similaridade com a parte mineral do osso, sendo uma cerâmica sintetizada facilmente em laboratório. Estudos com esse biomaterial associado a outros materiais como zinco, estrôncio e carbono têm sido realizados em diversos países, inclusive no Brasil, pelo grupo REGENERA.

Como discutido, são diversas as pequisas envolvendo esses materiais e as suas propriedades osteoindutivas e osteocondutoras. Contudo, para avaliar esses biomateriais visando uma aplicação na regeneração óssea, é essencial a realização de testes citotóxicos e genotóxicos seguindo as padronizações e regras estabelecidas por diversos órgãos (OECD, ISO, FDA), mas como foi discutido, a avaliação de genotoxicidade tem sido negligenciada, sendo necessários estudos que foquem nesse objetivo. As pesquisas devem considerar todos os aspectos da biocompatibilidade dos materiais quando se busca pela translação dos resultados da pesquisa para a aplicação clínica.

5. REFERÊNCIAS

ALTMAN, F. P. Tetrazolium salts and formazans. **Progress Histochemistry Cytochemistry.** v. 9, n. 3, p. 3-5, 1976.

AMADEI, S. U. et al. A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, n. 1, p. 5–12, 2006.

AMES, B. N.; JOYCE, M.; YAMASAKI, E. Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens With the Salmonella/Mammalian-microsome mutagenicity test. **Mutation Research**, v. 31, p. 347–363, 1975.

AMINI, A. R.; LAURENCIN, C. T.; NUKAVARAPU, S. P. Bone tissue engineering: recent advances and challenges. **Crit Rev Biomed Eng.**, v. 40, n. 5, p. 363–408, 2013.

ANDORKO, J. I.; JEWELL, C. M. Designing biomaterials with immunomodulatory properties for tissue engineering and regenerative medicine. **Bioengineering & Translational Medicine**, v. 2, n. 2, p. 139–155, 2017.

ASTALA R., STOTT M. J., First principles investigation of mineral component of bone: CO3 substitutions in hydroxyapatite, Chem. **Mater**. V. 17, n.16, p. 4125–4133, 2005.

AVELAR-FREITAS, B. A. et al. Trypan blue exclusion assay by flow cytometry. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 47, n. 4, p. 307–315, 2014.

AZQUETA, A. et al. Comet assay to measure DNA repair: Approach and applications. **Frontiers in Genetics**, v. 5, n. AUG, p. 1–8, 2014.

BAILEY, A. M.; MENDICINO, M.; AU, P. "An FDA perspective on preclinical development of cell-based regenerative medicine products". **Nature Biotechnology.** v. 32, n. 8, p. 721–723, 2014.

BHATIA S. K., YETTER A. B. Correlation of visual cytotoxicity ratings of biomaterials with quantitative in vitro cell viability measurements. **Cell Biol Toxicol**. 2008; 24:315-319.

BOHNER, M. Resorbable biomaterials as bone graft substitutes An ageing population and the democratization of high-risk sports have. **Materials Today**, v. 13, n. 1, p. 24–30, 2010.

BOUTINGUIZA M., POU J., COMESAÑA R., et al., Biological hydroxyapatite obtained from fish bones, Mater. **Sci. Eng**. C v. 32, n. 3, p. 478–486, 2012.

BROZEK, R.; KURPISZ, M.; KOCZOROWSKI, R. Application of stem cells in dentistry for bone regeneration. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 69, n. 1, p. 22–33, 2018.

BURDICK, J. A. et al. Acellular biomaterials: An evolving alternative to cell-based therapies. **Science Translational Medicine**, v. 5, n. 176, 2013.

CALASANS-MAIA M. D., ROSSI A. M., DIAS E. P., SANTOS S. R. A., ASCOLI F. O., GRANJEIRO J.M. Stimulatory effect on osseous repair of zincsubstituted hydroxyapatite: Histological study in rabbit's tibia. **Key Eng Mater**.; v. 1269, n. 72, p. 361–363, 2008.

CARMO, A. B. X. DO et al. Alveolar bone repair with strontium- containing nanostructured carbonated hydroxyapatite. **Journal of Applied Oral Science**, v. 26, n. 0, p. 1–9, 2018.

CHEN, Q.; THOUAS, G. A. Metallic implant biomaterials. **Materials Science and Engineering R: Reports**, v. 87, p. 1–57, 2015.

COLOMBO, F. et al. Regenerative medicine: Clinical applications and future perspectives. **Journal of Microscopy and Ultrastructure**, v. 5, n. 1, p. 1–8, 2017.

CORKUM, K. S.; LARONDA, M. M.; ROWELL, E. E. A review of reported surgical techniques in fertility preservation for prepubertal and adolescent females facing a fertility threatening diagnosis or treatment. **American Journal of Surgery**, v. 214, n. 4, p. 695–700, 2017.

COSTA A. M., SOARES G. A., CALIXTO R., ROSSI A.M. Preparation and properties of zinc containing biphasic calcium phosphate bioceramics. **Key Eng Mater**.; v. 119, n. 22p. 254–256, 2004.

COSTA, A. C. F. M. et al. Hidroxiapatita: Obtenção, caracterização e aplicações. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 3, n. 4, p. 29–38, 2009.

CUI, H. et al. Hierarchical Fabrication of Engineered Vascularized Bone Biphasic Constructs via Dual 3D Bioprinting: Integrating Regional Bioactive Factors into Architectural Design. **Adv. Healthc. Mater**. V. 5, p. 2174–2181, 2016.

DA SILVA SURUAGY, A. A. P. et al. Physico-chemical and histomorphometric evaluation of zinc-containing hydroxyapatite in rabbits calvaria. **Brazilian Dental Journal**, v. 27, n. 6, p. 717–726, 2016.

DAGAND G., KEWEI X., YONG H. The influence of Sr doses on the in vitro biocompatibility and in vivo degradability of single-phase Sr-incorporated HAP cement. J **Biomed Mater Res A**. v. 86, n. 4, p. 947-58, 2008.

DAI, R. et al. Adipose-Derived Stem Cells for Tissue Engineering and Regenerative Medicine Applications. **Stem Cells International**, v. 2016, 2016.

DALLAS, S. L.; BONEWALD, L. F. Dynamics of the transition from osteoblast to osteocyte. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1192, p. 437–443, 2010.

DANTAS, T. S. et al. Materiais de Enxerto Ósseo e suas Aplicações na Odontologia. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 13, n. 2, p. 131–136, 2011.

DEMENTO S.L., EISENBARTH S.C., FOELLMER H.G., et al. Inflammasomeactivating nanoparticles as modular systems for optimizing vaccine efficacy. **Vaccine**. v. 27, n. 23, p. 3013–3021, 2009.

DENIZ, F. Adsorption properties of low-cost biomaterial derived from Prunus amygdalus L. for dye removal from water. **The Scientific World Journal**, v. 2013, n. July 2013, 2013.

DUAN, B.; HOCKADAY, L.A.; KANG, K.H.; BUTCHER, J.T. 3D bioprinting of heterogeneous aortic valve conduits with alginate/gelatin hydrogels. **J. Biomed. Mater**. Res. A, 101, p. 1255–1264, 2013.

DZOBO, K. et al. Advances in Regenerative Medicine and Tissue Engineering: Innovation and Transformation of Medicine. **Stem Cells International**, v. 2018, p. 1–24, 2018.

E´GUES, M. A. M. Compósito de colágeno com silicato e hidroxiapatita como material para endodontia. **Dissertação (Mestrado)**. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia; Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Química de São Carlos, USP. São Carlos, 2005.

ELGALI, I. et al. Guided bone regeneration: materials and biological mechanisms revisited. **European Journal of Oral Sciences**, v. 125, n. 5, p. 315–337, 2017.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay in lymphocytes. **Methods in Molecular Biology**, v. 682, p. 217–234, 2011.

FLORENCIO-SILVA, R. et al. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.

FRANCHI, L. P.; TAKAHASHI, C. S. Citotoxicidade e genotoxicidade de nanotubos de carbono. **Quimica Nova**, v. 35, n. 3, p. 571–580, 2012.

FRATZL, P.; BARTH, F. G. Biomaterial systems for mechanosensing and actuation. **Nature**, v. 462, n. 7272, p. 442–448, 2009.

FRÖTSCHL, R. Experiences with the in vivo and in vitro comet assay in regulatory testing. **Mutagenesis**, v. 30, n. 1, p. 51–57, 2015.

GALDINO, A. G. S. et al. Análise de ensaios in vitro do compósito de 50% HA-50% TiO2 fabricados pelo método da esponja polimérica. **Ceramica (Sao Paulo).** v. 60, p. 586–593, 2014.

GASIK, M. Understanding biomaterial-tissue interface quality: combined in vitro evaluation. **Science and Technology of Advanced Materials**, v. 18, n. 1, p. 550–562, 2017.

GOTO T., SASAKI K., Effects of trace elements in fish bones on crystal characteristics of hydroxyapatite obtained by calcination, **Ceram**. Int. v. 40 , n. 7, p. 10777–10785.T.T, 2014.

HAARAPARANTA A. M., JARVINEN E., CENGIZ I. F., et al. Preparation and characterization of collagen/PLA, chitosan/ PLA, and collagen/chitosan/PLA hybrid scaffolds for cartilage tissue engineering. **J Mater Sci Mater Med**. V 25, p. 1129–1136, 2014.

HABIBAH, T. U. et al. Biomaterials, Hydroxyapatite. p. 1–6, 2018.

HAKURA, A. et al. Use of human liver S9 in the Ames test: Assay of three procarcinogens using human S9 derived from multiple donors. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 37, n. 1, p. 20–27, 2003.

HUANG, J. Ceramic Biomaterials. **Biomaterials**, p. 185–204, 2017.

ISO 10993:2009. Biological evaluation of medical devices—Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. 3ª ed. 2009.

ITO A., KAWAMURA H., OTSUKA M. , IKEUCHI M., OHGUSHI H. , ISHIKAWA K. , ONUMA K. , KANZAKI N., SOGO Y. , ICHINOSE N. Zinc-releasing calcium phosphate for stimulating bone formation. **Mater Sci Eng**, C. p. 22:21–5, 2002.

JAMMALAMADAKA, U.; TAPPA, K. Recent advances in biomaterials for 3D printing and tissue engineering. **Journal of Functional Biomaterials**, v. 9, n. 1, 2018.

KAMMER, G. M. et al. In Vivo Evaluation of Strontium-Containing Nanostructured Carbonated Hydroxyapatite. **Key Engineering Materials**, v. 696, p. 212–222, 2016.

KARLSSON, H. L. The comet assay in nanotoxicology research. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 398, n. 2, p. 651–666, 2010.

KATARI, R.; PELOSO, A.; ORLANDO, G. Tissue Engineering and Regenerative Medicine: Semantic Considerations for an Evolving Paradigm. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 2, n. January, p. 1–6, 2015.

KAWAMURA H., ITO A., MURAMATSU T., MIYAKAWA S., OCHIAI N., TATEISHI T. Long term implantation of zinc-releasing calcium phosphate ceramics in rabbit femora. **J Biomed Mater Res A**. v. 65, p. 468–74, 2003.

KINGERY W. D., Introduction to Ceramics, **J Wiley & Sons**, New York. 1976.

LANSMAN S., PAAKKO P., RYHANEN J., et al. Poly-L/D lactide (PLDLA) 96/4 fibrous implants: histological evaluation in the subcutis of experimental design. **J Craniofac Surg**.v. 17, p. 1121–1128, 2006.

LARONDA, M.M.; RUTZ, A.L.; XIAO, S.; WHELAN, K.A.; DUNCAN, F.E.; ROTH, E.W.; WOODRUFF, T.K.; SHAH, R.N. A bioprosthetic ovary created using 3D printed microporous scaffolds restores ovarian function in sterilized mice. **Nat. Commun**. V. 8, 15261, 2017.

LEE, V. et al. Design and Fabrication of Human Skin by Three-Dimensional Bioprinting. **Tissue Eng. C Methods**, v. 20, p. 473–484, 2014.

LIU, X. et al. A comparison of in vitro cytotoxicity assays in medical device regulatory studies. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 97, n. June, p. 24–32, 2018.

LU, Z. F.; KLEINE-NULEND, J.; LI, B. Bone Microenvironment, Stem Cells, and Bone Tissue Regeneration. **Stem Cells International**, v. 2017, p. 2–4, 2017.

MACHADO, C. P. G. et al. Histomorphometric evaluation of strontium-containing nanostructured hydroxyapatite as bone substitute in sheep. **Brazilian Oral Research**, v. 30, n. 1, p. 1–11, 2016.

MAO, A. S.; MOONEY, D. J. Regenerative medicine: Current therapies and future directions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 47, p. 14452–14459, 2015.

MARIA, F.; CHEQUER, D. Utilização do Teste de Micronúcleo na avaliação da toxicidade dos azo corantes Disperse Red 1, Disperse Orange 1 e Disperse Red 13. **Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto**, p. 1–28, 2008.

MARKSTEDT, K.; MANTAS, A.; TOURNIER, I.; ÁVILA, H.M.; HÄGG, D.; GATENHOLM, P. 3D Bioprinting Human Chondrocytes with Nanocellulose–Alginate Bioink for Cartilage Tissue Engineering Applications. **Biomacromolecules**. V. 16, p. 1489–1496, 2015.

MARTIN, V.; BETTENCOURT, A. Bone regeneration: Biomaterials as local delivery systems with improved osteoinductive properties. **Materials Science and Engineering C**, v. 82, p. 363–371, 2018.

MAVROPOULOS, E. et al. The impact of the RGD peptide on osteoblast adhesion and spreading on zinc-substituted hydroxyapatite surface. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 24, n. 5, p. 1271–1283, 2013.

MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 455, n. 1–2, p. 29–60, 2000.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**. v. 65, n. 1-2 p. 55-63, 1983.

MÜLLER U. In vitro biocompatibility testing of biomaterials and medical device. **Med Device Technol**.; v. 19, n.2, p. 30, 32-4, 2008.

NASCIMENTO, L. et al. Osseoinduction Evaluation of Hydroxyapatite and Zinc Containing Hydroxyapatite Granules in Rabbits. **Key Engineering Materials**, v. 493–494, p. 252–257, 2011.

NETO, A. S.; FERREIRA, J. M. F. Synthetic and marine-derived porous scaffolds for bone tissue engineering. **Materials**, v. 11, n. 9, 2018.OLIVEIRA, C. S. et al. Avanços e aplicações da bioengenharia tecidual. **Méd. Biol**, v. 9, n. 1, p. 73–77, 2010.

NIH, U.S. Department of Health & Human Services. National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering.

OECD. OECD guideline for testing of chemicals: Ready Biodegradable. n. July, p. 1–62, 1997.

OECD, Organisation for Economic Cooperation and Development. Technology and economy: the key relationships, Paris. OECD, 1961.

OLIVEIRA, C. S. et al. Avanços e aplicações da bioengenharia tecidual. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 9, n. 1, p. 28, 2010.

OLIVEIRA, L. C.; ROSSI, A. M.; BAFFA, O. A comparative thermoluminescence and electron spin resonance study of synthetic carbonated A-type hydroxyapatite. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 70, n. 3, p. 533–537, 2012.

ORCIANI, M. et al. Biofabrication and Bone Tissue Regeneration: Cell Source, Approaches, and Challenges. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 5, n. March, p. 1–15, 2017.

ORLANDO, WOOD, K.J., STRATTA, R.J., YOO, J., ATALA, A., and SOKER, S. (2011a). Regenerative medicine and organ transplantation: past, present and future. **Transplantation**. v. 91, p. 1310–1317, 2011.

PATEL N. et al. In vivo assessment of hydroxyapatite and silicate-substituted hydroxyapatite granules using an ovine defect model**. J Mater Sci Mater Med**. V. 16, n. 5, p. 429–40, 2005.

PICONI, C.; MACCAURO, G. Review: Zirconia as a ceramic biomaterial. **Comprehensive Biomaterials**, v. 20, p. 1–25, 1997.

PINTO, J. G. S. et al. Enxerto autógeno x biomateriais no tratamento de fraturas e deformidades faciais – uma revisão de conceitos atuais. **Revista da Faculdade de Odontologia**, v. 12, n. 3, p. 79–84, 2007.

RESENDE, R. F. B. et al. Long-term biocompatibility evaluation of 0.5 % zinc containing hydroxyapatite in rabbits. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 24, n. 6, p. 1455–1463, 2013.

RIBEIRO, S. et al. In vivo evaluation of Zinc-containing nanostructured carbonated hydroxyapatite Simone. **Key Engineering Materials**, v. 696, p. 212–222, 2016.

SCUDIERO, D. A. et al. Evaluation of a Soluble Tetrazolium/Formazan Assay for Cell Growth and Drug Sensitivity in Culture Using Human and Other Tumor Cell Lines. **Cancer Research**, v. 48, p. 4827–4833, 1988.

SHARP F.A., RUANE D., CLAASS B., et al. Uptake of particulate vaccine adjuvants by dendritic cells activates the NALP3 inflammasome. **Proc Natl Acad Sci USA**.; v. 106, n. 3, p. 870–875, 2009.

SHI, R. et al. Current advances for bone regeneration based on tissue engineering strategies. **Frontiers of Medicine**, p. 1-29, 2018.

SINGH, N. et al. NanoGenotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials. **Biomaterials**, v. 30, n. 23–24, p. 3891–3914, 2009.

SLAUGHTER B.V.; KHURSHID, S.S.; FISHER, O.Z.; KHADEMHOSSEINI, A.; PEPPAS, N.A. **Hydrogels in Regenerative Medicine**. Adv. Mater. V. 21, p. 3307–3329, 2009.

STORRIE H., STUPP S. I. Cellular response to zinc-containing organoapatite: An in vitro study of proliferation, alkaline phosphatase activity and biomineralization. **Biomaterials**. V. 26, p. 5492–9, 2005.

STROBER, W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. **Current Protocols in Immunology**, 21: A.3B.1-A.3B.2. 1997.

SUN, T. W. et al. Porous Nanocomposite Comprising Ultralong Hydroxyapatite Nanowires Decorated with Zinc-Containing Nanoparticles and Chitosan: Synthesis and Application in Bone Defect Repair. **Chemistry - A European Journal**, v. 24, n. 35, p. 8809–8821, 2018.

SUNIL B.R., JAGANNATHAM M., Producing hydroxyapatite from fish bones by heat treatment, Mater. **Lett**. V. 185, p. 411–414, 2016.

TANG L. L., LIU H., WANG Y. L., et al. Evaluation of biocompatibility of acellular porcine dermis. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. V. 57, p. 215-218, 2007.

TANG, X. L.; LI, Q.; ROKOSH, G. et al. "Long-term outcome of administration of c-kitPOS cardiac progenitor cells after acute myocardial infarction: transplanted cells do not become cardiomyocytes, but structural and functional improvement and proliferation of endogenous cells persist for at least one year". **Circulation Research.** vol. 118, no. 7, pp. 1091–1105, 2016.

VALENTE, F. L. et al. Hydroxyapatite, polycaprolactone and alendronate in bone regeneration in the olecranon of rabbits. p. 2–3, 2016.

VALIENSE H., BARRETO M., RESENDE R.F., ALVES A.T., ROSSI A.M., MAVROPOULOS E., GRANJEIRO J.M., CALASANS-MAIA M.D. 2015. In vitro and in vivo evaluation of strontium-containing nanostructured carbonated hydroxyapatite/sodium alginate for sinus lift in rabbits. **J Biomed Mater Res Part B**. v. 00B, p. 000–000, 2015.

VAMZE, J.; PILMANE, M.; SKAGERS, A. Biocompatibility of pure and mixed hydroxyapatite and α-tricalcium phosphate implanted in rabbit bone**. Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 26 n. 2 p. 1-6, 2015.

WAHAB, N. F. A. C. et al. Genotoxicity assessment of biphasic calcium phosphate of modified porosity on human dental pulp cells using Ames and Comet assays. **Toxicology in Vitro**, v. 47, n. September 2017, p. 207–212, 2018.

WANG G., LU Z., ZHAO X., KONDYURIN A., ZREIQAT H., "Ordered HAp nanoarchitecture formed on HAp-TCP bioceramics by 'nanocarving' and mineralization deposition and its potential use for guiding cell behaviors," **Journal of Materials Chemistry B**, v. 1, n. 19, p. 2455–2462, 2013.

WANG, W.; YEUNG, K. W. K. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. **Bioactive Materials**, v. 2, n. 4, p. 224–247, 2017.

WANG, X.; RIJFF, B.L.; KHANG, G. A building-block approach to 3D printing a multichannel, organ-regenerative scaffold. J. **Tissue Eng. Regen. Med**. V. 11, p. 1403–1411, 2017.

WONG, H. M. et al. A biodegradable polymer-based coating to control the performance of magnesium alloy orthopedic implants. **Biomaterials**, v. 31, n. 8, p. 2084–2096, 2010.

Z. LU, S.-I. ROOHANI-ESFAHANI, G. WANG, H. ZREIQAT, "Bone biomimetic microenvironment induces osteogenic differentiation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells," **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, vol. 8, no. 4, pp. 507–515, 2012.

ZHAO, D. et al. Sintering behavior and mechanical properties of a metal injection molded Ti-Nb binary alloy as biomaterial. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 640, p. 393–400, 2015.