

BIOTRANS

Programa de Pós-Graduação em
Biomedicina Translacional

Mestrado e Doutorado



JULLIANA HELENA DE SOUZA SOBRINHO

**AVALIAÇÃO DAS VIAS DE INTERNALIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE
HIDROXIAPATITA CARBONATADA EM CÉLULAS MURINAS FOST**

DISSERTAÇÃO

DUQUE DE CAXIAS

2024

BIOTRANS

Programa de Pós-Graduação em
Biomedicina Translacional

Mestrado e Doutorado



AVALIAÇÃO DAS VIAS DE INTERNALIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE HIDROXIAPATITA CARBONATADA EM CÉLULAS MURINAS FOST

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação BIOTRANS da Universidade do Grande Rio (Unigranrio) como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Biomedicina Translacional

Aluna: Julliana Helena de Souza Sobrinho

Orientadora: Prof^a. Dr^a Sara Gemini Piperni

DUQUE DE CAXIAS

2024

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UNIGRANRIO – NÚCLEO DE COORDENAÇÃO DE BIBLIOTECAS

S729a Souza Sobrinho, Julliana Helena de.

Avaliação das vias de internalização de nanopartículas de hidroxiapatita carbonatada em células murinas fost / Julliana Helena de Souza Sobrinho. – Duque de Caxias, Rio de Janeiro, 2024.
65 f. il.

Orientadora: Profa. Dra. Sara Gemini Piperni

Dissertação (mestrado) – Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”, Escola de Ciência da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional, Rio de Janeiro, 2024.

1. Biomaterial. 2. Hidroxiapatita carbonatada. 3. Tráfego intracelular. 4. Vias endocíticas. I. Piperni, Sara Gemini. II. Título. III. Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”.

CDD: 610

Rodrigo de Oliveira Brainer CRB-7: 6814

**AVALIAÇÃO DAS VIAS DE INTERNALIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE
HIDROXIAPATITA CARBONATADA EM CÉLULAS MURINAS FOST**

JULLIANA HELENA DE SOUZA SOBRINHO

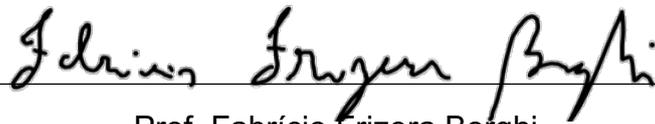
Dissertação apresentada ao
programa de pós-graduação
BIOTRANS da Universidade do
Grande Rio (Unigranrio) como
parte dos requisitos para a
obtenção do grau de Mestre em
Biomedicina Translacional

Aprovada em 10 de Abril de 2024

Banca examinadora:

Documento assinado digitalmente
 LEONARDO DA CUNHA BOLDRINI PEREIRA
Data: 26/06/2024 12:45:24-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Leonardo da Cunha Boldrini Pereira
Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – INMETRO
Presidente da banca



Prof. Fabrício Frizera Borghi
Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ



Profa. Isis Nem de Oliveira Souza
Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente, por Ele ter me concedido a felicidade de me especializar em áreas da ciência pelas quais sou apaixonada, e por ter me sustentado durante todo esse período. Mesmo nos momentos mais difíceis, quando a vida interpôs os mais diversos obstáculos para a conclusão desse trabalho, Deus estava aqui, me munindo de forças que eu não tinha, para continuar a caminhada até a linha de chegada.

À minha orientadora, Sara Gemini Piperni, por ter me aceito como aluna e ter tido paciência e gentileza para me guiar nessa estrada que por muitas vezes se tornou difícil. Seu apoio e compreensão, tanto na área acadêmica quanto muitas das vezes na área pessoal, me ajudaram a me superar e a evoluir a todo momento.

Aos meus familiares, em especial à minha mãe, por ter compreendido o caminho que escolhi e ter me dado total apoio para percorrê-lo.

Ao Laboratório de Biotecnologia, Bioengenharia d Biomateriais Nanoestruturados (LabEn), laboratório do qual faço parte, e a todos meus colegas que ali estão, por toda ajuda e companhia.

A Unigranrio, a Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), ao Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF) e a todos os profissionais neles incluídos, em especial o Dr. Marcel Guimarães Martins, Dr^a. Grasiella Ventura Matioszek, e ao Dr. Alexandre Malta Rossi.

EPÍGRAFE

“Como os céus são mais altos do que a terra,
assim os meus caminhos são mais altos
do que os seus caminhos, e os meus pensamentos,
mais altos do que os seus pensamentos.”

Isaías 55:9

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Representação esquemática das diferentes vias endocíticas	15
Figura 2. Esquema da síntese da Hidroxiapatita Carbonatada a 5°C, 37°C e 90°C	22
Figura 3. Fotografias do pó de CarboHA sintetizada a 5°C, 37°C e 90°C.....	28
Figura 4. Fotografia da CarboHA vista sob microscopia eletrônica de transmissão	29
Figura 5. Fotografias das CarboHAs 5°C, 37°C e 90°C após adsorção com rodamina	30
Figura 6. Gráfico das lavagens das CarboHAs 5°C, 37°C e 90°C por Espectrofotômetro	31
Figura 7. Fotografias das CarboHAs 5°C, 37°C e 90°C por microscopia de fluorescência	32
Figura 8. Difração de raios-X das CarboHAs 5°C, 37°C e 90°C	33
Figura 9. Espectrometria no infravermelho com transformada Fouries das CarboHAs 5°C, 37°C e 90°C	34
Figura 10. Potencial Zeta das CarboHAs 5°C, 37°C e 90°C em água e meio de cultura.....	35
Figura 11. Fotografia dos aglomerados de CarboHA por microscopia confocal.....	36
Figura 12. Espalhamento dinâmico da luz das CarboHAs 5°C, 37°C e 90°C	36
Figura 13. Doses de inibidores testadas para vias endocíticas	38
Figura 14. Gráfico representante da internalização das CarboHAs pela via mediada por Clatrina.....	40
Figura 15. Imagens representativas dos experimentos da internalização das CarboHAs pela via mediada por Clatrina	41
Figura 16. Gráfico representante da internalização das CarboHAs pela via mediada por Caveolina	42
Figura 17. Imagens representativas dos experimentos da internalização das CarboHAs pela via mediada por Caveolina	42
Figura 18. Gráfico representante da internalização das CarboHAs pela via de raft-lipídico	43
Figura 19. Imagens representativas dos experimentos da internalização das CarboHAs pela via de raft-lipídico	44
Figura 20. Gráfico representante da internalização das CarboHAs pela via de Macropinocitose	45

Figura 21. Imagens representativas dos experimentos da internalização das CarboHAs pela via de Macropinocitose	46
Figura 22. Gráfico representante da internalização das CarboHAs pela via de Fagocitose	47
Figura 23. Imagens representativas dos experimentos da internalização das CarboHAs pela via de Fagocitose	47
Figura 24. Gráfico representante da internalização das CarboHAs por todas as vias	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CAGR: *Compound Annual Growth Rate* (Taxa de Crescimento Anual Composta)

CarboHA: Hidroxiapatita carbonatada nanoestruturada

CarboHA 5°C: Hidroxiapatita carbonatada nanoestruturada sintetizada a 5°C

CarboHA 37°C: Hidroxiapatita carbonatada nanoestruturada sintetizada a 37°C

CarboHA 90°C: Hidroxiapatita carbonatada nanoestruturada sintetizada a 90°C

DLS: *Dynamic Light Scattering* (Espelhamento Dinâmico da Luz)

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DRX: Difração de Raios-X

EMC: Endocitose mediada por Clatrina

FTIR: *Fourier Transformed Infrared* (Espectrometria no Infravermelho com Transformata de Fourier)

HA: Hidroxiapatita

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

KBr: Brometo de potássio

M β CD: Methyl-beta-cyclodextrin

MET: Microscopia eletrônica de transmissão

NPs: Nanopartículas

PBS: Phosphate-buffered saline (tampão fosfato-salino)

PS: Penicilina estreptomina

SFB: Soro fetal bovino

Sumário

RESUMO	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1. Hidroxiapatita Carbonatada Nanoestruturada	12
1.2. Tráfego Intracelular	14
1.2.1. Endocitose.....	14
1.2.1.1. Endocitose Mediada por Clatrina.....	15
1.2.1.2. Endocitose Mediada por Caveolina	16
1.2.1.3. Endocitose Independente de Clatrina e Caveolina	16
1.2.1.4. Macropinocitose.....	17
1.2.1.5. Fagocitose	17
1.2.2. Vias de Internalização de Materiais Nanoestruturados	18
2. JUSTIFICATIVA	19
3. OBJETIVOS.....	21
3.1. Objetivo Geral.....	21
3.2. Objetivos Específicos	21
4. MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1. Síntese das Nanopartículas de Hidroxiapatita	22
4.2. Marcação Fluorescente das Nanopartículas de Hidroxiapatita	22
4.3. Exposição ao Meio de Cultivo	23
4.4. Caracterização Antes e Após Exposição ao Meio de Cultivo.....	23
4.5. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	23
4.6. Difração de Raios X (DRX)	23
4.7. <i>Fourier Transformed Infrared</i> (FTIR – Espectrometria no Infravermelho com Transformata de Fourier).....	24
4.8. Potencial Zeta	24
4.9. <i>Dinamic Light Scattering</i> (DLS – Espalhamento Dinâmico da Luz).....	25
4.10. Cultura Celular	25
4.11. Dose de Inibidores	25
4.12. Exposição às Células	26
4.13. Marcação das Células por Imunofluorescência	26
4.14. Análise dos Resultados.....	27
5. RESULTADOS	28
5.1. Síntese e Caracterização das Nanopartículas de Hidroxiapatita	28
5.1.1. Microscopia Eletrônica de Transmissão	29
5.2. Produção da Hidroxiapatita Carbonatada Fluorescente	29

5.3. Caracterização da Hidroxiapatita Carbonatada Adsorvida com Rodamina Antes e Após a Exposição ao Meio de Cultivo.	32
5.3.1. Difração de raio X	32
5.3.2. Espectrometria no Infravermelho com Transformada de Fourier – FTIR.	33
5.3.3. Potencial Zeta	34
5.3.4. Espelhamento Dinâmico da Luz – DLS	35
5.4. Ensaio de internalização e avaliação da citotoxicidade da hidroxiapatita carbonatada nanoestruturada	37
5.5. ANÁLISE DA INTERNALIZAÇÃO	40
6. DISCUSSÃO	49
7. CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS	56

RESUMO

A Hidroxiapatita (HA) é um biomaterial biocompatível e bioestimulador que permite a incorporação de moléculas como o carbonato, aumentando sua solubilidade e potencial de absorção de moléculas. As características físico-químicas da HA dependem fortemente da sua temperatura de síntese. Neste contexto, sínteses em temperatura mais próxima da temperatura corporal, são desejáveis para obter um material com estrutura mais parecida com o sintetizado de forma autóloga. Embora a literatura mostre que a Hidroxiapatita é internalizada pelas células, ainda não está esclarecido qual via endocítica esta nanopartícula utiliza para ser internalizada. O objetivo deste estudo é, portanto, a avaliação da internalização de nanopartículas de hidroxiapatita carbonatada (CarboHA) em células murinas fOST e sua correlação com a temperatura de síntese. A CarboHA foi sintetizada por precipitação por via úmida em três diferentes temperaturas, a saber, 5°C, 37°C e 90°C, e sua marcação fluorescente foi realizada por adsorção com Rodamina; seu tamanho foi diretamente proporcional à temperatura de síntese. As nanopartículas foram caracterizadas por Difração de Raios X - DRX, *Fourier Transformed Infrared* – FTIR e Potencial Zeta, antes e após a exposição ao meio de cultura, o que confirmou a natureza da nanopartícula, bem como a não alteração desta após a adsorção com Rodamina. Para verificação da via de internalização utilizada pelas nanopartículas, as células foram expostas a reagentes que inibem suas principais vias endocíticas. Após a inibição destas separadamente, concluímos que a internalização das CarboHAs tem relação direta com sua temperatura de síntese. A CarboHA 5°C, de menor grão primário, teve sua internalização feita majoritariamente pelas vias mediadas por Clatrina e Caveolina; já a CarboHA 90°C, de maior grão primário, teve sua internalização por Macropinocitose e Fagocitose.

PALAVRAS-CHAVE: Hidroxiapatita carbonatada, tráfego intracelular, biomaterial, vias endocíticas

ABSTRACT

Hydroxyapatite (HA) is a biocompatible and biostimulatory biomaterial that allows the incorporation of molecules such as carbonate, increasing their solubility and molecule absorption potential. The physicochemical characteristics of HA strongly depend on its synthesis temperature. In this context, syntheses at temperatures closer to the human organism are desirable to obtain a material with a more similar structure to that synthesized autologously. Although the literature shows that Hydroxyapatite is internalized by cells, it is not yet clear which endocytic pathway this nanoparticle uses to be internalized. The goal of this study is, therefore, the evaluation of the internalization of carbonated hydroxyapatite nanoparticles (CarboHA) in murine fOST cells and their correlation with the synthesis temperature. CarboHA was synthesized by wet precipitation at three different temperatures, namely, 5°C, 37°C, and 90°C, and its fluorescent marking was carried out by adsorption with Rhodamine; its size was directly proportional to the synthesis temperature. The nanoparticle was characterized by X-ray Diffraction - XRD, Fourier Transformed Infrared - FTIR and Zeta Potential, before and after exposure to the culture medium, which confirmed the nature of the nanoparticle, as well as its non-change after adsorption with Rhodamine. To verify the internalization pathway used by the nanoparticles, the cells were exposed to reagents that inhibit their main endocytic pathways. After an isolated inhibition, we concluded that the internalization of CarboHA is directly related to their synthesis temperature. CarboHA 5°C, with the smallest primary grain, was mainly internalized via pathways mediated by Clathrin and Caveolin; CarboHA 90°C, with the largest primary grain, was internalized by Micropinocytosis and Phagocytosis.

KEYWORDS: Carbonated hydroxyapatite, intracellular trafficking, biomaterial, endocytic pathways

1. INTRODUÇÃO

1.1. Hidroxiapatita Carbonatada Nanoestruturada

A substituição óssea é um procedimento que têm gerado impacto crescente nos últimos anos por conta do envelhecimento populacional e do aumento da expectativa de vida (IBGE, 2020). Dentre os tecidos do organismo, o tecido ósseo é um dos que mais sofre com o envelhecimento. Isso acontece por mudanças na arquitetura do osso, mudanças no metabolismo do organismo, e por deteriorações fisiológicas naturais (CUI et al, 2022; PIGNOLO, 2023).

O tecido ósseo é composto por aproximadamente 10% de água, 40% de componentes orgânicos, incluindo colágeno do tipo I e 10% de proteínas não colágenas envolvidas na mineralização óssea, sendo seu maior componente a hidroxiapatita, que compõe entre 50% e 70% do osso (CIOSEK et al, 2021). Dentre os principais tipos celulares, podemos citar os osteócitos, células mais abundantes no osso, com papel importante na homeostase, osteoclastos, responsáveis pela destruição do tecido ósseo, e osteoblastos, que têm o papel de formar novo osso (PENG et al, 2022). Este último tipo celular tem um papel importante na mineralização óssea (HASEGAWA et al, 2022). Os osteoblastos têm a função de secretar os precursores minerais necessários para a mineralização da matriz extracelular, utilizando para isso os lisossomos (IWAYAMA et al, 2019).

O material mais utilizado para realizar a substituição óssea é o enxerto ósseo, cuja primeira definição foi elaborada por Muschler e Lane, em 1992, caracterizando-o como qualquer material que sozinho ou combinado com outros, possui a capacidade de promover a regeneração óssea, além proporcionar propriedades osteoindutivas, osteogênicas e osteocondutoras (BALDWIN et al, 2019; SCHMIDT, 2021). Esse tipo de tratamento, porém, foi primeiramente visto no século XVII, em 1668, feito por Jacob van Meekeren, que relatou ter tido sucesso ao fazer um xenoenxerto de uma calvária de cão no crânio de um soldado (SCHMIDT, 2021).

Para os procedimentos de substituição óssea, os enxertos podem ser obtidos por duas vias: alogênica ou autóloga. A via alogênica é aquela na qual o material é obtido a partir de terceiros; na via autóloga, o material é obtido a partir do próprio paciente. Esta última via é considerada o padrão ouro da regeneração óssea, uma vez que o material obtido é histocompatível e não imunogênico para aquele paciente (HAUGEN et al, 2019), de modo que os resultados de qualquer método alternativo são comparados aos resultados demonstrados pela via autóloga (SCHMIDT, 2021). Existem, porém, diversas desvantagens quanto ambos os processos, como a necessidade de procedimentos complementares para a obtenção do enxerto a partir do doador, possibilidade de infecções bacterianas e transmissão

de doenças (MOUSSA et al, 2020), deformações, sangramentos, inflamação, dor crônica, além de custar consideravelmente mais (HAUGEN et al, 2019). E, dependendo do local de colheita do material, o paciente sofrerá muitas dores e grande morbidade (GHANAATI et al, 2019). O tempo de recuperação para esse procedimento pode variar entre duas semanas e três meses, e o enxerto ósseo em si precisa de no mínimo três meses para a cicatrização, período que pode se estender até dois anos, a depender do local e do tamanho do enxerto (SANZ-SANCHÉZ et al, 2022; BRINKER et al, 2020).

Como alternativa a tantas desvantagens e riscos, biomateriais sintéticos têm sido amplamente utilizados (BUSH et al, 2022). A nanomedicina, campo de pesquisa que tem crescido muito nos últimos anos, é a ciência que estuda a prevenção e tratamento de doenças e danos causados ao corpo humano através de ferramentas moleculares (LU et al, 2021). As nanopartículas, já utilizadas em diversas áreas da medicina, também estão presentes em campos como os enxertos nanoestruturados para regeneração tecidual, além de servirem como nanocarreadores, por conta da grande estabilidade e solubilidade que conferem à suas cargas (MITCHELL et al, 2020), e terem papel no nanodiagnóstico (JOVČEVSKA et al, 2019).

Dentre as nanopartículas mais utilizadas na medicina para processos de substituição óssea podemos destacar a Hidroxiapatita (HA). Este material é um dos principais componentes da matriz óssea, sendo composta pelos mesmos íons que o principal constituinte mineral do osso, e por isso, largamente utilizada em substituição aos enxertos alogênicos ou autólogos, uma vez que possuem propriedades biocompatíveis (ANJOS et al, 2019).

A HA é um composto de fosfato de cálcio bioativo, bioabsorvível e osteocondutivo (ARCOS, 2020). Sua grande bioatividade e biocompatibilidade chamou a atenção de pesquisadores de diversas áreas da saúde, o que fez com que o número de aplicações e estudos relacionados a esta nanopartícula crescesse (GHIASI et al, 2020). Sua fórmula química é $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ e sua razão Ca/P é de 1,67 (DINDA, et al, 2020). Sua estrutura permite a incorporação de diferentes moléculas e íons, que têm a capacidade de promover propriedades adicionais (ARCOS, 2020), assim como alterações físico-químicas e biológicas. Diversas incorporações já são realizadas, como a do estrôncio por exemplo, que auxilia na melhora da sua capacidade angiogênica e de regeneração óssea (RAN et al, 2023). A incorporação de carbonato na HA é uma das mais realizadas na literatura, pois aumenta sua solubilidade que por consequência facilita sua internalização, além de permitir a produção de substitutos ósseos com maior potencial de absorção de moléculas (ANJOS et al, 2019).

Para a produção de HA sintética, dois diferentes processos são utilizados: a via seca e a via úmida. A via seca, apesar de ter como vantagem a produção de produtos altamente cristalinos, tem como desvantagem a necessidade de temperaturas extremamente altas, de 900°C, o que gera uma grande dificuldade técnica (KIEN et al, 2018). Já a via úmida, processo mais simples de ser realizado em ambiente laboratorial, pode ser realizado tanto em água quanto em solvente, tanto em temperatura ambiente quanto em temperaturas mais elevadas, sob pressão normal ou mais alta (KIEN et al, 2018). Além disso, essa metodologia permite um controle melhor da estrutura, morfologia e cristalinidade da HA, e uma reprodução mais fiel dos tecidos biológicos, que são biossintetizados a 37°C.

Apesar desta nanopartícula ter crescido em importância e ter ganhado mais espaço nos últimos anos, ainda existem poucos estudos na literatura sobre quais vias endocíticas essa nanopartícula utilizada para ser internalizada pelas células, e assim exercer suas funções biológicas.

1.2. Tráfego Intracelular

O tráfego intracelular é o processo pelo qual as moléculas, íons e patógenos entram e saem das células, e é de extrema importância que tais processos sejam bem compreendidos. Tal importância existe pois é desta forma que as moléculas são internalizadas, para nutrição ou degradação celular, e que vesículas são excretadas. Muitas das vezes, essas vesículas têm a função de possibilitar a comunicação das células com o meio extracelular, ajustando-se a mudanças no ambiente, dispondo de um sistema especializado de membranas responsáveis pela entrada e saída de partículas (KEIJE et al, 2021). Além disso, é um processo que influencia em como as células percebem e respondem aos sinais externos (HARRISON et al, 2020).

1.2.1. Endocitose

Chama-se endocitose o processo pelo qual as células internalizam moléculas e partículas, ora envolvendo-as em vesículas que são formadas pelo invaginamentos da membrana plasmática, ora por extensões da mesma (JU et al, 2020). Pequenas vesículas medindo entre 60 e 120 nm são formadas para o transporte de diferentes cargas para dentro do citosol de células eucarióticas (KAKSONEN AND ROUX, 2018). Algumas moléculas precisam ligar-se à receptores na membrana (HINZE, 2018), que iniciarão o processo de internalização, formando um dobramento na membrana, cujo tamanho e formato dependem o tipo de via de internalização e da carga em si, que irão envolver a carga a levá-la para dentro da célula. Em seguida, as vesículas se desprendem da membrana e seguem para seu tráfego intracelular.

As vias endocíticas podem ser diferenciadas através do seu formato, tamanho, cinética dos produtos carregados e da carga a ser internalizada. Embora exista um vasto conhecimento sobre as cargas absorvidas, os mecanismos específicos pelos quais essas cargas são internalizadas são menos esclarecidos ainda mais quando se trata de materiais nanoparticulados, uma vez que diversas características destes, como tamanho, formato, elasticidade, e superfície, influenciam na sua internalização (KEIJE et al, 2021). As principais vias endocíticas mais comumente conhecidas são: endocitose mediada por clatrina, endocitose mediada por caveolina, endocitose independente de clatrina e caveolina, macropinocitose e fagocitose (Figura 1).

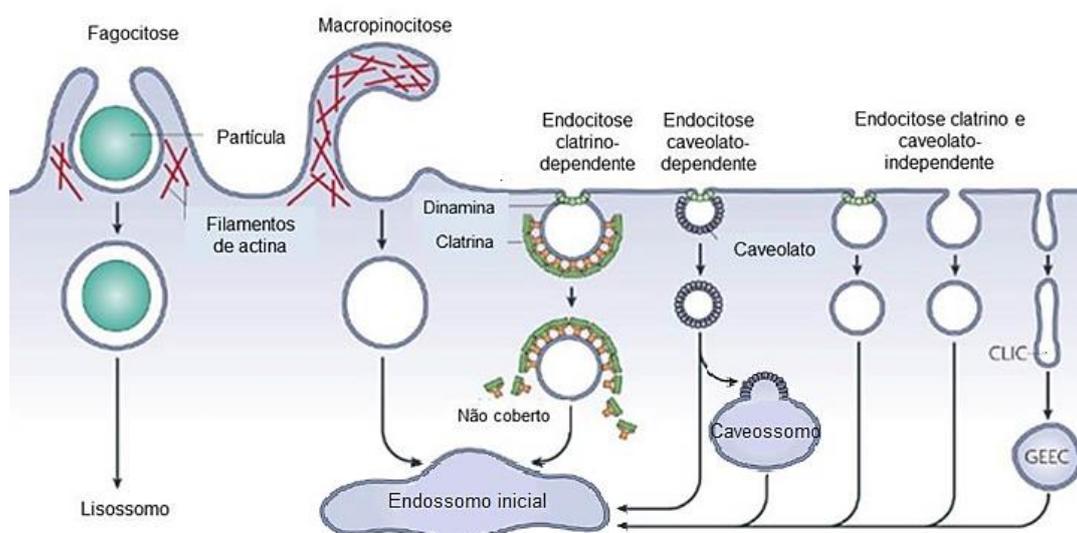


Figura 1: Representação esquemática de diferentes vias endocíticas. Adaptado de Mayor & Pagano (2007).

1.2.1.1. Endocitose Mediada por Clatrina

A endocitose mediada por Clatrina (EMC) é o processo endocítico mais bem caracterizado na literatura (BASCHIERI et al, 2020). É o principal caminho endocítico para a nutrição celular, migração, neurotransmissão, sinalização celular, adesão e morfogênese (KAKSONEN AND ROUX, 2018). Recebeu este nome devido a proteína Clatrina-1, seu principal componente, porém sabemos que outras 50 proteínas também estão envolvidas neste processo (KAKSONEN AND ROUX, 2018). De acordo com Kaksonen And Roux, 2018, além da Clatrina, este revestimento é formado por adaptinas, também chamadas proteínas adaptadoras de Clatrina. Como esta não é capaz de unir-se com a membrana vesicular, ela deve ser atraída pelas adaptinas. Outras proteínas, como a intersectina, interagem com as proteínas adaptativas para juntar os componentes do revestimento (KAKSONEN AND ROUX, 2018).

Essas estruturas são comumente chamadas *clathrin-coated pits*, por conta do formato dessas invaginações, compreendem não só a proteína, mas também todos os reguladores e adaptadores que juntos geram força para formar a invaginação da membrana plasmática (BASCHIERI et al, 2020). Por esta via ocorre a internalização de complexos de receptores de membrana e de sinalização, íons, transportados e outros tipos de moléculas (KAKSONEN AND ROUX, 2018).

1.2.1.2. Endocitose Mediada por Caveolina

As caveolinas são proteínas que se encontram na superfície de muitas células de mamíferos, capazes de formar invaginações entre 50 e 100 nm (WANG et al, 2021; YANG et al, 2020), sendo formados por dois tipos diferentes de proteínas, as cavininas e caveolinas (PARTON et al, 2020), pois a caveolina-1 sozinha é capaz de gerar as Cavéolas.

De acordo com Ferreira et al, 2014, esta via é mais lenta se comparada com a endocitose mediada por clatrina, mas tem sido altamente recomendada na área da nanomedicina quando se deseja evitar a degradação lisossomal (SAMRAT et al, 2021).

De acordo com Parton et al, 2020, a Caveolina além de ser sensível à estímulos mecânicos, também é capaz de transmitir sinais mecânicos, agindo assim como mecanossensores. Porém, as funções da Caveolina não se restringem a isso, pois outras rotas de sinalização têm sido relacionadas à Caveolina, na maioria das vezes associadas diretamente à interação desta proteína de membrana com proteínas sinalizadoras específicas (PARTON et al, 2020).

1.2.1.3. Endocitose Independente de Clatrina e Caveolina

A endocitose independente de clatrina foi observada tanto *in vitro* quanto *in vivo*, e suas funções na internalização compreendem a remoção de receptores presentes na membrana plasmática, a internalização de proteínas, lipídios, além de controlar mecanismos como a migração e polarização celular (FERREIRA et al, 2018). Conforme publicado por Watanabe et al, 2017, a endocitose independente de clatrina está relacionada à certas funções fisiológicas celulares, onde se faz necessário uma internalização mais rápida, tal como reações à hormônios do estresse ou um processo de endocitose que visa compensar certo número de exocitoses de vesículas hormonais. Logo, quando comparada com a endocitose mediada por clatrina, a endocitose independente desta se mostra mais rápida, além de participar na internalização de diversos vírus e ter função em doenças como aterosclerose e alguns tipos de cânceres (FERREIRA et al, 2018).

Embora três diferentes tipos de endocitose independente de clatrina e caveolina tenham sido identificados (VOCELLE et al, 2019), quando se trata da independência da caveolina,

ainda se fazem necessários estudos para distinguir melhor essas duas vias separadamente (FERREIRA et al, 2018).

Um mecanismo de internalização independente de Clatrina e Caveolina é o raft-lipídico, nanodomínios na membrana plasmática ricos em esfingolipídios e colesterol papel na organização lateral da superfície celular, com um processo pelo qual ligantes e receptores são internalizados por esses domínios (WEI et al, 2020; SAPÓN et al, 2023).

1.2.1.4. Macropinocitose

A macropinocitose é a única via endocítica capaz de internalizar grandes quantidades de fluidos extracelulares para que os nutrientes presentes nesse líquido sejam trazidos para dentro das células, e diferentes de outras vias de internalização, não precisa da adesão de moléculas nos receptores da superfície celular (LIN et al, 2020). Esse processo acontece pelo movimento de pseudópodes que se estendem a partir da célula e dobram-se, formando os chamados macropinosomos (STOW et al, 2020). Os mecanismos da macropinocitose ainda são mal compreendidos apesar de sua grande importância e, de acordo com Lin et al, 2020, diferentemente da endocitose mediada por clatrina, a macropinocitose não possui estrutura de revestimento e até o momento, nenhuma molécula exclusiva desta via foi identificada.

Embora seja um processo endocítico comumente observado em patógenos de vida livre, qualquer célula de mamífero pode realizar essa internalização, sendo células do sistema imune como células dendríticas e macrófagos as que mais comumente utilizam-se desta via (KING et al, 2019).

Era originalmente chamada pinocitose, mas teve sua nomenclatura modificada para macropinocitose para diferenciar este processo da internalização de vesículas endocíticas menores, tais como as revestidas por clatrina (YOSHIDA et al., 2017). Esta via é importante para o sistema imune, pois tem parte na busca por antígenos, além da sinalização por receptores de antígenos, e na própria internalização de alguns patógenos (STOW et al, 2020).

1.2.1.5. Fagocitose

A fagocitose é um processo pelo qual partículas grandes são internalizadas, sendo estas maiores que 0.5 μm e na grande maioria das vezes, sólidas, o que difere esta via da macropinocitose (HALLET, 2020). Envolve a expressão e reconhecimento de receptores celulares e a formação de um fagossomo (LASCATER et al, 2018), e assim como a macropinocitose, envolve a extensão da membrana plasmática para a capturar e englobar as partículas a serem internalizadas (HALLET, 2020).

Apesar de ser uma via de internalização utilizada por diversos tipos celulares, apenas células fagocíticas profissionais, os fagócitos, conseguem realizar essa internalização com

alta eficiência, conforme publicado por Rabinovish, 1995. Células do sistema imune, como neutrófilos, macrófagos, monócitos e células dendríticas estão entre os fagócitos profissionais, que têm a função de apresentar antígenos aos linfócitos e retirar microrganismos circulantes (URIBE-QUEROL et al, 2020).

Outros tipos celulares como células epiteliais, endoteliais e fibroblastos, apesar de serem consideradas células não-fagocíticas profissionais, também conseguem realizar a internalização de partículas por esta via (URIBE-QUEROL et al, 2020).

1.2.2. Vias de Internalização de Materiais Nanoestruturados

Materiais nanoestruturados, devido ao seu tamanho, são capazes de interagir com as células da mesma forma que outros materiais tamanho similar, tais como vírus e proteínas, sendo reconhecidos por receptores nas membranas e sendo internalizados através da maquinaria endocítica das células (FRANCIA et al, 2020). Embora o tamanho das partículas seja importante uma vez que quanto maiores estas forem, mais dificuldade as células terão para internalizá-las (WU et al, 2019), tanto o tamanho quanto a forma, a elasticidade e a carga da superfície podem ser adaptadas dependendo da necessidade (SHI et al, 2017).

Em células de mamíferos células não fagocíticas profissionais a via clássica para a internalização de nanopartículas é a endocitose mediada por clatrina (BASCHIERI et al, 2020; TARASENKO et al, 2021). Porém, ainda não existe um consenso na comunidade científica sobre qual via específica as células utilizam para internalizar os materiais nanoparticulados (FRANCIA et al, 2020). Parâmetros como tamanho, carga da superfície, forma e rigidez têm a capacidade de influenciar diretamente na forma como este nanomaterial é internalizado pela célula.

Ainda hoje, diversos aspectos da internalização e subsequente processamento de materiais nanoestruturados permanecem obscuros, e por isso, uma compreensão melhor desses mecanismos têm grande potencial para ajudar no melhor desenvolvimento de nanomateriais adaptados às necessidades dos campos nos quais eles serão utilizados. (FRANCIA et al, 2020).

2. JUSTIFICATIVA

Devido ao envelhecimento populacional e ao aumento da expectativa de vida, a substituição óssea é um dos procedimentos com impacto crescente nos últimos anos (IBGE, 2020). Enxertos ósseos são o segundo tecido mais transplantado ao redor do mundo, sendo o mais transplantado no Brasil (HAUGEN et al, 2019). De acordo com Zhao et al, 2021, 2.2 milhões de enxertos ósseos eram realizados no mundo com um custo estimado de US\$ 664 milhões até 2021, número que atualmente chega aproximadamente aos 3 milhões de procedimentos musculoesqueléticos realizados anualmente apenas nos Estados Unidos, de acordo com a *American Academy of Orthopedic Surgeons*, em 2020.

O desenvolvimento da nanotecnologia no século 21, gerou grande excitação e potencial ao redor do mundo, e apesar dos desafios que esta tecnologia ainda propõe, cientistas e pesquisadores continuam seus esforços para melhorar a compreensão e manejo de nanoproductos relacionados à nanotecnologia (VERMA et al, 2019).

De acordo com as expectativas do mercado internacional e previsões feitas até o ano de 2026, é esperado que os biomateriais sintéticos nanoestruturados demonstrem grande crescimento lucrativo, devido à sua melhor biocompatibilidade, melhor aceitação pelos pacientes e menores chances de transmissão de doenças. Os materiais cerâmicos, como a hidroxiapatita carbonatada, tem dominado o mercado pois este material é facilmente reabsorvido pelo corpo, possuindo menor risco de infecção. Além disso, sua popularidade tem crescido graças à curta duração da cirurgia, redução da dor, e controle da perda de sangue, que geralmente está envolvida nesses tipos de procedimento (GRAND VIEW RESEARCH, 2020). Resultados obtidos por estudos feitos por Jardim et al, 2020 mostram que compósitos dentais contendo nanopartículas de hidroxiapatita possuem a liberação de nanopartículas de cálcio e fosfato, promovendo a osteointegração.

Apesar dos benefícios supracitados do uso das nanopartículas, ainda não existe junto a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) um consenso sobre a regulação acerca da utilização dos materiais nanoestruturados, que apresentam propriedades físico-químicas diferentes da sua contraparte micro e macro estruturada. Portanto, se faz necessário a realização de mais estudos e pesquisas com a finalidade de melhor esclarecer este campo, de forma que tais tratamentos possam ser devidamente regulamentados, possibilitando o desenvolvimento e aplicação de medicamentos melhores que possam chegar à população.

Dado sua grande importância no mercado atual, é necessária uma investigação dos mecanismos de internalização e do seu tráfego intracelular da Hidroxiapatita carbonatada sintetizada em temperaturas próxima daquela corporal, visando a otimização e propostas de novas aplicações, além de uma melhor compreensão de suas limitações (ROSSI et al. 2017).

Este estudo propõe uma melhor compreensão de tais processos e sua corroboração com as diversas características da hidroxiapatita, relacionadas às diferentes temperaturas de síntese, visando encontrar novas formas de aprimorar a qualidade dos produtos baseados neste material e gerar fundamentos para a regulamentação de nanoprodutos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho é a avaliação da internalização e tráfego intracelular de nanopartículas de hidroxiapatita carbonatada em células murinas de cultura primária fOST.

3.2. Objetivos Específicos

- Síntese da hidroxiapatita carbonatada nanoestruturada por via úmida a 5°C, 37°C e 90°C.
- Caracterização do biomaterial antes e depois da exposição ao Meio de Cultura.
- Marcação fluorescente por adsorção a Rodamina, para possibilitar a visualização e quantificação após internalização.
- Caracterização das vias endocíticas para avaliação do processo de internalização dos biomateriais.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Síntese das Nanopartículas de Hidroxiapatita

A hidroxiapatita carbonatada (CarboHA) foi sintetizada no Laboratório de Biomateriais do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF) por precipitação por via úmida utilizando soluções aquosas de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, 0,21 mol/L; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 0,09 mol/L e $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, 0,033 mol/L. As condições de síntese foram rigorosamente controladas em pH 12 e em temperaturas de 5°C, 37°C e 90°C. Depois da adição, a suspensão de CarboHA 37°C e 90°C foi agitada por 2 horas enquanto a de 5°C por 3h, para então todas serem lavadas e filtradas a vácuo. Em seguida, o biomaterial foi seco; a CarboHA 37°C e 90° foram secas em estufa a 50°C por 12 horas, e a CarboHA 5° foi seca no liofilizador. Após seco o material foi peneirado em uma peneira de 75µm.

Três diferentes lotes foram sintetizados, visando garantir os resultados experimentais e sua reprodutibilidade.

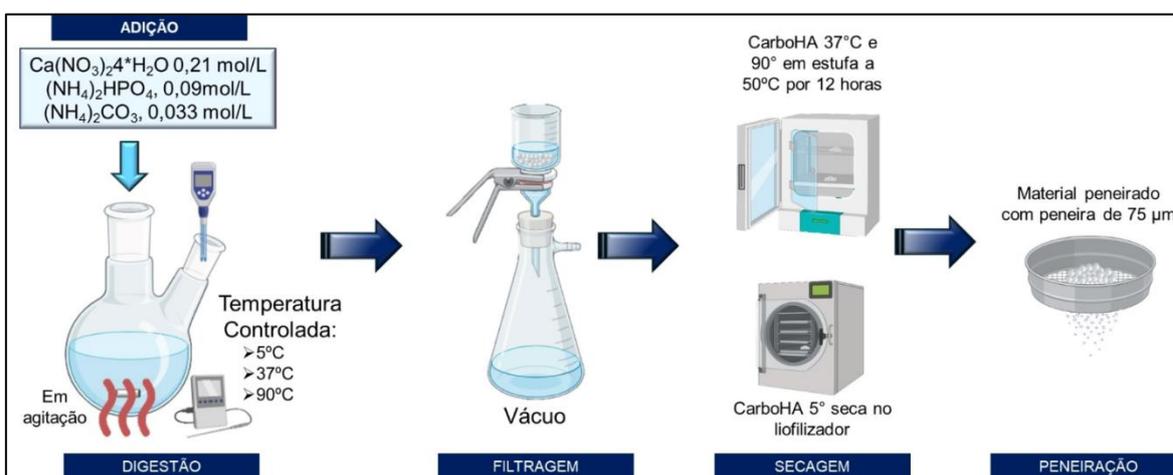


Figura 2: Representação esquemática dos principais procedimentos para a síntese da CarboHA. Da esquerda para a direita, o processo se inicia com a precipitação de nitrato de cálcio, fosfato diamônico e carbonato de amônio; em seguida a suspensão é agitada e então lavada, para seguir para a secagem.

4.2. Marcação Fluorescente das Nanopartículas de Hidroxiapatita

Para marcação das NPs, foram utilizadas moléculas fluorescentes de Rodamina. Estas moléculas foram incorporadas na superfície ou na estrutura do material nanoestruturado objetivando a geração de uma CarboHA fluorescente que torne possível a verificação da quantificação da internalização das mesmas pela célula a ser estudada.

Para a preparação de CarboHA florescente, uma solução concentrada 0,5 mg/ml foi preparada diluindo 10 mg de Rodamina em 50ml de água (estoque). Em seguida, 200 mg de CarboHA 5°C, CarboHA 37°C e CarboHA 90°C foram diluídos separadamente em 1 ml do estoque de Rodamina, vortexados e então agitados por duas horas em temperatura ambiente para realizar a adsorção da Rodamina à hidroxiapatita. Em seguida, o material foi

centrifugado por 10 minutos a 350 RCF, lavado com H₂O até o sobrenadante ficar transparente. As três diferentes condições de síntese da hidroxiapatita pura e com Rodamina adsorvida foram secas por 12 horas no secador. A adsorção da Rodamina fluorescente à hidroxiapatita foi confirmada tanto por microscopia de fluorescência, adquirindo imagens no filtro de emissão de rodamina, 546 nm (microscópio AXIO plan II, Zeiss Brasil) quanto pelas técnicas de FTIR, e potencial zeta durante a caracterização.

4.3. Exposição ao Meio de Cultivo

As Carbo-HA foram ressuspensas na concentração de 1 mg/ml em 14 ml de água Miliq ou meio de cultura DMEM suplementado com 10% de SFB e 1% de PS, respectivamente, ambos condicionados em incubadora por 24 horas a 37°C e 5% de CO₂. As amostras ressuspensas foram então deixadas em agitação por 24 horas. Em seguida, foram centrifugadas a 300 RCF por 5 minutos e lavadas 3 vezes com água Miliq, sendo novamente centrifugadas e ressuspensas em água após cada lavagem. Por fim, foram secas por 12 horas.

4.4. Caracterização Antes e Após Exposição ao Meio de Cultivo

A qualidade da síntese foi confirmada por difração de raio X (DRX). Para caracterização do biomaterial foram utilizadas técnicas químicas e físicas como MET, FTIR, Potencial Zeta e DLS antes e depois do contato com o meio biológico.

4.5. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Essa técnica foi utilizada para avaliar a morfologia, organização estrutural, tamanho, características nanoestruturais do material que foi utilizado.

As grades de cobre 300 mesh para a visualização das amostras foram obtidas comercialmente, revestidas com Formvar, aplicando duas gotas sobre a grade para então deixá-las secar por 24 horas. Em seguida, 10 µL da amostra contendo CarboHA foram postas sobre a grade, com uma pausa de em torno de 10 minutos para a decantação das partículas, após os quais o excesso de líquido é retirado. A amostra então foi visualizada no Microscópio Eletrônico de Transmissão (JEOL- JEM-1011) da plataforma multiusuária de microscopia eletrônica da FIOCRUZ.

4.6. Difração de Raios X (DRX)

O DRX foi utilizado com uma medida de 2θ de 10° a 50°, passo 0,02° com tempo de 5 s no Difrátometro de alta resolução (Zeiss HZGS) do CBPF (Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas). Esta análise obtém a análise estrutural e microestrutural, identificando os diferentes

materiais presentes na estrutura e para verificar o grau de cristalinidade do material sintetizado que foi utilizado. Através da utilização da técnica, foi possível observar a difração em cada amostra, tornando possível determinar a cristalinidade do material e confirmara qualidade da síntese obtida.

4.7. *Fourier Transformed Infrared* (FTIR – Espectrometria no Infravermelho com Transformata de Fourier)

Esta técnica é utilizada para obter a caracterização, identificação e/ou determinação de características estruturais (principalmente em grupos funcionais e de ligações presentes em uma amostra). A análise foi feita pesando 200 mg de KBr (brometo de potássio) e 5 mg de CarboHA – uma quantidade arbitrária, suficiente apenas para modificar levemente cor da pastilha – seguindo-se a maceração de ambos em um pilão até que sejam um pó extremamente fino. Em seguida, o material é montado em uma prensa uniaxial, e pressionado por cinco minutos para então ser retirado cuidadosamente da prensa, e ser levado até o aparelho para sua leitura em um espectrômetro da marca Shimadzu modelo IRPrestige-21, no Laboratório de Espectroscopia do CBPF.

O princípio da espectroscopia no infravermelho se baseia nas frequências de vibração específicas graças às ligações químicas entre as substâncias. Estas vibrações são correspondentes aos níveis de energia da molécula (chamados níveis vibracionais). Ao receber uma radiação eletromagnética que apresente a mesma energia de uma de vibrações, a molécula então absorverá a luz. A radiação do espectrofotômetro é guiada pelo interferômetro, que atua medindo os ângulos e distâncias de ondas eletromagnéticas, em seguida um gráfico é gerado apresentando a potência da radiação em um instante através da distância (interferograma). Útil para obtenção de informações qualitativas e semiquantitativas, de componentes de uma amostra ou de uma mistura, em qualquer estado de apresentação, quer seja sólido, líquido, gasoso ou em solução não-aquosa. Consiste em um teste rápido (promovendo resultados em menos de 5 minutos), tornando possível analisar também, amostras em pequena quantidade ou tamanho.

4.8. Potencial Zeta

Para verificar a eventual adsorção de moléculas, principalmente proteínas, foi utilizada a técnica do Potencial Zeta. A análise foi realizada em um Litesizer DLS 500 (Anton Paar Brasil) antes e depois do contato das partículas com meio de cultivo, após da preparação da amostra descrita previamente. 1 mg de amostra foi ressuspendida em KCl 1 mM e foi realizada a medida. Esta técnica mede a amplitude da repulsão ou da atração das cargas entre as partículas do material e o meio através da mobilidade eletroforética identificando a função

da carga superficial da partícula, de qualquer camada adsorvida na interface com o meio e da natureza e composição do meio que a circunda. A medição é feita mediante dois eletrodos que aplicam um potencial elétrico a uma cuba contendo a suspensão do material nanoestruturado. As partículas se movem na direção da carga oposta, e quanto mais rápida for a velocidade da partícula, maior é a carga elétrica. Quanto maior é a negatividade da medida de potencial, mais atrativas as forças tenderão a ser, constituindo um provável indicador de adsorção de proteínas.

4.9. *Dinamic Light Scattering* (DLS – Espalhamento Dinâmico da Luz)

O DLS é uma técnica de caracterização físico-química que mede a distribuição do tamanho de pequenas partículas e moléculas em solução líquida. Para avaliação das dimensões do nosso material em suspensão 1 mg de amostra obtida antes e depois do contato das partículas com meio de cultivo (após da preparação da amostra descrita previamente) foi ressuspendida em 1 ml de NaCl 1,2 g/ml e foi realizada a medida em um equipamento Litesizer DLS 500 (Anton Paar Brasil).

Quando uma partícula é iluminada por uma fonte de luz (como um laser), ocorre o espalhamento da luz multidirecional. Essa técnica consiste em analisar as flutuações de intensidade da luz espalhada em um determinado ângulo e associar ao tamanho da partícula que gerou a deflexão.

4.10. Cultura Celular

As células primárias murinas fOST são osteoblastos isolados a partir do fêmur de um camundongo BALB/c adulto. A cultura foi realizada em meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) com alta concentração de glicose (4500 mg/L), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de penicilina (PS). Foi realizada primeiramente a expansão das células, período no qual foram tripsinizadas ao atingir a 80% de confluência. Durante sua expansão, era necessário no mínimo de três passagens para que as células estivessem prontas para a realização dos experimentos.

4.11. Dose de Inibidores

As células foram plaqueadas na concentração de 15.000 células/ cm² por 24h e sucessivamente expostas a diferentes tipos e concentrações de inibidores em meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) com 10% de SFB e 1% de PS, com objetivo de obter a concentração de inibição capaz de inibir a via de internalização desejada de forma seletiva. As doses testadas foram baseadas naquelas encontradas nas publicações de LI et al,

2022, YADEGARI et al, 2021, QUEVEDO et al, 2021, LIANG et al, 2021, PEREIRA et al, 2020, TIAN et al, 2017, MORIMOTO et al 2016.

Dentre os inibidores que foram utilizados estão a Clorpromazina, inibidora da via endocítica mediada por Clatrina, cujas concentrações testadas foram de 15 μM , 50 μM e 100 μM ; Ginesteína, responsável pela inibição da via mediada por Caveolina, com as concentrações de 150 μM , 200 μM e 300 μM ; MBCD (Methyl- β -cyclodextrin), inibidor do raft lipídico, com as concentrações de 2nM, 5 nM e 10 mM. Sendo que a maioria dos testes confirmou as doses já presentes na literatura, foi optado para seguir com a concentração indicada pela maioria dos artigos que usavam inibidores da Macropinocitose e Fagocitose, Amilorida e Lovastatina respectivamente, correspondente a 100 μM .

O processo de internalização foi verificado com moléculas traçadoras fluorescentes, cada uma tendo como alvo um inibidor. As concentrações foram retiradas dos estudos de EVGENIYA et al, 2021, LIANG et al, 2021, NASAKO et al, 2020, BENCHIMOL, 2020, TYRPAK et al, 2019, HOLOWNIA, 2019, PERISA et al 2016. A transferrina humana foi usada para marcar a Clorpromazina, usada na concentração de 15 $\mu\text{g/mL}$; e Ginesteína, a toxina da cólera marcará o M β CD, na concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$.

4.12. Exposição às Células

Os experimentos de internalização após inibição de vias específicas foram realizados em triplicata, após plaqueamento de 30.000 células por poço em uma placa de 24 poços, sobre lamínulas de vidro. As células foram expostas à concentração dos inibidores escolhida, sendo a concentração de 300 μM para Ginesteína e 10 mM para M β CD, 100 μM para 100 μM para a Clorpromazina, Amilorida e Lovastatina inibidores da Macropinocitose e Fagocitose, respectivamente.

Em seguida, houve a exposição às partículas de hidroxiapatita nanoestruturada em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) com 10% de SFB e 1% de PS e monitoradas após 20 minutos e 2 horas, segundo o protocolo de internalização descrito por Rossi et al, 2017.

4.13. Marcação das Células por Imunofluorescência

Para a visualização das células após a exposição, foi feita a marcação por imunofluorescência, utilizando Alexa Fluor Deep Red 647.

Para tal, as células foram fixadas após a exposição usando paraformaldeído (PFA) a 4%, por 7 minutos, e em seguida lavado com tampão fosfato-salino (PBS) 3 vezes. Em seguida houve a preparação das células para a marcação com a exposição a 500 μl da solução *quencher* NH₄Cl 20 mM por 20 minutos para reduzir o background e em seguida realizada

a permeabilização da membrana celular com 300 µl de TRITON X-100 0,1% por 30 minutos.

Para a marcação, 100 µl da solução de Alexa Fluor 647 diluída em BSA 1% + TRITON X-100 0,1% na solução de trabalho 1:50 foram expostos às células por 1 hora, em câmara úmida previamente preparada. As lamínulas foram então lavadas 3 vezes novamente com PBS para a exposição ao DAPI (NucBlue™ Fixed Cell ReadyProbes™ Reagent) para marcação do núcleo celular.

4.14. Análise dos Resultados

Para a análise da internalização e das vias endocíticas utilizadas pelas células, as imagens obtidas a partir dos experimentos foram analisadas utilizando dois *softwares*: Leica LAS-X e ImageJ.

Os experimentos foram realizados em triplicata, após plaqueamento de 30.000 células por poço, sobre lamínulas de vidro. De cada poço, foram obtidas dez fotos de dez diferentes campos, resultando num total de 30 trinta imagens por experimento para serem analisadas.

A primeira fase da análise foi realizada pelo *software* Leica LAS-X. Através desta plataforma, utilizamos a função de co-localização, que nos permitiu contabilizar apenas a CarboHA fluorescente que se encontrava presente dentro das células, co-localizadas com a marcação com faloidina 647, que marca o citoesqueleto celular. Em seguida, o *software* ImageJ foi utilizado para a normalização dos resultados através do cálculo da área ocupada pelas células em cada campo, para que pudesse ser calculada a média da área ocupada das partículas de Carbo-HA por número de célula.

5. RESULTADOS

5.1. Síntese e Caracterização das Nanopartículas de Hidroxiapatita

A síntese da hidroxiapatita carbonatada nanoestruturada foi realizada pela via úmida, seguindo o protocolo descrito na literatura por Anjos et al, 2019, em três diferentes temperaturas, a saber, 5 °C, 37 °C e 90 °C.

Quando observada a olho nu, o pó resultante da síntese da CarboHA possui diferenças entre as amostras, que se relacionam diretamente a sua temperatura de síntese. Em temperaturas mais baixas, o pó resultante tem aparência de grumos bem pequenos, e à medida que a temperatura aumenta, pode-se visualizar grumos maiores (figura 3). Neste caso, podemos ver que a CarboHA sintetizada a 5°C aparenta ser um pó bem mais fino do que a CarboHA sintetizada a 37°, e a CarboHA sintetizada a 90°C, cujos grumos são consideravelmente maiores. Isso se dá por conta da tendência natural deste biomaterial de se aglomerar.



Figura 3: Hidroxiapatita carbonatada nanoestruturada sintetizada por via úmida em diferentes temperaturas, com aparência semelhante a de um pó branco. (A) Sintetizada a 5°C. (B) Sintetizada a 37°C. (C) Sintetizada a 90°C.

5.1.1. Microscopia Eletrônica de Transmissão

Os diferentes tamanhos dos grãos primários dos cristais, que têm correlação direta com a temperatura de síntese podem ser observados pela técnica de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), onde pode-se ver que, com o aumento da temperatura, também há um aumento na dimensão do grão primário dos cristais formados (Figura 4).

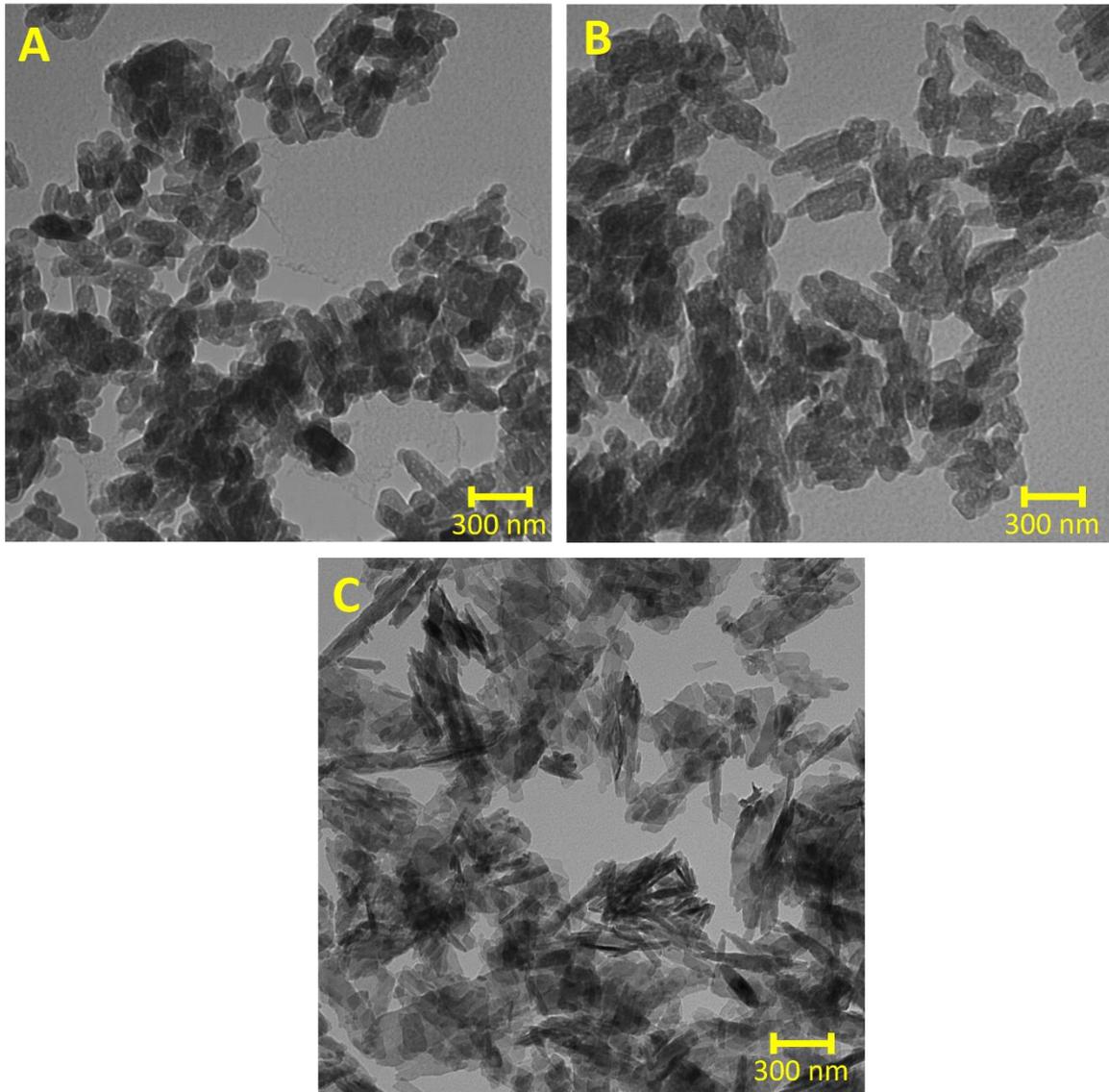


Figura 4: Hidroxiapatita carbonatada nanoestruturada vista através da técnica de microscopia eletrônica de transmissão, onde é evidenciado a diferença de tamanho dos cristais, variando por conta da temperatura de síntese, sendo maiores conforme esta aumenta. (A) Hidroxiapatita carbonatada sintetizada a 5°C; (B) Hidroxiapatita carbonatada sintetizada a 37°C; (C) hidroxiapatita carbonatada sintetizada a 90°C.

5.2. Produção da Hidroxiapatita Carbonatada Fluorescente

Para a produção da nanopartícula de hidroxiapatita carbonatada fluorescente, optou-se pela conjugação com a molécula de Rodamina. Este fluoróforo tem absorção em 555 nm

e emissão em 579 nm e 627 nm. A adsorção da hidroxiapatita carbonatada com Rodamina resultou na mudança da cor da hidroxiapatita, de branca para rosa, mantendo tanto as similaridades quanto as diferenças visuais observadas a olho nu. Os materiais resultantes dessa adsorção podem ser observados na figura 5.

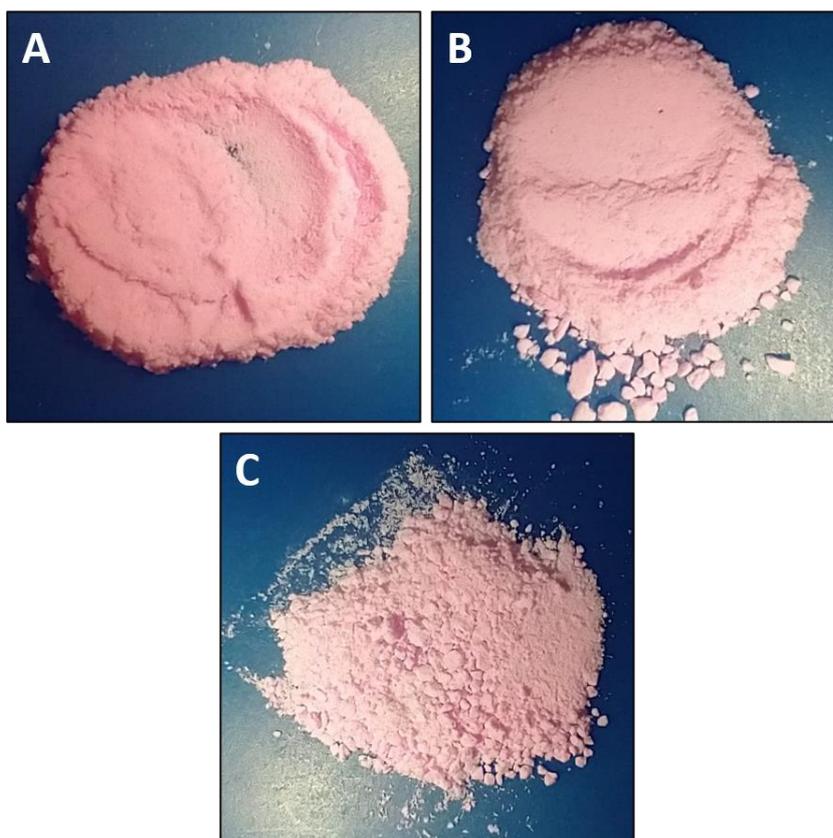


Figura 5: Hidroxiapatita carbonatada nanoestruturada adsorvida com Rodamina. (A) Sintetizada a 5°C; (B) Sintetizada a 37°C; Sintetizada a 90°C.

Para confirmar que a Rodamina foi adsorvida com sucesso pela Hidroxiapatita, foi realizada a medição da absorbância do sobrenadante inicial e de suas três lavagens por Espectrofotômetro. Os gráficos gerados comprovam o sucesso da adsorção, uma vez que o pico de absorbância em 550 nm se torna mais achatado ao longo das lavagens, até ficar praticamente plano, como pode ser observado na figura 6.

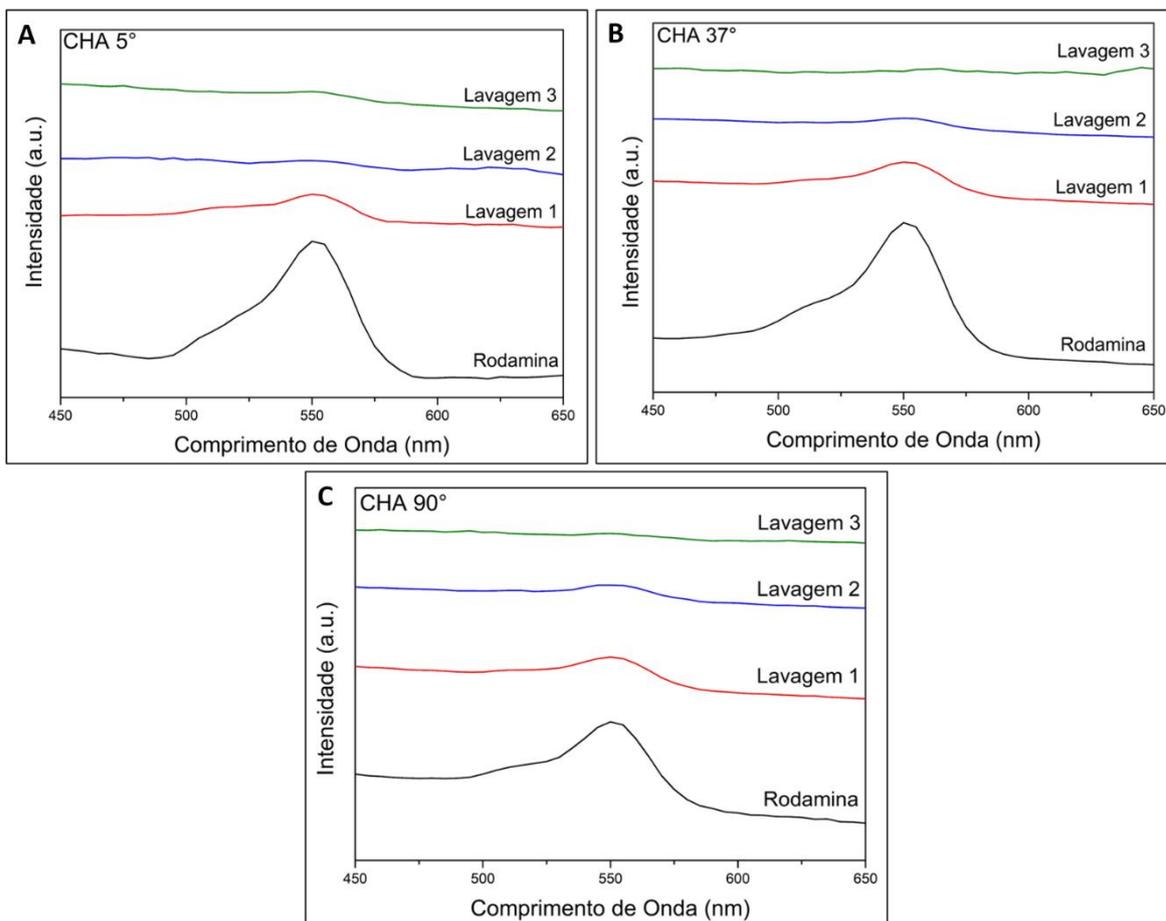


Figura 6: Gráfico gerado após medição da absorvância das três amostras de CarboHA. (A) Hidroxiapatita sintetizada a 5°C; (B) Hidroxiapatita sintetizada a 37°C; (C) Hidroxiapatita sintetizada a 90°C. Em todas as amostras, pode-se observar um pico de absorvância em 550 nm no sobrenadante inicial, que vai diminuindo ao longo das lavagens, até se tornar praticamente inexistente na última lavagem, comprovando a adsorção da Rodamina.

Para confirmar que as nanopartículas estavam fluorescentes após a adsorção da Rodamina, o material foi observado por Microscopia de Fluorescência. Todos os materiais floresceram no comprimento de onda de 546 nm, como mostrado na imagem da hidroxiapatita carbonatadas sintetizada 37 °C na figura 7.

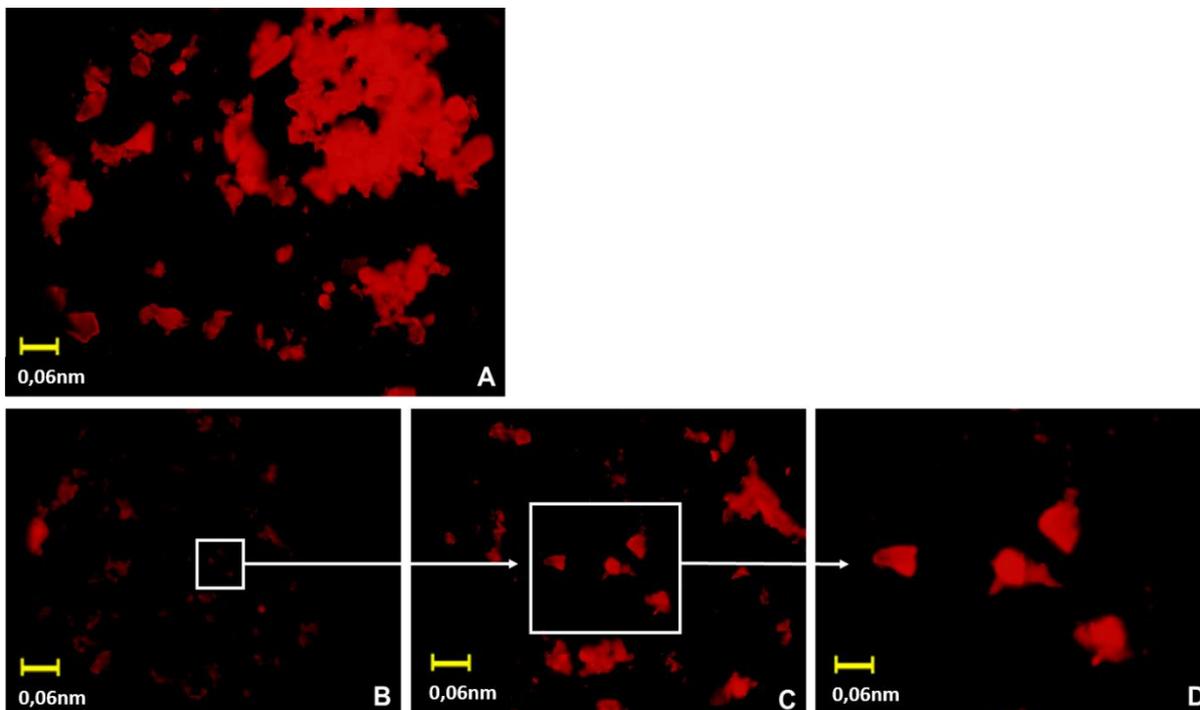


Figura 7: Hidroxiapatita carbonatada sob microscopia de fluorescência, confirmando a adsorção de Rodamina e a sua emissão, no comprimento de onda da cor vermelha. (A) CarboHA sintetizada a 37°C. (B) CarboHA sob aumento de 4 vezes. (C) CHA37 CarboHA sob aumento de 10 vezes. (D) CarboHA sob aumento de 20 vezes.

5.3. Caracterização da Hidroxiapatita Carbonatada Adsorvida com Rodamina Antes e Após a Exposição ao Meio de Cultivo.

Para a caracterização das nanopartículas de hidroxiapatita carbonatada foram realizadas análises de Espectrometria no Infravermelho com Transformada de *Fourier* (*Fourier Transformed Infrared* – FTIR), Potencial Zeta, e Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS).

5.3.1. Difração de raio X

Para conferir a qualidade da síntese e averiguar o grau de cristalinidade dos três materiais foi realizada a caracterização do material puro, após a síntese, pela técnica de difração de raio-x – DRX (figura 8). Os principais picos identificados, a saber, (002), (112), (210), (211), (112), (300), (310), (222) e (213), estão em conformidade com aqueles identificados em espectros publicados na literatura por LARA-OCHOA et al, 2021, confirmando assim a qualidade da síntese da hidroxiapatita em todas as temperaturas. A amostra sintetizada a 5°C mostrou um perfil com picos mais amplos e arredondados, diferentes das amostras sintetizadas a 37°C e 90°C, que apresentam picos mais estreitos, principalmente na síntese de temperatura mais alta.

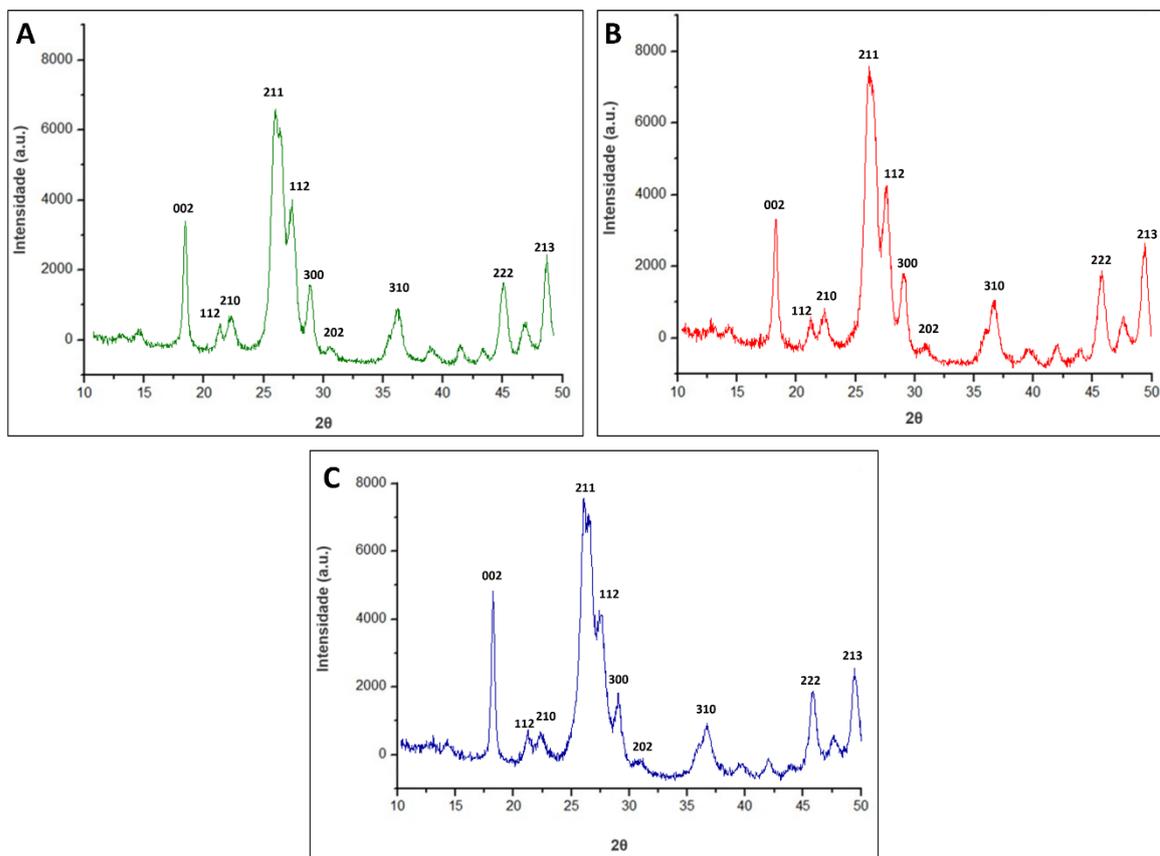


Figura 8: Gráfico de DRX gerados pela leitura da hidroxiapatita carbonatada, confirmando que o biomaterial como uma HA. A similaridade entre as amostras pode ser observada. (A) Hidroxiapatita sintetizada a 5°C; (B) Hidroxiapatita sintetizada a 37°C; (C) Hidroxiapatita sintetizada a 90°C. As três amostras possuem cristalinidade semelhante.

5.3.2. Espectrometria no Infravermelho com Transformada de Fourier – FTIR

Essa técnica foi utilizada para identificação dos grupos funcionais dos biomateriais de CarboHA sintetizados a 5°C, 37°C e 90°C. A análise foi feita após a adsorção a Rodamina, para a comprovação da mesma, bem como afirmar que tal adsorção não alterou a natureza da nanopartícula.

É possível identificar os grupos funcionais hidroxila e fosfato, característicos da hidroxiapatita. As análises evidenciaram a presença do grupo carbonato (CO_3^{2-}), através das bandas de absorção situadas em 875 e 1400-1500 cm^{-1} . Também foi possível verificar a presença de grupos substitucionais, como os grupos carbonato (CO_3^{2-}), nas bandas 1420 cm^{-1} e 1450 cm^{-1} relacionadas à substituição no sítio B, confirmando que os materiais são hidroxiapatitas carbonatadas, e atestando que a natureza do biomaterial não mudou após tal carbonatação. Tais resultados foram comparados com caracterizações da CarboHA pura, obtidas por LARA-OCHOA et al, 2021, confirmando assim o sucesso da carbonatação do biomaterial. A adsorção com a Rodamina gerou diversos picos, cuja maioria ficou sobreposta aos picos gerados pela CarboHA. Dentre estes, podemos observar diversos picos

entre 1300-1500 cm^{-1} região dos grupos carbonato, e picos entre 700-500 cm^{-1} , região da hidroxila, locais onde a Rodamina tem seus picos, conforme esclarecido dos estudos de QIN et al, 2021 e ALI KHAN et al, 2020. Ambos os trabalhos também mostraram que a Rodamina expressa um pico isolado em torno de 3000 cm^{-1} , o que também foi observado nas nossas amostras. Podemos então concluir que a adsorção foi concluída com sucesso, e comprovar que tal adsorção não alterou a natureza na nossa nanopartícula. Os gráficos resultantes podem ser observados na figura 9.

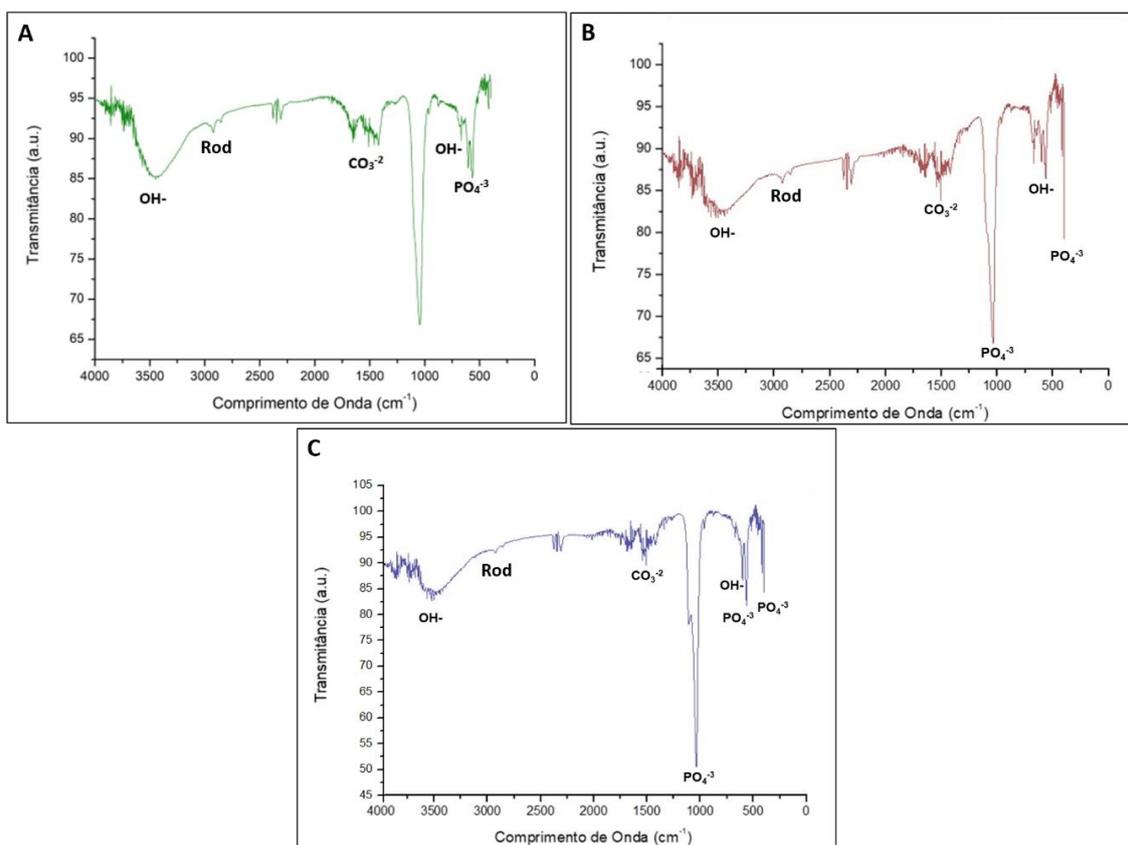


Figura 9: Gráficos resultantes da leitura de FTIR, onde a carbonatação e a não alteração da natureza da CarboHA pela Rodamina foram confirmadas. (A) CarboHA sintetizada a 5°C; (B) CarboHA sintetizada a 37°C; (C) CarboHA sintetizada a 90°C.

5.3.3. Potencial Zeta

O potencial zeta foi realizado para verificar a adsorção de moléculas, principalmente proteínas, da hidroxiapatita carbonatada pura e adsorvida com Rodamina, antes e depois da exposição ao meio de cultura DMEM com 10% de SFB (figura 10). Sabemos que a quantidade de proteínas tende a ser maior nas amostras após exposição ao meio, por conta da adição do soro fetal bovino (SFB) presente no meio de cultura.

A partir das análises, uma tabela foi gerada onde podemos observar que a adsorção de proteínas foi consideravelmente maior na presença de SFB. Ambas as amostras sem adição

de meio, tanto na ausência quanto na presença de Rodamina, demonstraram ter valores parecidos, com um leve aumento nas amostras com Rodamina, pois esse material gera uma nova superfície na qual as proteínas podem ser adsorvidas.

Nas amostras analisadas em água, sem Rodamina, o potencial de adsorção de proteínas é -11,4 mVolts, -12,3 mVolts e -13,2 mVolts para CarboHA 5°C, CarboHA 37°C e CarboHA 90°C, respectivamente. Esses números sofrem uma leve alteração quando comparados com a análise das amostras com Rodamina, subindo o potencial para -19,5 mVolts, -19,9 mVolts e -17,6 mVolts, o que se dá por conta da presença deste material na superfície da CarboHA. Já nas amostras analisadas na presença de DMEM, houve grande adsorção de proteínas, conforme o esperado, também apresentando um aumento similar nas amostras adsorvidas com Rodamina. Nas amostras sem Rodamina, o potencial foi de -28,1 mVolts, -29,7 mVolts e -28,1 mVolts para CarboHA 5°C, CarboHA 37°C e CarboHA 90°C, respectivamente. Semelhantemente ao que foi observado nas amostras sem DMEM, aqui também houve um aumento de adsorção proteica nas amostras com Rodamina, cujos potenciais aumentaram para -35,6 mVolts, -37,2 mVolts e -37,3 mVolts.

POTENCIAL ZETA (mV)		
Amostras	Água	DMEM 10% SFB
CarboHA 5°C	-11,4 ± 1,8	-28,1 ± 2,3
CarboHA 5°C +ROD	-19,5 ± 1,9	-35,6 ± 2,8
CarboHA 37°C	-12,3 ± 1,2	-29,7 ± 1,6
CarboHA 37°C +ROD	-19,9 ± 2,1	-37,2 ± 2,2
CarboHA 90°C	-13,2 ± 1,3	-28,1 ± 1,5
CarboHA 90°C +ROD	-17,6 ± 2,3	-37,3 ± 2,1

Figura 10: Tabela resultantes da análise de potencial zeta, onde há comparação entre as amostras sintetizadas sob mesma temperatura quanto a adsorção de proteínas antes e depois de exposição ao meio de cultura com SFB, estamos as amostras puras e já adsorvidas com Rodamina. Em todos os casos, houve grande aumento de potencial nas amostras ao meio de cultura, e, em ambos os casos, a Rodamina causou um leve aumento do potencial.

5.3.4. Espelhamento Dinâmico da Luz – DLS

A hidroxiapatita carbonatada é um material tem grande tendência de aglomeração (figura 11).

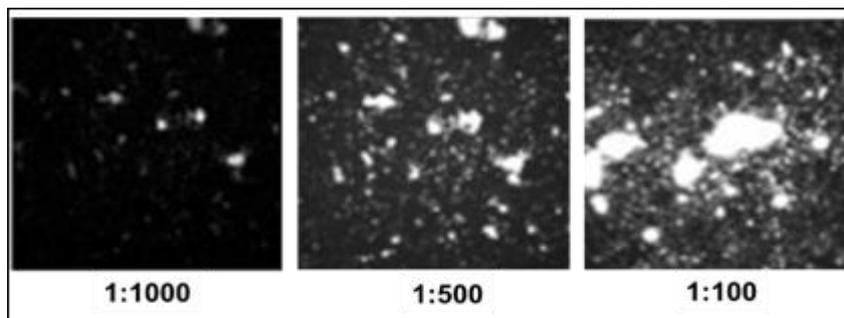


Figura 11: Hidroxiapatita carbonatada em meio de cultura DMEM, nas diluições (da esquerda para a direita) 1:1000, 1:500 e 1:100, visualizada por microscopia confocal, onde sua aglomeração pode ser observada.

Por conta desta tendência de aglomeração do biomaterial, optamos por criar um protocolo de dispersão por ultrasonicação para que os aglomerados sejam dispersos antes da exposição às células. A sonicação foi de 15 minutos, com 99% da potência de 750W, com a concentração da hidroxiapatita carbonatada a 1mg/ml. Para os tamanhos dos aglomerados dos cristais de hidroxiapatita carbonatada foram, portanto, realizadas análises por DLS.

Os resultados mostraram grande diminuição de tamanho nos aglomerados, que tiveram seu diâmetro hidrodinâmico médio que está aproximadamente entre 2μ e 3μ (figura 12).

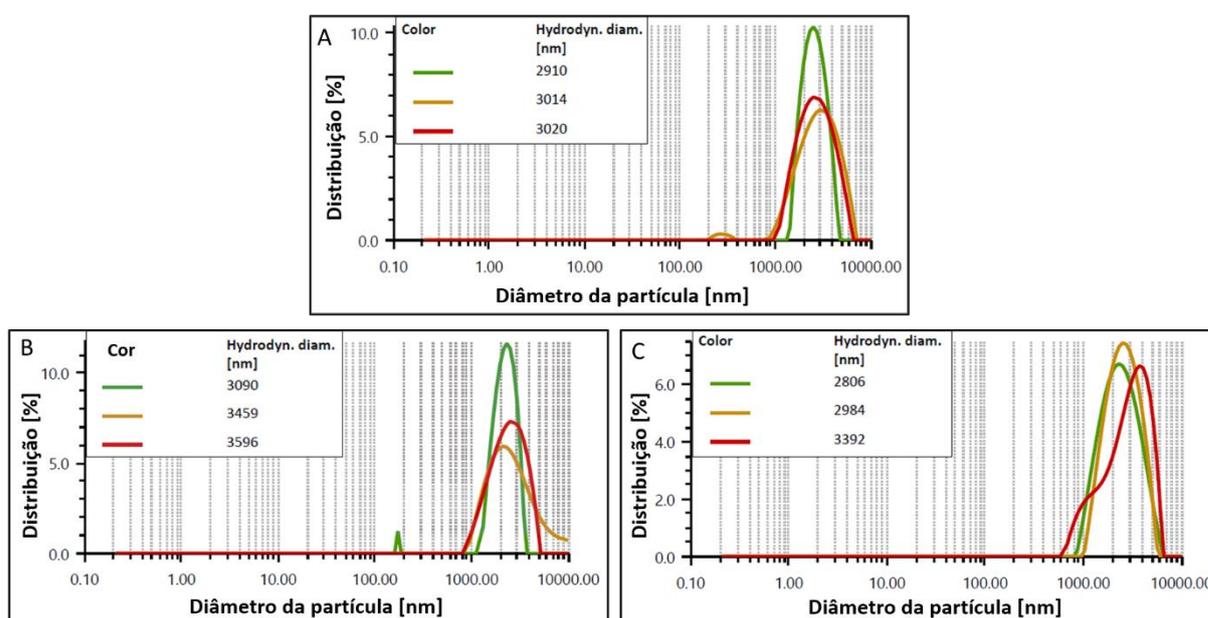


Figura 12: Gráficos gerados pela leitura de DLS. (A) Hidroxiapatita carbonatada sintetizada a 5°C com preparação e diluição em meio de cultura DMEM, com diâmetro hidrodinâmico médio de $2,5\mu$ (2.500nm); (B) Hidroxiapatita carbonatada sintetizada a 37°C com preparação e diluição em meio de cultura DMEM, com diâmetro hidrodinâmico médio de $2,5\mu$ (2.500nm); (C) Hidroxiapatita carbonatada sintetizada a 90°C com preparação e diluição em meio de cultura DMEM, com diâmetro hidrodinâmico médio de 2μ (2.000nm).

5.4. Ensaio de internalização e avaliação da citotoxicidade da hidroxiapatita carbonatada nanoestruturada

Os inibidores testados foram a Clorpromazina e Ginesteína que inibem a internalização do traçador transferrina, internalizada pela endocitose mediada por clatrina e caveolina, respectivamente, e Methyl-b-cyclodextrin, que inibe a internalização do traçador toxina do cólera pela via do raft lipídico. Todos os estudos mostraram uma inibição dose-dependente de cada via de internalização, particularmente a Clorpromazina e Ginesteína mostraram uma inibição já eficiente na primeira concentração testada de 15 μM para Clorpromazina e 50 μM para Ginesteína, que realizou uma inibição de cerca de 50% do traçador utilizado. Nas diluições sucessivas de Clorpromazina 50 μM e 200 μM para Ginesteína aumenta a eficiência de inibição até mostrar apenas 25% da internalização do traçador. Esta internalização diminui mais na concentração de inibidor de 100 μM para Clorpromazina e 300 μM para Ginesteína que zeram a internalização do traçador.

No caso do inibidor de raft lipídico, o Methyl-b-cyclodextrin a inibição da internalização do traçador toxina do cólera é ainda mais eficiente, pois já na primeira concentração testada de 2 mM, realizando uma inibição de 80% da internalização do traçador. A segunda concentração, de 5 mM, reduziu ainda mais a internalização, com 85% de inibição. A última e mais alta concentração, de 10 mM zerou a internalização do traçador.

Desta forma, foram identificadas as concentrações de inibição mais eficientes como 100 μM para Clorpromazina (endocitose por clatrina), 300 μM para Ginesteína (endocitose por caveolina) e 10mM para Methyl-b-cyclodextrin (raft lipídico).

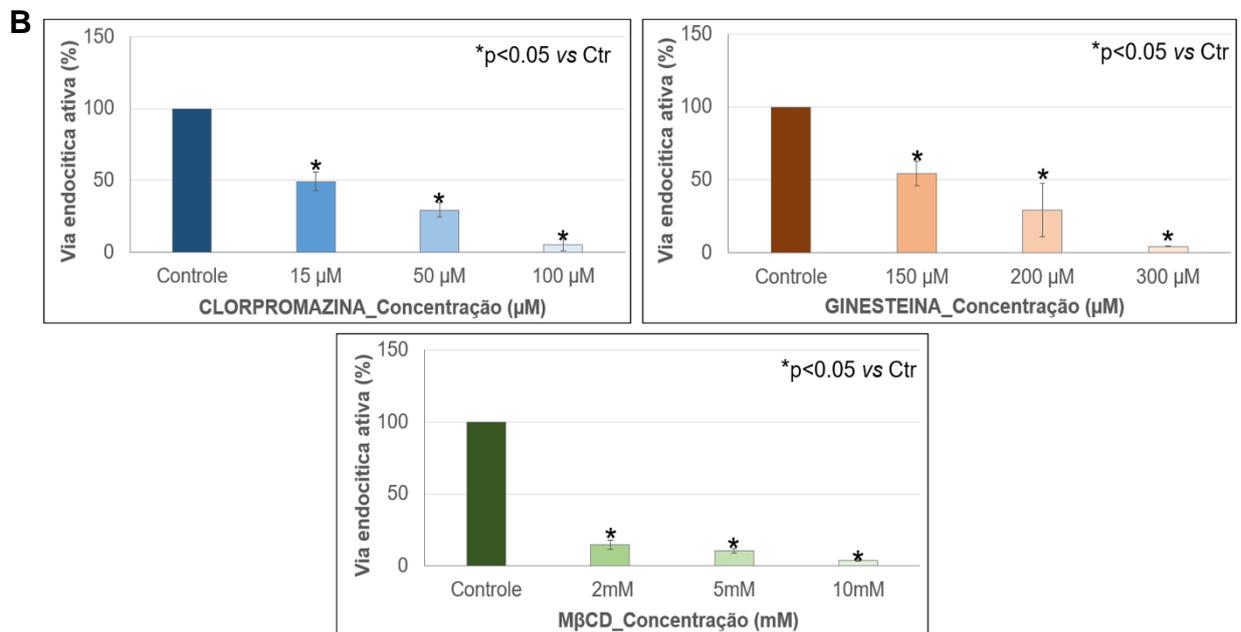
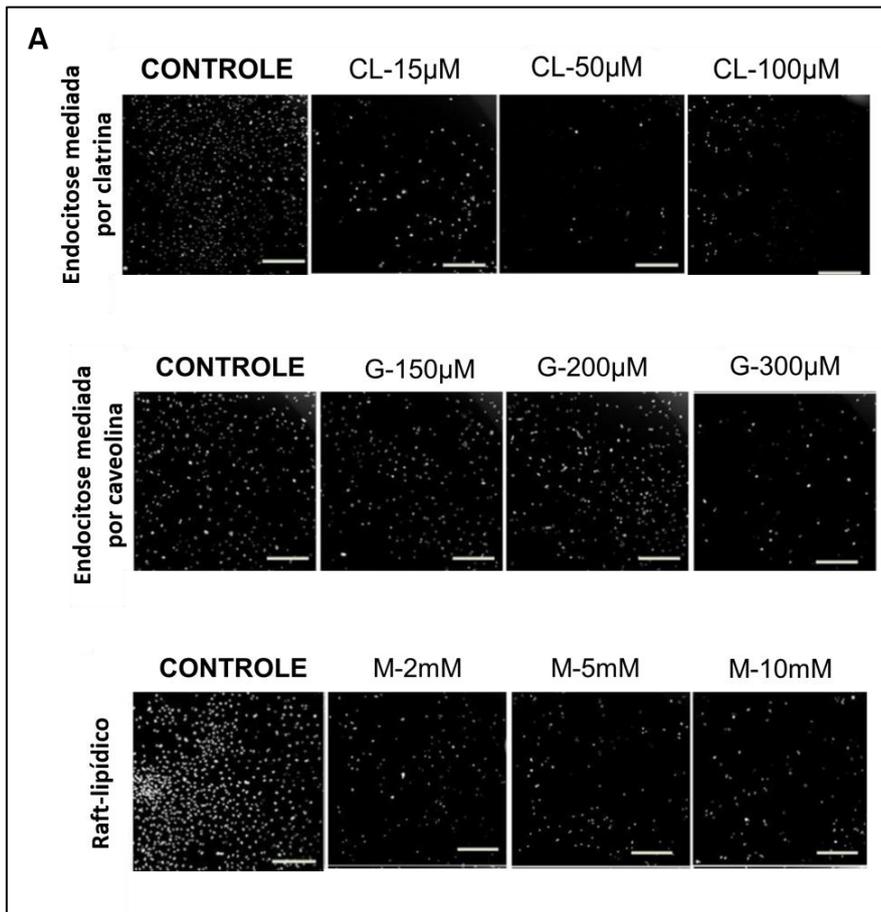


Figura 13: Visualização das doses testadas para inibição das vias endocíticas e representação gráfica quantitativa das vias endocíticas. (A) Vias endocíticas visualizadas sob microscopia confocal a laser, onde podemos observar a ação das diferentes concentrações de inibidores usados, com maior ação de bloqueio das vias conforme sua concentração aumenta. As inibições são, respectivamente, por Clorpromazina, concentrações 15 μ M, 50 μ M e 100 μ M. A primeira concentração reduziu a endocitose em 50%, a segunda em 75%, e a terceira teve inibição de cerca de 100%; Ginesteína, concentrações 150 μ M, 200 μ M e 300 μ M. A primeira concentração reduziu a endocitose em 50%, a segunda em 75%, e a terceira teve inibição de cerca de 100%, e Methyl- β -cyclodextrin, concentrações 2 mM, 5 mM e 100 mM. A primeira concentração reduziu drasticamente a endocitose, com apenas 20% da via ativa, a segunda dose permitiu apenas 15% da via ativa, e a terceira dose inibiu completamente (B) Gráficos demonstrando de maneira quantitativa as inibições resultantes das diferentes concentrações utilizadas.

5.5. ANÁLISE DA INTERNALIZAÇÃO

A primeira via endocítica a ser analisada foi a endocitose mediada por Clatrina, cujos resultados podem ser observados na figura 14. Na ausência de inibidor, todas as carbohidroxiapatitas foram internalizadas. Uma vez que a via é inibida, podemos observar que o percentual de internalização da CarboHA sintetizada a 5°C foi extremamente baixo, correspondendo a apenas 16% da quantidade internalizada sem a presença do inibidor. Já a CarboHA 37°C teve pouco mais da metade de sua internalização inibida na presença do inibidor, chegando a 54% de internalização. A CarboHA 90°C não teve sua internalização grandemente alterada pela presença do inibidor, contando com pouco menos de 90% de internalização.

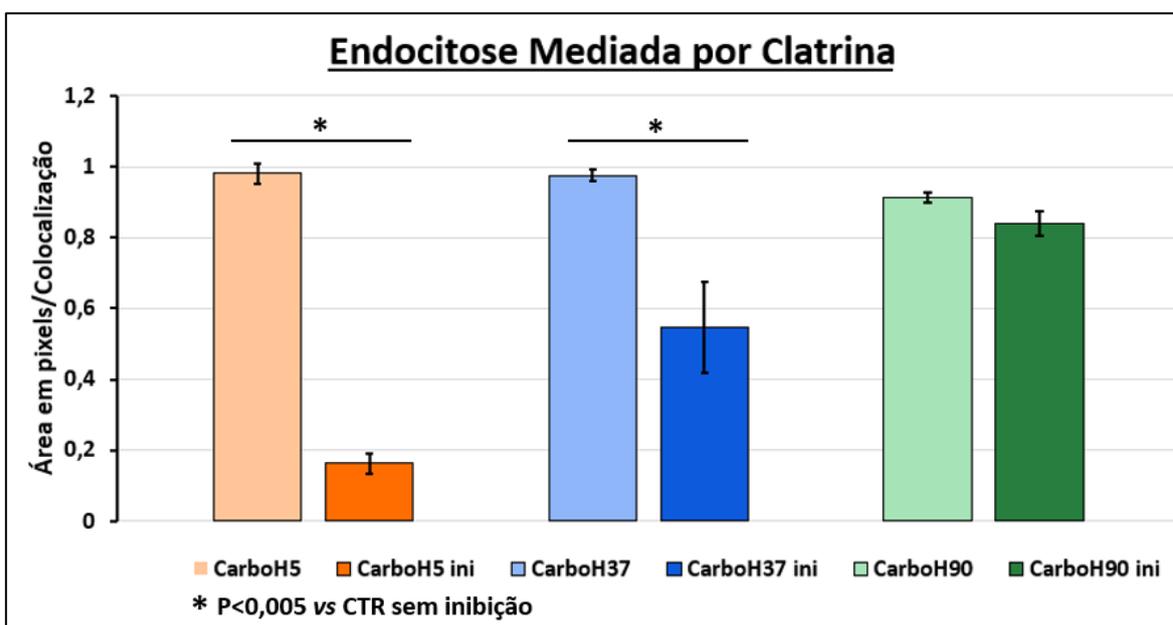


Figura 14: Gráfico demonstrando a porcentagem de internalização da Hidroxiapatita carbonatada quando a endocitose mediada por Clatrina é inibida. A CarboHA 5°C teve sua internalização grandemente bloqueada, com apenas 16% das nanopartículas sendo internalizadas pelas células; a CarboHA 37°C teve um percentual de 54% de internalização; a CarboHA 90°C não sofreu grandes alterações, com uma internalização quase completa, contando com 83% de internalização.

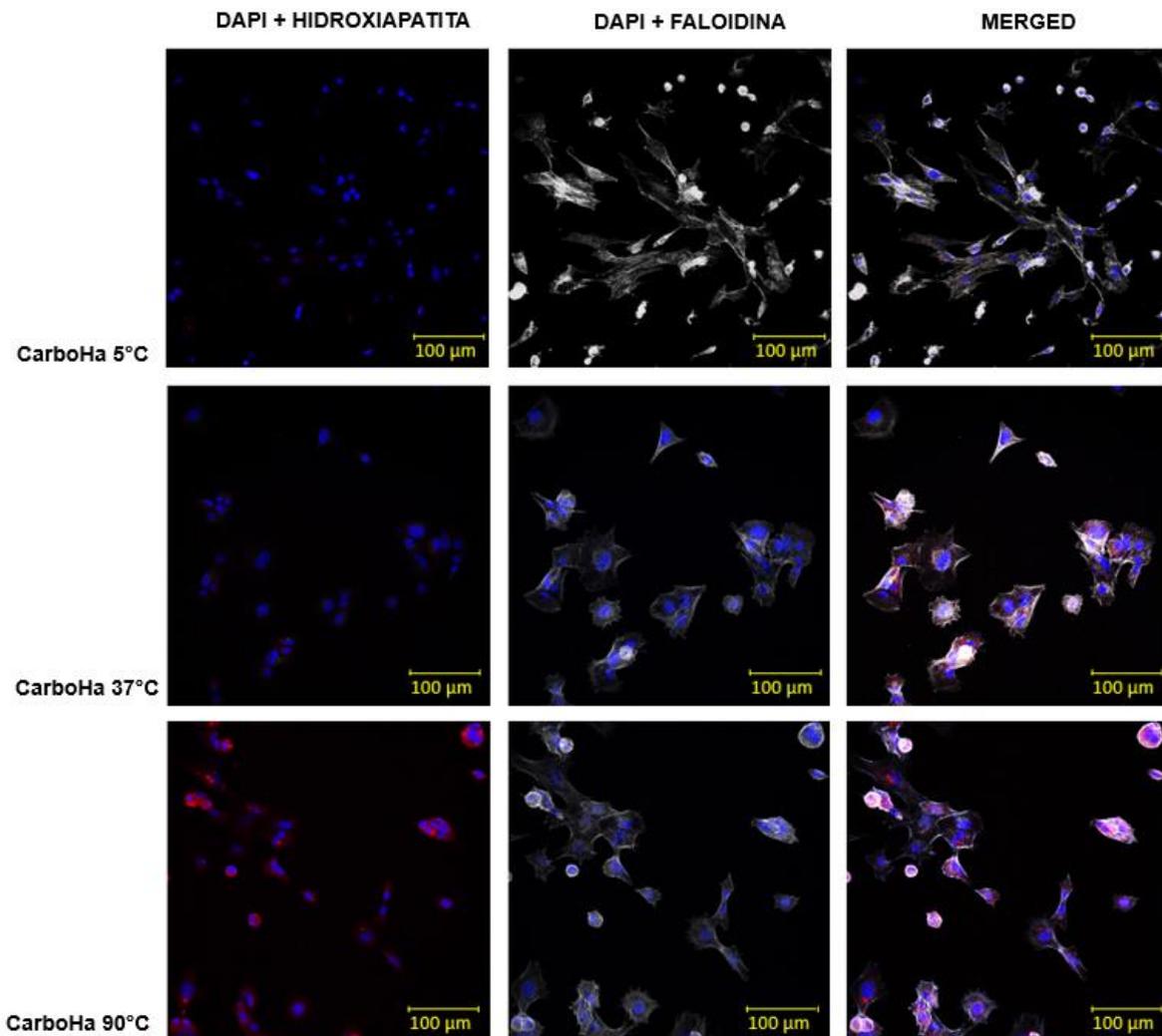


Figura 15: *Imagens representativas dos experimentos de inibição da via mediada por Clatrina. No primeiro bloco de imagens apenas o núcleo celular e a Rodamina, marcador da hidroxiapatita pode ser visto. Desta forma, fica claro a diferença de internalização entre as diferentes temperaturas de síntese. Na CarboHA 5 não há CarboHA, uma vez a via preferida por esta condição foi bloqueada, ao passo que na CarboHA 90, podemos ver uma grande quantidade de Hidroxiapatita que foi internalizada pelas células.*

Na endocitose mediada por Caveolina os resultados foram semelhantes aos apresentados pela endocitose mediada por Clatrina, que podem ser vistos na figura 16. Sem a exposição ao inibidor, todas as carbo-hidroxiapatitas foram novamente internalizadas. Com a inibição da via, a taxa de internalização da CarboHA sintetizada a 5°C foi significativamente reduzida, correspondendo apenas a 20% da quantidade internalizada na ausência do inibidor. Quanto à CarboHA a 37°C, mais da metade de sua internalização foi inibida na presença do inibidor, resultando em uma taxa de internalização de 40% em comparação com a condição sem inibição. Também, semelhantemente à endocitose mediada por Clatrina, a CarboHA a 90°C não apresentou uma alteração significativa em sua internalização na presença do inibidor, mantendo-se com 88% de internalização.

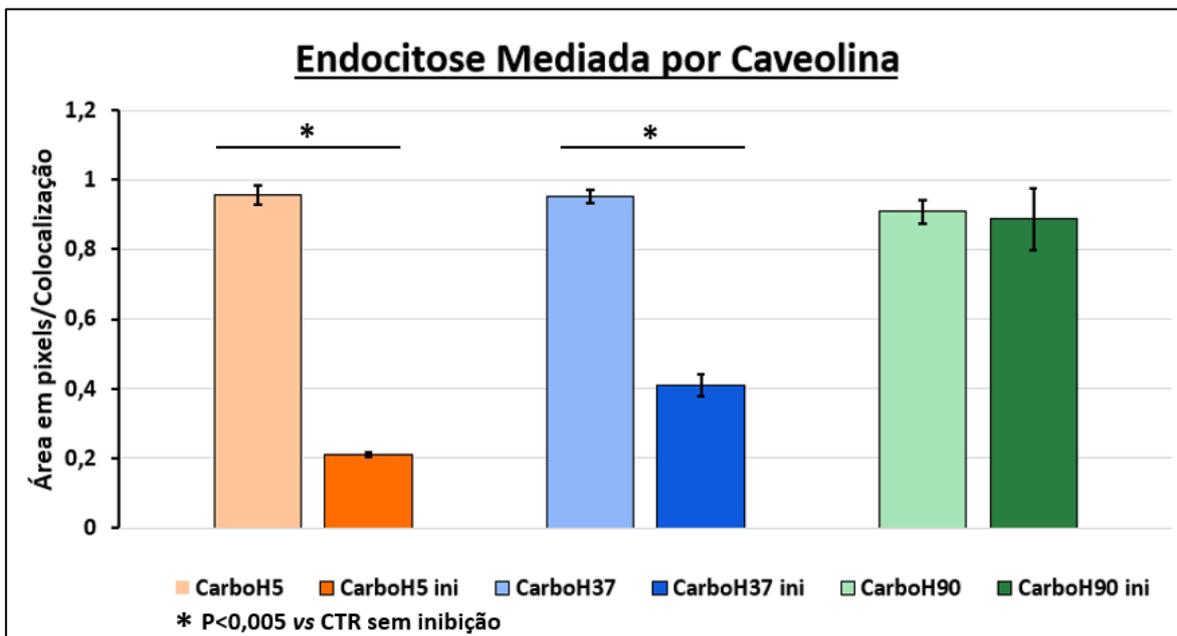


Figura 16: Gráfico demonstrando a porcentagem de internalização da Hidroxiapatita carbonatada quando a endocitose mediada por Caveolina é inibida. A CarboHA 5°C teve sua internalização grandemente bloqueada, com apenas 20% das nanopartículas sendo internalizadas pelas células; a CarboHA 37°C teve um percentual de 40% de internalização; a CarboHA 90°C não sofreu grandes alterações, com uma internalização quase completa, contando com pouco menos que 90% de internalização.

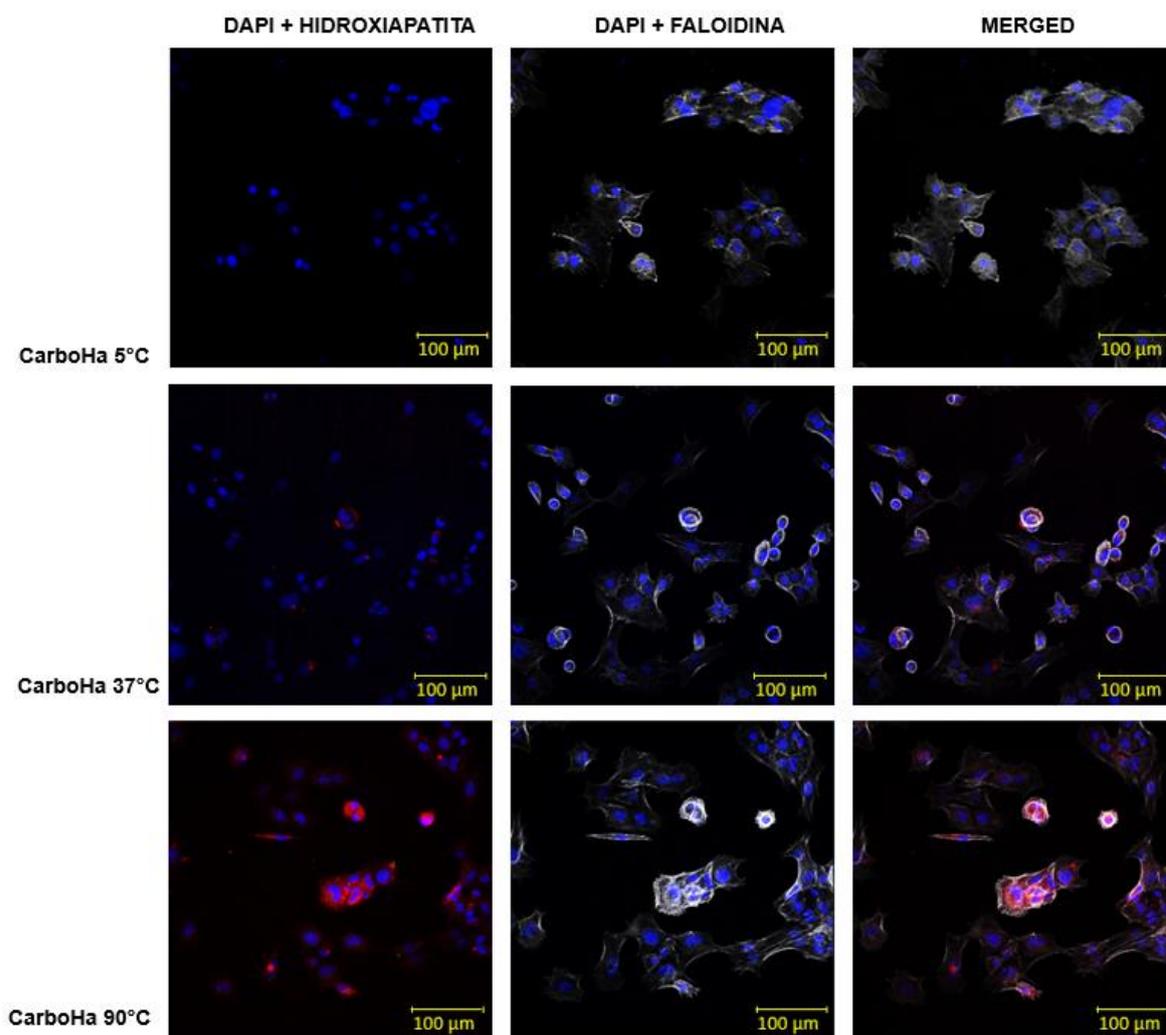


Figura 17: *Imagens representativas dos experimentos de inibição da via mediada por Caveolina. No primeiro bloco de imagens apenas o núcleo celular e a Rodamina, marcador da hidroxiapatita pode ser visto. Desta forma, fica claro a diferença de internalização entre as diferentes temperaturas de síntese. Na CarboHA 5 não há CarboHA, uma vez a via preferida por esta condição foi bloqueada, ao passo que na CarboHA 90, podemos ver uma grande quantidade de Hidroxiapatita que foi internalizada pelas células. Os resultados são semelhantes aos da inibição da via mediado por Clatrina.*

Prosseguimos então para a próxima via de internalização, o raft-lipídico cujos resultados se encontram na figura 18. A internalização da CarboHA não teve grandes alterações quando esta via foi inibida, independente das diferentes temperaturas de síntese. As três amostras de CarboHA ficaram com seu percentual de internalização entre 90 e 100%.

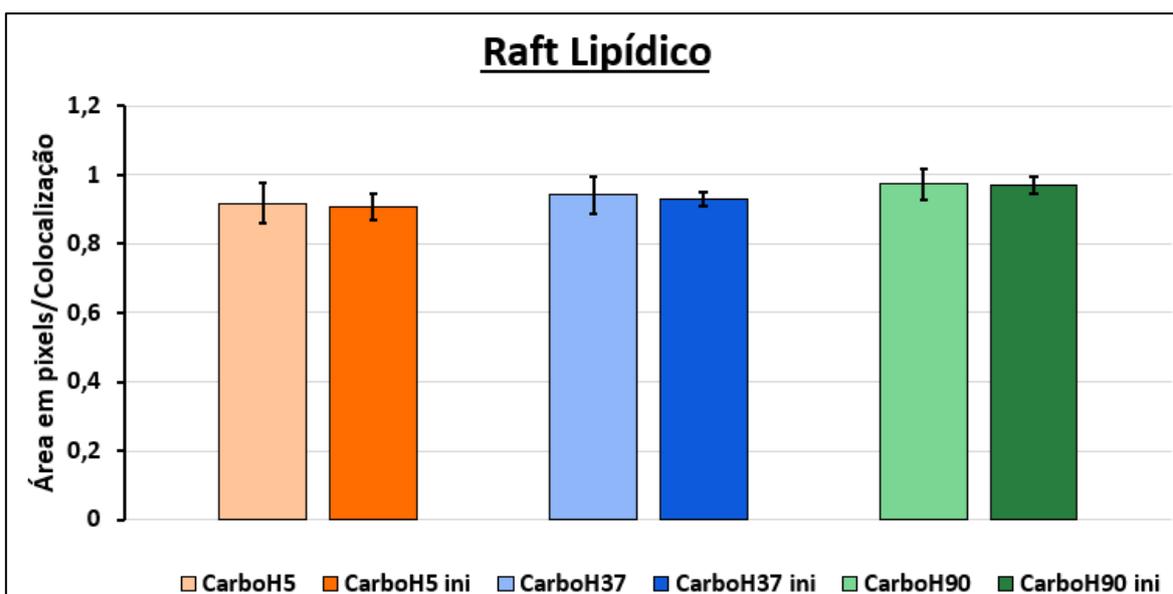


Figura 18: *Gráfico demonstrando a porcentagem de internalização da Hidroxiapatita carbonatada quando a endocitose por raft-lipídico é inibida. Não houve alteração considerável quanto a internalização de nenhuma das três temperaturas de síntese, com seu percentual de internalização variando entre 90 e 100%.*

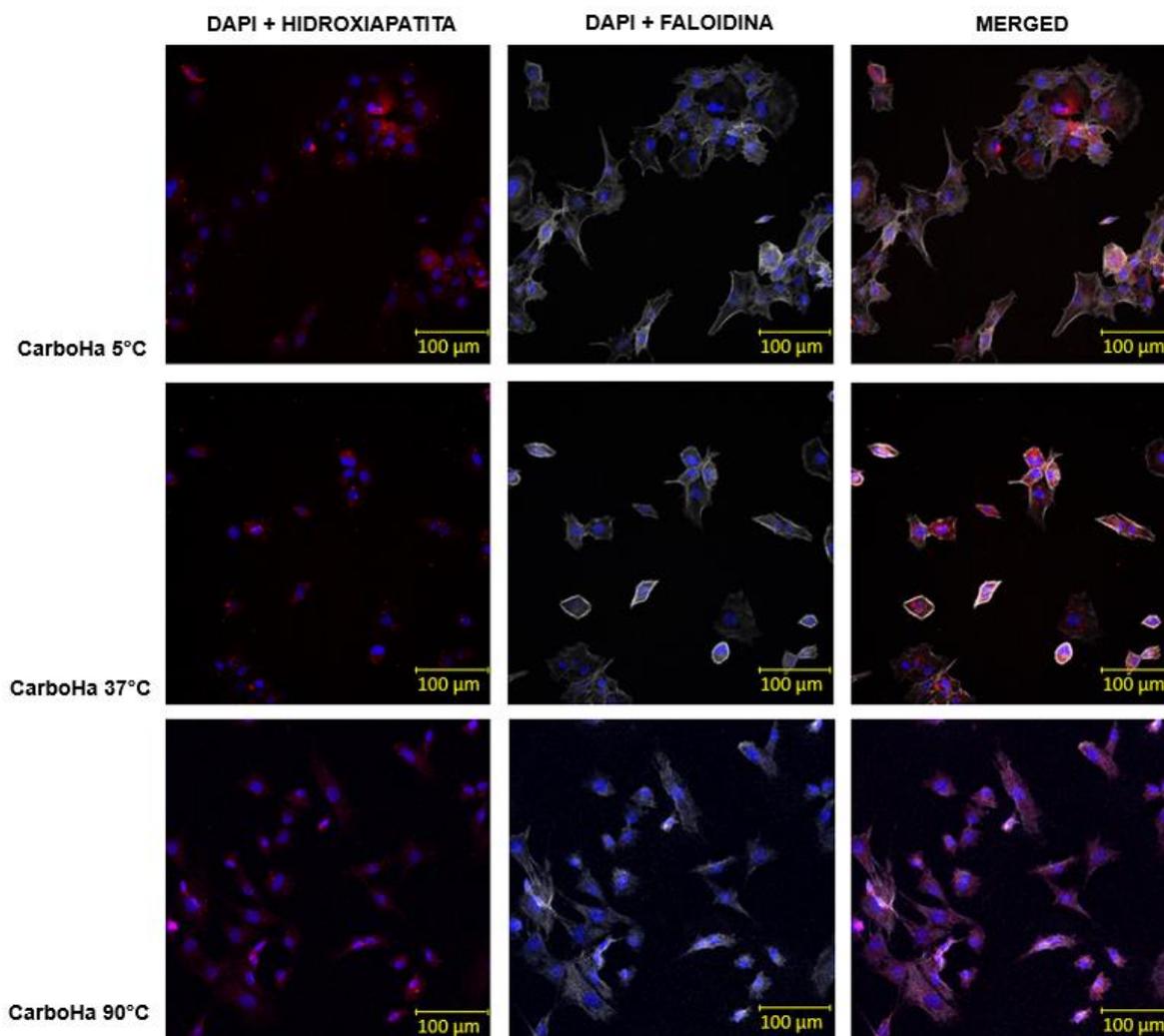


Figura 19: Imagens representativas dos experimentos de inibição da via por raft-lipídico. No primeiro bloco de imagens apenas o núcleo celular e a Rodamina, marcador da hidroxiapatita pode ser visto. Esta via mostrou-se não participante da internalização da CarboHA, pois sua inibição não impediu a internalização de nenhuma das três condições de CarboHA.

A Macropinocitose foi analisada em seguida, e seus resultados estão presentes na figura 20. Com a inibição desta via endocítica, a internalização da CarboHA 5°C teve pouca inibição, contando com 83% de internalização. A CarboHA a 37°C teve metade de sua internalização bloqueada, resultando em pouco mais de 50% de internalização quando comparada à condição com o inibidor. Por fim, a maior inibição se obteve na CarboHA 90°C, cuja inibição foi consideravelmente alterada, somando apenas 30% de internalização quando em presença do inibidor.

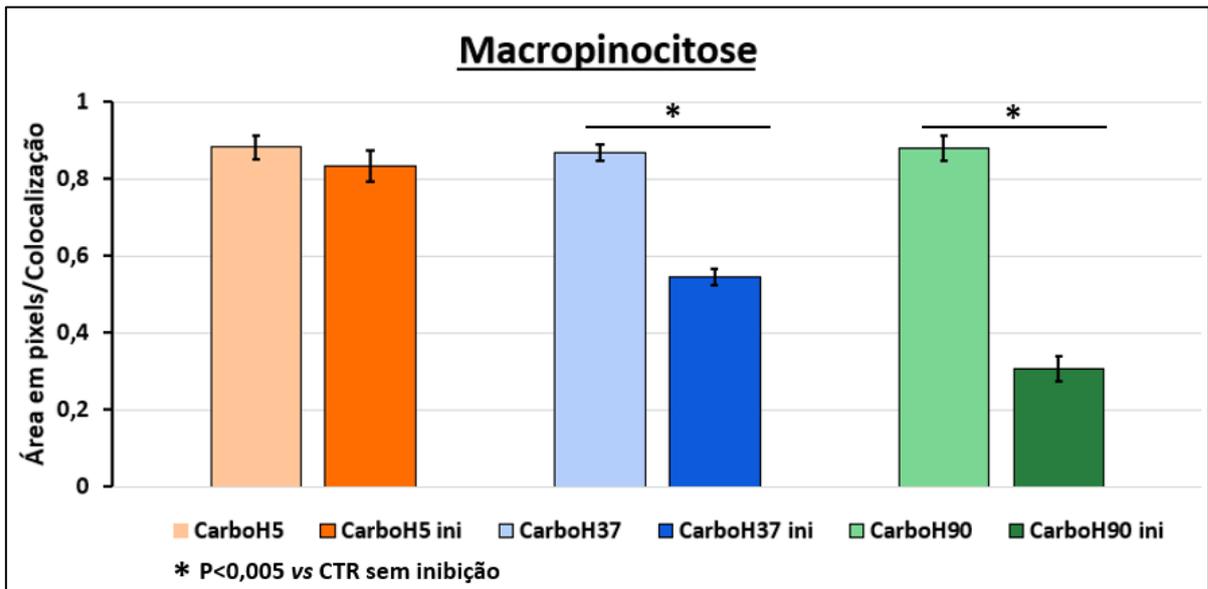


Figura 20: Gráfico demonstrando a porcentagem de internalização da Hidroxiapatita carbonatada quando a Macropinocitose é inibida. A CarboHA 5°C não apresentou alterações consideráveis na sua internalização, sendo esta de cerca de 80%; a CarboHA 37°C teve um percentual de 54% de internalização; a CarboHA 90°C sofreu grandes alterações na sua internalização, tendo esta fortemente bloqueada e uma taxa de apenas 30% de internalização.

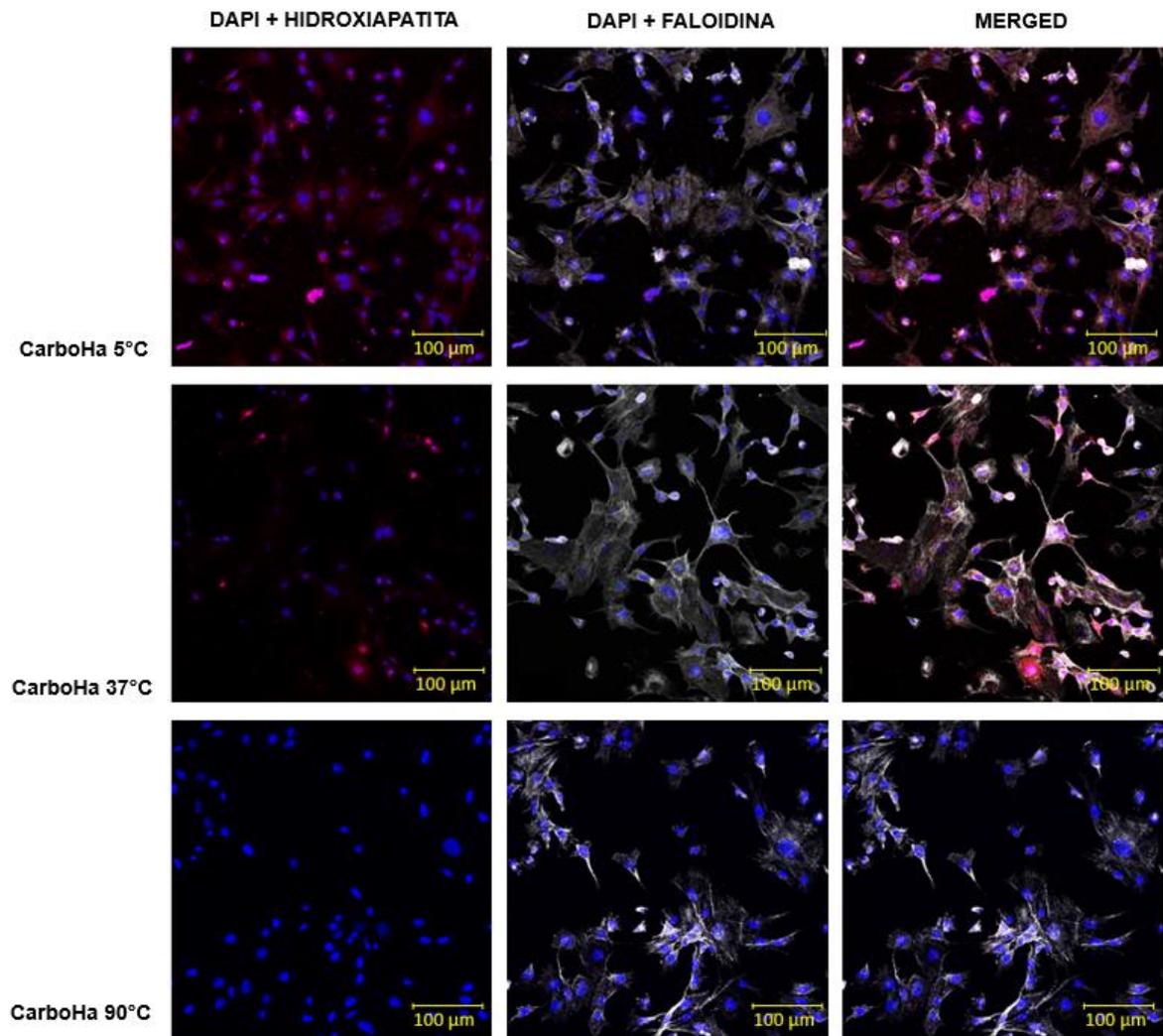


Figura 21: *Imagens representativas dos experimentos de inibição da via por Macropinocitose. No primeiro bloco de imagens apenas o núcleo celular e a Rodamina, marcador da hidroxiapatita pode ser visto. Desta forma, fica claro a diferença de internalização entre as diferentes temperaturas de síntese. Na CarboHA 5 podemos ver uma grande quantidade de Hidroxiapatita que foi internalizada pelas células, ao passo que na CarboHA 90, não há CarboHA presente.*

A última via a ser analisada foi a Fagocitose, cujos resultados podem ser vistos na figura 22. Ao bloquear essa via endocítica, a internalização da CarboHA a 5°C foi apenas levemente inibida, com uma taxa de internalização de 87. A internalização da CarboHA a 37°C foi impedida em 50%, resultando em uma taxa de internalização de 54% em comparação com a condição com o inibidor. Por fim, a CarboHA a 90°C apresentou a maior inibição, com uma redução significativa, totalizando apenas 27% de internalização na presença do inibidor.

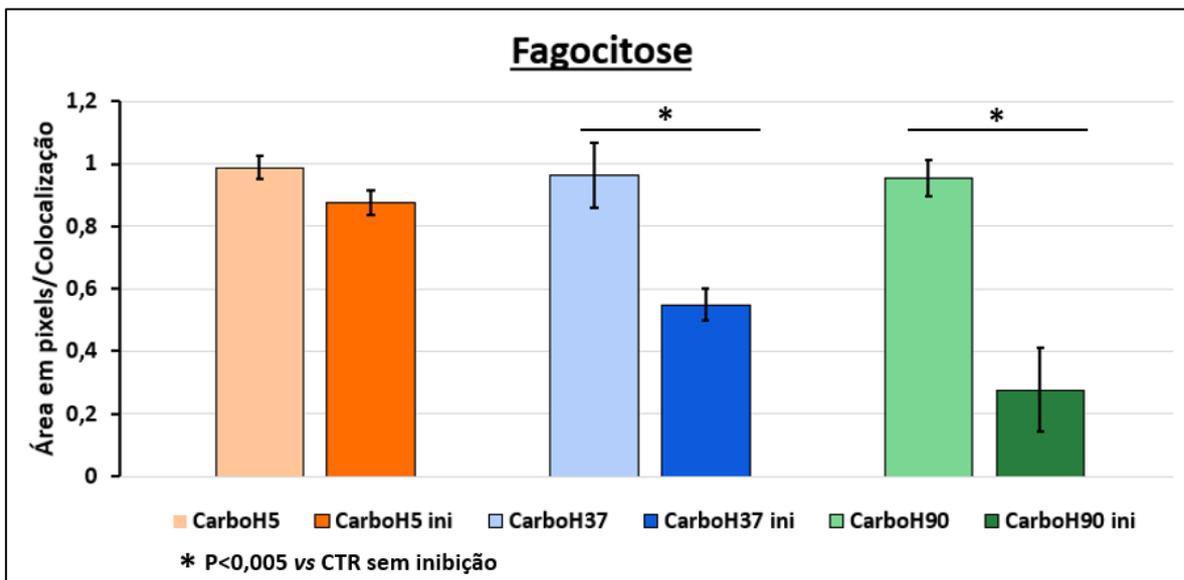


Figura 22: Gráfico demonstrando a porcentagem de internalização da Hidroxiapatita carbonatada quando a Fagocitose é inibida. A CarboHA 5°C não apresentou alterações consideráveis na sua internalização, sendo esta de 87%; a CarboHA 37°C teve um percentual de 54% de internalização; a CarboHA 90°C sofreu grandes alterações na sua internalização, tendo esta fortemente bloqueada e uma taxa de apenas 27% de internalização.

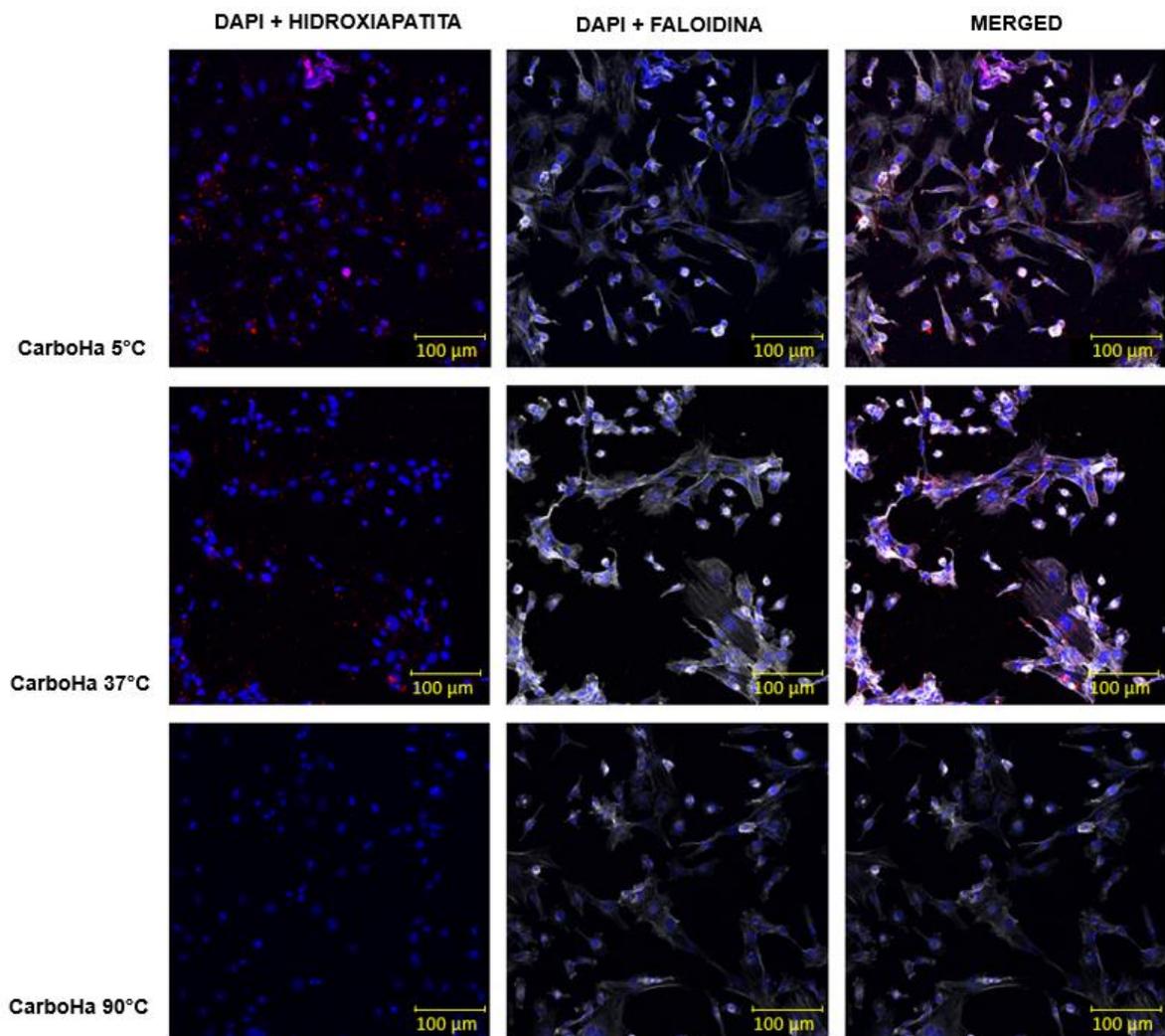


Figura 23: Imagens representativas dos experimentos de inibição da via por Fagocitose. No primeiro bloco de imagens apenas o núcleo celular e a Rodamina, marcador da hidroxiapatita pode ser visto. Desta forma,

fica claro a diferença de internalização entre as diferentes temperaturas de síntese. Na CarboHA 5 podemos ver uma grande quantidade de Hidroxiapatita que foi internalizada pelas células, ao passo que na CarboHA 90, não há CarboHA presente. Os resultados são semelhantes aos obtidos pela Macropinocitose.

Os resultados obtidos corroboram a existência de uma correlação direta entre a temperatura de síntese, e provavelmente o tamanho dos cristais, e a via pela qual são internalizados. Esta distinção torna-se evidente ao ser observada no gráfico da Figura 24.

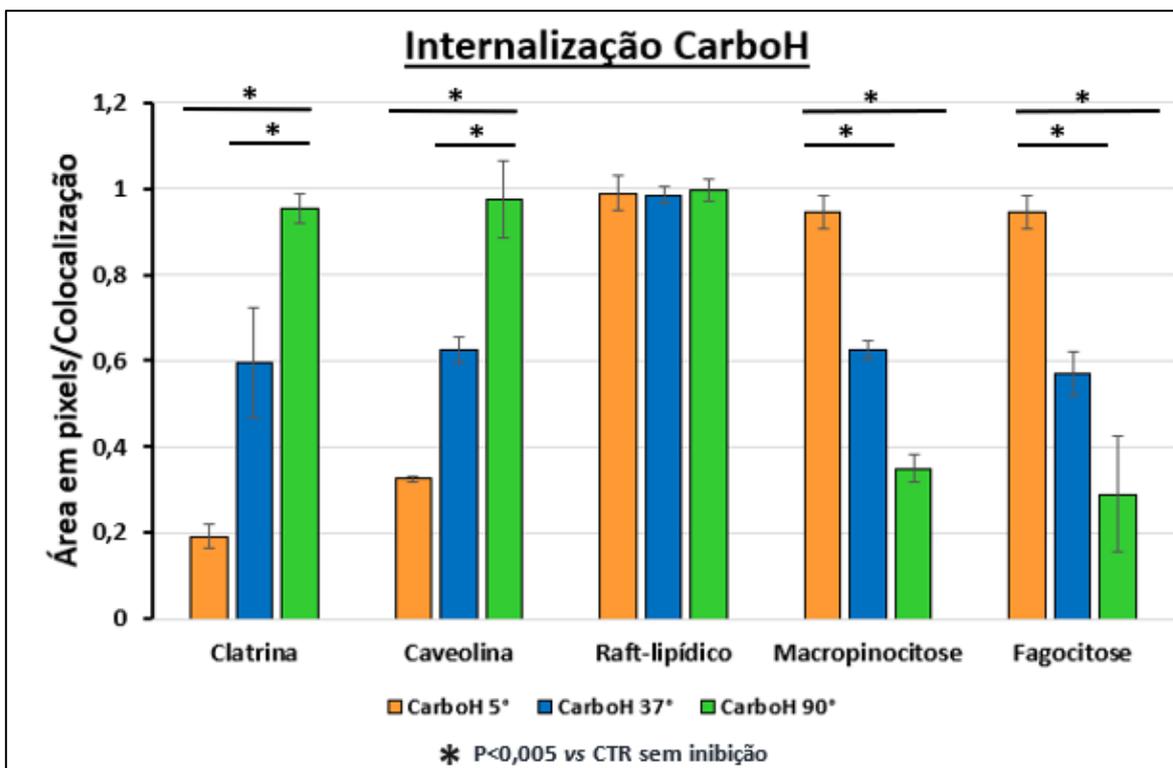


Figura 24: Gráficos comparativos das diferentes vias endocíticas, onde fica claro que a temperatura de síntese tem influência direta quanto a via endocítica pela qual esse será internalizado. A CarboHA 5°C, de tamanho menor, tem sua internalização inibida quando as vias da Clatrina e Caveolina são fechadas; a CarboHA 37°C apresenta apenas metade da sua internalização afetada; a CarboHA 90°C teve sua taxa de internalização diminuída nas vias por Macropinocitose e Fagocitose. Dentre as cinco vias, a única que não apresentou qualquer alteração foi a de raft-lipídico, indicando que está não é usada para a internalização da CarboHA.

6. DISCUSSÃO

A síntese da hidroxiapatita carbonatada nanoestruturada (CarboHA) foi realizada pela via úmida, conforme o protocolo descrito na literatura por ANJOS et al, 2019, em três diferentes temperaturas, a saber, 5 °C, 37 °C e 90 °C. A escolha da incorporação de carbonato foi feita pois a presença deste grupo aumenta a solubilidade da nanopartícula, estimulando a osteointegração (ANJOS et al, 2019). A carbonatação da hidroxiapatita também se deu por via úmida. A síntese da hidroxiapatita nas diferentes temperaturas resultou em materiais com aparência similar de pó de cor branca com um espectro de DRX compatível com os da HA encontrados na estudos publicados literatura (LARA-OCHOA et al, 2021), mas que, dependendo da sua temperatura de síntese – 5 °C, 37 °C, 90 °C – apresenta tamanhos granulométricos levemente diferentes visíveis a olho nu (figura 2) e tamanho de grãos primários e cristalinidade diretamente proporcionais com a temperatura de síntese. A adsorção com Rodamina modificou a cor do pó, que passou de branco para um tom de rosa, porém não houve qualquer alteração da natureza da nanopartícula, como pode ser comprovado na figura 8. É importante ressaltar que a Rodamina não é adsorvida a totalidade da superfície das nanopartículas, e sendo assim, sabemos que a células de fato tem seu contato com a CarboHA, e sua internalização não foi afetada pela Rodamina.

Os resultados obtidos no difratograma apresentam bandas largas e picos com pouca definição, o que corrobora a natureza pouco cristalina e nanométrica da CarboHA, pois este é o perfil característico deste biomaterial quando sintetizado em baixas temperaturas (GRIGORAVICIUTE-PURONIENE et al, 2019). É importante ressaltar também que o aumento da cristalinidade diminui a solubilidade da CarboHA (GRIGORAVICIUTE-PURONIENE et al, 2019), o que nos leva a supor que a CarboHA 5°C tem uma maior solubilidade, o que pode ser correlacionado com os resultados da internalização mostrados a seguir.

Com o estudo conduzido por Matsumoto et al 2002, já se buscava entender a solubilidade da HA. Neste estudo, relacionou-se a cristalinidade e solubilidade da HA com a adsorção destas com diferentes grupos de aminoácidos. As conclusões mostraram que tais adsorções afetaram negativamente a cristalinidade, mas muitas aumentaram sua solubilidade. Esse questionamento permanece, fato que também foi citado por estudos realizados por Makvandi et al, 2021 e Liang et al, 2021. Porém, aqui também encontramos uma lacuna de conhecimento acerca da HA sintetizada por via úmida a baixas temperaturas, uma vez que este estudo produziu conclusões sobre a nanopartícula sintetizada pela via seca, fato que se repete em estudos mais recentes como os de Kumar et al, 2020 e Sa et al, 2017. Um estudo conduzido por Sunarso et al, 2019 teve como uns dos objetivos comparar a solubilidade da

sua HA, produzida sem sinterização, com as HA comumente comercializadas que passam por este processo. As HA foram sintetizadas nas temperaturas de 100°C, 140°C e 180°C – ainda muito distantes das temperaturas de sínteses utilizadas neste projeto –, e conclui-se que as amostras sintetizadas sem sinterização demonstraram maior solubilidade.

A equação de Ostwald-Freundlich prediz que a solubilidade de uma nanopartícula é baseada no seu tamanho, sendo inversamente proporcional a este, ou seja, quanto menor for uma nanopartícula, mais solúvel ela será (LILIAN et al, 2021). Conforme foi exposto Lilian et al, 2021, nanopartículas menores possuem mais átomos em seus cantos e bordas, o que facilita que íons presentes na superfície sejam liberados e aglomerados quebrados, aumentando o grau de solubilidade da nanopartícula. Embora este estudo aborde nanopartículas de prata, tal afirmação é pertinente em relação à CarboHA, uma vez que seus aglomerados, que podem ter diferentes tamanhos – cuja aglomeração excessiva é quebrada pela dispersão –, possui grande número de bordas e cantos, que, contribuindo para a liberação de íons, tornariam esta nanopartícula mais solúvel.

De acordo com Kumar et al, 2020 e Sa et al, 2017, foi esclarecido que HA com baixa cristalinidade tem maior solubilidade, bem como maior capacidade de adsorção de proteínas. Contudo, nossas análises de potencial Z não mostram diferenças significativas entre as cargas superficiais presentes após o contato das três CarboHA com o meio de cultivo. Isso pode ser correlacionado com a sensibilidade da técnica, e precisaria de análises mais aprofundadas sobre corona proteica, como a verificação dos tipos de proteínas adsorvidas, para maiores conclusões, já que o potencial Z apenas se refere a mudança na carga superficial e não a concentração de proteínas eventualmente absorvidas.

Os dados citados nos levam a supor que dentre as nossas amostras, a CarboHA sintetizada a 5°C seria a amostra com maior solubilidade. Tal afirmação tem como base a relação entre temperaturas mais baixas de síntese que resultam em materiais de menor cristalinidade (SAKHNO et al, 2020, TRZASKOWSKA et al, 2023).

Uma vez que o biomaterial foi devidamente caracterizado como se tratando de uma HA, seguiu-se a produção da hidroxiapatita carbonatada fluorescente. Optou-se pela utilização da Rodamina, fluoróforo com absorção em 555nm e emissão em 579nm e 627nm.

Para garantir que a presença de Rodamina não afetasse as características da CarboHA foram realizadas caracterizações da CarboHA, adsorvida com Rodamina antes e após a exposição ao meio de cultura. Para tal, utilizamos as técnicas de Espectrometria no Infravermelho com Transformada de Fourier (Fourier Transformed Infrared – FTIR), Potencial Zeta, e Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e todos os resultados se mostraram comparáveis com os dados da CarboHA pura.

Ao visualizarmos a hidroxiapatita por microscopia eletrônica, constatamos que esta, graças a sua tendência natural de se aglomerar, formava grumos de tamanho considerável e grande variação de tamanho. Uma vez o tamanho das moléculas tem relação direta com a via endocítica utilizada pelas células para sua internalização. A excessiva aglomeração das nanopartículas poderia apresentar uma variável para avaliação da internalização. Portanto, optamos pela confecção de um protocolo de dispersão pela técnica de ultrasonicação, seguida pela medição do diâmetro hidrodinâmico por DLS, para avaliar a distribuição de tamanho antes da exposição às células.

Os resultados do DLS mostraram uma uniformidade de tamanho nos nanoaglomerados das diferentes CarboHA, que tiveram seu diâmetro hidrodinâmico médio entre aproximadamente 2 μm e 3 μm , apresentando um caráter bimodal na maioria dos casos, possuindo uma pequena parte de sua população em escala nanométrica. Este tamanho foi considerado aceitável, uma vez que, por conta da sua grande reatividade e tendência em aglomerar-se, esse biomaterial terá esse mesmo comportamento quando exposto à tecidos vivos ou antes de ser internalizado pelas células.

Para o ensaio de internalização, cujo objetivo é verificar por qual das cinco principais vias endocíticas a CarboHA utiliza para penetrar nas células, foi realizado primeiramente um ensaio em células de linhagem de osteossarcoma SAOS2, usando com três diferentes concentrações de inibidores, usando como base concentrações já utilizadas em estudos descritos na literatura por LI et al, 2022, YADEGARI et al, 2021, QUEVEDO et al, 2021, LIANG et al, 2021, PEREIRA et al, 2020, TIAN et al, 2017, MORIMOTO et al 2016, com o objetivo de encontrar a dose ótima para inibição da via. Para cada inibidor, uma molécula traçadora específica foi utilizada, também em doses já descritas previamente na literatura por EVGENIYA et al, 2021, LIANG et al, 2021, NASAKO et al, 2020, BENCHIMOL, 2020, TYRPAK et al, 2019, HOLOWNIA, 2019, PERISA et al 2016. Estes ensaios permitiram estabelecer a concentração ideal de três dos cinco inibidores, que conseguiu inibir significativamente a via endocítica sem produzir nenhuma alteração morfológica ou morte celular nas células. As concentrações testadas para as vias de clatrina, caveolina e raft lipídico confirmaram os dados na literatura e dispensaram a testagem dos outros dois inibidores (para via fagocítica e macropinocitose) cuja concentração foi baseada na literatura.

Prosseguimos, portanto, com a análise individual das vias endocíticas, com o propósito de compreender através de qual ou quais vias a CarboHA é internalizada.

Uma vez que já foi provado em estudos publicados na literatura que esse biomaterial, na sua forma carbonatada, é internalizado pelas células (FERNANDES et al, 2020; ANJOS et al, 2019; ROSSI et al, 2017), para que possa ser aprimorada sua formulação e aplicações, se

faz necessário entender melhor a via de internalização utilizada pelas células para a entrada desta nanopartícula, correlacionando os resultados com as suas características físico-químicas.

Nossos resultados mostram que, em osteoblastos murinos, as vias predominantes para CarboHA sintetizadas a temperaturas menores é a internalização por meio de vesículas de clatrina ou caveolina, enquanto as CarboHA sintetizadas a temperaturas maiores são prevalentemente internalizadas por macropinocitose e fagocitose. Ademais, este efeito é diretamente proporcional com a temperatura de síntese e potencialmente correlacionado com as diferenças de tamanho de grau primário e cristalinidade dependente da temperatura.

Os resultados deste estudo corroboram as conclusões previamente validadas a respeito da correlação entre as dimensões das nanopartículas e seu impacto na interação com as células (HAN et al, 2023). Podemos fazer referência à pesquisa conduzida por YANG et al., 2020, que investigou o transporte transmembranar de “nanogaiolas” de ouro. Este trabalho concluiu que as “nanogaiolas” de tamanhos de cerca de 50 nm foram internalizados pelas vias endocíticas mediadas por Clatrina e Caveolina; enquanto as “nanogaiolas” de ouro de tamanhos mais próximos de 100 nm e maiores, entraram nas células por Macropinocitose e Fagocitose. Uma conclusão semelhante foi obtida na pesquisa realizada por WU et al., 2019, que examinou a internalização de nanopartículas de prata. Partículas com dimensões menores, entre 5 nm e 50 nm, foram internalizadas nas células por meio das vias mediadas por Clatrina e Caveolina, enquanto partículas com tamanhos entre 50 nm e 100 nm utilizaram a Macropinocitose.

Embora já existam estudos sobre a internalização da hidroxiapatita, a maioria se concentra na nanopartícula produzida por via seca, que necessita de temperaturas de cerca de 900°C. O estudo conduzido por HUANG et al, 2019, abordou a internalização da HA nanoestruturada – sendo esta produzida por via seca em altíssimas temperaturas, e sem carbonatação – concluindo que a internalização da mesma por células de musculares lisas aórticas A7R5, se dá por macropinocitose, quando em formato de bastão ou disco, e pela via mediada por clatrina quando em formatos de agulha ou esfera. Apesar deste resultado esclarecer as vias de internalização desta nanopartícula, não podemos assumir que estes resultados são reproduzidos na HA carbonatada nanoestruturada, objeto deste estudo e produzida por via úmida em temperaturas mais baixas, a saber, 5°C, 37°C e 90°C, pois sabemos que a cristalinidade, sendo diretamente relacionada com a solubilidade, pode ocasionar uma diferença de via de internalização.

A maioria dos artigos que abordam a internalização da CarboHA nanoestruturada realizam seus experimentos e estudos com a CarboHA sintetizada por via seca, e a temperatura mais baixa encontrada, que ainda é bem rara, é de 100°C. Ainda existe uma

grande carência na literatura por dados que tratem e esclareçam como a internalização desta nanopartícula se dá quando sua síntese é por via úmida e sob temperaturas bem mais baixas, e se estas são internalizadas através das mesmas vias utilizadas pela HA sintetizada à altas temperaturas, ou se outras vias são ativadas. Há de se ressaltar que a mineralização óssea é realizada por internalização de fontes de fosfato e cálcio pelos osteoblastos, que os processam, possivelmente dentro de lisossomas, para que possa ocorrer o processo de mineralização (IWAYAMA et al, 2019). Portanto, a internalização e processamento do material pelo organismo, tanto do material que constitui o próprio osso, quanto do material sintético usado como biomaterial acontece em ambiente úmido e a temperaturas mais baixas de 100°C.

Ainda temos uma carência de análise de internalização da CarboHA que se apresenta em uma escala nanoestruturada, e a maior parte dos artigos trata desse assunto em revisões que ressaltam as dificuldades do estabelecimento de uma regra sobre a internalização de nanopartículas, uma vez que tamanho, carga e forma podem afetar a via de internalização, bem como esta pode variar também de acordo com o tipo celular (FRANCIA et al, 2020).

Nosso estudo mostra que com a inibição das vias mediadas por Clatrina e Caveolina, se observou uma inibição significativa na internalização da CarboHA 5°C, temperatura na qual os cristais são os menores entre as condições de síntese. Na primeira via endocítica citada, invaginações da membrana são formadas e possuem um encobrimento composto por um conjunto de proteínas citosólica chamadas clatrininas, cujas invaginações formam vesículas com tamanhos entre 30 e 100 nm (ARPINO et al, 2022; AKAMATSU et al, 2020). A endocitose mediada por Caveolina resulta na formação de invaginações conhecidas como cavéolas, as quais apresentam dimensões situadas na faixa de 50 a 60 nm (MAKVANDI et al, 2021; RENNICK et al, 2020). A dimensão das vesículas formadas por estas vias endocíticas corroboram com a maior internalização de CarboHA 5°C, que, nas micrografias eletrônicas apresenta um tamanho de grão primário menor comparadas com as demais CarboHA.

Na via da Macropinocitose o diâmetro das protusões formadas pela membrana variam de 200 nm a 0,5 µm (LI et al, 2020; YOSHIDA et al, 2018), e na Fagocitose, essas protusões têm a capacidade de internalizar partículas entre 250 nm, até maiores de 5 µm (TERTRAIS et al, 2021), podendo chegar até 15 µm (LI et al, 2020; BARANOV et al, 2021). Tais fatos corroboram com os resultados que mostram as partículas sintetizadas 90°C, maiores e mais cristalinas, utilizarem estas vias para serem internalizadas pelas células. É necessário ressaltar que tais conclusões têm como base publicações na literatura anteriormente mencionadas que relacionam a temperatura com a cristalinidade e o tamanho das nanopartículas, sendo ambas diretamente proporcionais. Para que haja comprovação,

estudos complementares se fazem necessários, para que possamos continuar a aprofundar os conhecimentos acerca desta nanopartícula.

Outro estudo com CarboHA demonstra uma internalização da hidroxiapatita carbonatada utilizando as células MC3T3 (osteoblastos murinos), que os agregados de CarboHA sintetizada a 90°C foram internalizados através de invaginação com tamanhos entre 1 µm e 3 µm, compatíveis com a internalização por fagocitose ou macropinocitose (ANJOS et al, 2019).

Quanto a CarboHA 37°C, sua entrada nas células foi bloqueada pela metade tanto na endocitose mediada por clatrina (59%) e caveolina (40%) quanto na macropinocitose (54%) e fagocitose (54%), provavelmente corroborado com o tamanho dos seus cristais e a sua cristalinidade transita entre as características encontradas entre a menor e maior temperatura de síntese. Estes resultados também poderiam explicar o melhor comportamento de osteointegração mostrado por este material em alguns trabalhos in vivo (ALMEIRDA et al, 2023).

De acordo com os resultados obtidos, nenhuma das três CarboHA apresentaram redução significativa na sua internalização por raft-lipídico quando esta via foi inibida.

Estas conclusões preenchem uma lacuna de conhecimento sobre a via endocítica pela qual as nanopartículas de hidroxiapatita sintetizadas em baixas temperaturas, são internalizadas pelas células.

Esse esclarecimento pode levar a formulações específicas visando controlar a internalização desta nanopartícula, o que auxiliaria numa melhor regeneração óssea, e no carregamento de moléculas, no caso da utilização como nanocarreadores, pois, devido à natureza da CarboHA, e ao conhecer sua via de internalização, esta poderia ser conjugada ou adsorvida à materiais que seriam mais bem reconhecidos pela via endocítica e assim facilitariam ainda mais sua internalização. Além disso, a própria confecção da CarboHA poderia ser modificada, com adições de diferentes grupos ou a realização de um material core/shell com CarboHA sintetizadas em diversas temperaturas para que também sua internalização fosse realizada de forma mais eficiente.

É importante citar, porém, que tal conclusão abre caminhos para novos estudos mais aprofundados sobre esta nanopartícula e seus diferentes aspectos, principalmente sobre o reprocessamento e o tráfego celular por meio de lisossomas, recentemente corroborados com a mineralização dos osteoblastos (IWAYAMA e al, 2019) uma vez que sua utilização tem crescido pelas mais diversas áreas da Biomedicina, Biotecnologia e Nanomedicina.

7. CONCLUSÃO

Este trabalho foca na avaliação da internalização e tráfego intracelular de nanopartículas de hidroxiapatita carbonatada sintetizada a temperatura de 5°C, 37°C e 90°C, respectivamente, por via úmida em células murinas de cultura primária fOST. Nossos resultados mostraram que:

- A hidroxiapatita carbonatada foi sintetizada com sucesso por via úmida.
- Uma hidroxiapatita carbonatada com propriedades fluorescentes foi produzida por adsorção com Rodamina.
- A cristalinidade e tamanho do grão primário dos biomateriais se mostraram diretamente proporcionais a temperatura de síntese.
- Foi demonstrada a presença de proteína Corona adsorvida nos biomateriais independentes da temperatura de síntese.
- A internalização da CarboHA 5°C é realizada preferencialmente por endocitose mediada por Clatrina e Caveolina, enquanto a CarboHA 90°C utiliza preferencialmente as vias de Macropinocitose e a Fagocitose, ao passo que a CarboHA 37°C utiliza todas estas para sua entrada na célula.
- O *raft* lipídico não é utilizado como via de internalização por nenhum dos biomateriais testados.

REFERÊNCIAS

1. ALBERTS B, JOHNSON A, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WALTER P. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science; 2002.
2. ALMEIDA D, SARTORETTO SC, CALASANS-MAIA JDA, GHIRALDINI B, BEZERRA FJB, GRANJEIRO JM, et al. (2023) *In vivo osseointegration evaluation of implants coated with nanostructured hydroxyapatite in low density bone*. PLoS ONE 18(2): e0282067. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0282067>
3. AKAMATSU M, VASAN R, SERWAS D, FERRIN D, RANGAMANI P, DRUBIN D. *Principles of self-organization and load adaptation by the actin cytoskeleton during clathrin-mediated endocytosis*. Cell Biology, Physics of Living Systems, January 2020. <https://doi.org/10.7554/eLife.49840>
4. ALI KHAN M, SIDDIQUI M R, OTERO M, ALSHAREEF SA, RAFATULLAH M. *Removal of Rhodamine B from Water Using a Solvent Impregnated Polymeric Dowex 5WX8 Resin: Statistical Optimization and Batch Adsorption Studies*. Polymers. 2020; 12(2):500. <https://doi.org/10.3390/polym12020500>
5. ANJOS S, MAVROPOULOS E, ALVES G G, COSTA A M, ALENCAR HAUSEN M, SPIEGEL C N, LONGUINHO M M, MIR M, GRANJEIRO J M, ROSSI A M. *Impact of crystallinity and crystal size of nanostructured carbonated hydroxyapatite on pre-osteoblast in vitro biocompatibility*. Journal of Biomedical Materials Research, p. 1965-1976, 2019.
6. ARCOS D, VALLET-REGÍ M. *Substituted hydroxyapatite coatings of bone implants*. Journal of Materials Chemistry B, 2020.
7. ARPINO G, SOMASUNDARAM A, SHIN W, SHUPLIAKOV O, TARASKA J, WU L. *Clathrin-mediated endocytosis cooperates with bulk endocytosis to generate vesicles*. iScience 25, 103809, February 18, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.103809>.
8. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTES DE ÓRGÃOS (ABTO). Registro Brasileiro de Transplantes. Ano XXII n. 4, jan/fev 2016. Disponível em: <<http://www.abto.org.br/abtov03/default.aspx?mn=457&c=900&s=0>> Acesso em: 15/12/2020
9. BALDWIN P, LID J, AUSTON D A, MIR H S, YOON R S, KOVAL K J. *Autograft, allograft, and bone graft substitutes*. Journal of Orthopaedic Trauma, 1, 2019.
10. BARANOV M V, KUMAR M, SACANNA S, THUTUPALLI S, VAN DEN BOGAART G. *Modulation of Immune Responses by Particle Size and Shape*.

- Frontiers in immunology, 11, 607945, 2021.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.607945>
11. BASCHIERI F, PORSHNEVA K, MONTAGNAC G. *Frustrated clathrin-mediated endocytosis – causes and possible functions*. Journal of Cell Science, 133(11), jcs240861, 2020.
 12. BENCHIMOL M; (2020). *Giardia intestinalis can interact, change its shape and internalize large particles and microorganisms*. Parasitology, (), -. doi:10.1017/s0031182020002292
 13. BRINKER MR, O'CONNOR DP. *Nonunions: evaluation and treatment*. In: Browner BD, Jupiter JB, Krettek C, Anderson PA, eds. *Skeletal Trauma: Basic Science, Management, and Reconstruction*. 6th ed. Philadelphia, PA: Elsevier; 2020:chap 26.
 14. BUSCH A, JÄGER M. *Synthetische Knochenersatzstoffe (Synthetic Bone Substitutes)*. Orthopädie 51, 1023–1032, 2022. <https://doi.org/10.1007/s00132-022-04319-5>
 15. BUSTAMANTE C J, CHEMLA Y R, LIU S, WANG M D. *Optical tweezers in single-molecule biophysics*. Nat Rev Methods Primers 1, 25, 2021. <https://doi.org/10.1038/s43586-021-00021-6>
 16. CIOSEK Ż, KOT K, KOSIK-BOGACKA D, ŁANOCHA-ARENDARCZYK N, ROTTER I. *The Effects of Calcium, Magnesium, Phosphorus, Fluoride, and Lead on Bone Tissue*. Biomolecules, 2021, 11(4), 506. doi:10.3390/biom11040506
 17. CUI J, SHIBATA Y, ZHU T, ZHOU J, ZHANG J. *Osteocytes in bone aging: Advances, challenges, and future perspectives*, Ageing Research Reviews, Volume 77, 2022, 101608, ISSN 1568-1637, <https://doi.org/10.1016/j.arr.2022.101608>.
 18. DINDA S, BHAGAVATAM A, ALREHAILI H, DINDA G P. *Mechanochemical Synthesis of Nanocrystalline Hydroxyapatite from Ca(H₂PO₄)₂.H₂O, CaO, Ca(OH)₂, and P₂O₅ Mixtures*. Nanomaterials, 10(11), 2232–, 2020. doi:10.3390/nano10112232
 19. EVGENIYA TROFIMENKO, YUTA HOMMA, MITSUNORI FUKUDA, CHRISTIAN WIDMANN, *The endocytic pathway taken by cationic substances requires Rab14 but not Rab5 and Rab7*, Cell Reports, Volume 37, Issue 5, 2021, 109945, ISSN 2211-1247, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109945>.
 20. FERNANDES M H, ALVES M M, CEBOTARENCO M, RIBEIRO I A C, GRENHO L, GOMES P S, CARMEZIM M J, SANTOS C F. *Citrate zinc hydroxyapatite nanorods with enhanced cytocompatibility and osteogenesis for bone regeneration*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2020.

21. FERREIRA A P A, BOUCROT E. *Mechanisms of Carrier Formation during Clathrin-Independent Endocytosis*. Trends in Cell Biology, 28(3), 188–200. 2018.
22. FRANCIA V, MONTIZAAN D, SALVATI A, BEILSTEIN J. *Interactions at the cell membrane and pathways of internalization of nano-sized materials for nanomedicine*. Journal of Nanotechnology, 11, 338–353, 2020.
23. GHANAATI S, AL-MAAWI S, CONRAD T, LORENZ J, RÖSSLER R, SADER R. *Biomaterial-based bone regeneration and soft tissue management of the individualized 3D-titanium mesh: an alternative concept to autologous transplantation and flap mobilization*. Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery. 2019.
24. GHIASI B, SEFIDBAKHT Y, MOZAFFARI-JOVIN S, GHAREHCHELOO B, MEHRARYA M, KHODADADI A, REZAEI M, SIADAT S O R, USKOKOVIĆ V. *Hydroxyapatite as a biomaterial – a gift that keeps on giving*. Drug Development and Industrial Pharmacy, 1–52, 2020.
25. GRAND VIEW RESEARCH. *Bone Graft and Substitutes Market Size, Share & Trends Analysis Report By Product (Allograft, Synthetic), By Application (Dental, Spinal Fusion), By Region (APAC, North America), And Segment Forecasts, 2020 – 2027*. 2020. Disponível em: < <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/bone-grafts-substitutes-market> > Acesso em: 04/11/2020
26. GRIGORAVICIUTE-PURONIENE I, TANAKA Y, VEGELYTE V, NISHIMOTO Y, ISHIKAWA K, KAREIVA A. *A novel synthetic approach to low-crystallinity calcium deficient hydroxyapatite*. Ceramics International, S0272884219311708–. doi:10.1016/j.ceramint.05.072, 2019.
27. HALLETT M B. (Ed.). *Molecular and Cellular Biology of Phagocytosis*. Advances in Experimental Medicine and Biology, 2020.
28. HAN J, TONG X, RAO C, OUYANG C, GUI B. *Size-Dependent Cytotoxicity, Adhesion, and Endocytosis of Micro-/Nano-hydroxyapatite Crystals in HK-2 Cells*. ACS Omega 2023, 8, 50, 48432–48443, 2023. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c08180>
29. HARRISON M Y, COYLE J, ARUMUGAM S. *To be more precise: the role of intracellular trafficking in development and pattern formation*. Biochem Soc Trans 30 October 2020; 48 (5): 2051–2066, 2020.
30. HAUGEN H J, LYGSTADAAS S P, ROSSI F, PERALE G. *Bone grafts: which is the ideal biomaterial?* Journal of Clinical Periodontology, 2019.
31. HASEGAWA T, HONGO H, YAMAMOTO T, ABE M, YOSHINO H, HARAGUCHI-KITAKAMAE M, ISHIZU H, SHIMIZU T, IWASAKI N,

- AMIZUKA N. *Matrix Vesicle-Mediated Mineralization and Osteocytic Regulation of Bone Mineralization*. International Journal of Molecular Sciences. 2022; 23(17):9941. <https://doi.org/10.3390/ijms23179941>
32. HYDROXYAPATITE MARKET GLOBAL OPPORTUNITY ANALYSIS AND INDUSTRY FORECAST, 2020–2027 Published Date: May 2020 | Pages: 226. Link: <https://www.alliedmarketresearch.com/hydroxyapatite-market>
33. HINZE C, BOUCROT E. *Endocytosis in proliferating, quiescent and terminally differentiated cells*. Journal of Cell Science, 131(23), 2018.
34. HOLOWNIA, A. (2019). *Phagocytosis and Autophagy in THP-1 Cells Exposed to Urban Dust: Possible Role of LC3-Associated Phagocytosis and Canonical Autophagy*. Advances in Experimental Medicine and Biology (Chapter 323), –. doi:10.1007/5584_2018_323
35. HUANG, LING-HONG; HAN, JIN; OUYANG, JIAN-MING; GUI, BAO-SONG (2019). *Shape-dependent adhesion and endocytosis of hydroxyapatite nanoparticles on A7R5 aortic smooth muscle cells*. Journal of Cellular Physiology, (), –. doi:10.1002/jcp.28987
36. IWAYAMA T, OKADA T, UEDA T, TOMITA K, MATSUMOTO S, TAKEDASHI M, WAKISAKA S, NODA T, OGURA T, MURAKAMI S. *Osteoblastic lysosome plays a central role in mineralization*. Sci. Adv.5,eaax0672(2019).DOI:10.1126/sciadv.aax0672
37. JARDIM R N, ROCHA A A, ROSSI A M, DE ALMEIDA NEVES A, PORTELA M B, LOPES R T, MOREIRA DA SILVA E. *Fabrication and Characterization of Remineralizing Dental Composites Containing Hydroxyapatite Nanoparticles*. Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, 103817. 2020.
38. JOVČEVSKA I, MUYLDERMANS S. *The Therapeutic Potential of Nanobodies*. BioDrugs, 2019, –. doi:10.1007/s40259-019-00392-z
39. JU Y, GUO H, EDMAN M, HAMM-ALVAREZ S F. *Application of advances in endocytosis and membrane trafficking to drug delivery*. Advanced Drug Delivery Reviews, v. 157, p. 118-141, 2020.
40. KAKSONEN M, ROUX A. *Mechanisms of clathrin-mediated endocytosis*. Nature Reviews Molecular Cell Biology 19, p. 313-326, 2018.
41. KEJIE H, YUSHUANG W, ZHIHONG Z, HAIBO C, BING Y, HONG-BO P, KAI Y. *Membrane-curvature-mediated co-endocytosis of bystander and functional nanoparticles*. Nanoscale, 2021, –. doi:10.1039/d1nr01443a
42. KIEN P T, PHU H D, LINH N V V, QUYEN T N, HOA N.T. *Recent Trends in Hydroxyapatite (HA) Synthesis and the Synthesis Report of Nanostructure HA by*

- Hydrothermal Reaction*. *Advances in experimental medicine and biology*, 1077:343-354, 2018.
43. KING J S, KAY R R. *The origins and evolution of macropinocytosis*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 374(1765), 20180158, 2019.
 44. KOPAC T. *Protein corona, understanding the nanoparticle-protein interactions and future perspectives: A critical review*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 169, 290–301, 2021. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.12.108
 45. KUMAR S C, DHANARAJ, K, VIMALATHITHAN, R M, ILAIYARAJA P, SURESH G. *Hydroxyapatite for bone related applications derived from sea shell waste by simpleprecipitation method*. *Journal of Asian Ceramic Societies*, 1–14, 2020. doi:10.1080/21870764.2020.1749373
 46. LANCASTER C E, HO C Y, HIPOLITO V E B, BOTELHO R J, TEREBIZNIK M R. *Phagocytosis: What's on the menu?* *Biochemistry and Cell Biology*, 2018.
 47. LARA-OCHOA S, ORTEGA-LARA W, GUERRERO-BELTRÁN C E. *Hydroxyapatite Nanoparticles in Drug Delivery: Physicochemistry and Applications*. *Pharmaceutics* 2021, 13, 1642. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13101642>
 48. LI S, XIAO D, ZHAO Y, ZHANG L, CHEN R, LIU W, WEN Y, LIAO Y, WEN Y, WU R, HAN X, ZHAO Q, DU S, YAN Q, WEN X, CAO S, HUANG X. *Porcine Deltacoronavirus (PDCoV) Entry into PK-15 Cells by Caveolae-Mediated Endocytosis*. *Viruses*. 2022; 14(3):496. <https://doi.org/10.3390/v14030496>
 49. LI Y, PANG H B. *Macropinocytosis as a cell entry route for peptide-functionalized and bystander nanoparticles*. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*, 329, 1222–1230, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.10.049>
 50. LIANG K, MEI S, GAO X, PENG S, ZHAN J. *Dynamics of Endocytosis and Degradation of Antibody-Drug Conjugate T-DMI in HER2 Positive Cancer Cells*. *Drug Des Devel Ther*. 2021;15:5135-5150 <https://doi.org/10.2147/DDDT.S344052>
 51. LILIAN R R. SOUZA, CORRÊA T Z, BRUNI A, DA VEIGA M. *The effects of solubility of silver nanoparticles, accumulation, and toxicity to the aquatic plant Lemna minor*. *Environmental Science and Pollution Research*, 2021. doi:10.1007/s11356-020-11862-1
 52. LIN X P, MINTERN J D, GLEESON P A. *Macropinocytosis in Diferent Cell Types: Similarities and Diferences*. *Membranes (Basel)*, 10(8), 177, 2020.

53. LU W, YAO J, ZHU X, QI Y. *Nanomedicines: Redefining traditional medicine*. Biomedicine & Pharmacotherapy, v. 134, 111103, ISSN 0753-3322, 2021.
54. MAKVANDI P, CHEN M, SARTORIUS R, ZARRABI A, ASHRAFIZADEH M, DABBAGH F, MA J, MATTOLI V, TAY F R. *Endocytosis of abiotic nanomaterials and nanobiovectors: Inhibition of membrane trafficking*. Nano Today, Volume 40, 2021, 101279, ISSN 1748-0132, <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2021.101279>
55. MATSUMOTO T, OKAZAKI M, INOUE M, HAMADA Y, TAIRA M, TAKAHASHI J. *Crystallinity and solubility characteristics of hydroxyapatite adsorbed amino acid*. Biomaterials. 23(10), 2241–2247, 2002. doi:10.1016/s0142-9612(01)00358-1
56. MAYOR S, PAGANO R E. *Pathways of clathrin-independent endocytosis*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2007, 8(8), 603–612. doi:10.1038/nrm2216
- MITCHELL M J, BILLINGSLEY M M, HALEY R M, WECHSLER M E, PEPPAS N A, LANGER R. *Engineering precision nanoparticles for drug delivery*. Nature Reviews Drug Discovery, 2020.
57. MORIMOTO K, JANSSEN W J, FESSLER M B, MCPHILLIPS K A, BORGES V, BOWLER R, XIAO Y, KENCH J A, HENSON P M. *Lovastatin Enhances Clearance of Apoptotic Cells (Efferocytosis) with Implications for Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. Journal of Immunology, v. 176, p. 7657–7665, 2016.
58. MOUSSA N T, DYM H. *Maxillofacial Bone Grafting Materials*. Dental Clinics of North America, 2020, S0011853219301119–. doi:10.1016/j.cden.2019.12.011
59. MUSCHLER G F, LANE J M. *Bone Grafts and Bone Substitutes* Orthopedic Surgery. In Habal MB, Reddi AH (eds).. Philadelphia, WB Saunders Co 375407, 1992.
60. NASAKO, HARUKA; AKIZUKI, RISA; TAKASHINA, YUI; ISHIKAWA, YOSHINOBU; SHINODA, TAKEHIRO; SHIROUZU, MIKAKO; ASAI, TOMOHIRO; MATSUNAGA, TOSHIYUKI; ENDO, SATOSHI; IKARI, AKIRA (2020). *Claudin-2 binding peptides, VPDSM and DSMKF, down-regulate claudin-2 expression and anticancer resistance in human lung adenocarcinoma A549 cells*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 1867(4), 118642–. doi:10.1016/j.bbamcr.2019.118642
61. PARTON R G, MCMAHON K, WU Y. *Caveolae: Formation, dynamics, and function*. Current Opinion in Cell Biology, 65, 8–16, 2020.
62. PENG D, CHUAN G, YOUSHUI G, DELIN L, HAO L, JUN X, XIAOYI C, YIGANG H, CHANGQING Z, MINGHAO Z, JUNJIE G. *Osteocytes regulate*

- senescence of bone and bone marrow.* eLife, 2022. 11:e81480
<https://doi.org/10.7554/eLife.81480>
63. PEREIRA, PATRICIA M.R.; MANDLEYWALA, KOMAL; RAGUPATHI, ASHWIN; LEWIS, JASON S (2020). *Acute statin treatment improves antibody accumulation in EGFR- and PSMA-expressing tumors.* Clinical Cancer Research, (), clincanres.1960.2020-. doi:10.1158/1078-0432.CCR-20-1960
 64. PERISA D, ROHRER L, KAECH A, VON ECKARDSTEIN A. *Itinerary of High Density Lipoproteins in Endothelial Cells.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids, 1861(2), 98–107, 2016.
 65. PIGNOLO R J. *Aging and Bone Metabolism.* Compr Physiol. 2023 Jan 30;13(1):4355-4386. doi: 10.1002/cphy.c220012. PMID: 36715278.
 66. QIN Z, SU W, LIU P, MA J, ZHANG Y, JIAO T. *Facile Preparation of a Rhodamine B Derivative-Based Fluorescent Probe for Visual Detection of Iron Ions.* ACS Omega. 2021 Sep 17;6(38):25040-25048. doi: 10.1021/acsomega.1c04206. PMID: 34604683; PMCID: PMC8482772.
 67. QUEVEDO AC, ELLIS L-JA, LYNCH I, VALSAMI-JONES E. *Mechanisms of Silver Nanoparticle Uptake by Embryonic Zebrafish Cells.* Nanomaterials. 2021; 11(10):2699. <https://doi.org/10.3390/nano11102699>
 68. RABINOVITCH M. *Professional and non-professional phagocytes: an introduction.* Trends Cell 421 Biol. (1995) 5: 85–7.
 69. RAN L, LIU L, GAO J, PAN Y, RAMALINGAM M, DU X, LIU Y, CHENG L, SHI Z. *Strontium-doped hydroxyapatite and its role in osteogenesis and angiogenesis.* Int J Dev Biol. 2023;67(4):137-146. doi: 10.1387/ijdb.230091lc. PMID: 37975329.
 70. RENNICK J J, JOHNSTON A P R, PARTON R G. *Key principles and methods for studying the endocytosis of biological and nanoparticle therapeutics.* Nat. Nanotechnol. 16, 266–276 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41565-021-00858-8>
 71. RIAL R, TICHNELL B, LATIMER B, LIU Z, MESSINA P V, RUSO J M. *Structural and Kinetic Visualization of the Protein Corona on Bioceramic Nanoparticles.* Langmuir, acs.langmuir.7b03573-, 2018. doi:10.1021/acs.langmuir.7b03573
 72. ROSSI A, LONGUINHO M, TANAKA M, FARINA M, BOROJEVIC R, ROSSI A. *Intracellular pathway and subsequent transformation of hydroxyapatite nanoparticles in the SAOS-2 osteoblast cell line.* Wiley Online Library, 2017.
 73. SA Y, GUO Y, FENG X. *Are different crystallinity index-calculating methods of hydroxyapatite efficient and consistent?* New J Chem. 2017;41 (13):5723–5731.

74. SAKHNO Y, IAFISCO M, JAISI D. *Role of Maturation Temperature on Structural Substitution of Carbonate in Hydroxyapatite Nanoparticles*. JOM 73, 1044–1052 (2021). <https://doi.org/10.1007/s11837-021-04587-0>
75. SAMRAT M, DEEPAK C, ANUPAMA M. *Exploration and insights into the cellular internalization and intracellular fate of amphiphilic polymeric nanocarriers*. Acta Pharmaceutica Sinica B, 2021, –. doi:10.1016/j.apsb.2021.02.019
76. SANZ-SÁNCHEZ I, SANZ-MARTÍN I, ORTIZ-VIGÓN A, MOLINA A, SANZ M. *Complications in bone-grafting procedures: Classification and management*. Periodontol 2000. 2022; 88: 86–102. doi:10.1111/prd.12413
77. SAPÓN K, MAÑKA R, JANAS T, JANAS T. *The role of lipid rafts in vesicle formation*. J Cell Sci (2023) 136 (9): jcs260887.
78. SCHMIDT, A. H. *Autologous bone graft: Is it still the gold standard?* Injury, 52, S18–S22, 2021.
79. SHI J, KANTOFF P W, WOOSTER R, FAROKHZAD O C. *Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities*. Nature Reviews Cancer, 17(1), 20–37, 2017.
80. STOW J L, HUNG Y, WALL A A. *Macropinocytosis: Insights from immunology and cancer*. Current Opinion in Cell Biology, 65, 131–140, 2020.
81. SUNARSO R, QALBINA T, INDRANI D J, HERDA E, PANGESTY A I. *Effect of hydrothermal temperature on phase transformation and mechanical property of non-sintered hydroxyapatite and its in vitro solubility*. J. Korean Ceram. Soc. 60, 215–223 (2023). <https://doi.org/10.1007/s43207-022-00257-2>
82. TARASENKO D, MEINECKE M. *Protein-dependent membrane remodeling in mitochondrial morphology and clathrin-mediated endocytosis*. European Biophysics Journal, 2021, –. doi:10.1007/s00249-021-01501-z
83. TERTRAIS M, BIGOT C, MARTIN E, POINCLOUX R, LABROUSSE A, MARIDONNEAU-PARINI I. *Phagocytosis is coupled to the formation of phagosome-associated podosomes and a transient disruption of podosomes in human macrophages*. European journal of cell biology, 100(4), 151161, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2021.151161>
84. TIAN B, AL-MOUJAHED A, BOUZIKA P, HU Y, NOTOMI S, TSOKA P, MILLER JW, LIN H, VAVVAS DG. *Atorvastatin Promotes Phagocytosis and Attenuates Pro-Inflammatory*. Scientific Reports 7 (1): 2329, 2017. doi:10.1038/s41598-017-02407-7. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-02407-7>.
85. TRZASKOWSKA M, VIVCHARENKO V, PRZEKORA A. *The Impact of Hydroxyapatite Sintering Temperature on Its Microstructural, Mechanical, and*

- Biological Properties*. Int J Mol Sci. 2023 Mar 7;24(6):5083. doi: 10.3390/ijms24065083. PMID: 36982158; PMCID: PMC10049015.
86. TYRPAK, DAVID; WANG, YUE; AVILA, HUGO; GUO, HAO; FU, RUNZHONG; TRUONG, ANH; PARK, MINCHEOL; OKAMOTO, CURTIS T.; HAMM-ALVAREZ, SARAH F.; MACKAY, JOHN ANDREW (2019). *Caveolin elastin-like polypeptide fusions mediate temperature-dependent assembly of caveolar microdomains*. ACS Biomaterials Science & Engineering, (), acsbiomaterials.9b01331–. doi:10.1021/acsbiomaterials.9b01331
 87. URIBE-QUEROL E, ROSALES C. *Phagocytosis: Our Current Understanding of a Universal Biological Process*. Front Immunol. 2020 Jun 2;11:1066. doi: 10.3389/fimmu.2020.01066. PMID: 32582172; PMCID: PMC7280488.
 88. VERMA A, GAUTAM S, BANSAL K, PRABHAKAR N, ROSENHOLM J. *Green Nanotechnology: Advancement in Phytoformulation Research*. Medicines, 6(1), 39, 2019.
 89. VOCELLE D, CHAN C, WALTON S P. *Endocytosis Controls Small Interfering RNA Efficiency: Implications for Small Interfering RNA Delivery Vehicle Design and Cell-Specific Targeting*. Nucleic Acid Therapeutics. Feb;30(1):22-32, 2020. doi: 10.1089/nat.2019.0804.
 90. WANG H, SHAN X, REN M, SHANG M, ZHOU C. *Nucleosomes enter cells by clathrin- and caveolin-dependent endocytosis*. Nucleic Acids Research, Volume 49, Issue 21, 2 December 2021, Pages 12306–12319, <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1121>
 91. WATANABE S, BOUCROT E. *Fast and ultrafast endocytosis*. *Current Opinion in Cell Biology*, 47, 64–71, 2017.
 92. WEI X, SHE G, WU T, XUE C, CAO Y. *PEDV enters cells through clathrin-, caveolae-, and lipid raft-mediated endocytosis and traffics via the endo-/lysosome pathway*. Veterinary Research, 2020, 51(1). doi:10.1186/s13567-020-0739-7
 93. WU M, GUO H, LIU L, LIU Y, XIE L. *Size-dependent cellular uptake and localization profiles of silver nanoparticles*. Int J Nanomedicine. 2019 Jun 7;14:4247-4259. doi: 10.2147/IJN.S201107. PMID: 31239678; PMCID: PMC6559762.
 94. YADEGARI-DEHKORDI, S., FIROOZABADI, S. M., FOROUZANDEH MOGHADAM, M., SHANKAYI, Z. (2021). *'Role of Endocytosis Pathways in Electropermeabilization of MCF7 Cells Using Low Voltage and High Frequency Electrochemotherapy'*, Cell Journal (Yakhteh), 23(4), pp. 445-450. doi: 10.22074/cellj.2021.7203

95. YANG C, HE B, DAI W, ZHANG H, ZHENG Y, WNAG X, ZHANG Q. *The role of caveolin-1 in the biofate and efficacy of anti-tumor drugs and their nano-drug delivery systems*. Acta pharmaceutica Sinica B. 2021 Apr;11(4):961-977. doi: 10.1016/j.apsb.2020.11.020. Epub 2020 Nov 28. PMID: 33996409; PMCID: PMC8105775.
96. YANG Y, ZHANG Q, CAI M, XU H, LU D, LIU Y, FU Y, YANG G, SHAN Y. *Size-Dependent Transmembrane Transport of Gold Nanocages*. ACS Omega 2020 5 (17), 9864-9869 DOI: 10.1021/acsomega.0c00079
97. YOSHIDA S, PACITTO R, INOKI K, SWANSON J. *Macropinocytosis, mTORC1 and cellular growth control*. Cellular and molecular life sciences : CMLS, 75(7), 1227–1239, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2710-y>
98. YOSHIDA S, PACITTO R, INOKI K, SWANSON J. *Macropinocytosis, mTORC1 and cellular growth control*. Cellular and Molecular Life Science, 75(7), p. 1227-1239, 2017.
99. ZANG P, LUI X, GUO P, LI X, HE Z, LI Z, STODDART M. J, TIAN W, CHEN D, ZOU X, ZHOU Z, LIU S. *Effect of cyclic mechanical loading on immunoinflammatory microenvironment in biofabricating hydroxyapatite scaffold for bone regeneration*, Bioactive Materials, Volume 6, Issue 10, 2021, Pages 3097-3108, ISSN 2452-199X, <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.02.024>.
100. ZHAO R, YANG R, COOPER PR, KHURSHID Z, SHAVANDI A, RATNAYAKE J. *Bone Grafts and Substitutes in Dentistry: A Review of Current Trends and Developments*. Molecules. 2021 May 18;26(10):3007. doi: 10.3390/molecules26103007. PMID: 34070157; PMCID: PMC8158510.