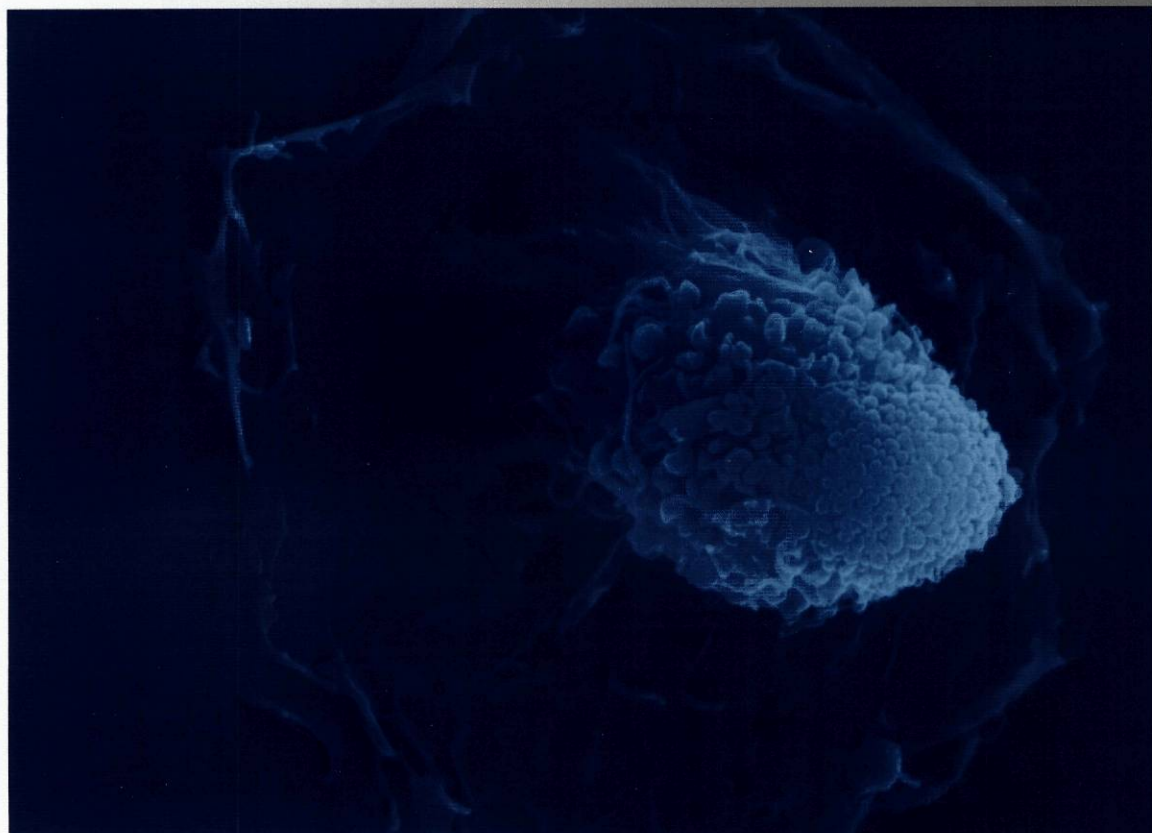


**MARIA JOÃO DA ROCHA COELHO**



**MODULAÇÃO FARMACOLÓGICA  
DA INTERACÇÃO  
TECIDO ÓSSEO/BIOMATERIAIS.  
ESTUDOS *IN VITRO*.**



Porto, 2001

**Modulação Farmacológica da Interação  
Tecido Ósseo/Biomateriais. Estudos *in vitro*.**

**Maria João da Rocha Coelho**

Dissertação de Candidatura ao Grau de Doutor Apresentada à  
Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto

Faculdade de Medicina Dentária

Porto 2001



*Aos meus pais.*

*À Zita.*

*Ao Luís.*

## AGRADECIMENTOS

Na elaboração desta tese coloquei todo o meu esforço e dedicação. No entanto, a concretização de um trabalho de investigação resulta sempre do esforço e trabalho de várias pessoas que directa ou indirectamente contibuem para a sua concretização. Assim, não posso deixar de expressar o meu mais sincero agradecimento a todas as pessoas que me auxiliaram.

Gostaria de expressar o meu apreço à Professora Doutora Maria Helena Fernandes da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto, orientadora desta tese, não só pela sua permanente disponibilidade para me prestar valiosos ensinamentos e esclarecimentos indispensáveis à concretização desta tese, como também pelo apoio e amizade demonstrados durante estes anos de trabalho em conjunto. A forma como me orientou, acompanhou, incentivou e procurou resolver as dificuldades que foram surgindo no meu percurso, juntamente com o seu empenho, entusiasmo e dinamismo foram decisivos para a apresentação deste trabalho.

Ao Prof. Doutor José Domingos Santos da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, co-orientador desta tese, agradeço a sua disponibilidade e indispensável colaboração no domínio dos Biomateriais. Fico também reconhecida por me ter posto à disposição o Laboratório de Biomateriais do Instituto de Engenharia Biomédica (INEB) para execução de parte do trabalho desenvolvido no âmbito desta tese, nomeadamente a preparação dos materiais utilizados.

Ao Conselho Directivo da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto, na pessoa do seu Presidente Prof. Dr. Fernando Peres, pela criação de condições para a realização do trabalho.

Ao Instituto de Engenharia Biomédica (INEB), as facilidades concedidas para a preparação dos materiais.

À Dra Maria Adelina Costa, agradeço a sua amizade e companheirismo e, também, a colaboração prestada especialmente durante a fase inicial deste trabalho.

À Prof. Doutora Maria Pia Ferraz do Instituto de Engenharia Biomédica (INEB), agradeço a sua disponibilidade e colaboração na preparação dos materiais.

À Cláudia Martins do Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Medicina Dentária quero agradecer a colaboração, companheirismo e amizade.

Ao Sr. Emanuel Monteiro do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar a disponibilidade e empenho manifestados na preparação das amostras para microscopia electrónica de varrimento.

Ao Engenheiro Pedro Malojo do Departamento de Informática da Faculdade de Medicina Dentária, gostaria de agradecer a sua disponibilidade e ajuda prestadas na digitalização das fotografias.

À Dra Maria de Lurdes Pereira do Laboratório de Farmacologia e à Ana Mota do Laboratório de Anatomia da Faculdade de Medicina Dentária quero agradecer a sua amizade, apoio e interesse com que acompanharam o meu trabalho.

Finalmente, quero exprimir de um modo muito especial o meu reconhecimento pela paciência, compreensão e apoio que a minha família e o Luís me dispensaram durante todo este longo período, sem os quais o trabalho feito teria sido mais árdua tarefa.



O trabalho desenvolvido no âmbito desta dissertação deu origem às seguintes comunicações e publicações:

### Comunicações

- **Coelho M.J.**, Análise do citoesqueleto aplicada ao comportamento celular, apresentada no curso “Bone Cell Cultures for Biomedical Applications”, Porto, 1995.
- Costa, M.A., Martins, P., Tracana, R.B., **Coelho, M.J.**, Dias, N., Fernandes, M.H. Carvalho, G.S., Human bone cell cultures for biocompatibility evaluation of biomaterials: Hormonal modulation of serially passaged cells and cytoskeleton organization, *Proceedings of the VII Mediterranean Conference on Medical & Biological Engineering*, Jerusalém, Israel, Setembro de 1995; 13.
- **Coelho, M.J.**, Dias, N., Costa, M.A., Fernandes, M.H. e Carvalho, G.S.: Adesão celular analisada pelo estudo do citoesqueleto e por microscopia electrónica de varrimento, Resumos do 4º Congresso Português de Engenharia Biomédica, *BIOENG' 96*, Aveiro, Abril de 1996; IX.2.1-2.5.
- **Coelho, M.J.**, Dias, N., Carvalho G.S., Fernandes, M.H., Human osteoblast-like cell cultures in biocompatibility testing: Influence of the culture medium, *Proceedings of the Third International Conference on Medical and Biological Implant*, Nottingham, Inglaterra, Julho de 1996; 11-13.
- **Coelho, M.J.**, Fernandes, M.H., Trigo Cabral, A., Monteiro, F.J., Hastings, G., *In vitro* osteocompatibility of Polypropylene, Polyethylene and an elastomeric composite, *Proceedings of the 9th International Conference on Biomedical Engineering*, Mandarin, Singapura, 1997; 25-28.
- Trigo Cabral, C., **Coelho, M.J.**, Fernandes, M.H., Efeito da clorohexidina em culturas celulares de osso alveolar humano, *Congresso Anual da Associação Profissional dos Médicos Dentistas - APMD 98*, Lisboa, 1998.

- **Coelho, M.J.**, Santos, J.D., Trigo Cabral, A., Fernandes, M.H., Comparison of the osteoblastic behaviour of human bone marrow and osteosarcoma derived cells, *ESB 99 – 15<sup>th</sup> European Conference on Biomaterials*, Bordeaux, 1999.
- **Coelho, M.J.**, Fernandes, M.H., Doxycycline and minocycline affect the behaviour of osteoblastic human bone marrow cell cultures in a concentration-dependent manner, *Proceedings of the 2<sup>nd</sup> European Congress of Pharmacology*, Budapeste, Julho de 1999.
- Trigo Cabral, C., **Coelho, M.J.**, Fernandes, M.H., Osteoblastic behaviour of human alveolar bone cell cultures in the presence of chlorohexidine, *Proceedings of the 2<sup>nd</sup> European Congress of Pharmacology*, Budapeste, Julho de 1999.
- Garcia Diniz, M., Fernandes, M.H., Soares, G.A., **Coelho, M.J.**, Martins, C.M., The morphology of the human osteoblastic bone marrow cells cultured *in vitro* on non-coated titanium, *7<sup>o</sup> Congresso Brasileiro de Microscopia de Materiais – MICROMAT 2000*, São Paulo, 2000.

### **Publicações**

- **Coelho, M.J.**, Fernandes, M.H., Doxycycline and minocycline affect the behaviour of osteoblastic human bone marrow cell cultures in a concentration-dependent manner, *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 1999, 13: 358s.
- Trigo Cabral, C., **Coelho, M.J.**, Fernandes, M.H., Osteoblastic behaviour of human alveolar bone cell cultures in the presence of chlorohexidine, *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 1999, 13: 320.
- **Coelho, M.J.**, Trigo Cabral, A., Carvalho, G.S., Fernandes, M.H.: Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part I: Osteoblastic differentiation of serially passaged human bone marrow cells cultured in  $\alpha$ -MEM and in DMEM, *Biomaterials*, 2000, 21:1087-1094.

- **Coelho, M.J., Fernandes, M.H.:** Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part II: Effect of ascorbic acid,  $\beta$ -glycerophosphate and dexamethasone in the osteoblastic differentiation, **Biomaterials**, 2000, 21:1095-1102.



## RESUMO

Os cerâmicos de fosfato de cálcio têm sido amplamente utilizados em aplicações médicas, nomeadamente como materiais ortopédicos e dentários, devido à sua capacidade de ligação ao tecido vivo. As suas vantagens clínicas devem-se às suas características biodegradáveis e/ou osteocondutoras, embora as suas propriedades dependam da sua estrutura, tal como a estequiometria química, cristalinidade e morfologia de superfície. Recentemente, têm sido desenvolvidos compósitos de hidroxiapatite reforçada com biovidro do sistema  $P_2O_5$ -CaO com o objectivo de melhorar as propriedades do cerâmico e aumentar, tanto quanto possível, a semelhança química entre o material implantado e o tecido ósseo hospedeiro.

Neste trabalho, foi desenvolvido um compósito que foi preparado por um processo de sinterização na presença de fase líquida, usando vidro do sistema  $P_2O_5$ -CaO contendo iões  $Na^+$ . O comportamento biológico do compósito foi avaliado utilizando culturas de células osteoblásticas obtidas a partir de medula óssea humana e efectuadas na superfície do material. Estudou-se também o efeito de três hormonas – dexametasona, hormona da paratiróide e hormona do crescimento e dois antibióticos – doxiciclina e minociclina, no desenvolvimento do fenótipo osteoblástico destas culturas com o objectivo de modular os fenómenos biológicos envolvidos na interacção células osteoblásticas/biomaterial. O comportamento do compósito foi comparado com o da hidroxiapatite, nas mesmas condições experimentais.

As culturas de células ósseas humanas, quando devidamente caracterizadas, constituem um modelo *in vitro* apropriado para o estudo dos fenómenos biológicos que ocorrem na interface tecido ósseo/material. A primeira parte do trabalho (capítulo II) visou otimizar as condições experimentais para a obtenção de culturas celulares que apresentassem uma expressão completa do fenótipo osteoblástico, adequadas para estudar as interacções entre o tecido ósseo e os biomateriais. Assim, foi comparado o comportamento de células de medula óssea humana mantidas em dois meios de cultura largamente utilizados,  $\alpha$ -Minimal Essential Medium Eagle ( $\alpha$ -MEM) e Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), ao longo de sucessivas subculturas e avaliada a influência de vários compostos, na presença isolada ou em combinação, que favorecem o desenvolvimento de culturas com características osteoblásticas: ácido ascórbico (AA),  $\beta$ -glicerofosfato ( $\beta$ -GF) e

dexametasona (Dex). A caracterização de culturas de células ósseas foi efectuada pela avaliação de parâmetros morfológicos e funcionais característicos das células osteoblásticas. Os resultados obtidos mostraram que as células da primeira subcultura cultivadas em  $\alpha$ -MEM, na presença de ácido ascórbico ( $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ),  $\beta$ -glicerofosfato ( $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) e na ausência ou presença de dexametasona ( $10 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), apresentaram desenvolvimento completo do fenótipo osteoblástico evidenciado por uma elevada actividade da fosfatase alcalina e formação de uma matriz extracelular mineralizada.

Foram de seguida efectuados estudos no sentido de avaliar o efeito de vários fármacos no comportamento de proliferação/diferenciação das células osteoblásticas, cultivadas nas condições experimentais descritas no capítulo II. Assim, avaliou-se a resposta de células de medula óssea humana a três hormonas que têm um papel importante nos mecanismos de regulação do metabolismo ósseo (dexametasona – Dex, hormona da paratiróide – PTH e hormona do crescimento) e a dois antibióticos que se utilizam no tratamento de infecções que se observam em cirurgia óssea reconstrutiva (doxiciclina e minociclina). A escolha das concentrações a utilizar baseou-se em resultados de estudos anteriores relativos ao efeito destas substâncias no metabolismo ósseo. Os resultados são apresentados no capítulo III.

Uma vez que alguns compostos exibem diferentes efeitos nas células ósseas de acordo com o estado de diferenciação celular, a adição da Dex, da PTH e da hormona do crescimento foi feita durante períodos seleccionados do tempo de cultura, representativos de populações celulares em diferentes estados de diferenciação. Os resultados obtidos mostraram que em culturas que crescem na presença de ácido ascórbico e  $\beta$ -glicerofosfato, a presença adicional de Dex ( $10 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) ou de PTH ( $10 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) resultou na estimulação do desenvolvimento do fenótipo osteoblástico. Em ambos os casos, esta indução foi mais significativa quando as culturas foram expostas às hormonas durante todo o período de incubação ou apenas durante a 1ª semana. A Dex estimulou a proliferação e diferenciação de células osteoprogenitoras e também de osteoblastos presentes num estado de diferenciação menos adiantado, enquanto que o seu efeito sobre os osteoblastos mais diferenciados foi menor. Os resultados obtidos também sugerem que a PTH está intimamente ligada à diferenciação osteoblástica, inibindo a diferenciação das células osteoblásticas mais maduras e favorecendo as que se encontram num estado imaturo.



A hormona do crescimento ( $50 \text{ ng.ml}^{-1}$ ), no sistema celular estudado, pareceu actuar essencialmente a nível da proliferação, uma vez que o crescimento das células em cultura foi estimulado e o efeito sobre a expressão fenotípica foi menos significativo. O estudo da acção desta hormona foi efectuado em culturas celulares mantidas permanentemente com 10% de soro bovino fetal e sobre culturas celulares que cresceram temporariamente na ausência de soro, visto que o soro constitui uma fonte de nutrientes e hormonas. Em ambas as situações, as culturas foram expostas à acção da hormona do crescimento por períodos de 24 horas ao longo do tempo de incubação. O efeito promotor desta hormona na proliferação celular foi observado tanto em células mantidas na presença como na ausência de soro bovino fetal. Contudo, as culturas que cresceram na presença de soro apresentaram um crescimento celular superior ao das culturas mantidas na ausência de soro.

O comportamento de culturas osteogénicas foi estudado na presença de doxiciclina e de minociclina, uma vez que estes fármacos, além de terem um espectro antibacteriano apropriado para o tratamento de infecções ósseas e de atingirem concentrações eficazes no tecido ósseo, parecem exercer um efeito benéfico nos processos de regeneração óssea. Deste modo, foi avaliada a resposta de células osteoblásticas a uma gama de concentrações de doxiciclina ( $1 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$ ,  $5 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$ ,  $10 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$  e  $25 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$ ) e de minociclina ( $1 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$ ,  $5 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$ ,  $10 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$ ,  $25 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$  e  $50 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$ ). Os resultados obtidos mostraram que estes dois antibióticos, quando utilizados em baixas concentrações, actuam como promotores da proliferação das células osteoblásticas. A exposição das células a concentrações superiores pareceu inibir a diferenciação ( $10 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$  de minociclina), atrasar a proliferação ( $10 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$  de doxiciclina e  $25 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$  de minociclina) ou exercer um efeito citotóxico ( $25 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$  de doxiciclina e  $50 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$  de minociclina).

O trabalho desenvolvido nos capítulos II e III permitiu a optimização das condições de cultura de células de medula óssea humana de modo a observar-se o crescimento de células osteogénicas na superfície do compósito e a expressão completa do fenótipo osteoblástico. Assim, foi possível estudar o comportamento biológico do compósito de hidroxiapatite-biovidro utilizando culturas de células osteoblásticas provenientes de medula óssea humana e modular farmacologicamente a interacção entre estas células e o biomaterial (capítulo IV).



As amostras do compósito foram incubadas durante 21 dias em meio de cultura, antes de serem cultivadas com células de medula óssea, uma vez que a pré-imersão dos materiais contribui para aumentar o desempenho biológico dos materiais cerâmicos. As culturas efectuadas na superfície do compósito na ausência de fármacos apresentaram desenvolvimento completo do fenótipo osteoblástico. A avaliação da modulação farmacológica da interacção entre o compósito e células osteoblásticas de medula óssea humana mostrou que a presença dos fármacos utilizados afectou significativamente o comportamento de proliferação/diferenciação celular. A exposição contínua das culturas efectuadas na superfície do compósito à Dex ( $10 \text{ nmol.L}^{-1}$ ) e à PTH ( $10 \text{ nmol.L}^{-1}$ ) resultou na estimulação do crescimento celular e na indução da diferenciação osteoblástica. A presença da hormona do crescimento ( $50 \text{ ng.ml}^{-1}$ ) por períodos de 24 horas ao longo do tempo de incubação resultou num aumento significativo da proliferação mas numa diminuição da diferenciação celular. As culturas efectuadas na superfície do compósito na presença de doxiciclina ( $1 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$ ) e minociclina ( $1 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$ ) apresentaram um aumento da proliferação celular, efeito que não foi acompanhado por uma indução da actividade da fosfatase alcalina.

Os resultados obtidos neste estudo mostraram que o compósito de hidroxiapatite–biovidro apresenta características de superfície mais apropriadas para a proliferação e diferenciação das células de medula óssea humana que a hidroxiapatite, em todas as situações estudadas. Contudo, a ordem de grandeza do efeito das hormonas e antibióticos utilizados seguiu um padrão semelhante nas culturas efectuadas na superfície dos dois materiais.

O trabalho realizado no âmbito desta tese permitiu obter informação relativamente ao desenvolvimento de um compósito de hidroxiapatite–biovidro com características de biocompatibilidade e bioactividade apropriadas para se observarem respostas específicas e desejáveis das células osteoblásticas. Os resultados relativos à modulação farmacológica do comportamento de culturas celulares de medula óssea humana efectuadas na superfície do compósito sugerem a possibilidade de uma mais rápida reconstrução óssea local e osteointegração do material na presença de fármacos relevantes.

## SUMMARY

Calcium phosphate ceramics have been widely used in clinical field, namely as orthopaedic and dental materials, because of their ability to bond to living tissue. Their clinical advantages are due to their biodegradable and/or osteoconductive characteristics, although the properties are dependent on their structure, such as chemical stoichiometry, crystallinity and surface morphology. Recently,  $P_2O_5$ -CaO glass-reinforced hydroxyapatite composites have been developed to improve properties of the calcium phosphate material and increase, as much as possible, the chemical similarity between the implanted material and bone tissue.

In this work, the composite was prepared by a liquid sintering process using  $P_2O_5$ -CaO glasses containing  $Na^+$  ions. The biological behaviour of the composite was assessed using osteoblastic human bone marrow cell cultures grown on the surface of the material. The effect of three hormones – dexamethasone, parathyroid hormone and growth hormone and two antibiotics – doxycycline and minocycline on the development of the osteoblastic phenotype of these cultures was studied, in order to modulate the biological mechanisms involved in the osteoblastic cells/biomaterial interaction. The composite performance was compared to that observed in the hydroxyapatite, in the same experimental conditions.

Well-characterised human osteoblastic cell cultures are a useful *in vitro* tool to analyse the biological events occurring at the bone tissue/materials interface. The aim of the first section of this work (chapter II) was to define the experimental conditions to obtain cell cultures with complete expression of the osteoblastic phenotype, appropriate to study bone tissue/biomaterials interactions. Therefore, the behaviour of serially passaged human bone marrow cells cultured in two widely used culture media,  $\alpha$ -Minimal Essential Medium Eagle ( $\alpha$ -MEM) and Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), was compared and the effect of several compounds, isolated or in combination, that favour osteoblastic differentiation was analysed: ascorbic acid (AA),  $\beta$ -glycerophosphate ( $\beta$ -GF) and dexamethasone (Dex). Bone cell cultures were characterised using morphological and functional osteoblastic parameters. Results showed that first passage cells grown in  $\alpha$ -MEM, in the presence of ascorbic acid ( $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ),  $\beta$ -glycerophosphate ( $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) and dexamethasone ( $10 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), presented complete expression of the osteoblastic phenotype



characterised by high alkaline phosphatase activity and the formation of a mineralised extracellular matrix.

The effect of several drugs on the proliferation/differentiation behaviour of osteoblastic cells, cultured under experimental conditions described in chapter II, was also studied. Therefore, the response of human bone marrow cells to three hormones which play an important role in the mechanisms of bone metabolism regulation (dexamethasone – Dex, parathyroid hormone – PTH and growth hormone) and to two antibiotics used in the treatment of infections that appear in reconstructive bone surgery (doxycycline and minocycline) was evaluated. The choice of the used concentrations was based in results of previous studies concerning the effect of these substances in the bone metabolism. Results are presented in chapter III.

Since several compounds exert different effects on bone cells depending on the cellular differentiation stage, the addition of Dex, PTH and growth hormone was made during selected periods of the culture time, representative of cellular populations in different differentiation stages. Results showed that in cultures grown in the presence of ascorbic acid and  $\beta$ -glycerophosphate, the addition of Dex ( $10 \text{ nmol.L}^{-1}$ ) or PTH ( $10 \text{ nmol.L}^{-1}$ ) resulted in the stimulation of development of the osteoblastic phenotype. In both cases, this induction was more significant when cultures were exposed to the hormones during the entire incubation time or during the first week only. Dex stimulated the proliferation and differentiation of osteoprogenitor cells and also of less differentiated osteoblasts, while its effect on more differentiated osteoblasts was smaller. Results suggest that PTH is closely linked to the osteoblastic differentiation; the hormone inhibits the differentiation of more mature osteoblasts and favour those found in an immature stage.

Growth hormone ( $50 \text{ ng.ml}^{-1}$ ), in this cellular system, appears to act essentially on the proliferation level, once the cultured cell growth was increased and the effect upon the phenotypic expression was less significant. The study of this hormone action was realised in cell cultures grown continuously with 10% foetal bovine serum and in cell cultures grown temporarily in the absence of serum, once this compound is a source of nutrients and hormones. In both situations, cultures were exposed to the growth hormone for periods of 24 hours during the incubation time. The increased effect of this hormone on cellular proliferation was observed both in cultures grown in the absence and in the presence of



foetal bovine serum. However, cultures grown in the presence of the serum presented a higher cellular growth.

The behaviour of osteogenic cultures was studied in the presence of doxycycline and minocycline, once these drugs, besides having an antibacterial spectrum appropriate to the treatment of bone infections and reaching efficient concentrations in the bone tissue, appear to exert a beneficial effect on the bone regeneration mechanisms. Therefore, the response of osteoblastic cells to a range of concentrations of doxycycline (1  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , 5  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , 10  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  and 25  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) and minocycline (1  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , 5  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , 10  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , 25  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  and 50  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) was evaluated. Results showed that these antibiotics, when used at low concentrations, act as promoters of the osteoblastic cells proliferation. The exposition of the cells to higher concentrations seemed to inhibit the differentiation (10  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  of minocycline), delay the proliferation (10  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  of doxycycline and 25  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  of minocycline) or exert a cytotoxic effect (25  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  of doxycycline and 50  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  of minocycline).

The work presented in chapters II and III allowed the definition of human bone marrow cell culture conditions, in order to observe the proliferation of osteogenic cells on the surface of the composite and the complete expression of the osteoblastic phenotype. Thus, it was possible to study the biological behaviour of the glass-reinforced hydroxyapatite composite using human bone marrow osteoblastic cell cultures and to pharmacologically modulate the cells/biomaterial interaction (chapter IV).

The samples of the composite were incubated during 21 days in culture medium, before being seeded with bone marrow cells, once the pre-immersion of materials contributes to increase the biological performance of calcium phosphate ceramics. The cultures grown on the surface of the composite in the absence of drugs presented complete development of the osteoblastic phenotype. The evaluation of the pharmacological modulation of the composite/human bone marrow osteoblastic cells interaction showed that the presence of the drugs affected significantly the behaviour of cellular proliferation/differentiation. The continuous exposition of the cultures grown on the surface of the composite to Dex (10  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) and PTH (10  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) resulted in the stimulation of the cellular growth and the induction of the osteoblastic differentiation. The presence of growth hormone (50  $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) for periods of 24 hours during the incubation time increased significantly the proliferation but reduced the

cellular differentiation. The cultures grown on the surface of the composite in the presence of doxycycline ( $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) and minocycline ( $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) presented an increase of the cellular proliferation, effect that was not followed by an induction of the alkaline phosphatase activity.

The results of this study showed that the glass-reinforced hydroxyapatite composite present surface characteristics more appropriate to the proliferation and differentiation of human bone marrow cells than hydroxyapatite, in all the tested situations. However, the level of response of the hormones and drugs was identical in cultures grown on the surface of both materials.

The presented work allowed for the development of a glass-reinforced hydroxyapatite lass composite with characteristics of biocompatibility and bioactivity appropriate to observe specific and desirable responses of the osteoblastic cells. The results related to the pharmacological modulation of the behaviour of human bone marrow cell cultures grown on the surface of the composite suggest the possibility of a faster local bone reconstruction and material osteointegration in the presence of relevant drugs.



## RÉSUMÉ

Les céramiques de phosphate de calcium sont amplement utilisées dans des applications médicales, notamment en tant que matériaux orthopédiques et dentaires, à cause de leur capacité de liaison au tissu osseux. Leurs avantages cliniques se doivent à leurs caractéristiques biodégradables et/ou ostéoconductrices, bien que leurs propriétés dépendent de leur structure, tel comme la stéquiométrie chimique, cristallinité et morphologie de surface. Récemment, des composites d'hydroxiapatite renforcée avec du verre du système  $P_2O_5$ -CaO ont été développés afin d'améliorer les propriétés du céramique et augmenter, le plus possible, la ressemblance chimique entre le matériel implanté et le tissu osseux.

Dans ce travail, le composite développé a été préparé par un processus de syntérisation en présence de phase liquide, tout en utilisant un verre du système  $P_2O_5$ -CaO contenant des ions  $Na^+$ . Le comportement biologique du composite a été évalué à travers de l'utilisation de cultures de cellules ostéoblastiques, obtenues à partir de moelle osseuse humaine et effectuées à la surface du matériel. L'effet de trois hormones – dexaméthasone, hormone de la parathyroïde – PTH et hormone de la croissance et de deux antibiotiques – doxycycline et minocycline sur le développement du phénotype ostéoblastique de ces cultures a aussi été étudié, afin de moduler les mécanismes biologiques engagés dans l'interaction cellules ostéoblastiques/biomatériau. Le comportement du composite a été comparé avec celui de l'hydroxiapatite, dans les mêmes conditions expérimentales.

Les cultures de cellules osseuses humaines, bien caractérisées, sont un modèle *in vitro* approprié pour l'étude des mécanismes biologiques qui surviennent à l'interface tissu osseux/matériau. La première partie du travail (chapitre II) a eu pour objet l'optimisation des conditions expérimentales pour l'obtention de cultures cellulaires qui présenteraient une expression complète du phénotype ostéoblastique, appropriées pour étudier les interactions entre le tissu osseux et les biomatériaux. Ainsi, le comportement de cellules de moelle osseuse humaine cultivées en deux milieux de culture largement utilisés,  $\alpha$ -Minimal Essential Medium Eagle ( $\alpha$ -MEM) et Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), au cours de successives subcultures a été comparé et l'influence de divers composés, isolés ou en combinatio, qui favorissent le développement de cultures avec des caractéristiques ostéoblastiques: acide ascorbique,  $\beta$ -glicerophosphate et dexaméthasone. La caractérisation



des cultures de cellules osseuses a été effectuée par l'avaliation de paramètres morphologiques et fonctionnels caractéristiques des cellules ostéoblastiques. Les résultats obtenus ont démontré que les cellules de la première subculture cultivées en  $\alpha$ -MEM, en présence d'acide ascorbique ( $50 \mu\text{g.ml}^{-1}$ ),  $\beta$ -glicerophosphate ( $10 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) et dexaméthasone ( $10 \text{ nmol.L}^{-1}$ ), ont présenté le développement complet du phénotype ostéoblastique caractérisé par une haute activité de la phosphatase alcaline et la formation d'une matrice extracellulaire minéralisée).

En suivant, nous avons effectué une évaluation de l'effet de diverses drogues sur le comportement de prolifération/différenciation des cellules ostéoblastiques, cultivées dans les conditions expérimentales décrites dans le chapitre II. Ainsi, la réponse des cellules de moelle osseuse humaine à trois hormones qui jouent un rôle important dans les mécanismes de régulation du métabolisme osseux (dexaméthasone, hormone de la parathyroïde et hormone de la croissance) et à deux antibiotiques qui sont utilisés pour le traitement d'infections qui peuvent être observées en chirurgie osseuse reconstructive (doxycycline et minocycline), a été étudiée. Le choix des concentrations à utiliser a eu pour base des résultats obtenus par des études antérieures relatives à l'effet de ces substances sur le métabolisme osseux. Les résultats sont présentés dans le chapitre III.

Vu que l'effet produit par certains composés sur les cellules osseuses dépend de l'état de différenciation, l'addition de la dexaméthasone, de la PTH et de l'hormone de la croissance a été faite pendant des périodes sélectionnées du temps de culture, représentatives de populations cellulaires en différents états de différenciation. Les études menées ont montré que dans les cultures qui se trouvent en présence d'acide ascorbique et de  $\beta$ -glicerophosphate, la présence additionnelle de dexaméthasone ( $10 \text{ nmol.L}^{-1}$ ) ou de PTH ( $10 \text{ nmol.L}^{-1}$ ) a provoqué une stimulation du développement du phénotype ostéoblastique. Dans les deux cas, cette induction a été plus significative quand les cultures ont été exposées aux hormones pendant tout le temps d'incubation ou à peine pendant la première semaine. La Dex a stimulé la prolifération et différenciation de cellules mères des ostéoblastes et aussi d'ostéoblastes présents dans un état de différenciation moins avancé, alors que son effet sur les ostéoblastes plus différenciés a été moins marquant. Les résultats obtenus suggèrent que la PTH exerce une influence sur la différenciation ostéoblastique; l'hormone inhibe la

différentiation des cellules ostéoblastiques plus mûres et favorit celles qui se trouvent dans un état précoce.

L'hormone de la croissance ( $50 \text{ ng.ml}^{-1}$ ), dans le système cellulaire étudié, paraît agir essentiellement au niveau de la prolifération, vu que la croissance des cellules en culture a été stimulée, pendant que l'effet sur l'expression du phénotype a été moins significative. L'étude de l'action de cette hormone a été faite en absence et en présence de 10% de sérum bovin foetal, une fois que le sérum est une source de nourissants et d'hormones. Dans les deux cas, les cultures ont été exposées à l'action de l'hormone de la croissance pendant des périodes de 24 heures au cours du temps d'incubation. L'effet promoteur de cette hormone sur la prolifération cellulaire a été observé dans les cellules maintenues en présence ou en absence du sérum. Cependant, les cultures qui ont grandi en présence de sérum ont présenté une croissance cellulaire supérieure à celle des cultures maintenues en absence du sérum.

Le comportement de cultures ostéogéniques a été étudié en présence de doxycycline et de minocycline, vu que ces médicaments, par ailleurs d'avoir un spectre antibactérien approprié pour le traitement d'infections osseuses et d'atteindre des concentrations efficaces dans le tissu osseux, exercent un effet bénéficiel dans les mécanismes de régénération osseuse. Ainsi, la réponse des cellules ostéoblastiques à une série de concentrations de doxycycline ( $1 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$ ,  $5 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$ ,  $10 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$  et  $25 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$ ) et de minocycline ( $1 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$ ,  $5 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$ ,  $10 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$ ,  $25 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$  et  $50 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$ ) a été évaluée. Les résultats obtenus ont montré que ces deux antibiotiques, en petites concentrations, ont une fonction promotrice de la prolifération des cellules ostéoblastiques. L'exposition des cellules aux hautes concentrations inhibe la différenciation ( $10 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$  de minocycline), provoque le retard de la prolifération ( $10 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$  de doxycycline et  $25 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$  de minocycline) ou exerce un effet cytotoxique ( $25 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$  de doxycycline et  $50 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$  de minocycline).

Le travail effectué dans les chapitres II et III a permis l'optimization des conditions de culture de cellules de moelle osseuse humaine, afin d'observer la croissance de cellules ostéogéniques à la surface du composite et l'expression complète du phénotype ostéoblastique. Ainsi, il a été possible d'étudier le comportement biologique du composite d'hydroxiapatite–bioverre tout en utilisant des cultures de cellules ostéoblastiques obtenues



a partir de moelle osseuse humaine et de moduler pharmacologiquement l'interaction entre ces cellules et le biomatériau (chapitre IV). Les échantillons du composite ont été incubés pendant 21 jours dans du milieu de culture, avant d'être couverts par des cellules de moelle osseuse, vu que la pré-immersion des matériaux contribue pour l'augmentation de la performance biologique des matériaux ceramiques. Les cultures effectuées à la surface du composite en absence de drogues ont présenté le développement complet du phénotype ostéoblastique. L'évaluation de la modulation pharmacologique de l'interaction entre le composite et les cellules ostéoblastiques de moelle osseuse humaine a montré que la présence des substances utilisées a affecté significativement le comportement de prolifération/différentiation cellulaire. L'exposition continue des cultures effectuées à la surface du composite à la Dex ( $10 \text{ nmol.L}^{-1}$ ) et à la PTH ( $10 \text{ nmol.L}^{-1}$ ) a stimulé la croissance cellulaire et a induit la différenciation ostéoblastique. La présence de l'hormone de la croissance ( $50 \text{ ng.ml}^{-1}$ ) pendant des périodes de 24 heures au cours du temps d'incubation a provoqué une augmentation significative de la prolifération et une diminution de la différenciation cellulaire. Les cultures effectuées à la surface du composite en présence de doxycycline ( $1 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$ ) et de minocycline ( $1 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$ ) ont présenté une augmentation de la prolifération cellulaire, effet qui n'a pas été accompagnée par une induction de l'activité de la phosphatase alcaline.

Les résultats obtenus par ce travail ont démontré que le composite d'hydroxiapatite-bioverre présente des caractéristiques de surface plus appropriées pour la prolifération et la différenciation de cellules de moelle osseuse humaine que l'hydroxiapatite, dans toutes les situations étudiées. Cependant, l'ordre de grandeur de l'effet des hormones et des antibiotiques utilisés a suivi un modèle semblable dans les cultures effectuées à la surface des deux matériaux.

Le travail réalisé dans cette dissertation a permis l'obtention d'information relativement au développement d'un composite d'hydroxiapatite-bioverre avec des caractéristiques de biocompatibilité et bioactivité appropriées pour que l'on puisse observer des réponses spécifiques et désirables des cellules ostéoblastiques. Les résultats relatifs à la modulation pharmacologique du comportement de cultures cellulaires de moelle osseuse humaine effectuées à la surface du composite suggèrent la possibilité d'une reconstruction osseuse locale et ostéointégration du matériel plus rapides en présence de drogues relevantes.



## ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E FÓRMULAS

AA	Ácido Ascórbico
A.cm <sup>-2</sup>	Absorvância por centímetro quadrado
AND	Ácido Desoxirribonucleíco
ADP	Difosfato de adenosina (“Adenosine Diphosphate”)
α-MEM	“α-Minimal Essential Medium Eagle”
AMP	Monofosfato de adenosina (“Adenosine Monophosphate”)
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina (“Adenosine MonoPhosphate ciclic”)
ARN	Ácido Ribonucleíco
α-TCP	α-tricálcio de fosfato
ATP	Trifosfato de adenosina (“Adenosine Triphosphate”)
As	Arsénio
B	Boro
Ba	Bário
β-GF	β-glicerofosfato
BMP	Proteínas morfogenéticas ósseas (“Bone Morphogenetic Proteins”)
BO <sub>2</sub>	Dióxido de boro
B <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Trióxido de boro
Br	Bromo
β-TCP	β-tricálcio de fosfato
°C	Grau centígrado
°C.min <sup>-1</sup>	Grau centígrado por minuto
Ca	Cálcio
Ca <sup>2+</sup>	Ião cálcio
CaF <sub>2</sub>	Fluoreto de cálcio
Ca <sub>i</sub>	Cálcio ionizado
CaO	Óxido de cálcio
CaPO <sub>4</sub>	Fosfato de cálcio
Ca <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub>	Hidroxiapatite
Ca/P	Razão entre o cálcio e o fósforo
Cd	Cádmio
Célula.cm <sup>-2</sup>	Número de células por centímetro quadrado
CFU	Unidade formadora de colónias fibroblásticas (“Colony – Forming Unit – Fibroblastic”)
Cl	Cloro
cm <sup>2</sup>	Centímetro quadrado
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CO <sub>3</sub>	Carbonato
CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	Ião carbonato
Col.	Colaboradores

<b>Cr</b>	Crómio
<b>CTP</b>	Conteúdo total de proteína
<b>CuSO<sub>4</sub></b>	Sulfato de cobre
<b>Dex</b>	Dexametasona
<b>DHAA</b>	Ácido L-desidroascórbico
<b>DMEM</b>	“Dulbecco’s Modified Eagle’s medium”
<b>ed.</b>	Edição
<b>Ed.</b>	Editor
<b>Eds.</b>	Editores
<b>etc</b>	Et cetera
<b>F</b>	Flúor
<b>F<sup>-</sup></b>	Ião fluoreto
<b>FA</b>	Fosfatase alcalina
<b>FGF</b>	Factor de crescimento fibroblástico (“Fibroblastic Growth Factor”)
<b>Fig.</b>	Figura
<b>Figs.</b>	Figuras
<b>g</b>	Gramas
<b>g.L<sup>-1</sup></b>	Gramas por litro
<b>g.ml<sup>-1</sup></b>	Gramas por mililitro
<b>Ge</b>	Germânio
<b>Gpa</b>	Giga Pascal
<b>h</b>	Horas
<b>H</b>	Hidrogénio
<b>H<sup>+</sup></b>	Ião hidreto <i>protão</i>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Água
<b>HA</b>	Hidroxiapatite
<b>HCl</b>	Ácido clorídrico
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	Ácido sulfúrico
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentração inibitória 50
<b>IGFs</b>	Factores de crescimento semelhantes à insulina (“Insulin-like Growth Factors”)
<b>IL</b>	Interleucina
<b>K</b>	Potássio
<b>K<sup>+</sup></b>	Ião potássio
<b>K<sub>2</sub>O</b>	Óxido de potássio
<b>L</b>	Litro
<b>LD<sub>50</sub></b>	Dose letal 50
<b>M</b>	Molar
<b>MEV</b>	Microscopia electrónica de varrimento
<b>Mg</b>	Magnésio
<b>Mg<sup>2+</sup></b>	Ião magnésio
<b>mg</b>	Miligramas
<b>mg.mL<sup>-1</sup></b>	Miligramas por mililitro
<b>min.</b>	Minutos

<b>mL</b>	Mililitro
<b>mmol</b>	Milimole
<b>mmol.L<sup>-1</sup></b>	Milimole por litro
<b>µg</b>	Micrograma
<b>µg.cm<sup>-2</sup></b>	Micrograma por centímetro quadrado
<b>µg.ml<sup>-1</sup></b>	Micrograma por mililitro
<b>µL</b>	Microlitro
<b>µm</b>	Micrómetro
<b>µM</b>	Micromolar
<b>MPa</b>	Mega Pascal
<b>MPa. m<sup>1/2</sup></b>	Mega Pascal por raiz quadrada de metro
<b>MTT</b>	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
<b>Na</b>	Sódio
<b>Na<sup>+</sup></b>	Ião sódio
<b>Na<sub>2</sub>O</b>	Óxido de sódio
<b>NaOH</b>	Hidróxido de sódio
<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>	Carbonato de sódio
<b>NH<sub>4</sub>OH</b>	Hidróxido de amónio
<b>ng</b>	Nanograma
<b>ng.mL<sup>-1</sup></b>	Nanograma por mililitro
<b>nm</b>	Nanómetro
<b>nmol</b>	Nanomole
<b>nmol.L<sup>-1</sup></b>	Nanomole por litro
<b>nmol.min<sup>-1</sup>.cm<sup>2</sup></b>	Nanomole por minuto e por centímetro quadrado
<b>nmol.min<sup>-1</sup>.µg prot.<sup>-1</sup></b>	Nanomole por minuto e por micrograma de proteína
<b>O<sub>2</sub></b>	Oxigénio
<b>OH<sup>-</sup></b>	Ião hidróxido
<b>P</b>	Fósforo
<b>Pb</b>	Chumbo
<b>PBS</b>	Solução tamponada de fosfato Dulbecco ("Dulbecco's Phosphate Buffered Saline")
<b>PDGF</b>	Factor de crescimento derivado de plaquetas ("Platelet-Derived Growth Factor")
<b>PE</b>	Polietileno
<b>PGE<sub>2</sub></b>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
<b>P<sub>i</sub></b>	Fósforo ionizado
<b>pmol</b>	Picomole
<b>pmol.ml<sup>-1</sup></b>	Picomole por mililitro
<b>PO<sub>4</sub></b>	Fosfato
<b>PO<sub>4</sub><sup>3-</sup></b>	Ião fosfato
<b>P<sub>2</sub>O<sub>5</sub></b>	Pentóxido de fósforo
<b>Prot.</b>	Proteína
<b>PTH</b>	Paratormona; hormona da paratiróide
<b>S</b>	Enxofre
<b>SBF</b>	Soro Bovino Fetal



<b>Si</b>	Silício
<b>SiO<sub>2</sub></b>	Óxido de silício
<b>Sr</b>	Estrôncio
<b>TGF</b>	Factor de crescimento transformador ("Transforming Growth Factor")
<b>TCP</b>	Tricálcio de fosfato
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>V</b>	Vanádio
<b>v/v</b>	Volume por volume
<b>Zn<sup>2+</sup></b>	Ião zinco
<b>λ</b>	Comprimento de onda
<b>%</b>	Porcentagem
<b>±</b>	Mais ou menos
<b>&lt;</b>	Inferior a
<b>&gt;</b>	Superior a
<b>≤</b>	Menor ou igual a
<b>x</b>	Vezes
<b>1<sup>a</sup></b>	Primeira
<b>2<sup>a</sup></b>	Segunda
<b>3<sup>a</sup></b>	Terceira
<b>4<sup>a</sup></b>	Quarta
<b>5<sup>a</sup></b>	Quinta

# ÍNDICE

Agradecimentos

Publicações

Resumo

Summary

Résumé

Abreviaturas, símbolos e fórmulas

Índice

Contexto e objectivos	1
<b>Capítulo I – Introdução geral</b>	
1. A biocompatibilidade e os biomateriais	6
2. Tecido ósseo	10
2.1. Células ósseas	10
2.2. Matriz extracelular	14
2.3. Remodelação óssea	18
2.4. Mecanismos de regulação da remodelação óssea	20
2.5. Perda óssea e fracturas	20
3. Os cerâmicos em implantologia	22
3.1. Bioactividade	25
3.2. Hidroxiapatite	27
3.2.1. Composição química	28
3.2.2. Hidroxiapatites biológicas	28
3.2.3. Hidroxiapatites sintéticas	29
3.2.4. Fosfatos de cálcio relacionados	29
3.2.5. Estrutura cristalina	30
3.2.6. Estabilidade térmica	30
3.2.7. Solubilidade	31
3.2.8. Propriedades mecânicas	31
3.2.9. Aplicações médicas	32

3.3. Biovidros	32
3.4. Compósitos	34
4. Interações entre o biomaterial e o ambiente biológico	36
4.1. Formação da interface inicial	37
4.2. Efeitos do meio biológico sobre o material	37
4.3. Resposta tecidual local	39
4.4. Resposta tecidual sistêmica e remota	42
5. Avaliação da biocompatibilidade	43
Culturas de células osteogênicas	48
Relação entre proliferação e diferenciação osteoblástica	49

**Capítulo II – Utilização de culturas de células osteoblásticas humanas como modelo *in vitro* no estudo das interações tecido ósseo/biomateriais: influência das condições de cultura**

1. Introdução	52
2. Cultura de células de medula óssea humana: influência do meio de cultura	54
2.1. Material e métodos	54
2.2. Resultados	59
2.3. Discussão	69
2.4. Conclusão	71
3. Cultura de células de medula óssea humana: efeito de ácido ascórbico, $\beta$ -glicerofosfato e dexametasona na diferenciação osteoblástica	72
3.1. Material e métodos	72
3.2. Resultados/discussão	73
3.3. Conclusão	82

**Capítulo III – Utilização de culturas de células osteoblásticas humanas como modelo *in vitro* no estudo das interações tecido ósseo/biomateriais: modulação farmacológica do comportamento de proliferação/diferenciação**

1. Introdução	85
2. Modulação hormonal do comportamento osteoblástico de culturas celulares de medula óssea humana	87
2.1. Efeito da dexametasona	88
2.1.1. Material e métodos	89



2.1.2. Resultados	91
2.1.3. Discussão	98
2.2. Efeito da hormona da paratiróide	101
2.2.1. Material e métodos	104
2.2.2. Resultados	105
2.2.3. Discussão	112
2.3. Efeito da hormona do crescimento	114
2.3.1. Material e métodos	116
2.3.2. Resultados	118
2.3.3. Discussão	122
3. Efeito da doxiciclina e da minociclina no comportamento osteoblástico de culturas celulares de medula óssea humana	124
3.1. Material e métodos	126
3.2. Resultados	127
3.3. Discussão	133
4. Conclusão	136

**Capítulo IV – Modulação farmacológica da interacção células osteoblásticas/compósito de hidroxiapatite–biovidro**

1. Introdução	140
2. Obtenção e caracterização do composto de hidroxiapatite–biovidro	142
2.1. Caracterização da hidroxiapatite	142
2.2. Preparação do composto de hidroxiapatite–biovidro	143
2.3. Preparação das amostras de hidroxiapatite e do composto de hidroxiapatite–biovidro	143
2.4. Propriedades mecânicas do composto de hidroxiapatite–biovidro	144
3. Modulação farmacológica do comportamento de células osteoblásticas humanas cultivadas na superfície dos materiais	146
3.1. Material e métodos	146
3.2. Resultados	148
3.2.1. Efeito da dexametasona, hormona da paratiróide e hormona do crescimento	150
3.2.2. Efeito da doxiciclina e minociclina	169
3.3. Discussão	180

**Capítulo V – Conclusões finais**

187

**Bibliografia**

198

## CONTEXTO E OBJECTIVOS

O uso clínico de biomateriais osteocompatíveis e bioactivos tem importantes aplicações em cirurgia maxilofacial e ortopédica. O desenvolvimento de materiais para substituição óssea tem sido dirigido para a utilização de materiais que permitem que o osso adira e cresça à sua superfície.

Entre os materiais cerâmicos, a hidroxiapatite, por possuir uma composição química semelhante à do tecido ósseo e apresentar uma boa adesão a este, tem sido extensivamente utilizada em aplicações biomédicas. Contudo, as limitações das suas propriedades mecânicas, quando comparada por exemplo com os biovidros, reduziram o seu uso a aplicações de baixas cargas. Por isso, é necessário desenvolver compósitos que reúnem as excelentes características de biocompatibilidade da hidroxiapatite e as propriedades de elevada resistência mecânica dos biovidros.

A apatite natural do osso e a apatite sintética possuem pequenas mas significativas diferenças atômicas, o que atrasa a resposta óssea dos implantes de hidroxiapatite. Tais diferenças parecem dever-se à cristalografia da apatite natural que permite que ocorram várias substituições iônicas dentro da estrutura e, assim, a parte inorgânica do osso contém vários íons residuais como por exemplo  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  e  $\text{F}^-$ . Além disso, a parte inorgânica do osso não consiste unicamente em apatite, mas contém igualmente resíduos de uma segunda fase de  $\beta$ -tricálcio de fosfato. Esta fase tem uma maior solubilidade que a hidroxiapatite e é considerada ser totalmente bioreabsorvível *in vivo*.

O sucesso da utilização de biomateriais para substituição do tecido ósseo pode ser comprometido por vários factores locais que dependem das características do próprio material, da manipulação durante o processo cirúrgico e da resposta do hospedeiro ao material implantado. A formação de uma interface apropriada entre o tecido ósseo e o material é essencial para que se observe aposição óssea na superfície do material. Assim, para se otimizar a formação tecidular na interface deve ter-se em consideração os factores que, em geral, influenciam o comportamento celular na superfície do material e, também, a possibilidade de modular farmacologicamente a resposta celular de modo a melhorar e tornar mais rápida a osteointegração do material. Os osteoblastos são as células



responsáveis pelo processo de formação óssea e desempenham um papel fundamental na fisiologia do tecido ósseo. Deste modo, a modulação farmacológica do comportamento das células osteoblásticas na interface tecido ósseo/biomaterial pode revestir-se de grande importância para se observar a regeneração tecidual local e a osteointegração do material. Fármacos de interesse evidente incluem hormonas e factores de crescimento que influenciam os fenómenos de regulação da formação óssea. De salientar, também, que a presença de antibióticos no local de cirurgia reconstrutiva pode revestir-se de muito interesse, pois que o aparecimento de infecções locais é relativamente frequente e pode comprometer todo o sucesso da intervenção.

O trabalho desenvolvido no âmbito desta tese tem os seguintes objectivos:

- 1) Desenvolvimento de um compósito de hidroxiapatite reforçada com biovidro de modo a melhorar as propriedades mecânicas da hidroxiapatite e aumentar a semelhança química entre os materiais cerâmicos e o tecido ósseo.
- 2) Estudo do comportamento biológico do compósito de hidroxiapatite–biovidro, utilizando culturas de células osteoblásticas obtidas de medula óssea humana.
- 3) Modulação farmacológica da interacção células osteoblásticas humanas/compósito de hidroxiapatite–biovidro.

Pretende-se avaliar o efeito de substâncias que influenciam a proliferação, diferenciação e actividade funcional das células osteoblásticas, como por exemplo, a dexametasona, hormona da paratiróide e hormona do crescimento, em culturas celulares de medula óssea humana efectuadas na superfície do compósito. Será realizado outro estudo que visa avaliar o comportamento de culturas celulares osteoblásticas efectuadas na superfície do compósito na presença de doxiciclina ou minociclina. A escolha destes antibióticos teve como justificação, além do seu espectro antibacteriano e da sua farmacocinética que permite a obtenção de concentrações eficazes no tecido ósseo, o facto de vários estudos mostrarem que estes fármacos parecem ter um efeito benéfico nos processos de regulação tecidual, portanto, influenciando também as células do hospedeiro.

Para a concretização dos objectivos 2 e 3 há necessidade de efectuar um trabalho experimental extensivo relacionado com a obtenção de um sistema *in vitro* apropriado para estudar o comportamento biológico do compósito de hidroxiapatite–biovidro e a

possibilidade da sua modulação farmacológica. Estes estudos serão efectuados na ausência de materiais e incluem:

- Obtenção e caracterização de culturas de células osteoblásticas a partir de medula óssea humana com um comportamento bem definido e reprodutível. Será assim efectuado um trabalho no sentido de otimizar as condições experimentais a utilizar, de modo a obter culturas celulares com predomínio de células que apresentem uma expressão completa do fenótipo osteoblástico e que possam ser utilizadas como modelo *in vitro* para estudar o comportamento biológico do compósito de hidroxiapatite–biovidro. Estes resultados estão apresentados no capítulo II.
- Modulação farmacológica do comportamento de culturas celulares de medula óssea humana na presença de (1) dexametasona, hormona da paratiróide e hormona do crescimento e (2) doxiciclina e minociclina. Os efeitos destes fármacos serão avaliados relativamente à concentração, duração da exposição e estado de diferenciação das células osteoblásticas. Estes resultados são apresentados no capítulo III.

Estes dois estudos providenciarão informação sobre o comportamento das culturas celulares na presença de dexametasona, hormona da paratiróide e hormona do crescimento e, também, de doxiciclina e minociclina de modo a otimizar as condições experimentais para a obtenção de diferenciação osteoblástica em culturas de células de medula óssea humana efectuadas na superfície do compósito de hidroxiapatite–biovidro (para cumprimento do objectivo 3, resultados que estão apresentados no capítulo IV).

A concretização dos objectivos propostos visa contribuir para o desenvolvimento de materiais com características de biocompatibilidade e bioactividade apropriadas para se observarem respostas específicas e desejáveis das células osteoblásticas. Proporciona ainda informação relevante no que diz respeito à possibilidade de modulação farmacológica dos fenómenos biológicos que ocorrem na interface tecido ósseo/biomaterial, possibilitando uma mais rápida regeneração óssea local e osteointegração do material

A optimização das condições experimentais de modo a observar-se a expressão completa do fenótipo osteoblástico em culturas celulares de medula óssea humana efectuadas na superfície do compósito de hidroxiapatite–biovidro permite explorar a possibilidade de expandir a utilização deste material como suporte de cultura de células de medula óssea retiradas previamente do hospedeiro e o seu crescimento em condições que favorecem a diferenciação osteoblástica. A implantação de um sistema deste tipo pode representar um

procedimento lógico para o desencadear da cascata de fenómenos responsáveis pela regeneração óssea. Este aspecto é particularmente importante quando se observa um afastamento entre o tecido ósseo e o material, situação que dificulta a migração das células ósseas para o implante, por não se verificar a existência de uma interface.



# **CAPÍTULO I**

## **INTRODUÇÃO GERAL**

# 1 - A BIOCOMPATIBILIDADE E OS BIOMATERIAIS

A utilização de materiais como implantes cirúrgicos para substituição de tecidos remonta a tempos longínquos na história humana. Através dos tempos, várias tentativas foram realizadas no sentido de restaurar partes do corpo humano com a utilização de materiais. Todavia, a investigação e o desenvolvimento de novos materiais com melhores propriedades para aplicações biomédicas só se verificaram a partir da segunda metade do século XX.

Durante algum tempo, entendia-se que um material biocompatível deveria ser o mais inerte possível, de modo a evitar quaisquer efeitos nocivos nos tecidos hospedeiros. O organismo deveria ser tolerante ao material e, conseqüentemente, ignorar o implante<sup>1</sup>. Contudo, o desempenho a longo prazo dos materiais requer um contacto directo e íntimo entre o biomaterial e o ambiente biológico circundante. Assim, a interacção do tecido vivo com o biomaterial deve ser feita de modo a observar-se a osteointegração do implante utilizado, de forma a garantir a sua biofuncionalidade e sobrevivência a longo prazo<sup>2,3,4,5</sup>. Neste contexto, o termo **biocompatibilidade** foi redefinido como sendo:

“a capacidade que um material tem de originar uma resposta adequada no hospedeiro, tendo em conta uma aplicação específica”<sup>6,7,8</sup>.

Esta definição implica uma interacção bilateral, visto que a biocompatibilidade refere-se:

- a um conjunto de processos que envolvem mecanismos de interacção diferentes, mas interdependentes entre o material e o tecido<sup>7</sup>;
- à capacidade que o material tem de desempenhar uma função que depende quer das suas propriedades físicas e mecânicas, quer da sua interacção com os tecidos<sup>7</sup>;
- à resposta, dada pelo hospedeiro, que deve ser adequada à função para a qual o implante é destinado<sup>7</sup>;
- a uma aplicação específica. Nenhum material é inequivocamente biocompatível: alguns materiais podem ser biocompatíveis sob uma ou mais condições definidas, mas não podem ser considerados biocompatíveis sob todas as condições. A biocompatibilidade não é uma característica intrínseca do material<sup>7</sup>.

Um biomaterial foi inicialmente definido como sendo “um material não vivo, utilizado como dispositivo médico, projectado para interactuar com sistemas biológicos”<sup>6</sup>. Como esta definição se restringia a materiais não vivos, foi considerada insuficiente e em 1991, na Conferência sobre Consenso nas Definições em Biomateriais, o termo biomaterial foi redefinido como sendo “um material destinado a contactar com sistemas biológicos para avaliar, tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do organismo”<sup>7</sup>.

Um biomaterial deve interactuar com os tecidos nos quais é implantado, mantendo a sua estrutura e propriedades, sem provocar alterações no meio fisiológico envolvente.

Tabela I – Aplicações médicas de biomateriais<sup>9</sup>.

Aplicações	Número/ano
<b>Oftalmológica</b>	
Lentes intra-oculares	1400000
Lentes de contacto	250000000
Implantes de retina	50000
<b>Cardiovascular</b>	
Enxertos vasculares	350000
Válvulas cardíacas	75000
“Pacemakers”	130000
Sacos para sangue	30000000
“Shunts” arteriovenosos	150000
<b>Reconstrutiva</b>	
Próteses para o peito	100000
nariz, queixo	10000
Próteses dentárias	20000
Próteses do pénis	40000
<b>Ortopédica</b>	
Ancas	90000
Joelhos	65000
Ombros, articulações dos dedos	50000
<b>Outros engenhos</b>	
“Shunts” ventriculares	21500
Catéteres	200000000
Oxigenatórios	500000
Dialisadores renais	16000000
Drenos	3000000
Suturas	20000000



Hoje em dia, os biomateriais são estudados exaustivamente, quer pelas suas características, quer pelo desempenho biológico que podem apresentar. A crescente utilização dos biomateriais tem sido notável. Tem-se assistido a uma explosão no número e variedade de implantes cirúrgicos utilizados no tratamento de numerosos problemas médicos<sup>10</sup>. A tabela I fornece-nos uma estimativa do número de engenhos biomédicos utilizados, actualmente nos Estados Unidos da América, nas diversas áreas clínicas.

O aumento no número de implantes foi acompanhado por uma maior esperança de vida dos doentes que recebem um implante. Devido ao aumento do número de traumatismos, cada vez mais são implantadas próteses articulares em pessoas mais jovens. Como consequência, é necessário prolongar o tempo de vida destas próteses, que hoje em dia se situa entre os 10 e os 12 anos.

Os materiais sintéticos correntemente utilizados como biomateriais podem ser classificados em várias categorias:

- metais e ligas metálicas;
- polímeros;
- cerâmicos e vidros;
- compósitos.

A tabela II exemplifica as principais aplicações clínicas dos vários tipos de materiais.

Existem alguns critérios mínimos a que os materiais devem obedecer, quando são postos em contacto com os sistemas vivos<sup>11</sup>. Assim, o material deve ser:

- não-tóxico e não-cancerígeno;
- biocompatível;
- biofuncional, isto é, capaz de substituir a função afectada, que obrigou à sua presença no organismo;
- possuir força mecânica e densidade adequadas ao seu uso;
- esterilizável (resistente às radiações gama, ao óxido de etileno ou à autoclavagem);
- estável durante o processo de implantação;
- possuir uma textura de superfície conveniente para que a adesão celular possa ocorrer;
- não deve degradar *in vivo*, a menos que o processo seja intencional;

- permeável à difusão: necessário em aparelhos que funcionam como membranas extracorporais, oxigenadores sanguíneos, sistemas de libertação de fármacos e órgãos artificiais híbridos;
- tromborresistentes: os materiais que entram em contacto com o sangue não devem originar a formação de coágulos, nem a desnaturação das proteínas sanguíneas;
- barato, reprodutível e facilmente fabricável e processado em larga escala.

Tabela II – Exemplos de aplicações clínicas dos vários tipos de biomateriais<sup>7</sup>.

<b>Categoria</b>	<b>Principais aplicações</b>
Metais	Substituição óssea e de articulações Instrumentação espinal Fixação de fracturas Reconstituição e implantes dentários Encapsulação de “pacemaker” Válvulas cardíacas Agentes antibacterianos
Cerâmicos e Vidros	Substituição de articulações Reconstituições e implantes dentários Substituição, aumento e reconstituição óssea Engenhos percutâneos Revestimentos de superfície nos metais Revestimentos para engenhos hemocompatíveis
Polímeros	Substituição de articulações Suturas Substituição e aumento dos tecidos moles Próteses vasculares Sistemas de libertação de fármacos Engenhos hemocompatíveis Reconstituição dentária Lentes intra-oculares Oftalmologia
Compósitos	Reconstituição dentária Reconstituição óssea Substituição óssea e de articulações

## 2 – TECIDO ÓSSEO

O osso é um tecido mineralizado característico dos animais vertebrados. Trata-se de uma forma especializada de tecido conjuntivo no qual a matriz extracelular está calcificada, conferindo assim a propriedade de acentuada rigidez e força, mas mantendo algum grau de elasticidade<sup>12,13</sup>. Sendo um tecido especializado no suporte de forças e tensões que lhe são transmitidas pelos músculos esqueléticos, o osso é um dos tecidos mais resistente e rígido do corpo humano<sup>14</sup>. Este tecido desempenha três funções importantes<sup>12,13,14</sup>:

- 1) *mecânica*: constituinte principal do esqueleto e proporciona apoio aos músculos para a locomoção;
- 2) *protectora*: protege órgãos vitais e a medula óssea;
- 3) *metabólica*: constitui um reservatório de cálcio, fosfato e outros íons inorgânicos e participa activamente na manutenção da homeostasia do cálcio no organismo.

Morfologicamente, existem duas formas de osso: osso cortical (compacto) e osso trabecular (esponjoso). No primeiro, as fibras de colagénio estão densamente compactadas, formando lamelas concêntricas; as fibras de lamelas adjacentes dispõem-se em plano perpendicular. O osso trabecular possui uma matriz de colagénio pouco organizada e porosa, delimitando cavidades intercomunicantes que são ocupadas pela medula óssea. As diferenças existentes entre os dois tipos de osso são simultaneamente estruturais e funcionais e são as diferenças nos arranjos estruturais que influenciam as funções de cada um: o osso cortical proporciona as funções mecânica e protectora, enquanto que o osso trabecular é responsável pelas funções metabólicas.

O tecido ósseo é constituído por células ósseas e por uma matriz extracelular que possui a característica única de mineralizar.

### 2.1 – CÉLULAS ÓSSEAS

O osso é composto por quatro tipos de células: osteoblastos, osteoclastos e células de revestimento que estão presentes nas superfícies ósseas e osteócitos que se encontram no interior da matriz.



**Osteoblastos:** são descritos como sendo as células plenamente diferenciadas responsáveis pela formação óssea, durante o desenvolvimento embrionário, o crescimento, a remodelação e a reparação de fracturas e outros defeitos ósseos<sup>15</sup>. São células mononucleadas que se dispõem sempre nas superfícies ósseas, lado a lado. Quando em intensa actividade sintética, são cubóides, com citoplasma muito basófilo, núcleo pálido e retículo endoplasmático rugoso e aparelho de Golgi desenvolvidos; porém, num estado pouco activo, tornam-se achatados e a basofilia citoplasmática diminui<sup>16,17</sup>. Possuem prolongamentos citoplasmáticos que se prendem aos dos osteoblastos vizinhos. São células polarizadas, cuja secreção é eliminada pela extremidade que está em contacto com o osso. Os osteoblastos são caracterizados por uma membrana plasmática rica em fosfatase alcalina (FA) e receptores para uma variedade de hormonas, como por exemplo, a hormona da paratiróide, estrogénios e para a vitamina D<sub>3</sub>. Também apresentam receptores para estrogénios e para a vitamina D<sub>3</sub> no seu núcleo. Além destas hormonas, também respondem à hormona do crescimento e à tiroxina e a numerosos factores de crescimento (por exemplo, TGF- $\beta$  e IGF-I) que são produzidos por células pertencentes à linhagem osteoblástica<sup>15</sup> e outras células presentes no microambiente ósseo. Não possuem capacidade de se dividirem<sup>13</sup>, mas são responsáveis pela síntese e secreção dos componentes da matriz orgânica extracelular, conhecida como **osteóide** (matriz óssea ainda não calcificada), que inclui o colagénio tipo I, proteoglicanos, glicoproteínas (fosfatase alcalina, osteonectina, osteopontina, osteocalcina...), bem como os factores de crescimento que são armazenados dentro da matriz óssea (IGF, TGF- $\beta$ )<sup>13,15</sup>. Os osteoblastos regulam a mineralização da matriz óssea.

Os osteoblastos têm origem em células pluripotentes (células mesenquimais indiferenciadas) presentes no sistema fibroblástico do estroma da medula óssea e noutros tecidos conjuntivos, que são capazes de originar várias linhas celulares incluindo a linha osteogénica<sup>15,17,18</sup>. Estes precursores ou osteoprogenitores, sob o estímulo correcto, proliferam e diferenciam-se em pré-osteoblastos, osteoblastos maduros e finalmente, em osteócitos. A linha celular osteogénica (Fig. 1) compreende as células osteoblásticas e condroblásticas<sup>18</sup>.

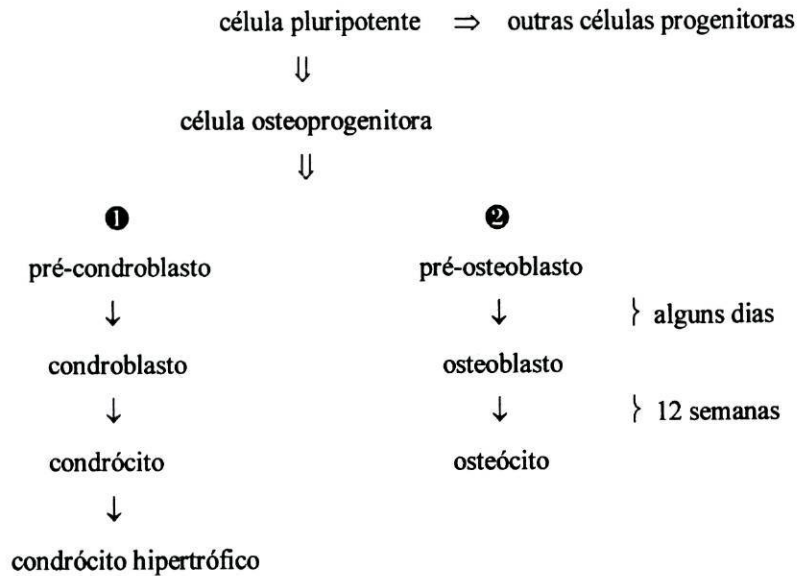


Figura 1 – Linhagem das células osteogénicas<sup>18</sup>

- ① linha de diferenciação condroblástica.
- ② linha de diferenciação osteoblástica.

Os pré-osteoblastos estão normalmente presentes próximo do local onde os osteoblastos maduros estão a sintetizar osso. São muito proliferativos e sintetizam factores de crescimento e componentes da matriz. Morfologicamente, assemelham-se aos osteoblastos maduros e possuem em comum alguns marcadores como a fosfatase alcalina<sup>13,17</sup>.

Os osteoblastos expressam todas as funções diferenciadas, necessárias para sintetizar osso. A passagem de pré-osteoblasto para osteoblasto é um processo gradual de diferenciação<sup>13</sup> que se torna completo quando a forma madura da célula atinge a superfície do osso. Aqui, os osteoblastos sintetizam e secretam uma matriz colagenosa que posteriormente mineraliza. À medida que a matriz é mineralizada, os osteoblastos ficam aprisionados, passando a denominar-se osteócitos<sup>17</sup>. Este processo ocorre para cerca de 10-20% dos osteoblastos<sup>17</sup>.

Os osteoblastos são considerados células reguladoras autocrínicas, visto sintetizarem e depositarem factores de crescimento na matriz óssea, que, após serem libertados pelos processos de reabsorção, estimulam novamente a actividade osteoblástica<sup>13</sup>.



**Osteócitos:** são considerados as células osteoblásticas mais maduras ou terminalmente diferenciadas<sup>17</sup>. Os osteócitos estão completamente envolvidos por matriz extracelular, formando um espaço denominado lacuna. As lacunas estão interligadas através de uma série de canais finos, os canaliculos, que são ocupados pelos prolongamentos citoplasmáticos dos osteócitos, permitindo o contacto entre células adjacentes. Estes canaliculos são extremamente importantes na manutenção da vitalidade destas células, pois é através deles que se processam as trocas metabólicas entre as células e os fluidos orgânicos. Os osteócitos não se dividem e acabam por ser fagocitados e digeridos, juntamente com os outros componentes ósseos, durante a reabsorção osteoclástica<sup>12-15,17</sup>.

**Células de revestimento:** os osteoblastos maduros que cessaram a sua actividade sintética e que não se diferenciam em osteócitos são denominados células de revestimento. São células achatadas e alongadas que, por terem uma actividade reduzida, possuem poucos organelos citoplasmáticos. Estas células parecem funcionar como uma barreira selectiva entre o osso e outros compartimentos do fluido extracelular, contribuem para a homeostasia mineral, regulando os fluxos de cálcio e fosfato no fluido extracelular ósseo e controlam o crescimento dos cristais ósseos, mantendo um microambiente iónico adequado<sup>15,17</sup>. São capazes de responder a estímulos mecânicos e hormonais e sintetizam alguns factores de crescimento.

**Osteoclastos:** são as células responsáveis pelo processo de reabsorção óssea, associado à remodelação contínua do osso. Os osteoclastos diferenciam-se em contacto com o osso, a partir de células precursoras hematopoiéticas mononucleares (sistema macrófago-monócito), que após atravessarem a parede dos capilares do osso, se fundem<sup>12,14,15,18</sup>. Os osteoblastos intervêm na formação e activação dos osteoclastos, visto actuarem como mediadores dos sinais locais e sistémicos necessários a estes fenómenos<sup>12,15</sup>. Os osteoclastos são células móveis, gigantes, multinucleadas, extensamente ramificadas e altamente polarizadas, que se encontram na superfície do osso a ser reabsorvido dentro de lacunas (lacunas de Howship) que resultam da actividade reabsorptiva dos próprios osteoclastos. A membrana celular, nas zonas de contacto com o tecido ósseo, possui interdigitações citoplasmáticas, assumindo a forma de múltiplas pregas estriadas denominadas bordo rugoso. Esta zona da membrana contém, entre outros, enzimas proteolíticas características da membrana dos lisossomas e um tipo específico de ATP<sub>ase</sub> envolvido na acidificação da lacuna<sup>12</sup>, e por isso, corresponde à parte activa da célula,



permitindo-lhe as trocas necessárias para assegurar o processo de reabsorção. Estas células caracterizam-se pela capacidade de acidificação do meio extracelular, com consequente dissolução dos cristais de fosfato de cálcio. Apresentam, ainda, actividade de ATP<sub>ase</sub> e de fosfatase ácida resistente ao ácido tartárico. A membrana apresenta, igualmente, receptores para a calcitonina e estrogénios, mas não para a hormona da paratiróide, nem para a vitamina D. Para além da reabsorção óssea, os osteoclastos também participam na manutenção a longo prazo da homeostasia do cálcio sanguíneo, através da sua resposta à hormona da paratiróide e à calcitonina<sup>12</sup> e desempenham um papel importante no desenvolvimento e crescimento ósseo, através da libertação de factores de crescimento a partir da matriz extracelular mineralizada<sup>19</sup>.

## 2.2 – MATRIZ EXTRACELULAR

O tecido ósseo é constituído por uma matriz orgânica firme e fortalecida por depósitos de sais de cálcio. Esta matriz é constituída por fibras de colagénio preferencialmente orientadas, numa percentagem de 90 a 95 %, sendo o restante formado por fluido extracelular e proteoglicanos (especialmente, sulfato de condroitina e ácido hialurónico), constituindo a substância intersticial<sup>12,13</sup>.

O colagénio do osso representa cerca de metade do colagénio total do organismo e encontra-se quase exclusivamente na forma de colagénio tipo I. A orientação preferencial das fibras difere conforme o estado de maturação do tecido ósseo<sup>13,14</sup>.

- No tecido ósseo primário ou imaturo, as fibras de colagénio apresentam uma orientação pouco organizada, que se deve à formação muito rápida do osso, como acontece durante a histogénese, no processo de reparação de fracturas, tumores e algumas doenças metabólicas do osso. Este tipo de osso, semelhante ao tecido ósseo embrionário (“woven bone”) possui menor quantidade de minerais e maior percentagem de osteócitos do que o tecido ósseo secundário.
- O tecido ósseo secundário existe em locais onde são exercidas forças de tensão. Substitui o osso primário durante o processo de crescimento ou de regulação óssea. Possui fibras de colagénio organizadas em lamelas, que, ou ficam paralelas umas às outras (como no osso trabecular e perióstio), ou dispõem-se em camadas concêntricas

em torno de vasos sanguíneos, formando os sistemas de Havers. Em cada lamela, as fibras são paralelas umas às outras.

O material orgânico não-colagénico restante inclui a osteocalcina, envolvida na ligação do cálcio durante o processo de mineralização, osteonectina que pode ter alguma função de união entre o colagénio e o componente mineral, osteopontina, sialoproteínas, glicoproteínas, fosfoproteínas, enzimas (fosfatase alcalina, colagenase) e factores de crescimento<sup>15</sup>.

Os sais inorgânicos depositados na matriz são principalmente compostos de cálcio e fosfato na forma de cristais de hidroxiapatite. Também estão presentes na matriz, compostos amorfos de fosfato de cálcio, principalmente hidrogenofosfato de cálcio ou compostos similares que estão frouxamente ligados à matriz e em equilíbrio reversível com os iões cálcio e fosfato do fluido extracelular. A deposição e solubilização destes compostos é fácil e rápida. Estes sais são responsáveis pela função de tampão do tecido ósseo na manutenção da concentração plasmática de cálcio<sup>20</sup>. Os cristais de hidroxiapatite são relativamente pequenos e distribuem-se ao longo das fibrilas de colagénio. Esta associação é responsável pela dureza e resistência características do tecido ósseo<sup>14,21</sup>. Estes cristais são conjugados com uma pequena proporção de bicarbonato, iões magnésio, sódio e potássio, mas também possuem afinidade para metais pesados e poluentes ambientais radioactivos<sup>12,14</sup>.

A matriz de colagénio tem de sofrer um processo de maturação antes de poder suportar a indução e crescimento mineral. Os osteoblastos têm um papel muito importante na maturação da matriz<sup>22</sup>.

### **Mineralização da matriz extracelular**

Há alguns anos atrás, a mineralização era vista como um fenómeno físico-químico, isto é, controlado por factores químicos existentes na matriz (como o colagénio) que serviriam de suporte, sobre o qual seriam formados os primeiros cristais. Estes cristais iniciais poderiam, então, servir de núcleos para uma subsequente propagação mineral. Contudo, recentemente tem sido atribuída às células uma grande importância no processo de iniciação da deposição mineral (através da formação das vesículas da matriz), enquanto que a propagação mineral mantém-se principalmente extracelular e físico-química. Mesmo assim, é reconhecida a



regulação da propagação mineral feita pelas células, ao criarem a matriz e um meio iónico no qual a mineralização pode ou não progredir<sup>23</sup>.

As vesículas da matriz (0,1-0,2  $\mu\text{m}$ ) são pequenas porções de membrana extracelular, que são excitadas da membrana plasmática de osteoblastos e, também, de condroblastos e odontoblastos. Contêm uma grande variedade de enzimas, proteínas e lípidos que podem interagir para iniciar a mineralização<sup>24</sup>. Apenas as superfícies dos osteoblastos que estão orientadas para o osteóide podem libertar vesículas para a matriz extracelular (natureza polar do processo de vesiculação) e este processo não requer morte celular ou desintegração. São várias as razões pelas quais estas vesículas constituem o local inicial da calcificação:

- a) presença de uma elevada concentração de fosfolípidos ácidos com afinidade para o cálcio;
- b) presença de fosfatases na membrana vesicular (FA,  $\text{ATP}_{\text{ase}}$ , pirofosfatase...) com capacidade de hidrolisar uma variedade de ésteres de fosfato;
- c) presença de compostos orgânicos (ATP, ADP, AMP, pirofosfato...), originando ortofosfato ( $\text{PO}_4$ ) que é usado posteriormente na formação de  $\text{CaPO}_4$ ;
- d) presença de um microambiente interno que protege o primeiro núcleo mineral, antes da sua conversão em hidroxiapatite.

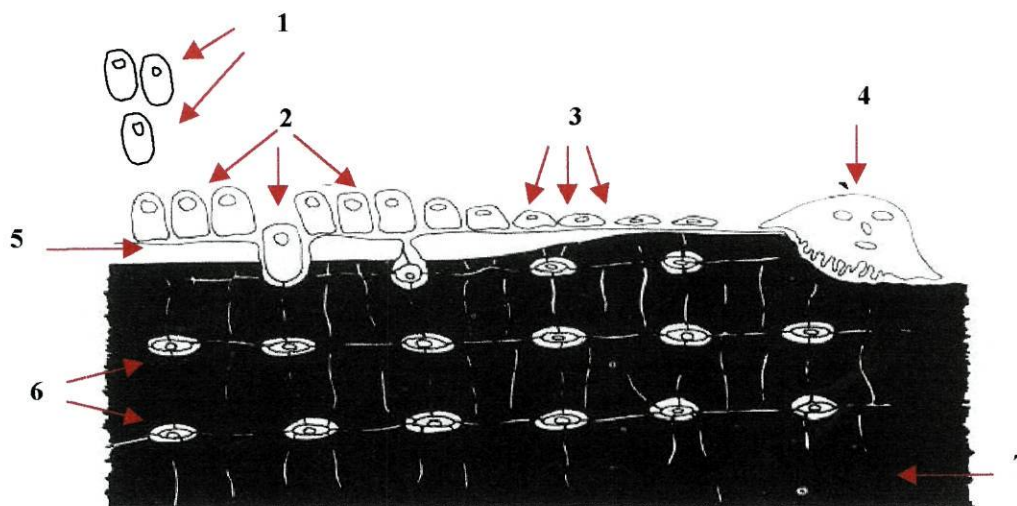
A mineralização, que ocorre no interior das vesículas, é um mecanismo que envolve duas fases distintas<sup>23</sup>:

- 1) durante a primeira fase, a concentração intravesicular de cálcio é aumentada devido à sua afinidade com os fosfolípidos e proteínas existentes na membrana interna. As fosfatases actuam sobre os ésteres de fosfato, produzindo um aumento local de  $\text{PO}_4^{3-}$  nas proximidades da membrana das vesículas. Assim, a actividade das fosfatases ocorre antes do início da mineralização, aumenta à medida que as vesículas se aproximam do local de mineralização e pouco depois do início desta, sofre uma redução. O produto iónico  $[\text{Ca}^{2+}] \times [\text{PO}_4^{3-}]$  é aumentado, resultando na deposição inicial de  $\text{CaPO}_4$  perto da membrana (1º núcleo mineral); a adição de iões hidróxido e bicarbonato a esta fase mineral, origina os primeiros cristais de hidroxiapatite.
- 2) Devido à acumulação e ao crescimento, os cristais de apatite intravesiculares perfuram a camada lipídica da vesícula e são expostos ao fluido extravascular, que nos animais



normais é supersaturado em apatite, permitindo a proliferação axial e lateral dos cristais. O trabalho das vesículas dá-se por terminado depois da deposição de alguns destes cristais entre as fibras de colagénio da matriz. Estes cristais podem, então, servir de suporte para uma nova proliferação e eventualmente fundem-se para formar uma fase mineral contínua. A taxa de calcificação que ocorre nesta segunda fase e a taxa de nucleação da hidroxiapatite são controladas por factores extracelulares (iões  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{PO}_4^{3-}$ , colagénio, proteoglicanos...). Quando a matriz se torna totalmente mineralizada, as vesículas residuais são destruídas pelo aumento dos cristais.

As células de linhagem osteoblástica influenciam directamente o processo de mineralização pois são responsáveis pela síntese selectiva de moléculas da matriz e regulação do meio iónico, influenciam, igualmente, o local e a taxa de mineralização através da síntese e colocação estratégica das vesículas<sup>23</sup>. Os osteoblastos também regulam este processo indirectamente, através da sua resposta a hormonas (por exemplo, hormona da paratiróide, hormona do crescimento e 1,25 diidroxivitamina  $\text{D}_3$ ), factores de crescimento (como o  $\text{TGF-}\beta$  e FGF), e proteínas morfogenéticas do osso (BMP)<sup>23</sup>.



**Figura 2** – Microambiente ósseo. 1 – pré-osteoblastos; 2 – osteoblasto; 3 – células de revestimento; 4 – osteoclasto; 5 – osteóide; 6 – osteócitos; 7 – matriz extracelular mineralizada; (adaptado da ref.<sup>25</sup>).

## 2.3 – REMODELAÇÃO ÓSSEA

A remodelação óssea é um conjunto de eventos que permitem a substituição do osso antigo por tecido ósseo novo, assegurando também a substituição do osso primário por osso secundário. Trata-se de um mecanismo complexo que requer uma actividade celular interactiva, regulada por uma variedade de factores bioquímicos e mecânicos. A contínua remodelação óssea tem por principal objectivo permitir ao osso responder e adaptar-se às tensões mecânicas, mas também permite a reparação de microdanos e por isso assegura a manutenção e melhoria das propriedades mecânicas do osso e, finalmente, participa na regulação da homeostasia iónica através da troca de cálcio e outros iões. As alterações verificadas a nível da remodelação são responsáveis pela maior parte das doenças metabólicas do osso.

Neste processo, os efeitos catabólicos dos osteoclastos (reabsorção óssea) estão em equilíbrio com os efeitos anabólicos dos osteoblastos (formação óssea). Trata-se de um processo local que se observa em pequenas áreas designadas por unidades de remodelação óssea. Cada unidade é constituída por diferentes tipos de células e não é uma estrutura permanente; é formada em resposta a um sinal ou a um estímulo, desempenha a sua função e dispersa-se, deixando algumas células quiescentes na superfície do osso recém-formado. O esqueleto contém milhões destas unidades em estados diferentes do seu ciclo funcional.

A remodelação óssea pode ser dividida em quatro fases, com base nas actividades celulares observadas: activação, reabsorção, reversa e formação<sup>26</sup>.

No início de cada ciclo de remodelação óssea observa-se a activação de células em repouso, nomeadamente migração de precursores mononucleares dos osteoclastos para o local de reabsorção e a sua posterior diferenciação. As células de revestimento também são activadas de modo a expor a superfície óssea, permitindo assim a adesão dos osteoclastos à matriz. Esta adesão é feita via integrinas e outros receptores da adesão celular. As hormonas sistémicas, os factores de crescimento e as interleucinas desempenham um papel importante no recrutamento de novos osteoclastos; cada osteoclasto multinucleado fica activo durante cerca de 12 dias para de seguida sofrer apoptose. A activação é um processo contínuo que ocorre na extremidade de cada unidade de remodelação. À medida que a unidade progride ao longo da superfície óssea, novas células são continuamente recrutadas.



A fase de reabsorção inicia-se com a união firme dos osteoclastos ao osso, isolando uma pequena área na sua superfície, a lacuna de reabsorção. A solubilização da matriz mineralizada faz-se por acidificação, obtida de dois modos: (1) fusão de vacúolos acídicos intracelulares com a membrana celular e libertação do seu conteúdo, (2) existência de uma bomba de prótons ( $H^+$ -ATP<sub>ase</sub>) na membrana osteoclástica. A matriz orgânica é depois degradada por várias enzimas e os produtos de degradação são interiorizados pelas células e libertados por transcitose na membrana basolateral<sup>26</sup>.

No final da reabsorção, observa-se o aparecimento de uma população heterogénea de células mononucleares na lacuna de reabsorção, que preparam o local para a fase de formação óssea. Esta fase, designada por fase reversa, constitui, possivelmente, um elemento importante de ligação entre os dois processos<sup>26</sup>. As células, nesta fase, secretam uma substância tipo cimento e parecem desempenhar um papel directo na activação e regulação das células osteoblásticas<sup>27</sup>.

A fase de formação óssea inicia-se com a activação de precursores de osteoblastos e a sua diferenciação em osteoblastos activos. Estes segregam uma matriz orgânica de colagénio (osteóide) que mais tarde é mineralizada. À medida que a matriz mineralizada se acumula e envolve o osteoblasto, esta célula perde a sua actividade sintética e torna-se um osteócito interior<sup>26</sup>. Porém, nem todos os osteoblastos se diferenciam em osteócitos; alguns, quando a produção diminui, tornam-se mais achatados e transformam-se em células de revestimento. A unidade de remodelação vai progredindo e novos osteoblastos são adicionados, mas unicamente na extremidade do local de formação óssea.

Normalmente, excepto nos ossos em crescimento, a taxa de deposição e a de reabsorção óssea são iguais, de modo que a massa óssea total permanece constante. A reabsorção e a formação óssea são mecanismos interligados. Os osteoclastos podem ser activados por factores locais sintetizados pelos osteoblastos e a lacuna de reabsorção criada pelos osteoclastos torna-se o local da actividade osteoblástica, preenchendo a recém-formada cavidade com osso novo<sup>28</sup>. Durante a reabsorção, também se verifica a libertação de factores de crescimento (IGF, TGF- $\beta$ ) a partir da matriz, que vão actuar sobre os osteoblastos<sup>27</sup>. O preenchimento total da lacuna de reabsorção é indispensável para manter um nível constante de massa óssea. A formação óssea pode ser avaliada, medindo a actividade da fosfatase alcalina, a produção de osteocalcina e de colagénio tipo I. Os



marcadores da reabsorção óssea incluem a fosfatase ácida resistente ao ácido tartárico e os produtos de degradação do colagénio tipo I: hidroxiprolina, glicosídeos de hidroxilisina, piridinolina e deoxi-piridinolina e peptídeos associados<sup>27,29</sup>.

## 2.4 – MECANISMOS DE REGULAÇÃO ÓSSEA

O metabolismo ósseo depende da disponibilidade de vários minerais (cálcio e fosfato) e homeostase iónica, de uma série de hormonas calciotrópicas e de numerosos factores locais. A hormona da paratiróide, a 1,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub>, a hormona do crescimento, as hormonas da tiróide, alguns estrogénios e glucocorticóides são as principais hormonas responsáveis pela regulação da fisiologia óssea. Os factores de crescimento e citocinas que existem no microambiente ósseo e que são produzidos pelas células ósseas e outras células presentes (células hematopoiéticas) também influenciam a remodelação óssea. Existe, portanto, uma regulação combinada entre as hormonas e os factores locais: as hormonas atingem o microambiente ósseo através da circulação sistémica e modulam a síntese de factores de crescimento pelas células locais. Estes factores têm uma acção directa no comportamento das células de linhagem osteoblástica e/ou osteoclástica, actuando de modo autocrínico e/ou paracrínico. Enquanto alguns destes factores são potentes mitogénicos (IGF, PDGF...), outros (retinóides, TGF- $\beta$ , BMP's) influenciam principalmente a diferenciação dos precursores osteoblásticos<sup>17</sup>. Alguns destes produtos são incorporados na matriz durante a formação óssea e libertados mais tarde, quando da reabsorção óssea, podendo influenciar o recrutamento e proliferação osteoblástica<sup>20,26</sup>.

Com excepção da calcitonina, todas as hormonas, citocinas e factores de crescimento que actuam no osso, mostraram possuir receptores nos osteoblastos, ou induzem respostas por parte destas células, ou ambos<sup>13,17</sup>.

## 2.5 – PERDA ÓSSEA E FRACTURAS

Uma vez completo o crescimento do esqueleto, os ossos podem ainda alterar a sua estrutura interna através da remodelação. Como este processo é responsável pela adaptação do tecido ósseo às tensões mecânicas, pela reparação de microdanos e pela manutenção do

metabolismo mineral, as alterações que podem ocorrer a nível da remodelação são responsáveis pela maior parte das doenças metabólicas do osso.

As melhorias verificadas durante o século XX a nível dos cuidados médico-sanitários e da prevenção e tratamento de doenças aumentaram substancialmente a esperança de vida. Este facto resulta num número elevado de pessoas mais velhas às quais está associado um maior risco de fracturas, uma vez que no adulto se observa uma perda óssea progressiva até à velhice. A densidade do osso estabiliza após se atingir o pico máximo de massa óssea e começa a declinar entre a quarta e quinta década de vida. A perda progressiva de massa óssea, associada ao envelhecimento, resulta numa diminuição da força mecânica do osso e aumenta o risco de osteoporose e de fractura.

O receio de assistir a uma redução significativa da qualidade de vida das pessoas que sofrem fracturas e a procura de soluções que permitissem uma recuperação estética e funcional mais extensa dos defeitos ósseos levaram ao desenvolvimento da ciência dos biomateriais para substituição óssea e implantologia. O uso clínico destes biomateriais tem importantes aplicações em cirurgia maxilofacial e ortopédica, nomeadamente, na regeneração de defeitos ósseos (de desenvolvimento, cirúrgicos, traumáticos ou resultantes de processos patológicos).



### 3 – OS CERÂMICOS EM IMPLANTOLOGIA

Desde tempos remotos que o Homem tenta restaurar ou substituir vários componentes do sistema ósseo. A medicina moderna tem vindo a usar uma larga gama de materiais para fazer face às imperfeições do organismo humano. Contudo, poucos destes materiais provaram poderem ser utilizados como substitutos ósseos, em particular quando sujeitos a cargas elevadas. A selecção de um biomaterial para utilização clínica baseia-se, principalmente, nas propriedades mecânicas e biológicas. Os progressos observados nos últimos trinta anos, na ciência dos cerâmicos, resultaram no desenvolvimento de numerosos materiais com propriedades químicas, físicas e mecânicas, que os tornam adequados para implantação a longo prazo num organismo vivo, melhorando a qualidade de vida das pessoas, e nalguns casos, proporcionando mesmo um aumento da sua longevidade<sup>30,31</sup>.

Os cerâmicos são materiais complexos, quer em composição, quer em estrutura, consistindo na ligação iónica e covalente de um metal a um não-metal, podendo originar um material com várias fases ou estruturas e conseqüentemente diferentes propriedades. As fases individuais podem ser amorfa (vítrea), mono ou policristalina<sup>30</sup>. Os cerâmicos, contrariamente aos metais, possuem os átomos num elevado grau de compactação e as ligações iónicas e covalentes apresentam um elevado grau de orientação. Assim, algumas das suas propriedades são bem distintas das dos metais<sup>32</sup>, em particular:

- elevada temperatura de fusão ou temperatura de decomposição, sendo por este facto estáveis a altas temperaturas;
- baixa reactividade química;
- elevada dureza;
- elevada resistência à compressão;
- baixas condutividades eléctrica e térmica;
- baixa densidade;
- ausência de plasticidade, fracturando facilmente;
- elevada resistência ao desgaste;
- elevada resistência a ataques ácidos;
- baixa resistência ao impacto;
- baixa resistência à tracção;
- elevada biocompatibilidade.



Devido ao seu tipo de organização e ligação atómicas, os átomos dos materiais cerâmicos possuem baixa mobilidade estrutural. Este facto suprime qualquer plasticidade nestes materiais a baixas temperaturas. Apesar desta desvantagem limitar a sua aplicação, uma vez melhorados alguns aspectos tecnológicos e as propriedades originais dos materiais, os cerâmicos podem ser usados:

- ⇒ para zonas sujeitas a esforços compressivos;
- ⇒ como revestimentos;
- ⇒ como compósitos.

As aplicações clínicas dos biocerâmicos vão desde implantes para o ouvido médio, componentes para substituição e aumento do tecido ósseo, componentes de válvulas cardíacas, componentes utilizados na restauração de articulações e correcções dentárias<sup>32,33</sup>.

Uma exigência essencial feita a qualquer implante é que não fracture quando em serviço. Este requisito é de particular importância na aplicação de cerâmicos, uma vez que estes materiais, sendo frágeis, possuem uma propensão intrínseca para a fractura<sup>34</sup>. A capacidade de prever a resistência de um material biocerâmico depende do rigor com que a microestrutura é caracterizada. Características como a densidade, porosidade, cristalinidade, tamanho do grão, fronteiras de grão, tamanho, forma e distribuição dos poros, nível de impurezas e pH do meio circundante têm um efeito significativo na resistência dos cerâmicos, bem como na sua velocidade de dissolução<sup>35,36</sup>.

A microestrutura final de um cerâmico é controlada usualmente pela evolução da fase de sinterização. A estrutura final também é influenciada pelas condições de sinterização, bem como pela composição química inicial. Todas as propriedades mecânicas estão relacionadas com a microestrutura: a resistência diminui com o aumento do tamanho do grão e da porosidade média<sup>37</sup>, por exemplo.

A boa compatibilidade demonstrada pelos cerâmicos deve-se, essencialmente, ao facto de possuírem na sua composição elementos normalmente encontrados no meio fisiológico (cálcio, fósforo, potássio, magnésio, sódio, etc) ou que evidenciam uma toxicidade bem tolerada pelo organismo (titânio)<sup>33</sup>.

Os biocerâmicos podem ser classificados através de dois critérios: pela sua microestrutura e pela natureza da interação tecidual com o organismo<sup>30</sup>. Como já foi referido, estruturalmente, estes materiais podem ser vítreos, mono ou policristalinos. Quanto ao segundo critério, existem, de uma maneira geral, três tipos de biocerâmicos<sup>30-32,38</sup>:

- cerâmicos bioinertes: possuem uma grande resistência à degradação e por isso, não ocorre qualquer alteração significativa à superfície do biomaterial junto à interface implante-tecido. Nesta situação, o implante é cercado por uma cápsula fibrosa de tecido conjuntivo muito fina, desenvolvida a partir dos tecidos vivos.

O processo de ligação é feito através do crescimento do tecido nas irregularidades do material (fixação morfológica). São normalmente utilizados na construção de componentes articulares de próteses ortopédicas e como revestimentos de implantes dentários.

*Exemplos*: alumina, zircónia, carbono, titânio e suas ligas.

- cerâmicos reabsorvíveis: estes biomateriais têm na sua composição elementos de fácil assimilação metabólica (essencialmente cálcio e fósforo), que os torna degradáveis. São desenvolvidos para serem absorvidos e gradualmente substituídos por tecido ósseo<sup>38</sup>.

O processo de dissolução destes cerâmicos ocorre em duas fases: dissolução extracelular de algumas partículas, seguida de fagocitose intracelular das mesmas. A taxa de degradação varia de material para material. Os cerâmicos reabsorvíveis com uma relação Ca/P mais baixa são muito solúveis e a sua biodegradabilidade é mais rápida do que a formação de um novo tecido ósseo<sup>39</sup>. Consequentemente, não são usados para preparação de implantes. Contudo, o seu interesse pode resultar do facto de serem considerados promotores da calcificação, sendo principalmente usados como suportes temporários. Também têm sido utilizados como sistemas de libertação de fármacos<sup>32</sup>.

A vantagem da utilização de uma prótese de material reabsorvível resulta do facto de esta ser substituída por osso normal, eliminando portanto quaisquer problemas funcionais ou de biocompatibilidade a longo prazo. A maior desvantagem que apresenta, no entanto, é que durante o processo de remodelação, a capacidade que a prótese tem de sustentar a carga é significativamente reduzida, podendo resultar em colapso mecânico<sup>30</sup>. Os implantes biodegradáveis devem promover o crescimento ósseo e facilitar a sua integração; a taxa da sua reabsorção não deve exceder a taxa de formação óssea e a



redução da resistência no implante deve acompanhar o aumento desta nos tecidos formados.

*Exemplos:* fosfatos de cálcio (tricálcio de fosfato, octacálcio de fosfato, etc).

- cerâmicos bioactivos ou de superfície activa: estes biomateriais apresentam características que os permitem situar entre as duas classes anteriores.

As suas composições químicas são tais que, uma vez colocados num ambiente fisiológico, desenvolvem à superfície uma série de reacções químicas. Num estado final, obtém-se uma forte ligação química entre o tecido e o biocerâmico, o qual permanece praticamente inalterado no seu volume. As aplicações médicas destes materiais são várias: reconstrução dentária e óssea, revestimento de próteses metálicas, preenchimento de espaços resultantes da extracção de tumores, etc.

*Exemplos:* hidroxiapatite, biovidros e vidros-cerâmicos.

### 3.1 – BIOACTIVIDADE

Alguns cerâmicos possuem a particularidade de se ligarem quimicamente ao osso<sup>40</sup>. A descoberta desta capacidade de ligação, por reacção superficial, introduziu um novo conceito no campo dos biomateriais – a **bioactividade** – e veio contribuir para a concretização de um importante requisito para o sucesso clínico de um implante: o estabelecimento de uma interface estável entre o implante e o tecido ósseo. Esta ligação baseia-se na capacidade que estes biomateriais têm de formar uma camada superficial de apatite<sup>41,42</sup>. O mecanismo mais aceite, através do qual os materiais bioactivos formam uma camada superficial de apatite, é o da dissolução/(re)precipitação dos iões de cálcio e fosfatos da superfície do material, seguida por um crescimento epitaxial dos cristais. Segundo esta teoria, ocorre uma dissolução superficial do material, libertando-se iões  $\text{Ca}^{2+}$ . Estes aumentam o grau de supersaturação do fluido circundante, resultando na (re)precipitação de apatite carbonatada (composto químico estruturalmente equivalente à fase mineral do osso), com conseqüente formação de novos cristais de apatite sobre a superfície do material<sup>43-48</sup>.

Estes novos cristais formam-se por crescimento epitaxial, isto é os cristais de apatite óssea utilizam a superfície do material como local de nucleação e/ou suporte para a deposição e



crescimento da sua própria fase. Quando estes cristais e o substrato são constituídos pelo mesmo material, os cristais estão em perfeita continuação com a rede cristalina do implante<sup>43</sup>.

A formação da camada de apatite promove a adesão das células ósseas e a síntese da matriz extracelular. Visto que o tecido ósseo é incorporado na recém-formada camada de apatite, a ligação existente é, por isso, o resultado de processos físico-químicos e biológicos que ocorrem na interface entre o osso e a superfície do biomaterial<sup>45,49,50</sup>. Todo o processo é fortemente dependente do pH e requer um pH ligeiramente alcalino para se tornar completo.

É possível então afirmar que a presença de cálcio e grupos fosfatos nos fluidos extracelulares, um pH local alcalino e um ambiente compatível com a presença de enzimas como a fosfatase alcalina resulta na precipitação do mineral ósseo de apatite carbonatada com a estrutura celular de colagénio, produzindo osso completamente mineralizado.

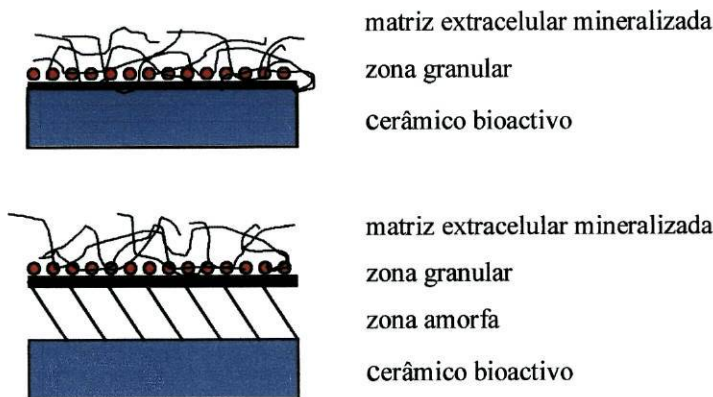
O estudo da interface tecido ósseo/material bioactivo revelou a existência de uma variedade de estruturas interfaciais. Estas estruturas são constituídas por diferentes zonas:

- a) zona granular: sem fibras de colagénio, com 50-600 nm de largura e contendo uma ou mais camadas electronodensas (40-100 nm de largura cada). A camada electronodensa é composta por depósitos globulares de Ca e P e material proteico, nomeadamente glicosaminoglicanos<sup>48,51-53</sup>, que resultam da adsorção proteica que precede a mineralização<sup>53</sup>. Esta zona é a zona de ligação propriamente dita, está em continuação com a *lamina limitans* do osso circundante, é constituída por cristais em forma acicular e é aqui que se vão ligar as fibras de colagénio<sup>48,51,54</sup>.
- b) zona amorfa: sem fibras de colagénio, com 0,7-0,8 µm de largura. Encontra-se entre a camada electronodensa e o implante (cerâmico bioactivo). Representa a degradação parcial da superfície do cerâmico (zona de reacção)<sup>51,53,53</sup>. É constituída por uma camada de apatite fundamentalmente carbonatada e deficiente em Ca.

As várias interfaces diferem entre si na presença ou não da zona amorfa<sup>51,53</sup>.

A mineralização começa na camada electronodensa<sup>52</sup> com a elaboração e fusão de glóbulos calcificados (processo mediado pelas células), que são depositados numa matriz orgânica,

seguinte-se a incorporação de fibras de colagénio e de proteínas, tais como glicosaminoglicanos, osteocalcina e osteopontina<sup>48,49,51,53</sup>. Depois das células osteoblásticas sintetizarem esta matriz de colagénio (matriz osteóide), o processo de mineralização prossegue segundo o padrão conhecido.



**Figura 3** – Esquema representativo do processo de mineralização que ocorre na interface tecido ósseo/cerâmico bioactivo.

Representação esquemática dos dois tipos de interfaces associadas às áreas mineralizadas<sup>51</sup>.

A hidroxiapatite e os biovidros têm sido objecto de inúmeros estudos, no âmbito das aplicações médicas, devido à sua bioactividade<sup>55</sup>. O objectivo final destes materiais é promover uma interface contínua com os tecidos circundantes, capaz de suportar as forças que ocorrem normalmente no local de implantação, e promover a formação de novo tecido ósseo<sup>33,56,57</sup>.

De seguida, é feita uma descrição sumária das características da hidroxiapatite e dos biovidros.

### 3.2 – HIDROXIAPATITE

A hidroxiapatite (HA) tem sido muito usada para substituição de tecidos duros, devido à sua semelhança cristalográfica com os constituintes inorgânicos do tecido ósseo e dos dentes. A sua biocompatibilidade com o tecido circundante provou ser excelente, permitindo a adesão do osso através de ligações químicas (fixação bioactiva)<sup>36,58</sup>.



### 3.2.1 – Composição química

A hidroxiapatite pertence ao grupo das apatites, termo usado para descrever a família de sólidos cristalinos representados pela fórmula química geral<sup>34,56,58</sup>:



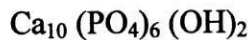
Assim, uma grande diversidade de compostos de apatites, com composições químicas variáveis, podem ser preparados através da substituição iónica de todos ou alguns elementos nos locais M, Z e X<sup>33,35,56,59</sup>.

M = Ca, Sr, Ba, Cd, Pb, Mg, Na, K, H,...

Z = P, CO<sub>3</sub>, V, As, S, Si, Ge, Cr, B...

X = OH, CO<sub>3</sub>, O, BO<sub>2</sub>, F, Cl, Br, vazio...

A hidroxiapatite é uma das apatites mais correntemente comercializada e extensivamente estudada, cuja fórmula química é a seguinte<sup>30,56,59</sup>:



A HA é portanto um fosfato de cálcio que inclui o ião hidróxido e cuja razão Ca/P é igual a 1,67<sup>30,36,59,60</sup>.

Os minerais naturais de apatite são encontrados nas rochas ígneas, sedimentárias e metamórficas. As apatites biológicas existem nos ossos e nos dentes dos vertebrados<sup>59,60</sup>.

### 3.2.2 – Hidroxiapatites biológicas

A hidroxiapatite existente no tecido ósseo e nos dentes é chamada hidroxiapatite biológica. Outras apatites biológicas podem ser encontradas, em maior ou menor quantidade, em tecidos patológicos calcificados tal como nos cálculos renais<sup>59</sup>. A composição química da apatite óssea varia de acordo com a espécie, a idade, a parte do esqueleto considerada, etc. A razão Ca/P aumenta com a idade até aproximadamente 1,67. O tamanho dos cristais das apatites biológicas é muito pequeno (menos de 0,2 µm)<sup>59</sup>. O tamanho reduzido é conveniente para que ocorra a remodelação óssea, isto é, para que se verifique processos de reabsorção e formação de osso rápidos.



### 3.2.3 – Hidroxiapatites sintéticas

Existem várias HA sintéticas utilizadas como biomateriais que diferem da HA estequiométrica ideal e entre si pelas substituições iónicas efectuadas (substituição dos grupos fosfato, hidroxil ou de ambos). Assim, a razão Ca/P não é necessariamente igual a 1,67. As diferenças na estrutura, composição e características físicas destas HA sintéticas derivam do processo de síntese e sinterização, que pode ser alterado em função das propriedades que se pretendem obter para o material. A temperatura, o tempo, o meio atmosférico e os aditivos usados na sinterização são alguns dos parâmetros que condicionam as características finais do material<sup>61-63</sup> e o seu comportamento *in vivo* e *in vitro*<sup>64</sup>.

A HA biológica contém aproximadamente 3 a 4% de iões CO<sub>3</sub>, 1% de Na e Mg e valores residuais de elementos como o F ou o Cl<sup>33,35,36,56</sup>. Contudo, para efeitos práticos, a HA sintética é química e cristalograficamente semelhante à que ocorre naturalmente no osso.

Existem quatro métodos para sintetizar hidroxiapatite<sup>59</sup>:

- 1) método a húmido (reacção no estado aquoso);
- 2) método a seco (reacção no estado sólido);
- 3) método hidrotérmico (reacção hidrotérmica);
- 4) método alcalino-óxido (reacção tanto no estado sólido como no aquoso).

O método a húmido é utilizado para a produção em massa de pós de HA pouco cristalina ou não-cristalina, enquanto que o método a seco é adequado para preparar pós de HA cristalina. O método hidrotérmico é usado na preparação de cristais de HA e o método alcalino-óxido, na preparação de finas membranas de HA policristalina.

### 3.2.4 – Fosfatos de cálcio relacionados

Quimicamente falando, a hidroxiapatite é um fosfato de cálcio e uma forma de classificar estes compostos é através da sua razão Ca/P. Vários tipos de fosfatos de cálcio, com razões entre 0,5 e 2,0, podem ser sintetizados, misturando soluções de cálcio e fosfato sob condições ácidas ou alcalinas<sup>59</sup>. Os fosfatos de cálcio com relação Ca/P inferior a 1,5 são muito solúveis e conseqüentemente as taxas de dissolução são elevadas, em comparação

com a formação do tecido ósseo novo, tornando-os inadequados para grande parte das aplicações médicas<sup>39</sup>. Em geral, os cerâmicos de fosfato de cálcio incluem misturas, intencionais ou acidentais, de fase de hidroxiapatite e tricálcio de fosfato (TCP), apresentando uma composição química caracterizada por uma razão Ca/P entre 10:6 e 3:2<sup>65,66</sup>.

### 3.2.5 – Estrutura cristalina

A hidroxiapatite cristaliza num sistema hexagonal com parâmetros<sup>56,59</sup>:

$$a = b = 9,418 \text{ \AA} \text{ e } c = 6,884 \text{ \AA}$$

Esta estrutura consiste num esqueleto de tetraedros de  $\text{PO}_4^{3-}$ , onde dois dos átomos de oxigénio se dispõem num plano horizontal e os dois restantes segundo um plano paralelo ao eixo cristalográfico<sup>59</sup>. Embora seja fácil sintetizar HA, a simples substituição iónica de alguns dos seus elementos por impurezas de Ba, Pb, Sr ou Cd entre outros, pode originar grandes alterações nas suas propriedades.

### 3.2.6 – Estabilidade térmica

Como o processamento e fabrico da HA pode incluir tratamentos por altas temperaturas, é importante conhecer o comportamento térmico deste material. A temperaturas elevadas, a estrutura da HA pode ser alterada, dependendo da sua estequiometria, da temperatura, da atmosfera e das condições de síntese<sup>56</sup>. Dois conjuntos de temperaturas podem ser distinguidos<sup>35</sup>:

- a) entre 0 – 1000°C: ocorrem reacções intercristalinas e decomposição irreversível das apatites não-estequiométricas;
- b) acima de 1300°C: corresponde à decomposição da HA estequiométrica em dois compostos, o  $\beta$ -TCP e o tetracálcio de fosfato. Acima dos 1350°C, o  $\beta$ -TCP transforma-se em  $\alpha$ -TCP. Contudo, hoje em dia, existem HA estáveis para temperaturas superiores.

Nas apatites não-estequiométricas, entre 650 e 750°C, há formação de  $\beta$ -TCP, logo uma mistura de HA e  $\beta$ -TCP pode coexistir na microestrutura. A temperaturas acima de 1050°C, a HA pode ser decomposta em  $\beta$ -TCP e tetracálcio de fosfato. Acima de 1200°C, o  $\beta$ -TCP transforma-se em  $\alpha$ -TCP, fase que se mantém mesmo após o arrefecimento<sup>35</sup>.



### 3.2.7 – Solubilidade

A hidroxiapatite é solúvel em meios ácidos, fracamente solúvel em água destilada e insolúvel em meios alcalinos. A taxa de solubilidade está dependente da porosidade, tamanho do grão, superfície específica e cristalinidade, incluindo os defeitos e o tamanho dos cristais. A solubilidade da HA sinterizada é muito baixa em meio fisiológico<sup>56,59</sup>.

### 3.2.8 – Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas da HA têm sido melhoradas, de modo a atingirem valores comparáveis ou superiores aos do osso humano. Estas características, nomeadamente a resistência à tracção, à compressão e à fadiga, são fortemente influenciadas pelo volume de porosidade, que pode ser sob a forma de microporos (diâmetros < 1 µm, devido a uma sinterização incompleta), ou de macroporos (diâmetros > 100 µm, permitindo o crescimento ósseo)<sup>57</sup>. A resistência à compressão depende do volume total de poros, enquanto que a resistência à tracção depende fundamentalmente do volume de fracção de microporosidades. Estas propriedades também variam com a temperatura de sinterização<sup>59</sup>. Tais características deverão sempre ser tidas em conta na selecção do tipo de HA a usar para determinada aplicação clínica. A HA porosa apresenta, evidentemente, uma resistência mecânica mais baixa que a forma densa, podendo ser aplicada na substituição de tecidos duros submetidos a pequenas cargas de compressão, como acontece em cirurgia facial ou craniana<sup>67</sup>.

**Tabela III** – Propriedades mecânicas mais relevantes da hidroxiapatite<sup>39</sup>.

	Porosidade (%)	Densidade	Módulo Young (GPa)	Micro-dureza (GPa)	Resist. Compres. (MPa)	Resist. Tracção (MPa)	Resist. Flexão (MPa)
Hidroxiapatite	0,1 – 3	3,05 – 3,15	35 – 120	6	350 – 450	40 – 120	105 – 215
	10	2,7	–	4,2	–	–	–
	30	–	–	–	120 – 170	–	–
	40	–	–	–	60 – 120	–	15 – 35
	2,8 – 19,4	2,55 – 3,07	44 – 88	–	310 – 510	–	60 – 115
	2,5 – 26,5	–	55 – 110	–	< 800	–	50 – 115



Na tabela III, resumem-se algumas das propriedades mecânicas mais importantes da hidroxiapatite.

### 3.2.9 – Aplicações médicas

A utilização clínica da hidroxiapatite está generalizada a vários campos da medicina. É utilizada, entre outros, na reconstrução do ouvido médio<sup>33,68-70</sup>, reconstrução e aumento crânio-facial<sup>33</sup>, reconstrução das paredes da órbita e na produção de vasos sanguíneos artificiais<sup>59</sup>.

Em medicina dentária, é utilizada para preenchimento de defeitos ósseos<sup>71</sup>, substituição de raízes dentárias<sup>59,72</sup>, prevenção da reabsorção alveolar após extracção dentária<sup>73</sup>, aumento do rebordo alveolar e revestimento de implantes dentários<sup>74</sup>. A sua inclusão em pastas dentífricas e cimentos dentários constitui outras aplicações dentárias<sup>35,59</sup>.

As aplicações ortopédicas da hidroxiapatite incluem o preenchimento de defeitos ósseos, revestimento de próteses ortopédicas, ossos e articulações artificiais<sup>59</sup>, entre outros. Como material de preenchimento, é usada em aplicações de baixa carga, quando os defeitos ósseos ocorrem devido a tumores ou acidentes<sup>59</sup>. A hidroxiapatite também tem sido usada como veículo para a libertação de fármacos<sup>75,76</sup>.

## 3.3 – BIOVIDROS

Os primeiros vidros, propostos para fins biomédicos, foram introduzidos por Larry Hench no final da década de 60<sup>77-79</sup>, sob o pressuposto que estes materiais estimulavam o crescimento ósseo sobre a sua superfície. Foram posteriormente designados por biovidros ou vidros bioactivos, dada a sua capacidade de ligação aos tecidos vivos sem que se verifique a formação de tecido fibroso<sup>77,78</sup>.

Os biovidros são cerâmicos que possuem uma estrutura amorfa, visto que são produzidos por fusão seguida de arrefecimento até à solidificação, sem que haja cristalização<sup>38</sup>.

Existem dois tipos de vidros que podem ser usados em biomateriais:

- a) vidros à base de sílica (vidros silicatados);

b) vidros à base de fosfato (vidros fosfatados).

Os vidros à base de sílica são constituídos por  $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O-P}_2\text{O}_5$ , podendo ainda conter  $\text{CaF}_2$  e  $\text{B}_2\text{O}_3$ <sup>32,77,78</sup>. O elemento formador da rede que caracteriza a estrutura é a sílica, que constitui 70% ou mais do peso total, e é a forte ligação Si-O que garante a resistência do material. A adição de óxidos de boro, potássio e iões fluoreto permite o aumento ou diminuição da solubilidade dos biovidros.

Os vidros fosfatados são formados a partir de pentóxido de fósforo ( $\text{P}_2\text{O}_5$ ), composto que possui um papel importante na fase inicial da formação do tecido ósseo. Estes vidros são facilmente fundidos e quimicamente mais instáveis do que os vidros de sílica, visto este composto ser química e termicamente mais estável do que o  $\text{P}_2\text{O}_5$ <sup>80</sup>. A adição de óxidos metálicos ( $\text{CaO}$ ,  $\text{K}_2\text{O}$ , etc) torna o vidro mais biodegradável. A adição de  $\text{Na}_2\text{O}$  actua como modificador da rede e enfraquece a estrutura do vidro. Este efeito é produzido pelo facto de iões monovalentes de  $\text{Na}^+$  ocuparem posições intersticiais na rede do vidro e romperem a continuidade estrutural<sup>80</sup>. A adição de um óxido alcalino, tal como o  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , aumenta a estabilidade do vidro, devido à sua incorporação como parte integral da rede. Biomateriais à base de fósforo, cálcio e sódio têm sido desenvolvidos; não possuem sílica que por vezes é referida como provocando efeitos nocivos quando implantada<sup>81</sup>.

Os biovidros ligam-se directamente ao osso através de<sup>30,38</sup>:

- libertação de iões  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Na}^+$  para os fluidos fisiológicos que rodeiam o implante;
- produção, na interface, de uma matriz orgânica que é posteriormente mineralizada.

A composição e estrutura de um biovidro são parâmetros de grande importância, dado que controlam a velocidade de libertação de compostos superficiais. Se esta for reduzida, minimiza-se a interacção com os tecidos vivos, enquanto que se for demasiado elevada, pode conduzir à necrose das células<sup>82</sup>.

A aplicação mais comum dos biovidros é a substituição de tecidos duros<sup>77</sup>. As limitações que apresentam são unicamente de natureza mecânica. A sua baixa resistência mecânica não permite, se usado por si só, a sua aplicação em zonas de sustentação de carga. No entanto, a sua maquinabilidade torna-os apropriados para aplicações de próteses do ouvido médio, substituição de raízes dentárias, aumento do maxilar e restauração óssea<sup>83</sup>. Os



biovidros também podem ser utilizados como revestimento de implantes (aço inoxidável, titânio ou alumina) tornando-os mecanicamente mais resistentes e conferindo-lhes uma adequada bioactividade<sup>83</sup>. Sob a forma de pós, estes materiais podem ser utilizados no tratamento de perdas ósseas e cirurgia maxilofacial<sup>83</sup>.

### 3.4 – COMPÓSITOS

Na prática, é muito comum concluir que um único material não é capaz de reunir todas as características adequadas para satisfazer as necessidades impostas. Dois ou mais materiais são frequentemente combinados, de modo a fazer o melhor uso das propriedades desejadas, ao mesmo tempo que se reduz a falta de algumas características de cada um dos materiais constituintes. Consequentemente, os compósitos são sintetizados com um duplo objectivo: criar materiais com uma combinação de propriedades que nenhum dos constituintes possui por si só e atingir características que excedem a simples adição das propriedades de cada um deles.

Com base nesta definição, podemos identificar três grupos de compósitos<sup>56</sup>:

- 1) compósitos nos quais se mantém e utiliza o excelente comportamento dos biocerâmicos (bioinertes ou bioactivos) e se reduz a falta de propriedades mecânicas através do reforço com uma segunda fase adequada;

*Exemplo:* compósitos de vidros bioactivos (biovidros reforçados com ZnO<sub>2</sub>),  
compósitos HA-PE (polietileno)

- 2) compósitos que actuam como suportes temporários para a genese do tecido. Aqui, utilizam-se cerâmicos bioreabsorvíveis, adicionando-lhes propriedades mecânicas e elásticas que satisfazem as necessidades funcionais da aplicação até que o tecido esteja totalmente regenerado;

*Exemplo:* PLA (“poly (L-lactyd) acid”)-β-TCP, PGA (“poly glicoacid”)-β-TCP

- 3) compósitos constituídos por fibras ou partículas cerâmicas, de modo a atingir uma combinação de propriedades mecânicas e elásticas impossíveis de obter com outros materiais;

*Exemplo:* compósitos de fibras de carbono reforçados com carbono



A maioria dos compósitos é criada para melhorar as propriedades mecânicas tais como a rigidez, a tenacidade e a resistência a certos ambientes corrosivos, de modo a satisfazer diferentes funções, nomeadamente mecânicas, físicas, biológicas e biomédicas. Apesar de serem considerados materiais multifásicos, muitos compósitos são apenas constituídos por duas fases; a **matriz**, que é contínua e rodeia a outra fase, denominada **fase dispersa**. Estas fases são quimicamente diferentes e separadas por uma interface distinta. As propriedades dos compósitos derivam das propriedades das fases constituintes, da proporção de cada uma delas e do tamanho, forma, distribuição e organização das partículas da fase dispersa.

## 4 – INTERACÇÕES ENTRE O BIOMATERIAL E O AMBIENTE BIOLÓGICO

O objectivo de um biomaterial é o de substituir uma parte ou uma função do organismo de uma forma segura, económica e fisiologicamente aceitável<sup>31</sup>. Quando o biomaterial é colocado no corpo humano por forma a cumprir o seu objectivo, contacta com os tecidos vivos que o circundam, do que resulta a criação de pelo menos uma interface entre o material e o sistema biológico. É a estabilidade a longo prazo desta interface que determina o sucesso ou insucesso de um implante<sup>33</sup>.

Os biomateriais podem interactuar passivamente com o meio fisiológico no qual são inseridos ou podem sofrer alterações microestruturais e químicas, que por sua vez conduzem a uma modificação da natureza da interface. Similarmente, a presença de um material prótico pode alterar e perturbar o ambiente biológico, gerando um meio de natureza diferente<sup>84</sup>. As interacções entre os materiais de implante e o receptor são várias e compreendem processos mecânicos, químicos e físicos, sendo a sua ocorrência determinada pelos seguintes factores<sup>7,85,86</sup>:

- propriedades do biomaterial;
- tratamento de superfície do material;
- “design” do implante;
- zona de implantação;
- traumatismos dos tecidos no momento da inserção;
- variáveis cirúrgicas;
- estado de saúde geral do paciente;
- rompimento físico da interface através do movimento.

A variedade multifactorial de processos que regulam as interacções entre o meio biológico e o biomaterial pode ser considerada uma sequência de quatro passos<sup>7</sup>:

1. as interacções físico-químicas iniciais entre o material e os componentes do tecido, na interface;
2. o efeito do ambiente biológico sobre o material (isto é, fenómenos de corrosão e de degradação);
3. o desenvolvimento da resposta local do tecido ao material imediatamente adjacente;

4. o transporte de produtos da reacção interfacial e a possibilidade de efeitos sistémicos.

#### 4.1 – FORMAÇÃO DA INTERFACE INICIAL

A implantação de qualquer material estabelece imediatamente uma interface sólido-líquido, envolvendo o próprio material e o sangue, soro ou fluido extracelular<sup>6</sup>. Rapidamente, as macromoléculas biológicas existentes nestes fluidos (principalmente proteínas e glicoproteínas) são adsorvidas à superfície sólida e como resultado, forma-se uma dupla camada entre o material e o seu novo ambiente<sup>86</sup>. Segundo Boyan e col.<sup>87</sup>, os primeiros constituintes orgânicos que se ligam ao biomaterial são componentes do soro presentes na zona da ferida e a sua afinidade para a superfície é regulada pelas características superficiais do material. Por outro lado, a adsorção relativa das proteínas, lípidos e hidratos de carbono influencia o tipo de células que são atraídas para a superfície, bem como determina quais as células que podem colonizar o implante com sucesso. As células chegam à superfície inorgânica por processos activos e de difusão, após o processo de adsorção, e por isso contactam com o implante sem que exista ligação física<sup>6,88</sup>.

É possível então afirmar que se bem que a formação da interface inicial se deva à adsorção de água, iões, açúcares, lípidos e proteínas, as alterações subsequentes nela verificadas são mediadas por células que estão presentes ou próximas da camada formada<sup>87</sup>. Estas células modulam o movimento de iões para o interior e o exterior da camada. Para além disso, podem modificar os constituintes orgânicos na interface, uma vez que as substâncias a ser sintetizadas (colagénio, proteínas de adesão...) dependem do tipo de células presentes.

#### 4.2 – EFEITOS DO MEIO BIOLÓGICO SOBRE O MATERIAL

É bem sabido que o ambiente biológico é um meio extremamente hostil e agressivo em relação a substratos sintéticos não biológicos. Assim, a maioria dos polímeros são degradados em maior ou menor grau, todos os metais sofrem corrosão e até mesmo os manifestamente estáveis cerâmicos mostram indícios de algum desgaste<sup>7</sup>. As consequências da degradação podem afectar a biocompatibilidade:

- a) os efeitos provocados no material podem alterar as suas propriedades, comprometendo, deste modo, a sua capacidade para desempenhar a função desejada<sup>7</sup>;



b) a libertação de qualquer componente do material (solúvel ou não) pode actuar como um potencial estímulo para o aparecimento de um processo inflamatório local, e por isso, funcionar como um factor determinante na resposta tecidular<sup>7</sup>.

Nos materiais cerâmicos, a degradação é causada quer pela solução envolvente, quer pelas células. No primeiro caso, a degradação deve-se à dissolução química ou à desintegração do material em pequenas partículas. A degradação mediada pelas células pode ser dividida em dois mecanismos<sup>89</sup>: fagocitose pelos macrófagos<sup>90</sup> e reabsorção pelos osteoclastos<sup>49</sup>. Existe muita controvérsia relativamente à degradação da hidroxiapatite. Alguns estudos sugerem que, *in vivo*, a degradação deste cerâmico é mediada pelas células<sup>91,92</sup> e/ou apenas causada pela solução<sup>93</sup>. *In vitro*, a degradação celular tem sido sugerida por alguns autores<sup>94</sup> e negada por outros<sup>95</sup>. Contudo, os cerâmicos em geral apresentam uma elevada resistência à degradação, devido às fortes ligações iónicas e covalentes que existem entre os átomos, sendo por isso necessária uma grande quantidade de energia para a sua ruptura. A taxa de degradação destes materiais dentro do organismo pode variar consideravelmente. Como resultado deste processo, pode verificar-se a libertação de contaminantes, caso o cerâmico não seja puro, provocando o aparecimento de respostas inflamatórias. Os níveis de libertação de iões de cálcio e fosfato de materiais reabsorvíveis têm sido identificados através da utilização de diferentes métodos, tais como a sua determinação no soro e urina, e em diferentes modelos animais, sem que se tenham obtido quaisquer resultados anómalos<sup>96</sup>. Para além disso, não se verificaram reacções particulares ou patológicas em estudos histológicos detalhados, nomeadamente do fígado, podendo-se concluir que os iões de cálcio e fosfato resultantes da dissolução destes cerâmicos são integrados no sistema regulador usual do organismo e são utilizados ou eliminados pelas vias normais<sup>96</sup>.

As propriedades físico-químicas do implante influenciam a estabilidade da interface criada quando da implantação do material<sup>97-101</sup>. As propriedades físicas incluem:

- forma (partículas ou blocos);
- porosidade;
- área de superfície;
- cristalinidade (tamanho e perfeição do cristal, tamanho do grão).

Os factores que tendem a aumentar a velocidade ou extensão da biodegradação são:

- aumento da porosidade;
- reduções no tamanho do cristal;
- aumento do número de imperfeições cristalinas,

- diminuição do tamanho do grão;
- aumento da área de superfície.

As propriedades químicas incluem:

- composição química (HA,  $\alpha$ -TCP,  $\beta$ -TCP);
- substituições iônicas;
- impurezas elementares;
- outras impurezas de fase resultantes da sinterização (tetracálcio de fosfato e óxido de cálcio);
- razão molar Ca/P.

A biodegradação ou bioreabsorção do material de implante é caracterizada por alterações nas propriedades físico-químicas, podendo ser considerada como uma combinação dos seguintes processos:

- a) físicos – abrasão, fractura, desintegração;
- b) químicos – dissolução, aumento da concentração local de cálcio e fosfato, conduzindo à formação de fases de superfície (fosfato de cálcio amorfo, dicálcio de fosfato dihidratado, octacálcio de fosfato e hidroxiapatite impura semelhante à apatite óssea);
- c) biológicos – redução no pH provocada por actividades celulares e fagocitárias (mediadas por macrófagos e osteoclastos), resultando na dissolução do implante (o encapsulamento tende a diminuir a extensão da degradação).

### 4.3 – RESPOSTA TECIDULAR LOCAL

Para além de satisfazerem as exigências físicas e funcionais impostas pela concepção dos implantes, os biomateriais têm de ser facilmente aceitáveis pelo organismo. De acordo com Hench<sup>30</sup>, um implante “ideal” é aquele que se comporta como se fosse equivalente ao tecido onde é inserido. Desta teoria advêm dois pressupostos:

- o tecido na interface deve ser o tecido normal do receptor;
- a resposta do material a um estímulo físico deve ser idêntica à do tecido que substitui.

Na prática, no entanto, a resposta adversa do receptor é frequentemente um factor limitativo na aplicação de biomateriais<sup>29</sup>.



Após a implantação de um biomaterial, observa-se um processo de inflamação dos tecidos provocada pela ferida infligida durante a cirurgia. A resposta normal à implantação deve ser portanto a de cicatrização de uma ferida, se bem que com algumas diferenças significativas, dado que a presença do implante condiciona de alguma forma o processo de recuperação. O mecanismo de recuperação envolve duas fases funcionais distintas mas que se sobrepõem no tempo<sup>38</sup>:

- a) a 1ª fase é de inflamação e envolve alterações localizadas da microvascularização e composição celular do tecido;
- b) a 2ª fase é de recuperação propriamente dita, em que o tecido tenta restaurar, estrutural e se possível funcionalmente, o estrago.

O processo inflamatório tem por objectivo eliminar, ou pelo menos conter, o agente estranho para que o tecido possa ser reparado e reconstruído<sup>6</sup>. A fase de inflamação envolve a activação da cascata de coagulação, a resposta celular (acumulação de leucócitos polimorfonucleares, seguida pela infiltração de macrófagos e linfócitos) e o recrutamento e proliferação de células indiferenciadas do mesênquima que originam o tecido de granulação<sup>6</sup>. Dependendo da extensão da ferida provocada, o tecido de granulação pode ser visto três a cinco dias depois da implantação do biomaterial<sup>102</sup>.

Quando um implante é inserido no organismo, a resposta inflamatória e o processo de recuperação que têm lugar são semelhantes aos que se verificam quando da formação de uma ferida simples<sup>38</sup>. O local de implantação é preenchido com sangue e forma-se uma rede de fibrina que serve de base para o crescimento subsequente do tecido fibroso. Após a deposição de proteínas do plasma na superfície do material, inicia-se uma resposta inflamatória aguda, em que os vasos dilatam e permitem a difusão através das suas paredes de glóbulos brancos, especialmente neutrófilos, e um exsudado extracelular que contém proteínas do plasma e mediadores bioquímicos. As células com actividade fagocitária, em particular os macrófagos, removem as células mortas e outras partículas. Paralelamente a esta actividade, inicia-se a regeneração vascular.

À medida que novos capilares crescem na área da ferida, os fibroblastos tornam-se activos e produzem colagénio ao mesmo tempo que o coágulo de fibrina é reabsorvido. O colagénio consegue atravessar a incisão na região do implante, formando uma cápsula fibrosa. A resposta dos tecidos deve estar estabilizada num período de 4-8 semanas e o aspecto



tecidual deve ser semelhante ao tecido normal de uma cicatriz<sup>6</sup>. Esta resposta dada pelo organismo é geralmente descrita como um encapsulamento fibroso do implante. O tecido que rodeia o implante torna-se o ponto de partida do processo de recuperação, porque degrada tecido desvitalizado e fornece células precursoras de osteoblastos e condroblastos que proliferam e se diferenciam, de modo a desempenhar as suas funções específicas neste processo.

Caso o material apresente alguma reactividade, os produtos resultantes da degradação são libertados para os tecidos<sup>6</sup>, onde se acumulam. Se estes produtos apresentarem uma actividade biológica reduzida, podem ser acomodados sem que se verifique uma resposta celular significativamente superior ou quaisquer sintomas clinicamente reconhecíveis. Caso exista uma actividade biológica superior, a resposta aumenta, especialmente com uma exacerbação da resposta inflamatória crónica e reparação fibroblástica excessiva<sup>6</sup>, verificando-se um atraso no processo de recuperação. As células fagocitárias, especialmente os macrófagos, permanecem durante longos períodos ou cronicamente nas proximidades do implante e por vezes originam células gigantes multinucleadas que estabelecem contacto íntimo com o material estranho. Os macrófagos, na sua tentativa de digerir as partículas, ficam fortemente activados e sintetizam e libertam grandes quantidades de enzimas que podem ser destrutivas, provocando a atracção de um maior número de células e a danificação do tecido. A inflamação excessiva e a formação do tecido de granulação parecem inibir a osteogénese e, normalmente a reabsorção óssea (os macrófagos podem atacar directamente o osso e podem excretar um factor activador dos osteoclastos, promovendo assim a osteólise); a dor e o inchaço tornam-se problemas clínicos que levam à remoção do implante<sup>6</sup>.

Osborn e col.<sup>103</sup> classificaram os biomateriais em três categorias, baseando-se na resposta dada pelo tecido receptor. Assim, existem materiais:

- **biotolerantes:** a resposta é negativa ou tolerável (o implante é separado do tecido ósseo por um tecido fibroso, isto é, há encapsulamento do implante);

**Exemplos:** aço inoxidável, polimetil metacrilato.

- **bioinertes:** a resposta é inexistente (não há formação do tecido fibroso, logo, o tecido ósseo está em contacto directo com o implante);

**Exemplos:** alumina, titânio, zircónia.

- **bioactivos:** a resposta é positiva (cria-se uma ligação entre o tecido ósseo e o implante; os materiais bioactivos utilizados na substituição óssea apresentam iões cálcio e grupos fosfato livres à sua superfície, promovendo assim uma firme ligação com o osso circundante).

**Exemplos:** hidroxiapatite, fosfatos de cálcio, biovidros, polímeros como o Polyactive.

Existem, basicamente, quatro tipos de resposta possíveis do tecido ao implante<sup>30,38</sup>:

- 1) se o material é tóxico – o tecido que envolve o implante morre;
- 2) se o material não é tóxico, mas é biologicamente inactivo – forma-se uma cápsula de tecido fibroso de espessura variável, não aderente à superfície do implante. O material é definido como inerte;
- 3) se o material não é tóxico e é biologicamente activo – forma-se uma ligação interfacial entre o material e o tecido. O material é definido como bioactivo;
- 4) se o material não é tóxico e se dissolve – há substituição do material pelo tecido circundante. O material é definido como reabsorvível.

#### 4.4 – RESPOSTA TECIDULAR SISTÉMICA E REMOTA

Os produtos libertados pelos materiais reactivos podem ser solúveis e, neste caso, passam rapidamente para o fluido extracelular e daí são transportados pelo sistema linfático ou vascular. É então possível que este material dissolvido seja metabolizado e excretado, ou que seja armazenado em qualquer tecido<sup>6</sup>. Contudo, os produtos também podem ser insolúveis. Dependendo do seu tamanho, tais partículas podem ser aprisionadas (por exemplo, por macrófagos) e depois passar para a corrente linfática e subsequentemente depositadas (por exemplo, nos nódulos linfáticos). Caso estes produtos tenham a capacidade de irritar o tecido, o que é muito provável, então os problemas aparecem por todo o organismo ou em local remoto através do qual os produtos passam ou no qual são depositados<sup>6</sup>.



## 5 - AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE

A implantação de um biomaterial em tecidos vivos resulta numa interface que é de extrema importância para o desempenho e sucesso do implante. O conhecimento e a caracterização dos processos que ocorrem nesta interface, isto é, o conhecimento da biocompatibilidade do implante, são necessários antes da sua utilização no corpo humano e permitem-nos desenvolver materiais para aplicações específicas<sup>26,28</sup>. Contudo, devido à variedade de processos que aqui ocorrem, a compreensão destas interacções tem sido difícil.

Durante os últimos trinta anos, os estudos de biocompatibilidade têm sido feitos principalmente *in vivo*, em animais. No entanto, a duração das experiências, o número de animais necessário para obter um certo grau de fiabilidade nos resultados estatísticos, os esforços legais feitos para reduzir a experimentação animal ao mínimo e os avanços recentes nas técnicas de cultura de células e de tecidos levaram à aplicação de testes *in vitro* no estudo dos biomateriais<sup>26,28</sup>. Assim, actualmente, qualquer programa de avaliação de biomateriais deve incluir testes de biocompatibilidade feitos em culturas celulares<sup>104</sup>.

A utilização de culturas de células na avaliação da biocompatibilidade apresenta uma série de vantagens<sup>104,105</sup>:

- detecção rápida e de baixo custo das potencialidades dos biomateriais;
- método altamente sensível que possibilita o reconhecimento e exclusão de materiais citotóxicos, numa fase precoce do estudo;
- determinação de parâmetros de crescimento celular com consequente avaliação estatística;
- capacidade de realizar numerosos ensaios nas mesmas condições experimentais;
- possibilidade de testar células humanas;
- redução da experimentação animal;
- possibilidade de investigar interacções específicas a nível celular ou molecular;
- controlo do ambiente físico-químico (pH, temperatura, pressão osmótica e tensão de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>) e das condições fisiológicas.

Tem igualmente alguns inconvenientes<sup>105</sup>:

- extrapolação difícil dos resultados obtidos para a situação *in vivo*;
- limitação do método pela escolha dos tipos celulares;



- não fornecer qualquer informação sobre a degradação do material;
- possibilidade de ocorrência de desdiferenciação, isto é, perda das características fenotípicas das células em relação ao tecido a partir do qual foram isoladas.

O estudo da biocompatibilidade de materiais envolve duas fases de avaliação:

1. testes de citotoxicidade
2. testes de biocompatibilidade específica.

A toxicidade *in vitro* é o efeito negativo ou deletério de um agente nas funções bioquímicas celulares normais, isto é, a perturbação da homeostasia celular. Este efeito pode assumir várias formas, desde a perda da viabilidade celular até a alterações das funções celulares que apenas podem ser detectadas através de meios bioquímicos. A morte celular, uma adesão celular reduzida, a alteração da morfologia da célula, a redução da proliferação celular e da actividade biossintética são exemplos de toxicidade *in vitro*<sup>105</sup>.

Os testes citotóxicos têm por objectivo actuarem como um método de detecção fiável, conveniente e reprodutível, a fim de detectar, numa fase inicial do processo, a morte celular ou qualquer outro efeito negativo nas funções celulares<sup>104,106</sup>. Tal observação permite a exclusão imediata de qualquer material tóxico, evitando deste modo uma investigação subsequente<sup>107</sup>. Estes testes incluem vários métodos quantitativos<sup>28,105-108</sup>:

- a) ensaios feitos em extractos (para detectar produtos libertados que podem produzir um efeito tóxico);
- b) ensaios feitos por contacto directo (normalmente, uma suspensão celular é directamente semeada sobre o material);
- c) ensaios feitos por contacto indirecto (as células são separadas do material por uma barreira de difusão que evita danos físicos das células por parte do material).

As linhas celulares permanentes são preferencialmente usadas nestes testes, devido à sua homogeneidade. Os parâmetros que são avaliados nesta primeira fase, qualitativa e quantitativamente, são a morfologia, proliferação, viabilidade, integridade da membrana e degeneração ou lise celular. Os materiais que apresentam efeitos citotóxicos reduzidos ou inexistentes são então sujeitos aos estudos *in vitro*, utilizando o tipo celular adequado para o objectivo para o qual se destina o biomaterial (2ª fase da avaliação)<sup>28,104,109,110</sup>:

- osteoblastos (obtidos a partir de medula óssea e osso trabecular) para materiais de substituição óssea e dentária;

- fibroblastos gengivais para materiais dentários;
- células epiteliais para materiais para a reconstituição do ouvido médio;
- linfócitos/macrófagos/granulócitos para avaliar a interferência dos materiais com o sistema imunitário;
- células endoteliais para a modulação da coagulação (próteses vasculares);
- células endoteliais e epiteliais da córnea para testar lentes intra-oculares e de contacto.

As culturas celulares referem-se às células provenientes de um tecido, originando uma suspensão celular que pode ser cultivada sob a forma de uma monocamada aderente sobre um substrato sólido, ou sob a forma de uma suspensão num meio de cultura. A esta cultura, constituída por células directamente retiradas do tecido, dá-se o nome de **cultura primária**<sup>111</sup>.

A cultura primária pode ser obtida por migração de células a partir de fragmentos do tecido, ou por desagregação mecânica ou enzimática desse tecido. A migração celular é um processo relativamente lento que pode ser altamente selectivo (selecção em função das células com maior capacidade proliferativa) e cujo sucesso depende da aderência dos tecidos utilizados ao substrato. É particularmente útil quando se dispõe de uma pequena quantidade de tecido ou quando o crescimento celular é lento. A digestão enzimática evita a selecção observada no método anterior, embora seleccione as células em função da sua resistência à acção das enzimas, e proporciona uma cultura celular que é mais representativa do tecido, num menor intervalo de tempo. As enzimas mais frequentemente utilizadas neste processo são a tripsina, colagenase, elastase, hialuronidase, DNase, dispase, ou várias combinações destas<sup>112</sup>. Algumas destas enzimas, tal como a tripsina, provocam uma desagregação completa, mas podem causar danos nas células, enquanto que outras, como a colagenase, possuem uma acção mais incompleta, mas inofensiva. A desagregação mecânica produz uma suspensão celular mais rapidamente, mas pode causar danos mecânicos.

As culturas primárias são normalmente heterogéneas, com uma baixa fracção de células proliferativas, mas contêm uma variedade de tipos celulares que são representativos do tecido. Nestas culturas, as células sofrem selecção de acordo com a sua capacidade de migrar dos fragmentos, ou, no caso da suspensão celular, apenas as células que sobrevivem ao processo de desagregação e aderem ao substrato poderão perpetuar a cultura<sup>113</sup>. Verifica-



se depois uma segunda selecção: o número de células proliferativas aumenta, alguns tipos celulares sobrevivem mas não aumentam, enquanto que outros são incapazes de sobreviver nas condições utilizadas. Deste modo, a proporção relativa de cada tipo celular é continuamente alterada<sup>114</sup>. Após atingir a confluência (isto é, quando toda a área de crescimento disponível é utilizada e as células mantêm-se em contacto íntimo umas com as outras), o crescimento é reduzido e a cultura tem de ser dividida. O processo normalmente envolve a remoção do meio de cultura e a dissociação das células por tratamento enzimático. Este processo constitui uma **passagem** e a **subcultura** resultante torna-se o início de uma linha celular, que se pode propagar e ser subcultivada várias vezes. A pressão selectiva das condições de cultura implica em cada passagem<sup>114</sup>:

- um aumento do número total de células ao longo de várias gerações;
- o predomínio das células com elevada capacidade proliferativa;
- um maior grau de uniformidade na população celular.

A maioria das linhas celulares pode ser propagada de modo inalterado durante um número limitado de gerações, a partir do qual morrem ou dão origem a linhas celulares contínuas ou permanentes. A alteração que ocorre numa cultura, quando dá origem a uma linha celular contínua, é vulgarmente denominada “transformação *in vitro*” e pode ser espontânea ou induzida quimicamente ou por intervenção de vírus<sup>114</sup>. As linhas celulares permanentes podem também ser obtidas de tecidos tumorais – linhas celulares tumorais. Ainda não está totalmente esclarecido se as células que dão origem a estas linhas estão presentes em pequeno número nos fragmentos iniciais do tecido, ou se surgem depois como resultado da transformação de uma ou mais células. As linhas celulares contínuas sofrem alterações morfológicas e a sua formação é frequentemente acompanhada por um aumento da carcinogenicidade<sup>114</sup>. Contudo, a maioria das células normais não dá origem a estas linhas.

As linhas celulares permanentes apresentam algumas vantagens quando utilizadas no estudo da biocompatibilidade<sup>104</sup>:

- representam uma fonte abundante de material celular homogéneo;
- possuem um crescimento rápido;
- as condições de cultura estão padronizadas;
- as culturas são menos sujeitas a contaminações;
- as células podem ser congeladas e recuperadas intactas, mesmo depois de alguns anos.

Contudo, também apresentam desvantagens<sup>104</sup>:

- possibilidade de variações do fenótipo e do genótipo, devido à natureza oncogénica destas células;
- relação proliferação/diferenciação “desacoplada”;
- os resultados obtidos *in vitro* com células tumorais ou transformadas não podem ser transferidos arbitrariamente para situações clínicas *in vivo*;
- normalmente, não apresentam muitas das características fenotípicas das células normais correspondentes (proteínas da membrana, capacidade de fagocitose...).

Como já foi referido, a maior parte das células provenientes de tecidos duros crescem sob a forma de monocamadas aderentes, e, a menos que tenham sofrido transformação, a seguir à desagregação do tecido ou à subcultura, elas vão aderir e espalhar-se sobre o substrato antes de começarem a proliferar. A adesão celular é mediada por receptores específicos da superfície da célula e por proteínas de adesão (fibronectina, laminina, integrinas, caderinas, proteoglicanos...) <sup>114</sup>.

A cultura celular é influenciada pelo ambiente de quatro modos distintos <sup>114,115</sup>:

- 1) natureza do substrato sobre o qual crescem as células. Este pode ser sólido (plástico ou vidro), semisólido (colagénio ou agar) ou líquido.
- 2) constituição físico-química e fisiológica do meio.
- 3) constituição da fase gasosa (O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>).
- 4) temperatura de incubação. A temperatura recomendada para a maioria das linhas celulares humanas e de outros animais de sangue quente é de 36,5 – 37,0°C. As células cultivadas toleram reduções consideráveis de temperatura, podendo sobreviver durante dias a 4°C. No entanto, não toleram mais do que 2°C acima do normal por mais do que algumas horas e morrem rapidamente a partir de 40°C.

Actualmente, os ensaios *in vitro* são utilizados para os seguintes objectivos <sup>104</sup>:

- avaliar a toxicidade e biocompatibilidade de novos biomateriais;
- avaliar a libertação de produtos de degradação que podem provocar efeitos tóxicos;
- controlar a qualidade do material durante os processos de fabricação e de esterilização e no produto final;
- monitorizar a libertação de agentes biologicamente activos a partir de sistemas de libertação de fármacos e seus efeitos nas células cultivadas sobre os biomateriais.



Há vários estudos experimentais que demonstraram uma boa correlação entre ensaios de citotoxicidade *in vitro* e *in vivo*, confirmando assim a utilidade dos testes *in vitro* como sistemas para selecção de materiais. Contudo, deve ser tido em consideração que as células cultivadas *in vitro* são geralmente mais sensíveis aos materiais tóxicos do que os tecidos *in vivo*. Por isso, um material tóxico *in vitro* não é necessariamente tóxico para os tecidos, enquanto que um material inofensivo para as células, é normalmente inerte *in vivo*. As excepções são raras, tal como nos casos em que o material, ao libertar partículas de corrosão ou desperdícios causados pelo desgaste *in vivo*, activa processos de defesa, levando à rejeição do implante<sup>104</sup>.

### **Culturas de células osteogénicas**

Os sistemas de cultura de células osteogénicas representam uma fonte inesgotável de material experimental para o estudo de efeitos de hormonas, factores de crescimento, fármacos e produtos celulares no crescimento ósseo e na diferenciação celular, num ambiente controlado. Constituem igualmente um excelente instrumento para avaliar as interacções dos biomateriais de substituição óssea e dos seus produtos de degradação com as células ósseas, na interface tecido ósseo/implante.

As culturas de células osteogénicas têm sido extensivamente caracterizadas, tendo sido demonstrado que produzem níveis elevados de fosfatase alcalina, colagénio tipo I, osteonectina, osteopontina, osteocalcina e outras proteínas não-colagénicas que existem no tecido ósseo e que expressam tais marcadores segundo um padrão temporal semelhante ao que se verifica *in vivo*. Também exibem respostas à acção de hormonas osteotrópicas e factores de crescimento e apresentam capacidade osteogénica<sup>116</sup>.

A formação de uma matriz mineralizada, mais especificamente de nódulos mineralizados, é um objectivo essencial para avaliar a capacidade osteogénica das culturas derivadas de células ósseas. A formação destes nódulos parece estar relacionada com o número de células semeadas e os estudos efectuados referem que cada nódulo surge a partir de uma única célula ou de uma unidade osteogénica formadora de colónias (CFU-O)<sup>116</sup>. Estes nódulos coram intensamente para a fosfatase alcalina e são formados por células osteoblásticas depositadas sobre uma matriz osteóide rica em fibrilas de colagénio. Na presença de uma fonte de fosfato, tal como o  $\beta$ -glicerofosfato, estas estruturas desenvolvem

áreas mineralizadas que estão intimamente ligadas às fibras de colagénio. Em geral, o processo de mineralização nas culturas osteogénicas assemelha-se ao que se observa no osso primário que é produzido *in vivo*<sup>116</sup>.

A formação destes nódulos depende de numerosos factores. Entre eles, o soro é de particular importância, uma vez que fornece os nutrientes necessários que podem não estar presentes no meio de cultura ou existirem em quantidades demasiado pequenas para favorecer o crescimento exponencial. O ácido ascórbico (ascorbato) também é necessário para promover a produção de uma matriz de colagénio. Há vários trabalhos anteriores que sugerem que é enviado um sinal para que se inicie a síntese da matriz, sinal este que depende da organização do colagénio e da presença de ácido ascórbico, permitindo assim a subsequente indução da diferenciação osteoblástica e da mineralização. Outro pré-requisito para que haja uma mineralização reprodutível é a presença de  $\beta$ -glicerofosfato, especialmente nas culturas de células ósseas humanas, uma vez que constitui uma fonte local de fosfato inorgânico ao actuar como substrato para a fosfatase alcalina<sup>117,118</sup>. Contudo, alguns estudos sugerem que este composto apenas facilita a mineralização *in vitro* e que mesmo na sua ausência, pode ocorrer uma mineralização dos nódulos mais lenta, mas igualmente extensa<sup>116</sup>. Os glucocorticóides também têm sido utilizados nas culturas de células osteoblásticas porque aumentam o tamanho e número de nódulos formados e estimulam a diferenciação das células osteoprogenitoras<sup>117,119-123</sup> e a expressão da fosfatase alcalina<sup>44</sup>.

As culturas de células ósseas têm sido obtidas através da aplicação de várias técnicas, desde a digestão sequencial pela colagenase e tripsina<sup>124-131</sup> até à separação mecânica<sup>132,133</sup>, em diferentes tecidos (medula óssea, osso trabecular, periósteo), de várias espécies (Homem, ratinho, rato, galinha, coelho e macaco)<sup>134-146</sup>.

### *Relação entre proliferação e diferenciação osteoblástica*

A formação óssea que ocorre quer durante o desenvolvimento, quer durante a remodelação óssea implica um controlo rigoroso da proliferação e da diferenciação dos osteoblastos. A regulação destes processos biológicos envolve a expressão sequencial de genes específicos do tecido ósseo em resposta a uma série de sinais reguladores que são mediados por factores fisiológicos<sup>147</sup>. Esta sequência temporal da expressão génica ocorre durante o



desenvolvimento progressivo do fenótipo osteoblástico e é caracterizada por três períodos: crescimento (proliferação) e biossíntese da matriz extracelular; desenvolvimento, maturação e organização da matriz extracelular; e mineralização da matriz extracelular<sup>147</sup>.

A importância biológica de um sistema de cultura de osteoblastos como modelo para estudar o comportamento de proliferação/diferenciação das células ósseas é suportada pela sequência de expressão de genes determinada em células diplóides normais cultivadas *in vitro* que é semelhante ao padrão de expressão génica *in vivo*<sup>147,148</sup>. Durante os 10-12 primeiros dias de cultura, um período de proliferação activa é reflectido pela actividade mitótica com expressão dos genes reguladores do ciclo celular e do crescimento celular. Estes genes codificam proteínas que favorecem a proliferação, tal como a histona. Durante este período proliferativo, vários genes associados à formação da matriz extracelular (responsáveis pela codificação do colagénio tipo I, fibronectina e TGF- $\beta$ ) são activamente expressos e gradualmente inibidos. Imediatamente a seguir à inibição da proliferação celular, causada pela formação da matriz, são detectadas proteínas associadas ao fenótipo osteoblástico, como a fosfatase alcalina. Durante o período pós-proliferativo que se segue (entre os dias 12 e 18 de cultura), a matriz extracelular sofre uma série de modificações na sua composição e organização que a tornam apta para a mineralização. À medida que ocorre esta “maturação” da matriz, todas as células apresentam uma coloração histoquímica positiva para a presença da fosfatase alcalina. Durante a mineralização da matriz extracelular, os níveis celulares desta enzima declinam e são induzidos genes responsáveis pela expressão de outras proteínas características do tecido ósseo (osteopontina, osteocalcina e sialoproteína óssea). Verifica-se igualmente a acumulação de depósitos de fosfato de cálcio. Frequentemente, ocorre uma proliferação compensatória pouco extensa na matriz mineralizada, em associação com a apoptose celular e o aumento da actividade da collagenase<sup>147,148</sup>.

A expressão sequencial e regulada de genes responsáveis pelo desenvolvimento do fenótipo osteoblástico define uma relação recíproca e funcionalmente acoplada entre a proliferação e a diferenciação. A compreensão dos mecanismos biológicos que suportam o desenvolvimento das células ósseas, em termos de proliferação/diferenciação, constitui uma base viável para o estudo das perturbações do tecido ósseo.

# **CAPÍTULO II**

**UTILIZAÇÃO DE CULTURAS DE CÉLULAS  
OSTEOBLÁSTICAS HUMANAS COMO  
MODELO *IN VITRO* NO ESTUDO DAS  
INTERACÇÕES TECIDO  
ÓSSEO/BIOMATERIAIS: INFLUÊNCIA DAS  
CONDIÇÕES DE CULTURA**



## 1 – INTRODUÇÃO

A utilização crescente de biomateriais osteocompatíveis e bioactivos em cirurgia maxilofacial e ortopédica levou à necessidade da avaliação da biocompatibilidade destes materiais. As interacções celulares que ocorrem na interface biomaterial/tecido ósseo foram já reconhecidas como um importante factor nesta avaliação, visto ser necessário um contacto íntimo e directo entre o biomaterial e o ambiente biológico activo, para que sejam garantidas a sua biofuncionalidade e sobrevivência a longo prazo<sup>2,3,4,5</sup>.

As culturas celulares constituem instrumentos úteis para o estudo detalhado de interacções específicas a nível celular e molecular e podem também ser utilizadas para distinguir entre os biomateriais, aqueles que são potencialmente adequados para utilização em seres humanos<sup>146</sup>. Tais culturas têm sido correntemente utilizadas para estudar a formação de tecido mineralizado, permitindo a avaliação da diferenciação e do metabolismo das células ósseas em condições simplificadas e definidas<sup>146,149</sup>.

A utilização de culturas de células ósseas foi descrita, pela primeira vez, na década de 60. Desde então, os estudos com culturas celulares referentes à regulação do crescimento e actividade das células ósseas têm sido realizados utilizando células ósseas de origem animal ou humana, derivadas de tecido ósseo normal ou de osteosarcoma<sup>117-119,121,124,137,142,149-164</sup>. Cada um dos modelos apresenta limitações próprias. A possibilidade de existirem variações inter-espécie deve ser sempre considerada quando se utilizam culturas de células provenientes de animais. As linhas celulares tumorais podem não reflectir o verdadeiro fenótipo das células correspondentes não transformadas. As culturas de células ósseas humanas reproduzem, em princípio, mais fielmente a actividade óssea *in vivo*<sup>19</sup>. Existe uma grande quantidade de informação que mostra diferenças de comportamento entre as células osteoblásticas provenientes de diferentes origens, no que diz respeito às características de crescimento, expressão dos marcadores fenotípicos e resposta a hormonas e factores de crescimento<sup>136,137,144,145</sup>.

Os vertebrados adultos necessitam de um fornecimento contínuo de osteoblastos tanto para a remodelação óssea, como para a regeneração que ocorre durante o processo de reparação de uma fractura. Tal implica a existência de um reservatório de células no organismo, capazes de osteogénese. De acordo com vários autores, a fonte mais provável são células

mesenquimais indiferenciadas, pluripotentes existentes no estroma da medula óssea, que possuem elevadas actividades proliferativa e de diferenciação e são capazes de originar várias linhagens celulares, incluindo a osteoblástica<sup>123</sup>.

A utilização de culturas celulares derivadas de medula óssea<sup>117,123,144,149,151,157,159-165</sup> provou, nestes últimos anos, ser um excelente modelo para o estudo da diferenciação osteoblástica, pelo facto destas culturas apresentarem um comportamento de proliferação/diferenciação representativo de uma população de osteoblastos *in vivo*, nomeadamente:

- elevada actividade da fosfatase alcalina;
- capacidade de sintetizar colagénio tipo I e outras proteínas não-colagénicas (osteonectina, osteopontina, osteocalcina...);
- capacidade de produzir uma matriz extracelular mineralizada<sup>146,151,160,165,166</sup>.

Os estudos que envolvem a utilização de sistemas de cultura de células requerem uma população celular com um fenótipo relevante e um número elevado de células. Devido à pequena quantidade de material biológico, particularmente de origem humana, disponível para a cultura primária, é frequente recorrer à subcultura sucessiva, para deste modo obter um número suficiente de células. Por isso, e com o objectivo de seleccionar a população (ou subcultura) mais adequada, a caracterização do sistema celular deve compreender a avaliação do fenótipo ao longo das sucessivas subculturas<sup>145,150</sup>, visto que se verifica uma perda do fenótipo quando células diplóides são cultivadas durante longos períodos de tempo<sup>167</sup>.

A expressão de um determinado fenótipo celular em cultura depende do material biológico utilizado (e da sua manipulação) e das condições de cultura, nomeadamente os meios de cultura, o tempo de cultura e a presença de compostos que influenciam a proliferação e diferenciação celular<sup>115,168-171</sup>. É por isso conveniente seleccionar condições experimentais apropriadas, de modo a obter culturas de células ósseas com um comportamento osteoblástico definido e reprodutível. A descoberta de que as células podiam ser cultivadas e propagadas *in vitro* levou à procura de meios de cultura cada vez mais definidos, capazes de sustentar um crescimento celular contínuo. Apesar de vários anos de investigação, em que se tentou fazer corresponder um meio particular a condições de cultura e tipos celulares específicos, a escolha do meio de cultura nem sempre é óbvia e é muitas vezes empírica<sup>115</sup>.



O objectivo do estudo que se apresenta neste capítulo foi o de seleccionar as condições experimentais mais apropriadas para a obtenção de culturas de células de medula óssea humana com expressão completa do fenótipo osteoblástico para serem utilizadas como modelo *in vitro* no estudo da biocompatibilidade e bioactividade de materiais utilizados para substituição óssea.

Na primeira parte do trabalho foi investigado o comportamento de proliferação e actividade funcional de células de medula óssea humana cultivadas em dois meios de cultura extensivamente utilizados,  $\alpha$ - Minimal Essential Medium Eagle ( $\alpha$ -MEM) e Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) e na presença de ácido ascórbico (AA),  $\beta$ -glicerofosfato ( $\beta$ -GF) e dexametasona (Dex), substâncias que de acordo com o descrito na literatura<sup>117</sup> favorecem o desenvolvimento de culturas com características osteoblásticas. Este estudo foi efectuado ao longo de três subculturas de modo a avaliar o comportamento das células osteoblásticas a longo prazo. Os resultados obtidos mostraram que as células da primeira subcultura mantidas em  $\alpha$ -MEM apresentaram a melhor relação de proliferação/diferenciação celular relativamente ao desenvolvimento do fenótipo osteoblástico. Assim, na segunda parte do trabalho, foram avaliados os efeitos do ácido ascórbico,  $\beta$ -glicerofosfato e dexametasona no comportamento osteoblástico de células de medula óssea humana da primeira subcultura e cultivadas em  $\alpha$ -MEM.

## **2 – CULTURA DE CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA HUMANA: INFLUÊNCIA DO MEIO DE CULTURA**

### **2.1 – MATERIAL E MÉTODOS**

Os reagentes utilizados foram adquiridos à Gibco BRL, Merck e Sigma – Aldrich Quimica S.A.

#### ***CULTURAS CELULARES***

As culturas de células osteoblásticas foram efectuadas a partir de medula óssea humana, obtida de procedimentos cirúrgicos ortopédicos correctivos efectuados a indivíduos de

ambos os sexos, com idades compreendidas entre os 20 e os 60 anos, que não estavam a ser submetidos a qualquer tipo de terapêutica medicamentosa. A medula óssea foi cultivada em  $\alpha$ - Minimal Essential Medium Eagle ( $\alpha$ -MEM) e em Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) enriquecidos com 10% de soro bovino fetal (SBF); foram igualmente adicionados  $2,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de fungizona e  $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de gentamicina, um antifúngico e um antibiótico respectivamente, de modo a evitar possíveis contaminações. As culturas foram incubadas a  $37^\circ\text{C}$  numa atmosfera húmida contendo 95% de ar e 5% de  $\text{CO}_2$  e o meio foi mudado duas vezes por semana. Estas culturas foram mantidas até próximo da confluência e, nesta fase, as células foram libertadas enzimaticamente (solução de 0,04% de tripsina e 0,025% de colagenase), contadas num hemocítmetro (Celltac – NIHON KOHDEN) e semeadas em microplacas de 96 poços para cultura de células (COSTAR). A 2ª e 3ª subculturas foram obtidas por tripsinização da 1ª e 2ª subculturas, respectivamente, efectuada durante a fase exponencial de crescimento. As células em subcultura foram semeadas a uma densidade de  $10^4$  células por centímetro quadrado ( $10^4$  células. $\text{cm}^{-2}$ ) e cultivadas em condições experimentais idênticas às utilizadas na cultura primária e na presença de ácido ascórbico ( $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ),  $\beta$ -glicerofosfato ( $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) e dexametasona ( $10 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) por um período de 35 dias. A monitorização das culturas foi feita diariamente, utilizando um microscópio de contraste de fase.

### **CARACTERIZAÇÃO DAS CULTURAS CELULARES**

As culturas celulares mantidas em condições experimentais seleccionadas foram caracterizadas nos dias 3, 7, 14, 21, 28, e 35 para avaliação da morfologia celular, proliferação celular, conteúdo em proteína total, actividade da fosfatase alcalina e capacidade de formação de depósitos de fosfato de cálcio na matriz extracelular. Assim, a determinação dos parâmetros mencionados foi efectuada em intervalos de 3 a 7 dias e, nestas condições, não é possível avaliar o momento exacto da expressão máxima dos vários parâmetros.

#### Morfologia celular

As células de medula óssea humana foram observadas durante a fase inicial da cultura, isto é, 30 min, 1 h, 4 h e 24 h após o início da cultura e ao longo do período de incubação. As células foram observadas por microscopia de contraste de fase e por microscopia electrónica de varrimento (MEV).



## Métodos bioquímicos

### **a) Proliferação/viabilidade celular**

Avaliada pelo ensaio do MTT que se baseia na redução do sal de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) pelas células viáveis e determinação espectrofotométrica do produto formado<sup>172</sup>.

Em cada dia seleccionado para este ensaio, foram adicionados 10 µl de MTT (5 mg.ml<sup>-1</sup>) a cada poço e as células foram incubadas por um período de 4 horas, nas condições acima referidas. O MTT é então incorporado pelas células metabolicamente activas, produzindo cristais de formazan de cor púrpura que se acumulam no seu interior. No final deste tempo, foram adicionados 100 µl de Dimetilsulfóxido a cada poço. As placas foram agitadas à temperatura ambiente durante 1 minuto para dissolver os cristais de formazan, e em seguida, as amostras foram lidas num leitor ELISA (Denley Wellscan), a 600 nm.

### **b) Proteína total**

Avaliada pelo método de Lowry<sup>173</sup>, que se baseia na reacção do reagente de Folin-Ciocalteu com os aminoácidos aromáticos (tirosina e fenilalanina), após tratamento com uma solução alcalina, originando um produto azul que é medido espectrofotometricamente. Após a remoção do meio de cultura, as células foram lavadas duas vezes com uma solução tampão fosfatada (“Dulbecco’s Phosphate Buffered Saline” – PBS). Foram adicionados a cada poço 100 µl de NaOH 0,1M e as placas foram incubadas a 37°C durante 1 hora. Ao fim deste tempo, foram adicionados 500 µl de uma solução (0,01 g.ml<sup>-1</sup> de tartarato de sódio + 0,005 g.ml<sup>-1</sup> de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O em água destilada com 1 gota de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado + 20 g.L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> em NaOH 0,1M, numa proporção de 1:9) e deixou-se actuar durante 10 minutos. Foram então adicionados 50 µl de reagente fenol (reagente Folin-Ciocalteu diluído em água destilada, numa razão de 1:1) a cada poço e as amostras foram mantidas durante 1 hora, no escuro. A absorvância de cada amostra foi determinada a 750 nm num espectrofotómetro de fluxo contínuo (JENWAY 6405) e comparada com os valores obtidos para uma série de padrões de albumina sérica bovina feitos a partir de uma solução de 0,5 mg.ml<sup>-1</sup> em NaOH 0,1M. Os resultados obtidos foram expressos em microgramas de proteína existente na amostra por centímetro quadrado (µg.cm<sup>-2</sup>).

### ***c) Actividade da fosfatase alcalina***

Avaliada pela hidrólise do p-nitrofenilfosfato pela fosfatase alcalina e determinação espectrofotométrica do p-nitrofenol formado.

Após a remoção do meio de cultura, as células foram lavadas duas vezes com uma solução tampão, pH 7,4 (PBS) e foram adicionados 100 µl de água destilada com 0,1% Triton X-100 a cada poço. Seguidamente, adicionaram-se 80 µl de substrato (solução a 25 mmol.L<sup>-1</sup> de p-nitrofenilfosfato em tampão alcalino) a cada poço e as placas foram incubadas a 37°C, por um período adicional de 30 minutos. A reacção foi interrompida pela adição de 20 µl de NaOH 5 M. A absorvância de cada amostra foi determinada a 405 nm num leitor ELISA (Denley Wellscan) e comparada com os valores obtidos para uma série de padrões de p-nitrofenol. Os resultados foram expressos em nanomoles de p-nitrofenol produzido por minuto e por centímetro quadrado (nmol.min<sup>-1</sup>.cm<sup>-2</sup>) ou por micrograma de proteína (nmol.min<sup>-1</sup>.µg proteína<sup>-1</sup>).

### Métodos histoquímicos

As culturas, após fixação com 1.5% glutaraldeído em 0,14 M tampão cacodilato de sódio durante 10 minutos, foram coradas histoquimicamente para identificação da presença de fosfatase alcalina, depósitos de cálcio (método da Alizarina vermelha) e depósitos de fosfato (método de von Kossa)<sup>174</sup>.

### ***a) Identificação histoquímica da fosfatase alcalina***

Baseada na hidrólise do naftil fosfato de sódio (éster fosfórico) pela fosfatase alcalina e precipitação do fosfato libertado por reacção com um composto apropriado (sal de diazónio).

As culturas fixadas foram mantidas durante 1 hora no escuro, com uma solução preparada em tampão Tris, pH 10, contendo 2 mg.ml<sup>-1</sup> de naftil fosfato de sódio e 2 mg.ml<sup>-1</sup> de fast blue RR salt (Sigma F-0500); a incubação foi interrompida com a lavagem das amostras com água destilada.

A reacção positiva traduz-se no aparecimento de uma coloração de castanho a preto.



## ***b) Identificação histoquímica de depósitos mineralizados***

### *Método da Alizarina vermelha*

A alizarina vermelha, em solução aquosa, combina-se com o cálcio, originando um precipitado vermelho denso.

Após a fixação, as culturas foram cobertas com uma solução de S alizarin sulfonato de sódio (0,028% v/v em NH<sub>4</sub>OH) a 1%, pH 6,4, durante 2 minutos, sendo depois lavadas com água destilada e etanol ácido (etanol a 95%, HCl a 0,01% v/v).

A reacção positiva traduz-se no aparecimento de depósitos vermelhos na matriz.

### *Método de von Kossa*

Consiste na formação de fosfato de prata a partir dos fosfatos de cálcio existentes na matriz óssea, na presença de nitrato de prata. O fosfato de prata formado é reduzido pela luz (radiação U.V.), libertando-se prata metálica.

Uma vez fixadas, as culturas foram cobertas com uma solução de nitrato de prata a 1% e mantidas durante 1 hora debaixo de uma lâmpada de U.V.; depois de lavadas com água destilada, foram cobertas com uma solução de tiosulfato de sódio durante 2 minutos, sendo novamente lavadas com água destilada.

A reacção positiva traduz-se no aparecimento de depósitos negros na matriz.

### Microscopia electrónica de varrimento

Esta técnica é utilizada para analisar a morfologia das células ósseas durante o período de incubação e a capacidade de formação de áreas mineralizadas. As culturas foram fixadas com 1,5% glutaraldeído em 0,14 M tampão de cacodilato de sódio, durante 10 minutos, desidratadas em vários alcóois de graduação crescente (70%, 80%, 90% e 100%) e submetidas a secagem por ponto crítico de CO<sub>2</sub>. De seguida, foram revestidas com um filme de ouro ou de carbono, observadas num microscópio electrónico de varrimento (Jeol JSM-6301F) e analisadas por espectroscopia de raios X de dispersão de energias (Voyager XRMA System, Noran Instruments).

### Análise estatística

Os dados apresentados em cada secção deste trabalho são o resultado de três experiências separadas, realizadas em culturas celulares obtidas a partir de três dadores diferentes de medula óssea (dadores de ambos os sexos, com idades compreendidas entre os 20-60 anos).

Em cada uma das experiências e para cada um dos ensaios bioquímicos foram efectuadas oito réplicas. Os resultados bioquímicos são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão.

As médias obtidas nas várias experiências foram comparadas por uma análise de variância (ANOVA), tendo-se verificado a não existência de diferenças significativas entre as experiências realizadas. Em cada experiência, as diferenças estatísticas observadas entre as culturas em estudo e a cultura controlo respectiva foram determinadas pelo método de Bonferroni, em que os valores de  $p \leq 0.05$  foram considerados significativos.

## 2.2 – RESULTADOS

### *Proliferação/viabilidade celular. Conteúdo total de proteína*

As culturas celulares mantidas em ambos os meios de cultura proliferaram ao longo do tempo de incubação (Fig. 4).



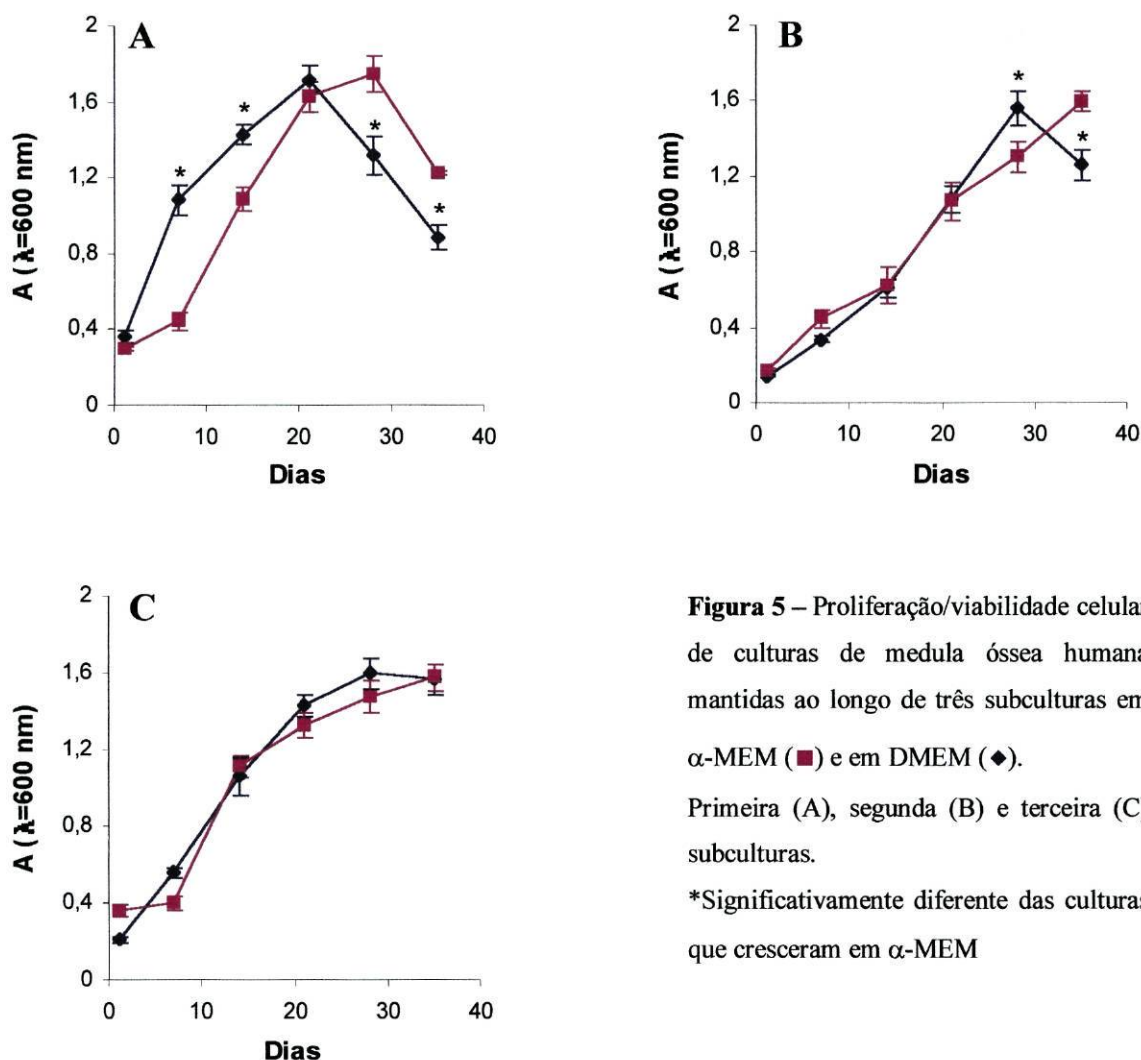
**Figura 4** – Aspecto microscópico de células em cultura; 1ª subcultura em  $\alpha$ -MEM, 7 dias. Fotografia de contraste de fase (x40).

O padrão de proliferação celular foi semelhante nas culturas que cresceram em  $\alpha$ -MEM e em DMEM, tal como é demonstrado pelos resultados obtidos pelo ensaio do MTT e pelo conteúdo total de proteína (Figs. 5 e 6).



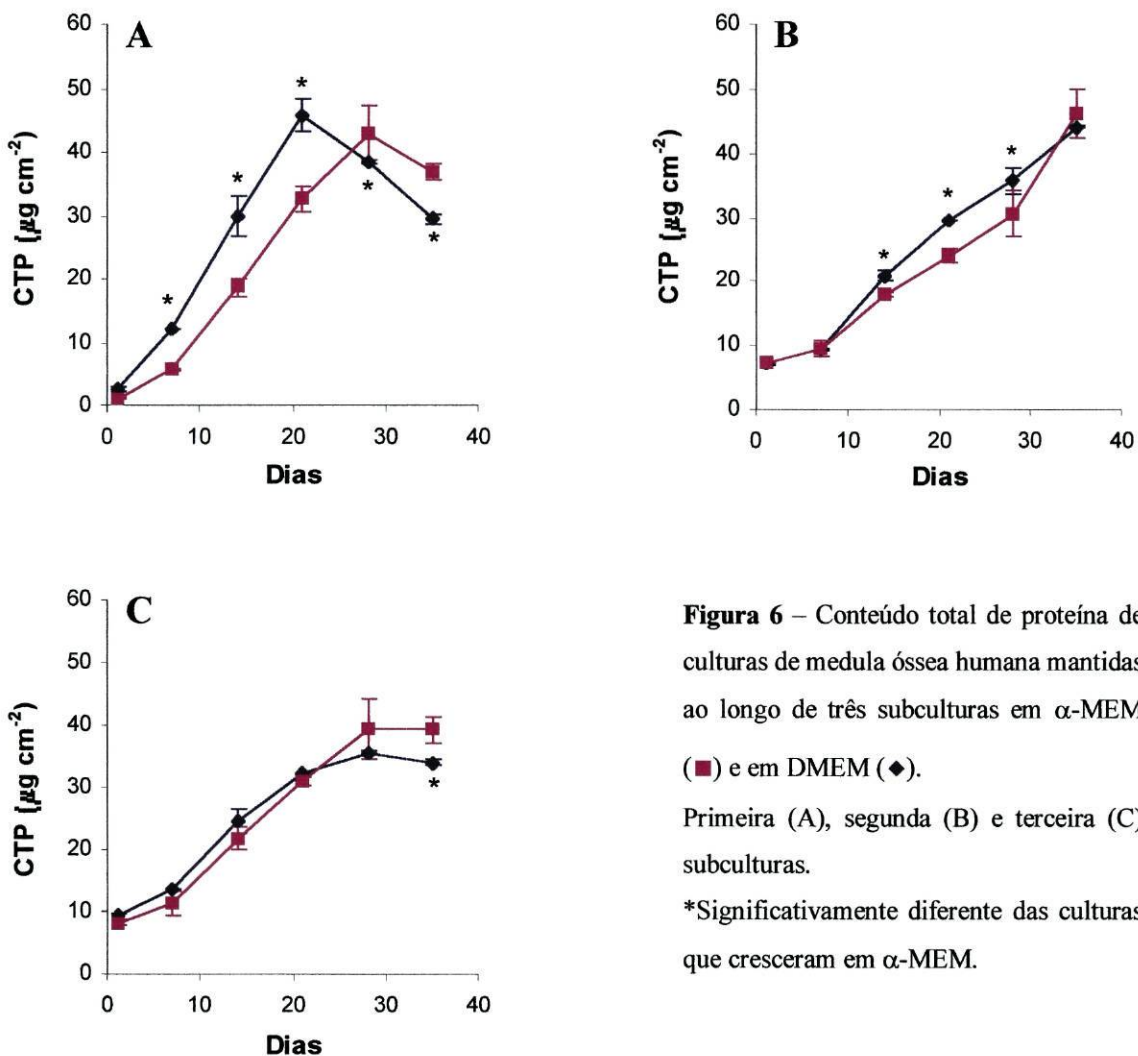
Na primeira subcultura, as células proliferaram activamente durante cerca de três semanas, observando-se de seguida uma redução significativa dos valores de redução do MTT e proteína total; durante a fase de crescimento exponencial, as células cultivadas em DMEM apresentaram valores de proliferação superiores às células cultivadas em  $\alpha$ -MEM, que atingiram o valor máximo mais tarde (Fig. 5A).

A segunda e terceira subculturas apresentaram um padrão de crescimento celular diferente. Em  $\alpha$ -MEM, as células apresentaram um crescimento contínuo, enquanto que em DMEM, apenas se verificou uma pequena redução da proliferação na última semana (5<sup>a</sup>) de cultura (Figs. 5B,C). Contudo, os valores máximos de proliferação foram semelhantes para os dois meios.



**Figura 5** – Proliferação/viabilidade celular de culturas de medula óssea humana mantidas ao longo de três subculturas em  $\alpha$ -MEM (■) e em DMEM (◆).  
Primeira (A), segunda (B) e terceira (C) subculturas.  
\*Significativamente diferente das culturas que cresceram em  $\alpha$ -MEM

De acordo com vários estudos efectuados sobre o desenvolvimento do fenótipo osteoblástico, existe uma sequência temporal da diferenciação destas células, envolvendo três fases: proliferação celular activa, síntese, deposição e maturação da matriz extracelular de colagénio e mineralização da matriz. A cada fase corresponde um estágio de proliferação celular, bem como a expressão de determinados marcadores osteoblásticos<sup>117,119,120,154</sup>. Assim, o período de proliferação intensa observado nas culturas está funcionalmente relacionado com a síntese da matriz extracelular pelos osteoblastos e a redução do crescimento celular é provavelmente o resultado da acumulação e maturação da matriz, tornando-a apta para o processo de mineralização<sup>15,122,154,175</sup>. Assim, de acordo com este modelo, os resultados obtidos sugerem que a partir da 1ª subcultura as populações celulares em cultura são mais proliferativas durante o tempo de incubação estudado.



**Figura 6** – Conteúdo total de proteína de culturas de medula óssea humana mantidas ao longo de três subculturas em  $\alpha$ -MEM (■) e em DMEM (◆). Primeira (A), segunda (B) e terceira (C) subculturas. \*Significativamente diferente das culturas que cresceram em  $\alpha$ -MEM.



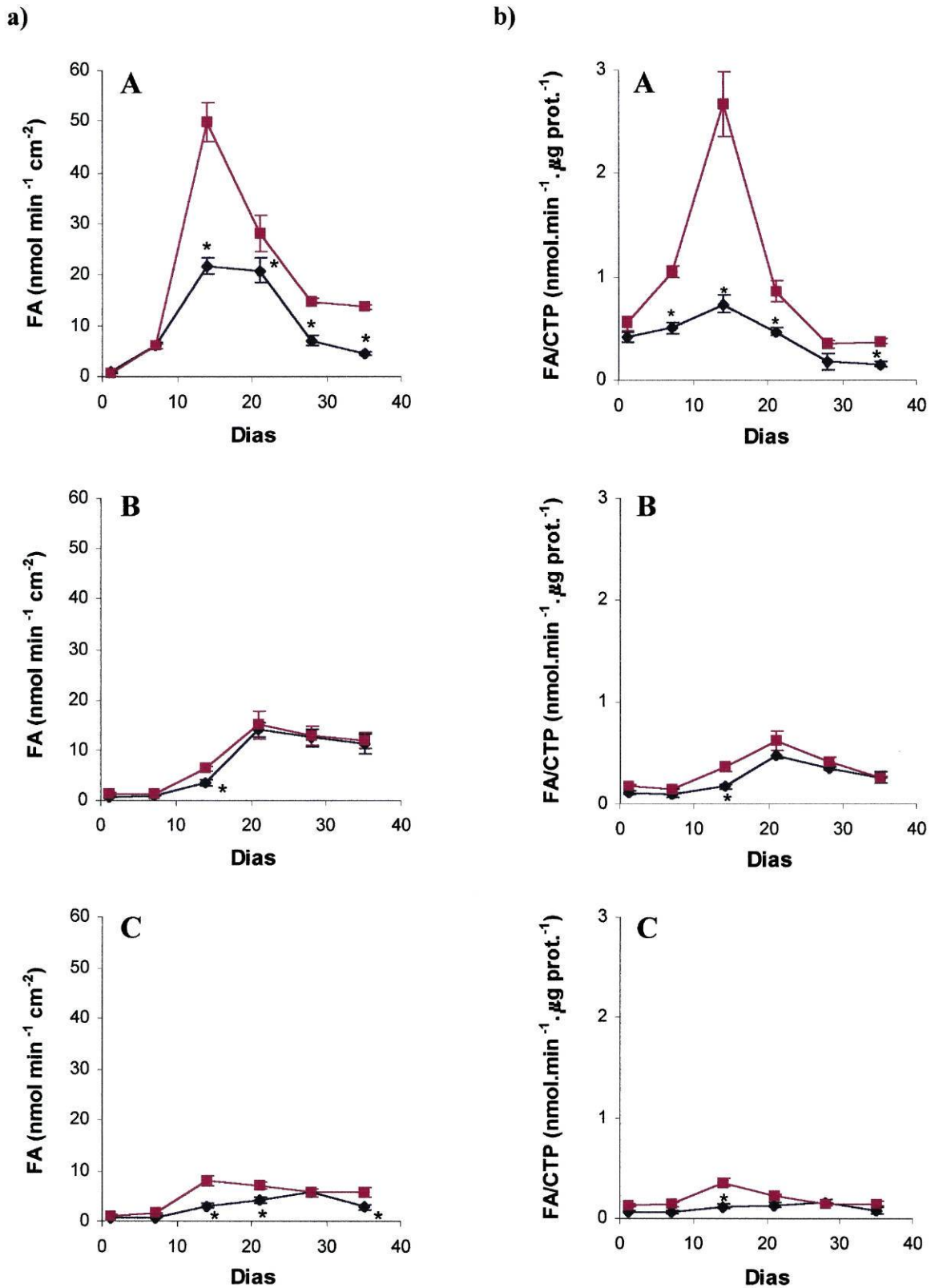
O conteúdo total de proteína (Figs. 6A-C) das culturas que cresceram nos dois meios de cultura seguiu um padrão semelhante ao observado para o teste do MTT, fornecendo um tipo de informação comparável.

### ***Actividade da fosfatase alcalina***

Os resultados referentes à actividade da fosfatase alcalina mostraram que, tanto o meio de cultura como a subcultura celular afectam os níveis desta enzima nas culturas osteoblásticas (Figs. 7a) e b)).

Na primeira subcultura, os níveis de fosfatase alcalina foram baixos durante a 1ª semana mas aumentaram significativamente durante a 2ª semana, atingindo valores máximos por volta do dia 14 em ambos os meios. Nas culturas efectuadas em  $\alpha$ -MEM, o valor máximo foi significativamente maior e os níveis da enzima baixaram imediatamente depois de atingir este valor. Nas culturas efectuadas em DMEM, a actividade da enzima também baixou depois do dia 14, mas esta redução foi menos significativa do que a observada nas culturas mantidas em  $\alpha$ -MEM (Fig. 7A). O aumento significativo da actividade da fosfatase alcalina durante a 2ª semana sugere um aumento da diferenciação celular, visto que os níveis desta enzima têm sido utilizados em ensaios *in vitro* como marcador da diferenciação osteoblástica<sup>15,17,122,137,147,175</sup>.

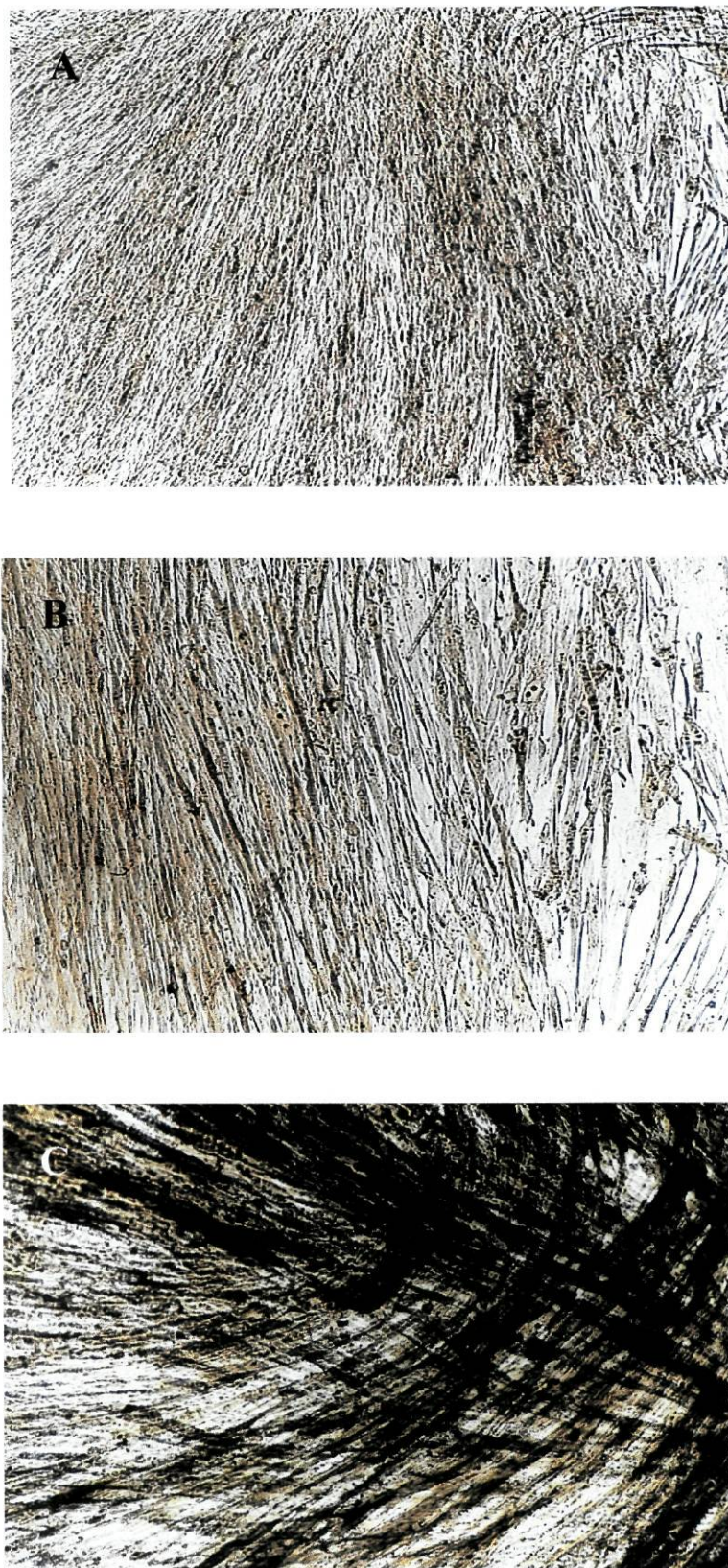
A subcultura sucessiva resultou numa diminuição da actividade da fosfatase, tanto nas culturas efectuadas em  $\alpha$ -MEM como nas culturas mantidas em DMEM; este efeito foi principalmente evidente na passagem da primeira para a segunda subcultura (Fig. 7B). Na segunda e terceira subculturas, e em ambos os meios, a variação da actividade da enzima seguiu um padrão diferente ao longo do tempo de incubação, comparativamente com a primeira subcultura. Em  $\alpha$ -MEM, as células da segunda passagem atingiram valores máximos de fosfatase alcalina inferiores e mais tardios ( $15,01 \pm 2,66 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ , por volta do dia 21) do que os observados nas mesmas condições na primeira subcultura ( $49,73 \pm 3,93 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ , no dia 14), mantendo-se aproximadamente constantes até ao fim da cultura. A terceira subcultura apresentou valores ainda mais baixos (Fig. 7C). Nas culturas efectuadas em DMEM, foram detectados níveis muito baixos de fosfatase alcalina na segunda e terceira subculturas e a actividade da enzima foi mais baixa do que a observada nas correspondentes culturas mantidas em  $\alpha$ -MEM (Figs. 7B,C).



**Figura 7** – Actividade da fosfatase alcalina de culturas de medula óssea humana mantidas ao longo de três subculturas em  $\alpha$ -MEM (■) e em DMEM (◆). Primeira (A), segunda (B) e terceira (C) subculturas; a) expressa em  $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$  e b) expressa em  $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \mu\text{g} \text{ prote\u00edna}^{-1}$ .

\*Significativamente diferente das culturas que cresceram em  $\alpha$ -MEM.





**Figura 8** – Aspecto microscópico de culturas celulares de medula óssea humana coradas histoquimicamente para a presença de fosfatase alcalina; 1ª subcultura em  $\alpha$ -MEM; 7 dias (A, x40; B, x100); 21 dias (C, x40).

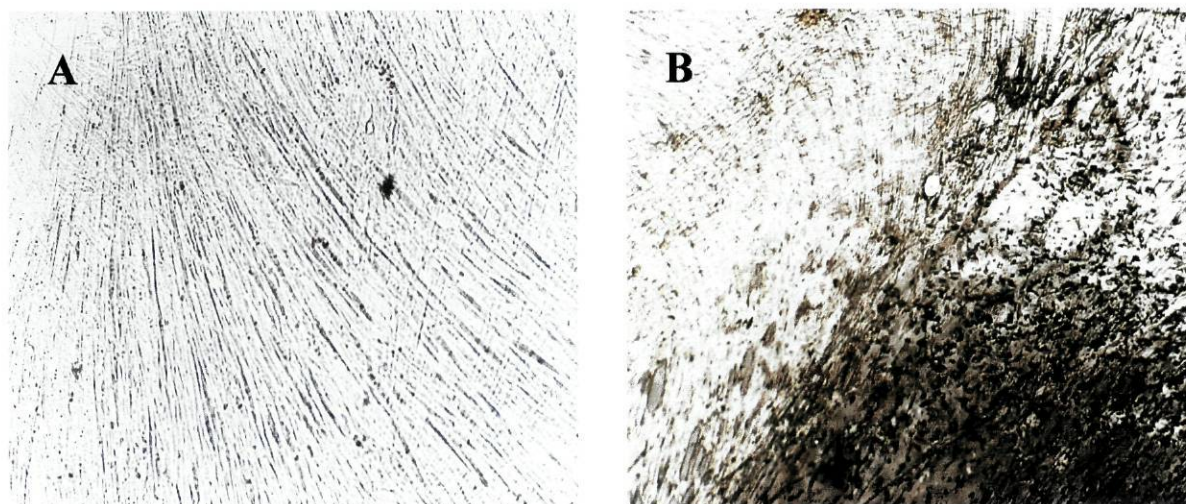


O estudo histoquímico para a detecção da fosfatase alcalina nas culturas mantidas em  $\alpha$ -MEM e DMEM mostrou resultados semelhantes aos obtidos na determinação bioquímica da enzima (Fig. 8).

a)



b)



**Figura 9** – Aspecto microscópico de culturas celulares de medula óssea humana coradas histoquimicamente para a presença de depósitos minerais; 1ª subcultura em  $\alpha$ -MEM.

- a) depósitos de cálcio (reacção de Alizarina vermelha);  
14 dias (A, reacção negativa); 21 dias (B, reacção positiva) (x100).
- b) depósitos de fosfato (reacção de von Kossa);  
14 dias (A, reacção negativa); 21 dias (B, reacção positiva) (x40).



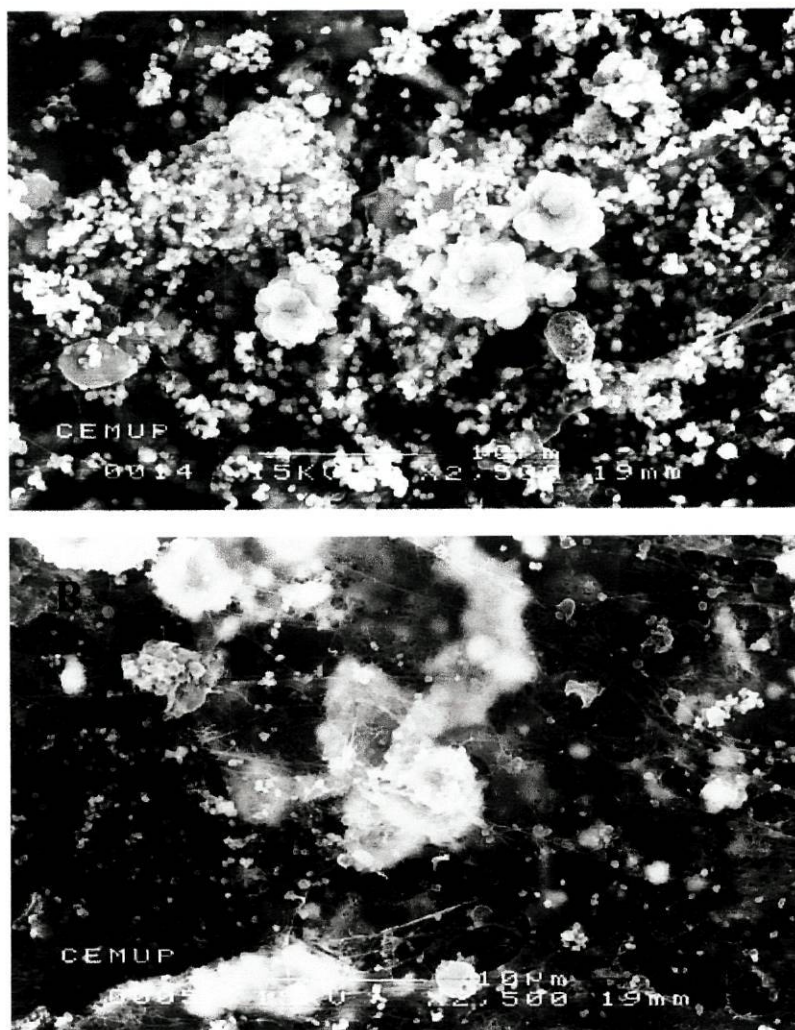
**Formação de depósitos de fosfato de cálcio**

A formação de depósitos minerais de fosfato de cálcio ocorreu a seguir ao valor máximo da actividade da fosfatase alcalina. Os resultados observados nas culturas efectuadas em  $\alpha$ -MEM parecem sugerir que este meio de cultura providencia condições mais favoráveis para a deposição destes minerais, visto que na primeira subcultura, as reacções histoquímicas foram positivas no dia 21 (Fig. 9), enquanto que nas culturas mantidas em DMEM, os depósitos minerais foram detectados mais tarde (dia 28); além disso, a intensidade da reacção foi superior nas culturas efectuadas em  $\alpha$ -MEM (Tabela IV). Estes resultados foram confirmados pela observação das culturas celulares por MEV (Figs. 10A,B). Esta observação mostrou que a proliferação das células de medula óssea foi acompanhada pela produção de uma matriz extracelular fibrilar, em ambos os meios de cultura. Nas culturas efectuadas em  $\alpha$ -MEM, a presença de depósitos mineralizados na matriz foi evidente no dia 21, observando-se numerosas estruturas globulares que, através de microanálise por raios X, mostraram conter Ca e P (Fig. 11). Estas estruturas foram aumentando em número ao longo do tempo de incubação e tenderam a fundir-se, formando depósitos minerais de dimensões maiores. Em concordância com os resultados histoquímicos, a presença dos depósitos de fosfato de cálcio foram observados mais tarde (dia 28) e em menor quantidade nas culturas efectuadas em DMEM.

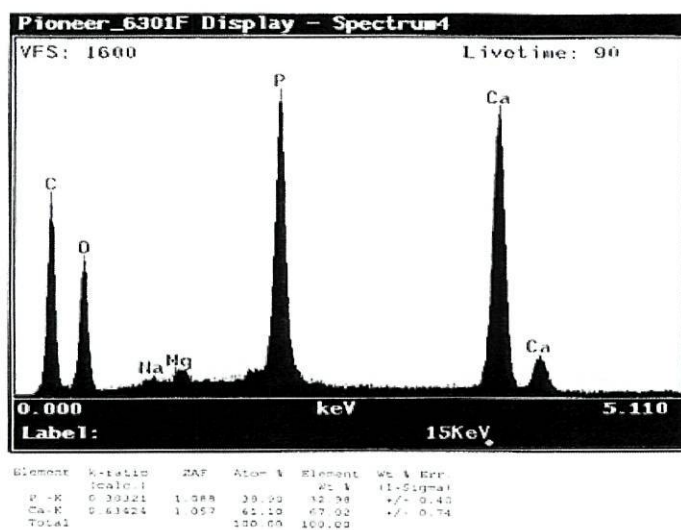
**Tabela IV** – Reacção histoquímica para a detecção de depósitos de fosfato de cálcio (método de von Kossa) em culturas de células osteoblásticas de medula óssea humana, aos 21, 28 e 35 dias – primeira, segunda e terceira subculturas, mantidas em  $\alpha$ -MEM e em DMEM.

Subcultura	21 dias		28 dias		35 dias	
	$\alpha$ -MEM	DMEM	$\alpha$ -MEM	DMEM	$\alpha$ -MEM	DMEM
1ª	+	-	++	+	+++	++
2ª	-	-	+	-	++	-
3ª	-	-	-	-	-	-

A intensidade da coloração é definida do seguinte modo: -, coloração negativa; +, coloração positiva de fraca intensidade; ++, coloração positiva de média intensidade; +++, coloração positiva de elevada intensidade.

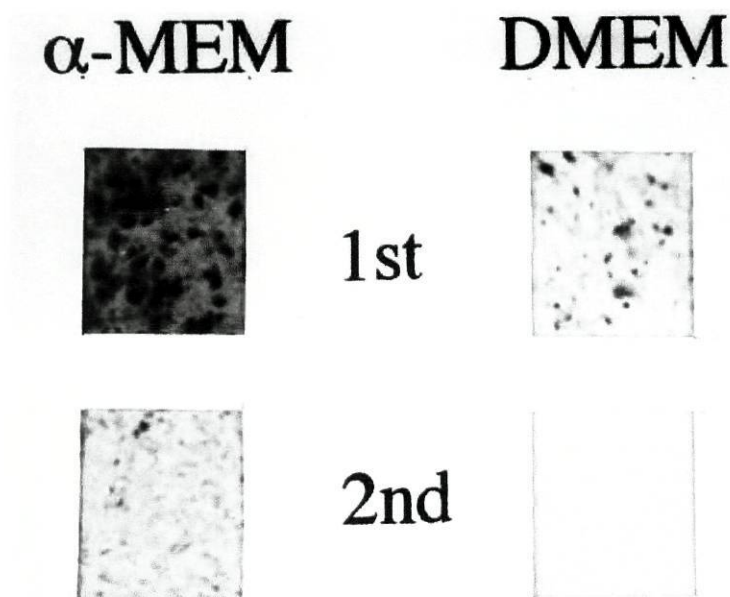


**Figura 10** – Fotografias de microscopia electrónica de varrimento de culturas de células de medula óssea humana com 28 dias – 1ª subcultura,  $\alpha$ -MEM (A) e DMEM (B).



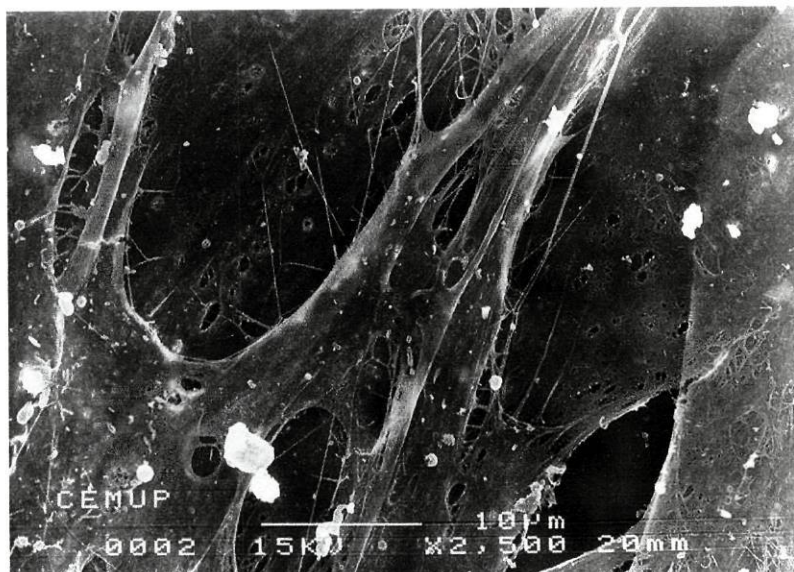
**Figura 11** – Espectro de raios X das estruturas minerais presentes na 1ª subcultura mantida em  $\alpha$ -MEM





**Figura 12** – Aspecto microscópico da primeira e segunda subculturas mantidas em  $\alpha$ -MEM e em DMEM, com 28 dias, e coradas para detecção de depósitos de fosfato de cálcio (método de von Kossa) (x 20).

Apenas as células da segunda subcultura mantida em  $\alpha$ -MEM mostraram uma reacção histoquímica para a detecção de depósitos minerais fracamente positiva e detectada mais tarde (dia 28) do que na primeira subcultura (dia 21) (Tabela IV). A Fig. 12 compara o aspecto da primeira e segunda subculturas com 28 dias, cultivadas em  $\alpha$ -MEM e em DMEM, e coradas pelo método de von Kossa para detecção de depósitos mineralizados. A observação das culturas por MEV também demonstrou que a abundância de estruturas minerais diminuiu com a subcultura sucessiva, apresentando a matriz extracelular um padrão de mineralização mais disperso. A presença de depósitos minerais ainda foi observada na segunda subcultura efectuada em  $\alpha$ -MEM. As outras subculturas (3<sup>a</sup> em  $\alpha$ -MEM, 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> em DMEM) mostraram uma estrutura formada apenas por células e uma matriz extracelular fibrilar, tal como se pode observar na Fig.13 que mostra o aspecto, aos 28 dias, da 3<sup>a</sup> subcultura efectuada em  $\alpha$ -MEM.



**Figura 13** – Fotografia de microscopia electrónica de varrimento da terceira subcultura mantida em  $\alpha$ -MEM durante 28 dias.

## 2.3 – DISCUSSÃO

Tendo em conta que a proliferação celular não foi afectada significativamente pela subcultura sucessiva, ao contrário da fosfatase alcalina que é, como já foi referido, um marcador *in vitro* da diferenciação osteoblástica, estes resultados sugerem que a passagem sucessiva das células resulta no aparecimento de uma população celular progressivamente menos diferenciada. Tal facto está provavelmente relacionado com a progressiva selecção de uma população celular cada vez mais proliferativa ao longo das passagens<sup>114</sup>, logo num estado de diferenciação menos adiantado<sup>15,122,147</sup>. Assim, a densidade efectiva de osteoblastos maduros, capazes de sintetizar uma matriz extracelular, diminui ao longo do processo de subcultura<sup>121</sup>. Esta hipótese é sustentada pelos resultados obtidos para a proliferação celular (Figs. 5 e 6), onde se verifica um crescimento celular contínuo à medida que aumenta o número de passagens, para os níveis máximos de fosfatase alcalina, que são mais baixos, aparecem mais tarde e permanecem constantes depois disso (Fig. 7), e para a capacidade de formar depósitos mineralizados, que diminui ao longo das subculturas (Tabela IV, Figs. 9, 12 e 13).

Os resultados apresentados nas figuras 5 e 6 mostram que apesar das culturas efectuadas em  $\alpha$ -MEM e DMEM apresentarem uma proliferação celular semelhante, a actividade da



fosfatase alcalina foi significativamente mais baixa nas culturas mantidas em DMEM. A formação de depósitos minerais ocorreu mais tarde neste meio de cultura e foi apenas observada na primeira subcultura. A actividade da enzima foi muito baixa na segunda e terceira subculturas e esta é provavelmente a razão pela qual a mineralização não ocorreu. A fosfatase alcalina é normalmente associada à calcificação biológica, pelo facto de se verificar elevados níveis da enzima antes do período de activa mineralização da matriz e uma redução significativa da sua actividade, durante as fases subsequentes da deposição mineral. Assim, é aparentemente necessária uma expressão significativa da fosfatase alcalina para que a mineralização da matriz se inicie, visto que a enzima, ao hidrolisar fosfatos orgânicos (neste caso, o  $\beta$ -GF), contribui para o enriquecimento local de fosfato inorgânico necessário para a nucleação e proliferação dos cristais de hidroxiapatite<sup>118</sup>.

Os resultados deste estudo mostram que os dois meios de cultura utilizados afectam a expressão dos parâmetros osteoblásticos de modo diferente. O DMEM é um meio de cultura menos rico, particularmente em aminoácidos e vitaminas, embora a concentração dos nutrientes seja, no total, maior do que a existente no  $\alpha$ -MEM. Tal facto explica provavelmente os valores mais elevados de proliferação celular apresentados pela primeira subcultura efectuada em DMEM, comparativamente com os observados na primeira subcultura mantida em  $\alpha$ -MEM, durante a fase exponencial do crescimento. A diferenciação celular parece ser mais estimulada nas culturas efectuadas em  $\alpha$ -MEM do que nas que cresceram na presença de DMEM. Esta observação deve-se provavelmente ao facto de o  $\alpha$ -MEM conter ácido ascórbico na sua constituição ( $0,05 \text{ g.L}^{-1}$ ), e por isso, as concentrações finais deste composto nas culturas mantidas em  $\alpha$ -MEM e DMEM serem na realidade,  $100 \mu\text{g.ml}^{-1}$  e  $50 \mu\text{g.ml}^{-1}$ , respectivamente.

O ácido ascórbico é um co-factor enzimático e antioxidante que estimula a transcrição, a tradução e o processo de pós-tradução do colagénio nas células do tecido conjuntivo<sup>176</sup>. Nas culturas de células ósseas, este composto estimula a diferenciação osteoblástica, a síntese e deposição de colagénio e a mineralização da matriz<sup>122,147,175,177</sup>. Em condições fisiológicas normais, *in vivo*, toda a vitamina C plasmática existe sob a forma de ácido ascórbico. Contudo, em condições patológicas, tal como a inflamação ou durante o processo de cicatrização, o ácido ascórbico extracelular é oxidado a ácido L-desidroascórbico (DHAA), que pode por sua vez ser captado pelas células e reduzido a ácido ascórbico. É possível que

este mecanismo ocorra durante o processo de remodelação óssea e contribua para o acoplamento entre a formação óssea e a reabsorção osteoclástica do osso. Os osteoclastos, que são fonte de radicais livres de oxigénio, podem oxidar o ácido ascórbico extracelular; o DHAA resultante pode então ser captado e reduzido pelos pré-osteoblastos e osteoblastos vizinhos, estimulando assim a sua diferenciação e a produção da matriz extracelular de colagénio<sup>178</sup>.

Há vários estudos efectuados em culturas de abóbada craniana de rato<sup>175</sup> que sugerem que a síntese de colagénio aumenta com concentrações crescentes de ácido ascórbico e que o consequente aumento na acumulação da matriz extracelular está associado a uma menor proliferação celular, a uma maior actividade da fosfatase alcalina e a uma maior capacidade de formar uma matriz mineralizada<sup>17,22,117,120,147</sup>, características que estão directamente relacionadas com a diferenciação osteoblástica<sup>15,122,147,175</sup>.

Tendo em consideração que a subcultura sucessiva das células parece contribuir para a selecção de uma população celular menos diferenciada, a diminuição nos parâmetros osteoblásticos observada na segunda e terceira subculturas, nomeadamente, uma menor actividade da fosfatase alcalina e uma capacidade reduzida para formar depósitos de fosfato de cálcio, pode estar relacionada com a formação de uma matriz extracelular inadequada (em quantidade e qualidade). Este processo é mais significativo nas culturas efectuadas em DMEM, o que está de acordo com o facto de que, nesta situação, as culturas cresceram na presença de uma concentração inferior de ácido ascórbico.

## 2.4 – CONCLUSÃO

Neste trabalho, células de medula óssea humana foram cultivadas durante 35 dias em condições experimentais que favorecem a diferenciação osteoblástica e as subculturas sucessivas foram mantidas em dois meios de cultura amplamente utilizados,  $\alpha$ - Minimal Essential Medium Eagle ( $\alpha$ -MEM) e em Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM). Os resultados obtidos mostraram que a proliferação celular foi semelhante nas culturas mantidas em ambos os meios, mas a actividade da fosfatase alcalina e a capacidade para formar depósitos mineralizados foram mais baixas nas culturas efectuadas em DMEM. Em ambas as situações experimentais, os parâmetros osteoblásticos foram fortemente reduzidos com a subcultura sucessiva, particularmente na passagem da primeira para a segunda



subcultura. Estes resultados apontam para a importância da definição das condições experimentais em estudos que envolvem culturas de células ósseas.

### **3 – CULTURA DE CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA HUMANA: EFEITO DO ÁCIDO ASCÓRBICO, $\beta$ -GLICEROFOSFATO E DEXAMETASONA NA DIFERENCIAÇÃO OSTEOBLÁSTICA**

Tendo em consideração o comportamento das células de medula óssea humana cultivadas em  $\alpha$ -MEM e sabendo que a expressão do fenótipo osteoblástico em cultura depende da composição do meio de cultura, nomeadamente, da presença de compostos que influenciam a proliferação e a diferenciação celulares<sup>115,168-170</sup>, efectuou-se um estudo que teve como objectivo comparar várias condições de cultura, de modo a maximizar a indução da expressão dos marcadores osteoblásticos nestas culturas. Assim, as células de medula óssea humana foram cultivadas na presença de: (1) ácido ascórbico (AA), um co-factor enzimático que estimula a síntese e maturação do colagénio, (2)  $\beta$ -glicerofosfato ( $\beta$ -GF), fonte de fosfato inorgânico necessário para o processo de mineralização e (3) dexametasona (Dex), um glucocorticóide que induz o fenótipo osteoblástico em numerosos sistemas celulares; as células também foram cultivadas na presença de duas combinações destes compostos, (4) AA +  $\beta$ -GF e (5) AA +  $\beta$ -GF + Dex. Na sequência dos resultados apresentados na secção anterior, em que se observa uma perda progressiva do fenótipo osteoblástico das células de medula óssea ao longo das sucessivas subculturas, todas as experiências foram realizadas na 1ª subcultura.

#### **3.1– MATERIAL E MÉTODOS**

##### ***CULTURAS CELULARES***

As células de medula óssea humana foram cultivadas em condições experimentais idênticas às descritas na secção anterior (secção 2.1). Após a tripsinização da cultura primária, as células foram cultivadas ( $10^4$  células.cm<sup>-2</sup>) por um período de 42 dias em meio padrão ( $\alpha$ -MEM enriquecido com soro bovino fetal, gentamicina e fungizona) e na

presença, isolada ou combinada, de compostos que influenciam a proliferação e a diferenciação das células osteoblásticas: ácido ascórbico (AA, 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ),  $\beta$ -glicerofosfato ( $\beta$ -GF, 10  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) e dexametasona (Dex, 10  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

Assim, foram testadas cinco situações: (i) presença de AA; (ii) presença de  $\beta$ -GF; (iii) presença de Dex; (iv) presença de AA +  $\beta$ -GF; (v) presença de AA +  $\beta$ -GF + Dex.

### **CARACTERIZAÇÃO DAS CULTURAS CELULARES**

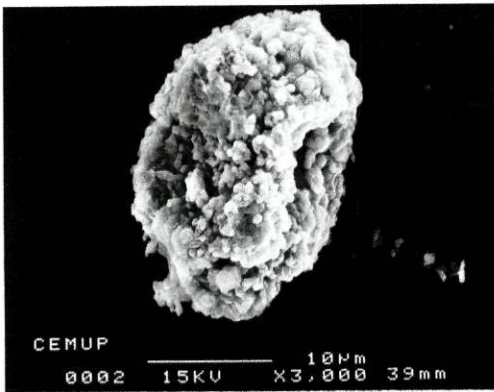
As culturas celulares foram caracterizadas relativamente à proliferação/viabilidade celular (ensaio do MTT), conteúdo total de proteína e actividade da fosfatase alcalina, de acordo com a metodologia descrita no capítulo II (secção 2.1). As culturas foram caracterizadas nos dias 3, 7, 14, 21, 28, 35 e 42.

## **3.2 – RESULTADOS/DISCUSSÃO**

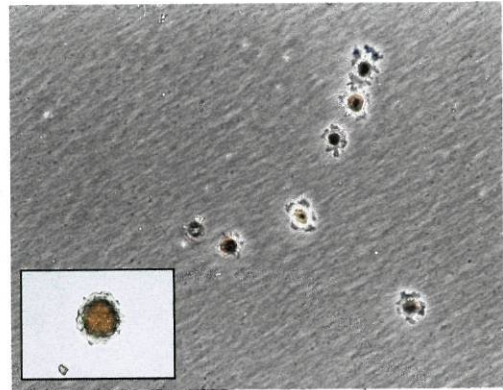
O crescimento e a diferenciação celulares dependem em parte da adesão celular inicial<sup>179-182</sup>. As observações por microscopia de contraste de fase e MEV mostraram que durante as primeiras 24 horas de incubação, a adesão das células de medula óssea à superfície de plástico da placa de cultura seguiu uma sequência semelhante em todas as situações testadas. Estas observações revelaram que 30 minutos após o início da cultura o citoplasma já estava visivelmente expandido e que, 4 horas depois, estava totalmente “espalhado” com o núcleo aparente (embora se pudesse observar coexistência de células em diferentes fases de adesão). Ao fim de 24 horas de incubação, as células apresentavam uma morfologia fibroblástica mas, nas culturas com 7 dias, já demonstravam um aspecto poligonal, sugerindo um desenvolvimento no processo de diferenciação osteoblástica<sup>15,17</sup> (Fig. 14I-VIII). As alterações morfológicas que ocorrem durante a adesão e expansão das células correspondem à reorganização do citoesqueleto, estrutura que desempenha um papel importante na modelação da forma da célula e no comportamento celular (incluindo a transcrição nuclear e a diferenciação)<sup>15,180,183</sup>.



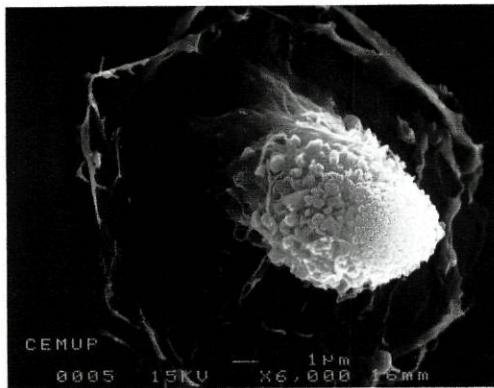
AI



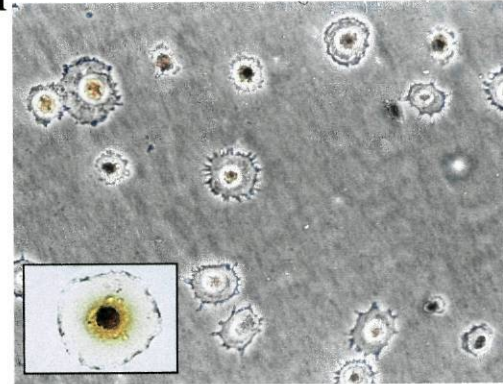
BI



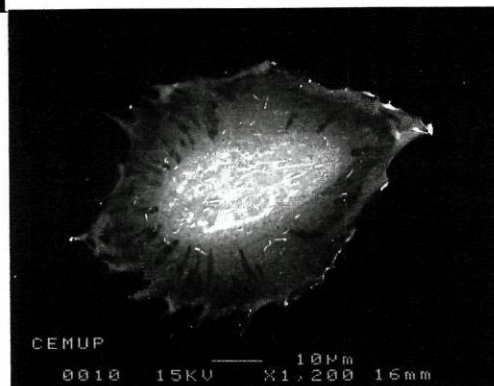
AII



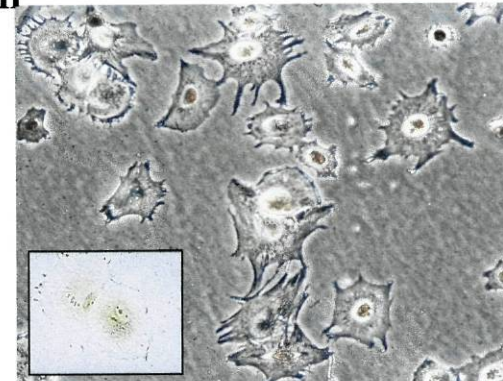
BII



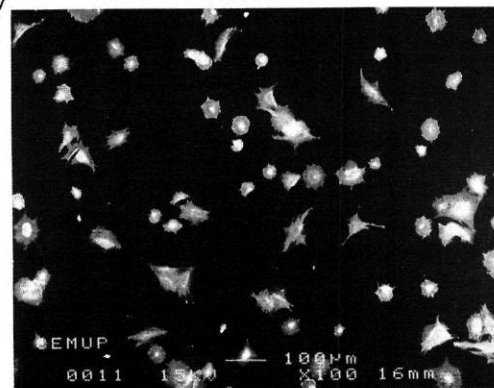
AIII



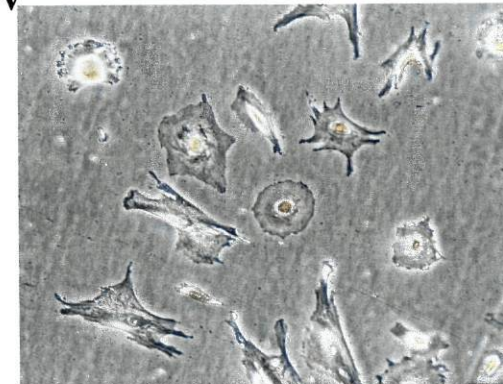
BIII



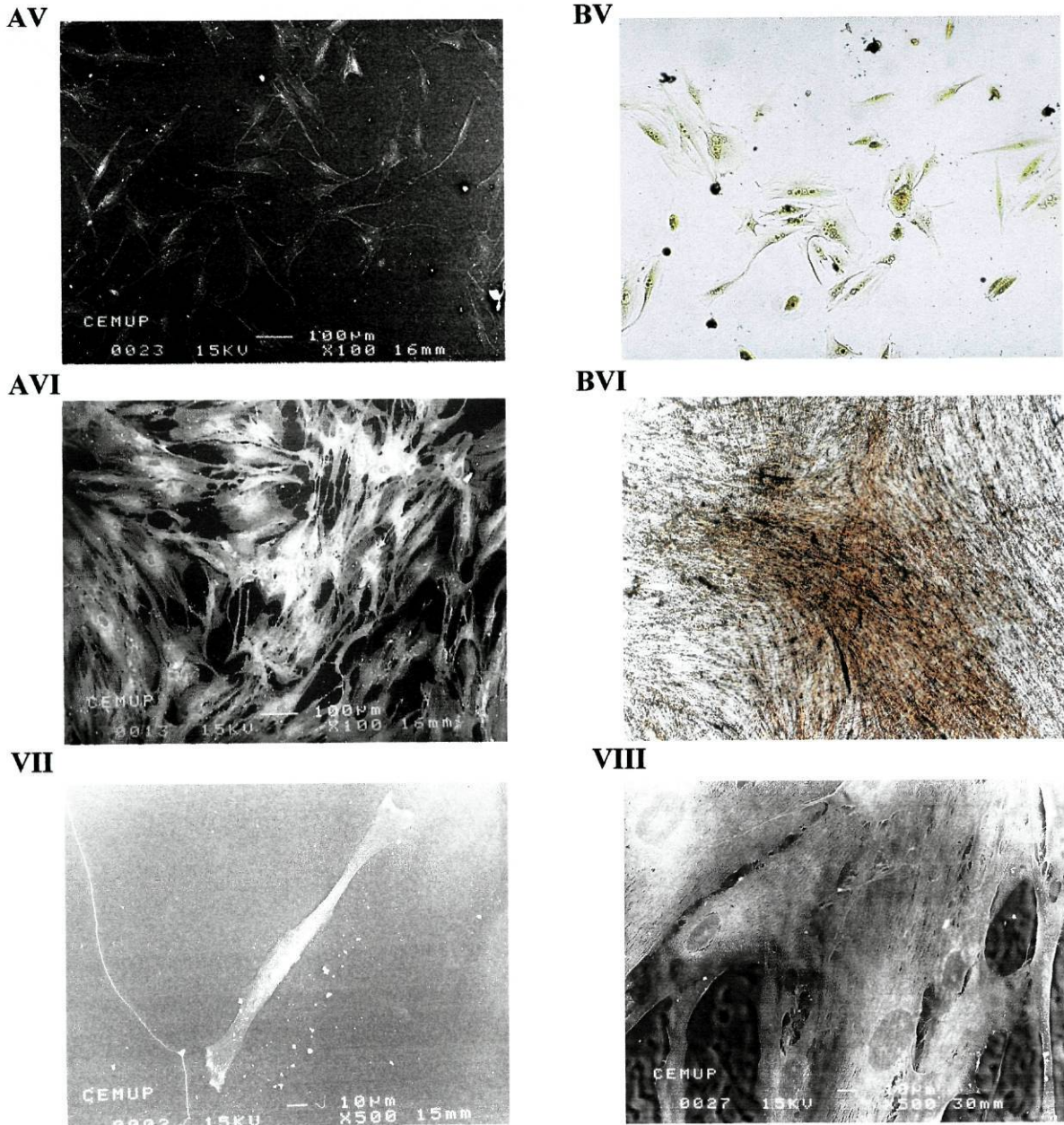
AIV



BIV





































**Figura 14** – Fotografias de microscopia eletrônica de varrimento (A) e de microscopia óptica (B, de células coradas histoquimicamente para detecção da fosfatase alcalina: I, II, III e IV: 400x; V e VI: 100x) de culturas osteoblásticas de medula óssea humana, mantidas na presença de AA +  $\beta$ -GF + Dex, ao fim de 30 min (I), 1h (II), 2h (III), 2h-aspecto geral (IV), 24h (V) e 7 dias de incubação (VI). Morfologia de uma célula com 24 horas (VII) e 7 dias (VIII).

As culturas celulares que cresceram nas diferentes condições experimentais apresentaram um aspecto morfológico semelhante até ao dia 14. As culturas mostraram a formação de camadas multicelulares com um aspecto contínuo e não se verificou a existência de



depósitos de fosfato de cálcio. Contudo, a partir da segunda semana de incubação, surgiram diferenças no comportamento das várias culturas celulares. Os resultados obtidos nos ensaios histoquímicos mostraram que as culturas que cresceram em meio padrão e na presença isolada de AA ou Dex apresentaram reacções negativas para a deposição mineral ao longo do período de incubação (Fig. 15).

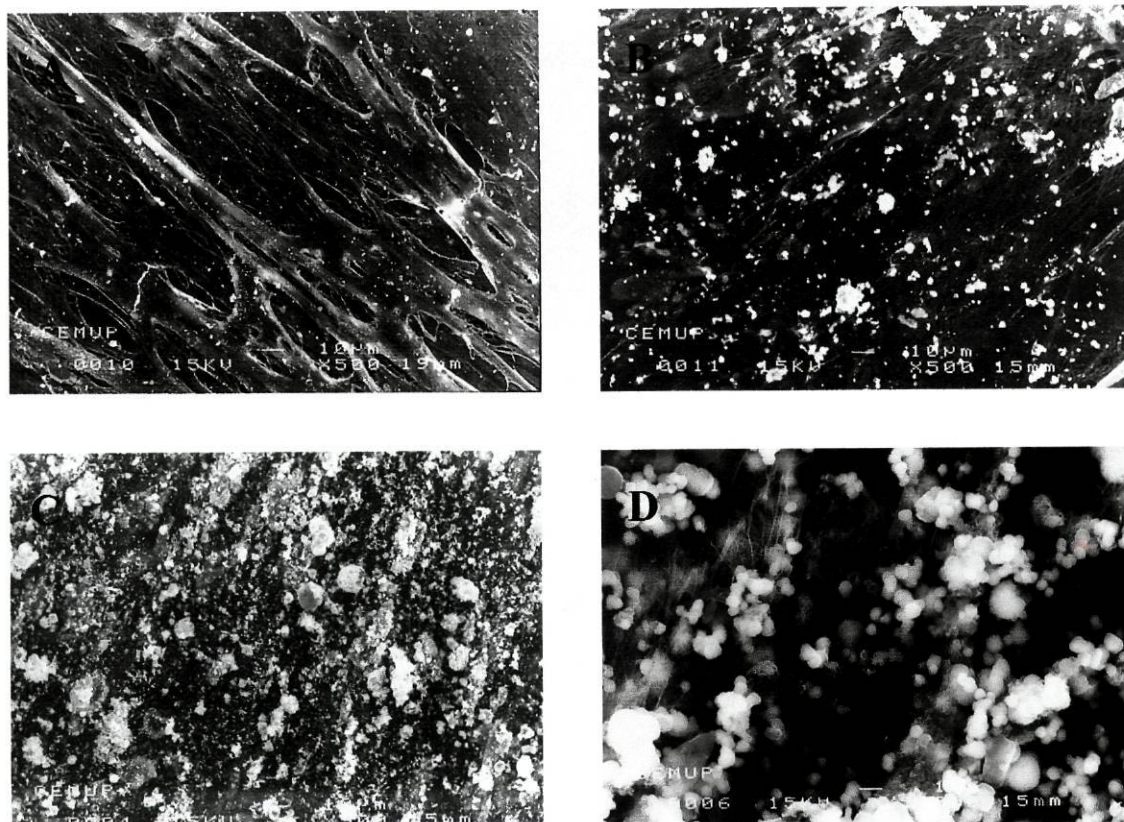
DIAS	14	21	28	35	42					
<b>Meio Padrão</b>		-		-		-		-		-
<b>AA</b>		-		-		-		-		-
<b>Dex</b>		-		-		-		-		-
<b><math>\beta</math>-GF</b>		-		+		++		+++		+++
<b>AA + <math>\beta</math>-GF</b>		-		-		+		++		+++
<b>AA + <math>\beta</math>-GF + Dex</b>		-		++		+++		+++		+++

**Figura 15** – Reacção histoquímica para a detecção de depósitos de fosfato de cálcio (método da Alizarina vermelha) em culturas de células osteoblásticas de medula óssea humana, mantidas em diversas condições experimentais, nos dias 14, 21, 28, 35 e 42.

A intensidade da coloração é definida do seguinte modo: -, coloração negativa; +, coloração positiva de fraca intensidade; ++, coloração positiva de média intensidade; +++, coloração positiva de elevada intensidade.

A observação destas culturas por MEV mostrou a presença de camadas multicelulares contínuas e uma matriz extracelular fibrilar, não evidenciando a presença de depósitos mineralizados (Figs. 16A,B). Apenas as culturas que cresceram na presença de  $\beta$ -GF, isolado ou em combinação com outros suplementos, apresentaram capacidade para formar depósitos minerais. No dia 21, a reacção histoquímica para estes depósitos era fracamente positiva nas culturas que cresceram na presença de  $\beta$ -GF e positiva nas que cresceram na presença de AA +  $\beta$ -GF + Dex; as culturas que cresceram num meio contendo AA +  $\beta$ -GF começaram a mineralizar mais tarde (por volta do dia 28). Nas culturas efectuadas em condições experimentais que permitiram a mineralização da matriz, a intensidade das reacções aumentou com o tempo de incubação (Figs. 15 e 17). A observação destas culturas

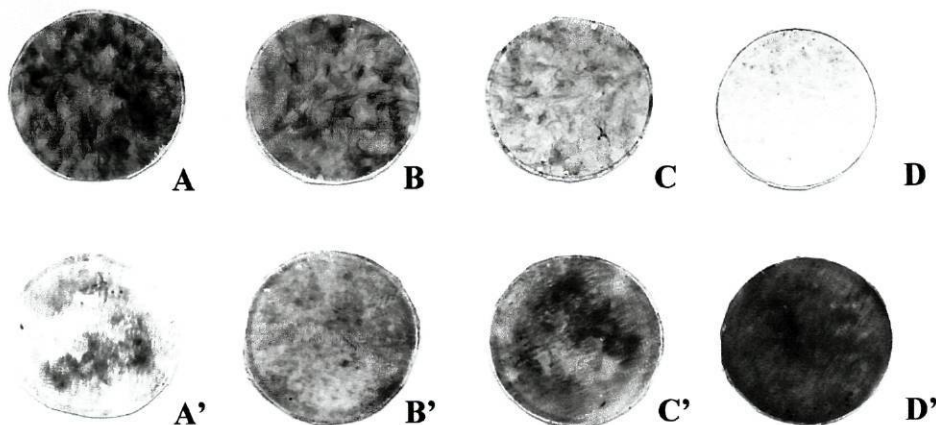
por MEV nos dias 35 e 42 mostrou a presença de numerosos depósitos globulares, principalmente nas culturas tratadas com AA +  $\beta$ -GF + Dex (Figs. 16C,D).



**Figura 16** – Fotografias de microscopia electrónica de varrimento de culturas de células osteoblásticas de medula óssea humana mantidas em meio padrão (A), na presença de AA +  $\beta$ -GF (B) e de AA +  $\beta$ -GF + Dex (C, D: ampliação).

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que as células de medula óssea humana cultivadas na presença de  $\beta$ -GF apresentaram valores relativamente baixos para a proliferação celular, conteúdo total de proteína e actividade da fosfatase alcalina (Fig. 18); no entanto, e comparando com as culturas que cresceram em meio padrão, o valor máximo de fosfatase alcalina foi atingido mais cedo (dia 21-28) e a formação de depósitos mineralizados foi observada a partir do dia 21.





**Figura 17** – Culturas celulares de medula óssea humana mantidas na presença de AA +  $\beta$ -GF + Dex coradas histoquimicamente para a presença de fosfatase alcalina e depósitos de fosfato de cálcio (método de von Kossa) nos dias 21 (A e A'), 28 (B e B'), 35 (C e C') e 42 (D e D').

O  $\beta$ -GF é usualmente adicionado às culturas de células ósseas para induzir a osteogénese e promover a mineralização da matriz osteóide, ao actuar como substrato da fosfatase alcalina *in vitro*<sup>22,117,118,124,137,139,150,155,158,184,185</sup>. O mecanismo pelo qual este composto induz a mineralização está intimamente ligado a uma elevada actividade da fosfatase alcalina nas culturas osteoblásticas; esta enzima hidrolisa rapidamente o  $\beta$ -GF e eleva, deste modo, a concentração local de fosfato inorgânico, fornecendo o potencial químico necessário para a deposição mineral<sup>22,118,139,155,184</sup>. Bellows e col.<sup>139</sup> demonstraram que, em sistemas celulares semelhantes ao descrito neste trabalho e em condições experimentais idênticas às utilizadas, o  $\beta$ -GF é totalmente degradado em fosfato inorgânico pela fosfatase alcalina, pois em culturas efectuadas na presença de um inibidor da enzima não se observa hidrólise deste composto.

Como já foi referido anteriormente, o ácido ascórbico desempenha um papel importante na produção da matriz óssea extracelular de colagénio<sup>117,137,158</sup>. Nas condições experimentais utilizadas e comparativamente com o observado nas culturas mantidas em meio padrão, a presença de AA no meio de cultura aparentemente não afectou significativamente os parâmetros de crescimento celular e a actividade da fosfatase alcalina nas culturas de

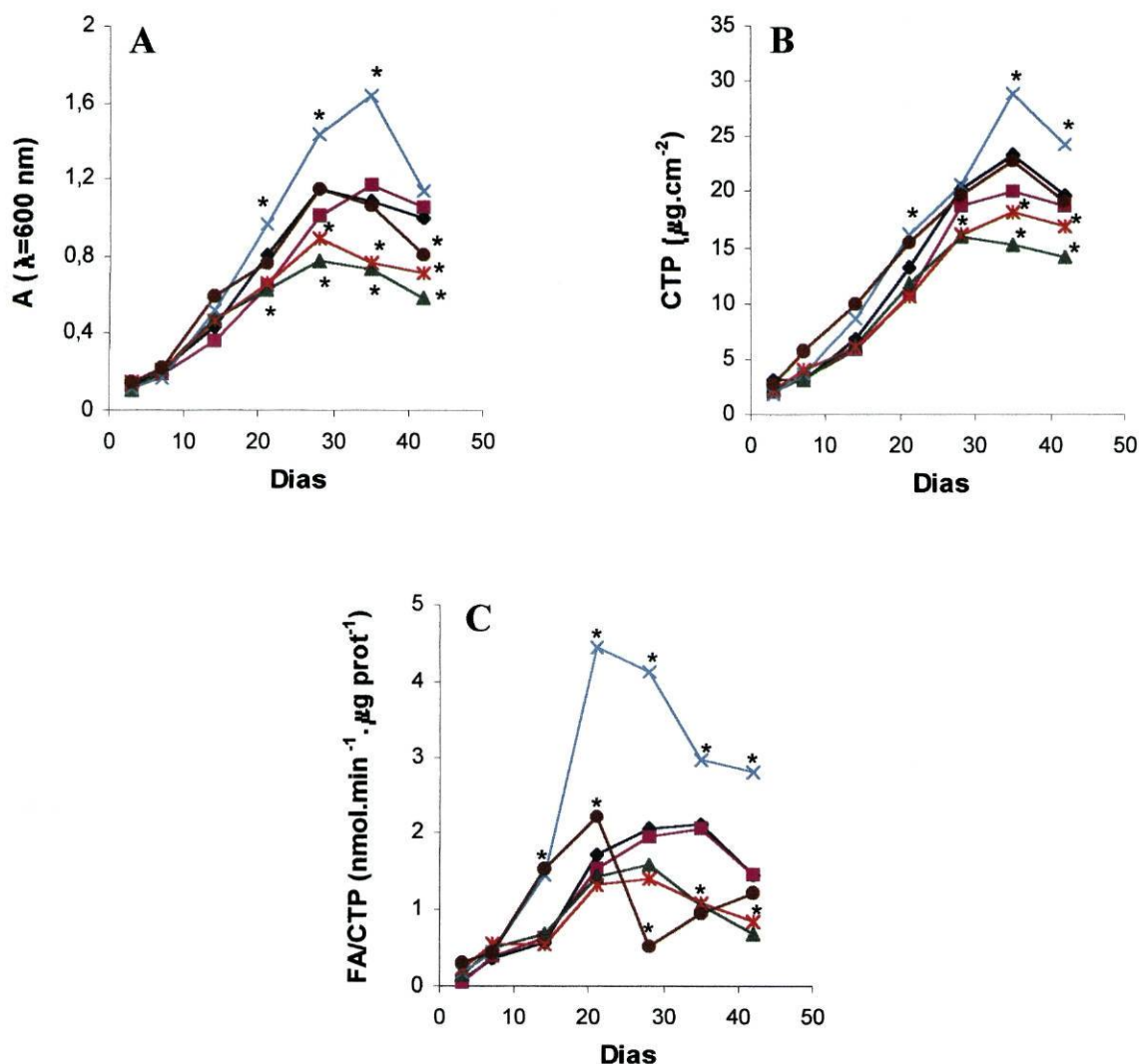
células de medula óssea. As culturas que cresceram unicamente na presença de AA apresentaram um crescimento celular e níveis de fosfatase alcalina semelhantes às culturas que cresceram em meio padrão, embora os valores máximos para a redução do MTT fossem atingidos mais tarde (dia 35). A presença adicional de AA no meio com  $\beta$ -GF resultou num pequeno aumento na proliferação celular, principalmente a partir do dia 28 (Fig. 18A), enquanto que a actividade da fosfatase alcalina seguiu um padrão semelhante ao apresentado pelas culturas que cresceram unicamente na presença de  $\beta$ -GF (Fig. 18C). Neste trabalho, as células de medula óssea foram cultivadas em meio de cultura  $\alpha$ -MEM que já contém  $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de AA e, neste sistema, um aumento deste composto no meio, aparentemente, não provocou qualquer efeito significativo nos parâmetros celulares estudados. Contudo, comparando com as culturas que cresceram apenas na presença de  $\beta$ -GF, a formação de depósitos minerais foi detectada alguns dias mais tarde nas culturas que cresceram na presença de AA +  $\beta$ -GF (Fig. 15). Este efeito está provavelmente relacionado com as diferenças que ocorrem no balanço acumulação/maturação da matriz de colagénio nas duas situações experimentais, visto que a quantidade, composição e maturação da matriz extracelular afecta a diferenciação das células ósseas<sup>175,176</sup>.

A presença de dexametasona nas culturas resultou num significativo aumento do crescimento celular (redução do MTT e conteúdo total de proteína) (Figs. 18A,B). Este efeito foi verificado quer nas culturas que não mineralizaram (células tratadas com Dex), quer nas que apresentaram a formação de depósitos mineralizados (culturas tratadas com AA +  $\beta$ -GF + Dex). A adição de Dex a culturas que cresceram em meio padrão resultou num aumento de 20 a 40% nos valores obtidos para a redução do MTT, a partir da segunda semana de incubação; comparativamente com as culturas que cresceram num meio enriquecido apenas com AA +  $\beta$ -GF, a presença adicional de Dex também resultou num aumento semelhante da proliferação celular ao longo do tempo de incubação. Em ambas as situações experimentais, (Dex; AA +  $\beta$ -GF + Dex), a presença de Dex induziu significativamente a actividade da fosfatase alcalina; os níveis da enzima aumentaram a partir da primeira semana e os valores máximos foram superiores e atingidos mais cedo (dia 21), comparativamente com as culturas que cresceram em meio semelhante, mas na ausência do glucocorticóide (respectivamente, meio padrão e AA +  $\beta$ -GF) (Fig. 18C). Nas culturas que mineralizaram (AA +  $\beta$ -GF e AA +  $\beta$ -GF + Dex), a presença de Dex aumentou a capacidade para formar depósitos de fosfato de cálcio, tal como é mostrado pela reacção



histoquímica de Alizarina vermelha (Fig. 15) e pela observação das culturas por MEV (Figs. 16B,C).

Os efeitos observados na presença de Dex devem-se provavelmente à capacidade que os glucocorticóides possuem de estimular a proliferação e/ou a diferenciação das células osteoprogenitoras, promovendo assim a expressão dos marcadores osteoblásticos nas culturas de células ósseas<sup>117,119-123,186-188</sup>.



**Figura 18** – Proliferação/viabilidade celular (A), conteúdo total de proteína (B) e actividade da fosfatase alcalina (C) de culturas de medula óssea humana mantidas nas seguintes condições experimentais: meio padrão (◆), AA (■), β-GF (▲), Dex (×), AA + β-GF (\*) e AA + β-GF + Dex (●).

\*Significativamente diferente das culturas que cresceram em meio padrão. Os desvios padrão observados foram < 20 %.

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que os parâmetros de crescimento celular (redução do MTT e conteúdo total de proteína) atingiram valores superiores nas culturas que não mineralizaram, isto é nas culturas que cresceram em meio padrão e na presença de AA ou Dex e que as células proliferaram até mais tarde (aproximadamente, até ao dia 35). Por outro lado, nas culturas que cresceram na presença de  $\beta$ -GF, isolado ou em combinação com outros suplementos, a proliferação celular foi menor ao longo do período de incubação e terminou mais cedo (por volta do dia 21). A única excepção foi observada para as culturas que cresceram na presença de AA +  $\beta$ -GF + Dex, que apresentaram uma proliferação celular semelhante à das culturas que cresceram em meio padrão. Tal facto deve-se ao efeito de estimulação da dexametasona no crescimento das células; contudo o crescimento celular desta culturas foi significativamente menor do que o observado nas culturas que cresceram apenas na presença de Dex.

As células de medula óssea cultivadas em todas as situações referidas neste trabalho apresentaram uma actividade da fosfatase alcalina elevada. Os níveis da enzima aumentaram ao longo do tempo de incubação, de modo análogo à proliferação celular. A fosfatase alcalina tem sido associada ao processo de mineralização<sup>15,22,118,122</sup> e em células cultivadas num meio contendo  $\beta$ -GF, a formação dos depósitos de fosfato de cálcio ocorreu logo depois de atingida a actividade máxima da enzima (Fig. 15C). Durante as fases subsequentes da deposição mineral, a intensidade das reacções histoquímicas para a detecção dos depósitos de fosfato de cálcio aumentou ao longo do tempo de incubação (Figs. 15 e 17), mas os níveis da enzima baixaram significativamente (Figs. 15 e 18C). Esta observação está de acordo com outros estudos que mostraram que as células estão principalmente envolvidas com o início do processo de deposição mineral (fornecendo elevados níveis de fosfatase alcalina, através das vesículas da matriz), enquanto que a propagação é um mecanismo essencialmente físico-químico<sup>22</sup>.

Os resultados obtidos mostram que a proliferação celular e a actividade da fosfatase alcalina diminuem para tempos de cultura prolongados, enquanto que a intensidade das reacções histoquímicas para a deposição mineral aumenta. Após o início da deposição mineral, o osteoblasto diferenciado, aprisionado na matriz extracelular, torna-se um osteócito que nem prolifera, nem expressa actividade da fosfatase alcalina; além disso,



durante esta fase da cultura, pode ocorrer apoptose celular, verificando-se conseqüentemente uma diminuição do número de células.

A proliferação das células osteoblásticas está funcionalmente relacionada com a síntese da matriz óssea extracelular, e a sua acumulação e deposição (essenciais para o processo de mineralização) contribuem para o termo da proliferação<sup>15,122,147,175</sup>. Por sua vez, a taxa de formação do mineral está dependente da regulação dos níveis de fosfato existentes na matriz extracelular. Assim, na presença de uma fonte de íões fosfato ( $\beta$ -GF), e uma vez alcançada a relação adequada entre a acumulação e a maturação da matriz extracelular, a mineralização desta ocorre e conseqüentemente a proliferação celular cessa, com os osteoblastos a serem embebidos na matriz óssea e a transformarem-se em osteócitos (estado terminal da diferenciação osteoblástica)<sup>22,147</sup>. De acordo com este modelo, existe uma relação funcional entre a proliferação e a diferenciação das células osteoblásticas que é, como já foi referido, caracterizada pela expressão temporal de determinados genes, que definem os três principais períodos do desenvolvimento fenotípico dos osteoblastos (proliferação, desenvolvimento e maturação da matriz extracelular e mineralização)<sup>147,175</sup>.

O comportamento das culturas de células de medula óssea humana parece estar de acordo com este modelo de diferenciação osteoblástica. As culturas que cresceram em condições experimentais que não permitiram a mineralização da matriz extracelular, isto é as culturas que cresceram na ausência de uma fonte de íões fosfato ( $\beta$ -GF), apresentaram valores para a proliferação celular superiores e características osteoblásticas, nomeadamente, uma actividade da fosfatase alcalina elevada, embora a expressão completa do fenótipo osteoblástico não se tenha verificado. Na presença de  $\beta$ -GF, a diferenciação osteoblástica foi completa e a formação da matriz mineralizada contribuiu para uma redução do crescimento celular. Como resultado, estas culturas apresentaram uma população celular osteoblástica menos proliferativa, mas mais diferenciada, comparativamente com as culturas que não apresentaram o processo de mineralização.

### 3.3 – CONCLUSÃO

Este trabalho teve como objectivo o estudo do comportamento de proliferação/diferenciação de células de medula óssea humana cultivadas em  $\alpha$ -MEM

suplementado com 10% de soro bovino fetal (meio padrão) e na presença isolada ou em combinação de ácido ascórbico (AA),  $\beta$ -glicerofosfato ( $\beta$ -GF) e dexametasona (Dex). As células cultivadas nas várias condições experimentais proliferaram gradualmente ao longo do período de incubação e apresentaram uma actividade da fosfatase alcalina elevada. As culturas mantidas em meio padrão ou na presença isolada de AA ou Dex não mineralizaram. As culturas mantidas na presença de  $\beta$ -GF, AA +  $\beta$ -GF e AA +  $\beta$ -GF + Dex, isto é na presença de uma fonte de iões fosfato, apresentaram a formação de uma matriz extracelular mineralizada. A presença de Dex resultou numa indução significativa da actividade da fosfatase alcalina e da capacidade para formar depósitos de fosfato de cálcio. Os resultados obtidos mostraram que existe uma relação recíproca e funcionalmente acoplada entre a proliferação e diferenciação destas culturas celulares, isto é, as culturas mantidas num meio contendo  $\beta$ -GF apresentaram uma população celular osteoblástica menos proliferativa mas mais diferenciada, comparativamente com as culturas que não mineralizaram.



# **CAPÍTULO III**

**UTILIZAÇÃO DE CULTURAS DE CÉLULAS  
OSTEOBLÁSTICAS HUMANAS COMO  
MODELO *IN VITRO* NO ESTUDO DAS  
INTERACÇÕES TECIDO ÓSSEO/BIOMATERIAIS:  
MODULAÇÃO FARMACOLÓGICA DO  
COMPORTAMENTO DE  
PROLIFERAÇÃO/DIFERENCIAÇÃO**

## 1 – INTRODUÇÃO

A perda óssea está associada ao processo de envelhecimento e pode também observar-se como resultado de variadas doenças metabólicas e de fracturas. Embora o tecido ósseo tenha uma considerável capacidade de regeneração ainda existem muitas situações em que este processo está dificultado, constituindo um problema em cirurgia óssea reconstrutiva. Neste contexto, o uso clínico de biomateriais osteocompatíveis e bioactivos tem importantes aplicações na reparação e reconstrução óssea.

A interacção biológica tecido ósseo/biomaterial deve ser apropriada de modo a permitir a migração de células ósseas em direcção e para o interior do material e a produção por estas células de uma matriz colagenosa calcificada semelhante ao tecido ósseo<sup>5</sup>. Os processos de reparação e formação óssea são regulados por várias hormonas e factores locais que podem actuar de modo endócrino, paracrínico e autocrínico nas células presentes no microambiente ósseo. Assim, os fenómenos biológicos que ocorrem na interface tecido ósseo/biomaterial podem ser farmacologicamente modulados pela utilização de hormonas e factores de crescimento de modo a estimular a adesão, proliferação e diferenciação das células osteoblásticas na interface, com o objectivo de garantir uma melhor e mais rápida regeneração tecidular e osteointegração do material. A dexametasona, hormona da paratiróide e hormona do crescimento são exemplos de hormonas com um papel importante nos mecanismos de regulação óssea e, em particular, na actividade osteoblástica<sup>12,18</sup>.

O sucesso da utilização de um biomaterial pode estar comprometido por vários factores locais que dependem das características do material, da manipulação durante o processo cirúrgico e da resposta do hospedeiro ao material implantado. O aparecimento de um processo infeccioso local é um fenómeno relativamente frequente que pode comprometer a regeneração tecidular e a osteointegração do implante. Assim, é muitas vezes necessária a utilização sistémica de antibióticos para combater a infecção local. Dos vários antibióticos que são utilizados clinicamente, as tetraciclina, nomeadamente a doxiciclina e a minociclina, apresentam um espectro antimicrobiano apropriado para o tratamento de infecções ósseas e uma eficácia clínica comprovada. Além do efeito anti-infeccioso, estes dois fármacos parecem exercer efeitos directos no microambiente ósseo que, aparentemente, se traduzem por um efeito benéfico nos processos de regeneração



tecdular<sup>190</sup>. A caracterização destes efeitos a nível celular reveste-se de particular interesse, pois que algumas das acções farmacológicas resultantes podem modular favoravelmente a resposta do hospedeiro contribuindo para o sucesso do processo de regeneração óssea<sup>189</sup>.

Neste capítulo apresentam-se os resultados relativos a dois estudos. No primeiro estudo (secção 2), avaliou-se o efeito da dexametasona, hormona da paratiróide e hormona do crescimento no comportamento de proliferação/diferenciação de culturas de células osteoblásticas de medula óssea humana. Este estudo permitiu seleccionar as condições mais adequadas para a obtenção da expressão máxima do fenótipo osteoblástico, nas condições de cultura utilizadas. No segundo estudo (secção 3) avaliou-se o efeito da doxiciclina e minociclina, em diferentes concentrações, no comportamento de culturas de células osteoblásticas de medula óssea humana. Este estudo permitiu caracterizar o efeito da doxiciclina e minociclina de modo a definir, dentro da gama de concentrações utilizadas terapêuticamente, níveis destes antibióticos que exercem um efeito positivo na actividade das células osteoblásticas. As concentrações das hormonas e dos antibióticos utilizadas nestes estudos foram seleccionadas tendo por base as concentrações plasmáticas obtidas durante o tratamento por estes fármacos e, também, resultados de estudos efectuados relativos ao efeito destes fármacos em sistemas de cultura de células. Estes estudos foram realizados na primeira subcultura pois, de acordo com os resultados descritos no capítulo II, é a que apresenta a expressão mais significativa dos parâmetros osteoblásticos avaliados.

Os dois estudos tiveram como objectivo caracterizar os efeitos da dexametasona, hormona da paratiróide e hormona do crescimento e, também, da doxiciclina e minociclina de modo a poder otimizar as condições experimentais para a modulação do comportamento de culturas celulares de medula óssea humana cultivadas na superfície de um composto de hidroxiapatite-biovidro (CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) e da hidroxiapatite para a obtenção da expressão completa da diferenciação osteoblástica nestas culturas (resultados apresentados no capítulo IV).

## 2 – MODULAÇÃO HORMONAL DO COMPORTAMENTO OSTEOBLÁSTICO DE CULTURAS CELULARES DE MEDULA ÓSSEA HUMANA

A capacidade que alguns fármacos possuem para regular a actividade funcional e a diferenciação das células osteoblásticas é complexa e depende da concentração utilizada, da presença de outros compostos e do momento na sequência do desenvolvimento celular em que são utilizados<sup>17</sup>. As hormonas podem afectar o crescimento celular e a diferenciação por acção directa nas células osteoblásticas ou por alteração da produção e disponibilidade dos factores de crescimento. Vários estudos sugerem que alguns factores demonstram diferentes efeitos nos osteoblastos à medida que estas células se diferenciam, enquanto que outros apenas reconhecem populações em determinado estado de diferenciação. Uma variedade de factores locais e hormonas osteotrópicas influenciam o recrutamento de células indiferenciadas, outros afectam a diferenciação de osteoprogenitores, alguns deles são potentes agentes mitogénicos, enquanto que outros influenciam a expressão de marcadores fenotípicos, sugerindo que as interacções destes factores de crescimento e hormonas são importantes na determinação das funções celulares<sup>15,122,147,190-192</sup>.

É sabido que os osteoblastos desempenham um papel importante nos mecanismos de regulação óssea, a par da sua capacidade para formar osso. Os estudos realizados em culturas de células osteoblásticas têm contribuído significativamente para a compreensão de alguns aspectos da fisiologia e da farmacologia do osso, e também dos acontecimentos biológicos que ocorrem na interface do tecido ósseo com os biomateriais de implante. As células da linhagem osteoblástica estão presentes na medula óssea em diferentes estados de diferenciação, que se distinguem quanto ao seu potencial proliferativo, actividade funcional e resposta a várias hormonas e factores de crescimento, bem como, às alterações que ocorrem no ambiente local (nomeadamente, a presença de fármacos). Os resultados descritos no capítulo II mostraram que as culturas celulares de medula óssea humana efectuadas na presença de AA +  $\beta$ -GF e mantidas por tempo prolongado (35-42 dias) apresentam capacidade de expressão completa do fenótipo osteoblástico. O padrão de comportamento destas culturas sugere uma progressão no desenvolvimento osteoblástico, à medida que a população celular evolui de um estado mais proliferativo e menos diferenciado (fase de crescimento celular exponencial) para um estado menos proliferativo



e mais diferenciado (quando a mineralização começa). Deste modo, este sistema de cultura representa um modelo *in vitro* adequado para estudar a relação proliferação/diferenciação durante o desenvolvimento progressivo do fenótipo osteoblástico<sup>168,171</sup> e verificar se determinados estados de diferenciação osteoblástica exibem uma resposta selectiva aos efeitos de compostos que influenciam a actividade destas células.

Nesta secção apresentam-se os resultados relativos ao comportamento de proliferação celular e diferenciação osteoblástica de culturas de células de medula óssea humana na presença de dexametasona, hormona da paratiróide e hormona do crescimento. As células, cultivadas na presença de AA +  $\beta$ -GF por períodos de 35 dias, foram expostas às hormonas durante todo o período de incubação ou, apenas, durante fases seleccionadas do tempo de cultura, representativas de diferentes estados de diferenciação celular.

## 2.1 – EFEITO DA DEXAMETASONA

Os glucocorticóides constituem um grupo de hormonas com particular interesse no que diz respeito ao metabolismo ósseo. São hormonas esteróides que estimulam a reabsorção óssea *in vivo* através da redução da absorção de cálcio e consequente aumento dos níveis da hormona da paratiróide (PTH)<sup>193</sup>, da estimulação da actividade dos osteoclastos e, também, da inibição da formação óssea<sup>194</sup>.

As células osteoblásticas possuem receptores para os glucocorticóides, sugerindo que estes compostos têm efeitos directos nas funções das células ósseas<sup>195</sup>. As acções destas hormonas na formação óssea são complexas. Em trabalhos efectuados com células osteoblásticas, cultivadas na presença de glucocorticóides em concentrações fisiológicas, observou-se uma redução da proliferação celular<sup>196,197</sup>, da síntese de colagénio tipo I e na secreção de osteocalcina<sup>198</sup>, e ainda uma diminuição da síntese de proteínas e de ARN<sup>199,200</sup>. No entanto, observou-se uma estimulação dos parâmetros mais relacionados com a expressão osteoblástica específica, tal como a actividade da fosfatase alcalina<sup>194,201,202</sup>, a resposta à PTH<sup>202</sup> e à 1,25-diidroxivitamina D<sub>3</sub><sup>203</sup>. Outros estudos<sup>120</sup> demonstraram que estas hormonas induzem a diferenciação de células do estroma de medula óssea humana em células que apresentam o fenótipo osteoblástico. Estas observações, juntamente com

outras<sup>204-208</sup>, sugerem que os glucocorticóides desempenham um papel importante na diferenciação de células osteoprogenitoras da medula óssea em células da linhagem osteoblástica. No entanto, foram observadas diferenças nos efeitos dos glucocorticóides sobre o comportamento destas células, consoante o sistema celular utilizado, a concentração da hormona, a presença de soro como fonte de hormonas e factores de crescimento interactivos e o estado de diferenciação das células<sup>158</sup>.

A dexametasona (Dex), um glucocorticóide sintético muito utilizado, parece estimular a proliferação e/ou a diferenciação de células osteoprogenitoras em diferentes estados de diferenciação; as células mais diferenciadas são capazes de formar uma matriz extracelular mineralizada sem que haja necessidade de estimulação exógena pela dexametasona, enquanto que as menos diferenciadas requerem a presença da hormona para a expressão dos parâmetros osteoblásticos<sup>17,117,119,204</sup>. A presença deste composto resulta na indução da expressão osteoblástica em vários sistemas de cultura de células ósseas<sup>117,119,121,158,160,187,204,209,210</sup>. Tal como os outros glucocorticóides, os efeitos da dexametasona na formação óssea *in vitro* parecem depender dos níveis fisiológicos ou farmacológicos da hormona utilizados, do tempo de exposição ao fármaco e do sistema celular em estudo.

Neste estudo, avaliou-se o efeito da dexametasona no crescimento celular e actividade funcional de culturas de células osteoblásticas de medula óssea humana; as culturas foram expostas à hormona de modo contínuo e em diferentes fases do período de incubação, representativas de diferentes estados de diferenciação das células.

### 2.1.1 – Material e Métodos

#### *CULTURAS CELULARES*

As células de medula óssea humana foram cultivadas em condições experimentais idênticas às descritas no capítulo II (secção 2.1). Após a tripsinização da cultura primária, as células foram cultivadas ( $10^4$  células.cm<sup>-2</sup>) por um período de 35 dias, na presença de ácido ascórbico e de  $\beta$ -glicerofosfato, nas concentrações já referidas na secção 2.1 do capítulo II, em condições controlo (ausência de Dex) e na presença da hormona numa concentração de 10 nmol.L<sup>-1</sup>. Foi preparada uma solução mais concentrada da hormona em etanol, cuja



concentração final no meio de cultura foi de 1%. Estudos preliminares mostraram que esta quantidade de etanol não afecta o comportamento das culturas celulares. As células foram expostas à dexametasona em duas situações experimentais:

1. de modo contínuo, durante os 35 dias do tempo de cultura;
2. em fases seleccionadas do período de incubação.

Assim, foram testadas cinco situações: (i) ausência da Dex (situação controlo, AA +  $\beta$ -GF); (ii) acção contínua da Dex; (iii) exposição à Dex durante a 1ª semana de cultura; (iv) exposição à Dex durante a 2ª semana de cultura; (v) exposição à Dex durante a 3ª semana de cultura.

### ***CARACTERIZAÇÃO DAS CULTURAS CELULARES***

As culturas celulares foram caracterizadas relativamente à proliferação/viabilidade celular (ensaio do MTT), conteúdo total de proteína, actividade da fosfatase alcalina e capacidade de formação de depósitos minerais, de acordo com a metodologia descrita no capítulo II (secção 2.1). As culturas foram caracterizadas nos dias 3, 7, 14, 21, 28 e 35.

Neste estudo efectuou-se também a determinação das concentrações de fósforo e cálcio ionizados no meio de cultura durante todo o tempo de incubação.

#### **Determinação de fósforo e cálcio ionizados no meio de cultura**

O meio de cultura das culturas celulares foi recolhido duas vezes por semana, em cada mudança de meio, ao longo de todo o período de incubação e foi analisado para determinar a concentração de fósforo e cálcio ionizados. A quantificação destes iões no meio de cultura incubado na ausência de células também foi efectuada.

Os níveis de fósforo e cálcio ionizados determinados no meio de cultura não são cumulativos, uma vez que o meio de cultura foi totalmente substituído de três em três dias; os valores obtidos mostram as alterações ocorridas em intervalos de três dias ao longo do período de incubação.

#### ***a) Fósforo ionizado***

A determinação do fósforo ionizado foi efectuada pelo método de Fiske e Subbarow adaptado pela Sigma (Kit Sigma Diagnostics, procedimento N° 670).

O meio de cultura foi tratado com ácido tricloroacético para precipitar as proteínas e os lípidos que se ligam aos fosfatos. O fluido sobrenadante reagiu com molibdato de amónia

numa solução ácida para formar fosfomolibdato. Adicionou-se uma mistura de bissulfito de sódio, sulfito de sódio e ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfónico de modo a reduzir o fosfomolibdato e formar um complexo azul de fosfomolibdénio. A intensidade da coloração foi medida a 660 nm num espectrofotómetro JENWAY 6405 UV/Vis.

#### ***b) Cálcio ionizado***

O cálcio ionizado foi determinado utilizando um procedimento adoptado pela Sigma (Kit Sigma Diagnostics, procedimento N° 587).

O meio de cultura foi adicionado a um agente cromogénico (“o-cresolphtalein complexone”), 8-hidroxiquinolina e 2-amino-2-metil-1,3 propanediol em meio alcalino. A reacção do cálcio com a o-cresoftalaína produz um complexo vermelho a pH 10-12. A intensidade da cor, medida a 575 nm num espectrofotómetro JENWAY 6405 UV/Vis, é directamente proporcional à concentração de cálcio existente na amostra.

#### ***c) Análise estatística***

Os resultados apresentados representam a média  $\pm$  desvio padrão de 2 réplicas das concentrações de cálcio ou fósforo ionizados determinadas no meio de cultura. Cada réplica corresponde ao meio recolhido de três poços, nas várias situações experimentais, sendo analisada em triplicado.

Em cada experiência, as diferenças estatísticas observadas entre as culturas em estudo e a cultura controlo respectiva foram determinadas pelo método de Bonferroni, em que os valores de  $p \leq 0.05$  foram considerados significativos.

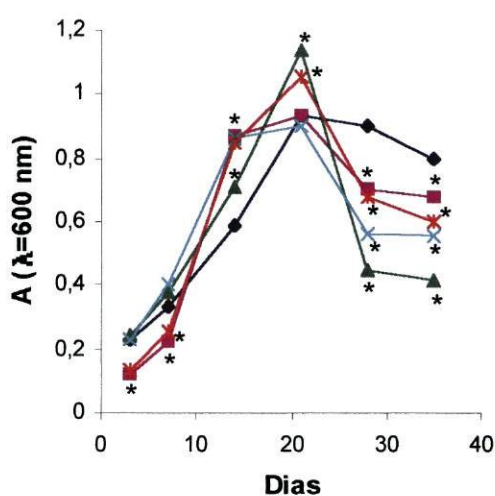
### **2.1.2 – Resultados**

#### ***Proliferação/viabilidade celular. Conteúdo total de proteína***

As células de medula óssea humana cultivadas em situação controlo (AA +  $\beta$ -GF) proliferaram gradualmente durante as três primeiras semanas e, após atingirem uma fase estacionária (4ª semana), os valores de redução do MTT diminuiram ligeiramente (Fig. 19). A presença contínua de Dex resultou numa estimulação do crescimento durante a 2ª semana de cultura; o valor máximo de proliferação celular foi observado mais cedo, por volta do dia 14-21, após o que se observou uma descida dos valores de redução do MTT (Fig. 19). A exposição das células à hormona durante a 1ª semana resultou num aumento significativo



da proliferação celular durante a fase exponencial do crescimento e o valor máximo atingido foi superior, relativamente às células cultivadas na ausência de Dex (Fig. 19). As culturas celulares tratadas com Dex durante a 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> semanas apresentaram uma indução do crescimento celular durante a fase de exposição (Fig. 19). As culturas de medula óssea expostas à Dex, quer de forma contínua, quer de forma descontínua, apresentaram uma diminuição significativa dos valores de redução do MTT após terem atingido o valor máximo de proliferação celular. O conteúdo total de proteína aumentou com o tempo de incubação de modo semelhante à proliferação celular (dados não apresentados).



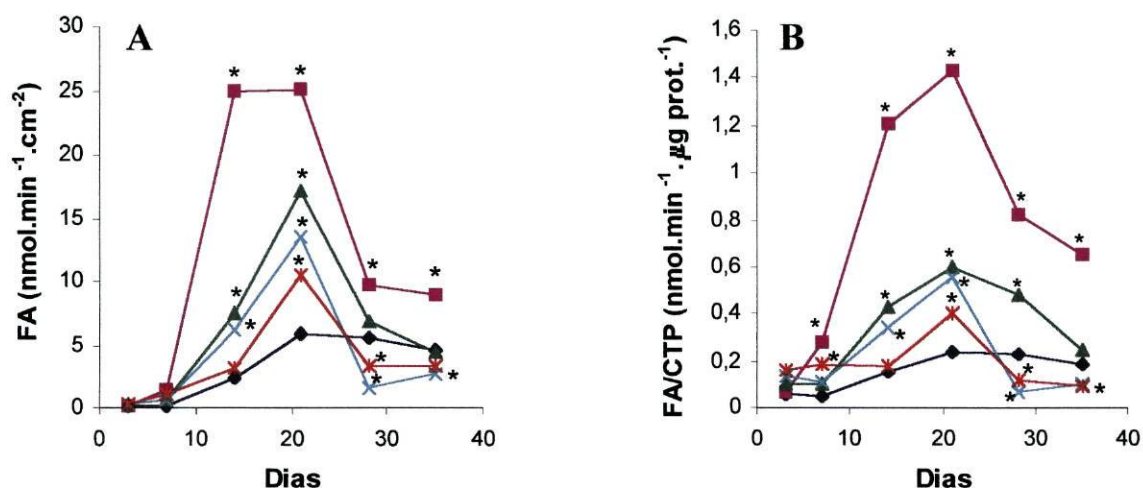
**Figura 19** – Proliferação/viabilidade celular (ensaio do MTT) de culturas de medula óssea humana mantidas nas seguintes condições experimentais: situação controlo (culturas efectuadas na presença de AA +  $\beta$ -GF) (◆), presença contínua de Dex (■), presença de Dex durante a primeira (▲), segunda (×) ou terceira (\*) semana de incubação.

\*Significativamente diferente das culturas que cresceram em situação controlo. Os desvios padrão observados foram < 20 %.

### **Actividade da fosfatase alcalina**

A determinação bioquímica da actividade da fosfatase alcalina mostrou que os níveis desta enzima foram influenciados pela presença de Dex nas culturas (Fig. 20). Nas culturas efectuadas na ausência da hormona (situação controlo), a actividade da enzima foi reduzida durante a 1<sup>a</sup> semana, aumentou durante a 2<sup>a</sup> semana de cultura atingindo valores máximos por volta do dia 21 e manteve-se mais ou menos estável até ao fim do tempo de cultura. Nas células cultivadas na presença contínua de Dex, a actividade da fosfatase alcalina foi

significativamente estimulada durante a 2ª semana de incubação, atingiu o nível máximo por volta do dia 14-21, após o que se observou uma redução brusca dos níveis da enzima. A exposição das células de medula óssea ao glucocorticóide durante a 1ª e 2ª semanas de cultura resultou na indução da actividade da fosfatase alcalina, embora menos significativa do que a observada nas culturas expostas continuamente à Dex; o valor máximo, atingido ao dia 21, foi significativamente maior do que o observado nas culturas controlo e os níveis da enzima baixaram imediatamente depois de atingir este valor. As culturas mantidas com Dex durante a 3ª semana apresentaram um aumento dos níveis da enzima durante a fase de exposição e o valor máximo, atingido ao dia 21, foi também superior ao observado nas culturas controlo. Os níveis de fosfatase alcalina diminuíram significativamente após 21 dias de incubação nas culturas celulares efectuadas na presença contínua ou descontínua de Dex.



**Figura 20** – Actividade da fosfatase alcalina expressa por unidade de área (A) e por micrograma de proteína (B) de culturas de medula óssea humana mantidas nas seguintes condições experimentais: situação controlo (culturas efectuadas na presença de AA +  $\beta$ -GF) ( $\blacklozenge$ ), presença contínua de Dex ( $\blacksquare$ ), presença de Dex durante a primeira ( $\blacktriangle$ ), segunda ( $\times$ ) ou terceira ( $*$ ) semana de incubação.

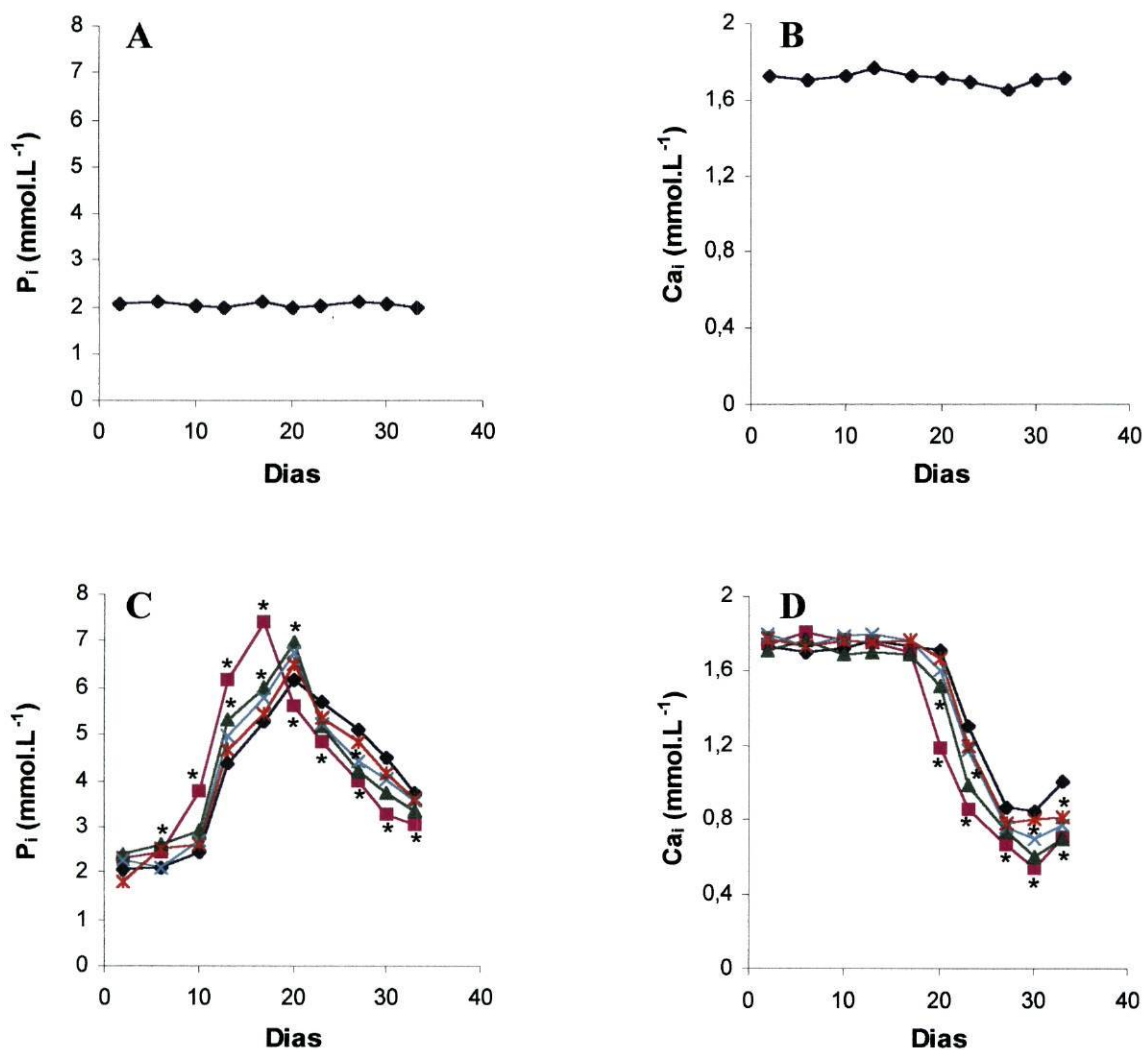
\*Significativamente diferente das culturas que cresceram em situação controlo. Os desvios padrão observados foram < 20 %.

A figura 20B apresenta os resultados da actividade da fosfatase alcalina expressos em  $\text{nmol.min}^{-1}.\mu\text{g prote\u00edna}^{-1}$ , permitindo uma no\u00e7\u00e3o mais precisa da actividade da enzima por c\u00e9lula. A informa\u00e7\u00e3o obtida nesta figura \u00e9 semelhante \u00e0 observada na figura 20A.



O estudo histoquímico para a detecção da fosfatase alcalina nas culturas efectuadas nas várias situações mostrou resultados semelhantes aos obtidos na determinação bioquímica da enzima, não sendo por isso apresentados.

### Níveis de fósforo e cálcio ionizados no meio de cultura



**Figura 21** – Níveis de fósforo e cálcio ionizados no meio de cultura recolhido ao longo do período de incubação. A e B, meio incubado na ausência de células; C e D, meio recolhido de culturas de medula óssea humana. Situação controlo (AA +  $\beta$ -GF) ( $\blacklozenge$ ), presença contínua de Dex ( $\blacksquare$ ), presença de Dex durante a primeira ( $\blacktriangle$ ), segunda ( $\times$ ) ou terceira ( $*$ ) semana de incubação.

\*Significativamente diferente das culturas que cresceram em situação controlo. Os desvios padrão observados foram < 20 %.

Na figura 21 apresentam-se os valores observados para as concentrações de fósforo e cálcio ionizados no meio incubado na ausência de células (respectivamente, A e B) e recolhido das culturas celulares efectuadas nas várias situações experimentais (respectivamente, C e D).

Na ausência de células ósseas, os níveis de fósforo e cálcio ionizados no meio de cultura foram semelhantes ao longo do período de incubação (Fig. 21A,B). Verificou-se que o teor das duas espécies iónicas no meio de cultura varia ligeiramente ao longo da experiência. Tal facto pode ser explicado tendo em conta que o meio de cultura tem de ser preparado diversas vezes durante o ensaio e que é muito difícil pipetar uniformemente este meio. A possibilidade de uma aplicação incorrecta dos métodos seleccionados pode ser posta de lado, visto que estudos preliminares comparativos<sup>185,211</sup> em que se utilizaram estes e outros métodos permitiram obter resultados com grande precisão e exactidão e que são semelhantes aos observados neste trabalho.

O meio de cultura recolhido das culturas que cresceram na ausência de Dex apresentou um aumento significativo da concentração de fósforo ionizado, que se observou aproximadamente a partir do dia 10 até ao dia 20 (Fig. 21C). Este aumento resulta da hidrólise, pela fosfatase alcalina, do  $\beta$ -GF adicionado ao meio ( $10 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) e a variação do teor de fósforo ionizado no meio está de acordo com o padrão de variação da actividade da fosfatase alcalina. Durante este período, os níveis de cálcio ionizado não se alteraram significativamente (Fig. 21D). Contudo, a partir do dia 20 e até ao fim do tempo de incubação, observou-se uma redução dos níveis de fósforo e cálcio ionizados. O consumo destas espécies a partir do meio de cultura reflecte a formação de depósitos de fosfato de cálcio nas culturas celulares. Estes resultados estão em concordância com estudos anteriores realizados em culturas celulares de medula óssea humana e de rato, mantidas em condições experimentais semelhantes<sup>185,212-214</sup>.

As culturas expostas continuamente à Dex apresentaram algumas diferenças relativamente às culturas que cresceram na ausência da hormona. Os níveis de fósforo ionizado começaram a aumentar desde o início do tempo de incubação e o valor máximo ( $7,41 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) foi observado mais cedo (dia 17) (Fig. 21C), resultados que estão de acordo com a indução na actividade da fosfatase alcalina observada nestas culturas. A redução dos níveis de fósforo e cálcio ionizados começou mais cedo (a partir do dia 17) do que nas culturas que não foram expostas ao glucocorticóide, sugerindo um início mais precoce do processo de



mineralização. Nas culturas que cresceram na presença da hormona de modo descontínuo o nível máximo de fósforo ionizado foi atingido ao dia 20 e nas culturas tratadas durante a 1ª semana os níveis de fósforo ionizado foram superiores aos observados nas culturas controlo nos dias 14, 17 e 20. O consumo das duas espécies iónicas foi maior nas culturas expostas ao glucocorticóide durante a 1ª semana, comparativamente com as culturas controlo, seguindo-se as culturas tratadas com Dex durante a 2ª semana e a 3ª semana, respectivamente, tendo estas últimas apresentado valores muito próximos dos observados nas culturas controlo (Fig. 21C,D).

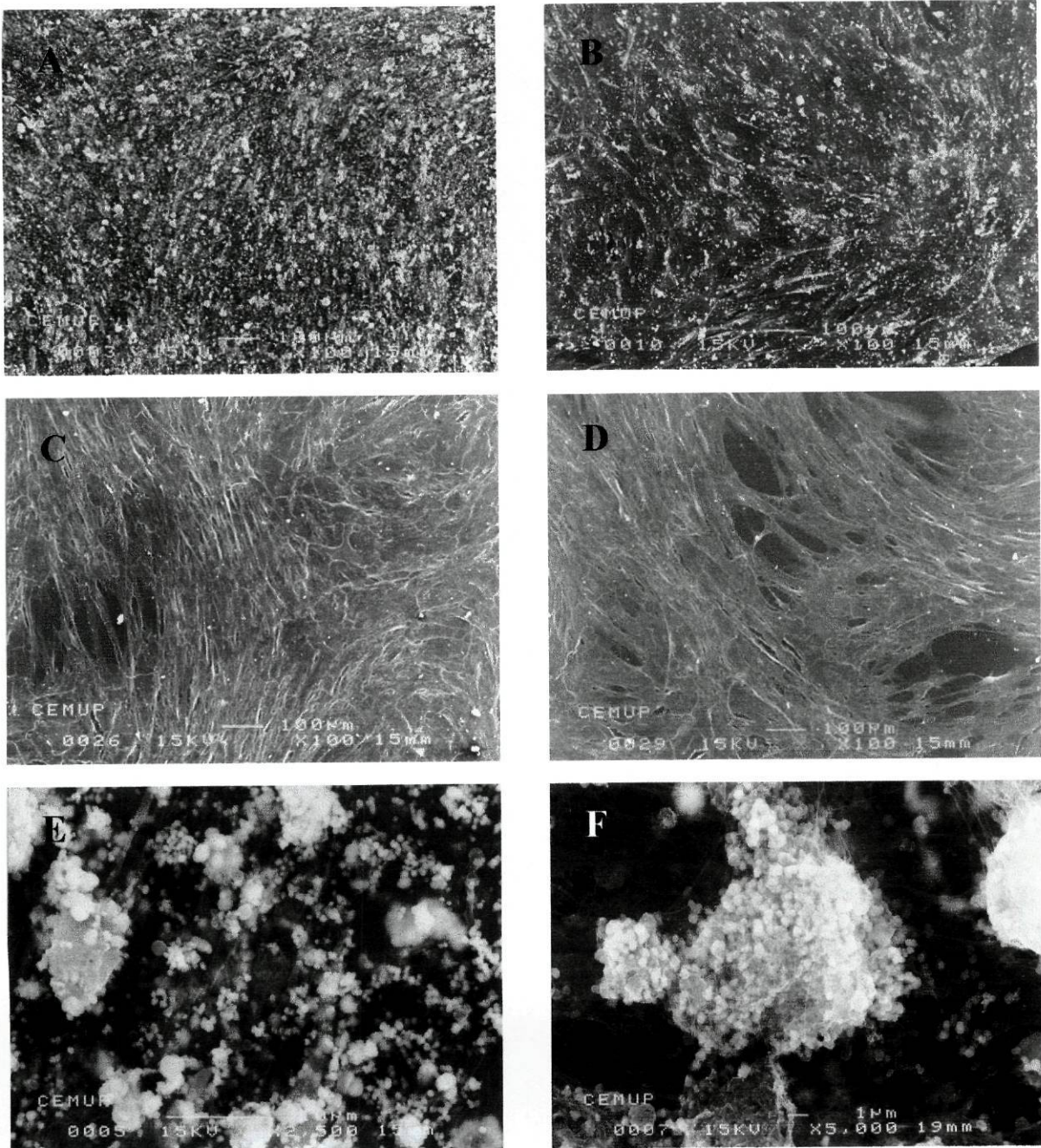
### ***Formação de depósitos de fosfato de cálcio***

Na tabela V mostram-se os resultados relativos à coloração das culturas pelo método de von Kossa nos dias 21, 28 e 35. A coloração das culturas pela técnica da Alizarina vermelha mostrou resultados semelhantes (dados não apresentados).

**Tabela V** – Reacção histoquímica para a detecção de depósitos de fosfato de cálcio (método de von Kossa) nos dias 21, 28 e 35, em culturas de células osteoblásticas de medula óssea humana mantidas nas seguintes condições experimentais: situação controlo (culturas efectuadas na presença de AA +  $\beta$ -GF), presença contínua de Dex, presença de Dex durante a primeira, segunda ou terceira semana de incubação.

	21 dias	28 dias	35 dias
<b>Controlo</b>	-	+/-	+
<b>Dex contínuo</b>	+	++	+++
<b>Dex 1ª semana</b>	+	+	++
<b>Dex 2ª semana</b>	+/-	+	++
<b>Dex 3ª semana</b>	-	+/-	+

A intensidade da coloração é definida do seguinte modo: -, coloração negativa; +, coloração positiva de fraca intensidade; ++, coloração positiva de média intensidade; +++, coloração positiva de elevada intensidade.



**Figura 22** – Fotografias de microscopia electrónica de varrimento de culturas de células osteoblásticas de medula óssea humana com 21 dias, mantidas nas seguintes condições experimentais: presença contínua de Dex (A) e presença de Dex durante a primeira (B), segunda (C) ou terceira (D) semana de incubação. E e F – ampliações de A.

As culturas controlo só mostraram a formação de depósitos de fosfato de cálcio após 28 dias de cultura. Nas culturas expostas continuamente à hormona ou apenas durante a 1<sup>a</sup>



semana observou-se a formação de áreas mineralizadas mais cedo (reações de Alizarina vermelha e de von Kossa positivas no dia 21); a intensidade das reações histoquímicas aumentou ao longo do período de incubação, embora de forma mais intensa nas culturas tratadas continuamente com Dex. As culturas tratadas com Dex durante a 2ª semana apresentaram uma reacção ligeiramente positiva no dia 21 e as culturas expostas durante a 3ª semana começaram a mineralizar mais tarde (reação positiva no dia 28), apresentando um comportamento semelhante ao observado nas culturas controlo (Tabela V); nestas culturas a intensidade das reações de coloração também aumentou com o tempo de incubação.

A observação das culturas expostas contínua ou descontinuamente à Dex por MEV confirmou os resultados histoquímicos. Assim, no dia 21, as culturas expostas durante todo o período de incubação ou apenas durante a 1ª semana mostraram a presença de numerosas estruturas globulares minerais enquanto que nas culturas tratadas durante a 2ª e 3ª semanas se observou a existência de uma estrutura formada apenas por células e uma matriz extracelular fibrilar (Fig. 22).

Os resultados relativos à detecção dos depósitos de fosfato de cálcio (reações histoquímicas; observação das culturas por MEV) parecem estar de acordo com o padrão de variação observado nos níveis de fósforo e cálcio ionizados no meio de cultura ao longo do período de incubação.

### 2.1.3 – Discussão

Os glucocorticóides possuem efeitos profundos na diferenciação de vários tipos celulares e podem actuar quer a nível da célula progenitora, quer a nível da expressão fenotípica e da actividade de células mais diferenciadas. Por exemplo, estes compostos regulam os tipos de colagénio sintetizado, inibem a síntese de colagénio e a taxa de crescimento dos fibroblastos<sup>215-217</sup>, reduzem a formação de osteoclastos a partir de células precursoras da linhagem dos monócitos<sup>218,219</sup> e aumentam a proliferação celular e a síntese de proteoglicanos e glicosaminoglicanos em culturas primárias de condrócitos<sup>220,221</sup>. Os glucocorticóides, a par de outras hormonas e factores de crescimento, são igualmente capazes de influenciar os osteoprogenitores que se dividem e se diferenciam para expressar a formação de depósitos mineralizados<sup>15,17,121,147,204</sup>. Existem estudos anteriores<sup>119</sup> que demonstraram que o tratamento crónico com dexametasona aumentou o número de nódulos

mineralizados em culturas primárias de osteoblastos obtidos a partir de abóbada craniana fetal de rato. Nas subculturas, o efeito foi ainda mais pronunciado, uma vez que o início da sequência de desenvolvimento osteoblástico na ausência de dexametasona foi significativamente atrasado, comparativamente com a progressão da sequência de desenvolvimento em culturas primárias de osteoblastos<sup>121</sup> na presença do glucocorticóide. Assim, o padrão de expressão génica nas células de subculturas é alterado pela dexametasona, visto que os glucocorticóides promovem a expressão dos parâmetros de diferenciação a níveis observados nas culturas celulares primárias. Aronow e col.<sup>121</sup> verificaram que em culturas osteoblásticas tratadas com dexametasona se observa uma estimulação da produção de osteopontina durante o período de proliferação, um aumento dos níveis de fosfatase alcalina e de osteocalcina que é proporcional ao número de nódulos formados e, ainda, uma indução precoce da mineralização da matriz extracelular.

Há numerosos estudos que sugerem que enquanto os glucocorticóides *in vivo* estão associados à perda óssea, quando utilizados *in vitro*, estes compostos tanto podem estimular como inibir a formação óssea<sup>195</sup>. Para melhor entender esta aparente contradição, é preciso distinguir que os glucocorticóides têm efeitos reguladores e efeitos de desenvolvimento na formação óssea<sup>195</sup>. Normalmente, estes compostos promovem a diferenciação das células osteoprogenitoras abreviando o período de proliferação da sequência de desenvolvimento da expressão do fenótipo osteoblástico (efeitos de desenvolvimento)<sup>15,117,120-123,171,186,207,222</sup>. Contudo, a formação óssea também é diminuída através da redução da expressão de vários genes dos marcadores osteoblásticos e da redução da proliferação celular no osso mineralizado (efeitos reguladores)<sup>195</sup>. Há estudos realizados com dexametasona<sup>223</sup> que demonstraram que inicialmente esta hormona estimula a proliferação e diferenciação de uma população distinta de células osteoprogenitoras que participam na formação óssea e que mais tarde limita a proliferação celular.

No trabalho aqui apresentado, a dexametasona, presente em baixas concentrações (10 nmol.L<sup>-1</sup>), parece estimular a proliferação e/ou diferenciação de células osteoprogenitoras em diferentes estados de diferenciação, existentes numa população celular de medula óssea humana, cultivada igualmente na presença de ácido ascórbico e  $\beta$ -glicerofosfato.

As células cultivadas nas diferentes situações experimentais apresentaram um comportamento relativo à proliferação celular semelhante ao que já foi descrito noutros



sistemas de células ósseas. Após uma fase “lag” de aproximadamente uma semana, as células de medula óssea humana entraram num período de proliferação activa que está associada à síntese de uma matriz extracelular, durante a segunda semana de incubação. Durante a terceira semana, observou-se a tendência para o aparecimento de uma fase estacionária (na ausência de Dex) ou de uma redução do crescimento celular (na presença contínua ou descontínua de Dex), como consequência da acumulação e maturação da matriz previamente formada. A expressão da fosfatase alcalina foi o parâmetro osteoblástico mais afectado pela presença da hormona em células em diferentes estados de diferenciação. Como já foi referido, os níveis de fosfatase alcalina são normalmente utilizados como marcador da diferenciação osteoblástica nos ensaios *in vitro*. A enzima está presente quando as células se diferenciam em pré-osteoblastos e osteoblastos e está ausente nos osteócitos. A um aumento da actividade específica da fosfatase alcalina numa população de células ósseas corresponde uma evolução das células para um estado mais diferenciado. Esta enzima tem sido associada à calcificação biológica e nas culturas de medula óssea humana, tal como noutros sistemas celulares<sup>186,213,224,225</sup>, a mineralização ocorreu logo após ter sido atingida a actividade máxima da enzima e durante as fases seguintes da deposição mineral os níveis de fosfatase alcalina baixaram significativamente. É de salientar que a redução significativa dos valores referentes à proliferação celular e à actividade da fosfatase alcalina nas culturas efectuadas na presença (contínua ou descontínua) de Dex está provavelmente relacionada com a mineralização mais precoce e mais pronunciada observada nestas culturas, relativamente às culturas controlo (AA +  $\beta$ -GF); durante o processo de mineralização, os osteoblastos vão ficando aprisionados na matriz e tornam-se osteócitos que não proliferam nem expressam fosfatase alcalina.

A exposição contínua das células à Dex resultou na indução da expressão osteoblástica, tal como é demonstrado pelo aumento significativo da actividade da fosfatase alcalina e pela antecipação e maior intensidade da mineralização. A presença de Dex nas culturas celulares de medula óssea humana durante diferentes fases do período de incubação resultou sempre num aumento da proliferação celular e da actividade da fosfatase alcalina, sugerindo que este glucocorticóide influencia as células da linhagem osteoblástica em diferentes estados de diferenciação. Contudo, o tratamento com esta hormona produziu efeitos diferentes dependendo da fase de cultura em que foi adicionada. O efeito da Dex na proliferação celular e actividade da fosfatase alcalina foi especialmente evidente nas culturas tratadas com o glucocorticóide durante a 1ª e a 2ª semanas. As células osteoblásticas de medula

óssea humana cultivadas com Dex durante a 3<sup>a</sup> semana apresentaram um aumento da proliferação celular e da expressão da fosfatase alcalina apenas durante o período de exposição.

Estas observações sugerem que a acção da dexametasona no crescimento celular e actividade funcional das células osteoblásticas provenientes de medula óssea humana depende do estado de diferenciação em que se encontram estas células. Nestas culturas, a indução da expressão osteoblástica pela Dex parece resultar do efeito deste composto nas células existentes em estados iniciais de diferenciação. Assim, em culturas celulares de medula óssea humana, a Dex estimula a proliferação e a diferenciação de células osteoprogenitoras e também de osteoblastos presentes num estado de diferenciação menos adiantado. O menor efeito da hormona quando está presente nas fases mais tardias do período de cultura (3<sup>a</sup> semana) é de esperar, uma vez que nestas fases as células já estão altamente diferenciadas, relativamente aos parâmetros osteoblásticos avaliados. Os dados obtidos neste trabalho também sugerem que a maximização do efeito estimulatório da dexametasona requer uma exposição contínua das células à hormona, visto que foi nestas condições que a expressão do fenótipo osteoblástico foi maior.

Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com estudos anteriores que mostram que o tratamento a longo prazo de culturas celulares de medula óssea de rato ou humana com concentrações baixas de dexametasona promove a diferenciação das células osteoblásticas<sup>117,120,171,222</sup> e com outros que descrevem que o tratamento precoce de culturas osteoblásticas com este glucocorticóide induz a diferenciação e formação óssea<sup>119</sup>.

## **2.2 – EFEITO DA HORMONA DA PARATIRÓIDE**

A hormona da paratiróide (PTH) é produzida pelas glândulas paratiroideas. Esta hormona, que é secretada em resposta a uma redução da concentração plasmática do cálcio, regula os níveis deste ião no fluido extracelular por interferência nos mecanismos de controlo da sua absorção intestinal, excreção renal e mobilização a partir do tecido ósseo<sup>20</sup>.

O efeito da PTH no tecido ósseo parece envolver dois mecanismos:



→ o efeito imediato é o da activação dos osteoblastos e osteócitos através da ligação da hormona a receptores específicos existentes nestas células. Esta activação resulta na transferência de cálcio do fluido ósseo para as células ósseas e depois, para o lado oposto, o fluido extracelular<sup>20</sup>. Este processo é acompanhado por uma remoção rápida de sais de fosfato de cálcio a partir dos depósitos amorfos que se situam junto destas células para que se verifique o restabelecimento dos níveis de cálcio no fluido ósseo<sup>20</sup>.

→ o segundo efeito, mais lento, consiste na estimulação, ainda que indirecta, da actividade osteoclástica e consequente reabsorção do tecido ósseo mineralizado<sup>226</sup>. Neste processo há libertação dos iões cálcio e fosfato por dissolução da matriz mineralizada e transferência para o fluido extracelular. A PTH inicialmente aumenta a área da membrana de reabsorção dos osteoclastos, seguindo-se a estimulação do tamanho e número destas células e a activação da colagenase e enzimas lisossómicas que são responsáveis pela hidrólise da matriz<sup>227</sup>. Induz também um aumento da actividade das enzimas fosfatase ácida e anidrase carbónica e da acumulação dos ácidos láctico e cítrico. A consequente redução do pH contribui para o processo de reabsorção.

A PTH tem efeitos directos nas células da linhagem osteoblástica, regulando vários aspectos do metabolismo celular, transporte membranar de iões ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{H}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{PO}_4$ ) e nutrientes (glucose e aminoácidos), organização do citoesqueleto e morfologia celular, síntese e secreção de proteínas da matriz (colagénio tipo I, osteonectina, osteopontina, osteocalcina), actividade de enzimas (fosfatase alcalina, colagenase, activador do plasminogénio) e libertação de factores de crescimento com efeitos autocrínicos e/ou paracrínicos (IGF-I, IGF-II, TGF- $\beta$ , IL-6, PGE<sub>2</sub>...) <sup>227</sup>. As respostas dos osteoblastos à PTH são mediados por um aumento da actividade da adenil ciclase e do AMP<sub>c</sub> intracelular e, também, pela activação da proteína quinase e incluem a inibição da síntese de colagénio e a alteração da actividade da fosfatase alcalina<sup>228</sup>.

A PTH actua provavelmente a vários níveis da linhagem osteoclástica: parece actuar directamente sobre os precursores dos osteoclastos existentes na medula óssea (células mononucleares), promovendo a formação de novas células gigantes multinucleadas. No entanto, os osteoclastos mais diferenciados não apresentam receptores específicos para a PTH e por isso, o seu efeito nestas células é mediado pelos osteoblastos<sup>15</sup>, observando-se um aumento do número de osteoclastos e activação da membrana de reabsorção<sup>227</sup>.

*In vivo*, as células ósseas nunca estão expostas apenas à PTH. Estão sempre presentes outros factores locais e/ou sistémicos que interactivam com a PTH nas células alvo. Os estudos *in vitro* mostraram que os efeitos da PTH na reabsorção óssea podem ser modulados por outros factores, tal como a 1,25 – dihidroxivitamina D<sub>3</sub>, a IL-1 e o TGF- $\beta$  que actuam sinergeticamente com a PTH, intensificando a sua acção, ou como a calcitonina, o cortisol e o fosfato que, em concentrações elevadas, inibem os efeitos da PTH<sup>227</sup>.

Os efeitos causados pela PTH diferem consoante o tipo de administração. Quando administrada continuamente, a PTH aumenta a reabsorção osteoclástica e suprime a formação óssea por inibição da diferenciação osteoblástica e da síntese de colagénio. Contudo, quando administrada em pequenas doses intermitentes, os seus principais efeitos consistem na estimulação da formação óssea<sup>227,229,230</sup>. Esta estimulação deve-se essencialmente ao aumento do número de osteoblastos por activação e diferenciação das células de revestimento em osteoblastos e não através da estimulação da proliferação das células osteoprogenitoras<sup>230</sup>.

Os trabalhos que procuraram investigar o mecanismo de acção da PTH na proliferação e na diferenciação dos osteoblastos obtiveram muitas vezes resultados inconsistentes. Por exemplo, a PTH estimula a proliferação de células osteoblásticas isoladas a partir de osso trabecular humano<sup>231</sup>, mas inibe o crescimento da linha celular de rato UMR-106<sup>232</sup>. Esta hormona reprime a actividade da fosfatase alcalina na linha osteoblástica de rato ROS-17/2.8<sup>233</sup>, mas tem um efeito estimulatório na linha celular de ratinho MC3T3-E1<sup>234</sup>. Para além disso, vários grupos já demonstraram que a PTH exerce efeitos diferentes na diferenciação osteoblástica, dependendo da fonte celular utilizada<sup>18</sup> e do estado de diferenciação destas células<sup>230</sup>. Estas observações indicam que a acção da PTH nos osteoblastos varia com o tipo celular e com as condições experimentais utilizadas.

Normalmente 70 a 95% da PTH circulante está presente sob a forma inactiva, nomeadamente, fragmentos terminais – C; a PTH intacta (1-84) constitui apenas 5 a 30% da forma circulante da molécula. O fragmento terminal (N) – amino da PTH (1-34) possui uma actividade biológica comparável à PTH (1-84) e parece ser sintetizado durante a proteólise hepática da molécula intacta<sup>235</sup>.



Assim, neste trabalho, foi avaliado o efeito do fragmento 1-34 da hormona da paratiróide no comportamento de proliferação e de diferenciação osteoblástica de culturas de células de medula óssea humana, estando a hormona presente de forma contínua ou em diferentes estados de diferenciação das células.

## 2.2.1 – Material e Métodos

### *CULTURAS CELULARES*

As células de medula óssea humana foram cultivadas em condições experimentais idênticas às descritas no capítulo II (secção 2.1). Após a tripsinização da cultura primária, as células foram cultivadas ( $10^4$  células.cm<sup>-2</sup>) por um período de 35 dias, na presença de ácido ascórbico e de  $\beta$ -glicerofosfato, nas concentrações já referidas na secção 2.1 do capítulo II, em condições controlo (ausência da PTH – fragmento 1-34) e na presença da hormona numa concentração de 10 nmol.L<sup>-1</sup>. Foi preparada uma solução mais concentrada desta hormona em etanol e a sua concentração final no meio de cultura foi de 1%. As células foram expostas à PTH em duas situações experimentais:

1. de modo contínuo, durante os 35 dias do tempo de cultura;
2. em fases seleccionadas do período de incubação.

Assim, foram testadas cinco situações: (i) ausência da PTH (situação controlo, AA +  $\beta$ -GF); (ii) acção contínua da PTH; (iii) exposição à PTH durante a 1ª semana de cultura; (iv) exposição à PTH durante a 2ª semana de cultura; (v) exposição à PTH durante a 3ª semana de cultura.

### *CARACTERIZAÇÃO DAS CULTURAS CELULARES*

As culturas celulares foram caracterizadas relativamente à viabilidade/proliferação celular (ensaio do MTT), conteúdo total de proteína, actividade da fosfatase alcalina e capacidade de formação de depósitos minerais, de acordo com a metodologia descrita no capítulo II (secção 2.1). As culturas foram caracterizadas nos dias 3, 7, 14, 21, 28 e 35.

Neste estudo efectuou-se também a determinação das concentrações de fósforo e cálcio ionizados no meio de cultura durante todo o tempo de incubação, utilizando os métodos descritos na secção 2.1.1 do capítulo III.

## 2.2.2 – Resultados

### ***Proliferação/viabilidade celular***

Após uma fase estacionária de aproximadamente 6-7 dias (durante a qual o crescimento celular foi lento devido à adaptação das células às condições de cultura), as células de medula óssea humana cultivadas nas diferentes situações experimentais entraram num período de proliferação activa e no início da 4ª semana (após se atingir o valor máximo de proliferação) observou-se uma redução do crescimento celular, provavelmente causada pela acumulação e maturação da matriz formada (Fig. 23A).

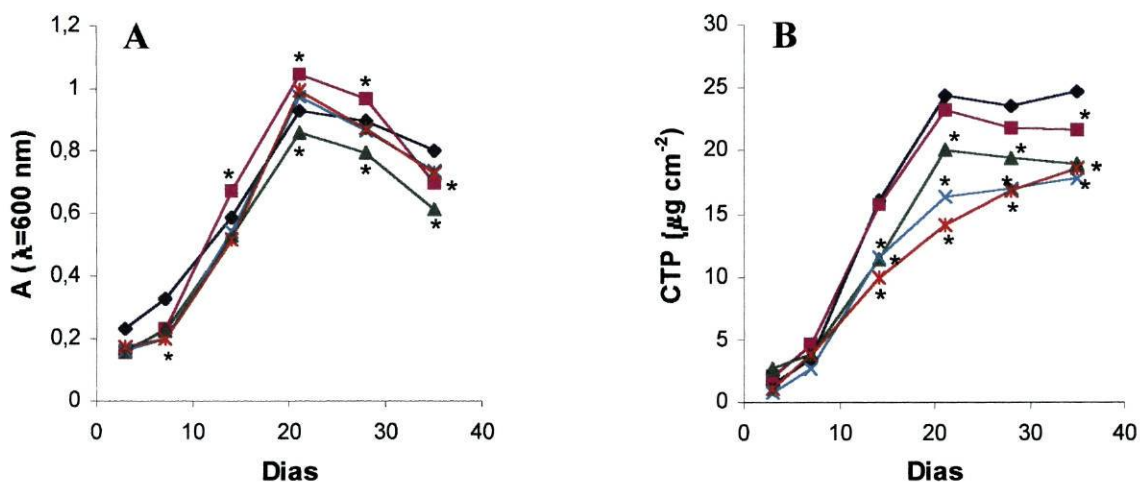
As células cultivadas em condições controlo (AA +  $\beta$ -GF) proliferaram gradualmente ao longo do tempo de incubação e o valor máximo de redução do MTT foi observado ao dia 21, seguindo-se uma redução do crescimento celular (Fig. 23A). As células expostas à acção contínua da PTH apresentaram um padrão de proliferação semelhante ao das culturas controlo, embora os valores observados fossem ligeiramente superiores nos dias 14 e 21 (no dia 21 os valores foram  $0,931 \pm 0,09$  e  $1,044 \pm 0,12$ , respectivamente para as culturas controlo e as culturas expostas continuamente à PTH) (Fig. 23A). As células cultivadas na presença da PTH durante a 1ª semana (fase “lag” do crescimento celular) apresentaram valores de proliferação inferiores aos obtidos nas culturas controlo, ao longo de todo o período de incubação (Fig. 23A). As culturas expostas à PTH durante a 2ª e 3ª semanas de incubação (fase exponencial do crescimento celular) apresentaram um padrão de proliferação idêntico ao da situação controlo, mas os valores máximos atingidos foram ligeiramente superiores, embora a diferença não fosse estatisticamente significativa (Fig. 23A).

### ***Conteúdo total de proteína***

Os resultados referentes ao conteúdo total de proteína estão apresentados da Fig. 23B. Nas culturas que cresceram em situação controlo, os valores de proteína total aumentaram ao longo do tempo de incubação de modo semelhante à proliferação celular, mantendo-se aproximadamente constantes a partir do dia 21 (Fig. 23B). As culturas expostas à PTH de forma contínua apresentaram um padrão de variação do conteúdo total de proteína idêntico ao das culturas controlo, embora os valores atingidos fossem ligeiramente mais baixos a partir do dia 21 (Fig. 23B). A presença da PTH durante a 1ª semana de cultura resultou



numa diminuição do conteúdo total proteico das culturas osteoblásticas; este efeito foi quantitativamente mais significativo do que o observado no ensaio do MTT no dia 21 e comparativamente com a situação controlo, observou-se uma redução de 12 % e 5 % para a proteína total e para a redução do MTT, respectivamente (Fig. 23B). Os resultados obtidos também mostraram que ocorreram variações no conteúdo total de proteína nas culturas expostas à acção da PTH durante a 2ª e 3ª semanas. Nestas situações, os valores de proteína total foram muito inferiores aos valores observados na situação controlo (Fig. 23B). as culturas expostas continuamente à PTH e as tratadas durante a 1ª semana apresentaram tendência para uma descida dos níveis de proteína após o dia 21, enquanto que nas tratadas durante a 2ª e 3ª semanas se observou um aumento dos valores de proteína até ao fim do tempo de incubação, especialmente nas culturas expostas à hormona durante a 3ª semana.



**Figura 23 – Proliferação/viabilidade celular (ensaio do MTT, A) e conteúdo total de proteína (B) de culturas de medula óssea humana mantidas nas seguintes condições experimentais: situação controlo (culturas efectuadas na presença de AA + β-GF) (◆), presença contínua de PTH (■), presença de PTH durante a primeira (▲), segunda (×) ou terceira (\*) semana de incubação.**

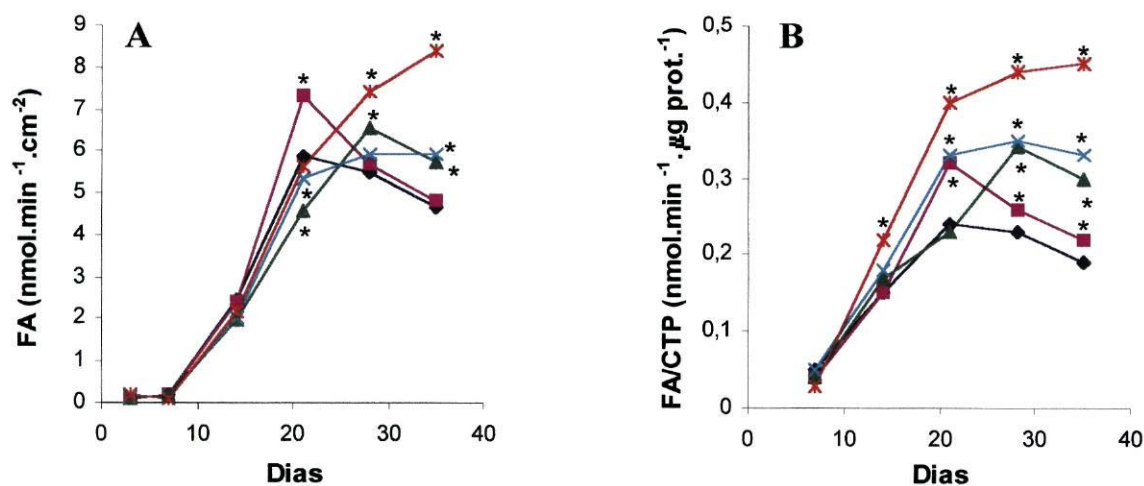
\*Significativamente diferente das culturas que cresceram em situação controlo. Os desvios padrão observados foram < 20 %.

Embora estes dois parâmetros (ensaio do MTT e conteúdo total de proteína) avaliem a proliferação celular, a informação fornecida por ambos é diferente. A proteína que foi medida nestas culturas inclui a proteína intra e extracelular e esta última contribui significativamente para o conteúdo total proteico existente nas culturas de células ósseas.

Assim, e uma vez que os valores obtidos no ensaio do MTT dizem respeito à viabilidade celular, parâmetro que se pode relacionar com a proteína intracelular, os valores mais baixos de proteína total observados nas culturas tratadas com PTH durante a 2ª e 3ª semanas provavelmente reflectem uma redução ou inibição da síntese de proteínas extracelulares, nomeadamente as que compõem a matriz óssea.

### Actividade da fosfatase alcalina

Os resultados referentes à actividade da fosfatase alcalina, determinada nas várias situações, estão apresentados nas figuras 24A e B, expressos, respectivamente, em  $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  e em  $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{g prot.}^{-1}$  (que fornece informação relativa ao conteúdo de fosfatase alcalina por célula); neste último caso, os valores são apresentados apenas a partir do dia 7, visto que em todas as situações testadas, os níveis da enzima foram muito baixos durante a 1ª semana de cultura.



**Figura 24** – Actividade da fosfatase alcalina expressa por unidade de área (A) e por micrograma de proteína (B) de culturas de medula óssea humana mantidas nas seguintes condições experimentais: situação controlo (culturas efectuadas na presença de AA +  $\beta$ -GF) (◆), presença contínua de PTH ao longo do período de incubação (■), presença de PTH durante a primeira (▲), segunda (×) ou terceira (\*) semana de incubação.

\*Significativamente diferente das culturas que cresceram em situação controlo. Os desvios padrão observados foram < 20 %.



Os resultados mostraram que nas culturas controlo (AA +  $\beta$ -GF) a enzima foi detectável por volta do dia 7 e que a sua actividade aumentou com o tempo de cultura, atingiu o valor máximo após 21 dias de incubação, observando-se posteriormente uma redução lenta dos seus níveis. O aumento significativo dos níveis da enzima durante a 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> semanas de incubação sugere uma evolução para um estado de diferenciação mais adiantado. A exposição contínua das células de medula óssea humana à PTH resultou num aumento dos níveis de fosfatase alcalina, comparativamente com a situação controlo, respectivamente,  $0,32 \pm 0,009$  e  $0,24 \pm 0,01$ , no dia 21 (Fig. 24B). Após se ter atingido o valor máximo de actividade ao dia 21, os níveis da enzima diminuíram significativamente. As células cultivadas na presença da PTH durante a 1<sup>a</sup> semana do período de incubação apresentaram uma actividade da fosfatase alcalina semelhante à observada nas culturas controlo, até aproximadamente ao dia 21; contudo, o valor máximo foi superior e atingido mais tarde (dia 28), verificando-se uma redução significativa da actividade da enzima até ao fim do tempo de cultura. A presença da PTH durante a 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> semanas (fases caracterizadas pelo aumento exponencial da actividade da fosfatase alcalina nas culturas controlo) resultou numa estimulação contínua dos níveis da enzima, sem que fosse atingido qualquer valor máximo seguido de decréscimo da actividade do marcador osteoblástico.

### ***Formação de depósitos de fosfato de cálcio***

A formação de depósitos de fosfato de cálcio nas culturas celulares mantidas nas diversas condições experimentais foi avaliada através de ensaios histoquímicos (Tabela VI), dos níveis de fósforo e cálcio ionizados no meio de cultura (Fig. 25) e da observação destas culturas por MEV (Fig. 26).

Nas culturas celulares que cresceram em situação controlo (AA +  $\beta$ -GF) o processo de mineralização ocorreu durante a 5<sup>a</sup> semana de incubação, tal como é demonstrado pelas reacções histoquímicas positivas para a detecção de depósitos de fosfato de cálcio no dia 28 (Tabela VI) e também pelo consumo significativo de fósforo e cálcio ionizados do meio de cultura durante esta fase (Fig. 25). A concentração de fósforo ionizado aumentou significativamente até ao dia 20, enquanto que os níveis de cálcio ionizado não sofreram grandes variações durante este período; a partir do dia 20 e até ao fim do período de incubação as concentrações das duas espécies iónicas diminuíram significativamente.

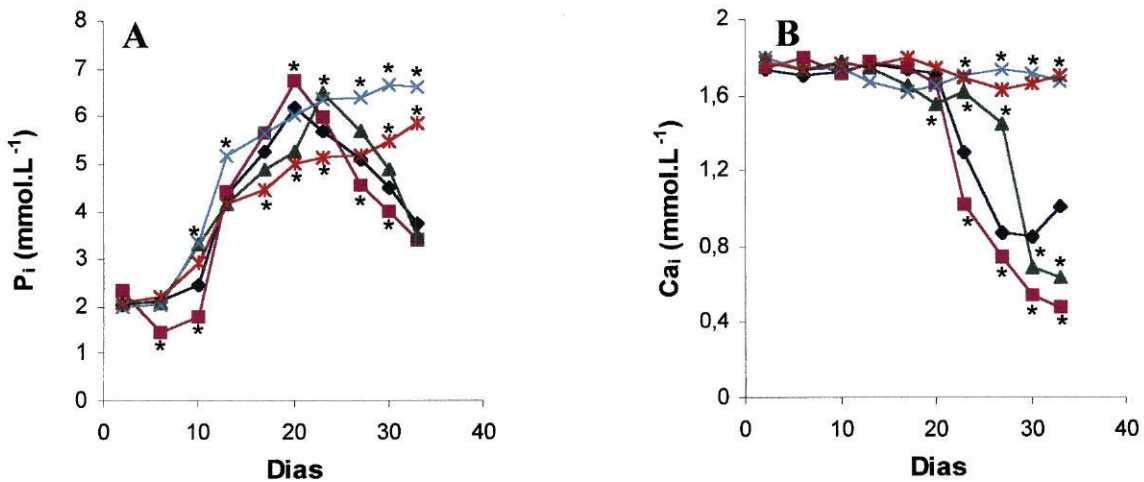
**Tabela VI** – Reacção histoquímica para a detecção de depósitos de fosfato de cálcio (método de von Kossa) nos dias 21, 28 e 35, em culturas de células osteoblásticas de medula óssea humana mantidas nas seguintes condições experimentais: situação controlo (culturas efectuadas na presença de AA +  $\beta$ -GF), presença contínua de PTH, presença de PTH durante a primeira, segunda ou terceira semana de incubação.

	21 dias	28 dias	35 dias
<b>Controlo</b>	-	+/-	+
<b>PTH contínuo</b>	+/-	+	++
<b>PTH 1ª semana</b>	-	+	++
<b>PTH 2ª semana</b>	-	-	-
<b>PTH 3ª semana</b>	-	-	-

A intensidade da coloração é definida do seguinte modo: -, coloração negativa; +, coloração positiva de fraca intensidade; ++, coloração positiva de média intensidade; +++, coloração positiva de elevada intensidade.

As culturas mantidas na presença contínua de PTH apresentaram um padrão de variação dos níveis de fósforo e cálcio ionizados no meio de cultura semelhante ao observado nas culturas controlo (Fig. 25), embora se observasse uma descida mais abrupta dos níveis destas espécies a partir do dia 20. Estas culturas apresentaram uma reacção de von Kossa positiva no dia 21, sugerindo que a formação de áreas mineralizadas ocorreu a partir da 3ª semana (Tabela VI). Relativamente às culturas controlo, nas culturas expostas à PTH durante a 1ª semana, os níveis de fósforo ionizado aumentaram até mais tarde (cerca de 2 a 3 dias) e os níveis de fósforo e cálcio começaram a baixar apenas a partir do dia 23 (Fig. 25); estes resultados estão em concordância com os observados nos ensaios histoquímicos, que mostraram que ocorreu alguma mineralização durante a quarta semana (Tabela VI). Nas culturas expostas à hormona durante a 2ª e 3ª semanas de cultura, não houve mineralização, tal como se pode verificar pelas reacções histoquímicas negativas (Tabela VI) e pelos valores de fósforo e cálcio ionizados no meio que não apresentaram qualquer redução (Fig. 25).

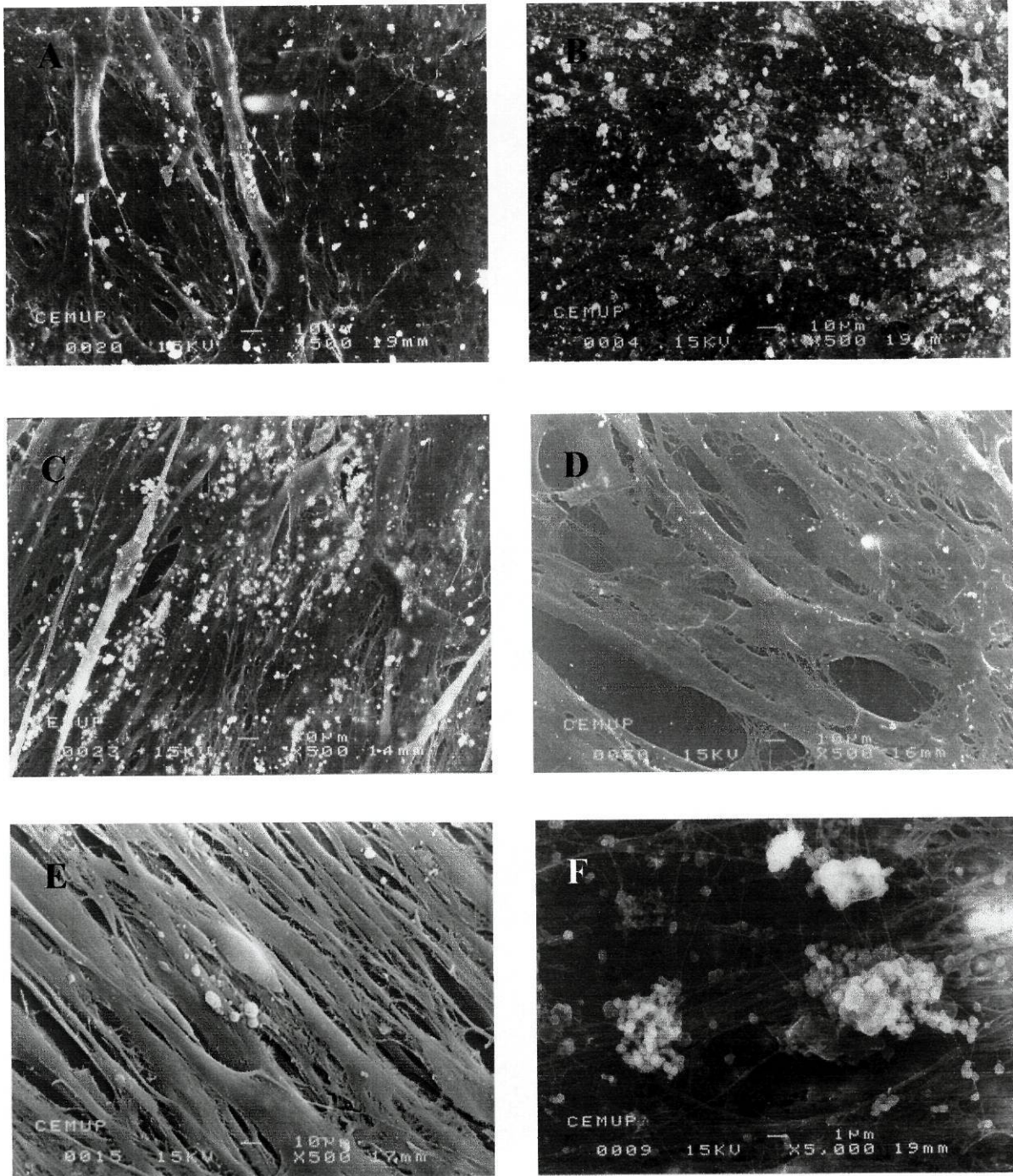




**Figura 25** – Níveis de fósforo (A) e cálcio (B) ionizados no meio de cultura recolhido de culturas de medula óssea humana mantidas nas seguintes condições experimentais: situação controlo (culturas efectuadas na presença de AA + β-GF) (◆), presença contínua de PTH (■), presença de PTH durante a primeira (▲), segunda (×) ou terceira (\*) semana de incubação.

\*Significativamente diferente das culturas que cresceram em situação controlo. Os desvios padrão observados foram < 20 %.

A observação por MEV mostrou que as culturas que cresceram nas várias condições experimentais apresentaram, no dia 21, uma estrutura formada por células e uma matriz extracelular fibrilar com um aspecto contínuo, sem qualquer evidência de depósitos minerais. No entanto, no dia 28, as culturas expostas continuamente à PTH apresentaram numerosas estruturas globulares minerais na rede de fibras. Nas restantes culturas celulares, não se observou qualquer formação de depósitos de fosfato de cálcio, excepto nas culturas expostas à hormona durante a 1ª semana, em que se verificou a existência de poucos depósitos ao dia 35 (Fig. 26).



**Figura 26** – Fotografias de microscopia electrónica de varrimento de culturas de células osteoblásticas de medula óssea humana com 35 dias, mantidas em situação controlo (culturas efectuadas na presença de AA +  $\beta$ -GF) (A), na presença de PTH de modo contínuo (B), na presença de PTH durante a primeira (C), segunda (D) ou terceira (E) semana de incubação. F – ampliação de B.



### 2.2.3 – Discussão

Existem vários estudos<sup>228-230,236-241</sup> que mostram que a hormona da paratiróide pode regular quer negativa, quer positivamente a expressão de marcadores do fenótipo osteoblástico tal como a fosfatase alcalina, colagénio tipo I, osteopontina e osteocalcina, dependendo da fonte de osteoblastos em cultura (linhas celulares, medula óssea, osso alveolar...) e da duração do tratamento hormonal. As diferenças existentes nestes resultados podem estar relacionadas com o facto da acção inibitória da PTH ter sido demonstrada em experiências de curta duração, enquanto que a estimulação da actividade osteoblástica tem sido observada em ensaios mais longos. Os efeitos a curto prazo provavelmente mostram os efeitos agudos da hormona sobre a população osteoblástica, enquanto que os efeitos a longo prazo podem representar alterações na composição e tamanho da população de células pertencentes à linhagem osteoblástica.

Os resultados descritos neste trabalho sugerem que a presença da hormona da paratiróide, na concentração utilizada ( $10 \text{ nmol.L}^{-1}$ ) e em qualquer fase de diferenciação osteoblástica interfere com o comportamento de proliferação e diferenciação das culturas de células de medula óssea humana nas condições experimentais testadas. O efeito mais significativo foi um evidente aumento da actividade da fosfatase alcalina nas culturas expostas continuamente à acção da PTH e nas culturas expostas à hormona durante a 1ª semana. Estas culturas apresentaram capacidade de formação de uma matriz extracelular mineralizada e, relativamente às culturas controlo, as culturas expostas continuamente à PTH mostraram uma mineralização mais precoce enquanto que nas culturas tratadas apenas durante a 1ª semana a mineralização foi mais tardia. Nas culturas celulares expostas à PTH durante a 2ª e 3ª semanas do período de incubação os níveis de fosfatase alcalina aumentaram continuamente durante o tempo de incubação e não se observou formação de depósitos de fosfato de cálcio. Estes resultados (ausência de redução dos níveis de fosfatase alcalina e de mineralização) devem-se provavelmente ao facto da matriz extracelular não estar adequada qualitativa ou quantitativamente para que ocorra deposição de fosfato de cálcio, observação que parece ser sugerida pela redução da síntese de proteínas extracelulares observada nestas duas situações. Como consequência, o número de osteoblastos a ficarem presos na matriz é pequeno, continuando a observar-se proliferação celular e produção de fosfatase alcalina. Assim, nestas culturas, não há um sinal para que a

enzima deixe de ser sintetizada, uma vez que o gene responsável pela síntese da fosfatase alcalina só é inibido quando os osteoblastos ficam embebidos na matriz<sup>17,118,122,175</sup> e consequentemente não há um processo de sinalização para que a mineralização se inicie.

Estes resultados sugerem que a PTH está intimamente ligada à diferenciação osteoblástica, inibindo a diferenciação das células osteoblásticas mais maduras, e favorecendo as que se encontram num estado imaturo (fase proliferativa), isto é a acção anabólica da hormona pode ser explicada em parte pela estimulação da proliferação<sup>240</sup> e da diferenciação das células osteoprogenitoras. Nakatani e col.<sup>242</sup> demonstraram o efeito estimulatório directo da hormona na diferenciação de células osteoblásticas da linha celular MC3T3-E1 e sugeriram que esta estimulação é feita via produção intracelular de AMP<sub>c</sub>. O efeito estimulatório da PTH nas células osteoblásticas parece ocorrer indirectamente, uma vez que vários estudos *in vitro* têm demonstrado que a hormona possui um efeito de desdiferenciação, isto é a PTH provoca uma redução da actividade da fosfatase alcalina e da síntese de colagénio tanto em culturas de tecidos, como em culturas de células ósseas isoladas<sup>18</sup>. No entanto, os efeitos anabólicos da PTH sobre o osso têm sido explicados pela estimulação da proliferação celular (aumento do número de células) causada pela hormona, ou seja, o peptídeo diminui a actividade da fosfatase alcalina nas células osteoblásticas individuais, enquanto que a actividade total da enzima aumenta<sup>242</sup>. A variação na resposta da fosfatase alcalina à exposição da PTH reflecte a importância da definição do estado de diferenciação em que se encontram as células osteoblásticas em estudo. É possível que seja o balanço entre os vários estados de diferenciação existentes na população celular que determina a resposta da fosfatase alcalina à PTH.

A concentração da PTH aqui utilizada, 10 nmol.L<sup>-1</sup>, é claramente superior às concentrações da hormona a que as células ósseas estão expostas *in vivo* (1-5 pmol.L<sup>-1</sup>)<sup>243</sup>. Contudo, a PTH é uma molécula que tem uma capacidade de aderência elevada a várias superfícies e componentes do soro, podendo verificar-se que nos sistemas *in vitro* a concentração a que estão expostos os osteoblastos é inferior à adicionada inicialmente à cultura<sup>243</sup>. De qualquer modo, a concentração de PTH utilizada na grande maioria dos estudos que envolvem culturas de células é de 10 nmol.L<sup>-1</sup>.

Os resultados observados ao longo do trabalho sugerem que neste sistema, isto é em culturas de medula óssea humana mantidas nas condições experimentais descritas, o efeito



da hormona da paratiróide no comportamento das células osteoblásticas é mais significativo quando a PTH é administrada de forma contínua ao longo do período de cultura.

### 2.3 – EFEITO DA HORMONA DO CRESCIMENTO

Como já foi referido, o crescimento e a regeneração normais do esqueleto dependem de níveis adequados de vitaminas, minerais, hormonas e da interacção complexa de numerosos factores de crescimento que condicionam o comportamento das células osteoblásticas. Um dos mais importantes destes factores que promove o desenvolvimento do tecido ósseo é a hormona do crescimento. Embora os factores osteotrópicos, tal como a insulina e as hormonas da tiróide, influenciem o crescimento ósseo, a hormona do crescimento é a única hormona reconhecida por estimular o crescimento longitudinal ósseo sendo o seu efeito dependente da concentração<sup>244</sup>.

A hormona do crescimento é um polipeptídeo produzido e armazenado nas células acidófilas do lobo anterior da glândula pituitária ou hipófise que possui uma acção anabólica geral. Esta hormona exerce uma variedade de efeitos fisiológicos em vários tecidos do organismo, tal como a estimulação do crescimento, regulação do sistema imunitário e do metabolismo dos hidratos de carbono e na lactação<sup>245</sup>. Estão descritos dois mecanismos responsáveis pela acção da hormona do crescimento:

- 1) o efeito promotor do crescimento não se deve a uma interacção directa com as células alvo, mas é mediado pela libertação de somatomedinas (IGFs)<sup>246,247</sup>;
- 2) a hormona do crescimento também exerce uma acção directa nas células através da sua interacção com receptores transmembranares locais<sup>248</sup>.

Morel<sup>244</sup> demonstrou que a presença de receptores para a hormona do crescimento nos osteoblastos corrobora o efeito endócrino directo da hormona sobre estas células. A hormona do crescimento liga-se inicialmente a nível da membrana plasmática dos osteoblastos e é depois interiorizada no núcleo, onde se tornam possíveis a expressão génica e a libertação das somatomedinas.

As somatomedinas ou IGFs são peptídeos que possuem uma estrutura semelhante à da insulina e por isso são denominadas “insulin growth factors”. São produzidas por vários

tecidos em resposta à hormona do crescimento, mas são principalmente sintetizadas pelo fígado, existindo também no microambiente ósseo, produzidas pelas células locais. As somatomedinas actuam como hormonas circulantes e os seus efeitos a nível do tecido ósseo incluem:

- aumento da deposição de proteínas pelos condrócitos e células osteogénicas responsáveis pelo crescimento ósseo;
- aumento da proliferação celular destes dois tipos de células;
- conversão de condrócitos em células osteogénicas, causando deposição do tecido ósseo.

Vários autores<sup>244,246,249,250</sup> demonstraram que a hormona do crescimento exerce um efeito mitogénico sobre as células osteoblásticas em cultura mediado pela acção autocrínica ou paracrínica da somatomedina IGF-I<sup>247,251</sup>. Schmid e col.<sup>252</sup> mostraram que este factor de crescimento é capaz de favorecer a diferenciação de células osteoblásticas *in vitro* e aumentar a actividade da fosfatase alcalina. Noutro estudo, foi descrito que as acções estimulatórias da hormona do crescimento eram inibidas na presença de anticorpos IGF-I. Estes resultados sugerem que é necessária a presença da forma biologicamente activa de IGF-I para que a hormona do crescimento exerça a sua acção na proliferação dos osteoblastos.

A hormona do crescimento é normalmente vista como um dos principais factores que afectam o metabolismo ósseo, pois além de regular a reabsorção osteoclástica<sup>253</sup>, promove um aumento da síntese de proteínas (colagénio e outras proteínas da matriz extracelular), de ADN e ARN e um aumento do número de células e do tamanho celular<sup>254-256</sup>. A hormona do crescimento possui um efeito directo na proliferação celular e estimula a produção de IGF-1 que, por sua vez, pode exercer um efeito estimulatório na proliferação e diferenciação das células ósseas<sup>257</sup>.

Embora já tenha sido demonstrado que a hormona do crescimento influencia as células osteoblásticas *in vitro*<sup>244,246,247,249-251,253-255</sup>, ainda não foi determinado se este efeito se deve a um aumento do número de precursores osteoblásticos que proliferam, ou a um aumento do número de pré-osteoblastos que se diferenciam, resultando deste modo num aumento da síntese e secreção de proteínas da matriz extracelular.



Isaksson e col.<sup>258</sup> mostraram que uma pequena dose desta hormona injectada directamente na placa de cartilagem da tíbia estimulava o crescimento da epífise, enquanto que uma dose sistémica idêntica não exercia qualquer efeito. Além disso, existem vários estudos relativos ao efeito da hormona do crescimento sobre células osteoblásticas que adicionaram a hormona de modo descontínuo<sup>255,259</sup>. Assim, no trabalho que aqui se descreve, foi estudado o comportamento das células de medula óssea humana expostas à hormona do crescimento por períodos de 24 horas ao longo do tempo de incubação.

### 2.3.1 – Material e Métodos

As culturas celulares osteoblásticas são muitas vezes efectuadas num meio relativamente pobre em nutrientes, por exemplo  $\alpha$ -MEM ou DMEM, que normalmente é suplementado com soro bovino fetal. A adição de soro é necessária pois constitui uma fonte de nutrientes essenciais e co-factores, tais como vitaminas e alguns aminoácidos e fornece igualmente hormonas e factores de crescimento. Nas situações em que se pretende estudar o efeito de factores de crescimento e de determinadas hormonas no comportamento das células osteoblásticas, a presença de soro bovino fetal pode constituir uma fonte de interferências devido à possibilidade de interacções dos vários factores e hormonas presentes no soro e a hormona que se pretende estudar. Deste modo, e no que diz respeito à hormona do crescimento, muitos dos estudos descritos na literatura avaliam o efeito da hormona em células mantidas na ausência de soro<sup>244,249,250,255,259</sup> embora também estejam descritos estudos que analisam o efeito da hormona em células cultivadas na presença de soro<sup>251</sup>. De referir, também, que há vários estudos que sugerem que a administração intermitente de hormona do crescimento conduz a resultados mais favoráveis no que diz respeito à estimulação do crescimento ósseo do que a utilização contínua da hormona<sup>255,259</sup>. Assim, o estudo que se segue foi realizado com culturas celulares mantidas permanentemente com soro bovino fetal e com culturas celulares que cresceram temporariamente na ausência de soro, com o objectivo de avaliar o efeito da hormona do crescimento nestes dois sistemas.

#### **CULTURAS CELULARES**

As células de medula óssea humana foram cultivadas em condições experimentais idênticas às descritas no capítulo II (secção 2.1). Após a tripsinização da cultura primária, as células foram cultivadas ( $10^4$  células.cm<sup>-2</sup>) por um período de 37 dias em condições controlo

(ausência da hormona do crescimento) e na presença da hormona numa concentração de  $50 \text{ ng.ml}^{-1}$ . A escolha desta concentração baseou-se em resultados obtidos em trabalhos anteriores<sup>259</sup>.

O efeito da hormona do crescimento foi avaliado em duas situações experimentais:

- 1) as células foram cultivadas em  $\alpha$ -MEM suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) e na presença de ácido ascórbico ( $50 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$ ) e  $\beta$ -glicerofosfato ( $10 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) (situação controlo). As culturas foram expostas à hormona do crescimento por períodos de 24 horas ao longo do período de incubação, nomeadamente nos dias 3, 8, 15, 22, 29 e 36. Os resultados dos ensaios bioquímicos estão apresentados como linhas contínuas.
- 2) as células foram cultivadas em  $\alpha$ -MEM suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) e na presença de ácido ascórbico ( $50 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$ ) e  $\beta$ -glicerofosfato ( $10 \text{ mmol.L}^{-1}$ ). O efeito da hormona do crescimento foi estudado por períodos de 24 horas ao longo do período de incubação mas, neste caso, em células mantidas na ausência de soro. Para isso, 48 horas antes da adição da hormona, o meio de cultura foi substituído por um meio sem soro (e com 0,1% de albumina<sup>249,250</sup>) e, após 24 horas, a hormona foi adicionada por um período de 24 horas. Também nesta situação, a hormona do crescimento foi adicionada nos dias 3, 8, 15, 22, 29 e 36.

As culturas foram também cultivadas nas mesmas condições experimentais mas na ausência de hormona do crescimento (situação controlo), isto é, as culturas foram mantidas na ausência de soro nos mesmos períodos que as culturas tratadas. Os resultados dos ensaios bioquímicos estão apresentados como linhas descontínuas.

### ***CARACTERIZAÇÃO DAS CULTURAS CELULARES***

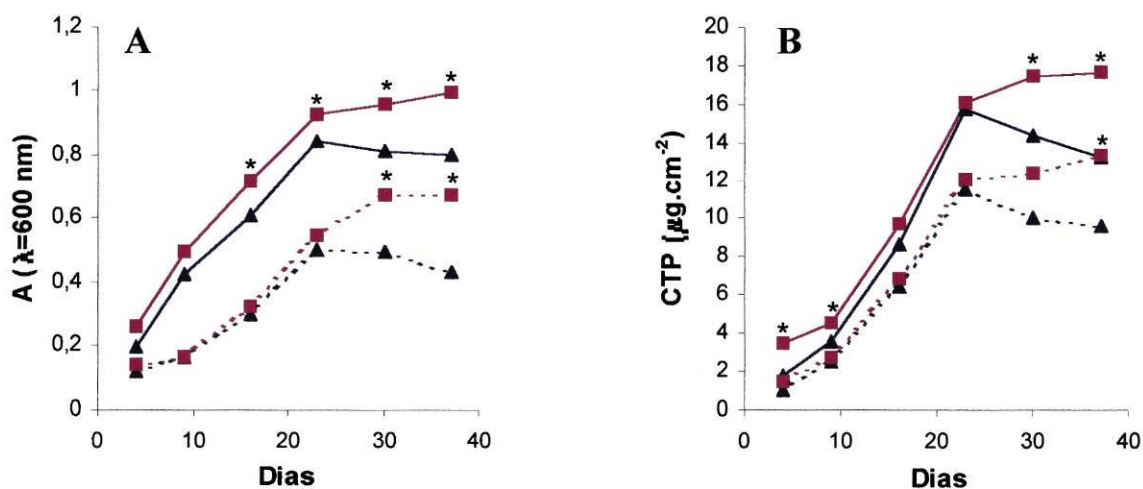
As culturas celulares foram caracterizadas relativamente à proliferação/viabilidade celular (ensaio do MTT), conteúdo total de proteína, actividade da fosfatase alcalina e capacidade de formação de depósitos minerais, de acordo com a metodologia descrita no capítulo II (secção 2.1). As culturas foram caracterizadas nos dias 4, 9, 16, 23, 30 e 37. Os meios de cultura foram analisados para avaliação da concentração de fósforo e cálcio ionizados, seguindo a metodologia descrita no capítulo III (secção 2.1.1).



## 2.3.2 – Resultados

### *Proliferação/viabilidade celular*

Os resultados relativos à proliferação/viabilidade celular das culturas que cresceram nas diferentes condições experimentais estão apresentados na figura 27A. As culturas que cresceram temporariamente na ausência de soro bovino fetal (períodos de 48 horas ao longo do tempo de incubação) apresentaram valores de crescimento celular muito baixos, comparativamente com as culturas mantidas na presença de 10% de soro ao longo de todo o período de incubação.



**Figura 27** – Efeito da hormona do crescimento na proliferação/viabilidade celular (A) e conteúdo total de proteína (B) de culturas celulares de medula óssea humana. Ausência de hormona do crescimento (▲); presença de hormona do crescimento (■).

\*Significativamente diferente das culturas que cresceram na respectiva situação controlo. Os desvios padrão observados foram < 20 %.

Nas culturas mantidas na ausência temporária de soro e sem hormona do crescimento (culturas controlo sem SBF), a proliferação celular aumentou lentamente ao longo do tempo de incubação, mantendo-se aproximadamente constante a partir da 4ª semana de cultura (Fig. 27A). As culturas que cresceram na presença de soro e sem hormona do crescimento (culturas controlo com SBF) proliferaram gradualmente ao longo do tempo de incubação, o

valor máximo de redução do MTT foi observado no dia 23, após o que se observou uma tendência para a manutenção dos valores até ao fim do período de cultura (Fig. 27A). Os valores de redução do MTT observados nestas culturas foram sempre superiores aos obtidos nas culturas controlo sem SBF.

A adição da hormona do crescimento por períodos de 24 horas ao longo do tempo de incubação e na ausência de soro resultou num aumento da proliferação celular a partir da 4ª semana de cultura (Fig. 27A). As culturas que cresceram na presença da hormona nos mesmos períodos e na presença de soro apresentaram um padrão de proliferação celular semelhante ao observado na respectiva situação controlo, embora os valores de redução do MTT fossem sempre superiores, especialmente a partir da 4ª semana de cultura (Fig. 27A).

### ***Conteúdo total de proteína***

O conteúdo total de proteína aumentou com o tempo de incubação de modo semelhante à proliferação celular (Fig. 27B).

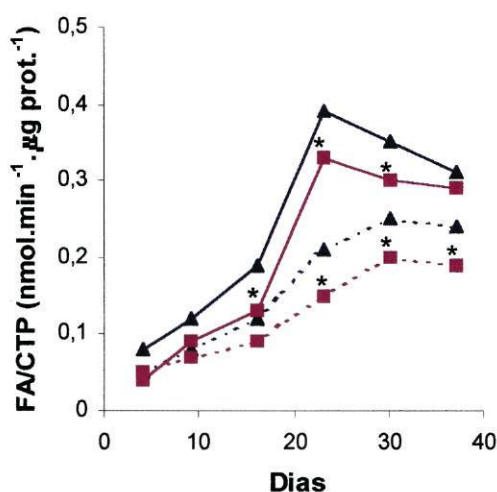
### ***Actividade da fosfatase alcalina***

Nas culturas que cresceram na presença de AA +  $\beta$ -GF + soro (culturas controlo com SBF) a actividade da fosfatase alcalina aumentou até aproximadamente ao dia 23, diminuindo a partir deste dia (Fig. 28). Os níveis da enzima nas culturas que cresceram na ausência temporária de soro e sem hormona do crescimento (culturas controlo sem SBF) aumentaram gradualmente ao longo do período de incubação (Fig. 28). A adição da hormona do crescimento resultou sempre numa diminuição da actividade da fosfatase alcalina, ao longo de todo o tempo de incubação (Fig. 28).

Os resultados apresentados na figura 28 mostraram que apenas nas culturas mantidas na presença de soro (expostas ou não à hormona do crescimento) a actividade da fosfatase alcalina diminuiu a partir da 4ª semana de incubação; na ausência de soro, a actividade da enzima aumentou ao longo de todo o tempo de incubação.

As culturas coradas para a presença da fosfatase alcalina, nos dias 23, 30 e 37, mostraram que estes resultados estão em concordância com os resultados observados na determinação bioquímica da enzima (dados não apresentados).





**Figura 28** – Efeito da hormona do crescimento na actividade da fosfatase alcalina de culturas celulares de medula óssea humana. Ausência de hormona do crescimento (▲); presença de hormona do crescimento (■).

\*Significativamente diferente das culturas que cresceram na respectiva situação controlo. Os desvios padrão observados foram < 20 %.

### ***Formação de depósitos de fosfato de cálcio***

A formação de depósitos de fosfato de cálcio nas diversas culturas foi avaliada através de ensaios histoquímicos (Tabela VII) e da determinação dos níveis de fósforo e cálcio ionizados no meio de cultura (Fig. 29). As culturas controlo que cresceram na presença de soro apresentaram uma reacção histoquímica fracamente positiva para a detecção de áreas mineralizadas no dia 30. As culturas expostas à hormona do crescimento apresentaram reacção histoquímica positiva no dia 37. As culturas mantidas na ausência de soro expostas ou não à hormona apresentaram reacções histoquímicas negativas.

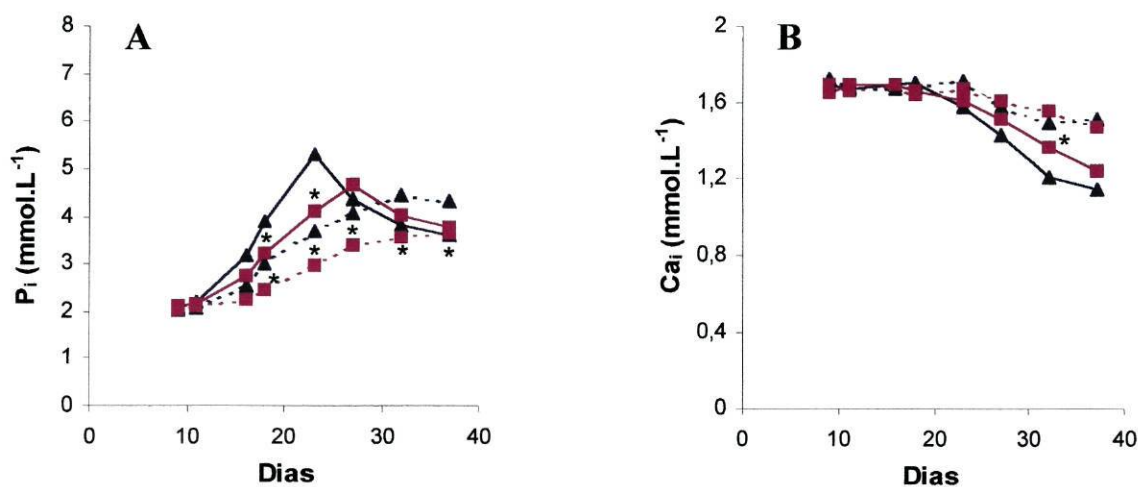
Na ausência de células, os níveis de fósforo e cálcio ionizados no meio de cultura foram semelhantes ao longo do período de incubação (resultados não apresentados). Nas culturas controlo efectuadas na presença de soro, os níveis de fósforo ionizado aumentaram gradualmente até ao dia 23, enquanto que os níveis de cálcio ionizado mantiveram-se aproximadamente constantes durante este período; as concentrações das duas espécies baixaram aproximadamente a partir do dia 23 (Fig. 29). Nas culturas expostas à hormona do crescimento na presença de soro, o padrão de variação do fósforo e cálcio ionizados foi semelhante ao observado nas respectivas culturas controlo, embora os valores máximos atingidos fossem inferiores e a redução dos níveis menos acentuada (Fig. 29). Nas culturas efectuadas na ausência de soro (expostas ou não à hormona do crescimento) os níveis de

cálcio ionizado no meio mantiveram-se relativamente constantes até ao dia 23, diminuindo ligeiramente depois, enquanto que as concentrações de fósforo ionizado aumentaram gradualmente até ao fim do tempo de incubação (Fig. 29).

**Tabela VII** – Reacção histoquímica para a detecção de depósitos de fosfato de cálcio (método de von Kossa nos dias 23, 30 e 37, em culturas de células osteoblásticas de medula óssea humana mantidas nas seguintes condições experimentais: culturas controlo com soro (A), culturas controlo sem soro (B), culturas com soro expostas à hormona do crescimento (C) e culturas sem soro expostas à hormona do crescimento (D).

	23 dias	30 dias	37 dias
<b>A</b>	-	+/-	+
<b>B</b>	-	-	-
<b>C</b>	-	-	+
<b>D</b>	-	-	-

A intensidade da coloração é definida do seguinte modo: -, coloração negativa; +, coloração positiva de fraca intensidade; ++, coloração positiva de média intensidade; +++, coloração positiva de elevada intensidade.



**Figura 29** – Níveis de fósforo (A) e cálcio (B) ionizados no meio de cultura recolhido de culturas de medula óssea humana. Ausência de hormona do crescimento (▲); presença de hormona do crescimento (■).

\*Significativamente diferente das culturas que cresceram na respectiva situação controlo. Os desvios padrão observados foram < 20 %.



### 2.3.3 – Discussão

A hormona do crescimento desempenha um papel importante no crescimento ósseo longitudinal pós-natal. Este efeito de modelação da hormona deve-se à sua capacidade para estimular as células precursoras na cartilagem epifisial. Estudos recentes sugeriram que a hormona do crescimento também participa no processo de renovação contínua do esqueleto humano adulto (remodelação)<sup>260</sup>. Esta hormona influencia o crescimento e as funções osteoblásticas *in vivo* e *in vitro*; a administração de uma pequena dose de hormona do crescimento induz uma estimulação sustentada da actividade osteoblástica<sup>261</sup>.

A concentração plasmática da hormona do crescimento diminui com a idade e é influenciada pelas hormonas sexuais, alterando-se após a menopausa. Em vários aspectos, os problemas que advêm do envelhecimento são semelhantes a um estado de deficiência da hormona do crescimento; isto verifica-se para o sistema imunitário e para a densidade óssea. Assim, tem sido postulado que a diminuição da actividade da hormona, a par de outros factores, pode constituir uma causa da osteoporose<sup>261</sup>. Consequentemente, uma terapêutica de substituição da hormona do crescimento pode ser potencialmente utilizada nos idosos de modo a manter e se possível aumentar a densidade e estrutura ósseas<sup>261</sup>.

A capacidade de resposta *in vitro* das células osteoblásticas à hormona do crescimento tem sido, até agora, predominantemente estudada em linhas celulares<sup>244</sup>, em culturas de células fetais de roedores<sup>246,247,250</sup>, de galinha<sup>249</sup> ou em osteoblastos humanos derivados de osso trabecular<sup>251,262,263</sup>, tendo sido demonstrada estimulação da proliferação e/ou da diferenciação celular. Kassem<sup>255</sup> demonstrou que a hormona do crescimento exerce diferentes efeitos nas células osteoblásticas humanas derivadas do estroma de medula óssea, dependendo das condições de cultura; a hormona aumenta a proliferação em culturas subconfluentes e estimula a diferenciação em culturas confluentes, o que sugere que os efeitos da hormona do crescimento nestas células dependem do seu estado de diferenciação.

Os dados obtidos neste trabalho parecem sugerir que os osteoblastos proliferam mais activamente em resposta ao estímulo da hormona do crescimento, uma vez que se observou um aumento da proliferação/viabilidade celular nas culturas tratadas com a hormona. Os efeitos da hormona do crescimento sobre os marcadores da diferenciação estudados neste

trabalho foram pouco significativos; observou-se uma ligeira redução da actividade da fosfatase alcalina nas últimas duas semanas de cultura e verificou-se a formação de depósitos de fosfato de cálcio apenas durante a última semana, na presença de soro.

Um padrão semelhante de respostas, isto é, estimulação da proliferação celular e redução da actividade da fosfatase alcalina pela hormona do crescimento foi observado em culturas de células osteoblásticas fetais de ratinho<sup>250</sup> e de galinha<sup>249</sup> e em culturas osteoblásticas de medula óssea humana obtida a partir de mulheres com osteoporose vertebral<sup>263</sup> e de voluntários saudáveis<sup>259</sup>. Existem outros trabalhos que também já demonstraram que esta hormona estimula a proliferação, mas não a diferenciação de células precursoras de vários tipos celulares, incluindo adipócitos<sup>264</sup> e condrócitos<sup>258</sup>. A acção pouco significativa da hormona do crescimento na diferenciação osteoblástica, nestas culturas, sugere que o papel desta hormona é de aumentar o número de células, enquanto que outros factores de crescimento ou outras hormonas são necessários para mediar a diferenciação celular. À semelhança do que acontece com outras substâncias que regulam o metabolismo ósseo e do que se observou para a dexametasona e para a hormona da paratiróide, existe uma diversidade de resultados relativos ao efeito da hormona do crescimento nas células osteoblásticas. Ao contrário dos dados obtidos neste trabalho, vários autores demonstraram que a hormona do crescimento exerce uma acção directa na diferenciação osteoblástica, estimulando a actividade da fosfatase alcalina e a secreção de osteocalcina<sup>244,251,255</sup>. Contudo, estas diferenças devem-se provavelmente à diversidade de sistemas celulares e de condições experimentais utilizados nos vários trabalhos.

Os resultados apresentados neste trabalho mostram que a exposição de culturas celulares de medula óssea humana à hormona do crescimento por períodos de 24 horas ao longo do tempo de incubação resultou num aumento da proliferação celular, tanto em células mantidas na presença como na ausência de soro bovino fetal. Convém referir no entanto que as culturas que cresceram na presença de soro apresentaram um crescimento celular (ensaio do MTT e conteúdo total de proteína) superior ao das culturas mantidas na ausência de soro.



### **3 – EFEITO DA DOXICICLINA E DA MINOCICLINA NO COMPORTAMENTO OSTEOBLÁSTICO DE CULTURAS CELULARES DE MEDULA ÓSSEA HUMANA**

As tetraciclina foram introduzidas em 1948 como antibióticos de largo espectro. Têm sido usadas em medicina dentária, particularmente na terapêutica periodontal, em virtude das suas propriedades<sup>265,266</sup>:

- 1) eficácia em suprimir organismos anaeróbios gram-negativos que existem na placa subgingival;
- 2) capacidade de concentração no fluido crevicular gengival em níveis 5 a 10 vezes superiores aos encontrados no soro;
- 3) capacidade de ligação à superfície do dente, sendo libertadas lentamente sem perder a sua acção antimicrobiana. Esta característica permite prolongar a eficácia terapêutica durante algum tempo depois do fármaco deixar de ser administrado ao paciente.

Para além destas, estes antibióticos têm propriedades independentes da acção antimicrobiana que parecem modular a resposta do hospedeiro e que são, do ponto de vista terapêutico, vantajosas<sup>265</sup>:

- 1) têm capacidade de promover a adesão de fibroblastos à superfície dos dentes, favorecendo a regeneração periodontal;
- 2) inibem directamente as enzimas colagenolíticas, diminuindo assim, a degradação do tecido conjuntivo. Esta propriedade não é exibida por mais nenhum outro grupo de antibióticos.

Foi na década de 80 que Golub e col.<sup>265</sup> verificaram que as tetraciclina possuíam efeitos farmacológicos ao inibir a actividade das metaloproteínases, tal como a colagenase, e que esta acção não estava relacionada com a actividade antimicrobiana destes fármacos. A inibição que as tetraciclina exercem sobre este grupo de enzimas deve-se à sua capacidade de ligação aos iões metálicos presentes nas metaloproteínases e que são necessários para a sua actividade de degradação da matriz; o  $Zn^{2+}$  é necessário no local activo da enzima e o  $Ca^{2+}$  estabiliza a conformação enzimática<sup>267</sup>. A colagenase é uma metaloproteínase da matriz (MPM) responsável, entre outros, pela degradação do colagénio da matriz extracelular do tecido conjuntivo, incluindo o tecido ósseo. É produzida por uma variedade de células incluindo as células ósseas e a sua actividade é regulada *in vivo* pelos inibidores

das MPM's. No tecido ósseo, várias hormonas calciotrópicas, tal como a hormona da paratiróide e factores de crescimento, actuam através de receptores existentes nos osteoblastos e estimulam a libertação de colagenase para a matriz extracelular. Uma vez secretada, esta enzima degrada o colagénio do osteóide permitindo que os osteoclastos cheguem até ao osso mineralizado e iniciem o processo de reabsorção óssea<sup>265</sup>. Assim, ao inibirem directamente a acção da colagenase, as tetraciclinas diminuem de forma indirecta a taxa de reabsorção óssea<sup>268</sup>.

Este grupo de antibióticos tem capacidade de inibir a reabsorção óssea não só através da inibição da colagenase, mas também através da inibição da função osteoclástica. As tetraciclinas podem afectar os parâmetros osteoclásticos de vários modos<sup>266</sup>:

1. alterando a capacidade de resposta dos osteoclastos a uma elevada concentração extracelular de cálcio;
2. reduzindo a área da membrana de reabsorção;
3. diminuindo a produção de ácido, que é secretado para a lacuna de reabsorção;
4. diminuindo a secreção de enzimas lisossómicas envolvidas na reabsorção óssea;
5. induzindo a retracção celular dos osteoclastos, o que diminui a sua adesão ao substrato.

O mecanismo de inibição da colagenase pelas tetraciclinas é terapêuticamente importante, visto que as concentrações que são utilizadas reduzem a elevada actividade colagenolítica patológica (que se observa por exemplo durante a inflamação), mas não produzem qualquer efeito negativo na colagenase necessária para a remodelação do tecido conjuntivo, isto é para manter a integridade do tecido normal<sup>265</sup>. Contudo, este fenómeno é bastante complexo, visto que os vários membros desta família diferem entre si na sua eficácia anti-colagenase, além de que as colagenases provenientes de diferentes tecidos e células podem variar consideravelmente na sua susceptibilidade à inibição pelas tetraciclinas<sup>265</sup>. Por exemplo, verificou-se que enquanto concentrações relativamente baixas de minociclina ( $2\text{-}25\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) inibem a colagenase produzida por neutrófilos polimorfonucleares humanos, é necessário uma concentração muito superior ( $250\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) para produzir o mesmo efeito em colagenases produzidas por fibroblastos humanos em cultura<sup>265</sup>.

As tetraciclinas semi-sintéticas, tal como a doxiciclina e a minociclina, são consideradas inibidores mais eficazes da colagenase do que a tetraciclina HCl. A elevada actividade da



doxiciclina ( $IC_{50} = 15 \mu M$ ) deve-se à sua maior capacidade de ligação ao ião  $Zn^{2+}$ . Estas duas tetraciclinas podem inibir directamente a reabsorção óssea e a actividade da colagenase produzida pelas células ósseas *in vitro*<sup>267</sup>.

Para além dos efeitos *in vivo* na perda óssea periodontal (redução da degradação do tecido conjuntivo), as tetraciclinas parecem ter um efeito anabólico no metabolismo ósseo, observação derivada de estudos que utilizaram o modelo de rato diabético<sup>267</sup>; os resultados mostraram que estes compostos possuem a capacidade de impedir a osteoporose no esqueleto de ratos diabéticos, através do aumento da actividade osteoblástica e da estimulação da formação óssea<sup>267</sup>.

Apesar de vários estudos mostrarem que as tetraciclinas exercem um efeito benéfico no tecido ósseo, são escassos os trabalhos relativos ao comportamento das células osteoblásticas na presença destes compostos. Neste trabalho, células de medula óssea humana foram cultivadas durante 35 dias em condições experimentais que favorecem o desenvolvimento completo do fenótipo osteoblástico. O comportamento de proliferação/diferenciação destas culturas celulares foi estudado na presença de diferentes concentrações de doxiciclina e de minociclina.

### **3.1 – MATERIAL E MÉTODOS**

#### ***CULTURAS CELULARES***

As células de medula óssea humana foram cultivadas em condições experimentais idênticas às descritas no capítulo II (secção 2.1). Após a tripsinização da cultura primária, as células foram cultivadas ( $10^4$  células.cm<sup>-2</sup>) por um período de 35 dias na presença de ácido ascórbico ( $50 \mu g.ml^{-1}$ ),  $\beta$ -glicerofosfato ( $10 mmol.L^{-1}$ ) e dexametasona ( $10 nmol.L^{-1}$ ), em condições controlo (ausência de antibióticos) e na presença de uma gama de concentrações de doxiciclina ( $1 \mu g.ml^{-1}$ ,  $5 \mu g.ml^{-1}$ ,  $10 \mu g.ml^{-1}$  e  $25 \mu g.ml^{-1}$ ) e de minociclina ( $1 \mu g.ml^{-1}$ ,  $5 \mu g.ml^{-1}$ ,  $10 \mu g.ml^{-1}$ ,  $25 \mu g.ml^{-1}$  e  $50 \mu g.ml^{-1}$ ).

#### ***CARACTERIZAÇÃO DAS CULTURAS CELULARES***

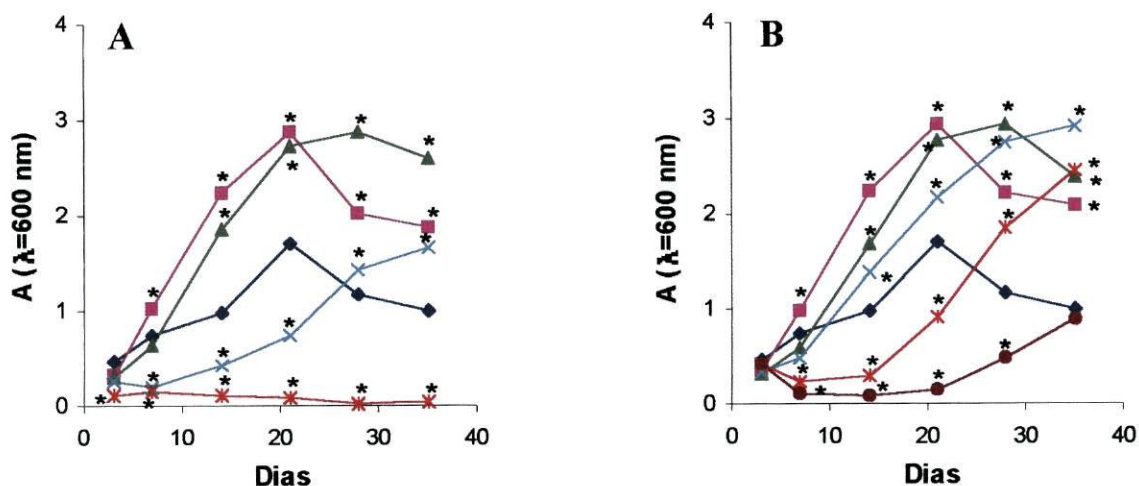
As culturas celulares foram caracterizadas relativamente à proliferação/viabilidade celular (ensaio do MTT), conteúdo total de proteína, actividade da fosfatase alcalina e capacidade

de formação de depósitos minerais, de acordo com a metodologia descrita no capítulo II (secção 2.1). As culturas foram caracterizadas nos dias 3, 7, 14, 21, 28 e 35. Os meios de cultura foram analisados para avaliação da concentração de fósforo e cálcio ionizados, seguindo a metodologia descrita no capítulo III (secção 2.1.1).

### 3.2 – RESULTADOS

#### *Proliferação/viabilidade celular. Conteúdo total de proteína*

Os resultados relativos ao ensaio do MTT estão apresentados nas figuras 30 A e B, respectivamente para as culturas que cresceram na presença de doxiciclina e minociclina.



**Figura 30** – Proliferação/viabilidade celular de culturas de medula óssea humana mantidas na presença de doxiciclina (A) e minociclina (B), nas seguintes concentrações: 1 μg.ml<sup>-1</sup> (■), 5 μg.ml<sup>-1</sup> (▲), 10 μg.ml<sup>-1</sup> (×), 25 μg.ml<sup>-1</sup> (\*) e 50 μg.ml<sup>-1</sup> (●); situação controlo (culturas efectuadas na presença de AA + β-GF + Dex) (◆). \*Significativamente diferente das culturas que cresceram em situação controlo. Os desvios padrão observados foram < 20 %.

A proliferação das células cultivadas em condições controlo (AA + β-GF + Dex) aumentou gradualmente durante as três primeiras semanas e a partir do dia 21 os valores de redução do MTT diminuíram significativamente (Fig. 30). As células expostas a 1 μg.ml<sup>-1</sup> de ambos os antibióticos apresentaram um crescimento celular superior ao observado nas culturas controlo. Estas culturas apresentaram um crescimento celular exponencial desde a 1ª

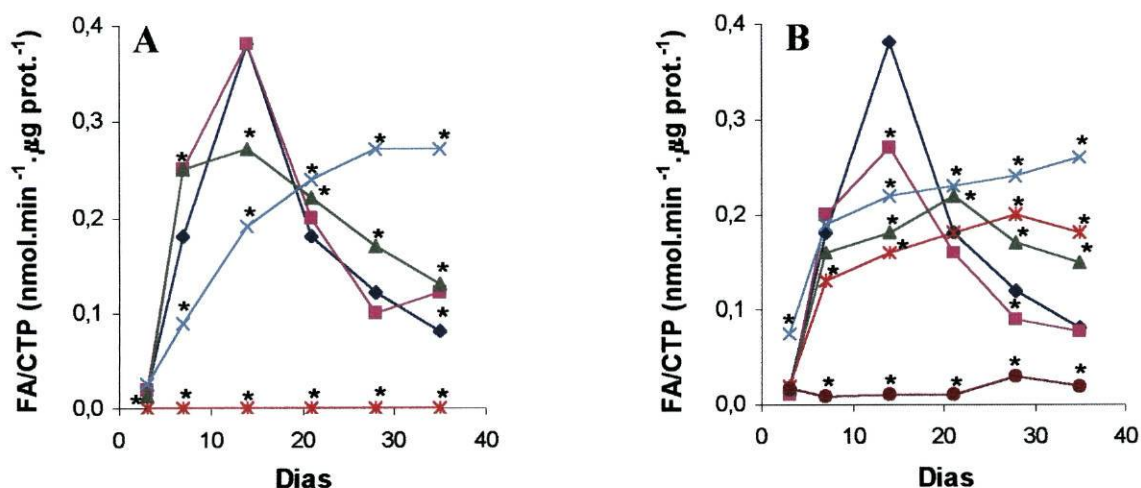


semana, atingiram o valor máximo de redução do MTT ao dia 21 ( $2,89 \pm 0,16$  e  $2,94 \pm 0,01$ , respectivamente para as células cultivadas na presença de  $1 \mu\text{g.ml}^{-1}$  de doxiciclina e para as células expostas a igual concentração de minociclina), observando-se uma redução significativa da proliferação durante a 4ª semana. A presença de  $5 \mu\text{g.ml}^{-1}$  de doxiciclina ou de minociclina resultou na indução da proliferação/viabilidade celular até ao dia 28, verificando-se uma pequena diminuição dos valores de redução do MTT durante a quinta semana de incubação. As culturas celulares expostas a  $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$  de minociclina proliferaram gradualmente durante os 35 dias de incubação, sem atingir qualquer fase estacionária ou de redução do crescimento celular e os valores de redução do MTT foram superiores aos observados nas culturas controlo (Fig. 30B). No entanto, nas culturas tratadas com  $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$  de doxiciclina e  $25 \mu\text{g.ml}^{-1}$  de minociclina, observou-se uma redução significativa da proliferação celular durante as três primeiras semanas relativamente às culturas controlo, sugerindo que a presença destes fármacos nestas concentrações perturba as fases inicial e exponencial do crescimento celular. Em ambas as situações, os valores de redução do MTT aumentaram a partir do dia 14, ultrapassaram o valor observado nas culturas controlo ao dia 28 (19% e 37%, respectivamente) e não apresentaram qualquer redução ou manutenção dos valores até ao fim do período de incubação (Figs. 30A,B). A presença de  $25 \mu\text{g.ml}^{-1}$  de doxiciclina provocou um efeito deletério na proliferação/viabilidade celular, uma vez que nas culturas expostas a esta concentração os valores de redução do MTT foram muito reduzidos (Fig. 30A). Nas culturas mantidas na presença de  $50 \mu\text{g.ml}^{-1}$  de minociclina, o crescimento celular foi muito baixo até ao dia 21 e aumentou durante as duas últimas semanas de incubação, atingindo no dia 35, valores de redução do MTT próximos dos observados nas culturas controlo ( $0,895 \pm 0,013$  e  $0,998 \pm 0,02$ , respectivamente) (Fig. 30B).

Nas culturas que cresceram em condições controlo, o conteúdo proteico total aumentou ao longo do tempo de incubação de modo semelhante à proliferação celular (dados não apresentados). Os resultados obtidos mostraram que as alterações no conteúdo total de proteína observadas na presença das diversas concentrações das duas tetraciclinas são idênticas às verificadas na proliferação/viabilidade celular (dados não apresentados).

**Actividade da fosfatase alcalina**

Os níveis de fosfatase alcalina nas culturas celulares de medula óssea humana mantidas em condições controlo (AA +  $\beta$ -GF + Dex) aumentaram ao longo do período de incubação; o pico máximo de actividade da enzima foi atingido por volta do dia 14, baixando significativamente a partir da terceira semana de cultura (Fig. 31).



**Figura 31** – Actividade da fosfatase alcalina de culturas de medula óssea humana mantidas na presença de doxiciclina (A) e minociclina (B), nas seguintes concentrações: 1  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  (■), 5  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  (▲), 10  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  (×), 25  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  (\*) e 50  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  (●); situação controlo (culturas efectuadas na presença de AA +  $\beta$ -GF + Dex) (◆). \*Significativamente diferente das culturas que cresceram em situação controlo. Os desvios padrão observados foram < 20 %.

As culturas tratadas com 1  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de doxiciclina apresentaram um padrão de actividade de fosfatase alcalina semelhante ao observado nas culturas controlo (Fig. 31A). As culturas que foram mantidas na presença de 5  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de doxiciclina apresentaram uma menor actividade da fosfatase alcalina, comparativamente com as culturas controlo; o nível máximo da enzima também foi atingido ao dia 14, observando-se uma redução da actividade até ao fim do período de incubação (Fig. 31A). A exposição das culturas celulares a 10  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de doxiciclina causou um aumento da actividade da enzima até aproximadamente ao dia 28 e, na última semana, os níveis mantiveram-se praticamente constantes; até ao dia 14 os valores de actividade de fosfatase alcalina nestas culturas foram inferiores aos registados nas culturas controlo, ultrapassando-os a partir da 4ª semana (Fig.



31A); no entanto, os níveis máximos foram muito inferiores aos observados na situação controlo. Nas culturas que foram expostas a  $25 \mu\text{g.ml}^{-1}$  de doxiciclina, os níveis de fosfatase alcalina foram insignificantes, resultados que estão de acordo com o facto de as células praticamente não proliferarem na presença desta concentração do antibiótico (Fig. 31A). As culturas celulares expostas a  $1 \mu\text{g.ml}^{-1}$  de minociclina apresentaram uma variação dos níveis de fosfatase alcalina semelhante à verificada nas culturas controlo (Fig. 31B). O valor máximo foi atingido por volta do dia 14 mas foi inferior ao observado na situação controlo; a actividade da enzima diminuiu significativamente até ao fim do tempo de incubação. A presença de  $5 \mu\text{g.ml}^{-1}$  de minociclina resultou numa redução da actividade da enzima e o valor máximo foi atingido mais tarde, no dia 21, (Fig. 31B). As células cultivadas na presença de  $10$  e  $25 \mu\text{g.ml}^{-1}$  de minociclina apresentaram um aumento contínuo dos níveis da enzima ao longo do período de incubação, sem que se verificasse qualquer tendência para a estabilização ou redução da actividade deste marcador osteoblástico (Fig. 31B). Em ambas as culturas, a actividade da fosfatase alcalina até ao dia 21 foi menor do que a observada nas culturas controlo, sendo os valores registados nas culturas expostas a  $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$  superiores aos verificados nas culturas mantidas com  $25 \mu\text{g.ml}^{-1}$ . A exposição a  $50 \mu\text{g.ml}^{-1}$  de minociclina provocou uma significativa redução da actividade da fosfatase alcalina ao longo de todo o período de incubação (Fig. 31B). As culturas coradas para a fosfatase alcalina apresentaram resultados que estão de acordo com os observados para a determinação bioquímica da enzima, fornecendo o mesmo tipo de informação (dados não apresentados).

### ***Formação de depósitos de fosfato de cálcio***

Os resultados obtidos na coloração histoquímica dos depósitos mineralizados pela técnica da Alizarina vermelha, nas culturas com 21, 28 e 35 dias, estão apresentados nas Tabelas VII e IX; a coloração das culturas pelo método von Kossa providenciou o mesmo tipo de informação. Nas culturas controlo, a reacção para a detecção de áreas mineralizadas foi positiva no dia 21, sugerindo que a formação de depósitos de fosfato de cálcio ocorreu a partir da 3ª semana de cultura. Nas culturas expostas a  $1 \mu\text{g.ml}^{-1}$  de doxiciclina ou de minociclina, a detecção de depósitos mineralizados foi também observada no dia 21. As culturas tratadas com  $5 \mu\text{g.ml}^{-1}$  de doxiciclina apresentaram uma reacção fracamente positiva no dia 21 e as que foram mantidas com  $5 \mu\text{g.ml}^{-1}$  de minociclina começaram a mineralizar mais tarde (reacção positiva no dia 28). A exposição das culturas a  $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$

de doxiciclina e a 10 e 25  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  de minociclina, resultou num efeito deletério do processo de mineralização, uma vez que as reacções histoquímicas foram negativas. Como seria de esperar pelos resultados obtidos para a proliferação celular, as culturas que cresceram na presença de 25  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  de doxiciclina ou de 50  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  de minociclina apresentaram reacções histoquímicas negativas.

**Tabela VIII** – Reacção histoquímica para a detecção de depósitos de fosfato de cálcio (método de Alizarina vermelha) nos dias 21, 28 e 35 dias, em culturas de células osteoblásticas de medula óssea humana mantidas na presença de doxiciclina, nas seguintes concentrações: 1  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ , 5  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ , 10  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  e 25  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ .

	21 dias	28 dias	35 dias
<b>Controlo</b>	+	++	+++
<b>D1</b>	+	++	+++
<b>D5</b>	+/-	++	++
<b>D10</b>	-	-	-
<b>D25</b>	-	-	-

**Tabela IX** – Reacção histoquímica para a detecção de depósitos de fosfato de cálcio (método de Alizarina vermelha) nos dias 21, 28 e 35 dias, em culturas de células osteoblásticas de medula óssea humana mantidas na presença de minociclina, nas seguintes concentrações: 1  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ , 5  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ , 10  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ , 25  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  e 50  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ .

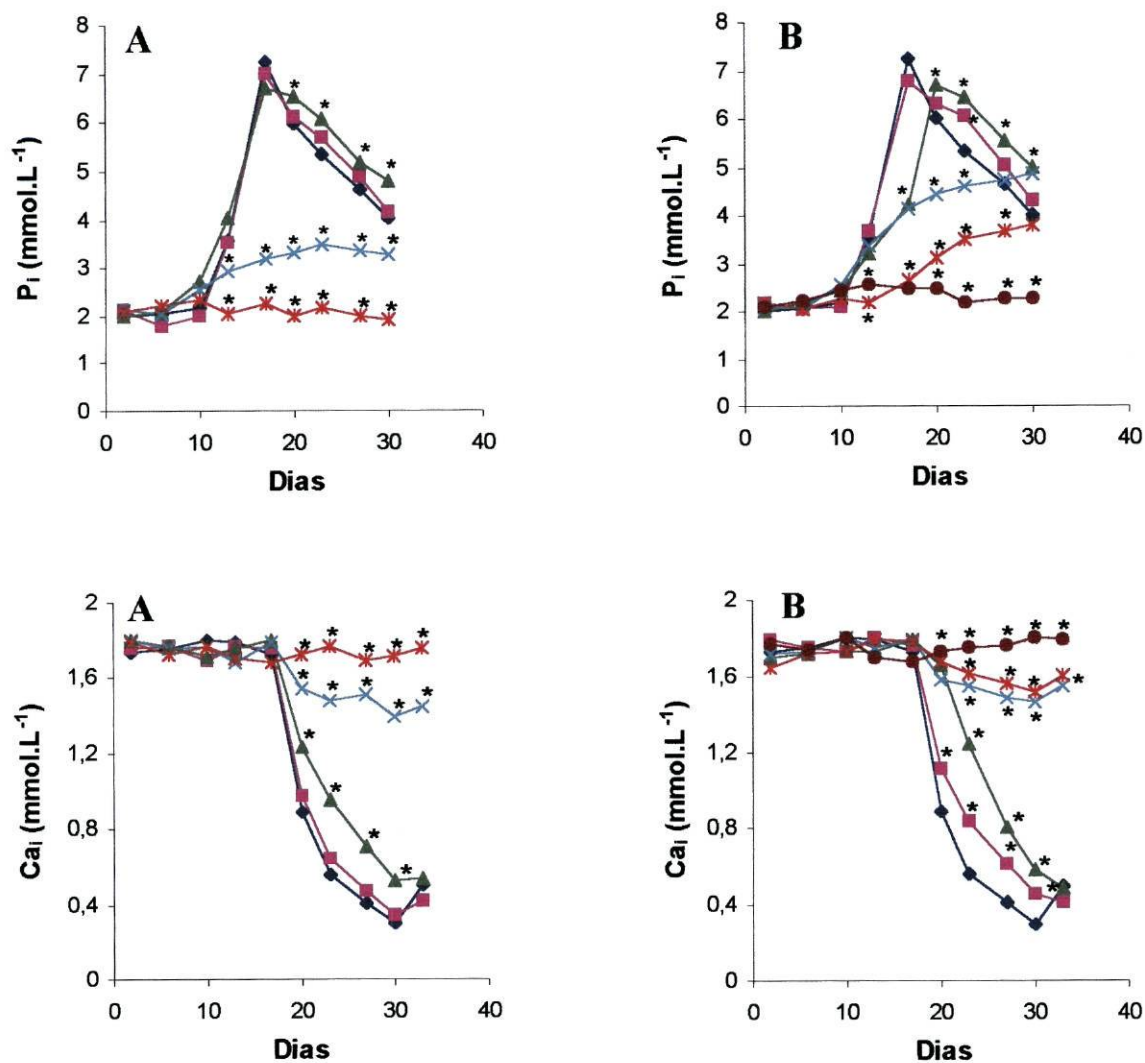
	21 dias	28 dias	35 dias
<b>Controlo</b>	+	++	+++
<b>M1</b>	+	++	+++
<b>M5</b>	-	+	++
<b>M10</b>	-	-	-
<b>M25</b>	-	-	-
<b>M50</b>	-	-	-

A intensidade da coloração é definida do seguinte modo: -, coloração negativa; +, coloração positiva de fraca intensidade; ++, coloração positiva de média intensidade; +++, coloração positiva de elevada intensidade.



### Níveis de fósforo e cálcio ionizados no meio de cultura

As concentrações de fósforo e cálcio ionizados observados no meio de cultura recolhido das várias culturas celulares estão apresentados, respectivamente nas figuras 32A e B.



**Figura 32** – Níveis de fósforo e cálcio ionizados no meio de cultura recolhido de culturas de medula óssea humana mantidas na presença de doxiciclina (A) e minociclina (B), nas seguintes concentrações: 1 μg.ml<sup>-1</sup> (■), 5 μg.ml<sup>-1</sup> (▲), 10 μg.ml<sup>-1</sup> (×), 25 μg.ml<sup>-1</sup> (\*) e 50 μg.ml<sup>-1</sup> (●); situação controlo (culturas efectuadas na presença de AA + β-GF + Dex) (◆).

\*Significativamente diferente das culturas que cresceram em situação controlo. Os desvios padrão observados foram < 20 %.

No meio de cultura recolhido das culturas controlo observou-se um aumento na concentração de fósforo ionizado até ao dia 17, enquanto que os níveis de cálcio ionizado não se alteraram significativamente durante este período. Contudo, a partir do dia 17, as concentrações das duas espécies iónicas diminuíram significativamente, o que reflecte a formação de depósitos de fosfato de cálcio nestas culturas. Os níveis de fósforo e cálcio ionizados no meio recolhido das culturas expostas a  $1 \mu\text{g.ml}^{-1}$  de doxiciclina seguiram um padrão semelhante ao observado nas culturas controlo. Nas culturas tratadas com  $5 \mu\text{g.ml}^{-1}$  de doxiciclina e  $1 \mu\text{g.ml}^{-1}$  de minociclina a concentração de fósforo ionizado atingiu um valor máximo ligeiramente mais baixo e a redução observada nos níveis das duas espécies a partir do dia 17 foi menos significativa do que a verificada nas culturas controlo. Nas culturas tratadas com  $5 \mu\text{g.ml}^{-1}$  de minociclina, os níveis de fósforo ionizado aumentaram até mais tarde e foram inferiores aos observados na situação controlo; os níveis de fósforo e de cálcio só começaram a baixar a partir do dia 20. Nas culturas expostas a  $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$  de doxiciclina e a  $10$  e  $25 \mu\text{g.ml}^{-1}$  de minociclina, os níveis de fósforo ionizado no meio aumentaram gradualmente até ao fim do período de incubação; contudo, os valores observados foram significativamente mais baixos do que os registados nas culturas controlo. Nestas culturas, observou-se uma pequena tendência para a redução dos níveis de cálcio ionizado apenas nos últimos dias de cultura. Nas culturas expostas a  $25 \mu\text{g.ml}^{-1}$  de doxiciclina e  $50 \mu\text{g.ml}^{-1}$  de minociclina, os níveis de fósforo e cálcio ionizados não sofreram quaisquer alterações ao longo do período de incubação.

### 3.3 – DISCUSSÃO

Após uma pesquisa bibliográfica cuidadosa, verificou-se que existem na literatura poucos estudos *in vitro* realizados com células osteoblásticas cultivadas na presença de tetraciclina. Um destes trabalhos<sup>269</sup>, efectuado com células osteoblásticas isoladas a partir de osteosarcoma humano, mostrou que a presença de  $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$  de doxiciclina inibe a proliferação das células tumorais e estimula o processo de apoptose; a apoptose ou morte celular programada está inibida em muitos tecidos tumorais, podendo esta inibição contribuir para o crescimento descontrolado das células cancerosas. Este trabalho sugere que a doxiciclina tem um potencial terapêutico que pode ser utilizado como forma de quimioterapia em pacientes com osteosarcoma<sup>269</sup>. Também existem trabalhos *in vivo* efectuados em mulheres com osteoporose<sup>270</sup> que demonstram que a administração de doses



baixas de doxiciclina atenua a perda de osso alveolar, o que é essencial para prevenir tanto a perda de dentes como a deterioração da micro-arquitetura do osso alveolar. Existem outros trabalhos<sup>271</sup> que sugerem que o tratamento diário com minociclina (5-15 mg) de ratos com osteopenia aumenta a densidade óssea na região da diáfise, estimula a expressão de colagénio tipo I e diminui a produção de IL-6 (citocina que estimula o processo de reabsorção óssea). A utilização do antibiótico não teve qualquer efeito na expressão da osteocalcina e da fosfatase alcalina. Em culturas de células de medula de rato, a minociclina estimulou a formação de nódulos celulares<sup>271</sup>. Estes trabalhos sugerem que o efeito anabólico deste fármaco deve-se provavelmente aos seus efeitos na expressão do colagénio tipo I e/ou nas células osteoprogenitoras. Estes e outros trabalhos<sup>272</sup> sugerem que as propriedades das tetraciclinas podem providenciar novas vertentes terapêuticas de doenças como a doença periodontal e, também, de alguns estados patológicos que são caracterizados pela degradação excessiva do colagénio, tal como a artrite reumática, osteoartrite, diabetes *mellitus*, úlceras córneas e angiogénese<sup>273</sup>.

Os dados obtidos nesta secção sugerem que a exposição de células de medula óssea humana, cultivadas em condições que favorecem o desenvolvimento do fenótipo osteoblástico, a uma concentração de  $1 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  quer de doxiciclina, quer de minociclina resultou num aumento da proliferação celular durante a fase exponencial, que foi acompanhado pela expressão das funções osteoblásticas (elevada actividade da fosfatase alcalina e formação de depósitos de fosfato de cálcio). Estes resultados sugerem que, para além das suas propriedades antimicrobianas e anti-colagenolíticas, estes dois antibióticos pertencentes ao grupo das tetraciclinas, quando utilizados em baixas concentrações, actuam como promotores da proliferação das células osteoblásticas.

As culturas celulares tratadas com  $5 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  de doxiciclina ou minociclina apresentaram uma indução do crescimento celular, mas os marcadores da diferenciação osteoblástica não foram estimulados na mesma proporção; a detecção de depósitos mineralizados foi mais tardia nas culturas tratadas com  $5 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  de minociclina e em ambos os casos a mineralização foi mais fraca. A exposição das células a  $10 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  de minociclina pareceu estimular o crescimento destas, mas não afectou de igual modo os níveis de fosfatase alcalina; na presença desta concentração, a população celular foi mais proliferativa mas

menos diferenciada, como se pode comprovar pela ausência de formação de áreas mineralizadas.

As concentrações de  $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$  de doxiciclina e  $25 \mu\text{g.ml}^{-1}$  de minociclina perturbaram significativamente o comportamento normal das culturas celulares. Os resultados sugerem que estas concentrações exerceram um efeito inibitório na proliferação celular durante as fases inicial e exponencial do período de cultura, atrasando deste modo a fase de proliferação que está associada à formação de uma matriz extracelular e o aparecimento de áreas mineralizadas. Os resultados aqui obtidos também mostraram que concentrações relativamente elevadas destes antibióticos ( $25 \mu\text{g.ml}^{-1}$  de doxiciclina e  $50 \mu\text{g.ml}^{-1}$  de minociclina) foram citotóxicas para as células de medula óssea humana. Relativamente a este aspecto, há estudos anteriores efectuados em fibroblastos obtidos do ligamento periodontal que mostraram que concentrações de doxiciclina superiores a  $25 \mu\text{g.ml}^{-1}$  resultaram numa inibição da adesão dos fibroblastos à superfície da placa de cultura e, também, ao desprendimento destas células depois de estabelecidas em culturas aderentes<sup>274</sup>. Há ainda outro estudo que mostra que a  $\text{LD}_{50}$  de minociclina para este tipo de células é de  $171 \mu\text{M}$  ( $84,5 \mu\text{g.ml}^{-1}$ )<sup>275</sup>.

É de salientar que a partir de  $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$ , a doxiciclina apresenta uma toxicidade mais elevada para as células de medula óssea que iguais concentrações de minociclina. Assim, por exemplo, para a concentração de  $25 \mu\text{g.ml}^{-1}$  observou-se crescimento celular na presença de minociclina mas não de doxiciclina. Esta observação pode eventualmente estar relacionada com a potência dos dois fármacos relativamente às funções afectadas nestas células. Este facto observa-se, por exemplo, relativamente à eficácia antimicrobiana da doxiciclina e minociclina; estes fármacos afectam a síntese proteica bacteriana e para uma parte significativa dos microorganismos sensíveis, a doxiciclina é activa em menores concentrações que a minociclina<sup>276</sup>.

As concentrações plasmáticas de doxiciclina e minociclina que se obtêm com os esquemas terapêuticos anti-infecciosos normalmente utilizados situam-se na gama dos  $2$  a  $6 \mu\text{g.ml}^{-1}$ <sup>277</sup>. Ambos os compostos são relativamente lipossolúveis e atingem os vários órgãos e fluídos do organismo, incluindo o microambiente ósseo. Assim, os resultados deste estudo sugerem que a utilização terapêutica destas duas tetraciclinas resulta em níveis que podem afectar as



células osteoblásticas e que, para as concentrações plasmáticas observadas, o efeito se traduz num aumento da proliferação celular. Deve também ter-se em consideração que as tetraciclina são usadas topicamente no tratamento da doença periodontal. Neste caso, são frequentemente utilizadas preparações de libertação prolongada, situação em que as concentrações do fármaco que se obtêm nas bolsas periodontais são bastante mais elevadas que as observadas com a utilização sistémica destes compostos e, normalmente, superiores aos 25-50  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Assim, no caso da utilização deste tipo de preparações deve considerar-se a possibilidade de ocorrência de efeitos citotóxicos nas células locais, nomeadamente do ligamento periodontal e osso alveolar.

## 4 – CONCLUSÃO

Nos estudos apresentados neste capítulo avaliou-se o efeito de três hormonas (dexametasona, hormona da paratiróide e hormona do crescimento) e dois antibióticos (doxiciclina e minociclina) no comportamento de culturas celulares de medula óssea humana, relativamente à proliferação/viabilidade celular e expressão do fenótipo osteoblástico ao longo do tempo de incubação. Estes estudos permitiram seleccionar as condições experimentais mais adequadas para a obtenção da expressão máxima do fenótipo osteoblástico, nas condições de cultura utilizadas, nomeadamente quanto à concentração utilizada a ao tempo de exposição.

Os vários ensaios foram realizados na primeira subcultura em  $\alpha$ -MEM, na presença de compostos que favorecem o desenvolvimento de fenótipo osteoblástico e do composto a estudar, na concentração adequada, que esteve presente durante todo o tempo de incubação ou adicionado numa determinada fase da cultura.

Os resultados apresentados neste trabalho mostram que a acção da dexametasona (10  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) no comportamento de proliferação/diferenciação de células osteoblásticas provenientes de medula óssea humana depende do estado de diferenciação celular. Nestas culturas, a indução da expressão osteoblástica pela dexametasona parece resultar do efeito deste composto nas células existentes em estados iniciais de diferenciação. Assim, em culturas celulares de medula óssea humana, a dexametasona estimula a proliferação e a diferenciação de células osteoprogenitoras e também de osteoblastos presentes num estado

de diferenciação menos adiantado (1<sup>a</sup> e 2<sup>a</sup> semanas do período de cultura). Quando a hormona está presente nas fases mais tardias do período de cultura (3<sup>a</sup> semana) o efeito é menor, uma vez que nestas fases as células já estão altamente diferenciadas, relativamente à actividade da fosfatase alcalina e à capacidade para formar uma matriz extracelular mineralizada. Os dados obtidos neste trabalho também sugerem que a maximização do efeito estimulatório da dexametasona requer uma exposição contínua das células à hormona, visto que foi nestas condições que a expressão do fenótipo osteoblástico foi maior e ocorreu mais cedo.

O efeito da hormona da paratiróide no comportamento de proliferação/diferenciação de células osteoblásticas também foi estudado. Os resultados obtidos sugerem que a hormona da paratiróide (10 nmol.L<sup>-1</sup>) está intimamente ligada à diferenciação osteoblástica, inibindo a diferenciação das células osteoblásticas mais maduras, e favorecendo as que se encontram num estado imaturo (fase proliferativa), isto é a acção anabólica da hormona pode ser explicada em parte pela estimulação da proliferação e da diferenciação das células osteoprogenitoras. O efeito mais significativo da acção da hormona da paratiróide, nas culturas de células de medula óssea humana, foi um evidente aumento da actividade da fosfatase alcalina nas culturas expostas continuamente à acção da PTH e nas culturas expostas à hormona durante a 1<sup>a</sup> semana de cultura. A exposição das culturas celulares à PTH durante a 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> semanas do período de incubação resultou num aumento contínuo do nível da enzima, sugerindo que as populações celulares que cresceram nestas condições estavam num estado menos diferenciado na linhagem osteoblástica. Paralelamente, e uma vez que a síntese de proteínas extracelulares nestas duas situações experimentais foi reduzida, a produção de uma matriz extracelular adequada para que a mineralização ocorresse provavelmente não foi observada, não se verificando a formação de depósitos mineralizados nas culturas expostas à PTH durante a 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> semanas do período de incubação.

Seguidamente, estudou-se o efeito da hormona do crescimento, que é conhecida por promover o desenvolvimento do tecido ósseo, em culturas celulares de medula óssea humana mantidas permanentemente com 10% de soro bovino fetal e em culturas celulares que cresceram temporariamente na ausência de soro, uma vez que o soro é fonte, entre outros, de hormonas e factores de crescimento. As culturas celulares expostas à acção da hormona do crescimento por períodos de 24 horas ao longo do tempo de incubação



apresentaram um aumento significativo da proliferação das células osteoblásticas, efeito que foi acompanhado por uma ligeira diminuição da actividade da fosfatase alcalina e da capacidade de formação de depósitos de fosfato de cálcio, sugerindo que esta hormona actua essencialmente a nível do crescimento celular. O efeito promotor da hormona do crescimento na proliferação celular foi observado tanto em células mantidas na presença como na ausência de soro bovino fetal. Contudo, as culturas que cresceram na presença de soro apresentaram um crescimento celular superior ao das culturas mantidas na ausência de soro.

O comportamento de culturas osteogénicas foi estudado na presença de doxiciclina e de minociclina, uma vez que estes fármacos têm um espectro antibacteriano apropriado para o tratamento de infecções que surgem após o processo cirúrgico e, também, porque parecem actuar sobre as células do hospedeiro, influenciando os processos de regeneração tecidual. Deste modo, foi avaliada a resposta de células osteoblásticas a uma gama de concentrações de doxiciclina ( $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ,  $5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ,  $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  e  $25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) e de minociclina ( $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ,  $5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ,  $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ,  $25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  e  $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). Os resultados obtidos sugerem que, baixas concentrações de doxiciclina e de minociclina ( $1-5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) estimulam a proliferação das células de medula óssea humana, cultivadas em condições que favorecem o aparecimento do fenótipo osteoblástico. Estes resultados sugerem que, para além das suas propriedades antimicrobianas e anti-colagenolíticas, estes dois antibióticos, quando utilizados em baixas concentrações, actuam como promotores da proliferação das células osteoblásticas, favorecendo principalmente o crescimento de populações celulares menos diferenciadas. A exposição das células a  $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de minociclina parece estimular o aparecimento de uma população celular mais proliferativa mas menos diferenciada. As concentrações de  $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de doxiciclina e  $25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de minociclina causaram um efeito deletério no comportamento das culturas celulares, atrasando a fase de proliferação que está associada à formação de uma matriz extracelular e o aparecimento de áreas mineralizadas. Os resultados aqui obtidos também mostram que concentrações relativamente elevadas destes antibióticos ( $25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de doxiciclina e  $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de minociclina) são citotóxicas para as células de medula óssea humana. É de salientar que a mesma concentração dos dois antibióticos pode ter efeitos diferentes nas culturas celulares, tal como se observou para as concentrações de  $10$  e  $25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

# **CAPÍTULO IV**

**MODULAÇÃO FARMACOLÓGICA DA  
INTERACÇÃO CÉLULAS OSTEÓBLÁSTICAS/  
COMPÓSITO DE HIDROXIAPATITE-BIOVIDRO**



## 1 – INTRODUÇÃO

Os recentes desenvolvimentos de novos materiais para substituição óssea apontam para a utilização de materiais que permitem a adesão e o crescimento do tecido ósseo sobre a sua superfície<sup>278</sup>. A hidroxiapatite  $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$  é o principal constituinte da parte mineral do osso e tem sido utilizada com sucesso em aplicações ortopédicas e maxilofaciais, principalmente devido à sua natureza bioactiva<sup>278</sup>. No entanto, o seu uso tem sido limitado devido às suas fracas propriedades mecânicas, nomeadamente à sua reduzida tenacidade à fractura e resistência mecânica<sup>279,280</sup>.

A apatite natural do osso e a apatite sintética comercialmente disponível possuem pequenas, mas significativas, diferenças atómicas, o que atrasa marcadamente a resposta óssea aos implantes de hidroxiapatite. Tais diferenças parecem dever-se à cristalografia da apatite natural, que permite que ocorram várias substituições iónicas dentro da estrutura, por exemplo, os iões  $\text{OH}^-$  e  $\text{PO}_4^{3-}$  são vulgarmente substituídos pelo ião  $\text{CO}_3^{2-}$ , o ião  $\text{Ca}^{2+}$  pelos iões  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Na}^+$  e o ião  $\text{PO}_4^{3-}$  pelo ião  $\text{F}^-$ <sup>282</sup>. Deste modo, e uma vez que a parte inorgânica do osso contém vários iões residuais, torna-se importante incorporar tais iões nos implantes de hidroxiapatite, visto que o comportamento biológico das apatites está fortemente dependente da sua presença. Para além disso, a parte inorgânica do osso não consiste unicamente em apatite, mas contém igualmente resíduos de uma segunda fase de  $\beta$ -tricálcio de fosfato ( $\beta$ -TCP),  $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . Esta fase de  $\beta$ -TCP apresenta uma maior solubilidade do que a hidroxiapatite e é considerada ser bioreabsorvível *in vivo*. A presença desta fase e a possibilidade de substituições iónicas no interior da rede de hidroxiapatite natural são os factores responsáveis pela maior bioactividade desta, comparativamente com a apatite sintética.

Recentemente, foram desenvolvidos materiais compósitos com uma microestrutura baseada numa rede de sílica e uma estrutura cristalina de hidroxiapatite<sup>282</sup>. Apesar destes materiais demonstrarem bioactividade quando implantados, a presença de sílica ( $\text{SiO}_2$ ) faz com que a densificação do material seja pequena, não se desenvolvendo uma forte ligação com a hidroxiapatite. Além disso, durante o processo de sinterização, há formação de um silicato complexo de cálcio e fósforo, composto cristalino que parece ser responsável pelos elevados níveis de porosidade detectados na microestrutura<sup>282,283</sup>. Uma elevada porosidade

associada a uma reduzida densificação parecem estar na origem das baixas propriedades mecânicas deste material. Assim, no sentido de produzir materiais à base de hidroxiapatite com uma composição química que se aproxima da do tecido ósseo, e que apresente elevadas propriedades mecânicas e uma maior bioactividade, foram desenvolvidos novos materiais cuja microestrutura compreende uma estrutura de hidroxiapatite, cristais de uma segunda fase cristalina de fosfato de cálcio e uma fase vítrea residual. Estes novos materiais compósitos possuem uma matriz de hidroxiapatite sintética, comercialmente disponível, a qual é reforçada com um biovidro fosfatado<sup>284,285</sup>. Os biovidros pertencentes ao sistema  $P_2O_5-CaO-Na_2O$  têm sido considerados biomateriais com um enorme potencial, pelo facto da sua composição química ser semelhante à parte inorgânica do osso, apresentarem elevada biocompatibilidade, especialmente em aplicações dentárias e maxilofaciais, e bioactividade<sup>286</sup>. Como os vidros fosfatados exibem uma maior degradação do que a hidroxiapatite, estes novos materiais podem ser utilizados em aplicações biomédicas onde a relativa insolubilidade da apatite é uma desvantagem<sup>286</sup>.

Recentemente, Santos e col.<sup>287</sup> desenvolveram novos materiais compósitos à base de hidroxiapatite, à qual foi adicionada uma fase vítrea durante o processo de sinterização. Pequenas quantidades de vidro fosfatado são facilmente adicionadas à hidroxiapatite, aumentando, deste modo, o processo de densificação. Por outro lado, a incorporação dos iões do biovidro na estrutura de apatite permite que a bioactividade do novo material seja melhorada. As propriedades mecânicas da hidroxiapatite sinterizada são significativamente aumentadas, particularmente a sua força de flexão e a sua resistência à fractura<sup>282-285,288-291</sup>.

O sucesso da utilização de biomateriais para substituição do tecido ósseo pressupõe a formação de uma interface apropriada de modo a observar-se aposição óssea na superfície do material. Deste modo, a adesão, proliferação celular e produção de uma matriz extracelular mineralizada são pré-requisitos para que se verifique a integração tecidular do biomaterial. Assim, para se otimizar a formação tecidular na interface deve ter-se em consideração os factores que, em geral, influenciam o comportamento celular na superfície do material e, também, a possibilidade de modular farmacologicamente a resposta celular de modo a melhorar e tornar mais rápida a osteointegração do material. Os osteoblastos, as células responsáveis pelo processo de formação óssea, desempenham um papel fundamental na fisiologia do tecido ósseo pois funcionam como mediadores celulares do efeito de uma variedade de hormonas e factores de crescimento que influenciam todo o



metabolismo ósseo, incluindo o processo de reabsorção óssea. Deste modo, a modulação farmacológica do comportamento das células osteoblásticas na interface tecido ósseo/biomaterial pode revestir-se de particular importância para se observar a regeneração tecidual local e a osteointegração do material.

Neste capítulo, apresentam-se os resultados relativos à preparação e caracterização de um compósito de hidroxiapatite–biovidro e, também, o seu comportamento biológico utilizando culturas de células osteoblásticas provenientes de medula óssea humana.

O comportamento de proliferação e diferenciação de células osteoblásticas cultivadas na superfície do compósito de hidroxiapatite–biovidro foi farmacologicamente modulado pela utilização de três hormonas (dexametasona, hormona da paratiróide e hormona do crescimento, secção 3.2.1) e de dois antibióticos (doxiciclina e minociclina, secção 3.2.2). As condições experimentais usadas neste trabalho foram seleccionadas do estudo descrito no capítulo III relativo ao comportamento de culturas celulares de medula óssea humana na presença destes fármacos. Foram escolhidas as condições experimentais, nomeadamente, concentração do fármaco e tempo de exposição, que conduziram a uma optimização da relação de proliferação e diferenciação celulares de modo a obter a formação de uma matriz extracelular mineralizada e, portanto, o desenvolvimento completo do fenótipo osteoblástico das células de medula óssea humana cultivadas na superfície do biomaterial. O comportamento biológico do compósito de hidroxiapatite–biovidro foi comparado com o observado em amostras de hidroxiapatite comercial, nas mesmas condições experimentais.

## **2 – PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO COMPÓSITO DE HIDROXIAPATITE–BIOVIDRO**

### **2.1 – CARACTERIZAÇÃO DA HIDROXIAPATITE**

Estudos anteriores<sup>292</sup> demonstraram por análise de difracção de raios X que o pó de hidroxiapatite utilizado (Plasma Biotal) é cristalino e não contém quaisquer fases de TCP. Todavia, esta hidroxiapatite (HA) é não-estequiométrica e a sua razão Ca/P é superior a 1,67. A maior razão Ca/P e a presença de iões  $\text{CO}_3^{2-}$  na estrutura, detectados por análise de

infravermelhos, parecem indicar que se trata de uma HA carbonatada em que iões  $\text{CO}_3^{2-}$  substituem iões  $\text{PO}_4^{3-}$ . A HA carbonatada é considerada ser quimicamente mais reactiva do que a HA pura, logo o desenvolvimento deste composto é de grande interesse. O constituinte mineral dos tecidos duros também contém iões  $\text{CO}_3^{2-}$  e quanto maior for a sua percentagem, maior é a actividade metabólica<sup>292</sup>.

## **2.2 – PREPARAÇÃO DO COMPÓSITO DE HIDROXIAPATITE–BIOVIDRO**

O vidro fosfatado foi produzido com os seguintes reagentes (em mol %): 45,0  $\text{P}_2\text{O}_5$  – 28,0  $\text{CaO}$  – 27,0  $\text{Na}_2\text{O}$ , tendo-se utilizado  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{CaCO}_3$  e  $\text{P}_2\text{O}_5$  para a sua preparação. Após uma pesagem rigorosa, os reagentes foram misturados num misturador durante 2 minutos e o pó obtido foi colocado num cadinho de platina. Utilizando uma taxa de aquecimento de  $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , a mistura foi aquecida a  $1400^\circ\text{C}$  durante 4 horas, seguindo-se o vazamento para água e a moagem do pó obtido num moinho de ágata durante 6 horas, por forma a reduzir o tamanho das partículas de vidro à mesma magnitude das do pó de HA.

A preparação da mistura de HA–biovidro foi realizada num moinho rotativo, na presença de 350 ml de metanol para 200 g de mistura, durante 12 horas. Vários estudos<sup>283,285</sup> demonstraram que a quantidade de vidro adicionada à HA deve ser pequena, de modo a limitar as transformações de fase de HA em  $\beta$  e  $\alpha$ -TCP e a aumentar as propriedades mecânicas. Assim, e com base num trabalho anterior<sup>283</sup>, foi apenas adicionado 2.5 % de vidro em relação ao peso total da mistura. Ao fim das 12 horas, fez-se a secagem da mistura durante 24 horas a  $80^\circ\text{C}$ , para remover o solvente.

## **2.3 – PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE HIDROXIAPATITE E DO COMPÓSITO DE HIDROXIAPATITE–BIOVIDRO**

Foram preparadas amostras de hidroxiapatite e de compósito sob a forma de discos com um diâmetro de 16 mm e uma espessura de 3 mm, de modo a poderem ser colocadas em placas de cultura de 24 poços para a realização das culturas celulares.

O pó obtido pelo processo acima descrito foi crivado (malha do crivo =  $70\ \mu\text{m}$ ) até se obter um pó muito fino. De seguida, foram pesados 1,2 g de pó (HA ou compósito) e colocados



num molde; as amostras foram compactadas uniaxialmente a 288 MPa e sinterizadas a 1300°C com uma taxa de aquecimento de 5°C min<sup>-1</sup>, durante 1 hora, seguido de arrefecimento lento no interior do forno.

## 2.4 – PROPRIEDADES MECÂNICAS DO COMPÓSITO DE HIDROXIAPATITE–BIOVIDRO

As propriedades mecânicas do compósito são influenciadas pela temperatura de sinterização e pela percentagem e composição química do vidro adicionado<sup>282,283</sup>.

A sinterização na presença de fase líquida pode ser descrita como o processo que envolve a coexistência de um líquido e de partículas sólidas, durante uma parte do ciclo térmico<sup>282</sup>. Este processo consiste em aquecer o pó do material sólido (HA) a temperaturas elevadas, normalmente até 2/3 da sua temperatura de fusão, na presença de um vidro que funde nesta gama de temperaturas. Durante a sinterização, ocorre dissolução parcial do sólido no líquido, o que favorece a formação dos designados colos de sinterização entre as partículas do sólido. Este processo é contínuo e à medida que a cinética de sinterização avança, o número de colos e o seu tamanho aumentam.

O vidro actua como adjuvante do processo de sinterização e tem por isso três efeitos principais que podem afectar, de modo benéfico, as propriedades da hidroxiapatite. Em primeiro lugar, e dependendo da composição do vidro, pode provocar a transformação de HA em TCP o qual possui propriedades mecânicas mais elevadas que a HA; a formação de fases de TCP é acompanhada por uma alteração do volume e logo por um mecanismo de “reforço”, que é responsável pelo melhoramento das propriedades mecânicas. Em segundo lugar, o vidro preenche a porosidade residual da matriz de HA uma vez que ele se encontra no estado líquido e difunde pela estrutura<sup>283,293</sup>. Finalmente, a transformação da HA em  $\beta$ -TCP e  $\alpha$ -TCP provoca um ligeiro aumento de volume local, criando tensões residuais na estrutura do material. Estas tensões residuais dificultam a propagação das fissuras, o que aumenta a resistência do material<sup>294</sup>. Alguns estudos<sup>283</sup> demonstraram ainda que o vidro de fosfato inibe o crescimento exagerado do grão, o qual é prejudicial em termos de resistência mecânica do material. Assim, a presença do vidro reactivo provoca o afastamento dos grupos hidroxil na estrutura da HA, alterando a razão Ca/P e conduzindo à formação de estruturas cristalinas de TCP (a tendência geral de transformação observada é

a seguinte,  $HA \Rightarrow \beta\text{-TCP} \Rightarrow \alpha\text{-TCP}$ <sup>292,295</sup>. O processo de densificação ocorre através da formação e dispersão da fase líquida, melhorando o mecanismo de difusão atômica entre as partículas de HA. Desenvolve-se, assim, uma forte ligação entre a HA e o vidro fosfatado que actua nas partículas sólidas de HA, reduzindo a energia interfacial e eliminando a porosidade<sup>282,288</sup>.

Trabalhos anteriores<sup>282,283,285</sup> demonstraram que as propriedades mecânicas do compósito são significativamente melhoradas quando a temperatura de sinterização é de 1300°C, visto que a esta temperatura o tamanho dos grãos é ainda reduzido e a taxa de densificação do material é elevada (Tabela X).

**Tabela X** – Comparação da hidroxiapatite sinterizada e do compósito de hidroxiapatite–biovidro relativamente ao tamanho de grão e a algumas propriedades mecânicas, quando a temperatura de sinterização é de 1300°C<sup>282,285</sup>.

	<b>Tamanho do grão (μm)</b>	<b>Tenacidade à fractura (MPa m<sup>1/2</sup>)</b>	<b>Flexão Biaxial (MPa)</b>	<b>Módulo de Young (GPa)</b>
<b>HA</b>	3,3 ± 0,4	0,5 ± 0,02	28 ± 7	88 ± 8
<b>Compósito</b>	0,9 ± 0,1	1,1 ± 0,05	55 ± 18	113 ± 15

Diversas investigações sobre a relação entre as características físicas da superfície e a citocompatibilidade *in vitro* e *in vivo* de diversos biomateriais correntemente utilizados em cirurgia dentária e ortopédica sugerem que superfícies com rugosidade acentuada exibem uma resposta celular local melhor do que superfícies lisas<sup>296</sup>. Deste modo, não se efectuou qualquer polimento das amostras dos materiais no trabalho aqui apresentado.



### **3 – MODULAÇÃO FARMACOLÓGICA DO COMPORTAMENTO DE CÉLULAS OSTEOBLÁSTICAS HUMANAS CULTIVADAS NA SUPERFÍCIE DOS MATERIAIS**

#### **3.1 – MATERIAL E MÉTODOS**

##### ***TRATAMENTO DE PRÉ-IMERSÃO DAS AMOSTRAS DOS MATERIAIS***

As amostras do compósito e da HA foram previamente imersas em meio de cultura ( $\alpha$ -MEM + SBF + fungizona + gentamicina) durante 21 dias, a 37°C numa atmosfera húmida de 95% ar e 5% CO<sub>2</sub>. Durante o período de imersão das amostras, foram determinadas as concentrações de fósforo e cálcio ionizados no meio de cultura. As amostras foram observadas por MEV para avaliação das alterações de superfície observadas durante a imersão. Após este tratamento de imersão, os materiais foram semeados com células de medula óssea humana ( $2 \times 10^4$  células.cm<sup>-2</sup>, 35 dias).

##### ***CULTURAS CELULARES***

As células de medula óssea humana foram cultivadas em condições experimentais idênticas às descritas no capítulo II (secção 2.1). Após a tripsinização da cultura primária, as células foram semeadas em placas de cultura de 24 poços a uma densidade de  $2 \times 10^4$  células.cm<sup>-2</sup>, por um período de 35 dias, em duas situações experimentais: (1) directamente sobre a superfície de poliestireno das placas de cultura e (2) sobre a superfície de amostras do compósito de hidroxiapatite–biovidro fosfatado e da hidroxiapatite sinterizada (HA).

As culturas que cresceram na ausência e na presença dos materiais foram mantidas em várias condições experimentais:

##### ***Presença de hormonas***

1. ácido ascórbico ( $50 \mu\text{g.ml}^{-1}$ ) +  $\beta$ -glicerofosfato ( $10 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) (situação controlo);
2. AA +  $\beta$ -GF e dexametasona ( $10 \text{ nmol.L}^{-1}$ );
3. AA +  $\beta$ -GF e hormona da paratiróide ( $10 \text{ nmol.L}^{-1}$ );
4. AA +  $\beta$ -GF e hormona do crescimento ( $50 \text{ ng.ml}^{-1}$ );

### Presença de antibióticos

1. AA ( $50 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ ) +  $\beta$ -GF ( $10 \text{ mmol}.\text{L}^{-1}$ ) + Dex ( $10 \text{ nmol}.\text{L}^{-1}$ ) (situação controlo);
2. AA +  $\beta$ -GF + Dex e doxiciclina ( $1 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ );
3. AA +  $\beta$ -GF + Dex e minociclina ( $1 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ ).

As culturas foram expostas aos fármacos de modo contínuo, durante os 35 dias do tempo de cultura, à excepção da situação em que foram tratadas com a hormona do crescimento; neste caso, foram expostas à hormona nos dias 2, 6, 13, 20, 27 e 34.

### **CARACTERIZAÇÃO DAS CULTURAS CELULARES**

As culturas foram caracterizadas ao longo do tempo de incubação para avaliar a proliferação/viabilidade celular (ensaio do MTT), conteúdo total de proteína e actividade da fosfatase alcalina; as culturas de 7 e 21 dias foram observadas por microscopia electrónica de varrimento. Pelo facto das amostras dos materiais não possuírem a mesma área que os poços das placas de cultura ( $1,54 \text{ cm}^2$  e  $1,8 \text{ cm}^2$ , respectivamente), os resultados obtidos para a proliferação/viabilidade celular são apresentados em valores de absorvância por unidade de área ( $\text{A}.\text{cm}^{-2}$ ), de modo a tornar possível a comparação do crescimento das células sobre a superfície dos materiais e nas placas de cultura.

O meio de cultura foi analisado para a determinação da concentração de fósforo e cálcio ionizados, ao longo dos 35 dias de cultura.

As culturas celulares não foram caracterizadas histoquimicamente pelo facto dos materiais possuírem na sua composição química cálcio e fosfato, o que falseia os resultados quanto à detecção de áreas mineralizadas; além disso, as amostras de ambos os biomateriais apresentavam uma cor azulada que não permitia a visualização das colorações histoquímicas.

Para uma melhor compreensão dos resultados, a proliferação/viabilidade celular, o conteúdo total de proteína, a actividade da fosfatase alcalina e os níveis de fósforo e cálcio ionizados no meio de cultura foram apresentados de duas maneiras diferentes: figuras a) e figuras b). As figuras a) apresentam os resultados de modo a comparar, para cada material (compósito ou HA), o efeito dos vários fármacos, enquanto que nas figuras b) os dados estão apresentados de maneira a comparar os dois materiais (compósito e HA) na mesma situação experimental.



## **ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os dados apresentados neste capítulo são o resultado de três experiências separadas, realizadas em culturas celulares obtidas a partir de três dadores diferentes de medula óssea (dadores de ambos os sexos, com idades compreendidas entre os 20-60 anos). Em cada uma das experiências, os ensaios bioquímicos foram efectuados em triplicado. Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão.

As médias obtidas nas várias experiências foram comparadas por uma análise de variância (ANOVA), tendo-se verificado a não existência de diferenças significativas entre as experiências realizadas. Em cada experiência, as diferenças estatísticas observadas entre as culturas em estudo e a cultura controlo respectiva foram determinadas pelo método de Bonferroni, em que os valores de  $p \leq 0.05$  foram considerados significativos.

## **3.2 – RESULTADOS**

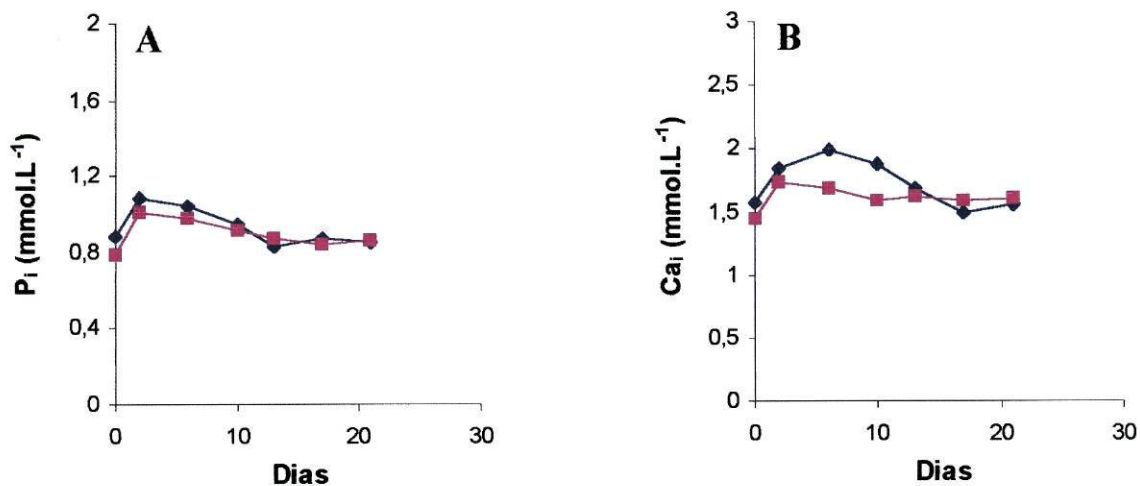
### Caracterização das amostras dos materiais durante o período de pré-imersão

#### ***Níveis de fósforo e cálcio ionizados no meio de cultura***

A imersão das amostras do compósito e da HA no meio de cultura durante 21 dias resultou num aumento das concentrações de fósforo e cálcio ionizados no meio, durante as duas primeiras semanas. Depois disso os níveis destas duas espécies no meio foram idênticos aos medidos antes de qualquer contacto com os materiais (Fig. 33). Estes resultados sugerem que a partir aproximadamente da terceira semana se atingiu um estado de equilíbrio entre a superfície dos materiais e o meio de cultura, pois que, os níveis de fósforo e cálcio ionizados medidos não são cumulativos, uma vez que o meio de cultura é totalmente substituído duas vezes por semana.

A imersão das amostras do compósito resultou num aumento das concentrações de fósforo e cálcio ionizados no meio de cultura aproximadamente durante os primeiros sete dias, após o que se observou uma diminuição dos níveis das duas espécies. Ao fim de aproximadamente duas semanas, os valores eram semelhantes aos observados no meio antes de qualquer contacto com as amostras (Fig. 33). As amostras da HA apresentaram uma variação dos níveis de fósforo e cálcio ionizados semelhante à observada para o

compósito, no entanto, a libertação de cálcio ionizado para o meio de cultura durante as duas primeiras semanas foi superior nas amostras da HA (Fig. 33).



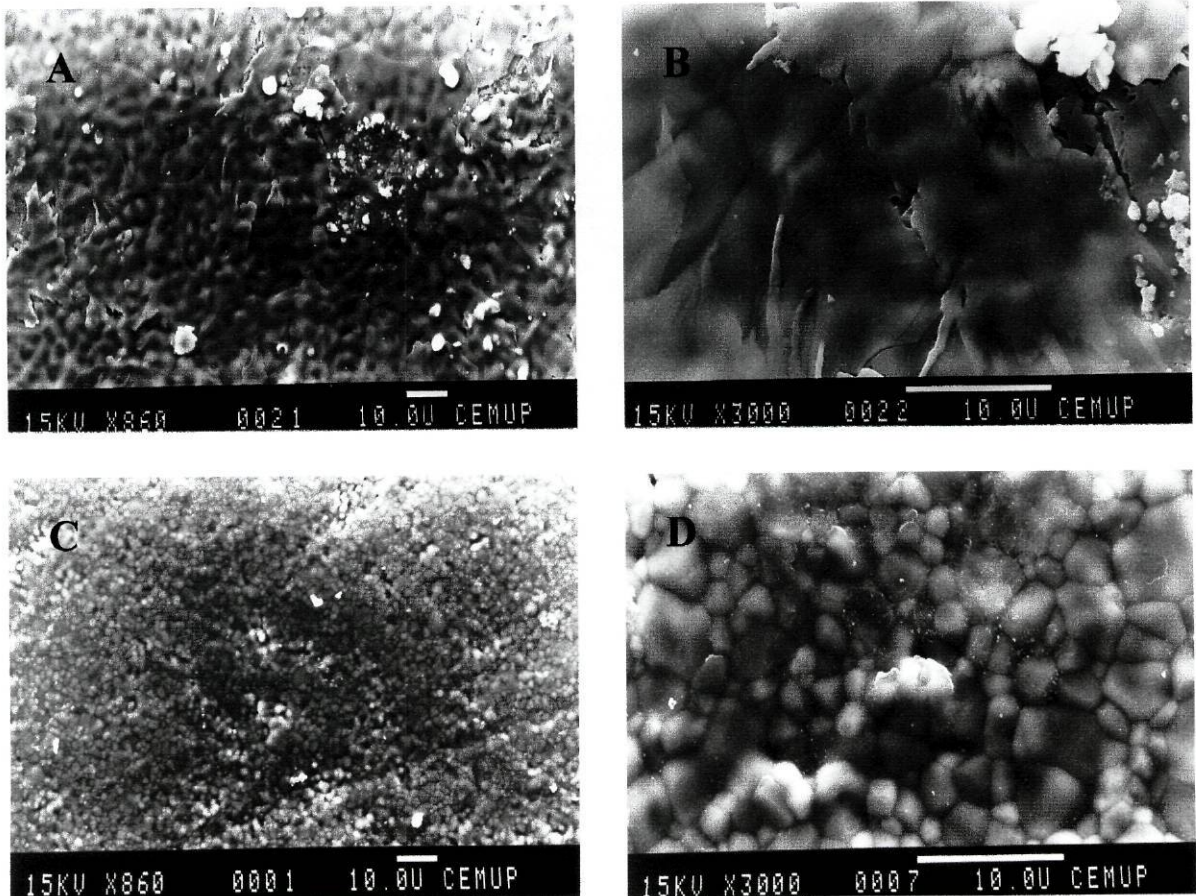
**Figura 33** – Níveis de fósforo (A) e cálcio (B) ionizados no meio de cultura recolhido das amostras do compósito de hidroxiapatite-biovidro (■) e da hidroxiapatite (◆), incubadas na ausência de células de medula óssea durante 21 dias.

Os desvios padrão observados foram < 20 %.

### ***Observação das amostras por MEV***

As reacções que ocorreram entre os materiais e o meio de cultura causaram alterações de superfície, que de acordo com vários estudos<sup>296</sup> correspondem à formação de uma camada de apatite, tal como é demonstrado pela observação das amostras por MEV. Na figura 34, mostra-se o aspecto de amostras do compósito de hidroxiapatite-biovidro antes e depois do tratamento de imersão. As alterações de superfície que ocorreram nas amostras da hidroxiapatite foram semelhante às observadas na superfície do compósito. Antes do tratamento de pré-imersão a superfície dos materiais era ligeiramente rugosa; após a imersão em meio de cultura, a superfície dos materiais ficou totalmente recoberta por pequenas partículas esféricas.



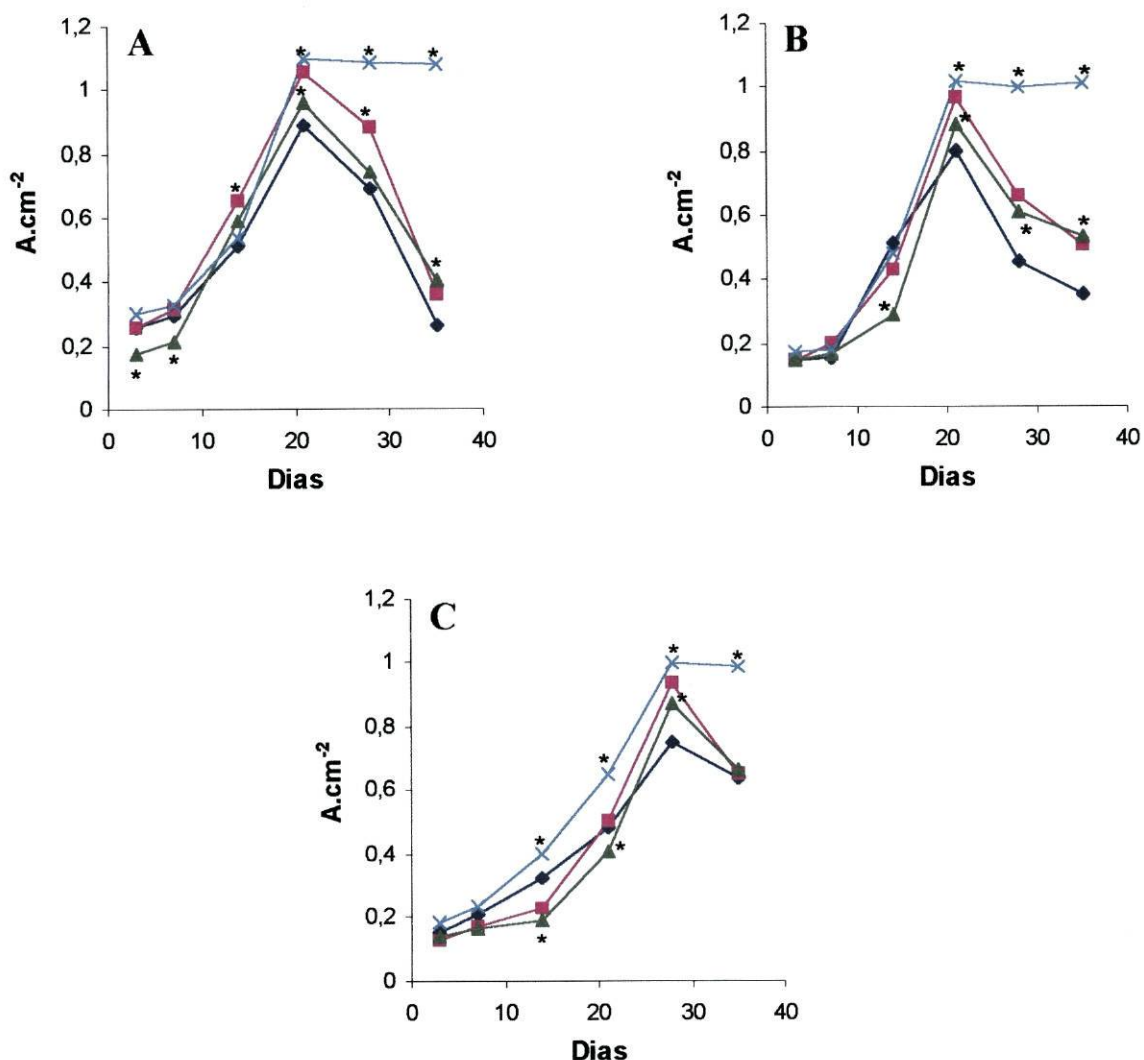


**Figura 34** – Fotografias de microscopia electrónica de varrimento de amostras do compósito de hidroxiapatite–biovidro, antes (A, B) e depois (C, D) de 21 dias de imersão em meio de cultura.

### **3.2.1 – Efeito da dexametasona, hormona da paratiróide e hormona do crescimento**

#### ***Proliferação/viabilidade celular***

A proliferação das culturas efectuadas na presença de AA +  $\beta$ -GF que cresceram na ausência de materiais aumentou gradualmente ao longo do tempo de incubação; o valor máximo de redução do MTT foi atingido ao dia 21, seguindo-se uma redução significativa do crescimento (Fig. 35a-A).



**Figura 35a** – Efeito da dexametasona (■), hormona da paratiróide (▲) e hormona do crescimento (×) na proliferação/viabilidade celular de culturas de células de medula óssea humana. Culturas efectuadas na ausência de materiais (A) e na superfície do compósito de hidroxiapatite–biovidro (B) e da hidroxiapatite (C); (◆) Culturas mantidas na presença de AA +  $\beta$ -GF (culturas controlo).

\*Significativamente diferente das culturas controlo. Os desvios padrão observados foram < 20 %.

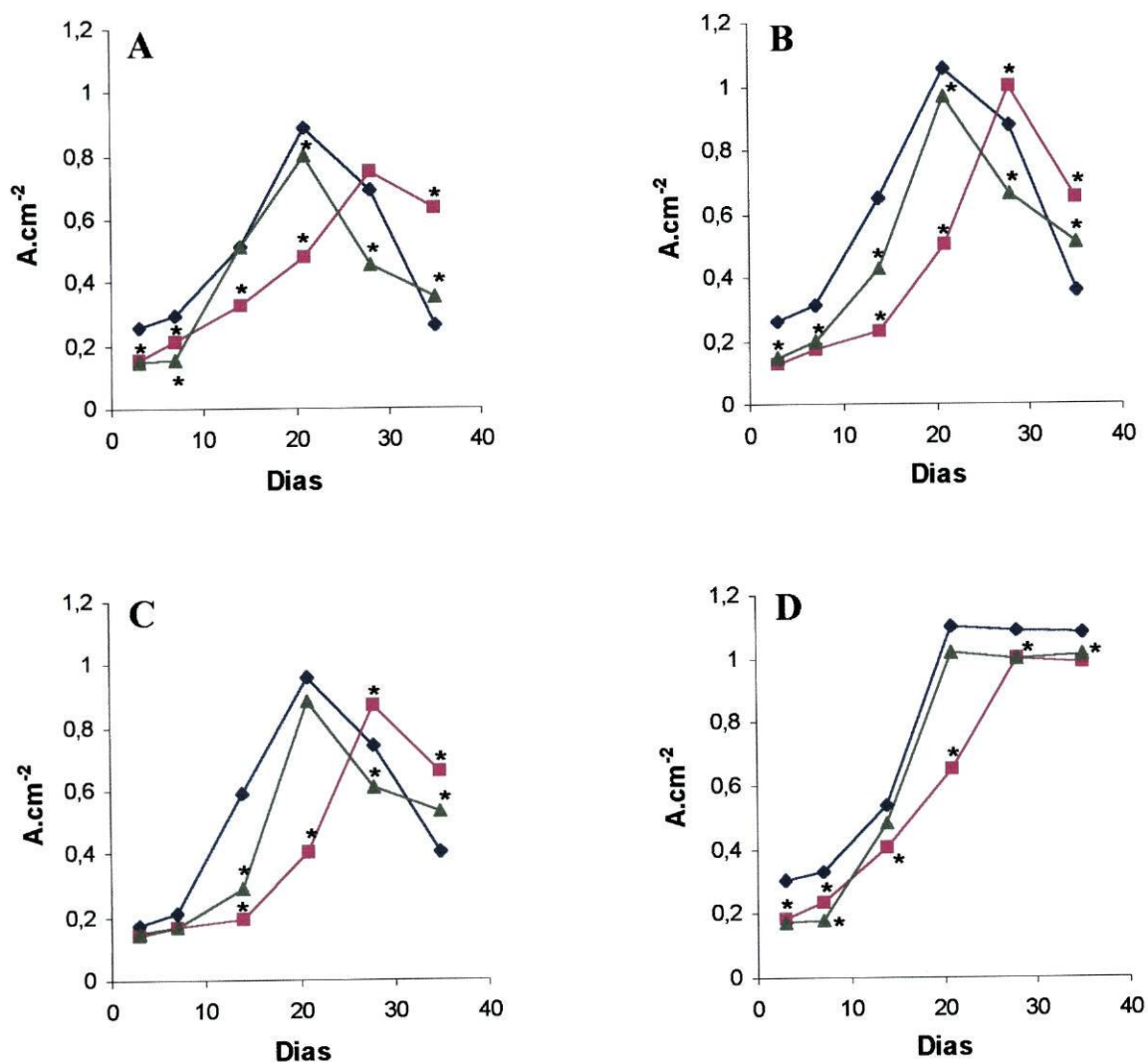
As culturas celulares tratadas com Dex ou com PTH apresentaram um padrão de proliferação semelhante, isto é, proliferaram continuamente até ao dia 21, após o que se observou uma diminuição significativa dos valores de redução do MTT. A presença de Dex resultou numa estimulação do crescimento celular durante todo o período de incubação. As células tratadas com PTH apresentaram, a partir da 3ª semana, valores de redução do MTT



ligeiramente superiores aos observados nas culturas efectuadas apenas na presença de AA +  $\beta$ -GF. Nas culturas celulares expostas à hormona do crescimento, observou-se uma indução da proliferação após a 2ª semana de cultura e o valor máximo de redução do MTT, atingido ao dia 21, foi significativamente superior ao observado nas culturas efectuadas na ausência da hormona; no entanto, a taxa de proliferação manteve-se mais ou menos estável até ao fim do período de cultura.

A presença de Dex, PTH e hormona do crescimento nas culturas efectuadas sobre o compósito (Fig. 35a-B) e HA (Fig. 35a-C) resultou num efeito semelhante ao observado nas culturas que cresceram na ausência dos materiais, durante todo o tempo de incubação. Este efeito traduziu-se por um aumento da proliferação celular que foi mais evidente nos dias 21 e 28, respectivamente nas culturas efectuadas sobre o compósito e HA. No entanto, nas culturas que cresceram sobre a HA, a hormona do crescimento causou um aumento da proliferação desde o início do período de incubação.

Na figura 35b comparam-se os resultados obtidos para a proliferação celular relativos às culturas que cresceram na ausência de materiais e na superfície do compósito e HA nas várias situações experimentais, nomeadamente, ausência (Fig. 35b-A) e presença de Dex, PTH ou hormona do crescimento (respectivamente, Figs. 35b-B, C e D). A análise destes resultados mostra que as culturas efectuadas na superfície do compósito apresentaram, em todas as situações testadas, uma curva de proliferação semelhante à observada nas culturas que cresceram na ausência de material. No entanto, as culturas que cresceram na superfície do compósito apresentaram valores de proliferação celular inferiores, especialmente durante as duas primeiras semanas, nomeadamente as culturas tratadas com Dex ou PTH. No que diz respeito às culturas efectuadas na superfície da HA, observou-se que este material parece causar algum atraso no crescimento celular, uma vez que as culturas que cresceram na ausência (Fig. 35b-A) ou na presença das hormonas (Figs. 35b-B, C e D) apresentaram valores de redução do MTT mais baixos e o valor máximo foi atingido mais tarde (dia 28) do que nas culturas efectuadas na ausência de materiais ou sobre o compósito. No entanto, o valor máximo de redução do MTT foi semelhante nos dois materiais (e ligeiramente inferior ao observado nas culturas efectuadas na ausência dos materiais).



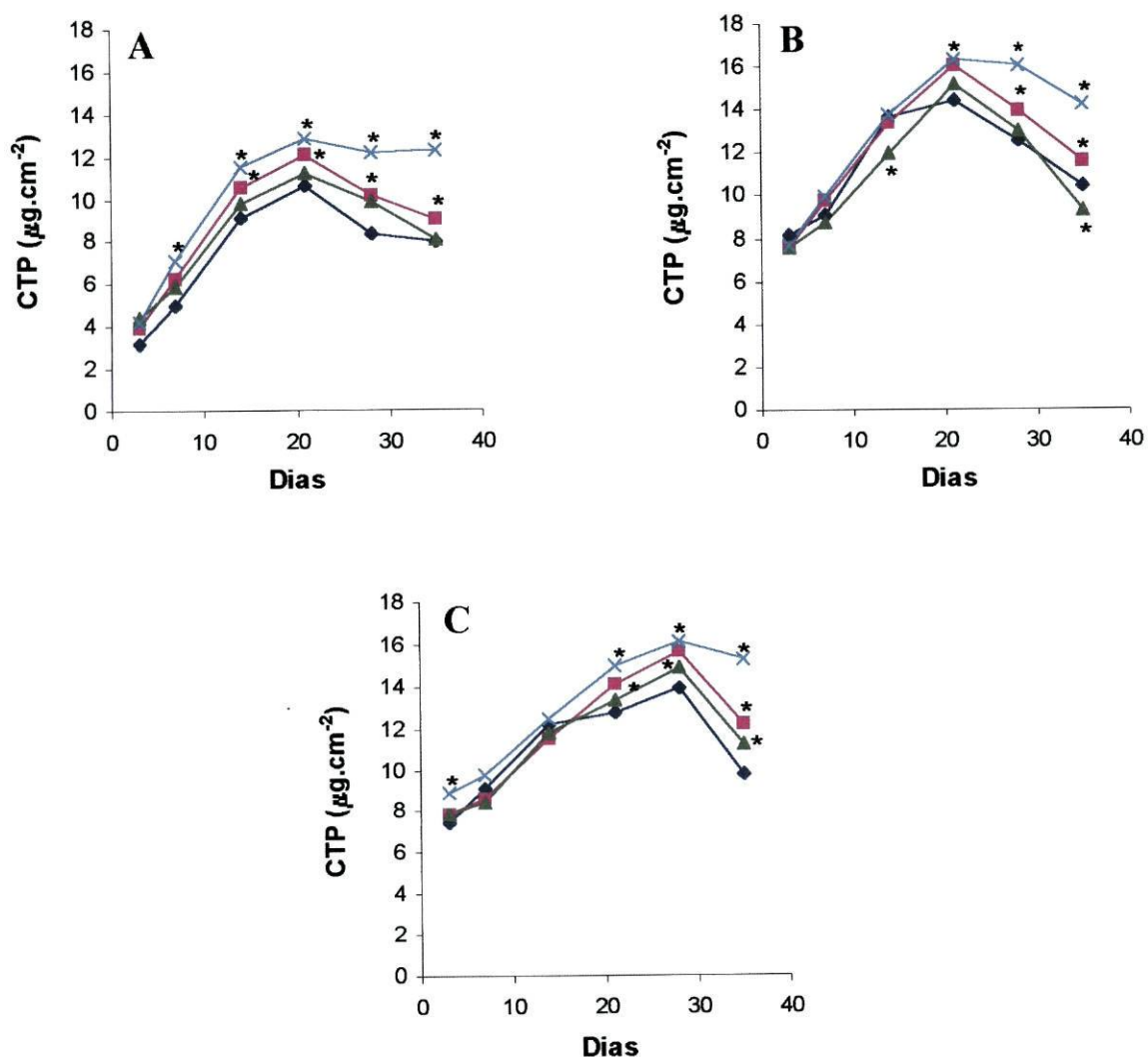
**Figura 35b** – Proliferação/viabilidade celular de culturas de células de medula óssea humana mantidas em situação controlo (AA +  $\beta$ -GF) (A), na presença de dexametasona (B), hormona da paratiróide (C) e hormona do crescimento (D). Culturas efectuadas na ausência de materiais ( $\blacklozenge$ ) e na superfície do composto de hidroxiapatite-biovidro ( $\blacktriangle$ ) e da hidroxiapatite ( $\blacksquare$ )

\*Significativamente diferente das culturas efectuadas na ausência de materiais. Os desvios padrão observados foram < 20 %.

### **Conteúdo total de proteína**

Nas células cultivadas na presença de AA +  $\beta$ -GF e na ausência de materiais, o conteúdo total de proteína aumentou ao longo do tempo de incubação, verificando-se a tendência para uma redução dos valores registados a partir do dia 21 (Fig. 36a-A).



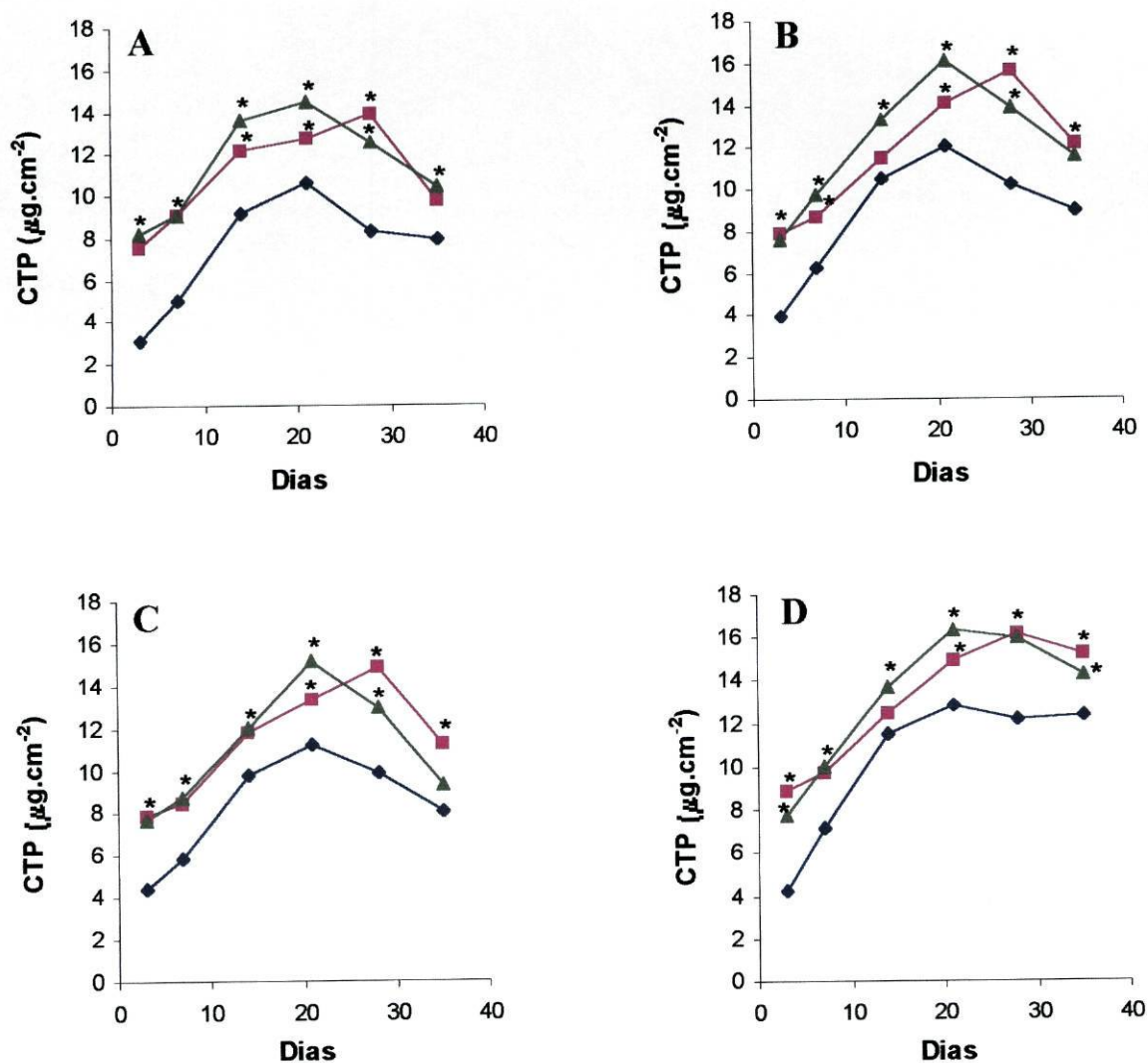


**Figura 36a** – Efeito da dexametasona (■), hormona da paratiróide (▲) e hormona do crescimento (×) no conteúdo total de proteína de culturas de células de medula óssea humana. Culturas efectuadas na ausência de materiais (A) e na superfície do composto da hidroxiapatite–biovidro (B) e de hidroxiapatite (C); (◆) Culturas mantidas na presença de AA + β-GF (culturas controlo).

\*Significativamente diferente das culturas controlo. Os desvios padrão observados foram < 20 %.

O conteúdo total proteico das culturas tratadas com as hormonas seguiu um padrão semelhante. Contudo, a partir da 3<sup>a</sup> semana do período de incubação, os valores obtidos mantiveram-se aproximadamente constantes nas culturas expostas à hormona do crescimento, enquanto que nas restantes culturas se observou uma diminuição. A presença adicional de Dex, PTH ou hormona do crescimento resultou num aumento deste parâmetro

(Fig. 36a-A); a ordem de grandeza do efeito das hormonas foi idêntico ao observado para o ensaio do MTT. O conteúdo total de proteína das culturas efectuadas na superfície dos materiais (compósito e HA), nas diversas situações experimentais, ausência e presença das hormonas, seguiu um padrão semelhante ao observado para a proliferação celular (Figs. 36a-B e C).



**Figura 36b** – Conteúdo total de proteína de culturas de células de medula óssea humana mantidas em situação controlo (AA + β-GF) (A), na presença de dexametasona (B), hormona da paratiróide (C) e hormona do crescimento (D). Culturas efectuadas na ausência de materiais (♦) e na superfície do compósito de hidroxiapatite–biovidro (▲) e da hidroxiapatite (■)

\*Significativamente diferente das culturas efectuadas na ausência de materiais. Os desvios padrão observados foram < 20 %.



As culturas que cresceram sobre os materiais testados apresentaram um conteúdo total proteico superior ao observado nas culturas mantidas na ausência de qualquer material, para todas as situações experimentais utilizadas (Fig. 36b). Tal facto deve-se provavelmente à adsorção de quantidades significativas de proteínas durante a pré-imersão em meio de cultura. Esta observação sugere que a quantidade de proteína medida nas culturas que cresceram sobre os materiais inclui a proteína adsorvida pelo próprio material e a resultante do crescimento celular. Observou-se ainda que as culturas que cresceram sobre o compósito apresentaram um conteúdo total de proteína ligeiramente superior ao observado nas células cultivadas sobre a HA, nas mesmas condições experimentais (Fig. 36b).

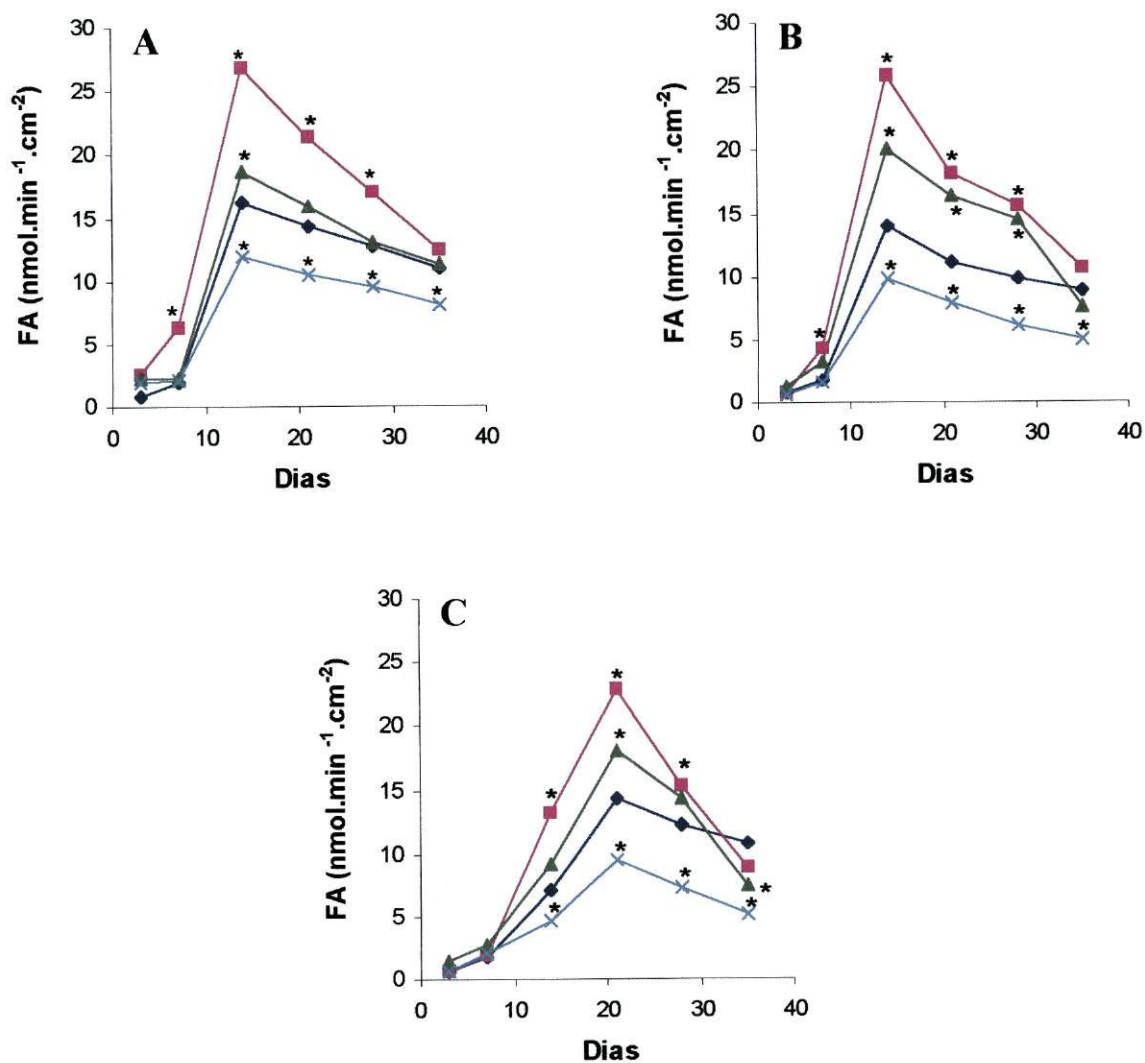
Resultados semelhantes a estes foram obtidos em trabalhos anteriores, com células de medula óssea humana cultivadas sobre amostras de titânio revestidas com hidroxiapatite e com um compósito HA–biovidro de composição ligeiramente diferente do compósito aqui utilizado<sup>297</sup>.

### ***Actividade da fosfatase alcalina***

A actividade da fosfatase alcalina nas culturas efectuadas apenas na presença de AA +  $\beta$ -GF e na ausência de materiais foi relativamente baixa nos primeiros sete dias, aumentou significativamente até atingir o nível máximo de resposta ao dia 14 e baixou a partir da terceira semana até ao fim do período de incubação (Fig. 37a-A). A exposição das culturas à Dex resultou numa significativa estimulação da actividade da enzima durante a 2ª semana e o valor máximo foi atingido por volta do dia 14, seguindo-se uma redução brusca dos níveis obtidos. Nas células cultivadas na presença de PTH, observou-se um aumento da actividade da fosfatase alcalina, embora os valores atingidos fossem inferiores aos registados nas culturas expostas ao glucocorticóide; após atingir o nível máximo ao dia 14, a actividade da enzima diminuiu significativamente. Os níveis de fosfatase alcalina nas culturas tratadas com hormona do crescimento foram sempre inferiores aos obtidos nas culturas controlo durante todo o período de incubação, apesar de seguir um padrão semelhante ao observado nas culturas efectuadas na ausência da hormona (Fig. 37a-A).

Nas culturas efectuadas na superfície do compósito (Fig. 37a-B) e HA (Fig. 37a-C), a presença de Dex, PTH e hormona do crescimento causou um efeito na actividade da fosfatase alcalina semelhante ao observado nas culturas que cresceram na ausência dos materiais (Fig. 37a-A). Na presença de Dex e PTH, o aumento que se verificou foi superior ao observado na proliferação celular, resultados que sugerem que estas hormonas, e

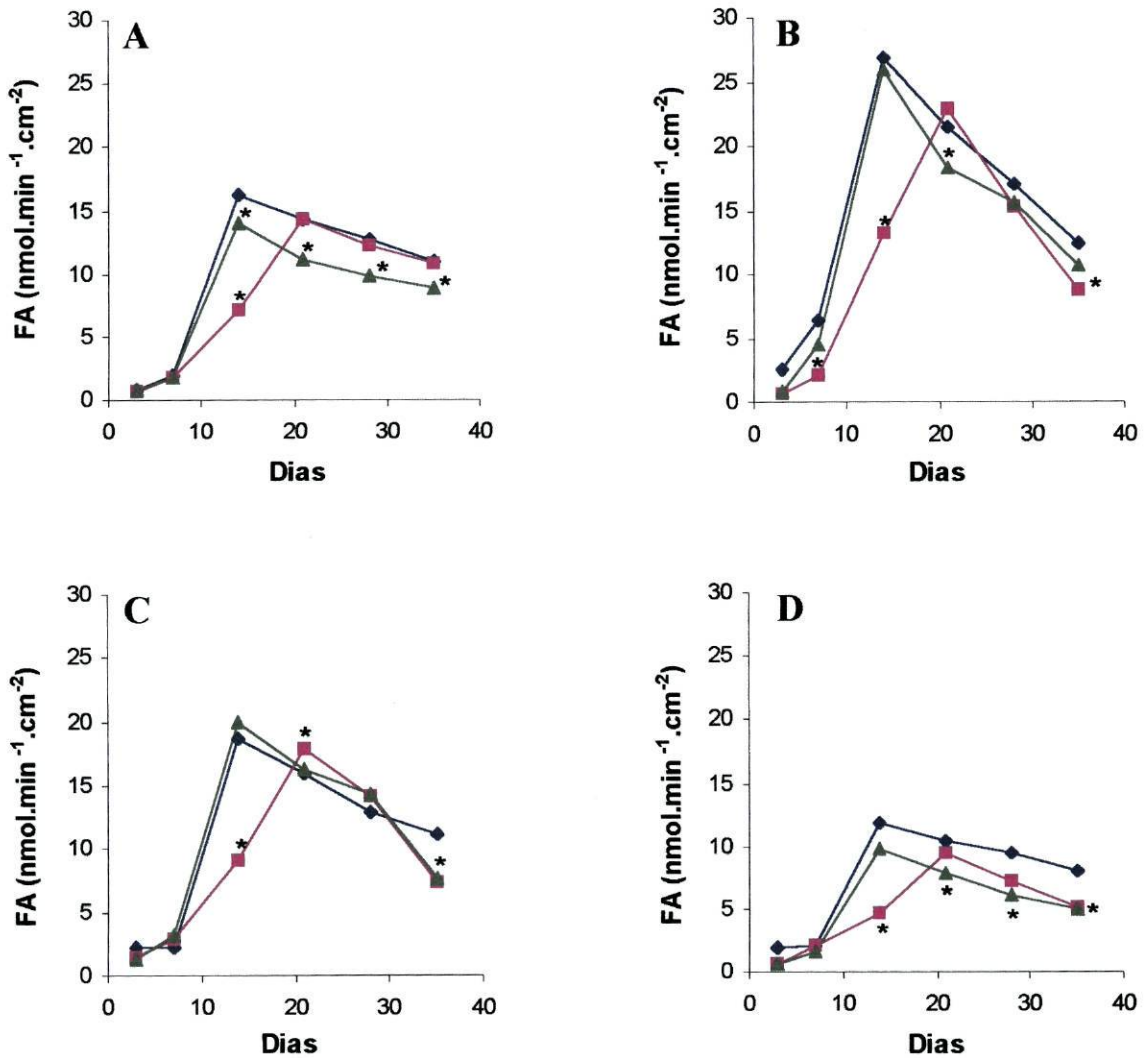
especialmente a Dex, provocam uma indução na expressão deste marcador osteoblástico. Nas culturas que cresceram sobre o composto a indução na actividade da fosfatase alcalina causada pela PTH foi superior à observada nas culturas que cresceram na ausência de materiais. A população celular que cresceu na presença da hormona do crescimento apresentou níveis de fosfatase alcalina inferiores aos observados nas culturas controlo.



**Figura 37a** – Efeito da dexametasona (■), hormona da paratiróide (▲) e hormona do crescimento (×) na actividade da fosfatase alcalina de culturas de células de medula óssea humana. Culturas efectuadas na ausência de materiais (A) e na superfície do composto de hidroxiapatite–biovidro (B) e da hidroxiapatite (C); (◆) Culturas mantidas na presença de AA +  $\beta$ -GF (culturas controlo).

\*Significativamente diferente das culturas controlo. Os desvios padrão observados foram < 20 %.





**Figura 37b** – Actividade da fosfatase alcalina de culturas de células de medula óssea humana mantidas em situação controlo (AA +  $\beta$ -GF) (A), na presença de dexametasona (B), hormona da paratiróide (C) e hormona do crescimento (D). Culturas efectuadas na ausência de materiais ( $\blacklozenge$ ) e na superfície do compósito de hidroxiapatite-biovidro ( $\blacktriangle$ ) e da hidroxiapatite ( $\blacksquare$ ).

\*Significativamente diferente das culturas efectuadas na ausência de materiais. Os desvios padrão observados foram < 20 %.

Na figura 37b compara-se o comportamento do compósito e da HA na mesma situação experimental. À semelhança do que se observou na proliferação celular, as culturas efectuadas sobre o compósito apresentaram um comportamento semelhante ao observado nas culturas que cresceram sobre o poliestireno da placa de cultura; na ausência de

hormonas, os níveis de fosfatase alcalina foram ligeiramente mais baixos, mas na presença das hormonas a actividade da enzima foi semelhante durante todo o tempo de incubação. As culturas que cresceram na superfície da hidroxiapatite apresentaram um atraso na expressão da fosfatase alcalina; os níveis da enzima começaram a aumentar mais tarde e o valor máximo foi atingido no dia 28, isto é, uma semana após o observado nas culturas que cresceram na superfície do compósito. A actividade máxima da enzima foi semelhante nas culturas que cresceram sobre o compósito e a hidroxiapatite em todas as situações, excepto nas culturas tratadas com Dex em que o glucocorticóide provocou uma maior indução da expressão da enzima nas culturas que cresceram sobre o compósito.

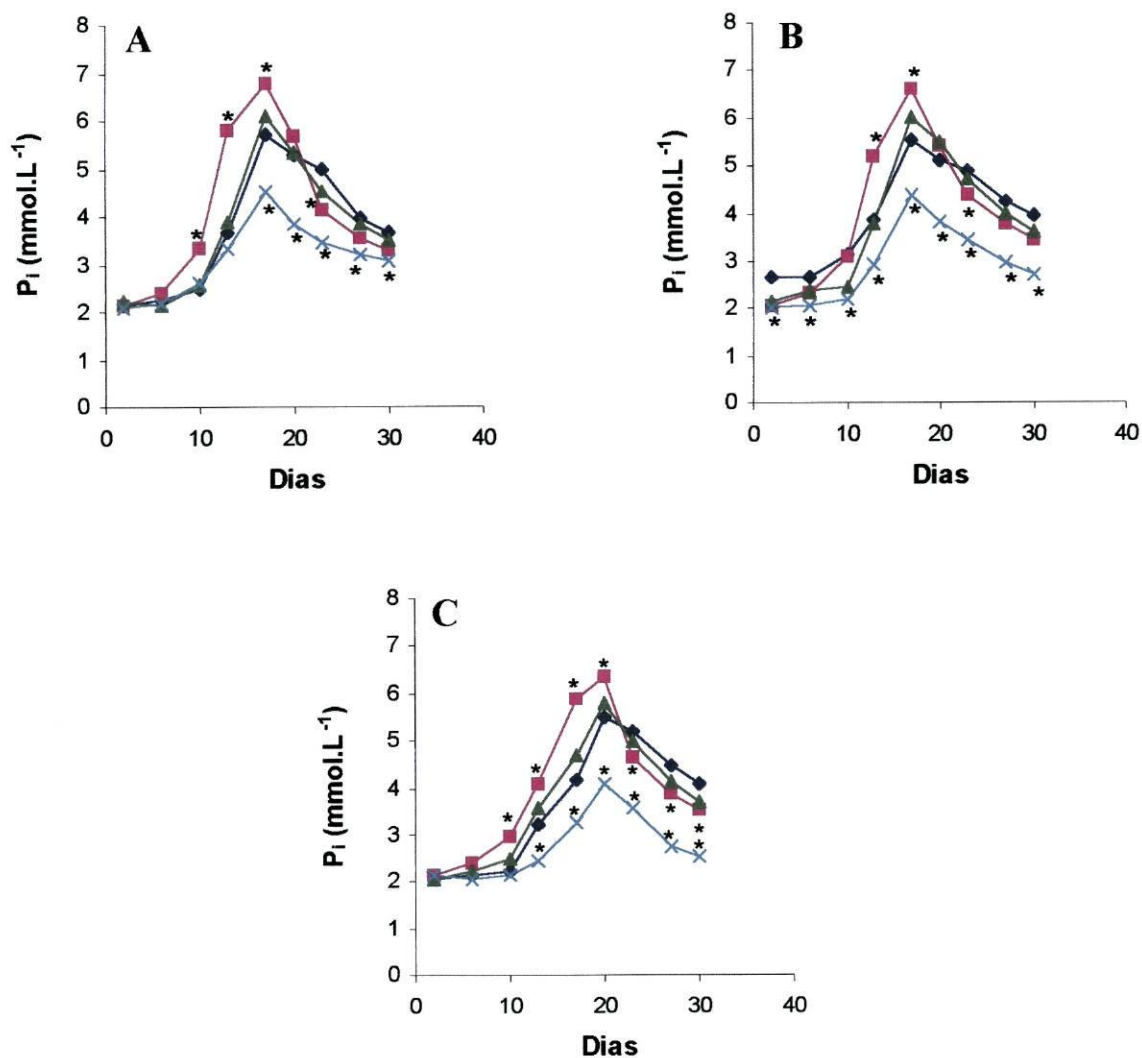
### ***Níveis de fósforo e cálcio ionizados no meio de cultura***

Nas figuras 38 e 39 apresentam-se, respectivamente, os valores observados para as concentrações de fósforo e cálcio ionizados no meio recolhido das culturas celulares efectuadas nas várias situações experimentais.

O meio de cultura recolhido das culturas efectuadas na presença de AA +  $\beta$ -GF e na ausência de materiais mostrou uma variação insignificante nos níveis de cálcio ionizado durante os primeiros 17 dias da cultura (Fig. 39a-A) enquanto que a concentração de fósforo inorgânico aumentou significativamente durante este período (Fig. 38a-A). Contudo, a partir do dia 17 observou-se uma redução significativa nos níveis das duas espécies iónicas, o que provavelmente reflecte o processo de mineralização. As culturas que cresceram na presença de Dex e de PTH apresentaram um padrão de variação dos níveis de cálcio e fósforo ionizados semelhante ao observado nas culturas efectuadas apenas na presença de AA +  $\beta$ -GF; no entanto, o aumento dos níveis de fósforo ionizado foi superior nas culturas tratadas com Dex. O valor máximo de fósforo ionizado nas culturas tratadas com Dex e PTH foi atingido ao dia 17, após o que se observou uma diminuição significativa até ao fim do período de incubação; o consumo das duas espécies iónicas foi maior nas culturas expostas ao glucocorticóide, comparativamente com as culturas que cresceram apenas na presença de AA +  $\beta$ -GF, seguindo-se as culturas tratadas com PTH. Nas culturas expostas à hormona do crescimento, os níveis de fósforo ionizado aumentaram gradualmente até ao dia 17, mas as concentrações observadas foram relativamente baixas; os níveis de cálcio e de fósforo ionizados baixaram a partir do dia 17.



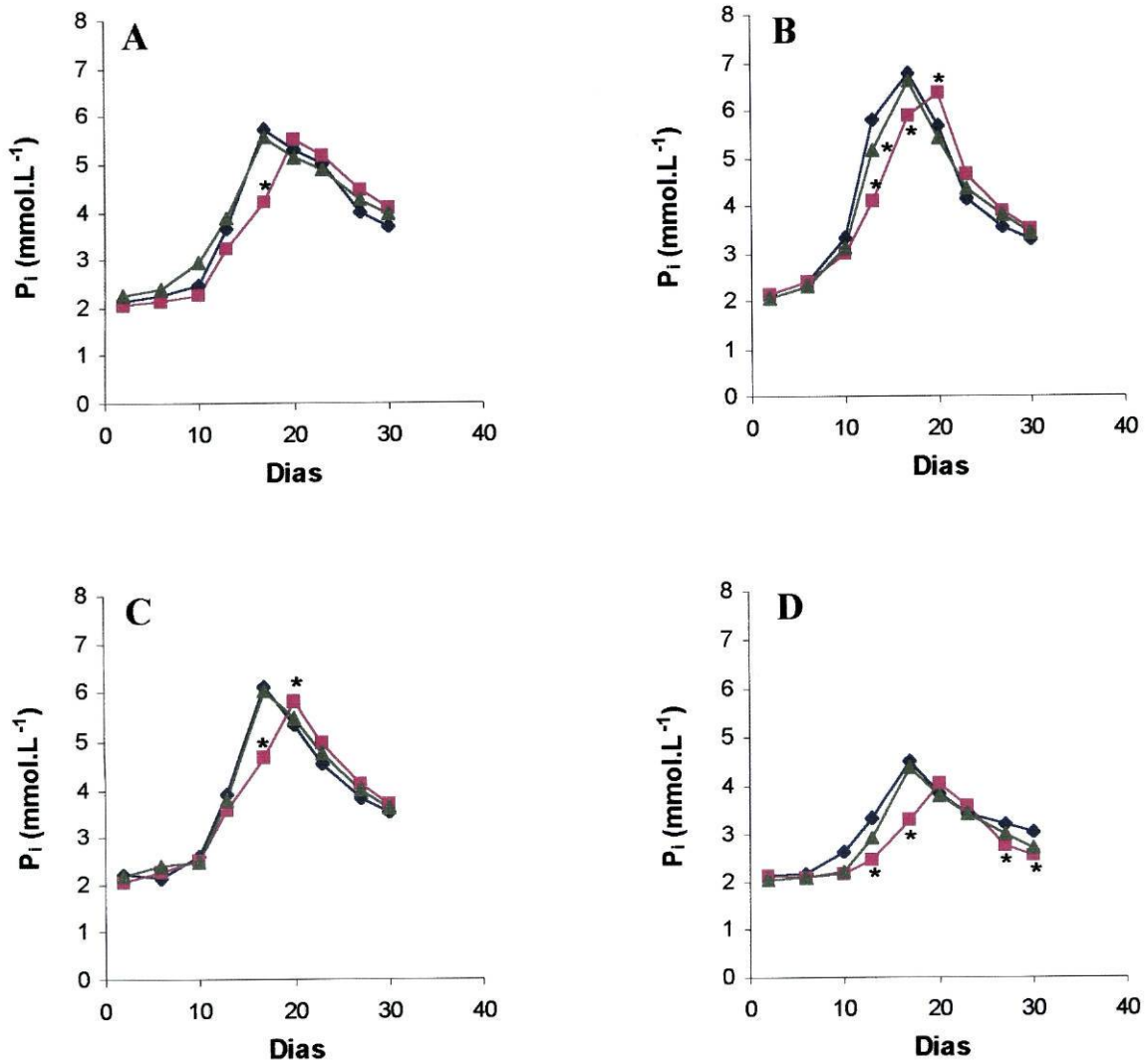
O padrão de variação dos níveis de fósforo e cálcio ionizados determinados no meio recolhido das culturas efectuadas sobre o compósito (Figs. 38a-B e 39a-B) e HA (Figs. 38a-C e 39a-C) foi idêntico ao observado nas culturas que cresceram na ausência de materiais (Figs. 38a-A e 39a-A), tanto na ausência como na presença de Dex, PTH ou hormona do crescimento.



**Figura 38** – Níveis de fósforo ionizado no meio de cultura recolhido ao longo do período de incubação.

a) Efeito da dexametasona (■), hormona da paratiróide (▲) e hormona do crescimento (×) nos níveis de fósforo ionizado em culturas efectuadas na ausência de materiais (A) e culturas efectuadas na superfície do compósito de hidroxiapatite–biovidro (B) e da hidroxiapatite (C). (◆) Culturas mantidas na presença de AA + β-GF (culturas controlo).

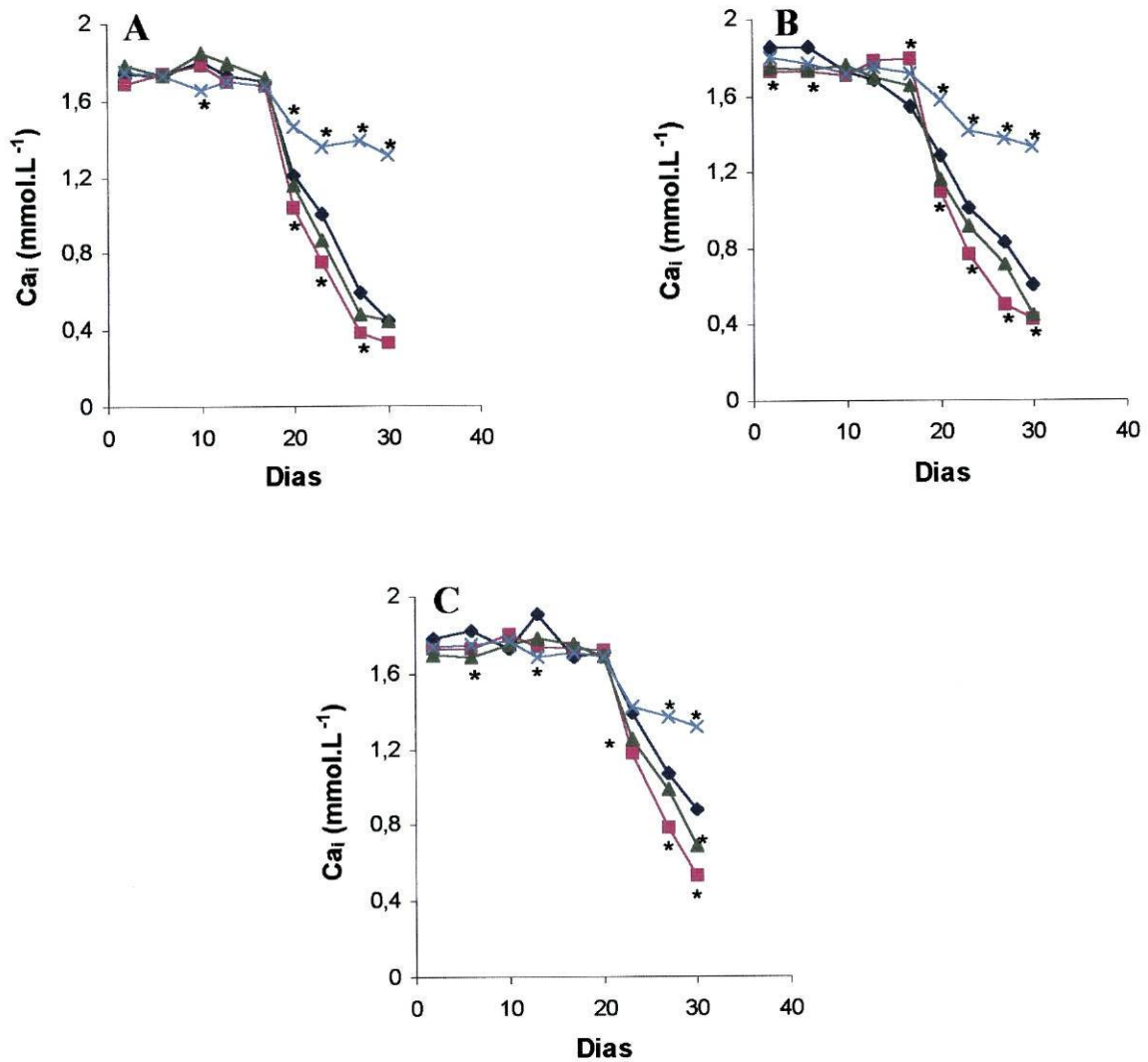
\*Significativamente diferente das culturas controlo. Os desvios padrão observados foram < 20 %.



b) Níveis de fósforo ionizado no meio recolhido de culturas de células de medula óssea humana mantidas em situação controlo (AA +  $\beta$ -GF) (A), na presença de dexametasona (B), hormona da paratiróide (C) e hormona do crescimento (D). Culturas efectuadas na ausência de materiais ( $\blacklozenge$ ) e na superfície do compósito de hidroxiapatite-biovidro ( $\blacktriangle$ ) e da hidroxiapatite ( $\blacksquare$ ).

\*Significativamente diferente das culturas efectuadas na ausência de materiais. Os desvios padrão observados foram < 20 %.



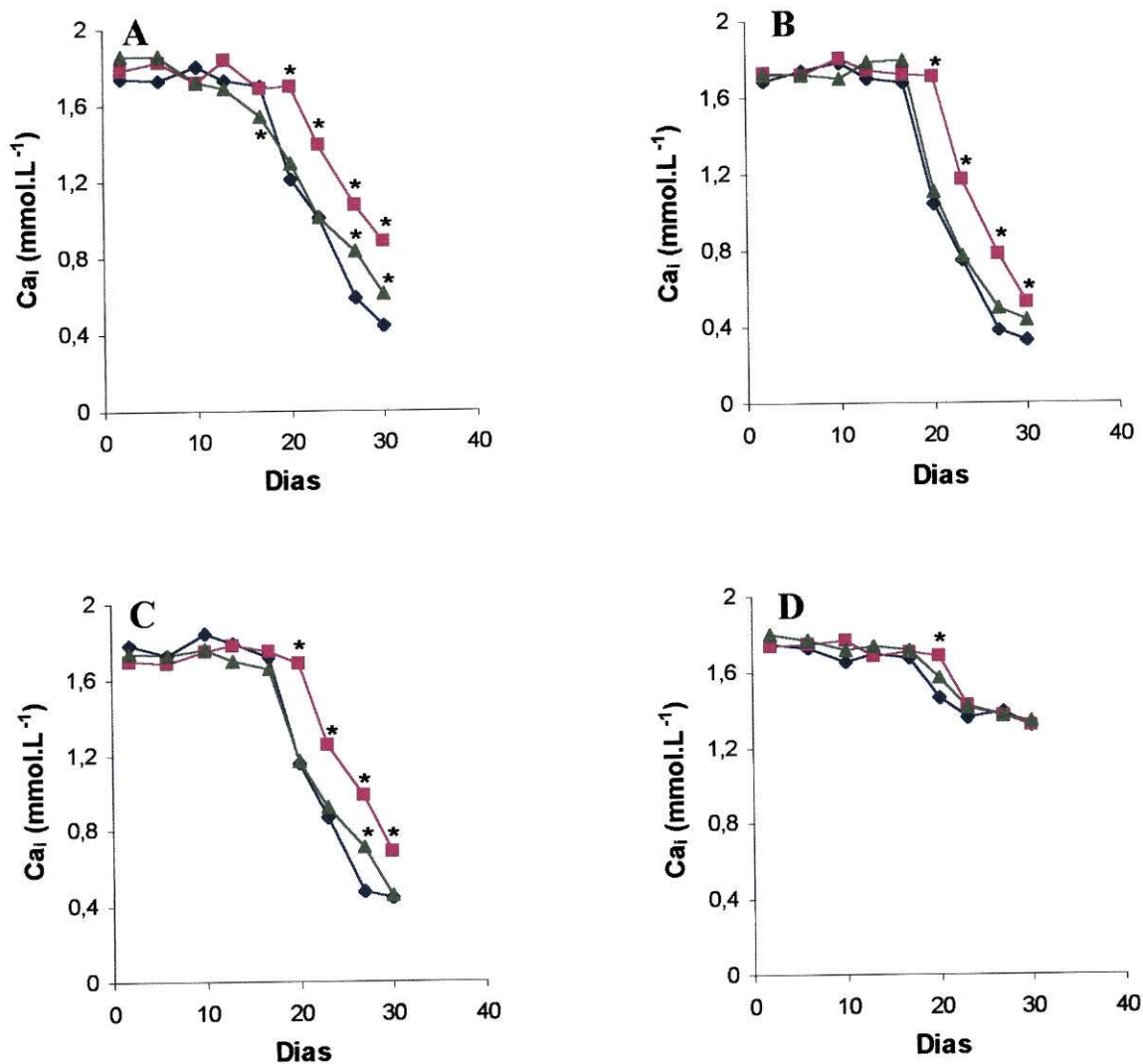


**Figura 39 –** Níveis de cálcio ionizado no meio de cultura recolhido ao longo do período de incubação. a) Efeito da dexametasona (■), hormona da paratiróide (▲) e hormona do crescimento (×) nos níveis de cálcio ionizado em culturas efectuadas na ausência de materiais (A) e culturas efectuadas na superfície do compósito de hidroxiapatite–biovidro (B) e da hidroxiapatite (C). (◆) Culturas mantidas na presença de AA + β-GF (culturas controlo).

\*Significativamente diferente das culturas controlo. Os desvios padrão observados foram < 20 %.

As figuras 38b e 39b mostram que as culturas que cresceram sobre o compósito apresentaram um comportamento muito semelhante ao observado nas que cresceram na superfície de poliestireno da placa de cultura em todas as situações experimentais (ausência e presença das hormonas). Contudo, nas culturas que cresceram sobre a HA, o aumento dos

níveis de fósforo ionizado foi menor, a concentração máxima foi atingida mais tarde e a redução dos níveis de cálcio e fósforo que se seguiu foi menos acentuada, o que sugere uma mineralização mais tardia e menos intensa nestas culturas.



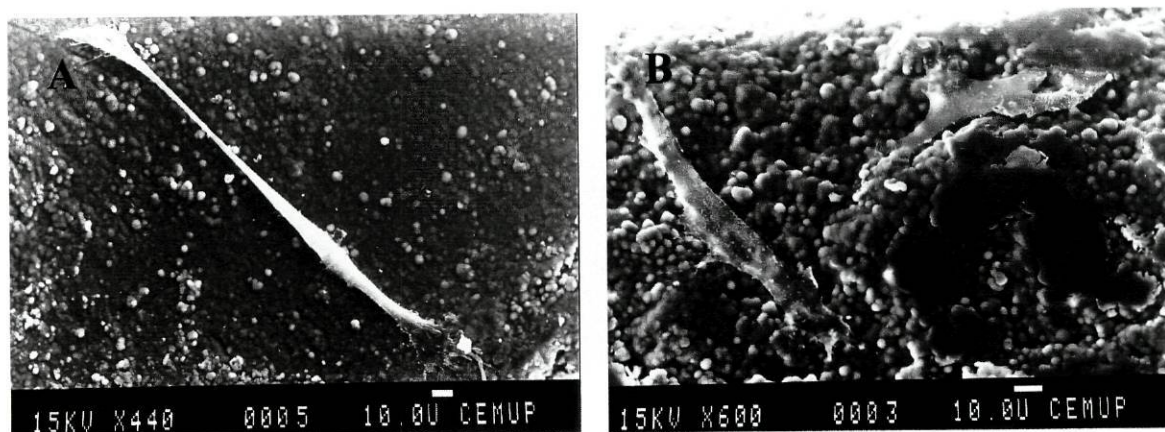
b) Níveis de cálcio ionizado no meio recolhido de culturas de células de medula óssea humana mantidas em situação controlo (AA +  $\beta$ -GF) (A), na presença de dexametasona (B), hormona da paratiróide (C) e hormona do crescimento (D). Culturas efectuadas na ausência de materiais (♦) e na superfície do composto de hidroxiapatite-biovidro (▲) e da hidroxiapatite (■).

\*Significativamente diferente das culturas efectuadas na ausência de materiais. Os desvios padrão observados foram < 20 %.



### ***Formação de depósitos de fosfato de cálcio***

As células osteoblásticas cultivadas na superfície dos biomateriais aderiram, proliferaram e secretaram uma matriz extracelular que mineralizou. Ao fim de 24 horas de incubação, as células cultivadas sobre o compósito apresentavam uma morfologia fibroblástica (Fig. 40A) mas, nas culturas com 7 dias, já demonstravam um aspecto poligonal (Fig. 40B), sugerindo um desenvolvimento no processo de diferenciação osteoblástica. Esta evolução na morfologia celular também foi observada nas culturas efectuadas na superfície da hidroxiapatite.

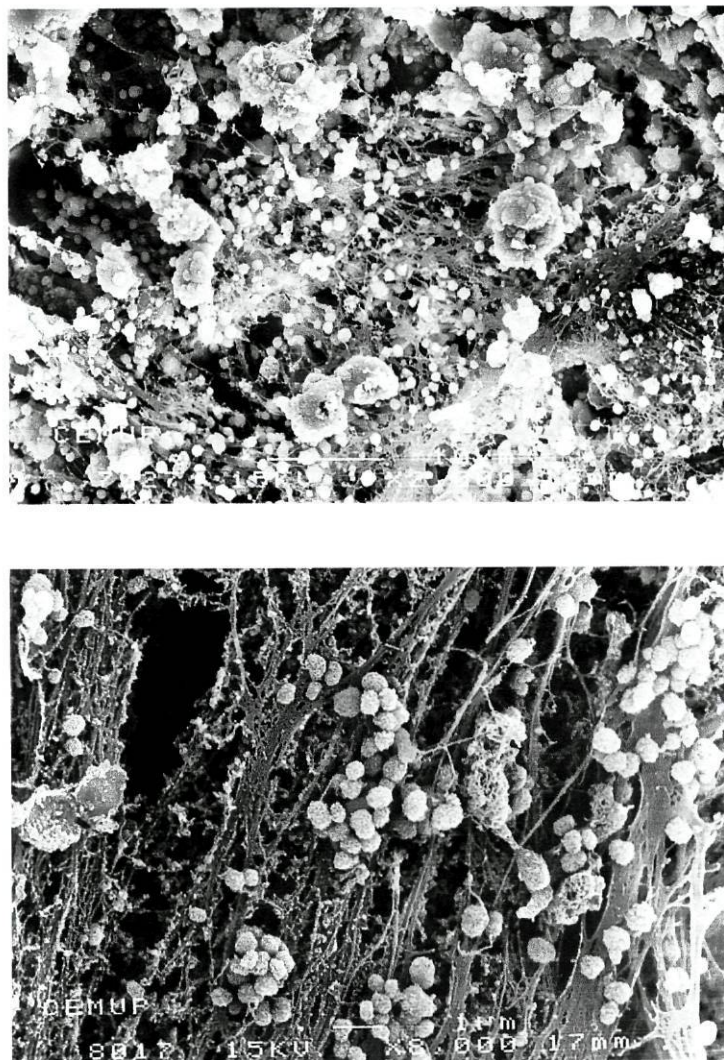


**Figura 40** – Fotografias de microscopia electrónica de varrimento de culturas de células osteoblásticas de medula óssea humana efectuadas na superfície do compósito de hidroxiapatite–biovidro ao fim de 24 horas (A) e 7 dias (B) de incubação.

A formação de depósitos de fosfato de cálcio nas culturas celulares mantidas nas diversas condições experimentais foi avaliada através da sua observação por MEV (Fig. 41).

A observação das culturas efectuadas na ausência de materiais mostrou que a proliferação das células de medula óssea foi acompanhada pela produção de uma matriz extracelular fibrilar e que as culturas de 21 dias apresentaram numerosas estruturas minerais globulares que, através de microanálise por raios X, mostraram conter Ca e P (Fig. 42). As culturas efectuadas na superfície do compósito apresentaram um comportamento semelhante, isto é, presença de estruturas minerais aos 21 dias de cultura. No entanto, as culturas que cresceram sobre a HA mineralizaram mais tarde e apenas as culturas de 28 dias mostraram a presença de estruturas minerais. Estes resultados foram observados nas culturas que

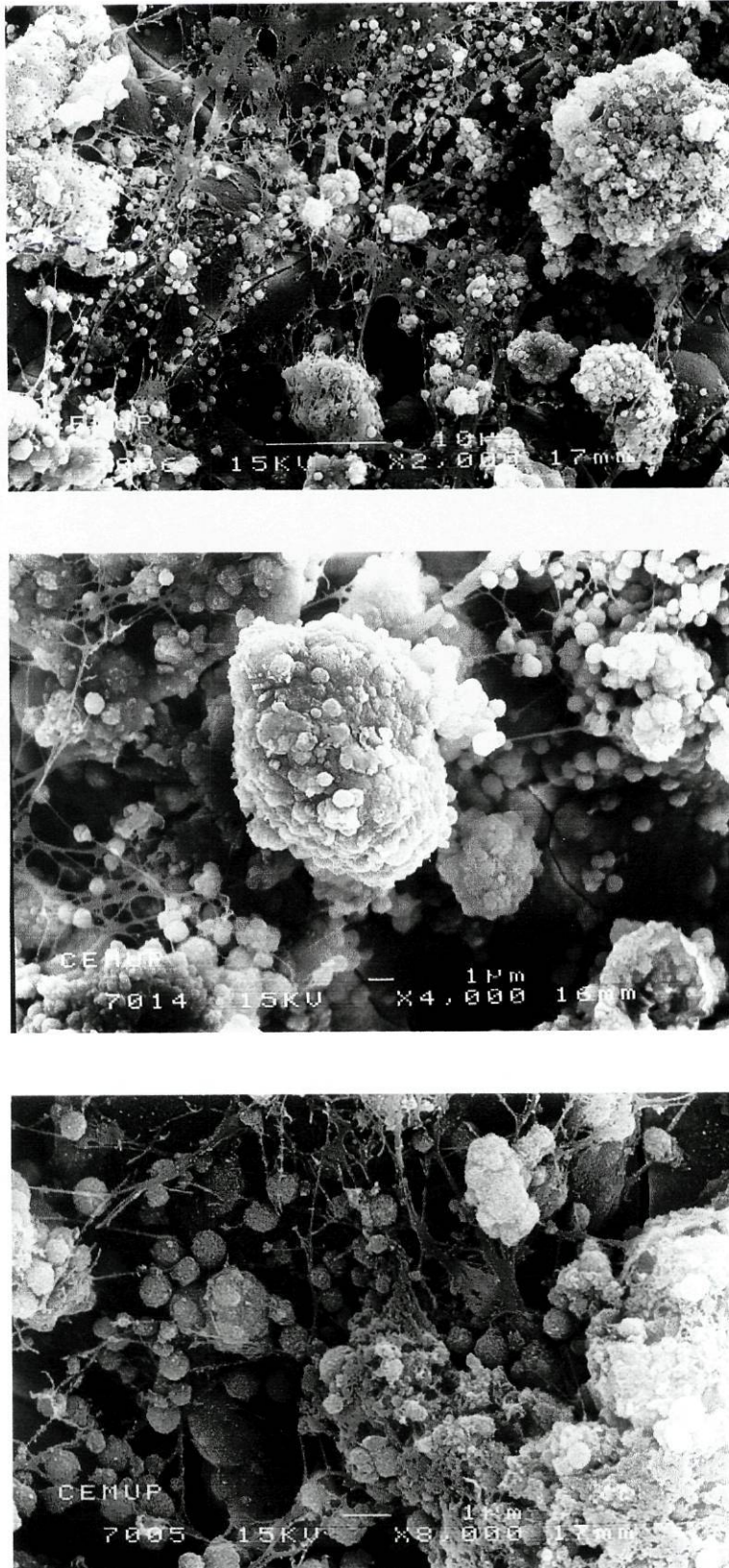
creceram na ausência de hormonas e nas que foram tratadas com Dex ou PTH; contudo, as culturas apresentaram uma mineralização mais extensa quando expostas à dexametasona, comparativamente com as culturas mantidas na presença da PTH. Nas culturas celulares tratadas com hormona do crescimento, a formação de depósitos de fosfato de cálcio foi tardia (5ª semana de cultura).



**Figura 41** – Fotografias de microscopia electrónica de varrimento de culturas de células osteoblásticas de medula óssea humana tratadas com dexametasona.

a) Culturas efectuadas na ausência de materiais, 21 dias.





**Figura 41 – b)** Culturas efectuadas na superfície do composto de hidroxiapatite–biovidro, 21 dias.

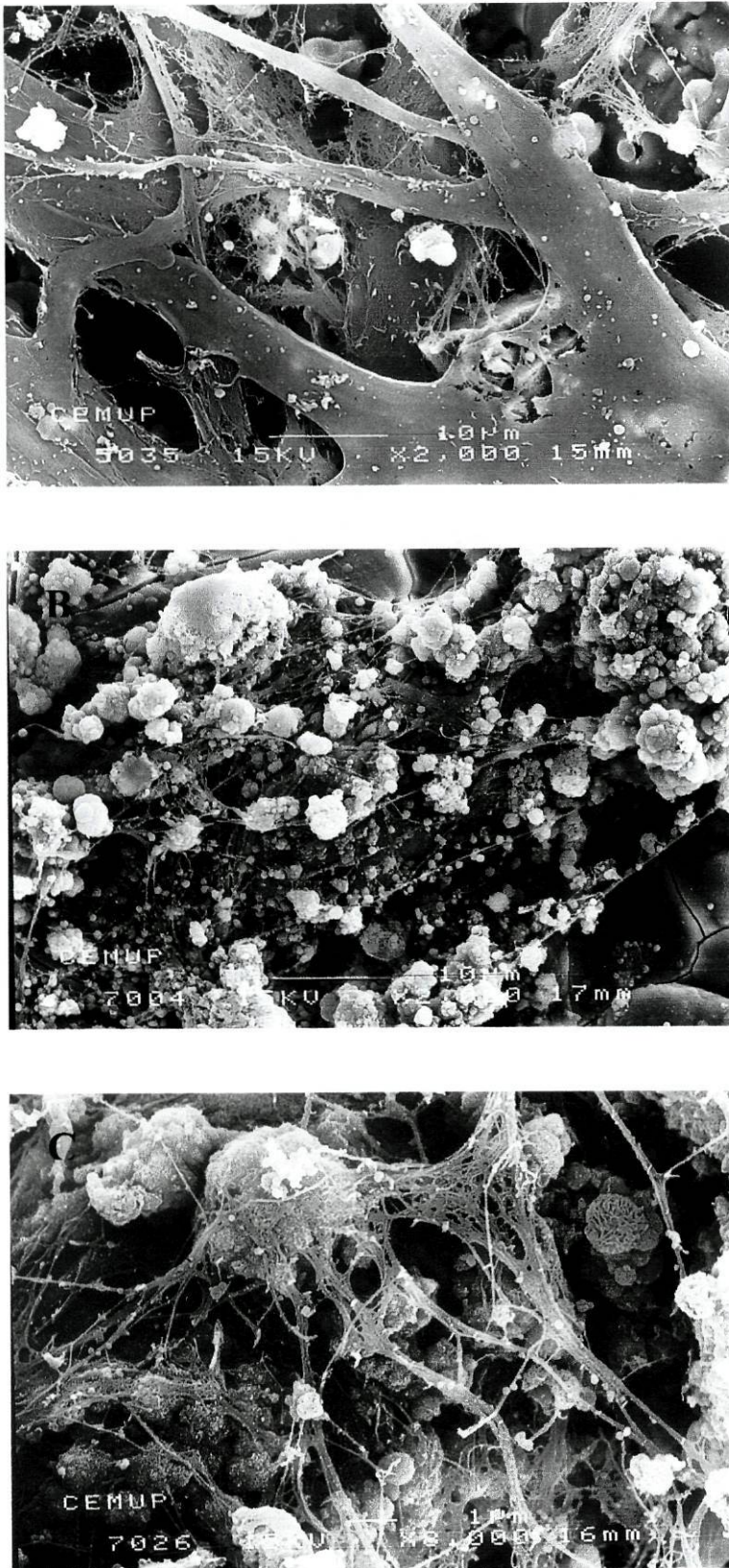
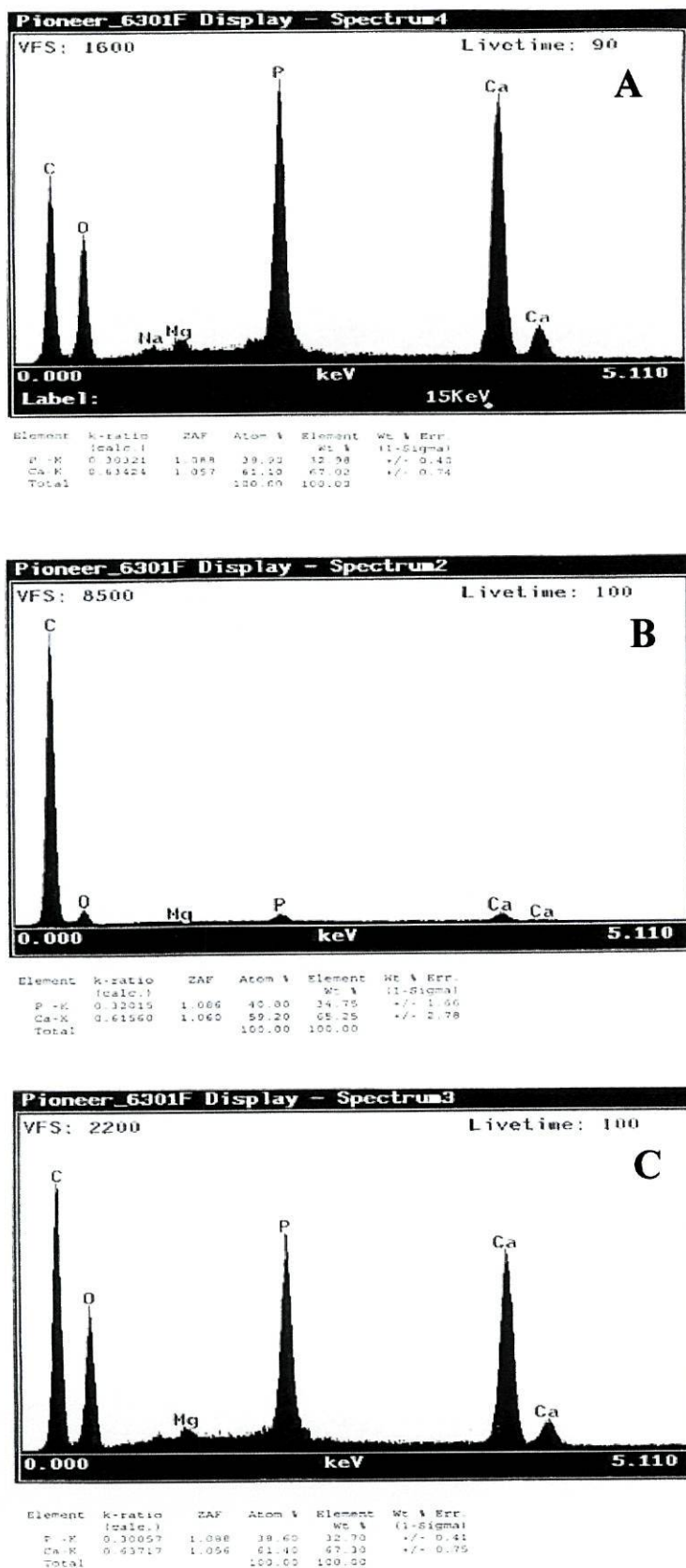


Figura 41 – c) Culturas efectuadas na superfície da hidroxiapatite, 21 (A) e 28 (B e C) dias.



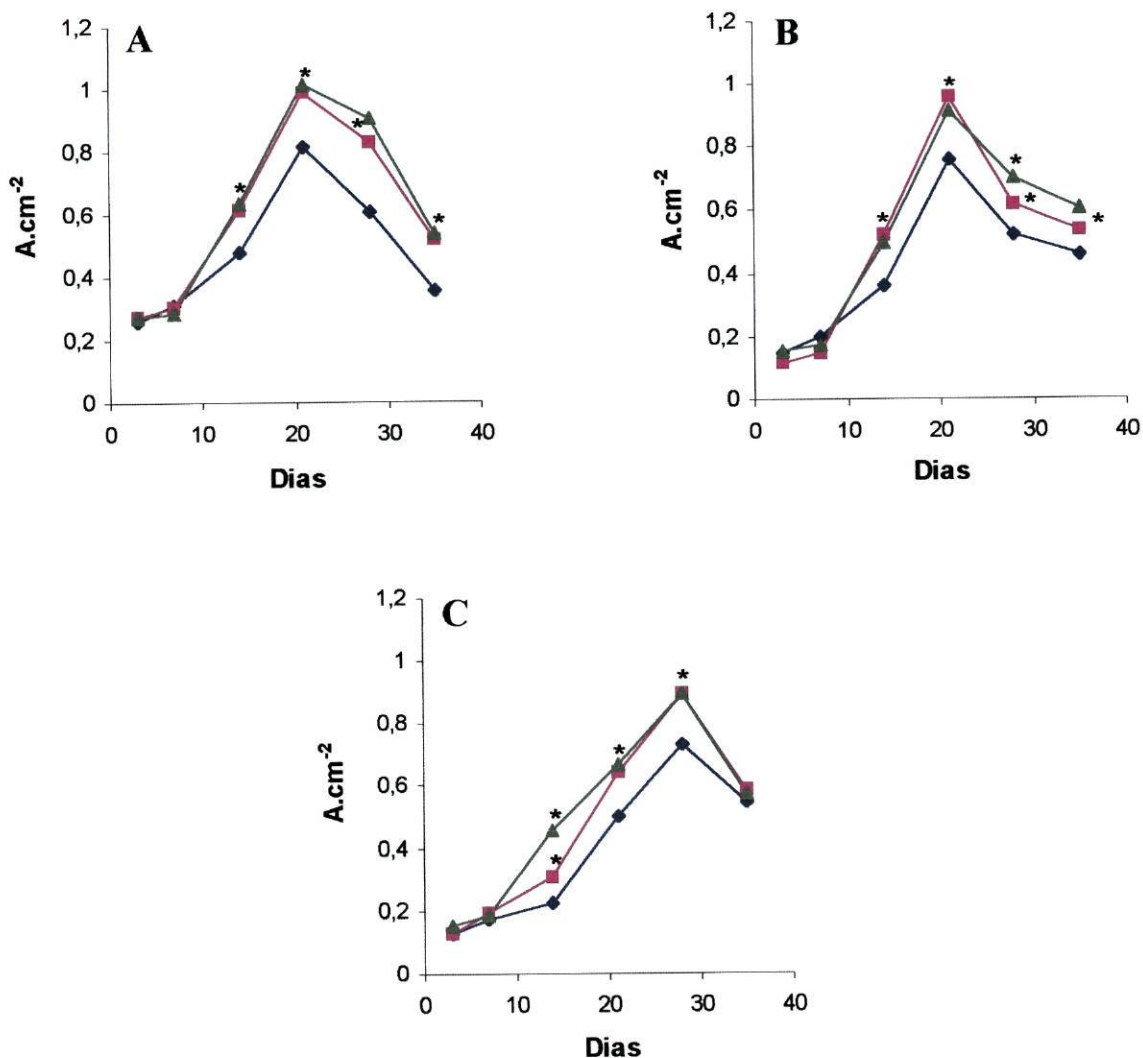


**Figura 42** – Espectro de raios X das estruturas minerais presentes nas culturas tratadas com dexametasona. Culturas efectuadas na superfície do compósito de hidroxiapatite–biovidro (A, 21 dias) e da hidroxiapatite (B, 21 e C, 28 dias).

### 3.2.2 – Efeito da doxiciclina e minociclina

Neste estudo, as células de medula óssea humana foram cultivadas na presença de AA +  $\beta$ -GF + Dex na ausência de materiais e na superfície do compósito e da HA. Estas culturas foram mantidas por 35 dias e tratadas com  $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de doxiciclina ou  $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de minociclina durante todo o tempo de incubação.

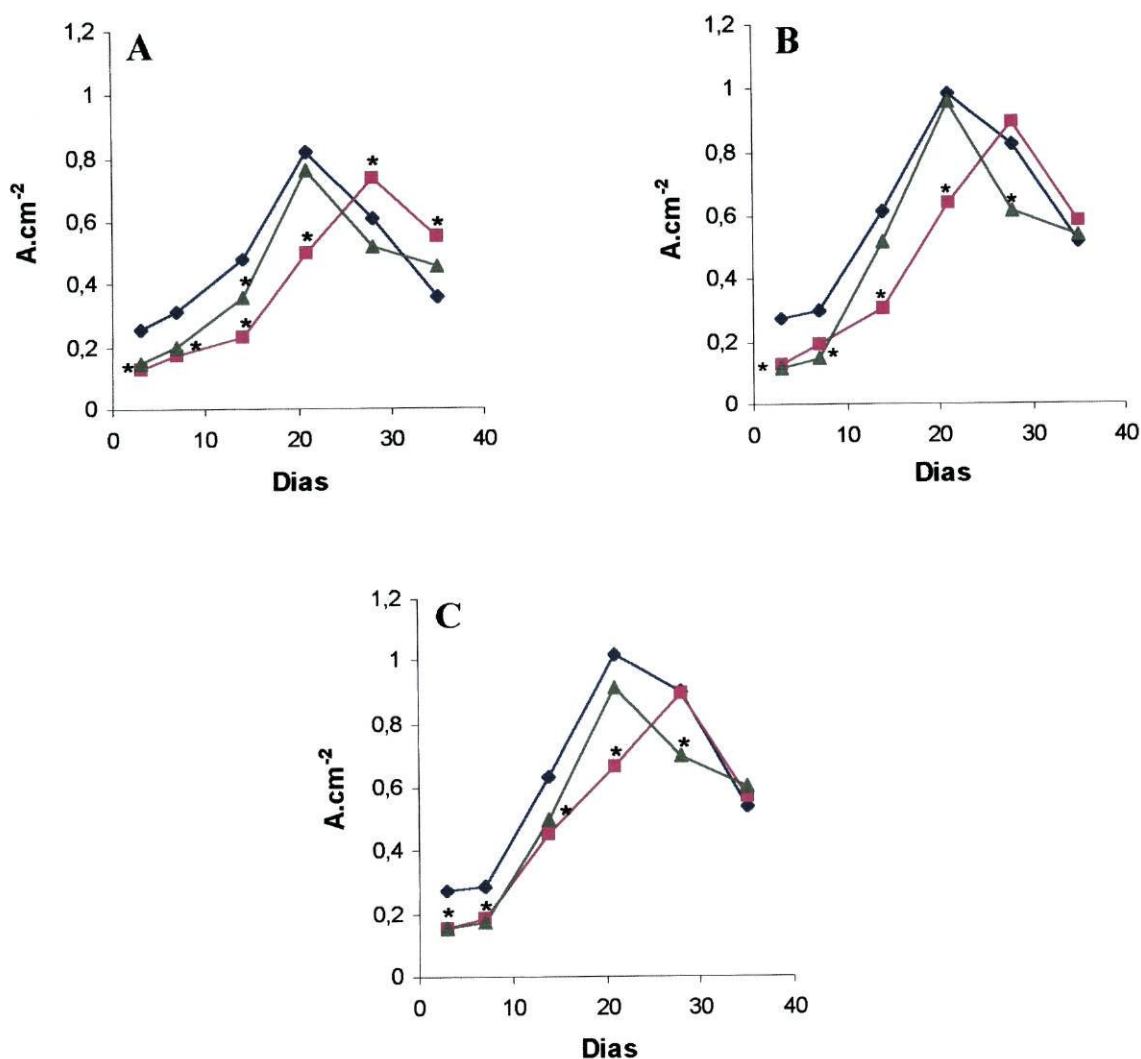
#### *Proliferação/viabilidade celular*



**Figura 43a** – Efeito da doxiciclina (■) e minociclina (▲) na proliferação/viabilidade celular de culturas de células de medula óssea humana. Culturas efectuadas na ausência de materiais (A) e na superfície do compósito de hidroxiapatite-biovidro (B) e da hidroxiapatite (C); (◆) Culturas mantidas na presença de AA +  $\beta$ -GF + Dex (culturas controlo).

\*Significativamente diferente das culturas controlo. Os desvios padrão observados foram < 20 %.





**Figura 43b** – Proliferação/viabilidade celular de culturas de células de medula óssea humana mantidas em situação controlo (AA +  $\beta$ -GF + Dex) (A), na presença de doxiciclina (B) e minociclina (C). Culturas efectuadas na ausência de materiais (◆) e na superfície do composto de hidroxiapatite-biovidro (▲) e da hidroxiapatite (■)

\*Significativamente diferente das culturas efectuadas na ausência de materiais. Os desvios padrão observados foram < 20 %.

As culturas efectuadas na presença de AA +  $\beta$ -GF + Dex e na ausência de materiais proliferaram gradualmente até ao dia 21, seguindo-se uma redução do crescimento celular (Fig. 43a-A). A exposição das células à doxiciclina e minociclina resultou num aumento deste parâmetro a partir da 2<sup>a</sup> semana; os valores máximos de redução do MTT foram

também atingidos ao dia 21 e verificou-se uma diminuição significativa do crescimento durante a 4<sup>a</sup> e 5<sup>a</sup> semanas de incubação.

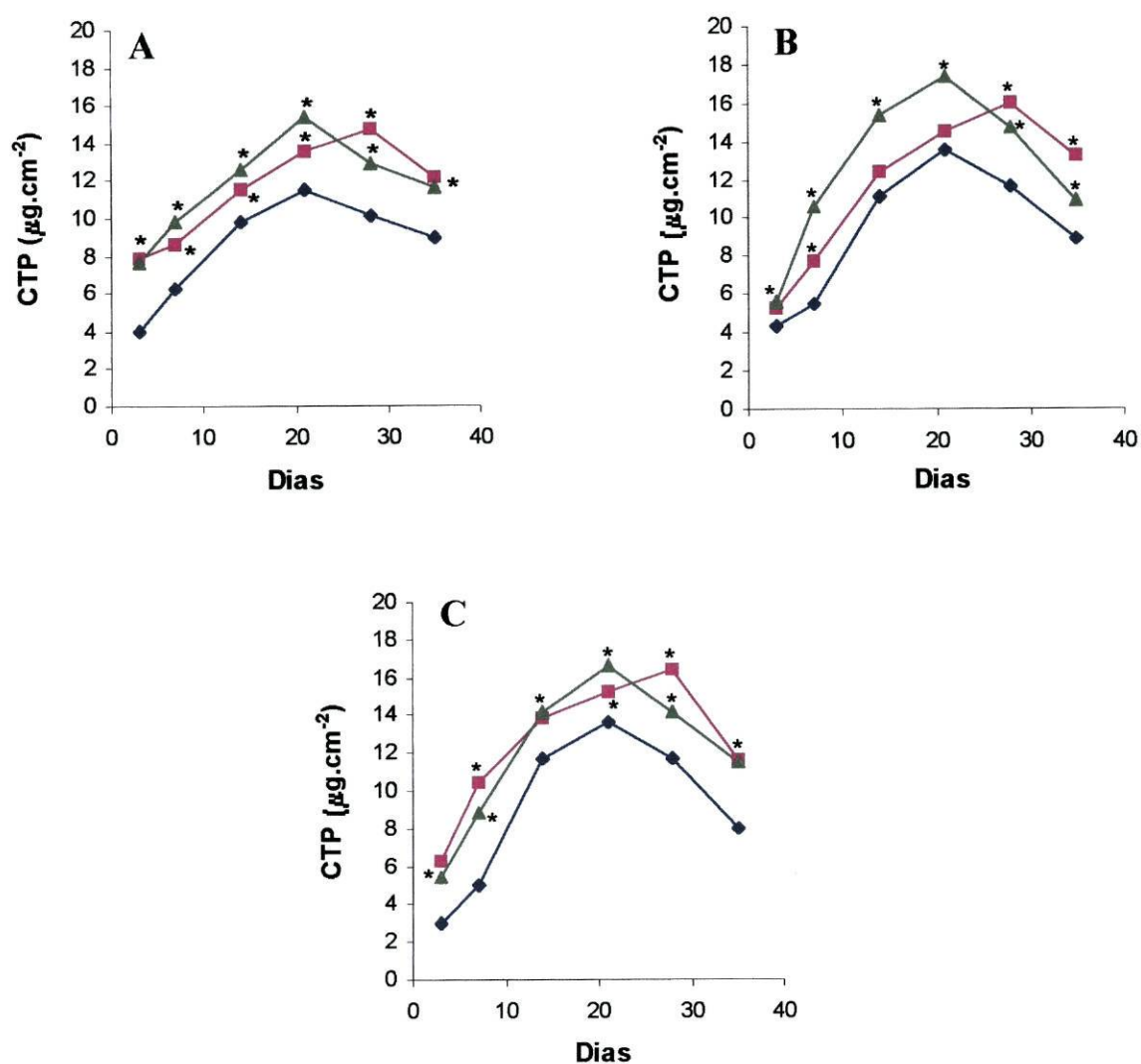
A presença de doxiciclina e minociclina provocou o mesmo tipo de efeito nas culturas efectuadas na superfície do compósito (Fig. 43a-B) e da HA (Fig. 43a-C). No entanto, a presença dos dois antibióticos causou uma maior indução da proliferação celular nas culturas que cresceram sobre a HA durante a 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> semanas, comparativamente ao efeito observado nas culturas efectuadas sobre o compósito.

A figura 43b compara o comportamento das culturas efectuadas sobre o compósito e HA para a mesma situação experimental, isto é, na presença de doxiciclina (A) e de minociclina (B). As culturas que cresceram sobre o compósito têm um padrão de proliferação celular semelhante ao observado nas efectuadas nas placas de cultura (Figs. 43b-A e B), embora se observasse um valor ligeiramente mais baixo para este parâmetro nas culturas tratadas com minociclina (Fig. 43b-B). Comparativamente, as culturas que cresceram sobre a HA apresentaram uma proliferação celular menor e os valores máximos, atingidos no dia 28, foram inferiores aos observados nas culturas que cresceram na ausência de materiais, tanto na presença de doxiciclina como na de minociclina (Figs. 43b-A e B).

### ***Conteúdo total de proteína***

Nas células cultivadas na ausência e na presença dos materiais, em todas as situações experimentais testadas, o conteúdo total de proteína aumentou com o tempo de incubação de modo semelhante à proliferação celular (resultados não apresentados). Neste estudo, tal como no anterior, as culturas que cresceram sobre os materiais testados apresentaram um conteúdo total proteico superior ao observado nas culturas mantidas na ausência de qualquer material, para todas as situações experimentais utilizadas (Fig. 44).

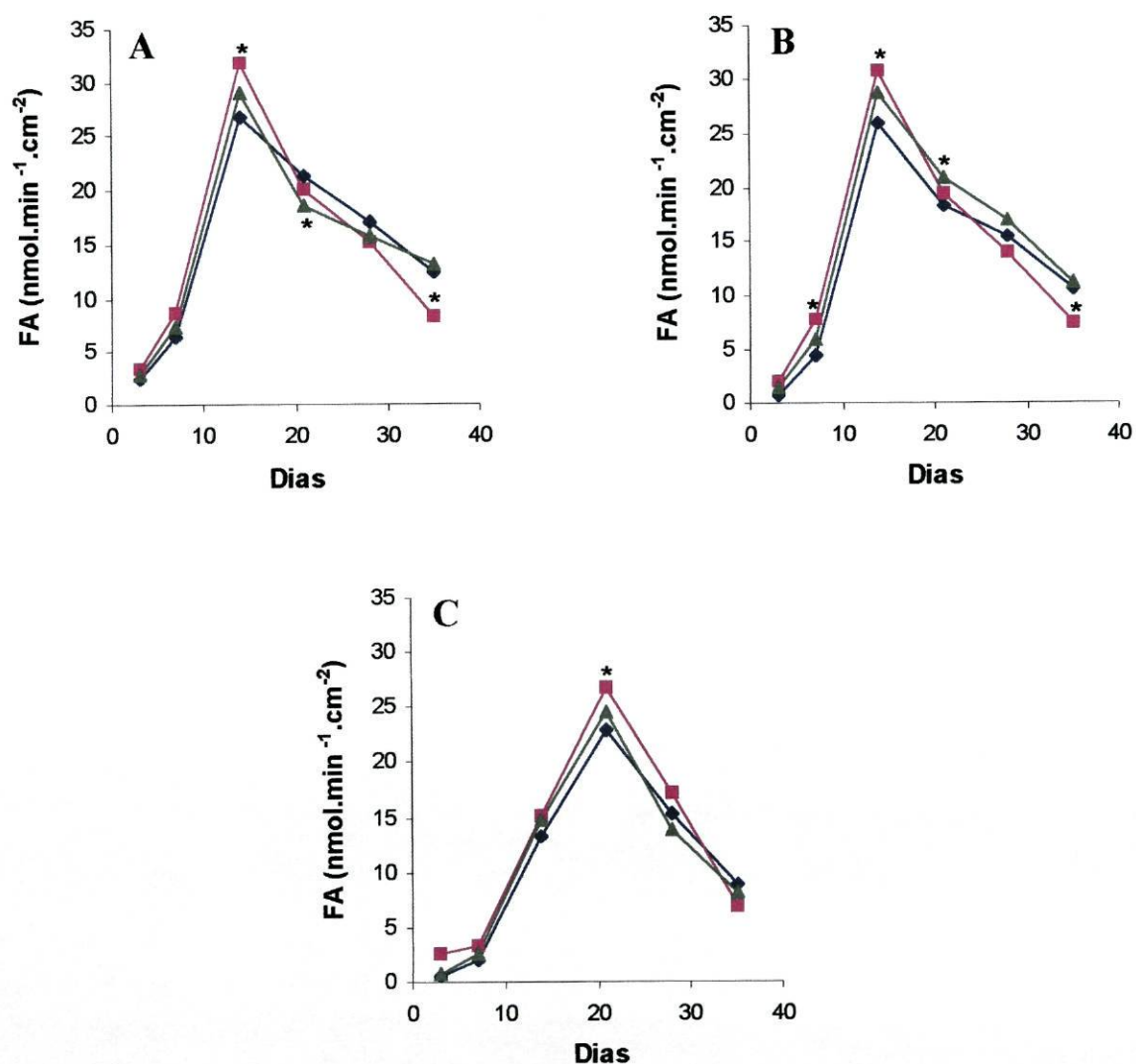




**Figura 44 –** Conteúdo total de proteína de culturas de células de medula óssea humana mantidas em situação controlo (AA +  $\beta$ -GF + Dex) (A), na presença de doxiciclina (B) e minociclina (C). Culturas efectuadas na ausência de materiais ( $\blacklozenge$ ) e na superfície do composto de hidroxiapatite–biovidro ( $\blacktriangle$ ) e da hidroxiapatite ( $\blacksquare$ )  
\*Significativamente diferente das culturas efectuadas na ausência de materiais. Os desvios padrão observados foram < 20 %.

### **Actividade da fosfatase alcalina**

Os resultados referentes à actividade da fosfatase alcalina, determinada nas várias situações experimentais, estão apresentados na figura 45.



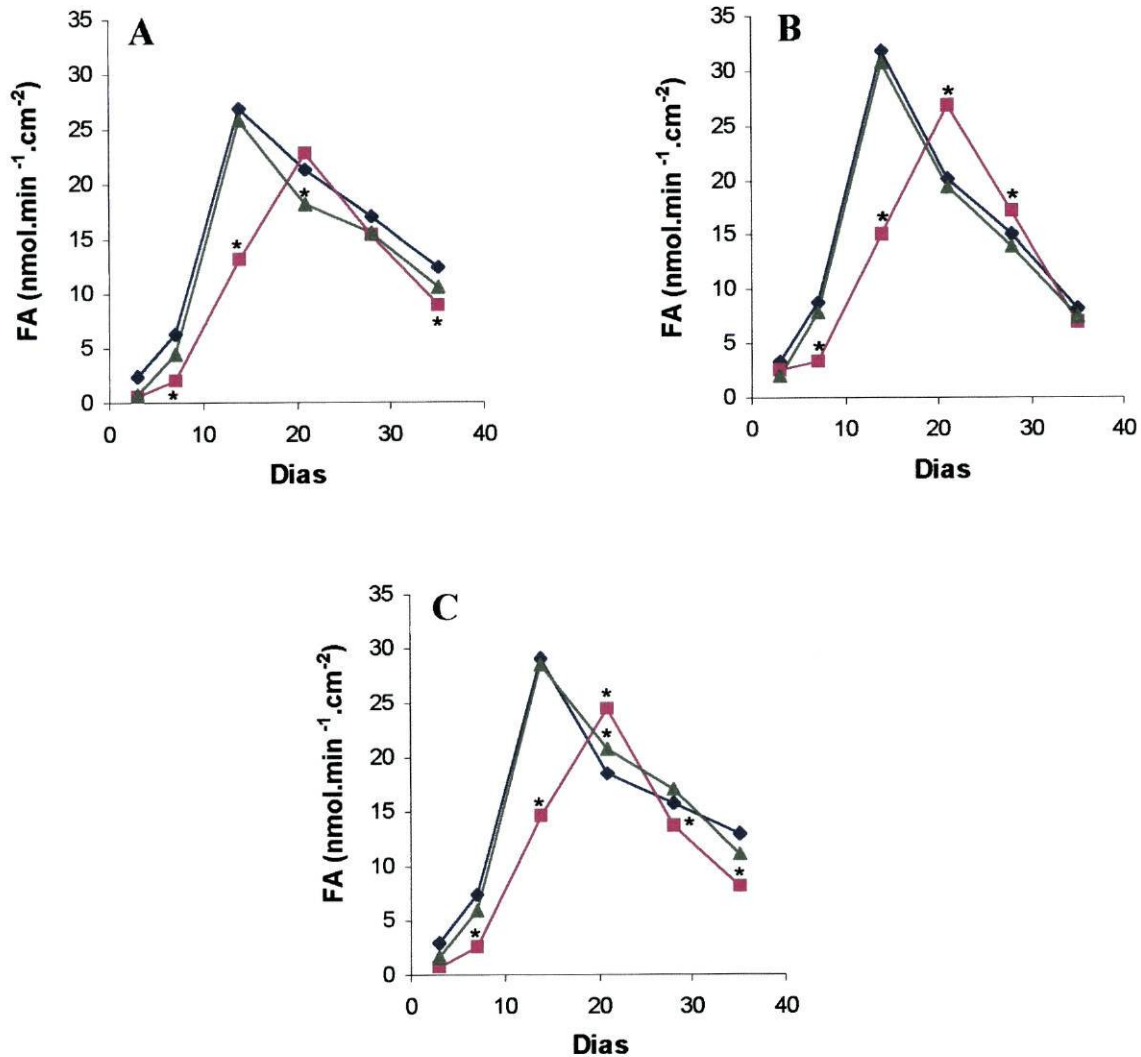
**Figura 45a** – Efeito da doxiciclina (■) e minociclina (▲) na actividade da fosfatase alcalina de culturas de células de medula óssea humana. Culturas efectuadas na ausência de materiais (A) e na superfície do compósito de hidroxiapatite–biovidro (B) e da hidroxiapatite (C); (◆) Culturas mantidas na presença de AA +  $\beta$ -GF + Dex (culturas controlo).

\*Significativamente diferente das culturas controlo. Os desvios padrão observados foram < 20 %.

A actividade da fosfatase alcalina nas culturas que cresceram na presença de AA +  $\beta$ -GF + Dex e na ausência de materiais (Fig. 45a-A) aumentou até aproximadamente ao dia 14, diminuindo significativamente a partir deste dia. A presença adicional de doxiciclina ou de minociclina nestas culturas resultou num ligeiro aumento dos níveis da enzima durante as duas primeiras semanas de cultura, aspecto que está provavelmente relacionado com o



aumento de proliferação celular que também se observou durante este período e não com o aumento real da actividade da fosfatase alcalina por célula. A redução da actividade deste marcador osteoblástico a partir do dia 14 foi mais acentuada nas culturas tratadas com os antibióticos (Fig. 45a). A estimulação promovida pela doxiciclina foi ligeiramente superior à exibida pela minociclina.



**Figura 45b** – Actividade da fosfatase alcalina de culturas de células de medula óssea humana mantidas em situação controlo (AA +  $\beta$ -GF + Dex) (A), na presença de doxiciclina (B) e minociclina (C). Culturas efectuadas na ausência de materiais (◆) e na superfície do composto de hidroxiapatite–biovidro (▲) e da hidroxiapatite (■)

\*Significativamente diferente das culturas efectuadas na ausência de materiais. Os desvios padrão observados foram < 20 %.

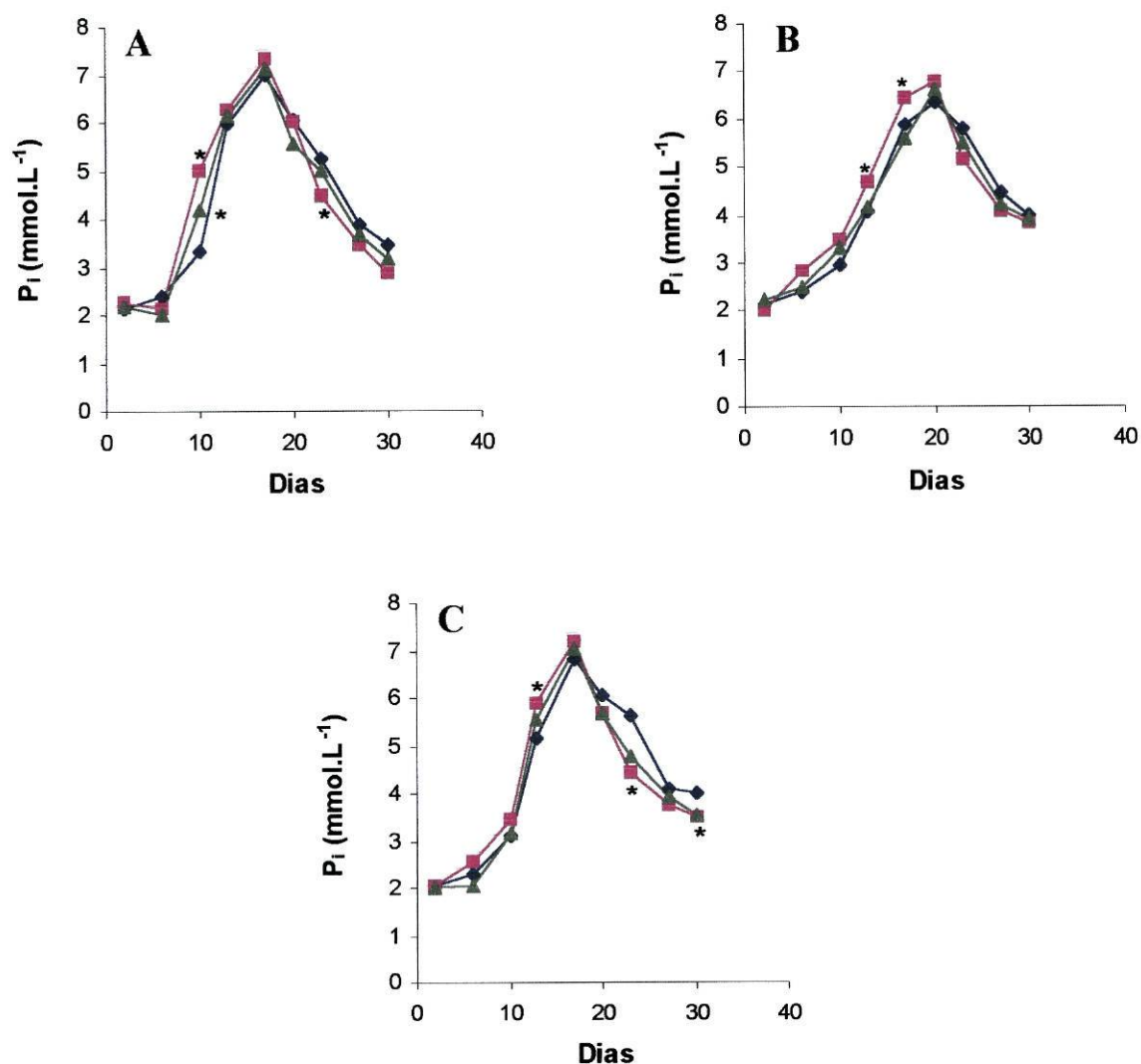
As culturas que cresceram na superfície do compósito (Fig. 45a-B) apresentaram uma actividade de fosfatase alcalina que aumentou até aproximadamente ao dia 14, enquanto que nas culturas que cresceram na superfície da HA (Fig. 45a-C) a actividade máxima da enzima foi atingida apenas por volta do dia 21. Em ambas as situações, após se ter atingido o valor máximo, observou-se uma diminuição acentuada dos níveis da enzima. O efeito da doxiciclina e da minociclina e a sua ordem de grandeza foram semelhantes nas culturas que cresceram nos dois tipos de materiais e, também, aos observados nas culturas efectuadas na ausência de materiais (Fig. 45a-A).

A figura 45b mostra que a actividade da fosfatase alcalina nas culturas que cresceram na superfície do compósito seguiu um padrão semelhante ao observado nas culturas efectuadas nas placas de cultura, quer na ausência quer na presença dos antibióticos. No entanto, nas culturas efectuadas sobre a HA, observou-se um atraso na expressão da fosfatase alcalina e a actividade máxima, atingida uma semana mais tarde, foi inferior à observada nas culturas que cresceram sobre o compósito. Contudo, a menor actividade da fosfatase alcalina está muito provavelmente relacionada com o facto de a proliferação celular também ter sido menor nas culturas efectuadas sobre a HA (Fig. 43b-A).

### ***Níveis de fósforo e cálcio ionizados no meio de cultura***

Nas culturas efectuadas na presença de AA +  $\beta$ -GF + Dex e na ausência de materiais, a concentração de fósforo ionizado aumentou significativamente até ao dia 17, enquanto que os níveis de cálcio ionizado não sofreram grandes variações durante este período; a partir do dia 17 e até ao fim do período de incubação as concentrações das duas espécies iónicas diminuíram significativamente (Figs. 46a-A e 47a-A). As concentrações de fósforo e cálcio ionizados no meio de cultura recolhido das culturas tratadas com doxiciclina e minociclina variaram de modo semelhante (Figs. 46a-A e 47a-A). No entanto, na presença dos antibióticos o aumento dos níveis de fósforo ionizado foi ligeiramente superior, especialmente durante a 2ª semana e o consumo das duas espécies iónicas foi um pouco mais acentuado.



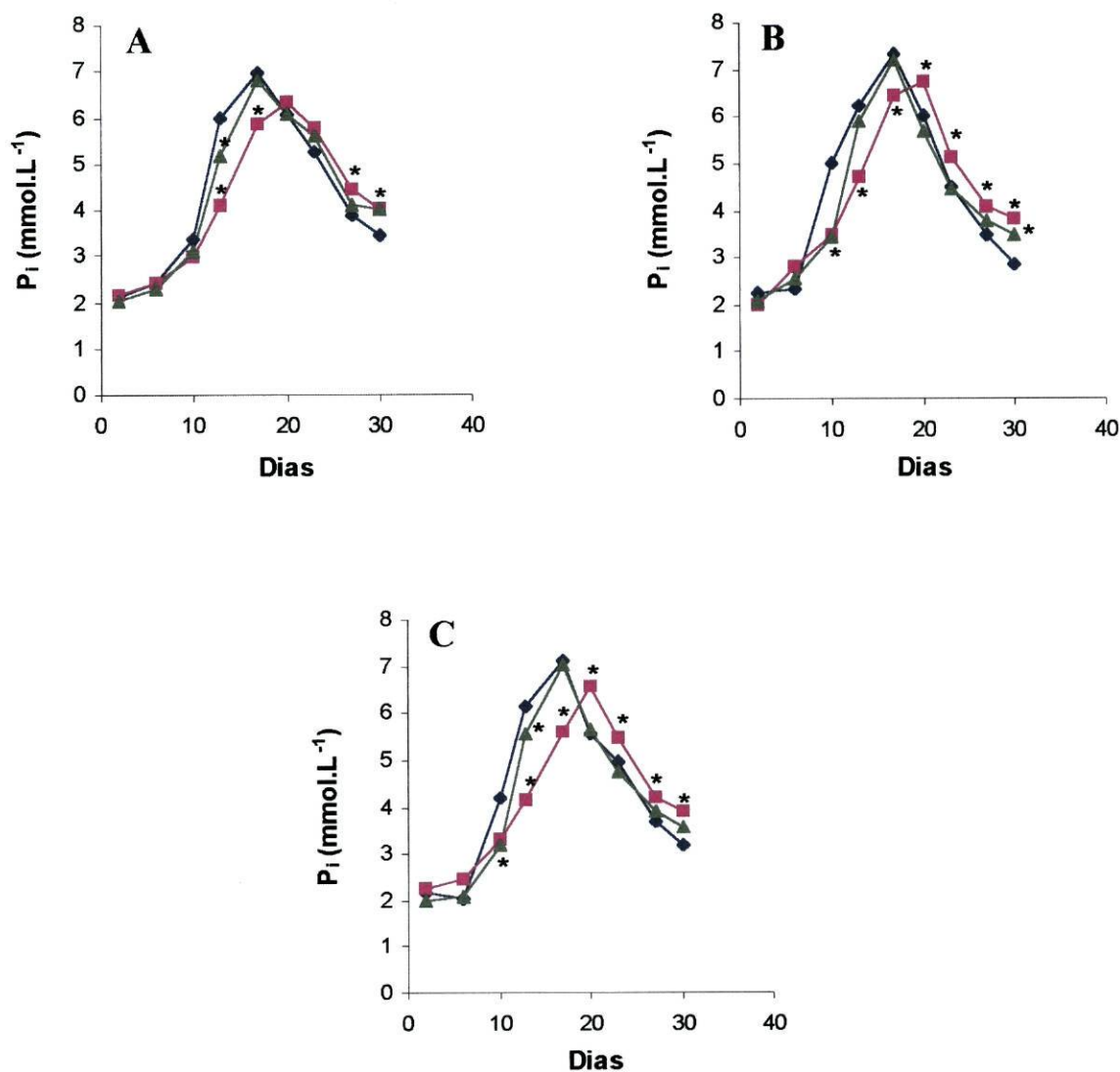


**Figura 46** – Níveis de fósforo ionizado no meio de cultura recolhido ao longo do período de incubação.

a) Efeito da doxiciclina (■) e minociclina (▲) nos níveis de fósforo ionizado em culturas efectuadas na ausência de materiais (A) e culturas efectuadas na superfície do composto de hidroxiapatite-biovidro (B) e da hidroxiapatite (C). (♦) Culturas mantidas na presença de AA +  $\beta$ -GF + Dex (culturas controlo).

\*Significativamente diferente das culturas controlo. Os desvios padrão observados foram < 20 %.

Nas culturas efectuadas sobre o composto (Figs. 46a-B e 47a-B) e HA (Figs. 46a-C e 47a-C), a doxiciclina e a minociclina causaram efeitos semelhantes aos observados nas culturas efectuadas na ausência de materiais (Figs. 46a-A e 47a-A).



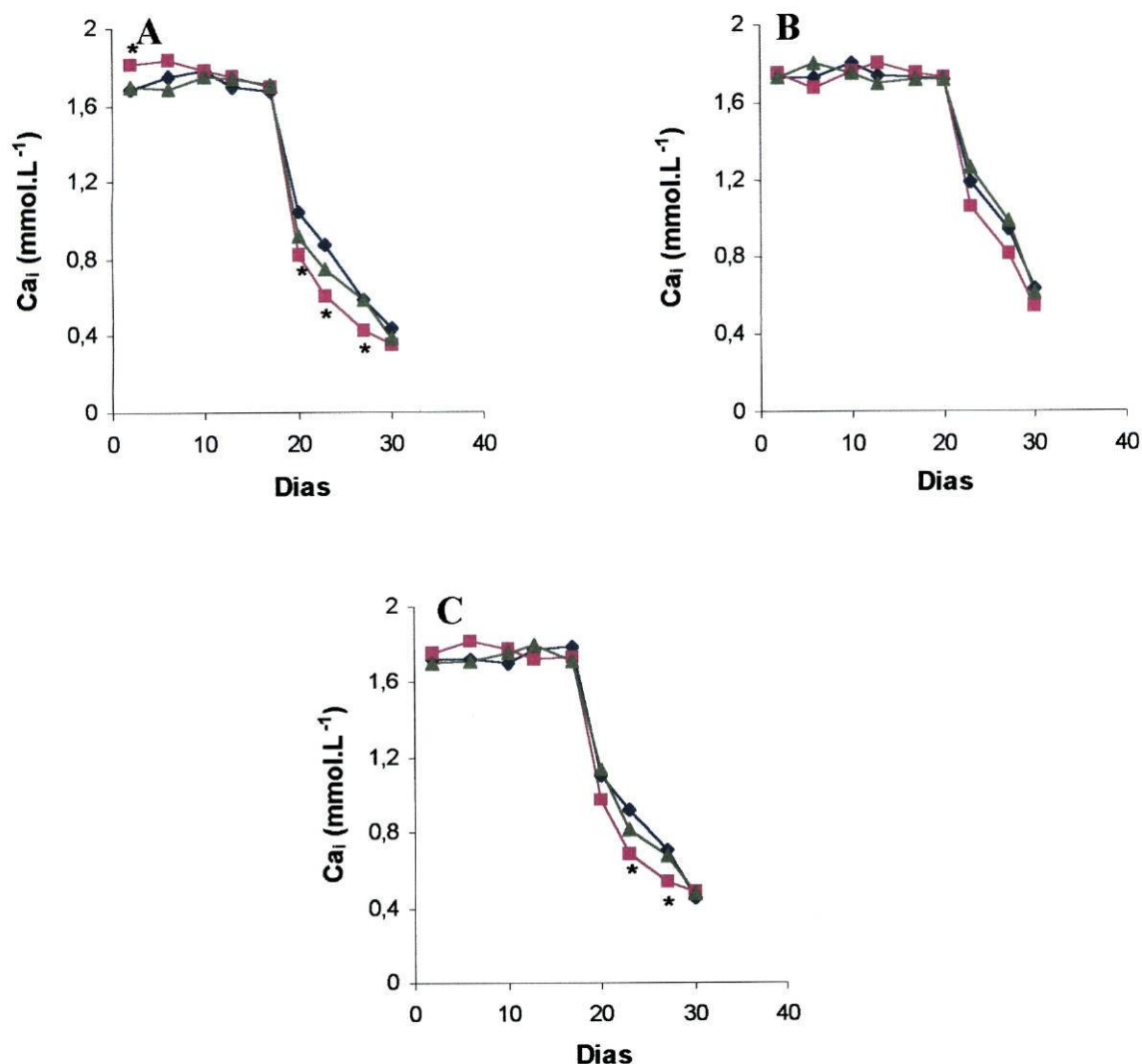
b) Níveis de fósforo ionizado no meio recolhido de culturas de células de medula óssea humana mantidas em situação controlo (AA +  $\beta$ -GF + Dex) (A), na presença de doxiciclina (B) e minociclina (C). Culturas efectuadas na ausência de materiais (♦) e na superfície do compósito de hidroxiapatite-biovidro (▲) e da hidroxiapatite (■).

\*Significativamente diferente das culturas efectuadas na ausência de materiais. Os desvios padrão observados foram < 20 %.

Nas figuras 46b e 47b pode observar-se que o padrão de variação dos níveis de fósforo e cálcio ionizados determinados no meio recolhido das culturas efectuadas sobre o compósito foi idêntico ao observado nas culturas efectuadas na ausência de materiais, em todas as situações experimentais. Nas culturas mantidas sobre a HA, o aumento dos níveis de



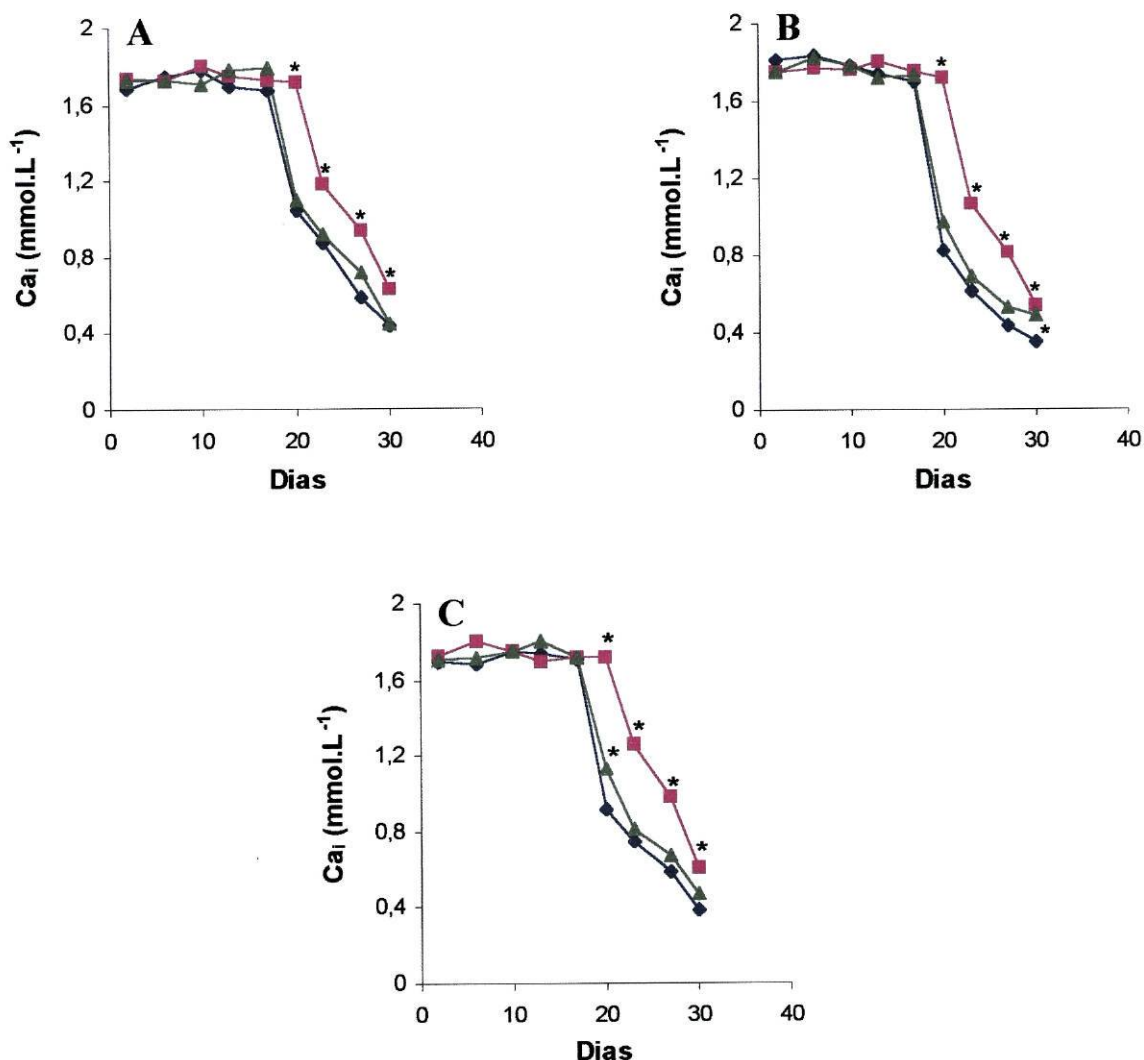
fósforo ionizado foi menor e os valores máximos foram atingidos mais tarde, por volta do dia 23, altura em que se começou a observar o consumo das duas espécies iónicas a partir do meio de cultura; estes resultados sugerem uma mineralização mais tardia nestas culturas.



**Figura 47** – Níveis de cálcio ionizado no meio de cultura recolhido ao longo do período de incubação.

a) Efeito da doxiciclina (■) e minociclina (▲) nos níveis de cálcio ionizado em culturas efectuadas na ausência de materiais (A) e culturas efectuadas na superfície do compósito de hidroxiapatite–biovidro (B) e da hidroxiapatite (C). (◆) Culturas mantidas na presença de AA +  $\beta$ -GF + Dex (culturas controlo).

\*Significativamente diferente das culturas controlo. Os desvios padrão observados foram < 20 %.



b) Níveis de cálcio ionizado no meio recolhido de culturas de células de medula óssea humana mantidas em situação controlo (AA +  $\beta$ -GF + Dex) (A), na presença de doxiciclina (B) e minociclina (C). Culturas efectuadas na ausência de materiais (♦) e na superfície do compósito de hidroxiapatite-biovidro (▲) e da hidroxiapatite (■).

\*Significativamente diferente das culturas efectuadas na ausência de materiais. Os desvios padrão observados foram < 20 %.

### **Formação de depósitos de fosfato de cálcio**

Nas culturas que cresceram na superfície do compósito, tanto na ausência como na presença de doxiciclina ou minociclina, o processo de mineralização ocorreu a partir da 3ª semana (de modo similar ao que se observou nas culturas efectuadas na ausência de materiais). As culturas efectuadas na superfície da HA começaram a mineralizar alguns dias mais tarde.



### 3.3 – DISCUSSÃO

Um dos principais objectivos da utilização dos materiais de substituição óssea é induzir rapidamente a deposição abundante de uma matriz de colagénio mineralizada sobre os biomateriais implantados. É por isso fundamental assegurar que as células osteoblásticas humanas proliferem e se diferenciem na superfície destes materiais. O comportamento dos osteoblastos sobre os biomateriais é, por sua vez, influenciado pela composição química, porosidade, natureza da superfície e características físicas destes materiais.

Embora diversos estudos tenham descrito que células da abóbada craniana de rato<sup>298-300</sup>, linhas celulares osteoblásticas<sup>301</sup>, células do estroma de medula de rato<sup>302</sup> e células ósseas humanas<sup>303</sup> aderem e crescem sobre vários materiais *in vitro*, poucos avaliaram a capacidade de diferenciação das células osteoblásticas humanas à superfície destes materiais, em culturas a longo prazo. Entre estes trabalhos, Hott e col.<sup>303</sup> demonstraram que células osteoblásticas de osso trabecular humano, cultivadas sobre hidroxiapatite, expressaram colagénio tipo I e osteocalcina, mas produziram uma matriz extracelular pouco abundante, comparativamente com células cultivadas directamente na superfície das placas de cultura. Assim, apesar da diferenciação destas células ter sido ligeiramente promovida, quando cultivadas sobre hidroxiapatite, observou-se uma redução na proliferação celular, o que limitou a extensão da matriz extracelular formada *in vitro* sobre este material. Estes dados estão em concordância com resultados obtidos em trabalhos anteriores realizados com células osteoblásticas da abóbada craniana<sup>298,304</sup> e de medula<sup>305,306</sup> de rato.

Num sistema *in vitro*, as células osteoprogenitoras e as células osteoblásticas podem alterar rapidamente o seu fenótipo; assim, o substrato deve favorecer a expressão do fenótipo osteoblástico e ser apropriado para que ocorra a deposição mineral. Existem trabalhos anteriores<sup>298</sup> que demonstraram, em culturas celulares da abóbada craniana de rato, que a hidroxiapatite, material normalmente designado como bioactivo, ao contrário de exercer o esperado efeito promotor da formação óssea, reduziu significativamente a adesão e a proliferação das células osteoblásticas. Ao contrário deste, outros estudos provaram que os osteoblastos quer de origem animal<sup>301,304</sup>, quer de origem humana<sup>307</sup> mantinham a sua expressão fenotípica (produção de colagénio tipo I e elevada actividade da fosfatase alcalina) na presença deste material cerâmico e que este funcionava como promotor do

crescimento celular. Apesar destes resultados contraditórios, a hidroxiapatite é descrita como um material que favorece a formação óssea quando implantado, sugerindo que a situação *in vivo* envolve mecanismos adicionais.

As apatites biológicas, que compreendem as fases minerais dos tecidos calcificados, tais como o osso, a dentina e o esmalte, diferem da hidroxiapatite pura  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , na estequiometria, composição química, cristalinidade e outras propriedades físicas e químicas. Deste modo, têm sido desenvolvidos compósitos de hidroxiapatite reforçada com biovidro, de maneira a aumentar a semelhança química entre os biomateriais cerâmicos e os tecidos duros.

O sucesso da utilização de biomateriais para substituição do tecido ósseo pressupõe a formação de uma interface apropriada, de modo a que se verifique a integração tecidular do implante. A modulação farmacológica da resposta das células presentes na superfície do material constitui uma maneira de otimizar a formação desta interface e, assim, tornar mais rápida e eficaz a osteointegração do biomaterial.

O objectivo deste trabalho foi estudar o comportamento biológico de um compósito de hidroxiapatite–biovidro utilizando culturas de células osteoblásticas provenientes de medula óssea humana e modular farmacologicamente a interacção entre estas células e o biomaterial. O comportamento biológico do compósito de hidroxiapatite–biovidro foi comparado com o observado em amostras de hidroxiapatite comercial, nas mesmas condições experimentais.

As amostras de ambos os materiais utilizados neste estudo foram incubadas durante 21 dias em meio de cultura, antes de serem cultivados com células de medula óssea. A pré-imersão dos materiais contribui, de acordo com vários estudos anteriores, para aumentar o desempenho biológico deste tipo de materiais. Vários trabalhos<sup>297,308,309</sup> sugeriram que a pré-imersão de materiais cerâmicos, tal como a hidroxiapatite e compósitos de hidroxiapatite–biovidro de várias composições químicas, numa solução fisiológica acelular, como por exemplo o meio de cultura, resulta na formação de uma camada superficial de apatite que presumivelmente aumenta a biocompatibilidade e a bioactividade destes materiais. Estes trabalhos demonstraram que as modificações superficiais causadas pela pré-imersão influenciam o crescimento e funções celulares de osteoblastos de osteosarcoma



humano MG63<sup>308</sup> e também de células de medula óssea humana<sup>309</sup>, nomeadamente aumentando a taxa de proliferação e a diferenciação celular. Os efeitos aparentemente benéficos da pré-imersão na biocompatibilidade dependem das interacções moleculares e iónicas entre o material e o ambiente líquido, incluindo a libertação de algumas espécies iónicas (iões  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{PO}_4^{3-}$ ), a modificação local do pH e a adsorção, do meio para a superfície do biomaterial, de moléculas biologicamente activas, tais como peptídeos e proteínas que desempenham um papel importante no processo de adesão e actividade funcional dos osteoblastos<sup>310</sup>.

As culturas efectuadas na superfície do compósito na presença de AA +  $\beta$ -GF ou AA +  $\beta$ -GF + Dex apresentaram a expressão completa do fenótipo osteoblástico (elevada actividade da fosfatase alcalina e formação de depósitos de fosfato de cálcio). Estas culturas proliferaram gradualmente com o tempo de incubação, observando-se uma redução do crescimento celular a partir da 4ª semana. A actividade da fosfatase alcalina também aumentou com o tempo de cultura e o aumento significativo dos níveis desta enzima observado durante a 2ª semana sugere uma evolução no estado de diferenciação das células. Nestas culturas, o processo de mineralização ocorreu a partir da 3ª semana, tal como é demonstrado pelo consumo significativo de fósforo e cálcio ionizados a partir do meio de cultura durante esta fase e pela presença de numerosos depósitos minerais nas culturas celulares com 21 dias.

A exposição das culturas que cresceram na superfície do compósito à dexametasona ( $10 \text{ nmol.L}^{-1}$ ) e à hormona da paratiróide ( $10 \text{ nmol.L}^{-1}$ ) resultou na estimulação do crescimento celular e na indução da actividade da fosfatase alcalina, relativamente às culturas controlo (AA +  $\beta$ -GF); o processo de mineralização ocorreu na mesma altura que nas culturas controlo, mas foi mais intenso na presença das hormonas. O efeito do glucocorticóide foi mais significativo do que o da hormona da paratiróide. As culturas tratadas com hormona do crescimento ( $50 \text{ ng.ml}^{-1}$ ) apresentaram uma proliferação celular superior à observada nas culturas controlo (AA +  $\beta$ -GF) e não se verificou qualquer diminuição do crescimento após a obtenção do valor máximo; a expressão da fosfatase alcalina foi reduzida e não se observou a formação de depósitos de fosfato de cálcio.

A presença de doxiciclina ( $1 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$ ) ou minociclina ( $1 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$ ) nas culturas celulares efectuadas na superfície do compósito resultou num aumento do crescimento celular, comparativamente com as culturas efectuadas na ausência dos antibióticos (culturas

efectuadas na presença de AA +  $\beta$ -GF + Dex); a mineralização também se observou a partir da 3ª semana de cultura e foi ligeiramente mais intensa nas culturas tratadas com doxiciclina, seguindo-se as culturas expostas à minociclina.

Dos resultados apresentados neste capítulo, é evidente que o compósito de hidroxiapatite–biovidro apresentou características de superfície mais adequadas para a proliferação e diferenciação de células osteoblásticas de medula óssea humana do que a hidroxiapatite, em todas as situações experimentais testadas. As células cultivadas na superfície do compósito apresentaram um padrão de comportamento semelhante ao observado nas culturas efectuadas na ausência de materiais, enquanto que nas culturas efectuadas sobre a hidroxiapatite se observou sempre um atraso no comportamento de proliferação/diferenciação das células. Nestas culturas, o crescimento celular foi mais baixo durante as primeiras quatro semanas, a actividade da fosfatase alcalina atingiu níveis significativos apenas durante a 3ª semana do período de incubação e o processo de mineralização foi mais tardio do que nas culturas efectuadas sobre o compósito de hidroxiapatite–biovidro. No entanto, a ordem de grandeza do efeito da Dex, PTH e hormona do crescimento e, também, da doxiciclina e minociclina, seguiu um padrão semelhante nas culturas efectuadas na superfície dos dois materiais.

Os resultados descritos sugerem que a população celular que cresceu sobre o compósito parece diferenciar-se mais cedo e com um padrão semelhante ao observado nas culturas efectuadas na ausência de materiais, comparativamente com a população celular que cresceu sobre a hidroxiapatite, ou seja, a expressão completa do fenótipo osteoblástico ocorreu mais tarde nas células cultivadas sobre a hidroxiapatite, em todas as condições experimentais utilizadas. Esta observação pode estar relacionada com diferenças observadas na formação da camada de apatite durante a pré-imersão dos dois materiais. Assim, no estudo referido anteriormente<sup>308</sup>, os autores mostraram que após o tratamento de pré-imersão a influência na proliferação e diferenciação de células osteoblásticas foi mais pronunciada em compósitos de hidroxiapatite–biovidro com a seguinte composição (em mol %) 35 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 35 CaO, 20 Na<sub>2</sub>O, 10 K<sub>2</sub>O do que em hidroxiapatite. De acordo com este trabalho, a taxa de formação da camada de apatite foi maior nos materiais compósitos do que na hidroxiapatite, visto que a superfície destes materiais foi totalmente recoberta por cristais de fosfato de cálcio ao fim de 14 e 21 dias, respectivamente. Estes resultados foram igualmente obtidos por outros autores<sup>311</sup>. Este comportamento pode ser explicado pelas



transformações de fase causadas pela adição do vidro que aumenta a proporção relativa de  $\beta$ -TCP na estrutura do compósito. Dada a sua maior solubilidade, ocorre uma maior libertação dos iões  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{PO}_4^{2-}$  dos materiais, o que aumenta o grau de saturação local destes iões no meio circundante, acelerando deste modo a formação da camada de apatite<sup>282,291</sup>. Além disso, a adição de  $\text{Na}_2\text{O}$  e de  $\text{P}_2\text{O}_5$  à fase vítrea parece também aumentar a taxa de formação desta camada<sup>291</sup>.

Os resultados obtidos no trabalho aqui apresentado estão em concordância com este tipo de estudos, uma vez que as modificações superficiais resultantes da pré-imersão do compósito e da HA parecem ter um efeito positivo mais pronunciado no crescimento e diferenciação dos osteoblastos de medula óssea humana cultivados sobre o compósito, verificando-se uma expressão do fenótipo osteoblástico mais precoce nas culturas celulares que cresceram sobre este material. Esta observação está também de acordo com estudos *in vitro* anteriores realizados com células de medula óssea humana<sup>309</sup> ou linhas celulares de osteosarcoma humano<sup>308</sup> que avaliaram a resposta biológica da hidroxiapatite e de um compósito de hidroxiapatite–biovidro, sugerindo que o compósito apresenta melhores características para o crescimento e funções das células ósseas do que a hidroxiapatite.

Segundo um estudo realizado por Ohgushi<sup>305</sup>, os materiais bioactivos, tal como os utilizados neste trabalho, são capazes de estimular a diferenciação de células osteoprogenitoras do estroma da medula óssea de rato, bem como a formação de uma matriz extracelular mineralizada que se liga ao material. Embora os mecanismos utilizados ainda estejam pouco esclarecidos, este autor sugere que a ligação de moléculas biologicamente activas à superfície dos biomateriais pode activar os receptores membranares das células e a expressão de vários genes, resultando na diferenciação osteoblástica. Assim, embora estes materiais não possuam capacidade osteogénica por si só, podem ser considerados materiais osteogénicos na presença de células osteoprogenitoras existentes na medula óssea.

A inclusão em materiais osteogénicos de fármacos com um perfil farmacológico adequado e a sua libertação local e controlada constitui uma abordagem muito promissora pois permite associar o efeito osteoindutor do material com a possibilidade de modular o comportamento das células ósseas na interface, de modo a assegurar e a tornar mais rápido o processo de regeneração tecidual e de osteointegração do material<sup>312,313</sup>. Devido ao facto

de os osteoblastos desempenharem um papel central nos mecanismos de regulação do metabolismo ósseo, os fármacos que estimulam o crescimento e a diferenciação das células osteoblásticas têm particular interesse. Estão neste caso várias hormonas e factores de crescimento. A presença de antibióticos no local da cirurgia reconstrutiva reveste-se também de muita importância, pois que o aparecimento de infecções locais pode comprometer todo o sucesso da intervenção.

Os resultados descritos neste capítulo sugerem que a exposição de culturas celulares efectuadas sobre o compósito (e também, HA) à dexametasona e hormona da paratiróide resulta numa indução da proliferação e diferenciação osteoblástica e que a presença da hormona do crescimento causa um aumento significativo da proliferação celular.

É interessante observar que a presença de doxiciclina e minociclina, dois antibióticos que têm um espectro antibacteriano largo que abrange microorganismos implicados em infecções ósseas, causem, numa concentração antibacteriana eficaz para muitos microorganismos, um efeito de estimulação da proliferação de células osteoblásticas cultivadas sobre o compósito e HA. Este aspecto parece ser muito relevante pois fármacos que são utilizados no tratamento de processos infecciosos podem interferir de modo significativo com a actividade das células presentes no local (por um mecanismo independente do efeito antibacteriano).

Assim, os resultados descritos neste capítulo providenciam informação que pode ser de grande interesse no desenvolvimento de sistemas de libertação local de fármacos utilizando materiais compósitos (e, também, HA), associando o potencial osteogénico destes materiais e a possibilidade de modular a resposta do hospedeiro de um modo que se identifique com os objectivos pretendidos.

A colonização de materiais biocompatíveis com células do hospedeiro com potencial osteogénico, obtidas previamente do indivíduo, parece constituir uma metodologia promissora para se observar uma rápida reconstrução óssea local<sup>314</sup>. A implantação de um sistema deste tipo pode representar um procedimento lógico para o desencadear da cascata de fenómenos responsáveis pela regeneração óssea. Este aspecto é particularmente relevante quando se observa um afastamento entre o tecido ósseo e o material, situação que



dificulta a migração das células ósseas para o implante, por não se verificar a existência de uma interface.

O trabalho desenvolvido no âmbito desta tese permitiu a otimização das condições de cultura de células de medula óssea humana de modo a observar-se o crescimento de células osteogénicas na superfície do compósito e da hidroxiapatite e a expressão completa do fenótipo osteoblástico, isto é, a formação de uma matriz extracelular mineralizada. Este tipo de metodologia permite explorar a possibilidade de expandir a utilização do compósito desenvolvido (e, também, da hidroxiapatite) como suporte de crescimento de células ósseas do hospedeiro que apresentam capacidade osteogénica. Por outro lado, a possibilidade de modular farmacologicamente este sistema com substâncias que intervêm nos mecanismos de formação óssea pode permitir uma mais rápida regeneração local e integração do material.

# **CAPÍTULO V**

## **CONCLUSÕES FINAIS**



A tecnologia mais recente permitiu o desenvolvimento de vários materiais que são utilizados nas cirurgias ortopédica, dentária e maxilofacial. Entre estes, os biovidros e os cerâmicos de fosfato de cálcio, tal como a hidroxiapatite, são conhecidos por serem biocompatíveis e bioactivos, permitindo a ligação directa do tecido ósseo recém-formado com a superfície do biomaterial. Embora a hidroxiapatite seja um material de substituição óssea muito utilizado, a sua aplicação limita-se a locais sujeitos a baixas cargas, pelo facto de apresentar uma força mecânica muito inferior à do tecido ósseo. Além disso, a sua composição química difere bastante da do mineral ósseo humano, visto que este contém outros iões tais como o potássio, magnésio, carbonato, flúor e sódio. Existem vários trabalhos em que estes iões têm sido incorporado na matriz de hidroxiapatite, de modo a simular o melhor possível a composição do mineral ósseo humano, melhorando assim a resposta biológica dos materiais implantados. Por outro lado, existe uma grande necessidade de produzir biomateriais cuja bioactividade seja superior à da hidroxiapatite e de ajustar a taxa de degradação do implante à taxa auto-regeneradora dos tecidos. Assim, é de grande interesse produzir um biomaterial cuja composição química coincida, tanto quanto possível, com a do tecido ósseo, embora preservando a estrutura da hidroxiapatite, que é o principal constituinte mineral do osso. Tendo isto em conta, foi produzido neste trabalho um compósito de hidroxiapatite–biovidro fosfatado com a seguinte composição (em mol %): 45,0 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> – 28,0 CaO – 27,0 Na<sub>2</sub>O. A microestrutura do compósito possui uma estrutura cristalina bifásica, composta por hidroxiapatite e por uma pequena quantidade de β-TCP. O aperfeiçoamento das propriedades mecânicas deste material, relativamente à hidroxiapatite, deve-se essencialmente ao tamanho de grão reduzido e às elevadas densificação, flexão biaxial e resistência à fractura. O desempenho biológico do compósito de hidroxiapatite–biovidro foi avaliado *in vitro*, utilizando culturas de células osteoblásticas obtidas de medula óssea humana e o seu comportamento comparado com o observado na hidroxiapatite comercial, nas mesmas condições experimentais.

As respostas dos tecidos aos materiais são geralmente avaliadas através de exames morfológicos e histológicos do local de implante, de modo a determinar aspectos de citotoxicidade e osteointegração do material. Contudo, o novo conceito de biocompatibilidade pressupõe o conhecimento da resposta das células envolvidas na interacção com os biomateriais. Uma vez que *in vivo* há várias populações celulares e numerosos factores químicos que estão envolvidos, os ensaios *in vivo* não permitem a avaliação da reacção de um tipo celular específico a um substrato. O modelo de cultura

celular na presença de biomateriais é então de grande utilidade na determinação dos acontecimentos e parâmetros que influenciam o processo interactivo. Embora os estudos *in vitro* não incluam todas as condições que existem *in vivo*, o microambiente do sistema de cultura pode ser constantemente produzido e mantido e podem ser adicionadas variáveis suplementares, sob condições controladas. Além disso, um modelo *in vitro* permite realizar em larga escala, estudos a longo prazo.

A regulação do processo de formação óssea local e consequente osteointegração do material só pode ser compreendida através do estudo do comportamento das células responsáveis por este processo, os osteoblastos. A maioria dos estudos *in vitro* utilizam células de origem animal, células fetais humanas e células transformadas. As diferenças existentes entre as espécies e a maturidade das células tornam muito difíceis a extrapolação dos resultados obtidos e a comparação das respostas observadas. As culturas celulares de medula óssea humana têm inegáveis vantagens pois constituem uma população celular existente nos implantes ortopédicos *in situ* e possuem células mesenquimais indiferenciadas com o potencial de se diferenciar em vários tipos celulares incluindo uma linha osteogénica, dependendo das condições de cultura.

Assim, o primeiro objectivo deste trabalho foi obter e caracterizar culturas de células de medula óssea humana com um comportamento bem definido e reprodutível que apresentassem uma expressão completa do fenótipo osteoblástico. No capítulo II apresentaram-se os resultados relativos à optimização das condições experimentais para a obtenção de culturas celulares com estas características para serem utilizadas como modelo *in vitro* na avaliação da biocompatibilidade e bioactividade dos materiais estudados, nomeadamente um compósito de hidroxiapatite–biovidro e hidroxiapatite.

Numa primeira fase do trabalho, foi avaliada a influência do meio de cultura na proliferação e actividade funcional destas células ao longo de três subculturas. As culturas primárias foram obtidas a partir de medula óssea humana, proveniente de doadores adultos saudáveis e foram cultivadas em dois meios amplamente utilizados,  $\alpha$ -Minimal Essential Medium Eagle ( $\alpha$ -MEM) e Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), enriquecidos com 10% de soro bovino fetal,  $2,5 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  de fungizona e  $50 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  de gentamicina. As culturas foram incubadas a  $37^\circ\text{C}$  numa atmosfera húmida contendo 95% de ar e 5% de  $\text{CO}_2$ . As



subculturas, obtidas após tripsinização das células, foram mantidas nas mesmas condições experimentais e na presença de substâncias que favorecem o desenvolvimento das características osteoblásticas, nomeadamente, ácido ascórbico ( $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ),  $\beta$ -glicerofosfato ( $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) e dexametasona ( $10 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Os resultados obtidos mostraram que as células de medula óssea humana são capazes de proliferar e de se diferenciar em ambos os meios estudados, embora a actividade da fosfatase alcalina e a capacidade para formar depósitos minerais fossem inferiores nas culturas efectuadas em DMEM. Para além disso, os parâmetros osteoblásticos foram significativamente reduzidos pela subcultura sucessiva das células, particularmente da primeira para a segunda subcultura. Nas condições experimentais utilizadas, a diferenciação osteoblástica máxima (mineralização da matriz extracelular) só foi observada na primeira e segunda subculturas efectuadas em  $\alpha$ -MEM e na primeira subcultura efectuada em DMEM. Assim, os resultados obtidos mostraram que a primeira subcultura efectuada em  $\alpha$ -MEM constitui um sistema celular apropriado para estudar o comportamento de proliferação/diferenciação de células osteoblásticas, uma vez que nestas condições, se observou uma elevada capacidade proliferativa e a expressão completa do fenótipo osteoblástico.

Tendo em atenção os resultados obtidos, a segunda parte do trabalho apresentado no capítulo II teve como objectivo avaliar o efeito do ácido ascórbico (co-factor enzimático que estimula a síntese e maturação do colagénio),  $\beta$ -glicerofosfato (fonte de fosfato inorgânico necessário para o processo de mineralização) e dexametasona (glucocorticóide que induz o fenótipo osteoblástico em numerosos sistemas celulares) na proliferação e diferenciação de células de medula óssea humana da primeira subcultura mantidas em  $\alpha$ -MEM, suplementado com 10% de soro bovino fetal. A adição destes compostos foi feita continuamente ao longo do período de cultura, de modo isolado (AA,  $\beta$ -GF ou Dex) ou em combinação (AA +  $\beta$ -GF e AA +  $\beta$ -GF + Dex). As células que cresceram nas diferentes condições experimentais proliferaram gradualmente ao longo do tempo de incubação e apresentaram uma elevada actividade da fosfatase alcalina. As culturas que cresceram na ausência destes suplementos e na presença isolada de AA ou de Dex não formaram depósitos de fosfato de cálcio. As células cultivadas na presença isolada ou combinada de  $\beta$ -glicerofosfato ( $\beta$ -GF, AA +  $\beta$ -GF, AA +  $\beta$ -GF + Dex) mostraram a formação de uma matriz mineralizada. As culturas que cresceram num meio com  $\beta$ -glicerofosfato apresentaram uma população de células osteoblásticas menos proliferativa, mas mais

diferenciada do que as culturas que não exibiram mineralização. A presença adicional de dexametasona resultou numa indução significativa dos dois marcadores osteoblásticos aqui estudados (actividade da fosfatase alcalina e capacidade de formação de depósitos minerais). Os resultados obtidos neste estudo mostraram que as culturas efectuadas em condições que permitiram a formação de uma matriz extracelular mineralizada apresentaram um comportamento que está de acordo com o modelo proposto na literatura para o desenvolvimento do fenótipo osteoblástico<sup>122</sup> que define uma relação recíproca entre proliferação e diferenciação.

Com base nestes resultados, é possível afirmar que as culturas de células de medula óssea humana, mantidas em condições experimentais que favorecem a expressão do fenótipo osteoblástico, nomeadamente, células da primeira subcultura cultivadas em  $\alpha$ -MEM suplementado com 10% de soro bovino fetal, 50  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de ácido ascórbico, 10  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\beta$ -glicerofosfato e na ausência ou presença de 10  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de dexametasona podem ser utilizadas como modelo *in vitro* no estudo dos mecanismos de regulação dos processos de formação óssea. Estas culturas constituem também um instrumento apropriado para o estudo de aspectos biológicos envolvidos na interacção tecido ósseo/biomaterial, visto que a utilização de materiais para substituição óssea tem por objectivo a indução da deposição de uma matriz de colagénio mineralizada sobre o implante.

No tecido ósseo normal, a produção e disponibilidade de hormonas e factores de crescimento desempenham um papel chave na formação e remodelação óssea. Por outro lado, o sucesso da utilização de biomateriais em cirurgia reconstrutiva depende, entre outros, de várias substâncias que possam garantir o processo de regeneração tecidual e de osteointegração do material. Os fenómenos biológicos que ocorrem na interface tecido ósseo/biomaterial podem ser farmacologicamente modulados de modo a assegurar os objectivos pretendidos. Fármacos de interesse evidente incluem hormonas e factores de crescimento que influenciam a adesão, proliferação e diferenciação das células osteoblásticas e, conseqüentemente, o processo de regeneração na interface. Também, a utilização de antibióticos é muitas vezes necessária pois o aparecimento de um processo infeccioso local é relativamente frequente e pode comprometer a regeneração tecidual e a osteointegração do implante. Assim, no capítulo III apresentaram-se dois estudos que avaliaram o efeito da dexametasona, hormona da paratiróide e hormona do crescimento,



hormonas que afectam de modo significativo o metabolismo ósseo e, também, da doxiciclina e minociclina, antibióticos de largo espectro de acção, no comportamento de culturas celulares de medula óssea humana efectuadas segundo a metodologia descrita no capítulo II. Este estudo teve como objectivo otimizar as condições experimentais de modo a seleccionar as mais apropriadas para a obtenção da expressão completa do fenótipo osteoblástico em culturas celulares de medula óssea efectuadas na superfície do compósito de hidroxiapatite–biovidro e hidroxiapatite (resultados apresentados no capítulo IV).

Os estudos descritos no capítulo III foram realizados em células da primeira subcultura mantidas em  $\alpha$ -MEM suplementado com compostos que favorecem o desenvolvimento do fenótipo osteoblástico. As hormonas na concentração adequada estiveram presentes durante todo o tempo de incubação ou durante diferentes fases do período de cultura, representativas de populações celulares em diferentes estados de diferenciação osteoblástica. Os antibióticos foram adicionados durante todo o período de incubação e estudou-se o comportamento das culturas celulares na presença de uma gama de concentrações dos dois compostos. As concentrações das hormonas e dos antibióticos utilizadas nestes estudos foram seleccionadas tendo por base as concentrações plasmáticas obtidas durante o tratamento por estes fármacos e, também, resultados de estudos efectuados relativos ao efeito destes fármacos em sistemas de cultura de células.

A dexametasona é conhecida por exercer uma acção no metabolismo ósseo, nomeadamente influenciar a proliferação e a actividade funcional das células osteoblásticas. Os resultados apresentados neste trabalho mostraram que a presença contínua desta hormona no meio de cultura estimulou a proliferação celular, a actividade da fosfatase alcalina e o processo de mineralização de culturas celulares de medula óssea humana. Contudo, o tratamento com este glucocorticóide produziu efeitos distintos, dependendo do estado de diferenciação em que se encontravam as células. Assim, em culturas celulares de medula óssea humana, a dexametasona estimulou a proliferação e a diferenciação de células osteoprogenitoras e também de osteoblastos presentes num estado de diferenciação menos adiantado (1<sup>a</sup> e 2<sup>a</sup> semanas do período de cultura). Quando a hormona esteve presente nas fases mais tardias do período de cultura (3<sup>a</sup> semana) o efeito foi menor, uma vez que nestas fases as células já estão altamente diferenciadas, relativamente à actividade da fosfatase alcalina e à capacidade para formar uma matriz extracelular mineralizada. Os dados obtidos sugerem que a maximização do efeito estimulatório da dexametasona requer uma exposição contínua

das células à hormona, visto que foi nestas condições que se observou uma maior indução da expressão do fenótipo osteoblástico.

Os resultados apresentados neste capítulo sugerem que a hormona da paratiróide está intimamente ligada à diferenciação osteoblástica, inibindo a diferenciação das células osteoblásticas mais maduras e favorecendo as que se encontram num estado imaturo. O efeito mais significativo da acção da hormona da paratiróide nas culturas de células de medula óssea humana foi um evidente aumento da actividade da fosfatase alcalina nas culturas expostas continuamente à acção da PTH e nas culturas expostas à hormona durante a 1ª semana de cultura. A exposição das culturas celulares à PTH durante a 2ª e 3ª semanas do período de incubação resultou num aumento dos níveis da fosfatase alcalina mas não se verificou a formação de depósitos minerais. Nestas culturas, observou-se uma diminuição da síntese de proteínas extracelulares, sugerindo provavelmente dificuldades na produção de uma matriz extracelular adequada para suportar o processo de mineralização. Os resultados observados sugerem que as culturas tratadas com PTH durante a 2ª ou a 3ª semana constituem populações celulares menos diferenciadas na linhagem osteoblástica, comparativamente com as expostas à hormona de modo contínuo ou apenas durante a 1ª semana.

Seguidamente, estudou-se o comportamento das culturas celulares de medula óssea humana na presença da hormona do crescimento, substância conhecida por promover o desenvolvimento do tecido ósseo. O efeito da hormona foi estudado em culturas celulares mantidas permanentemente com 10% de soro bovino fetal e em culturas celulares que cresceram temporariamente na ausência de soro, uma vez que o soro é fonte, entre outros, de hormonas e factores de crescimento. As culturas expostas à acção da hormona do crescimento por períodos de 24 horas ao longo do tempo de incubação apresentaram um aumento significativo da proliferação das células osteoblásticas, efeito que foi acompanhado por uma ligeira diminuição da actividade da fosfatase alcalina e da capacidade de formação de depósitos de fosfato de cálcio, sugerindo que esta hormona actua essencialmente a nível do crescimento celular. Embora a hormona do crescimento tenha induzido a proliferação celular tanto em culturas mantidas na presença como na ausência de soro bovino fetal, as culturas que cresceram na presença de soro apresentaram um crescimento celular superior ao das culturas mantidas na ausência de soro.



O comportamento de culturas osteogénicas foi também estudado na presença de doxiciclina e de minociclina. Estes fármacos são utilizados para eliminar infecções que surgem após o processo cirúrgico e, para além da sua eficácia antimicrobiana, parecem exercer uma acção benéfica sobre o metabolismo ósseo, efeito que pode estar relacionado com a capacidade de inibição da colagenase (enzima responsável pela degradação do colagénio da matriz extracelular do tecido conjuntivo, incluindo o tecido ósseo). Deste modo, foi avaliada a resposta de células osteoblásticas a uma gama de concentrações de doxiciclina ( $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ,  $5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ,  $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  e  $25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) e de minociclina ( $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ,  $5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ,  $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ,  $25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  e  $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). Os resultados obtidos mostraram que baixas concentrações de doxiciclina e de minociclina ( $1-5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) estimularam a proliferação das células de medula óssea humana, cultivadas em condições que favorecem o desenvolvimento do fenótipo osteoblástico. Estes resultados sugerem que, para além das suas propriedades antimicrobianas e anti-colagenolíticas, estes dois antibióticos, quando utilizados em baixas concentrações, actuam como promotores da proliferação das células osteoblásticas. A exposição das células a  $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de minociclina pareceu estimular o aparecimento de uma população celular mais proliferativa mas menos diferenciada. As concentrações de  $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de doxiciclina e  $25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de minociclina causaram um efeito deletério no comportamento das culturas celulares, atrasando a fase de proliferação que está associada à formação de uma matriz extracelular. Os resultados aqui obtidos também mostraram que concentrações relativamente elevadas destes antibióticos ( $25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de doxiciclina e  $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de minociclina) foram citotóxicas para as células de medula óssea humana. É de salientar que a mesma concentração de doxiciclina e de minociclina teve efeitos diferentes nas culturas celulares, tal como se observou para as concentrações de  $10$  e  $25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Esta observação pode estar relacionada com uma diferença de potência dos dois antibióticos relativamente às funções celulares afectadas.

Embora os materiais cerâmicos e os biovidros se comportem como materiais osteocondutores, facultando um substrato que permite a migração e a proliferação de células ósseas, não podem ser considerados osteoindutores. A presença de fármacos com capacidade para estimular a proliferação e diferenciação osteoblástica representa, assim, uma maneira de promover a colonização celular destes materiais e permitir que eles desempenhem na totalidade a função para a qual foram implantados. Assim, no capítulo IV apresentaram-se os resultados relativos ao comportamento biológico do compósito de

hidroxiapatite–biovidro preparado, utilizando culturas de células osteoblásticas provenientes de medula óssea humana. O comportamento de proliferação/diferenciação celular de células osteoblásticas cultivadas na superfície deste material foi farmacologicamente modulado pela utilização de três hormonas (dexametasona, hormona da paratiróide e hormona do crescimento) e de dois antibióticos (doxiciclina e minociclina). A concentração dos fármacos e o tempo de exposição foram escolhidos tendo por base o estudo realizado no capítulo III, de modo a obter o desenvolvimento completo do fenótipo osteoblástico das células de medula óssea humana cultivadas na superfície do compósito.

As amostras do compósito e da HA foram incubadas durante 21 dias antes de serem cultivadas com células de medula óssea. De acordo com trabalhos anteriores<sup>296,307</sup>, a pré-imersão dos materiais cerâmicos contribui para aumentar o desempenho biológico destes materiais: promove a formação de uma camada de apatite que aumenta a biocompatibilidade e bioactividade destes biomateriais e a adsorção, do meio para a superfície do material, de moléculas biologicamente activas que desempenham um papel importante no processo de adesão e actividade funcional dos osteoblastos. Durante este tratamento, observaram-se trocas iónicas entre os materiais e o meio de cultura e alterações de superfície que se traduziram pela formação de pequenas partículas esféricas na superfície dos materiais, visíveis por microscopia electrónica de varrimento.

As culturas efectuadas na superfície do compósito na presença de AA +  $\beta$ -GF e AA +  $\beta$ -GF + Dex apresentaram uma proliferação celular semelhante à observada na ausência de materiais, actividade da fosfatase alcalina elevada e formação de uma matriz extracelular mineralizada. A exposição contínua das culturas efectuadas na superfície do compósito à dexametasona ( $10 \text{ nmol.L}^{-1}$ ) e à hormona da paratiróide ( $10 \text{ nmol.L}^{-1}$ ) resultou na estimulação do crescimento celular e na indução da diferenciação osteoblástica, evidenciada por um aumento da fosfatase alcalina e um processo de mineralização mais extenso; estes efeitos foram mais acentuados na presença da dexametasona. No entanto, a presença da hormona do crescimento ( $50 \text{ ng.ml}^{-1}$ ) por períodos de 24 horas ao longo do tempo de incubação resultou num aumento significativo do crescimento mas numa diminuição da diferenciação celular, pois estas culturas apresentaram níveis mais baixos de fosfatase alcalina e formação tardia de depósitos minerais. As culturas efectuadas na superfície do compósito na presença de doxiciclina ( $1 \mu\text{g.ml}^{-1}$ ) ou de minociclina ( $1 \mu\text{g.ml}^{-1}$ )



apresentaram um aumento da proliferação celular, efeito que não foi acompanhado por uma indução da actividade da fosfatase alcalina.

Os resultados descritos no capítulo IV mostraram que o compósito de hidroxiapatite-biovidro apresenta características de superfície mais apropriadas para a proliferação e diferenciação das células de medula óssea humana que a hidroxiapatite, em todas as situações estudadas. As culturas que cresceram sobre a hidroxiapatite apresentaram o valor máximo de proliferação celular mais tarde, o que provavelmente explica a expressão mais tardia das características osteoblásticas (actividade da fosfatase alcalina e início do processo de mineralização), uma vez que há uma relação recíproca entre o crescimento celular e a diferenciação. No entanto, a ordem de grandeza do efeito da dexametasona, hormona da paratiróide e hormona do crescimento e, também, da doxiciclina e minociclina, seguiu um padrão semelhante nas culturas efectuadas na superfície dos dois materiais.

Os resultados apresentados mostraram que a expressão completa do fenótipo osteoblástico de culturas de células de medula óssea humana ocorreu mais cedo nas culturas efectuadas sobre o compósito, comparativamente com as que cresceram sobre a hidroxiapatite. O melhor desempenho biológico do compósito está muito provavelmente relacionado com a maior solubilidade deste material. Esta característica parece favorecer as interacções iniciais da superfície do material com o meio de cultura, nomeadamente a formação de uma camada de apatite e a adsorção de moléculas envolvidas no recrutamento e adesão das células ósseas, passo fundamental para o crescimento e diferenciação das populações osteogénicas e consequente formação de uma matriz extracelular mineralizada nas culturas. De acordo com estudos anteriores<sup>307</sup>, a taxa de formação da camada de apatite é maior no compósito do que na hidroxiapatite.

*In vivo*, existem diversas hormonas e factores de crescimento produzidos pelas células presentes no microambiente ósseo e/ou que são armazenados na matriz extracelular, que medeiam a adesão, proliferação e funções das células osteoblásticas. Por sua vez, os vários fármacos utilizados no processo pós-cirúrgico (mais frequentemente, anti-inflamatórios e antibióticos), para além da acção farmacológica pretendida, podem influenciar significativamente o comportamento das células presentes no local. Estes compostos podem afectar vários fenómenos específicos no tecido ósseo, tal como a proliferação e diferenciação das células progenitoras e a formação e composição da matriz extracelular. A

caracterização dos fenómenos biológicos que ocorrem entre os biomateriais e as células ósseas e a possibilidade da sua modulação farmacológica constituem aspectos particularmente relevantes no estudo de materiais para substituição óssea. Os resultados descritos neste trabalho sugerem que a utilização sinérgica de um compósito de hidroxiapatite–biovidro e de diversos fármacos, que influenciam o comportamento osteoblástico, promove a proliferação e diferenciação das células osteoblásticas e a mineralização *in vitro*.

Os resultados obtidos neste trabalho para cumprimento dos objectivos propostos têm interesse, fundamentalmente, em duas áreas de conhecimento:

- desenvolvimento de materiais com características de biocompatibilidade e bioactividade apropriadas para se observarem respostas específicas e desejáveis das células osteoblásticas, de modo a garantir o processo de osteointegração;
- contribuição para o desenvolvimento de vertentes farmacológicas que possibilitem o controlo de alguns dos problemas associados à utilização dos biomateriais relacionados com a resposta do hospedeiro, possibilitando uma mais rápida reconstrução óssea local e osteointegração do material; relativamente a este aspecto, o desenvolvimento de sistemas de libertação local de fármacos utilizando compósitos pode ser de grande interesse pois permite associar o potencial osteogénico destes materiais e a possibilidade de modular a resposta do hospedeiro de um modo que se identifique com os objectivos pretendidos.

O trabalho desenvolvido no âmbito desta tese permitiu a optimização das condições de cultura de modo a observar-se a expressão completa do fenótipo osteoblástico em culturas de células de medula óssea humana cultivadas na superfície do compósito de hidroxiapatite–biovidro. Este tipo de metodologia permite explorar a possibilidade de expandir a utilização do compósito como suporte de cultura de células de medula óssea retiradas previamente do hospedeiro e o seu crescimento em condições que favorecem a diferenciação osteoblástica. A posterior implantação de um material colonizado com células osteogénicas do hospedeiro pode representar uma abordagem lógica para permitir uma mais rápida regeneração local e integração do material.



# BIBLIOGRAFIA

- 1 Carvalho, G.S., **Biocompatibility: *in vitro* and *in vivo* studies**. Workshop, Porto. 1995.
- 2 Galante, J.O., Lemons, J., Spector, M., Wilson Jr, P.D., Wright, T.M., The biologic effects of implant materials. **J. Orthop. Res.** 1991; 9: 760-775.
- 3 Puleo, D.A., Bizios, J., Formation of focal contacts by osteoblasts cultured on orthopedic biomaterials. **J. Biomed. Mater. Res.** 1992; 26: 291-301.
- 4 van Blitterswijk, C.A., Bakker, D., Hesselink, S.C., Koerten, H.K., Reactions of cells at implant surfaces. **Biomaterials.** 1991; 12 (2): 187-193.
- 5 Bagambisa, F.B., Kappert, H.F., Schilli, W., Interfacial reactions of osteoblasts to dental and implant materials. **J. Oral Maxillofac. Surg.** 1994; 52: 52-56.
- 6 Williams, D.F., de Groot, K., Lee, A.J.C., Consensus and definitions in biomaterials. **Advances in Biomaterials.** 1988; 8: 11-16.
- 7 Williams, D., Cahn, R.W., Bever, M.B., **Concise Encyclopedia of Medical & Dental Materials**. Pergamon Press. 1990.
- 8 Williams, D., **Medical Devices and Biomaterials.** 1991; Jan/Feb: 44-48.
- 9 Ratner, B.D., New ideas in biomaterials science – a path to engineered biomaterials. **J. Biomed. Mater. Res.** 1993; 27: 837-850.
- 10 Laing, P.G., World standards for surgical implants: an American perspective. **Biomaterials.** 1994; 15(6): 403-407.
- 11 Fischman, G.S., Ceramics for inert biomedical applications. In: Eds. Fischman, G.S., Clare, A., Hench, L. **Bioceramics: Materials and Applications – vol.48**. Ceramics Transactions, 1990.
- 12 Baron, R., Anatomy and ultrastructure of bone. In: Ed. Favus, M.J. **Primer of the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism**. Raven Press, 2<sup>nd</sup> ed., 1993: 3-9.
- 13 Puzas, J.E., The osteoblast. In: Ed. Favus, M.J. **Primer of the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism**. Raven Press, 2<sup>nd</sup> ed., 1993: 15-21.
- 14 Junqueira, L.C., Carneiro, J., Tecido ósseo. In: Junqueira, L.C., Carneiro, J. **Histologia Básica**. Guanabara Koogan, 3<sup>a</sup> ed., 1974: 132-155.
- 15 Martin, T.J., Findlay, D.M., Heath, J.K., Ng, K.W., Osteoblasts: differentiation and function. In: Eds. Mundy, G.R., Martin, T.J. **Handbook of Experimental Pharmacology – vol. 107**. Springer-Verlag, 1993: 149-183.
- 16 Ziats, N.P., Miller, K.M., Anderson, J.M., *In vitro* and *in vivo* interactions of cells with biomaterials. **Biomaterials.** 1988; 9 (1): 5-13.
- 17 Aubin, J.E., Turksen, K., Heersche, J.N.M., Osteoblastic cell lineage. In: Ed. Noda, M. **Cellular and Molecular Biology of Bone**. Academic Press Inc., 1993: 2-45.
- 18 Nijweide, P.J., Burger, E.H., Feyen, J.H.M., Cells of bone: proliferation, differentiation and hormonal regulation. **Physiological Reviews.** 1986; 66 (4): 855-886.
- 19 Rodan, G.A., Introduction to bone biology. **Bone.** 1992; 13: S3-S6.
- 20 Fernandes, M.H., Mecanismos de regulação do metabolismo ósseo. **Acta Médica Portuguesa.** 1998; 11: 41-52.
- 21 Kokubo, T., Bioactive glass ceramics: properties and applications. **Biomaterials.** 1991; 12: 155-163.



- 22 Anderson, H.C., Morris, D.C., Mineralization. In: Eds. Mundy, G.R., Martin, T.J. **Handbook of Experimental Pharmacology – vol. 107**. Springer-Verlag, 1993: 267-287.
- 23 Anderson, H.C., Mechanism of mineral formation in bone. **Laboratory Investigation**. 1989; 60 (3): 320-330.
- 24 Vaananen, H.K., Mechanism of bone turnover. **Annals of Medicine**. 1993; 25: 353-359.
- 25 Marks, S.C., Hermey, D.C., The structure and development of bone. In: Eds. Bilezikian, J.P., Raisz, L.G., Rodan, G.A. **Principles of Bone Biology**. Academic Press, 1996: 3-14.
- 26 Bizios, R., Mini – Review: Osteoblasts: an *in vitro* model of bone-implant interactions. **Biotechnology and Bioengineering**. 1994; 43: 582-585.
- 27 Ott, S.M. Theoretical and methodological approach. In: Eds. Bilezikian, J.P., Raisz, L.G., Rodan, G.A. **Principles of Bone Biology**. Academic Press, 1996: 231-241.
- 28 Harmand, M.F., Human cell culture and characterization of cell/biomaterial interface. **Clinical Materials**. 1992; 11: 145-150.
- 29 Garnero, P., Delmas, P.D., Measurements of biochemical markers: methods and limitations. In: Eds. Bilezikian, J.P., Raisz, L.G., Rodan, G.A. **Principles of Bone Biology**. Academic Press, 1996: 1277-1291.
- 30 Black, J., Ceramics and Composites. In: Black, J. **Orthopaedic Biomaterials in Research and Practice**. Churchill Livingstone Inc., 1988: 133-161.
- 31 Hench, L., Ethridge, E.C., **Biomaterials – An Interfacial Approach**. Academic Press, 1982.
- 32 Bajpai, P.K., Billotte, W.G., Ceramics Biomaterials. In: Ed. Bronzino, J.D. **The Biomedical Engineering Handbook**. CRC Press, 1995: 552-580.
- 33 Ducheyne, P., Bioceramics: Material characteristics versus *in vivo* behaviour. **J. Biomed. Mater. Res.** 1987; 21 (A2): 219-236.
- 34 Bonfield, W. et al., Biomechanical stability and design strength. In: Eds. Ducheyne, P., Lemons, J. **Bioceramics: Material characteristics versus *in vivo* behaviour, vol.523**. Annals of the New York Academy of Sciences, 1988: 287-291.
- 35 Van Raemdonk, W., Ducheyne, P., DeMeester, P., Calcium Phosphate Ceramics. In: Eds. Ducheyne, P., Hastings, G.W. **Metal and Ceramic Biomaterials. Vol.II. Strength and Surface**. CRC Press, Boca Raton, 1984: 143-166.
- 36 Misch, C.E., Dietsh, F., Bone-grafting materials in implant dentistry. **Implant Dentistry**. 1993; 2(3): 158-167.
- 37 Paiva, O., Ribeiro, C., **Interfaces em Materiais de Implante**. 1992.
- 38 Pizzoferrato, A., Cenni, E., Ciapetti, G., Savarino, S., Stea, S., *In vitro* cytocompatibility and tissue reaction to ceramics. In: Eds. Ravaglioli, A., Krajewski, A. **Bioceramics and the Human Body**. Elsevier Applied, 1992: 285-294.
- 39 Ramselaar, M.M.A., Driessens, F.C.M., Kalk, W., Van Mullem, P.J., Biodegradation of four calcium phosphate ceramics; *in vivo* rates and tissue interactions. **J. Materials Science**. 1991; 2: 63-70.
- 40 Hench, L., Ceramics, glasses, and glass-ceramics. In: Eds. Ratner, B.D., Hoffman, A.S., Schoen, F.J., Lemons, J.E. **Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine**. Academic Press, 1996: 73-84.
- 41 Hench, L.L., Wilson, J., Surface-active biomaterials. **Science**. 1984; 226: 630-636.

- 42 Jarcho, M., Kay, J.F., Kenneth, I., Gumarr, K.I., Doremus, R.H., Drobeck, H.P., Tissue, cellular and subcellular events at a bone-ceramic hydroxylapatite interface. **J. Bioeng.** 1977; 1: 79-92.
- 43 Bagambisa, F.B., Joos, U., Schilli, W., Mechanisms and structure of the bond between bone and hydroxyapatite ceramics. **J. Biomed. Mater. Res.** 1993; 27: 1047-1055.
- 44 Hulshoff, J.E.G., van Dijk, K., de Ruijter, J.E., Rietveld, F.J.R., Ginsel, L.A., Jansen, J.A., Interfacial phenomena: an *in vitro* study of the effect of calcium phosphate (Ca-P) ceramic on bone formation. **J. Biomed. Mater. Res.** 1998; 40: 464-474.
- 45 Neo, M., Nakamura, T., Ohtsuki, C., Kokubo, T., Yamamuro, T., Apatite formation on three kinds of bioactive material at an early stage *in vivo*: A comparative study by transmission electron microscopy. **J. Biomed. Mater. Res.** 1993; 27: 999-1006.
- 46 Ogiso, M., Kaneda, H., Arasaki, J., Tabata, T., Epithelial attachment and bone tissue formation on the surface of hydroxyapatite dental implants. In: Eds. Winter, G.D., et al. **Advances in Biomaterials 1980.** John Wiley and Sons Ltd, 1982: 59-64.
- 47 Jarcho, M., Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. **Clin. Orthop.** 1981; 157: 259-279.
- 48 de Bruijn, J.D., van Blitterswijk, C.A., Davies, J.E., Initial bone matrix formation at the hydroxyapatite interface *in vivo*. **J. Biomed. Mater. Res.** 1995; 29: 89-99.
- 49 Shen, X., Roberts, E., Peel, S.A.F., Davies, J.E., Organic extracellular matrix components at the bone cell/substratum interface. **Cells and Materials.** 1993; 3: 257-272.
- 50 Bagambisa, F.B., Kappert, H.F., Schilli, W., Interfacial reactions of osteoblast to dental and implant materials. **J. Oral Maxillofac. Surg.** 1994; 52: 52-56.
- 51 de Bruijn, J.D., Klein, C.P.A.T., de Groot, K., van Blitterswijk, C.A., The ultrastructure of the bone-hydroxyapatite interface *in vitro*. **J. Biomed. Mater. Res.** 1992; 26: 1365-1382.
- 52 Sautier, J.M., Nefussi, J.R., Forest, N., Ultrastructural study of bone formation on synthetic hydroxyapatite in osteoblast cultures. **Cells and Materials.** 1991; 1(3): 209-217.
- 53 de Bruijn, J.D., Davies, J.E., Flach, J.S., de Groot, K., Ultrastructure of the mineralized tissue/calcium phosphate interface *in vitro*. **Mat. Res. Soc. Symp. Proc.** 1992; 252: 63-70.
- 54 de Bruijn, J.D., Klein, C.P.A.T., de Groot, K., van Blitterswijk, C.A., The bone-calcium phosphate interface *in vitro*. In: Eds. Doherty, P.J. et al. **Advances in Biomaterials – Biomaterial Tissue Interfaces, vol. 10.** Elsevier Science Publishers, 1992: 305-309.
- 55 Rizkalla, A.S., Jones, D.W., Clarke, D.B., Hall, G.C., Crystallization of experimental bioactive glass compositions, **J. Biomed. Mater. Res.** 1996; 32: 119-124.
- 56 Heimke, G., Structural characteristics of metals and ceramics. In: Eds. Ducheyne, P., Hastings, G.W. **Metal and Ceramic Biomaterials. Vol.II. Strength and Surface.** CRC Press, Boca Raton, 1984: 8-62.
- 57 de Groot, K., Bioceramics consisting of calcium phosphate salts. **Biomaterials.** 1980; 1 (1): 47-50.
- 58 Gross, K.A., Berndt, C.C., Goldschlag, D.D., Iacono, V.J., *In vitro* changes of hydroxyapatite coatings. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants.** 1997; 12: 589-597.
- 59 Aoki, H., In: Eds. Aoki, H., Sawai, K. **Medical Applications of Hydroxyapatite.** Ishiyaku EuroAmerica, Inc, 1994.
- 60 Aoki, H., **Science and Medical Applications of Hydroxyapatite.** JAAS, 1991.
- 61 LeGeros, R.Z., Biodegradation and bioresorption of calcium phosphate ceramics. **Clinical Materials.** 1993; 14: 65-88.



- 62 Liu, D.M., Fabrication of hydroxyapatite ceramic with controlled porosity. **J. Mater. Sci: Mater. Med.** 1997; 8: 227-232.
- 63 Zhou, J., Zhang, X., Chen, J., Zeng, S., de Groot, K., High temperature characteristics of synthetic hydroxyapatite. **J. Mater. Sci: Mater. Med.** 1993; 4: 83-85.
- 64 Daculsi, G., LeGeros, J.P., Three-dimensional defects in hydroxyapatite of biological interest. **J. Biomed. Mat. Res.** 1995; 31: 495-501.
- 65 LeGeros, R.Z., Significance of the porosity and physical chemistry of calcium phosphate ceramics. In: Eds. Ducheyne, P., Lemons, J. **Bioceramics: Material characteristics versus *in vivo* behaviour**, vol. 523. Annals of the New York Academy of Sciences, 1988: 268-273.
- 66 Rey, C., Calcium phosphate biomaterials and bone mineral. Differences in composition, structures and properties. **Biomaterials.** 1990; 11: 13-15.
- 67 Rout, P.G.J., Tarrant, S.F., Frame, J.W., Davies, J.E., Interaction between primary bone cell cultures and biomaterials. Part 3. A comparison of dense and macroporous hydroxyapatite. In: Eds. Pizzoferrato, A., Marchetti, P.G., Ravaglioli, A., Lee, A.J.C. **Advances in Biomaterials – Biomaterials and Clinical Applications**, vol. 7. Elsevier Science Publishers, 1987: 591-596.
- 68 van Blitterswijk, C.A., Grote, J.J., Kuijpers, W., Macroporous and dense hydroxyapatite as middle ear implant materials. In: Eds. Ducheyne, P., Vander Perre, G., Aubert, A.E. **Advances in Biomaterials – Biomaterials and Biomechanics**, vol. 5. Elsevier Science Publishers, 1984: 433-438.
- 69 Lutgert, H.W., van Blitterswijk, C.A., Grote, J.J., Reconstruction of the external ear canal and middle ear with hydroxyapatite implants. In: Eds. Putter, C., DeLange, G.L., de Groot, K. **Advances in Biomaterials – Implant Materials in Biofunction**, vol. 8. Elsevier Science Publishers, 1988: 93-97.
- 70 van Blitterswijk, C.A., Grote, J.J., Lutgert, H.W., Koerten, H.K., Biological performance of hydroxyapatite as otologic biomaterial: an evaluation of clinically applied hydroxyapatite. In: Eds. Putter, C., DeLange, G.L., de Groot, K. **Advances in Biomaterials – Implant Materials in Biofunction**, vol. 8. Elsevier Science Publishers, 1988: 221-225.
- 71 Kenney, E.B., Lekovic, V., Carranza, F.A., Dimitrijevic, B., Takei, H., A comparative clinical study of solid and granular porous hydroxylapatite implants in human periodontal osseous defects. **J. Biomed. Mater. Res.** 1988; 22: 1233-1243.
- 72 DeLange, G.L., de Putter, C., de Groot, K., Histology of the attachment of gingival fibers to dental root implants of Ca-hydroxyapatite. In: Eds. Ducheyne, P., Vander Perre, G., Aubert, A.E. **Advances in Biomaterials – Biomaterials and Biomechanics**, vol. 5. A.E., Elsevier Science Publishers, 1984: 451-456.
- 73 Cavalheiro, J., Vasconcelos, M., Afonso, A., Branco, R., Influência da composição química e da estrutura dos grânulos de hidroxiapatite na regeneração do tecido ósseo. **Rev. Port. Implantologia.** 1994; 1: 35-38.
- 74 Ogiso, M., Yamamura, M., Kuo, P.T., Borgese, D., Matsumoto, T., Comparative push-out test of dense HA implants: Findings in a canine study. **J. Biomed. Mater. Res.** 1998; 39: 364-372.
- 75 Yamamura, M., Iwata, H., Yotsuyanagi, T., Synthesis of antibiotic-loaded hydroxyapatite beads and *in vitro* drug release testing. **J. Biomed. Mater. Res.** 1992; 26: 1053-1064.
- 76 Downes, S., Clifford, C.J., Scotchford, C., Klein, C.P.A.T., Comparison of the release of growth hormone from hydroxyapatite, heat-treated hydroxyapatite, and fluoroapatite coatings on titanium. **J. Biomed. Mater. Res.** 1995; 29: 1053-1060.
- 77 Hench, L.L., Wilson, J., **Introduction to bioceramics.** World Scientific, Singapura, 1993.
- 78 Hench, L.L., Bioceramics from Concept to Clinic. **Journal of American Ceramic Society.** 1991; 74 (7): 1487-1510.

- 79 Bundy, K.J., Penn, R.W., The effect of surface preparation on metal/bone cement interfacial strength. **J. Biomed. Mater. Res.** 1987; 21 (6): 773-805.
- 80 Abe, Y., Hosono, H., Phosphate glasses and glass-ceramics. In: Ed. Kanazawa, T. **Inorganic Phosphate Materials**. Elsevier, 1989: 247-281.
- 81 Nagase, M., Abe, Y., Chigira, M., Udagawa, E., Toxicity of silica-containing calcium phosphate glasses demonstrated in mice. **Biomaterials**. 1992; 13 (3): 172-175.
- 82 Lycett, R.W., Hughes, A.N., Corrosion. In: Eds. Ducheyne, P., Hastings, G.W. **Metal and Ceramic Biomaterials Vol.II. Strength and Surface**. CRC Press, Boca Raton, 1984: 91-118.
- 83 Hench, L.L., Bioactive ceramics. In: Eds. Ducheyne, P., Lemons, J. **Bioceramics: Material characteristics versus *in vivo* behaviour**, vol. 523. Annals of the New York Academy of Sciences, 1988: 268-273.
- 84 Ravaglioli, A., Krajewski, A., **Bioceramics: Materials. Properties. Applications**. Chapman and Hall, 1992.
- 85 Hazan, R., Brener, R., Oron, U., Bone growth to metal implants is regulated by their surface chemical properties. **Biomaterials**. 1993; 14 (8): 570-577.
- 86 Ducheyne, P., et al., Bioactive glasses, aluminum oxide, and titanium. Ion transport phenomena and surface analysis. In: Eds. Ducheyne, P., Lemons, J. **Bioceramics: Material characteristics versus *in vivo* behaviour**, vol. 523. Annals of the New York Academy of Sciences, 1988: 257-269.
- 87 Boyan, B., Schepers, E., Yamamuro, T., Wilson, J., Gross, U., Reck, R., et al, Bioactive glasses, aluminium oxide and titanium: biochemistry of interface. In: Eds. Ducheyne, P., Lemons, J. **Bioceramics: Material characteristics versus *in vivo* behaviour**, vol. 523. Annals of the New York Academy of Sciences, 1988: 262-267.
- 88 Kasemo, B., Lausmaa, J., **Surface characterization of biomaterials, Progress in Biomedical Engineering**, 6. Eds. Ratner, B.D. (Proceedings do simpósio Surface Analysis of Biomaterials, Ann Arbor, Michigan, Junho de 1987: 1-12).
- 89 Soueidan, A., Gan, O.I., Bouler, J.M., Gouin, F., Daculsi, G., Biodegradation of synthetic biphasic calcium phosphate and biological calcified substratum by cells of hematopoietic origin. **Cells and Materials**. 1995; 5: 31-44.
- 90 Kawaguchi, H., Ogawa, T., Shirakawa, M., Okamoto, H., Akisaka, T., Ultrastructural and cytochemical characteristics of multinucleated cells after hydroxyapatite implantation into rat periodontal tissue. **J. Periodont. Res.** 1992; 27 (19): 48-54.
- 91 Yamada, S., Nakamura, T., Kokubo, T., Oka, M., Yamamuro., Osteoclastic resorption of apatite formed on apatite -and wollastonite- containing glass-ceramic by a simulated body fluid. **Cells and Materials**. 1994; 4: 347-356.
- 92 van Blitterswijk, C.A., Grote, J.J., Kuypers, W., Blok-van Hoek, C.J.G., Daems, W.T., Bioreactions at the tissue/hydroxyapatite interface. **Biomaterials**. 1985; 6: 243-251.
- 93 Lu, J.X., Gallur, A., Flautre, B., Anselme, K., Deschamps, M., Thierry, B., Hardouin, P., Comparative study of tissue reactions to calcium phosphate ceramics among cancellous, cortical and medullar bone sites in rabbits. **J. Biomed. Mater. Res.** 1998; 42: 357-367.
- 94 Gomi, K., Lowenberg, B., SHAIro, G., Davies, J.E., Resorption of sintered synthetic hydroxyapatite by osteoclasts *in vitro*. **Biomaterials**. 1993; 14 (2): 91-96.
- 95 Shimizu, H., Sakamoto, S., Sakamoto, B., Lee, D.D., The effect of substrate composition and condition on resorption by isolated osteoclasts. **Bone Miner.** 1989; 6: 261-275.



- 96 Heimke, G., Griss, P., In: Eds. de Groot, K. **Bioceramics of Calcium Phosphate**. CRC Press Inc., 1983: 79-98.
- 97 Maxian, S.H., Zawaddasky, J.P., Dunn, M.G., Effect of calcium/phosphate coating resorption and surgical fit on the bone/implant interface. **J. Biomed. Mater. Res.** 1988; 28: 1311-1319.
- 98 Koerten, H.K., ven der Meulen, J., Degradation of calcium phosphate ceramics. **J. Biomed. Mater. Res.** 1989; 44: 78-86.
- 99 Maxian, S.H., Zawaddasky, J.P., Dunn, M.G., Mechanical and histological evaluation of amorphous calcium phosphate and poorly crystallized hydroxyapatite coatings on titanium implants. **J. Biomed. Mater. Res.** 1992; 27: 717-728.
- 100 Roudier, M., Bouchon, C., Rouvillain, J.L., Arnédée, J., Bareille, R., Rouais, F., Fricain, J.C., The resorption of bone-implanted corals varies with the porosity but also with the host reaction. **J. Biomed. Mater. Res.** 1995; 29: 909-915.
- 101 de Bruijn, J.D., **Calcium Phosphate Biomaterials: Bone-bonding and Biodegradation Properties**. Tese de Doutorado, 1993.
- 102 Anderson, J.M., Mechanisms of inflammation and infection with implanted devices. **Cardiovasc. Pathol.** 1993; 2 (3): 335-415.
- 103 Osborn, J.F., Newesely, H., Dynamic aspects of the implant/bone interface. In: Eds. Heimke, G., Verlag, C.H. **Dental Implants**. 1980: 11-123.
- 104 Pizzoferrato, A., Ciapetti, G., Stea, S., Cenni, E., Arciola, C.R., Granchi, D., Savarino, L., Cell culture methods for testing biocompatibility. **Clinical Materials**. 1994; 15: 173-190.
- 105 Kirkpatrick, C.J., Mittermayer, C., Theoretical and practical aspects of testing potential biomaterials *in vitro*. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**. 1990; 1: 9-13.
- 106 Kirkpatrick, C.J., Biological testing of materials and medical devices. **Regulatory Affairs**. 1992; 4:13-32.
- 107 Ciapetti, G., Pizzoferrato, A., **Quantitative evaluation of the effect of biomaterials on cells *in vitro***. (Workshop, Porto) Maio 1995.
- 108 Kirkpatrick, C.J., Dekker, A., **Quantitative evaluation of cell interaction with biomaterials *in vitro***. (Proceedings da 9ª ESB, Chester, U.K.) Setembro 1991.
- 109 Amedee, J., Bareille, R., Jeandot, R., Bordenave, L., Remy, M., Rouais, F., Baquey, C., Evaluation of cell colonization on biomaterials: preventing cell attachment to plastic containers. **Biomaterials**. 1994; 15 (12): 1029-1031.
- 110 Ciapetti, G., Cenni, E., Cavedagna, D., Pratelli, L., Pizzoferrato, A., Cell culture methods to evaluate the biocompatibility of implant materials. **ATLA**. 1992; 20: 52-60 (Italian Tissue Culture Meeting).
- 111 Freshney, R.I., In: Freshney, R.I. **Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Techniques**. Wiley-Liss, 3ª ed., 1994: 1-7.
- 112 Freshney, R.I., In: Freshney, R.I. **Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Techniques**. Wiley-Liss, 3ª ed., 1994: 127-147.
- 113 Freshney, R.I., In: Freshney, R.I. **Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Techniques**. Wiley-Liss, 3ª ed., 1994: 149-159.
- 114 Freshney, R.I., In: Freshney, R.I. **Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Techniques**. Wiley-Liss, 3ª ed., 1994: 9-16.

- 115 Freshney, R.I., In: Freshney, R.I. **Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Techniques**. Wiley-Liss, 3ª ed., 1994: 71-103.
- 116 Gronowicz, G., Raisz, L.G., Bone formation assays. In: Eds. Bilezikian, J.P., Raisz, L.G., Rodan, G.A. **Principles of Bone Biology**. Academic Press, 1996: 1253-1265.
- 117 Maniopoulos, C., Sodek, J., Melcher, A.H., Bone formation *in vitro* by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. **Cell Tissue Res**. 1988; 254: 317-330.
- 118 Bellows, C.G., Aubin, J.E., Heersche, J.N.M., Initiation and progression of mineralization of bone nodules formed *in vitro*: the role of alkaline phosphatase and organic phosphate. **Bone and Mineral**. 1991; 14: 27-40.
- 119 Bellows, C.G., Aubin, J.E., Heersche, J.N.M., Physiological concentrations of glucocorticoids stimulate formation of bone nodules from isolated rat calvaria cells *in vitro*. **Endocrinology**. 1987; 121: 1985-1992.
- 120 Cheng, S.L., Yang, J.W., Riffins, L., Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells *in vitro*. **Endocrinology**. 1994; 134: 277-286.
- 121 Aronow, M.A., Gerstenfeld, T.A., Owen, T.A., Tassinari, M.S., Stein, G.S., Lian, J.B., Factors that promote progressive development of the osteoblast phenotype in cultured fetal rat calvaria cells. **J. Cell Phys**. 1990; 143: 213-221.
- 122 Stein, G.S., Lian, J.B., Molecular mechanisms mediated proliferation-differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. **End. Rev.** 1993; 14 (4):424-442.
- 123 Gundle, R., Joyner, C.J., Triffitt, J.T., Human bone tissue formation in diffusion chamber culture *in vitro* by bone-derived cells and marrow stromal fibroblastic cells. **Bone**. 1995; 16 (6): 597-601.
- 124 Satomura, K., Nagayama, M., Ultrastructure of mineralized nodules formed in rat bone marrow stromal cell culture *in vitro*. **Acta Anatomica**. 1991; 142: 97-104.
- 125 Nakade, O., Baylink, D.J., Lau, K.H.W., Phenytoin at micromolar concentrations is an osteogenic agent for human-mandible-derived bone cells *in vitro*. **J. Dent. Res**. 1995; 74 (1): 331-337.
- 126 Nagata, T., Bellows, C.G., Kasugai, S., Butler, W.T., Sodek, J., Biosynthesis of bone proteins [SPP-1 (secreted phosphoprotein-1, osteopontin), BSP (bone sialoprotein) and SPARC (osteonectin)] in association with mineralized-tissue formation by fetal-rat calvarial cells in culture. **Biochem. J**. 1991; 274: 513-520.
- 127 Wong, G.L., May, C.N.G., Calabrese, D.W., Swartzendruber, D.E., Characterization of bone cells isolated on discontinuous percoll gradients: distribution in sequentially derived populations. **J. Bone and Mineral Res**. 1991; 6 (9): 969-976.
- 128 Andrews, P.B., Ten Cate, A.R., Davies, J.E., Mineralized matrix synthesis by isolated mouse odontoblast-like cells *in vitro*. **Cells and Materials**. 1993; 3(1): 67-82.
- 129 Villanueva, J.E., Nimni, M.E., Promotion of calvarial cell osteogenesis by endothelial cells. **J. Bone and Mineral Res**. 1990; 5 (7): 733-739.
- 130 Bernier, S.M., Desjardins, J., Sullivan, A.K., Goltzman, D., establishment of an osseous cell line from fetal rat calvaria using an immunocytolytic method of cell selection: characterization of the cell line and of derived clones. **J. Cellular Physiology**. 1990; 145: 274-285.
- 131 Nefussi, J.R., Septier, D., Collin, P., Goldberg, M., Forest, N., A comparative ultrahistochemical study of glycosaminoglycans with Cuproline Blue in bone formed *in vivo* and *in vitro*. **Calcif. Tissue Int**. 1989; 44: 11-19.
- 132 Nefussi, J.R., Boy-Lefevre, M.L., Boulekbache, H., Forest, N., Mineralization *in vitro* of matrix formed by osteoblasts isolated by collagenase digestion. **Differentiation**. 1985; 29: 160-168.



- 133 Fedarko, N.S., Moerike, M., Brenner, R., Robey, P.G., Vetter, U., Extracellular matrix formation by osteoblasts from patients with osteogenesis imperfecta. **J. Bone and Mineral Res.** 1992; 7 (8): 921-939.
- 134 Bouvier, M., Couble, M.L., Hartmann, D.J., Gauthier, J.P., Magloire, H., Ultrastructural and immunocytochemical study of bone-derived cells cultured in three-dimensional matrices: influence of chondroitin-4 sulfate on mineralization. **Differentiation.** 1990; 45: 128-137.
- 135 Inoue, T., Chen, S.H., Shimono, M., Induction of cartilage and bone formation by cells from explants of various oral tissues *in vitro*. **The Bulletin of Tokyo Dental College.** 1990; 31 (4): 295-300.
- 136 Nolan, P.C., Nicholas, R.M., Mulholland, B.J., Mollan, R.A.B., Wilson, D.J., Culture of human osteoblasts on demineralised human bone. **J. Bone and Joint Surgery.** 1992; 74 B: 284-286.
- 137 Masquelier, D., Herbert, B., Hauser, N., Mermilled, P., Schonne, E., Remack, C., Morphologic characterization of osteoblast-like cell cultures isolated from newborn rat calvaria. **Calcif. Tissue Int.** 1990; 47: 92-104.
- 138 Zimmermann, H.C., Wachtel, H.C., Noppe, C., Patterns of mineralization *in vitro*. **Cell Tissue Res.** 1991; 263: 483-493.
- 139 Bellows, C.G., Heersche, J.N.M., Aubin, J.E., Inorganic phosphate added exogenously or released from  $\beta$ -glycerophosphate initiates mineralization of osteoid nodules *in vitro*. **Bone and Mineral.** 1992; 17: 15-29.
- 140 Groessner-Schreiber, R.S., Tuan, J., Enhanced extracellular matrix production and mineralization by osteoblasts cultured on titanium surfaces *in vitro*. **J. Cell Science.** 1992; 101: 209-217.
- 141 Nagai, M., Suzuki, Y., Ota, M., Systematic assessment of bone resorption, collagen synthesis, and calcification in chick embryonic calvaria *in vitro*: effects of prostaglandin E<sub>2</sub>. **Bone.** 1993; 14 (4): 655-659.
- 142 Gotoh, Y., Hiraiwa, K., Nagayama, M., *In vitro* mineralization of osteoblastic cells derived from human bone. **Bone and Mineral** 1990; 8: 239-250.
- 143 Grégoire, M., Orly, I., Menanteau, J., The influence of calcium phosphate biomaterials on human bone cell activities. An *in vitro* approach. **J. Biomed. Mater. Res.** 1990; 24: 165-177.
- 144 Kassem, M., Risteli, L., Masekilde, L., Melsen, F., Eriksen, E.F., Formation of osteoblast-like cells from human mononuclear bone marrow cultures. **APMIS.** 1991; 99: 269-274.
- 145 Schmidt, R., Kulbe, K.D., Long-term cultivation of human osteoblasts. **Bone and Mineral** 1993; 20: 211-221.
- 146 Hayashi, Y., Murakami, N., Pathological mineralization in a serially passaged cell line from rat pulp. **J. Oral Pathol. Med.** 1993; 22: 175-179.
- 147 Stein, G.S., Lian, J.B., Molecular mechanisms mediating developmental and hormone-regulated expression of genes in osteoblasts: an integrated relationship of cell growth and differentiation. In: Ed. Noda, M. **Cellular and Molecular Biology of Bone.** Academic Press Inc., 1993: 47-95.
- 148 Stein, G.S., Lian, J.B., Stein, J.L., van Wijnen, A.J., Frenkel, B., Montecino, M., Mechanisms regulating osteoblast proliferation and differentiation. In: Eds. Bilezikian, J.P., Raisz, L.G., Rodan, G.A. **Principles of Bone Biology.** Academic Press, 1996: 69-86.
- 149 Rickard, D.J., Kassem, M., Hefferar, T.E., Sarkar, G., Spelsberg, T.C., Riggs, B.L., Isolation and characterization of osteoblast precursor cells from human bone marrow. **J. Bone Mineral Res.** 1996; 11: 312-324.
- 150 Casser-Bette, M., Murray, A.B., Closs, E.I., Erfle, V., Schmidt, J., Bone formation by osteoblast-like cells in a three-dimensional cell culture. **Calcif. Tissue Int.** 1990; 46: 46-56.

- 151 Auf'mkolk, B., Hauschka, P.V., Schwartz, E.R., Characterization of human bone cells in culture. **Calcif. Tissue Int.** 1985; 37: 228-235.
- 152 Nefussi, J.R., Brami, G., Modrowski, D., Oboeuf, M., Forest, N., Sequential expression of bone matrix proteins during rat calvaria osteoblast differentiation and bone nodule formation *in vitro*. **J. Histochemistry and Cytochemistry.** 1997; 45: 493-503.
- 153 Fried, A., Benayahu, D., Wientroub, S., Marrow stroma-derived osteogenic clonal cell lines: putative stages in osteoblastic differentiation. **J. Cellular Physiology.** 1993; 155: 472-482.
- 154 Malaval, L., Modrowski, D., Gupta, A.K., Aubin, J.E., Cellular expression of bone-related proteins during *in vitro* osteogenesis in rat bone marrow stromal cell cultures. **J. Cellular Physiology.** 1994; 158: 555-572.
- 155 Ecarot-Charrier, B., Shepard, N., Charette, G., Grynepas, M., Glorieux, F.H., Mineralization in osteoblast cultures: a light and electron microscopic study. **Bone.** 1988; 147-154.
- 156 Williams, D.C., Boder, G.B., Toomey, R.E., Paul, D.C., Hillman, C.C., King, K.L., Van Frank, R.M., Johnston, C.C., Mineralization and metabolic response in serially passaged adult rat bone cells. **Calcif. Tissue Int.** 1980; 30: 233-246.
- 157 Koshihara, y., Kawamura, M., Oda, H., Higaki, S., *In vitro* calcification in human osteoblastic cell line derived from periosteum. **Biochem. Biophys. Res. Com.** 1987; 145: 651-657.
- 158 Satomura, K., Hiraiwa, K., Nagayama, M., Mineralized nodule formation in rat bone marrow stromal cell culture without  $\beta$ -glycerophosphate. **Bone and Mineral** 1991; 14: 41-54.
- 159 Hughes, F.J., McCulloch, C.A.G., Stimulation of the differentiation of osteogenic rat bone marrow stromal cells by osteoblast cultures. **Laboratory Investigation.** 1991; 64: 617-622.
- 160 Benayahu, D., Fried, A., Zipori, D., Wientroub, S., Subpopulations of marrow stromal cells share a variety of osteoblastic markers. **Calcif. Tissue Int.** 1991; 49: 202-207.
- 161 Haynesworth, S.E., Baber, M.A., Caplan, A.I., Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. **Bone.** 1992; 13: 69-80.
- 162 Nakagawa, H., Takagi, K., Kitaoka, M., Iyama, K.I., Usuku, G., Influence of monocyte-macrophage lineage cells on alkaline phosphatase activity of developing osteoblasts derived from rat bone marrow stromal cells. **The Journal of the Japanese Orthopaedic Association.** 1993; 67: 480-489.
- 163 Inoue, T., Chen, S.H., Morohoshi, Y., Shimono, M., Osteogenic activity of cells from dental pulp, periodontal ligament, bone marrow and muscle *in vitro*: an ultrastructural study and alkaline phosphatase activity. **The Bulletin of Tokyo Dental College.** 1992; 33: 7-12.
- 164 de Pollack, C., Arnaud, E., Renier, D., Marie, P.J., Age-related changes in bone formation, osteoblastic cell proliferation and differentiation during postnatal osteogenesis in human calvaria. **J. Cellular Biochemistry.** 1997; 64: 128-139.
- 165 Vilamitjana-Amedee, J., Bareille, R., Rouais, F., Caplan, A.I., Harmand, M.F., Human bone marrow stromal cells express an osteoblastic phenotype in culture. **In Vitro Cell. Dev. Biol.** 1993; 29A: 699-707.
- 166 Iwamoto, M., Shibano, K., Watanabe, J., Asada-Kubota, M., Ogawa, R., Kanamura, S., Culture of marrow stromal cells derived from bone marrow specimens formed at fracture site of human long bone. **Bone.** 1993; 14: 799-805.
- 167 Hayflick, L., The limited *in vitro* lifetime of human diploid cell strains. **Exp. Cell Res.** 1965; 37: 614-636.



- 168 Coelho, M.J., Trigo Cabral, A., Fernandes, M.H., Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part I: osteoblastic differentiation of serially passaged human bone marrow cells cultured in  $\alpha$ -MEM and in DMEM. **Biomaterials**. 2000; 21: 1087-1094.
- 169 Chavassieux, P.M., Chenu, C., Valentin-Opran, A., et al, Influence of experimental conditions on osteoblast activity in human primary bone cell cultures. **J. Bone Miner. Res.** 1990; 5: 337-343.
- 170 Rattner, A., Sabido, O., Massoubre, C., Rasclé, F., Frey, J., Characterization of human osteoblastic cells: influence of the culture conditions. **In Vitro Cell. Dev. Biol.** 1997; 33: 757-762.
- 171 Coelho, M.J., Fernandes, M.H., Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part II: effect of ascorbic acid,  $\beta$ -glycerophosphate and dexamethasone in the osteoblastic differentiation. **Biomaterials**. 2000; 21: 1095-1102.
- 172 Berridge, V., Tan, A.S., Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. **Arch. Biochem. Biophys.** 1993; 303: 474-482.
- 173 Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. **J. Biol. Chem.** 1951; 193:265-275.
- 174 McGee-Russel, S.M., Histochemical methods for calcium. **J. Histochemistry and Cytochemistry**. 1958; 6: 22-42.
- 175 Owen, T.A., Aronow, M., Shalhoub, V., Progressive development of the rat osteoblast phenotype *in vitro*: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation during formatio of bone extracellular matrix. **J. Cell Phys.** 1990; 143: 420-430.
- 176 Franceschi, R.T., The role of ascorbic acid in mesenchymal differentiation. **Nutr. Rev.** 1992; 50: 60-65.
- 177 Franceschi, R.T., Wilson, J.X., Dixon, S.J., Requirement for  $\text{Na}^+$ -dependent ascorbic acid transport in osteoblastic function. **Am. J. Physiol.** 1995; 268: C1430-C1439.
- 178 Qutob, S., Wilson, J.X., Insulin stimulates vitamin C recycling and ascorbate accumulation in osteoblastic cells. **Endocrinology**. 1998; 139: 51-56.
- 179 Lynch, M.P., Stein, J.L., Stein, G.S., Lian, J.B., The influence of type I collagen on the development and maintenance of the osteoblast phenotype in primary and passaged rat calvarial osteoblasts: modification of expression of genes supporting cell growth, adhesion and extracellular matrix mineralization. **Exp. Cell Res.** 1995; 216: 35-45.
- 180 Gwynn, I.A.P., Cell biology at interfaces. **J. Mat. Sci: Mat. Med.** 1994; 5: 357-360.
- 181 Verrier, S., Bareille, R., Rovira, A., Dard, M., Amedee, J., Human osteoprogenitor responses to orthopaedic implant: mechanism of cell attachment and cell adhesion. **J. Mat. Sci: Mat. Med.** 1996; 7: 46-51.
- 182 Dee, K.C., Rueger, D.C., Andersen, T.T., Bizios, R., Conditions which promote mineralization at the bone-implant interface: a model *in vitro* study. **Biomaterials**. 1996; 17: 209-215.
- 183 David-Ferreira, J.F., Citoesqueleto: composição, organização e significado funcional. In: Ed. Azevedo, C. **Biologia Celular**. LIDEL Ed. Técnicas, 1994: 189-202.
- 184 Chung, C.H., Golub, E.E., Forbes, E., Tokuoka, T., Shapiro, I.M., Mechanism of action of  $\beta$ -glycerophosphate on bone cell mineralization. **Calcif. Tissue Int.** 1992; 51: 305-311.
- 185 Morais, S., Dias, N., Sousa, J.P., Fernandes, M.H., Carvalho, G.S., *In vitro* osteoblastic differentiation of human bone marrow cells in the presence of metal ions. **J. Biomed. Mat. Res.** 1999; 44: 176-190.

- 186 Fernandes, M.H., Costa, M.A., Carvalho, G.S., Mineralization in serially passaged human alveolar bone cells. **J. Mat. Sci: Mat. Med.** 1997; 8: 61-65.
- 187 Ishida, Y., Heersche, J.N.M., Progesterone and dexamethasone stimulate proliferation and differentiation of osteoprogenitors and progenitors for adipocytes and macrophages in cell populations derived from adult rat vertebrae. **J. Bone Mineral Res.** 1996; 11 (7): 921-930.
- 188 Chen, J., Thomas, H.F., Sodek, J., Regulation of bone sialoprotein and osteopontin mRNA expression by dexamethasone and 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in rat bone organ cultures. **Connective Tissue Res.** 1996; 34:41-51.
- 189 Seymour, R.A., Heasman, P.A., In: Seymour, R.A., Heasman, P.A. **Drug, Diseases, and the Periodontium.** Oxford Medical Publications, 1992, 180-186.
- 190 Chaudhary, L.R. Avioli, L.V. Dexamethasone regulates 1L-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ -induced interleukin-8 production in human bone marrow stromal and osteoblast-like cells. **Calcif. Tissue Int.** 1994; 55: 16-20.
- 191 Ishibe, M., Nojima, T., Ishibashi, T., Koda, T., Kaneda, K., Rosier, R.N., Puzas, J.E., 17 $\beta$ -estradiol increases the receptor number and modulates the action of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in human osteosarcoma-derived osteoblast-like cells. **Calcif. Tissue Int.** 1995; 57: 430-435.
- 192 Rao, L.G., Wylie, J.N., Sutherland, M.S., Murray, T.M., 17 $\beta$ -estradiol enhances the stimulatory effect of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on alkaline phosphatase activity in human osteosarcoma cells in a differentiation-dependent manner. **J. Endocrinol.** 1996; 148: 181-187.
- 193 Canalis, E., Regulation of bone remodeling. In: Ed. Favus, M.J. **Primer of the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism.** Raven Press, 2<sup>nd</sup> ed., 1993: 33-37.
- 194 Kasperk, C., Schneider, U., Sommer, U., Niethard, F., Ziegler, R., Differential effects of glucocorticoids on human osteoblastic cell metabolism *in vitro*. **Calcif. Tissue Int.** 1995; 57:120-126.
- 195 Lukert, B.P., Kream, B.E., Clinical and basic aspects of glucocorticoid action in bone. In: Eds. Bilezikian, J.P., Raisz, L.G., Rodan, G.A. **Principles of Bone Biology.** Academic Press, 1996: 533-548.
- 196 Chen, T.L., Aronow, L., Feldman, D., Glucocorticoid receptors and inhibition of bone cell growth in primary culture. **Endocrinology.** 1977; 100: 619-628.
- 197 Chen, T.L., Feldman, D., Glucocorticoid receptors and actions in subpopulations of cultured rat bone cells. **J. Clin. Invest.** 1979; 67: 750-758.
- 198 Wong, G.L., Basal activities and hormone responsiveness of osteoblast-like and osteoclast-like bone cells are regulated by glucocorticoids. **J. Biol. Chem.** 1979; 254: 6337-6340.
- 199 Peck, W.A., Brandt, J., Miller, I., Hydrocortisone-induced inhibition of protein synthesis and uridine incorporation in isolated bone cells *in vitro*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 1967; 57: 1599-1606.
- 200 Peck, W.A., Messinger, K., Brandt, J., Carpenter, J., Impaired accumulation of ribonucleic acid precursors and depletion of ribonucleic acid in glucocorticoid-treated bone cells. **J. Biol. Chem.** 1969; 244: 4174-4184.
- 201 Majeska, R.J., Nair, B.C., Rodan, G.A., Glucocorticoid regulation of alkaline phosphatase in the osteoblastic osteosarcoma cell line ROS 17/2.8. **Endocrinology.** 1985; 116: 170-179.
- 202 Chen, T.L., Feldman, D., Glucocorticoid potentiation of the adenosine 3',5'-monophosphate response to parathyroid hormone in cultured rat bone cells. **Endocrinology.** 1978; 102: 589-596.
- 203 Wong, G.L., Lukert, B.P., Adams, J.S., Glucocorticoids increase osteoblast-like bone cell response to 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. **Nature.** 1980; 285: 254-257.



- 204 Leboy, P.S., Beresford, J.N., Devlin, C., Owen, M.E., Dexamethasone induction of osteoblast mRNAs in rat marrow stromal cell cultures. **J. Cellular Physiology**. 1991; 146: 370-378.
- 205 Benayahu, D., Kletter, Y., Zipori, D., Wientroub, S., Bone marrow-derived stromal cell line expressing osteoblastic phenotype *in vitro* and osteogenic capacity *in vivo*. **J. Cellular Physiology**. 1989; 140: 1-7.
- 206 Simmons, D.J., Seitz, P., Kidder, L., Klein, G.L., Waeltz, M., Gundberg, C.M., Tabuchi, C., Yang, C., Zhang, R.W., Partial characterization of rat marrow stromal cells. **Calcif. Tissue Int.** 1991; 48: 326-334.
- 207 Kamalia, N., McCulloch, C.A.G., Tenenbaum, H.C., Limeback, H., Dexamethasone recruitment of self-renewing osteoprogenitor cells in chick bone marrow stromal cell cultures. **Blood**. 1992; 79: 320-326.
- 208 Shalhoub, V., Conlon, D., Tassinari, M., Quinn, C., Partridge, N., Stein, G.S., Lian, J.B., Glucocorticoids promote development of the osteoblast phenotype by selectively modulating expression of cell growth and differentiation-associated genes. **J. Cell Biochem.** 1992; 50: 425-440.
- 209 Turksen, K., Aubin, J.E., Positive and negative immunoselection for enrichment of two classes of osteoprogenitor cells. **J. Cell Biology**. 1991; 14: 373-384.
- 210 Chen, T.C., Mallory, J.B., Hintz, R.L., Dexamethasone and 1,25 (OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub> modulate the synthesis of insulin-like growth factor-I in osteoblast-like cells. **Calcif. Tissue Int.** 1991; 48: 278-282.
- 211 Morais, S., Carvalho, G.S., Sousa, J.P., Potentiometric determination of total and ionized Ca in osteoblast-like cell culture medium. **Electroanalysis**. 1996; 8(12): 1174-1178.
- 212 Morais, S., Sousa, J.P., Fernandes, M.H., Carvalho, G.S., de Bruijn, J.D., van Blitterswijk, C.A., Effects of AISI 316L corrosion products in *in vitro* bone formation. **Biomaterials**. 1998<sup>a</sup>; 19: 999-1007.
- 213 Morais, S., Sousa, J.P., Fernandes, M.H., Carvalho, G.S., de Bruijn, J.D., van Blitterswijk, C.A., Decreased consumption of Ca and P during *in vitro* biomineralization and biologically induced deposition of Ni and Cr in presence of stainless steel corrosion products. **J. Biomed. Mater. Res.** 1998b; 42: 199-212.
- 214 Fernandes, M.H., Effect of stainless steel corrosion products on *in vitro* biomineralization. **J. Biomat. App.** 1999; 14:113-168.
- 215 Cutroneo, K.R., Rokowski, R., Counts, D.F., Glucocorticoids and collagen synthesis: comparison on *in vivo* and cell culture studies. **Col. Rel. Res.** 1981; 1: 557-568.
- 216 Shull, S., Cutroneo, K.R., Glucocorticoid coordinate and regulate procollagens type I and type III synthesis. **J. Biol. Chem.** 1983; 258: 3364-3369.
- 217 Sterling Jr, K.M., Harris, M.J., Mitchell, J.J., DiPetrillo, T.A., Delaney, G.L., Cutroneo, K.R., Dexamethasone decreases the amount of type I procollagen mRNAs *in vivo* and in fibroblast cell cultures. **J. Biol. Chem.** 1983; 258: 7644-7647.
- 218 Suda, T., Testa, Ng., Allen, T.D., Onions, D., Jarrett, O., Effect of hydrocortisone on osteoclasts generated in cat bone marrow cultures. **Calcif. Tissue Int.** 1985; 35: 82-86.
- 219 Pharoah, M.J., Heersche, J.N.M., Dexamethasone inhibits formation of osteoclast-like cells in bone marrow cultures. **J. Dent. Res.** 1986; 65: 1006-1009.
- 220 Takano, T., Takigawa, M., Suzuki, F., Stimulation by glucocorticoids of the differentiated phenotype of chondrocytes and proliferation of rabbit costal chondrocytes in culture. **J. Biochem.** 1985; 97: 1093-1100.
- 221 Kato, Y., Gospodarowicz, D., Stimulation by glucocorticoids of the synthesis of cartilage-matrix proteoglycans produced by rabbit costal chondrocytes *in vitro*. **J. Biol. Chem.** 1985; 260: 2364-2373.
- 222 Beresford, J.N., Joyner, C.Y., Devlin, C., Triffit, J.T., The effects of Dex and 1,25-dihydroxvitamin D on osteogenic differentiation of human marrow stromal cells *in vitro*. **Archs. Oral Biol.** 1994; 39: 941-947.



- 223 Tenenbaum, H.C., Heersche, J.N.M., Dexamethasone stimulates osteogenesis in chick periosteum *in vitro*. **Endocrinology**. 1985; 117: 2211-2217.
- 224 Tomás, H., Carvalho, G.S., Fernandes, M.H., Freire, A.P., Abrantes, L.M., The use of rat, rabbit or human bone marrow derived cells for cytocompatibility evaluation of metallic elements. **J. Mat. Sci: Mat. Med.** 1997;8: 233-238.
- 225 Costa, M.A., Fernandes, M.H., Proliferation/differentiation of osteoblastic human alveolar bone cell cultures in the presence of stainless steel corrosion products. **J. Mat. Sci: Mat. Med.** 1999; 10: 1-12.
- 226 Durão, V., Hormona paratireóidea, calcitonina, vitamina D e outros agentes que afectam o metabolismo ósseo. In: Garrett, J., Osswald, W., Guimarães, S. **Terapêutica Medicamentosa e suas bases farmacológicas. Manual de Farmacologia e Farmacoterapia. II vol.** Porto Editora, 3ª ed., 1997: 822-841.
- 227 Mundy, G.R., Hormonal factors which regulate bone resorption. In: Eds. Mundy, G.R., Martin, T.J. **Handbook of Experimental Pharmacology – vol. 107.** Springer-Verlag, 1993: 215-247.
- 228 Li, N., Ouchi, Y., Okamoto, Y., Masuyama, A., Kaneki, M., Futami, A., Hosoi, T., Nakamura, T., Orimo, H., Effect of parathyroid hormone on release of interleukin 1 and interleukin 6 from culture mouse osteoblastic cells. **Bioch. Biophys. Res. Com.** 1991; 179: 236-242.
- 229 Schmidt, I.U., Dobnig, H., Turner, R., Intermittent parathyroid hormone treatment increases osteoblast number, steady state messenger ribonucleic acid levels for osteocalcin and bone formation in tibial metaphysis of hypophysectomized female rats. **Endocrinology**. 1995; 136: 5127-5134.
- 230 Ishizuya, T., Yamaguchi, A., Parathyroid hormone exerts disparate effects on osteoblast differentiation depending on exposure time in rat osteoblastic cells. **J. Clin. Invest.** 1997; 99: 2961-2970.
- 231 Liu, C.C., Kalu, D.N., Salerno, E., Echon, R., Hollis, B.W., Ray, M., Preexisting bone loss associated with ovariectomy in rats is reversed by PTH. **J. Bone Miner. Res.** 1991; 6: 1071-1080.
- 232 Dobnig, H., Turner, R.T., Evidence that intermittent treatment with parathyroid hormone increases bone formation in adult rats by activation of bone lining cells. **Endocrinology**. 1995; 136: 3632-3638.
- 233 Yamaura, M., Nakamura, T., Kanou, A., Miura, T., Ohara, H., Suzuki, K., The effect of 17  $\beta$ -estradiol treatment on the mass and the turnover of bone in ovariectomized rats taking a mild dose of thyroxin. **Bone Miner.** 1994; 24: 33-42.
- 234 Turner, R.T., Cancellous bone turnover in growing rats: time-dependent changes in association between calcein label and osteoblasts. **J. Bone Miner. Res.** 1994; 9: 1419-1424.
- 235 Fitzpatrick, L.A., Bilezikian, J.P., Actions of parathyroid hormone. In: Eds. Bilezikian, J.P., Raisz, L.G., Rodan, G.A. **Principles of Bone Biology.** Academic Press, 1996: 339-346.
- 236 Rao, L.G., Wylie, J.N., Sutherland, M.S.K., Murray, T.M., 17 $\beta$ -estradiol and parathyroid hormone potentiate each other's stimulatory effects on alkaline phosphatase activity in SaOS-2 cells in a differentiation-dependent manner. **Endocrinology**. 1994; 134: 614-620.
- 237 Ishikawa, Y., Wu, L.N.Y., Genge, B.R., Mwale, F., Wuthier, R.E., Effects of calcitonin and parathyroid hormone on calcification of primary cultures of chicken growth plate chondrocytes. **J. Bone Miner. Res.** 1997; 12: 356-366.
- 238 Lomri, A., Pollack, C., Sebag, M., Goltzmann, D., Kremer, R., Marie, P.J., Expression of parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) and PTH/PTHrP receptor in newborn human calvaria o steoblastic cells. **European Journal of Endocrinology**. 1997; 136: 640-648.
- 239 Terakado, A., Tagawa, M., Goto, S., Yamazaki, M., Moriya, H., Fujimura, S., Elevation of alkaline phosphatase activity induced by parathyroid hormone in osteoblast-like cells from the spinal hyperostotic mouse TWY (twy/twy). **Calcif. Tissue Int.** 1995; 56: 135-139.



- 240 van der Plas, A., Feyen, J.H.M., Nijweide, P.J., Direct effect of parathyroid hormone on the proliferation of osteoblast-like cells; a possible involvement of cyclic AMP. **Biochem. Biophys. Res. Com.** 1985; 129: 918-925.
- 241 Wong, G.L., Luben, R.A., Cohn, D.V., 1,25-dihydroxycholecalciferol and parathormone: effects on isolated osteoclast-like and osteoblast-like cells. **Science.** 1977; 12: 663-665.
- 242 Nakatani, Y., Tsunoi, M., Hakeda, Y., Kurihara, N., Fujita, K., Kumegawa, M., Effects of parathyroid hormone on cAMP production and alkaline phosphatase activity in osteoblastic clone MC3T3-E1 cells. **Biochem. Biophys. Res. Com.** 1984; 123: 894-898.
- 243 Mallette, L.E., Gagel, R.F., Parathyroid hormone and calcitonin. In: Ed. Favus, M.J. **Primer of the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism.** Raven Press, 2<sup>nd</sup> ed., 1993: 90-99.
- 244 Morel, G., Chavassieux, P., Barenton, B., Dubois, P.M., Meunier, P.J., Boivin, G., Evidence for a direct effect of growth hormone on osteoblasts. **Cell Tissue Res.** 1993; 273: 279-286.
- 245 Guicheux, J., Heymann, D., Gouin, F., Pilet, P., Faivre, A., Daculsi, G., Growth hormone stimulates multinucleated cell formation in long-term bone marrow cultures. **European Journal of Cell Biology.** 1998; 75: 59-65.
- 246 Stracke, H., Schulz, A., Moeller, D., rossol, S., Schatz, H., Effects of growth hormone on osteoblasts and demonstration of somatomedin-c/IGF1 in bone organ culture. **Acta Endocrinol.** 1987; 107: 16-24.
- 247 Ernst, M., Froesch, E.R., Growth hormone dependent stimulation of osteoblast-like cells in serum free cultures via local synthesis of insulin-like growth factor-I. **Biochem. Biophys. Res. Com.** 1988; 151(1): 142-147.
- 248 Isaksson, O., Jansson, J.O., Gause, I.A.M., Growth hormone stimulates longitudinal bone growth directly. **Science.** 1982; 216: 1237-1238.
- 249 Sloomweg, M.C., van Buul-Offers, S.C., Herrmann-Erlee, M.P., Duursma, S.A., Direct stimulatory effect of growth hormone on DNA synthesis of fetal chicken osteoblasts in culture. **Acta Endocrinol. Copenh.** 1988; 118 (2): 294-300.
- 250 Sloomweg, M.C., van Buul-Offers, S.C., Herrmann-Erlee, M.P., van der Meer, J.M., Duursma, S.A., Growth hormone is mitogenic for fetal mouse osteoblasts but not for undifferentiated bone cells. **J. Endocrinol.** 1988; 116 (3): R11-3.
- 251 Chenu, C., Valentin-Opran, A., Chavassieux, P., Saez, S., Meunier, P.J., Delmas, P.D., Insulin like growth factor I hormonal regulation by growth hormone and by 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> and activity on human osteoblast-like cells in short-term cultures. **Bone.** 1990; 11: 81-86.
- 252 Schmid, C., Ernst, M., Zapf, J., Froesch, R., Release of insulin-like growth factor carrier proteins by osteoblasts: stimulation by estradiol and growth hormone. **Biochem. Biophys. Res. Com.** 1989; 160: 788-794.
- 253 Spencer, M., Liu, C.C., Si, E.C.C., Howard, E.G., *In vivo* actions of insulin-like growth factor-I (IGF-I) on bone formation and resorption in rats. **Bone.** 1991; 12: 21-26.
- 254 Barnard, R., Ng, K.W., Martin, T.J., Waters, M.J., Growth hormone (GH) receptors in clonal osteoblast-like cell mediate a mitogenic response to GH. **Endocrinology.** 1991; 128: 1459-1464.
- 255 Kassem, M., Blum, W., Ristelli, J., Mosekilde, L., Eriksen, E.F., Growth hormone stimulates proliferation and differentiation of stromal human osteoblast-like cells *in vitro*. **Calcif. Tissue Int.** 1993; 52: 222-226.
- 256 Guyton, A.C., The pituitary hormones and their control by the hypothalamus. In: Ed. W.B. Saunders. **Textbook of Medical Physiology.** W.B. Saunders Company, 7<sup>a</sup> ed., 1986: 884-896.



- 257 Nilsson, A., Isgaard, J., Lindahl, A., Dahlstrom, A., Skottner, A., Isaksson, O.G.P., Regulation by growth hormone of number of chondrocytes containing IGF-I in rat growth plate. **Science**. 1986; 233: 571-574.
- 258 Isaksson, O.G., Lindhal, A., Nilsson, A., Isgaard, J., Mechanisms of the stimulatory effects of growth hormone on longitudinal bone growth. **Endocr. Rev.** 1987; 8: 426-438.
- 259 Kassem, M., Brixen, K., Mosekilde, L., Eriksen, E.F., Human marrow stromal osteoblast-like cells do not show reduced responsiveness to *in vitro* stimulation with growth hormone in patients with postmenopausal osteoporosis. **Calcif. Tissue Int.** 1994; 54: 1-6.
- 260 Brixen, K., Nielsen, H.K., Mosekilde, L., Flyvbjerg, A., A short course of recombinant human growth hormone treatment stimulates osteoblasts and activates bone remodeling in normal human volunteers. **J. Bone Miner. Res.** 1990; 5: 609-618.
- 261 Sloomweg, M.C., Growth hormone and bone. **Horm. Metab. Res.** 1993; 25: 335-343.
- 262 Scheven, B.A.A., Hamilton, N.J., Fakkeldij, T.M.V., Duursma, S.A., Effects of recombinant human insulin-like growth factor I and II (IGF-I/II) and growth hormone (GH) on the growth of normal adult osteoblast-like cells and human osteogenic sarcoma cells. **Growth Regulation**. 1991; 1: 160-167.
- 263 Pfeilschifter, J., Diel, I., Pilz, U., Brunotte, K., Naumann, A., Ziegler, R., Mitogenic responsiveness of human bone cells *in vitro* to hormones and growth factors decreases with age. **J. Bone Miner. Res.** 1993; 8 (6): 707-717.
- 264 Green, H., Morikawa, M., Nixon, T., A dual effector theory of growth-hormone action. **Differentiation**. 1985; 29: 195-198.
- 265 Golub, L.M., Ramamurthy, N.S., McNamara, T.F., Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown: new therapeutics implications for an old family of drugs. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**. 1991; 2(2): 297-322.
- 266 Rifkin, B.R., Vernillo, A.T., Golub, L.M., Ramamurthy, N.S., Modulation of bone resorption by tetracyclines<sup>a</sup>. **Annals of the New York Academy of Sciences**. 1994; vol. 732: 165-180.
- 267 Golub, L.M., Wolff, M., Roberts, S., Lee, H.M., Leung, M., Payonk, G.S., Treating periodontal diseases by blocking tissue-destructive enzymes. **JADA**. 1994; 125: 163-171.
- 268 Vernillo, A.T., Ramamurthy, N.S., Golub, L.M., Rifkin, B.R., The nonantimicrobial properties of tetracycline for the treatment of periodontal disease. **Current Science**. 1994; 111-118.
- 269 Fife, R.S., Rougraff, B.T., Proctor, C., Sledge, G.W., Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by doxycycline in cultured human osteosarcoma cells. **J. Lab. Clin. Med.** 1997; 130:530-534.
- 270 Payne, J.B., Reinhardt, R.A., Potential application of low-dose doxycycline to treat periodontitis in postmenopausal women. **Adv. Dent. Res.** 1998; 12(2):166-169.
- 271 Williams, S., Barnes, J., Wakisaka, A., Ogasa, H., Liang, C.T., Treatment of osteoporosis with MMP inhibitors. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 1999; 878: 191-200.
- 272 Golub, L.M., Suomalainen, K., Sorsa, T., Host modulation with tetracyclines and their chemically modified analogues. **Current Science**. 1992; 2: 80-90.
- 273 Rifkin, B.R., Vernillo, A.T., Golub, L.M., Blocking periodontal disease progression by inhibiting tissue-destructive enzymes: a potential therapeutic role for tetracyclines and their chemically-modified analogues. **J. Periodontol.** 1993; 64: 819-827.
- 274 Tsukuda, N., Gabler, W., The influence of doxycycline on the attachment of fibroblasts to gelatin-coated surfaces and its cytotoxicity. **J. Periodontol.** 1993; 64: 1219-1224.



- 275 Omori, N., Kobayashi, H., Tsutsui, T., Quantitative comparison of cytotoxicity of tetracyclines and fluoroquinolones on human periodontal ligament fibroblasts. **J. Periodontol. Res.** 1999; 34: 290-295.
- 276 Guimarães, S., Tetraciclina e cloranfenicol. In: Garrett, J., Osswald, W., Guimarães, S. **Terapêutica Medicamentosa e suas bases farmacológicas. Manual de Farmacologia e Farmacoterapia. II vol.** Porto Editora, 3ª ed., 1997: 935-944.
- 277 **Martindale, the complete drug reference.** In: Ed. Parfitt, K. Pharmaceutical Press, 32ª ed., 1999: 202-227.
- 278 Niwa, S., Sawai, K., Takahashi, S., Tagai, H., Ono, M., Fukada, Y., Experimental studies on the implantation of hydroxyapatite in the medullary cavity of rabbits. **Biomaterials.** 1980; 1: 65-71.
- 279 Akao, H., Aoki, H., Kato, K., Mechanical properties of sintered hydroxyapatite for prosthetic application. **J. Mater. Sci.** 1981; 16: 809-812.
- 280 Royer, A., Viguie, J.C., Heughebaert, M., Heughebaert, J.C., Stoichiometry of hydroxyapatite: influence on the flexural strength., **J. Mater. Sci. Mater. Med.** 1993; 4: 76-82.
- 281 LeGeros, R.Z., Trautz, O.R., LeGeros, J.P., Shirra, W.P., Apatite crystallites: effect of carbonate on morphology. **Science.** 1967; 155: 1409-1411.
- 282 Santos, J.D., Reis, R.L., Monteiro, F.J., Knowles, J.C., Hastings, G.W., Liquid phase sintering of hydroxyapatite by phosphate and silicate glass additions: structure and properties of the composites. **J. Mater. Sci. Mater. Med.** 1995; 6: 348-352.
- 283 Santos, J.D., Knowles, J.C., Reis, R.L., Monteiro, F.J., Hastings, G.W., Microstructural characterization of glass-reinforced hydroxyapatite composites. **Biomaterials.** 1994; 15(1): 5-10.
- 284 Santos, J.D., Silva, P.L., Knowles, J.C., Talal, S., Monteiro, F.J., Reinforcement of hydroxyapatite by adding P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-CaO glasses with Na<sub>2</sub>O, K<sub>2</sub>O and MgO. **J. Mater. Sci. Mater. Med.** 1996; 7: 187-189.
- 285 Santos, J.D., Knowles, J.C., Morrey, S., Monteiro, F.J., Hastings, G.W., Development of a glass reinforced hydroxyapatite with enhanced mechanical properties: physical characterization. In: Eds. Yamamuro, T., Kokubo, T., Nakamura, T. **Bioceramics vol. 5.** Japan: Kokunshi Kankokai, 1992 (5): 35-41.
- 286 Burnie, J., Gilchrist, T., Controlled release glass (C.R.C.) – a new biomaterial. In: Ed. Vincenzini, P. **Ceramics in surgery.** Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1983: 169-176.
- 287 Santos, J.D., Knowles, J.C., Hastings, G.W., Bonfield, W., Sintered hydroxyapatite compositions and method for the preparation thereof. **British Patent 9213774.4**, 29 Junho 1993.
- 288 Santos, J.D., Vasconcelos, M., Reis, R.L., Afonso, A., Monteiro, F.J., Hastings, G.W., Glass reinforced hydroxyapatite composites: preliminary histological studies in rabbits. In: Eds. Andersson, O.H., Yli-Urpo, A. **Bioceramics vol. 7.** Butterworth-Heinemann Ltd., 1994.
- 289 Knowles, J.C., Bonfield, W., Development of a glass reinforced hydroxyapatite with enhanced mechanical properties. The effect of glass composition on mechanical properties and its relationship to phase changes. **J. Biomed. Mater. Res.** 1993; 27: 1591-1598.
- 290 Santos, J.D., Lakhan, J.J., Monteiro, F.J., Surface modifications of a glass-reinforced hydroxyapatite composites. **Biomaterials.** 1995; 6: 521-526.
- 291 Lakhan, J.J., Santos, J.D., Knowles, J.C., Characterization of apatite layer formation on P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-CaO, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-CaO-Na<sub>2</sub>O and P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-CaO-Na<sub>2</sub>O-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> glass hydroxyapatite composites. **J. Biomed. Mater. Res.** 1996; 31: 481-486.
- 292 Santos, J.D., **Glass reinforced hydroxyapatite composites for biomedical applications**, Tese de Doutorado, 1993.

- 293 Knowles, J.C., Talal, S., Santos, J.D., Sintering effects in a glass reinforced hydroxyapatite. **Biomaterials**. 1996; 17:1437-1442.
294. Lopes, M.A., Monteiro, F.J., Santos, J.D., Glass-reinforced hydroxyapatite composites; secondary phase proportions and densification effects on biaxial bending strength. **J. Biomed. Mater. Res.** 1999; 48: 734-740.
- 295 Lopes, M.A., Santos, J.D., Monteiro, F.J., Knowles, J.C., Glass-reinforced hydroxyapatite: a comprehensive study of the effect of glass composition on the cristallography of the composite. **J. Biomed. Mater. Res.** 1998; 39: 244-251.
- 296 De Santis, D., Guerriero, C., Nocini, P.F., Ungersbock, A., Richards, G., Gotte, P., Armato, U., Adult human bone cells from jaw bones cultured on plasma-sprayed or polished surfaces of titanium or hydroxylapatite discs. **J. Mater. Sci. Mat. Med.** 1996; 7: 21-28.
- 297 Ferraz, M.P., Fernandes, M.H., Santos, J.D., Monteiro, F.J., HA and double-layer HA/CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> glass coatings: influence on chemical composition on human bone marrow cells osteoblastic behavior. submetido ao **J. Mater. Sci. Mat. Med.** em Janeiro de 2000.
- 298 Puleo, D.A., Holleran, L.A., Doremus, R.H., Bizios, R., Osteoblast responses to orthopaedic implant materials *in vitro*. **J. Biomed. Mater. Res.** 1991; 25: 711-723.
- 299 Malik, M.A., Puleo, D.A., Bizios, R., Doremus, R.H., Osteoblasts on hydroxyapatite, alumina and bone surfaces *in vitro*: morphology during the first 2h of attachment. **Biomaterials**. 1992; 13(2): 123-128.
- 300 Sautier, J.M., Nefussi, J.R., Forest, N., Surface-reactive biomaterials in osteoblast culture; an ultrastructural study. **Biomaterials**. 1992; 13: 400-402.
- 301 Cheung, H.S., Haak, M.H., Growth of osteoblasts on porous calcium phosphate ceramic: an *in vitro* model for biocompatibility study. **Biomaterials**. 1989; 10: 63-67.
- 302 Uchida, A., Nade, S., McCartney, E., Ching, W., Growth of bone marrow cells on porous ceramics *in vitro*. **J. Biomed. Mater. Res.** 1987; 21: 1-10.
- 303 Hott, M., Noel, B., Bernache-Assolant, D., Rey, C., Marie, P.J., Proliferation and differentiation of human trabecular osteoblastic cells on hydroxyapatite. **J. Biomed. Mater. Res.** 1997; 37: 508-516.
- 304 Vrouwenvelder, W.C.A., Groot, C.G., de Groot, K., Histological and biochemical evaluation of osteoblasts cultured on bioactive glass hydroxyapatite, titanium alloy, and stainless steel. **J. Biomed. Mater. Res.** 1993; 27: 465-475.
- 305 Ohgushi, H., Dohi, Y., Tamai, S., Tabata, S., Osteogenic differentiation of marrow stromal stem cells in porous hydroxyapatite ceramics. **J. Biomed. Mater. Res.** 1993; 27: 1401-1407.
- 306 Goshima, J., Goldberg, V.M., Caplan, A.I., Osteogenic potential of culture-expanded rat marrow cells as assayed *in vivo* with porous calcium phosphate ceramic. **Biomaterials**. 1991; 12: 253-258.
- 307 Wilke, A., Orth, J., Lomb, M., Fuhrmann, R., Kienapfel, H., Griss, P., Franke, R.P., Biocompatibility analysis of different biomaterials in human bone marrow cell cultures. **J. Biomed. Mater. Res.** 1998; 40: 301-306.
- 308 Ferraz, M.P., Knowles, J.C., Olsen, I., Monteiro, F.J., Santos, J.D., Flow cytometry analysis of the effects of glass on the response of the osteosarcoma cells to plasma sprayed hydroxyapatite/ CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> coatings. **J. Biomed. Mater. Res.** 1999; 47: 603-611.
- 309 Ferraz, M.P., Fernandes, M.H., Trigo Cabral, A., Santos, J.D., Monteiro, F.J., *In vitro* growth and differentiation of osteoblast-like human bone marrow cells on glass reinforced HA plasma srayed coatings. **J. Mater. Sci. Mat. Med.** 1999; 10: 567-576.



- 310 El-Ghannam, A., Ducheyne, P., Shapiro, I.M., Bioactive material template for *in vitro* synthesis of bone. **J. Biomed. Mater. Res.** 1995; 29: 359-370.
- 311 Filgueiras, M.R., Torre, G.L., Hench, L.L., Solution effects on the surface reactions of a bioactive glass. **J. Biomed. Mater. Res.** 1993; 27: 445-453.
- 312 Di Silvio, L., Bonfield, W., Biodegradable drug delivery system for the treatment of bone infection and repair. **J. Mater. Sci. Mat. Med.** 1999; 10: 653-658.
- 313 Denissen, H., van Beek, E., Martinetti, R., Klein, C., van der Zee, E., Ravaglioli, A., Net-shaped hydroxyapatite implants for release of agents modulating periodontal- like tissues. **J. Periodont. Res.** 1997; 32: 40-46.
- 314 Krajewski, A., Ravaglioli, A., Kirsch, M., Biagini, G., Solmi, R., Belmonte, M., Zucchini, C., Gandolfi, M.G., Castaldini, C., Rodriguez, L., Giardino, R., Mongiorgi, R., Roncari, E., Orlandi, L., Ceramic support for cell cultures. **J. Mater. Sci. Mat. Med.** 1996; 7: 99-102.