

ANÁLISE DE COMPÓSITOS DE HIDROXIAPATITA E ALGINATO COM POTENCIAL PARA APLICAÇÃO FUTURA COMO BIOMATERIAIS ORTOPÉDICOS

Rachelle Salem

Tese de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas, Instituto de Ciências Biomédicas do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Morfológicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Christina Maeda Takiya

Co-orientadores: Prof. Dr. Radovan Borojevic

Prof. Dr. Marcos Farina de Souza

Rio de Janeiro

Março / 2006

ANÁLISE DE COMPÓSITOS DE HIDROXIAPATITA E ALGINATO COM POTENCIAL PARA APLICAÇÃO FUTURA COMO BIOMATERIAIS ORTOPÉDICOS

Rachelle Salem

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Christina Maeda Takiya

Co-orientadores: Prof. Dr. Radovan Borojevic

Prof. Dr. Marcos Farina de Souza

Tese de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas, Instituto de Ciências Biomédicas do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Morfológicas.

Aprovada por:

Presidente, Prof^a. Dr^a.

Prof^a. Dr^a.

Prof. Dr.

Prof. Dr.

Rio de Janeiro
Março/ 2006

Salem, Rachelle

Análise de compósitos de hidroxiapatita e alginato com potencial para aplicação futura como biomateriais ortopédicos / Rachelle Salem. – Rio de Janeiro: UFRJ / Faculdade de Medicina, 2006.

xvii, 84 f. : il. ; 31 cm

Orientadores: Christina Maeda Takiya, Radovan Borojevic e Marcos Farina de Souza

Dissertação (mestrado) -- UFRJ, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-graduação em Ciências Morfológicas, 2006.

Referências bibliográficas: f. 76-84

1. Materiais biocompatíveis. 2. Hidroxiapatita - análise. 3. Alginatos - análise. 4. Substitutos ósseos. 5. Testes de materiais. 6. Propriedades da superfície. 7. Microscopia eletrônica de varredura. 8. Ciências Morfológicas - Tese. I. Takiya, Christina Maeda. II. Borojevic, Radovan. III. Souza, Marcos Farina de. IV. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-graduação em Ciências Morfológicas. V. Título.

AGRADECIMENTOS

A orientadora Profa. Dra. Cristina Maeda Takiya pelos importantíssimos ensinamentos durante a realização deste projeto.

Ao Dr. Radovan Borojevic pela ajuda na interpretação dos resultados.

Ao Dr. Marcos Farina pela orientação.

Aos amigos Drs. Alex Balduino e Leonardo Andrade pelas ajudas inestimáveis, que tornaram mais fácil esta caminhada.

Em especial a Doris, Leandro, Luciene, Vitor e William.

RESUMO

ANÁLISE DE COMPÓSITOS DE HIDROXIAPATITA E ALGINATO COM POTENCIAL PARA APLICAÇÃO FUTURA COMO BIOMATERIAIS ORTOPÉDICOS

Diante das limitações dos enxertos naturais nas áreas ortopédica e odontológica, torna-se cada vez mais necessária à compreensão da interação de células e de materiais propostos como substituintes sintéticos de tecidos. Sendo assim, a caracterização destes possíveis enxertos, bem como sua influência no comportamento celular, permite o aperfeiçoamento da produção de implantes que apresentam uma potencial aplicabilidade em Bioengenharia Tecidual.

Os objetivos gerais deste trabalho foram analisar a superfície de biocompósitos de hidroxiapatita e alginato calcinados a 1500°C ou não e a avaliação da interação de células osteoblásticas murinas cultivadas sobre biocerâmicas.

Ao longo deste trabalho, foram utilizados principalmente métodos de microscopia óptica convencional, confocal, eletrônica de varredura, transmissão/difração de elétrons para caracterização dos materiais; ensaios de proliferação celular, avaliação da adesão, detecção de marcadores de osteoblastos murinos cultivados sobre pastilhas de hidroxiapatita e alginato e ensaio de MTT para avaliar a viabilidade das células.

Pode-se concluir que há diferenças na superfície dos materiais calcinados e os que não foram submetidos a elevadas temperaturas durante sua síntese,

pois estes se apresentaram mais compactos. Os compósitos calcinados não sofreram alterações em sua superfície diante das condições necessárias a cultura de osteoblastos. Estas células se apresentaram aderidas, espraiadas, capazes de emitirem prolongamentos para as adjacentes, porém com uma baixa proliferação e viabilidade quando cultivadas por apenas 48 horas. Dados imunohistoquímicos mostraram a expressão de marcadores de diferenciação celular tais como osteopontina e α -actina de músculo liso sobre o biomaterial testado.

Palavras-chaves: Biomaterial – Alginato – Hidroxiapatita – Implantes – Tecido Ósseo.

Rio de Janeiro

Março / 2006

ABSTRACT

ANALYSIS OF HYDROXYAPATITE AND ALGINATE-COMPOSITES FOR FUTURE APPLICATION AS ORTOPEDIC BIOMATERIALS

Because of the limitation of natural grafts, in orthopedic and odontological fields, it has become more necessary to comprehend the interaction of cells and materials used as substitutes to synthetic tissues. Therefore, the characterization of the possible grafts, as well as their influence on cellular behavior allows the improvement of production of implants that bring potential applicability in Tecdual Bioengineering.

The general purpose of this work whas to analyze the biocomposite of hydroxyapatite and alginate surface calcinated at 1500°C, or not, and the evaluation of the interection of osteoblastic murine cells. Those cells were seeded on the surface of bioceramics.

Throughout this research, methods of optical, confocal, scanning and transmission electron microscopy/electron diffraction for material characterization, cellular proliferation assay, adhesion, detection of markers of murine obsteoblasts cultured over pastiches of hydroxyapatite and alginate and MTT assay to evaluate the viability of cells.

Therefore differences can be found on the surface of the calcinated material and the ones that were not submitted to high temperatures during the synthesis, because these were presented in a more compact way. The calcinated composites did not suffer alterations in their surface while necessary conditions to

the culture of osteoblasts. These cells appeared with morphologic adhesion, spreading and being capable of transmitting extensions to their adjacent cells, despite the low proliferation and viability when seeded for only 48 hours. Immunohistochemical data show the expression of the markers of cellular differentiation, such as osteopontin and α - smooth muscle actin in the tested biomaterial.

Keywords – Biomaterial – Alginate – Hydroxyapatite – Implants - Bone Tissue.

Rio de Janeiro,

March/2006.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1. Considerações Gerais	5
2.1.1. Ossificação: Intramembranosa e Endocondral	6
2.1.2. Matriz Óssea	9
2.1.3. O Constituinte Celular	12
2.1.4. Caracterização dos osteoblastos	13
2.1.5. Biomateriais	16
2.1.6. Fosfatos de cálcio	21
2.1.7. Biomateriais e a Bioengenharia Tecidual	22
3. OBJETIVOS	25
3.1. Geral	25
3.2. Específicos	25
4. METODOLOGIA	27
4.1. Material	27
4.1.1. Biomembranas	27
4.1.2. Esferas de alginato e hidroxiapatita (HA)	27
4.1.3. Pastilhas de alginato/HA (1:18)	28
4.1.4. Origem das células	28

4.2. Métodos	29
4.2.1. Cultura dos Osteoblastos	29
4.2.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	29
4.2.2.1. Preparação de Biomateriais	29
4.2.2.2. Células cultivadas sobre biomateriais	30
4.2.3. Métodos analíticos por Microscopia Eletrônica de Transmissão	31
4.2.4. Análise da superfície das esferas calcinadas submetidas às condições necessárias a cultura de células	32
4.2.5. Análise da superfície das pastilhas por MEV	33
4.2.6. Análise da capacidade de absorção de meio de cultura pelas pastilhas	33
4.2.7. Adesão celular por MEV: cultivo de células sobre as pastilhas após 48h	33
4.2.8. Ensaio Proliferação Celular sobre as Pastilhas	34
4.2.9. Ensaio de Viabilidade Celular (MTT)	34
4.2.10. Ensaio de imunohistoquímica	35
5 RESULTADOS	38
5.1. Esfera de Alginato e Hidroxiapatita (1:18) – Calcinada	38
5.2. Esfera de Alginato e Hidroxiapatita (1:18) – Não calcinada	40
5.3. Membrana Simples (HA/Alg (1:1)) – 100 µm	43
5.4. MEV das esferas calcinadas sob as condições de cultura	45
5.5. Análise da superfície das pastilhas por MEV	53

5.6. Análise da absorção de meio de cultura pelas pastilhas	54
5.7. Adesão celular por MEV: Cultivo de células	55
5.8. Ensaio de Adesão e Proliferação Celular	60
5.9. Viabilidade Celular por MTT	62
5.10. Imunohistoquímica	63
6. DISCUSSÃO	67
7. CONCLUSÕES	74
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BMPs	Proteínas Morfogenéticas Ósseas
BSS	Solução Salina (<i>Balanced Saline Solution</i>)
BSS-CMF	Solução Salina sem Cálcio e Magnésio
α-TCP	Alfa-Tricálcio Fosfato
β-TCP	Beta-Tricálcio Fosfato
°C	Grau centígrado
Ca	Cálcio
Ca²⁺	Íon cálcio
α-Ca₃(PO₄)₂	Alfa-Tricálcio Fosfato
Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂	Fórmula molecular da Hidroxiapatita
Cbfa-1	<i>Core-binding factor family-1</i>
Ca/P	Razão entre o Cálcio e o Fósforo
Célula/mL	Número de células por mililitros
CO₂	Dióxido de Carbono
d	Dias

DF	Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium suplementado com Soro Fetal Bovino
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
Ed.	Editora
ed.	Edição
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
EDXA	Microanálise de Raios-X por Energia Dispersiva
F⁻	Íon Fluoreto
Fig.	Figura
g	Gramas
h	Horas
H₂O	Água
HA	hidroxiapatita
HAD	Hidroxiapatita deficiente em Cálcio
HAE	Hidroxiapatita Estequiométrica
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
mL	Mililitro
mg	Miligrama
mm	Milímetro
n.	Número
Na⁺	Íon Sódio
nm	Nanômetro
µm	Micrômetro

P	Fósforo
p.	Página
PBS	Phosphate Buffer Saline
O₂	Oxigênio
SBF	Soro Fetal Bovino
RGD	Arginina-Glicina-Asparagina
TCP	Tricálcio Fosfato
V	Volume da revista científica
%	Porcentagem
x	Vezes

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E DE GRÁFICOS

Figura 1	Esquematização dos Processos de Ossificação	8
Figura 2	Osteoclasto realizando a reabsorção óssea	13
Figura 3	Estrutura química do alginato: Ácido β -D-Manurônico e Ácido α -L Gulurônico	20
Figura 4	Esquema do modelo <i>egg-box</i>	21
Figura 5	Imagens de MEV (A-D) mostram contornos de grão na superfície do material. Apresentam volumes semelhantes. Analisa-se a junção dos cristais de HA nanométrica e espaços formados pela perda do alginato sob condições de elevada temperatura. Superfícies externa e interna apresentam-se semelhantes	39
Figura 6	Observa-se por MET que o material não é totalmente compacto. Apresenta espaços sem arranjo geométrico entre os cristais que cresceram e se uniram. As faces destes são determinadas pelo seu cristal vizinho	38
Figura 7	Observa-se pelas imagens de MEV semelhanças entre a textura externa e interna do material. Presença de uma superfície compacta, com ausência de orifícios na região. (A) e (B) Esfera inteira, (C) e (D) Esfera clivada	40
Figura 8	Difração de elétrons da esfera de Alginato e HA (microscópio eletrônico Jeol 1200 EX) (A) não calcinada; (B) calcinada – Não calcinada mostrando	

	ausência de anéis que sugerem uma região com poucos cristais embora tenham comprimentos maiores. Os anéis indicados pelas setas possuem distâncias entre os planos cristalinos (D): $D_1 = 3,406$ (Å) e $D_2 = 2,79$ (Å). Figura compatível com a da Hidroxiapatita padrão. O resultado não se altera para esferas calcinadas visto que a perda de material orgânico não altera a HA41
Figura 9	Observa-se por MET uma mistura heterogênea de cristais em forma de espículas ou não com comprimentos distintos42
Figura 10	Observa-se pelas imagens de MEV a presença de fases diferentes do material, onde a HA não se misturam bem aos constituintes do material. Formou-se uma fase rica em HA que se segregou do material particulado43
Figura 11	Imagens de MET revelam a presença de fases diferentes do material. Forma-se uma fase rica em HA que se manteve separada das partículas de alginato, formando um meio não homogêneo. Os cristais de HA são semelhantes aos presentes nas esferas não calcinadas44
Figura 12 A	Não foram observadas diferenças na superfícies do material sob condições de cultura46
Figura 12 B	Não foram observadas alterações na superfície do material sob condições de cultura48
Figura 12 C	Não foram observadas diferenças na superfície do material sob condições de cultura50

Figura 12 D	Nas análises de MEV não foram observadas diferenças na superfície do material sob condições de cultura	52
Figura 13	Imagens de MEV mostram que alterações da forma do material resultam em modificações na sua superfície (A-E), o que não acontece quando imerso em meio de cultura (F)	54
Figura 14.	Observou-se a adesão (*), espraiamento (**) de A-C, e a emissão de prolongamentos (setas) em 48h de cultura sobre lamínula controle	55
Figura 15	Imagens de MEV em diferentes aumentos após 48h de cultura. Células osteoblásticas apresentam um aspecto poligonal típico, algumas espraiadas e emitindo prolongamentos para a célula adjacente. Há migração para reentrância da pastilha. Maior densidade quando cultivadas no compósito	57
Figura 16.	Há migração para reentrância da pastilha. A reentrância em menor aumento (A), células capazes de aderirem no interior da reentrância (B), borda esquerda do orifício (C), na direita (D).Nesta borda observa-se a migração celular)	59
Figura 17	Imagens da marcação nuclear de osteoblastos sobre lamínula/controle e sobre pastilhas. Em (A) (B) e (C) 4h, (D), (E), (F) 24h, e (G), (H), (I) 48h; 20x/ barra 50µm	61

- Figura 18.** Imagens de Fluorescência confocal demonstram expressões pouco e muito intensas de α -actina de músculo liso(A), pouco intensas de osteopontina (B), marcação nuclear de DAPI (C) e sobreposição das imagens (D) em lamínulas com 24h de cultura63
- Figura 19.** Imagens de Fluorescência confocal demonstram expressões pouco intensas de α -actina de músculo liso(A), maiores intensidade de osteopontina (B), marcação nuclear de DAPI (C) e sobreposição das imagens (D) em lamínulas com 72h de cultura64
- Figura 20.** Imagens de Fluorescência confocal demonstram expressões intensas de α -actina de músculo liso(A e E), osteopontina (B e F), marcação nuclear de DAPI (C e G) e sobreposição das imagens (D e H) em pastilhas com 24h de cultura. Observa-se subpopulações que expressam um ou outro marcador (seta), como populações simultaneamente positivas proteínas (ponta da seta)65
- Figura 21.** Imagens de Fluorescência confocal demonstram a expressão de α -actina de músculo liso (A), osteopontina (B), DAPI (C), sobreposição (D) em pastilha de 72 h de cultura. Neste observa-se subpopulações que expressam um ou outro marcador (seta), como populações simultaneamente positivas proteínas (ponta da seta). Objetiva de 40x66

Gráfico 1	Número de núcleos quantificadas durante 48 h de cultivo em pastilhas de Alginato e HA e em lamínulas.....	60
Gráfico 2	Porcentagem de células viáveis durante 48 h de cultura nas lamínulas e nas pastilhas	62

1 INTRODUÇÃO

Um aumento significativo de pesquisas nas áreas de Engenharia Tecidual e Medicina Regenerativa vem sendo notado nos últimos anos, buscando alcançar novas perspectivas que possibilitem o reparo e a regeneração de órgãos e tecidos.

Enxertos ósseos são utilizados na reconstrução de defeitos ósseos causados por traumas, cistos, tumores benignos e malignos, ou ainda de natureza congênita (Kim *et al.*, 2006). Sabe-se que enxertos autólogos possuem limitações em sua aplicabilidade, seja pela necessidade de processos cirúrgicos adicionais, pela captação de pequena quantidade de material doado, ou ainda, por apresentar uma inadequada velocidade de reabsorção durante o processo de cicatrização. Aloenxertos apresentam como desvantagem a possibilidade de sofrerem rejeição pelo sistema imune do receptor, além de reduzirem a atividade osteoindutora local (Rodrigues *et al.*, 2003). Evidencia-se, portanto, a necessidade de estudos de materiais sintéticos, dentre os quais aqueles compostos de fosfato de cálcio capazes de serem utilizados como futuros substitutos do tecido ósseo (Deligianni *et al.*, 2001), a fim de contornar os problemas associados ao uso de enxertos naturais.

Os materiais utilizados na substituição de ossos enquadram-se em uma classe denominada de biomateriais. Estes devem apresentar propriedades físicas e biológicas compatíveis com os tecidos vivos do hospedeiro, de modo a estimular uma resposta adequada dos mesmos. Tais propriedades caracterizam a biocompatibilidade (Kawachi *et al.*, 2000). Este termo inclui características atóxicas, não carcinogênicas e a estabilidade do material (Suchanek &

Yoshimura, 1998). Outra classificação para estes materiais substitutos é cerâmica. Segundo a Associação Brasileira de Cerâmica, este termo é definido como todos os materiais inorgânicos, não metálicos, obtidos geralmente após tratamento térmico à temperaturas elevadas (<http://www.abceram.org.br>).

Os fosfatos de cálcio, do tipo hidroxiapatita (HA), assemelham-se com a parte mineral do osso natural além de serem biocompatíveis e osteocondutores (Ehara *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2005).

A capacidade de um biomaterial de manter a adesão, espraiamento e crescimento celular, assim como, ativar a função da célula, depende das características físico-químicas da sua superfície (Matsuzaka *et al.*, 2003). Além destas características, é relatada a influência da topografia e cristalografia na resposta celular (Olmo *et al.*, 2003). Sendo assim, o material bioativo de fosfato de cálcio, a HA, tem se destacado nos estudos de implantes pela sua forte interação com o tecido ósseo (Deligianni *et al.*, 2001). A microporosidade e rugosidade das biocerâmicas determinam como moléculas e íons podem ser adsorvidos na superfície do biomaterial, afetando diretamente o comportamento celular (Anselme *et al.*, 2000).

A associação de hidroxiapatita com biopolímeros (produção de compósitos) visa aperfeiçoar as características necessárias para que um biomaterial seja um futuro arcabouço (enxerto) capaz de promover o reparo do tecido ósseo (Drury *et al.*, 2003). Resultados experimentais têm demonstrado que os compósitos de hidroxiapatita não somente mimetizam a composição natural óssea mas, também apresentam uma elevada osteocondutividade capaz de induzir a remodelação óssea (Zhang *et al.*, 2003). Porém, sabe-se que a

hidroxiapatita apresenta limitações em suas propriedades mecânicas (Thian *et al.*, 2002).

Dentre os biopolímeros destacam-se os alginatos. Estes são polissacarídeos extraídos de algas e de algumas bactérias que podem funcionar como arcabouço celular na engenharia tecidual. Isto pode ser compreendido visto que há alguns polissacarídeos no osso natural onde o alginato mimetiza a arquitetura destes constituintes da matriz tecidual. Além disso, o alginato se apresenta biocompatível em estudos realizados *in vitro* em cultura de condrócitos. Sendo assim esse tipo de material pode ser útil na manutenção de propriedades biológicas teciduais (Zhang *et al.*, 2003). Os alginatos são capazes de promover a integridade mecânica e simultaneamente a transmissão de sinais para as células, possibilitando o desenvolvimento do tecido (Drury *et al.*, 2003). Além disso, este biopolímero tem se destacado nos estudos das indústrias de biotecnologia pela sua capacidade de encapsular e liberar gradualmente proteínas com potencial terapêutico (Raj *et al.*, 2003). Os alginatos com cátions divalentes como o cálcio, por exemplo, em sua estrutura adquirem um modelo de rede conhecido como *egg-box* (Thian *et al.*, 2002). Esta rede confere maior rigidez à estrutura deste polissacarídeo. Sendo assim, a produção de compósitos de alginato e hidroxiapatita pode ser interessante para otimizar a fraca resistência mecânica deste fosfato de cálcio necessária em sítios de preenchimento de reparo.

A engenharia de tecidos busca a combinação perfeita entre células e materiais suportes que venham acomodar o tecido neoformado e moléculas bioativas, promovendo a diferenciação e o crescimento das células progenitoras sobre o material. O que significa a mimetização do tecido natural (Risbud, 2001).

Portanto, o objetivo deste trabalho visa o estudo da interação inicial entre células ósseas (osteoblastos) de murinos e materiais sintéticos (constituídos de compósitos de hidroxiapatita e alginato) que permitam o desenvolvimento de um tecido ósseo. Além disso, este projeto inclui a caracterização de biomateriais com potencial para aplicação futura em bioengenharia de tecidos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

O tecido ósseo é um tipo especializado de tecido conjuntivo que serve de suporte e confere proteção aos órgãos vitais. Ele proporciona apoio aos músculos esqueléticos, abriga e protege a medula óssea. Além disso, participa do processo de manutenção da homeostasia de cálcio, fosfatos e outros íons (Fernandes, 1998).

A arquitetura macroscópica dos ossos no organismo é constituída de osso do tipo trabecular (esponjoso) e cortical (compacto). No primeiro, observa-se uma interconexão de trabéculas formando uma rede; no segundo, há formação de uma cobertura ao redor do componente trabecular, contribuindo para sua integridade estrutural, desempenho de importantes funções mecânicas e protetoras. Além disso, a porção cortical é constituída de um arcabouço de fibras colágenas em forma de lamelas concêntricas (Marks & Hermey, 1996 *apud* Bilezekian *et al.*, 1996).

Notam-se três superfícies constituintes do osso cortical: A porção endosteal (em contato com a cavidade medular), a periosteal (superfície externa do osso) e ainda, a porção cortical (representada pelo tecido ósseo entre o endóstio e o perióstio). Destaca-se que o perióstio prende-se ao osso pela presença de feixes de fibras colágenas que penetram neste tecido, as fibras de Sharpey (Junqueira & Carneiro, 1999). Dessa forma, sob o ponto de vista microestrutural esse tecido consiste em fibrilas de colágeno mineralizadas arranjada em lamelas. Já pelo ponto de vista ultraestrutural de arquitetura, o osso é um polímero inorgânico de nanocompósito (Manjubala *et al.*, 2005).

O tecido ósseo apresenta-se em processo contínuo de remodelação. No adulto, a massa óssea é mantida através do balanço entre a sua formação e absorção. A contínua remodelação do osso traduz-se na manutenção de funções fisiológicas importantes, como a regulação da homeostasia iônica e a manutenção das propriedades mecânicas do osso (Fernandes, 1998). Logo, um possível desequilíbrio entre a reabsorção e formação óssea pode culminar em osteopatias.

2.1.1 Ossificação: Intramembranosa e Endocondral

A formação do osso (ossificação) pode ocorrer pelo processo direto (intramembranoso) ou pelo processo indireto (endocondral). Ambos requerem um fornecimento apropriado de uma vascularização para elaboração e mineralização da matriz extracelular. A ossificação intramembranosa ocorre durante o desenvolvimento embrionário pela transformação direta das células mesenquimais em osteoblastos. Esse tipo de ossificação é restrita aos ossos da abóbada craniana, alguns ossos faciais e partes da mandíbula e clavícula (Marks & Hermey, 1996 *apud* Bilezekian *et al.*, 1996). O processo de formação óssea do tipo endocondral, que ocorre na embriogênese, inicia-se quando as células mesenquimais (células progenitoras que podem se diferenciar em osso ou células formadoras de cartilagem) utilizam um molde cartilaginoso para a formação do osso. As células mesenquimais formam grupos de células (condensações) que se diferenciam em condrócitos (células formadoras de cartilagem) e secretam a matriz cartilaginosa. As células localizadas nas bordas das condensações formam o pericôndrio (Kronenberg, 2003). Os condrócitos localizados na porção central do molde cartilaginoso perdem a capacidade de proliferar e tornam-se hipertróficos, formando assim, o centro de ossificação primário. Destaca-se como um

importante gene regulador do desenvolvimento ósseo durante a ossificação endocondral o *Indian hedgehog* (Ihh), sendo responsável pela coordenação da proliferação dos condrócitos, assim como, a diferenciação destes e das células formadoras de osso denominadas osteoblastos (Kronenberg, 2003). Os condrócitos hipertróficos são capazes de atrair vasos sanguíneos originados no mesênquima ao produzirem fatores de crescimento do endotélio vascular (VEGF), entre outros. Posteriormente, ocorre a calcificação da matriz e a apoptose dos condrócitos hipertróficos. Simultaneamente, células osteoprogenitoras do pericôndrio formam um colar periosteal (Kierszenbaum, 2002). Então, o pericôndrio agora é chamado de periósteo. Este por sua vez é composto de células mesenquimais capacitadas a formar osso em vez de cartilagem, além de impedir a nutrição dos condrócitos (Sikavitsas *et al.*, 2001). Os vasos sanguíneos que invadem o espaço ocupado pelos condrócitos hipertrofiados ramificam-se em direções opostas. Desenvolve-se, portanto, o centro de ossificação secundária nas epífises. Nota-se a intercomunicação entre os vasos sanguíneos da epífise e da diáfise. Toda a cartilagem da epífise é substituída por osso exceto a porção articular (Kierszenbaum, 2002). Esta ossificação é produzida pelos ossos longos e curtos do corpo (Sikavitsas *et al.*, 2001). Em ambos os processos o tecido ósseo que aparece primeiro é o osso primário ou imaturo. Este apresenta baixo componente mineral e células embebidas na matriz (osteócitos). Nota-se a substituição do osso primário pelo osso secundário (maduro ou lamelar). Neste, o arranjo das fibras colágenas apresenta-se em lamelas paralelas umas as outras ou de organização concêntrica ao redor do canal vascular. Mais detalhadamente no osso secundário compacto, há diferentes disposições lamelares: lamelas circunferenciais externas (se aprofundam no periósteo e formam a região mais

externa da diáfise), lamelas circunferenciais internas (circundam a cavidade medular), osteônio (unidade formadora do osso compacto contendo o canal Haversiano e lamelas concêntricas) e a lamelas intersticiais (de formas irregulares). No osso secundário, trabecular, as lamelas possuem um arranjo irregular, cujos canalículos comunicam os osteócitos. Nestas células os nutrientes são difundidos a partir da medula óssea através de capilares presentes no interior destes canalículos (Figura 1).

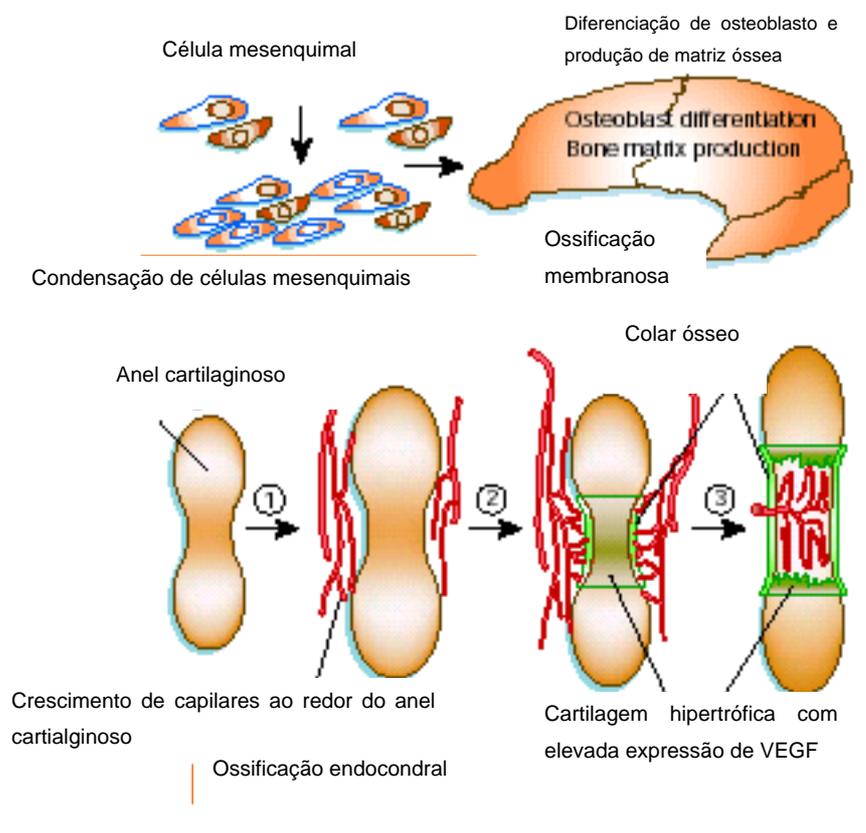


FIGURA 1. Esquematização dos Processos de Ossificação.

(Fonte: Kronenberg et al., 2003).

2.1.2 Matriz Óssea

O tecido que constitui o esqueleto é caracterizado pela presença de depósitos de minerais que lhe conferem rigidez e dureza característica. O processo de mineralização não consiste apenas na combinação dos íons cálcio e fosfato na matriz orgânica, sob a forma de fosfato de cálcio, mas é o resultado da interação de muitos fatores biológicos e físico-químicos que agem estimulando ou inibindo esse processo altamente complexo (Katchburian & Arana, 1999). Portanto, a mineralização biológica ou biomineralização, é o processo de formação de mineral *in vivo* (Dorozhkin & Epple, 2002).

Nos vertebrados, a fase mineral que constitui a maior parte dos tecidos esqueléticos é fosfato de cálcio, em geral sob a forma de hidroxiapatita (HA) carbonatada. Este é o tipo de apatita biológica que impregna os tecidos mineralizados formando cristais nanométricos que variam em tamanho. Geralmente os cristais de hidroxiapatita nos tecidos duros não têm estrutura perfeita, pois mostram consideráveis variações na sua composição, embora sua fórmula básica seja sempre a mesma: $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ (Katchburian & Arana, 1999).

O tecido ósseo é constituído por células embebidas em matriz extracelular mineralizada. A porção protéica da matriz extracelular do osso é composta de 90% de proteínas colágenas (das quais 97% de colágeno tipo I e 3% de colágeno tipo V) e 10% de proteínas não-colágenas (das quais 20% correspondem a osteocalcina, 20% osteonectina, 12% sialoproteínas, 10% proteoglicanas e 38% restantes a osteopontina, fibronectina, fatores de crescimento, proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), etc (Anselme, 2000). A seqüência Arginina-

Glicina-Asparagina (RGD) presente em proteínas como fibronectina, vitronectina, colágeno tipo I, osteopontina e sialoproteína óssea, atua como mediadora da adesão celular a algumas proteínas do plasma e da matriz extracelular. Receptores da superfície celular pertencentes à superfamília das integrinas reconhecem a seqüência RGD mediando assim a adesão celular no osso (Puelo & Nanci, 1999). As integrinas são consideradas mediadoras do ambiente extracelular, servindo de ligação direta entre a matriz extracelular e a actina do citoesqueleto, via proteínas, como talina, vinculina e paxilina das células (Mizuno *et al.*, 2000).

A osteocalcina ou proteína - Gla do osso, sintetizada pelos osteoblastos, possui uma moderada afinidade por cálcio e pode ser usada na inibição da mineralização (Sikavitsas *et al.*, 2001). É capaz também de controlar o processo de reabsorção óssea (Sikavitsas *et al.*, 2001). Esta proteína pode ser utilizada como marcador para o fenótipo de células osteoblásticas (Mizuno *et al.*, 2000). Vale destacar que o controle da expressão de osteocalcina é dado pelo gene *Cbfa-1* (*core-binding factor family*) específico de osteoblastos, capaz de codificar o fator de transcrição que induz a diferenciação destas células formadoras de osso (Kierszenbaum, 2002).

A osteopontina e sialoproteína óssea juntas constituem a maioria das proteínas do osso associadas à mineralização. A osteopontina é a primeira proteína a ser expressa durante o período de ativação da proliferação celular (De oliveira *et al.*, 2003). Sabe-se que o aminoácido que predomina na osteopontina é o aspartato, já nas sialoproteínas é o ácido glutâmico. Ambas possuem as seqüências RGD que reconhecem as subunidades $\alpha_v\beta_3$, assim como outros receptores da família das integrinas. Isto possibilita dessa forma, a adesão e

ativação da via de sinalização celular do tecido em questão. Apesar das semelhanças de suas propriedades bioquímicas, tais proteínas possuem funções distintas. Acredita-se que as sialoproteínas ósseas iniciam a formação dos cristais da mineralização *in vivo*, enquanto a osteopontina inibe o crescimento destes cristais. A osteonectina é uma glicoproteína que também se liga predominantemente aos cristais de hidroxiapatita (Davies, 2000).

As BMPs são importantes por direcionarem a diferenciação das células precursoras na via osteogênica. Estas proteínas podem promover a formação de cartilagem ou do osso, pois o precursor celular é comum a esses tecidos; porém, o comprometimento de uma célula a uma linhagem específica é guiado por influência de sinais moleculares do seu microambiente, os quais agem sobre a cascata de ativação de genes que irão determinar a especificidade da via de diferenciação (Davies, 2000).

As BMPs pertencem à família de citocinas que estimulam a proliferação celular tanto dos condrócitos quanto dos osteoblastos, causando o aumento da produção da matriz para cada tipo celular. Além disso, estas proteínas ativam genes específicos, tornando possível a diferenciação das células mesenquimais em osteoblastos (Sikavitsas *et al.*, 2001).

A fibronectina é um polipeptídeo extracelular que se liga a regiões de colágeno, fibrina, assim como às próprias células. Os osteoblastos usam a fibronectina para adesão celular, enquanto o Fator Transformante de Crescimento - β (TGF- β) modula sua síntese (Sikavitsas *et al.*, 2001). Este, por sua vez, permite a diferenciação das células mesenquimais em condrócitos, além de induzir a proliferação de condrócitos e osteoblastos (Sikavitsas *et al.*, 2001).

As proteoglicanas I, presentes na matriz, também chamadas de biglicanas, e as proteoglicanas II, conhecidas como decorinas, afetam o crescimento e o diâmetro fibras de colágeno (Sikavitsas *et al.*, 2001). Estas são distribuídas juntamente com colágeno tipo I e parecem regular o processo fibrilogênese colágena, enquanto as biglicanas predominam pericelularmente e modulam as respostas de precursores de osteoblastos a TGF- β (Mackie, 2003).

Observa-se ainda a formação de uma matriz óssea desprovida de colágeno tipo I durante o processo de remodelação óssea e também na interface entre osso e implante, denominada linha cementante. Seguidamente à maturação celular, os osteoblastos produzem uma matriz mineralizada, constituída de um arcabouço de fibras colágenas, as quais são impregnadas por cristais de carbonato apatita (Davies, 2000).

2.1.3 O Constituinte Celular

Os tipos celulares componentes do tecido ósseo são os osteoblastos (responsáveis pela síntese da matriz extracelular), osteócitos (células maduras situadas no interior de lacunas da matriz) e osteoclastos (responsáveis pela reabsorção óssea, participando dos processos de remodelação do osso) (Junqueira & Carneiro, 1999). Os osteoblastos e os osteoclastos estão intimamente ligados durante o desenvolvimento do esqueleto e através de toda a vida. Células da linhagem osteoblástica sintetizam e secretam moléculas que iniciam e controlam a diferenciação dos osteoclastos (Ducy *et al.*, 2000).

Os osteoclastos (Figura 3) são células originadas de monócitos que se fundem e formam células grandes e multinucleadas que reabsorvem o osso. Quando ativas, essas células movem-se em direção à superfície óssea, e

apresentam duas especializações da membrana plasmática: a Borda Ondulada (*ruffled border*) e a Zona Clara (*clear zone*). A primeira é a mais central, com uma área altamente invaginada da membrana, onde ocorre a reabsorção óssea. A segunda, porém, é rica em microfilamentos, onde a área da membrana que não contém organelas envolve a Borda Ondulada e serve como local delimitado da matriz, para o ataque dos osteoclastos onde será liberado H^+ e enzimas para a digestão das proteínas de matriz (Bilezekian *et al.*, 1996).

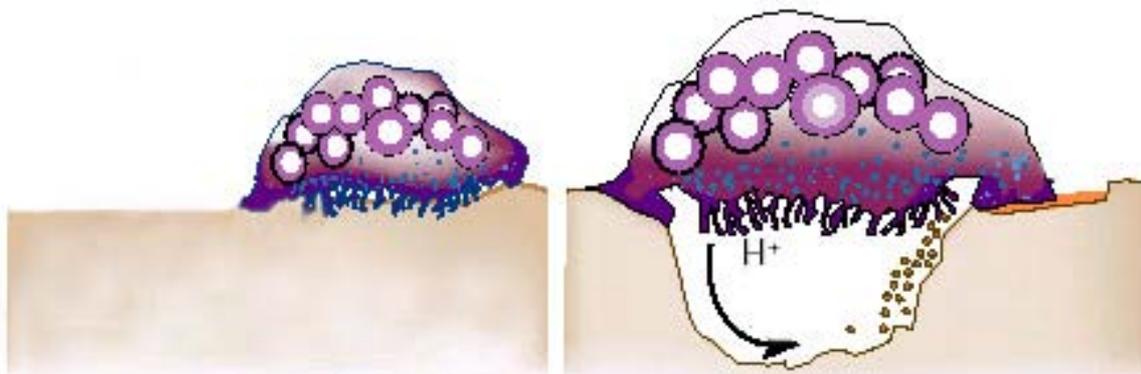


FIGURA 2. Osteoclasto realizando a reabsorção óssea. Observar a Zona Clara e a Borda Ondulada (Fonte: Adaptado de Boyle *et al.*, 2003).

2.1.4 Caracterização dos osteoblastos

As células das linhagens osteoblásticas são caracterizadas de acordo com a sua morfologia e definições histoquímicas, e separadas em quatro estágios de maturação identificados *in situ*, durante seu desenvolvimento: pré-osteoblasto, osteoblasto, osteócito e *bone lining cell* ou células de recobrimento ósseo (Bilezekian *et al.*, 1996).

Os pré-osteoblastos são considerados precursores imediatos das células osteoblásticas, podendo ser identificados pela sua localização no tecido ósseo em relação aos osteoblastos. Os pré-osteoblastos são histologicamente e ultra-estruturalmente semelhantes aos osteoblastos, apresentam-se também marcadas para atividade da fosfatase alcalina e apresentam baixa capacidade de divisão celular (Bilezekian *et al.*, 1996).

Osteócitos são células osteoblásticas diferenciadas, embebidas na matriz extracelular mineralizada, sendo considerada o último estágio de diferenciação na linhagem osteoblástica. No tecido, os osteócitos são menores do que os osteoblastos, apresentam menor quantidade de suas organelas, decréscimo da atividade da fosfatase alcalina e são pouco ativas sob o ponto de vista metabólico (Bilezekian *et al.*, 1996). Porém recentes estudos envolvendo osso trabecular sugerem a participação de osteócitos na atividade remodeladora do tecido ósseo (Hernandez, 2004). Cada osteócito ocupa um espaço ou lacuna contida na matriz delimitada pelo próprio volume celular. Eles apresentam extensões de filopódios pelos canalículos dessa matriz e estabelecem, assim, contatos com células adjacentes pelas junções comunicantes. Uma vez que a difusão de nutrientes e metabólitos pela matriz mineralizada é limitada, as conexões por filopódios permitem uma comunicação entre osteócitos vizinhos, seja na superfície interna ou externa do osso ou, ainda, com vasos sanguíneos do tecido que ficam distantes em no máximo 100 μ m dos osteócitos (Bilezekian *et al.*, 1996).

No esqueleto adulto, a maior parte da superfície óssea que não está sofrendo remodelação (reabsorção ou formação) é recoberta por uma camada de células achatadas, finas e alongadas denominadas *bone lining cells*. Estas representam a forma quiescente dos osteoblastos com relação à produção da

matriz. É proposto que esta linhagem de células possa ser ativada em resposta a estímulos particulares como, por exemplo, o hormônio da paratireóide (PTH). (Bilezekian *et al.*, 1996).

O fenótipo do osteoblasto é caracterizado pela capacidade desta célula sintetizar fosfatase alcalina associada à membrana, além de moléculas da matriz óssea, incluindo colágeno tipo I (COLL-I) e uma variedade de proteínas não-colágenas, como osteocalcina, sialoproteínas ósseas, osteopontina; proteoglicanas e, ainda, receptores de fatores de crescimento e hormônios (Bilezekian *et al.*, 1996).

É uma célula mononuclear, e no seu estado mais ativo é rica em retículo endoplasmático granular, ribossomos e um aparelho de Golgi bem desenvolvido. Sabe-se que as células desta linhagem são derivadas de mesenquimais indiferenciadas (Baxter *et al.*, 2002).

Estas células secretam quantidades elevadas de fosfatase alcalina durante a fase da formação da matriz orgânica. A fosfatase alcalina gera um aumento da concentração local de fosfato inorgânico necessário para deposição de hidroxiapatita e/ou ative as fibras colágenas de modo a tornar possível a deposição de sais de cálcio (Fernandes, 1998). A atividade da fosfatase alcalina é aumentada durante a diferenciação dos pré-osteoblastos em osteoblastos; portanto, utiliza-se freqüentemente esta enzima como marcador do processo de diferenciação em osteoblastos (Davies, 2000). Entretanto, a expressão dessa enzima não é única de células osteoblásticas, ou seja, outros marcadores são necessários para identificação deste tipo celular (Mizuno *et al.*, 2000).

Os osteoblastos regulam a mineralização da matriz óssea. Entretanto, este mecanismo não está totalmente compreendido. A mineralização é iniciada

pelas vesículas da matriz que brotam da membrana plasmática na superfície celular (Bilezekian *et al.*, 1996).

Essas vesículas originam-se das próprias células produtoras da matriz orgânica. No tecido ósseo elas encontram-se apenas no início da mineralização do osso embrionário ou imaturo, não estando mais presentes no osso maduro. Tais vesículas são envolvidas por uma membrana idêntica à membrana plasmática, e constituem microcompartimentos, nos quais as concentrações iônicas de cálcio e fosfato podem ser alteradas sem a necessidade de modificações nas concentrações iônicas do líquido extracelular (Katchburian & Arana, 1999).

Logo, os osteoblastos são células importantes na criação e manutenção da arquitetura esquelética (Mackie, 2003).

2.1.5 Biomateriais

Diversas desordens afetam a estrutura óssea, sejam decorrentes de estados patológicos (como osteoporose e/ou perda de massa óssea) ou, ainda, em consequência de acidentes. Nota-se, portanto, a necessidade de intensificar pesquisas na procura de materiais que possam substituir de maneira adequada os ossos danificados (Kawashi *et al.*, 2000).

Os materiais utilizados na substituição de ossos enquadram-se em uma classe denominada de biomateriais. Estes devem apresentar propriedades físicas e biológicas compatíveis com os tecidos vivos do hospedeiro, de modo a estimular uma resposta adequada dos mesmos. Tais propriedades caracterizam a biocompatibilidade (Kawachi *et al.*, 2000). Este termo inclui características atóxicas, não carcinogênicas e a estabilidade mecânica do material (Suchanek &

Yoshimura, 1998). A biocompatibilidade está relacionada com o comportamento da célula na área de contato (mais especificamente na adesão da célula com a superfície do biomaterial), onde as características da superfície como topografia, composição química e energia de superfície são essenciais na adesão dos osteoblastos (Anselme, 2000). Dessa maneira, tais características determinam como as moléculas irão adsorver e se orientar na superfície do substrato (Anselme *et al.*, 2000), bem como o comportamento da célula no contato, influenciando sua morfologia, capacidade de adesão e proliferação (Anselme, 2000; Manjubala *et al.*, 2005).

O processo de adesão é essencial nas etapas do desenvolvimento celular. Este processo está intimamente relacionado com a complexa rede de sinalização de importantes processos como a divisão, migração, diferenciação celular e apoptose (Thiery, 2003).

O termo adesão envolve diferentes fenômenos: a fase da adsorção, que ocorre rapidamente e envolve eventos de curta duração, como ligações físicas e químicas entre as células e o material, englobando forças iônicas, van der Waals, e a fase da adesão propriamente dita, ocorrendo por longo período envolvendo várias moléculas biológicas, como as proteínas da matriz extracelular, transmembranares e do citoesqueleto que interagem na transdução de sinal e, ainda, promovem a ação de fatores de transcrição e, conseqüentemente, a regulação da expressão gênica (Anselme, 2000).

Os locais de adesão entre as células em cultura e a superfície do substrato são denominados contatos focais ou placas de adesão. Na face externa do contato focal, observam-se proteínas transmembranares específicas em seus receptores denominadas de integrinas. Na face interna, algumas proteínas, como

talina, paxilina e vinculina são mediadoras de interações entre os filamentos de actina do citoesqueleto e as proteínas dos receptores de membrana (integrinas) (Anselme, 2000).

A formação dos contatos focais ocorre essencialmente nas células com baixa motilidade, e isso é promovido *in vitro* por proteínas da matriz extracelular como fibronectina e/ou vitronectina. A distribuição da actina do citoesqueleto é essencial na manutenção da forma da célula e sua adesão. As moléculas de actina podem se agrupar em feixes formando uma projeção da membrana plasmática em forma de dedo conhecida como filopódio. Quando se apresentam sob a forma de rede, projetando uma área maior de membrana é conhecida como lamelipódio (Anselme, 2000).

Os fosfatos de cálcio sintéticos assemelham-se com os do osso natural, além de serem biocompatíveis e osteocondutivos (Ehara *et al.*, 2003), permitindo assim, sua utilização em processos clínicos que necessitam de implantes ósseos. A hidroxiapatita parece ser o mais adequado material cerâmico para implantes de reposição de tecidos rígidos, por apresentar biocompatibilidade, osteocondução e osteoindução (Suchanek *et al.*, 1998).

Outros estudos sugerem que a hidroxiapatita promove uma melhor formação óssea *in vivo* pela eficiência demonstrada na adsorção de proteínas adesivas a partir do fluido corporal de pacientes. Esta adsorção pode resultar em uma adesão mais eficiente entre célula e matriz extracelular, bem como uma adequada proliferação e diferenciação de células osteoblásticas na região do implante (Sawyer *et al.*, 2005).

A associação de hidroxiapatita com biopolímeros (produção de compósitos) visa aperfeiçoar as características necessárias para que um

biomaterial seja um futuro arcabouço (enxerto) capaz de promover o reparo do tecido ósseo (Raj *et al.*, 2003).

Dentre os biopolímeros destacam-se os alginatos. Estes são polissacarídeos carboxilados extraídos de algas ou bactérias que podem funcionar como arcabouço celular na engenharia tecidual (Stome *et al.*, 2004). Alginatos são capazes de promover a integridade mecânica e simultaneamente a transmissão de sinais para as células, possibilitando o desenvolvimento do tecido. Quanto à constituição destes polissacarídeos (Figura.4), sabe-se que são polímeros lineares do ácido (1,4) β -D-manurônico e de ácido α -L-gulurônico com seqüências repetidas ou alternadas (Draget *et al.*,1997; Drury *et al.*, 2003; Stevens *et al.*,2004). Os alginatos são polissacarídeos extraídos exclusivamente de algas pardas como algas *Laminaria hyperborea*, *Ascophyllum nodosum* e *Macrocystis pyrifera* (Rodríguez *et al.* 2003). Outras espécies de algas também foram objeto de estudos envolvendo extração e purificação de alginatos, tais como *Laminaria japónica*, *Eclonia maxima* e *Lesonia negrescens*. As propriedades físicas dos alginatos são determinadas pela sua composição e seu peso molecular. Os alginatos são estudados sob os mais variados aspectos na tentativa de se obter um melhor aproveitamento de suas propriedades (Simpson *et al.*, 2004).

A utilização de alginato como biopolímero chama atenção dos pesquisadores por apresentar biocompatibilidade e um suporte mecânico satisfatório para célula. Recentemente, o alginato tem sido utilizado na encapsulação de células e enzimas. Além disso, nota-se nos estudos *in vivo* e *in vitro* sobre formação do tecido cartilaginoso uma satisfatória adaptação deste polissacarídeo nas culturas de condrócitos (Zhang *et al*; 2003). Notam-se estudos

onde géis de alginato permitem que condrócitos mantenham seu fenótipo normal de diferenciação e a síntese de macromoléculas como proteoglicanas e colágenos específicos do tecido cartilaginoso (Stevens *et al.*, 2004). Além disso, outros estudos apontam o alginato como um polissacarídeo biodegradável e com baixa reação tecidual (Raj *et al.*, 2003).

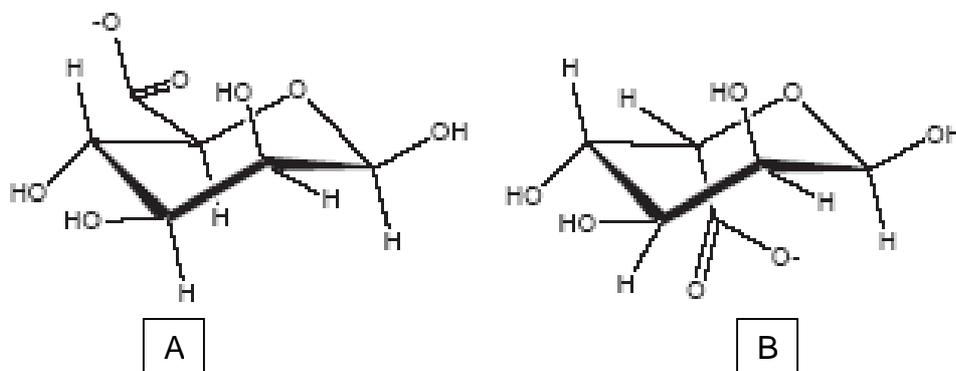


FIGURA 3. Estrutura química do alginato: Ácido β -D-Manurônico (A) e Ácido α -L Gulurônico (B) (Stevens *et al.*,2004).

A solução de alginato de sódio torna-se hidrogéis na presença de íons divalentes, como o cálcio. O hidrogel é formado pelos blocos de resíduos gulurônicos que se ligam a cátions resultando na formação de uma rede tridimensional pela interação iônica. Esse modelo de rede é chamado de *egg-box* (Figura 5). Observa-se que quanto maior a concentração de CaCl_2 na solução de alginato de sódio, maior a força dessa rede (Simpson *et al.*, 2004). Além disso,

sabe-se que a hidroxiapatita sintética possui limitações quanto a sua aplicabilidade por ser quebradiça e apresentar baixas propriedades mecânicas comparada com o osso (Thian *et al.*, 2002). Dessa maneira, podemos sugerir um aperfeiçoamento na produção de compósitos deste polissacarídeo e hidroxiapatita sintética, na tentativa de otimizar as propriedades mecânicas deste biomaterial.

Portanto, torna-se clara a importância de se compreender a relação entre as células ósseas e a superfície de biomateriais, sob o aspecto de suas propriedades físicas, químicas e mecânicas, a fim de se aprimorar a produção de materiais sintéticos que interajam de maneira adequada com o tecido ósseo, possibilitando seu reparo em futuras aplicações clínicas.

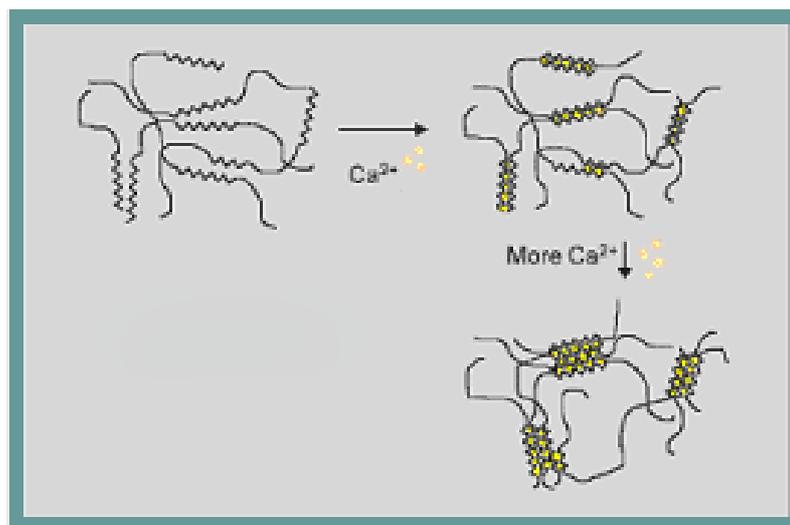


FIGURA 4. Esquema de representação do modelo *egg-box* (Adaptado do site <http://www.fmcbiopolymer.com>).

2.1.6 Fosfatos de cálcio

Os ortofosfatos de cálcio são os principais constituintes inorgânicos presentes nos processos fisiológicos e patológicos de calcificação dos sistemas

biológicos. A maior parte destes fosfatos se diferencia pela sua solubilidade e pela razão Ca/P. Para compostos quimicamente puros esta razão varia entre 0,5 e 0,2, sendo que quanto menor é a razão, maior é a sua acidez e a sua solubilidade em água. A hidroxiapatita (HA) é o mais estável e menos solúvel dos fosfatos, apresentando a razão Ca/P 1,67. A apatita biológica é caracterizada pela sua deficiência em cálcio, além de apresentar substituintes iônicos na sua estrutura, como exemplo, carbonatos, Na^+ , Mg^+ , F^- , entre outros íons. A hidroxiapatita deficiente em Cálcio (Ca/P 1,58) tende a procurar um estado de menor energia, ou seja, mais estável. Sendo assim, pode transformar-se em HA estequiométrica.

Portanto, as biocerâmicas constituídas de hidroxiapatita, merecem destaque nos estudos de materiais empregados em reparos ósseos (Cancedda *et al.*, 2003).

2.1.7 Biomateriais e a Bioengenharia Tecidual

A aplicabilidade clínica, frente a inúmeras justificativas para o desenvolvimento da Bioengenharia Tecidual Óssea, inclui a necessidade de produzir e aperfeiçoar materiais destinados a enxertos ortopédicos. Neste sentido, o conhecimento dos fenômenos envolvidos nas etapas de regeneração do osso como: a sinalização morfogenética, a resposta celular do hospedeiro à sinalização, a viabilidade das células e uma apropriada vascularização (Burg *et al.*, 2000), torna possível o desenvolvimento, a produção e aplicabilidade destes biomateriais.

É desejado que os biomateriais, neste caso, possuam características como: osteocondução e osteoindução. A primeira permite um apropriado suporte para o crescimento de capilares e a migração de células do hospedeiro para a

região de formação óssea. Portanto, funciona como um material capaz de guiar o reparo ósseo local (Burg *et al.*, 2000). A segunda é definida como a capacidade de causar a diferenciação de células pluripotentes em condrócitos e osteoblastos, culminando na formação óssea. (HABIBOVIC *et al.*, 2005). A osteoindução dos materiais permite reparos em locais onde eles não cicatrizariam por si só (Burg *et al.*, 2000). Desta forma, o objetivo das pesquisas de implantes é projetar materiais que possam controlar a indução, guiar e promover a rápida re-estruturação tecidual. Para alcançar estes objetivos, torna-se importante à compreensão dos eventos ocorridos na interface do biomaterial e seus efeitos sobre as células ósseas. O conhecimento destes fatores é essencial para o desenvolvimento de estratégias que possam otimizar o controle da osteointegração (Puelo & Nanci, 1999). O enxerto ósseo ideal deve ser biocompatível, osteocondutivo, osteoindutivo, possuidor de propriedades mecânicas similares ao osso natural, e, ainda, capaz de oferecer um suporte para a angiogênese levando a remodelação óssea (Davies, 2000). Além disso, deve apresentar estrutura de nanocompósitos e composição similar ao osso (Manjubala *et al.*, 2005).

Os materiais cerâmicos possuem uma variedade de aplicações médicas: implantes dentários, fixação óssea, recobrimento de implantes, entre outras utilizações médicas. A natureza biomimética da hidroxiapatita sintética, em combinação com seu potencial biocompatível, osteocondutivo e bioativo, torna-a um material atrativo para aplicações ortopédicas (Davies, 2000). Além disso, esse material inorgânico é capaz de integrar rapidamente ao tecido ósseo do hospedeiro (Chang *et al.*, 2000).

A explicação para a bioatividade da cerâmica de fosfato de cálcio é que esse material permite a ligação preferencial com proteínas séricas específicas,

assim como a fatores de crescimento (Davies, 2000). É bem conhecido que o comportamento dos osteoblastos em cultura é influenciado pela natureza química e física do substrato sobre o qual as células estão semeadas. A energia de superfície, a adsorção de proteínas, a porosidade, a topografia e a rugosidade são capazes de conduzir muitos aspectos da vida da célula, incluindo adsorção, adesão, espreadimento, metabolismo, produção de citocinas, liberação de fatores de crescimento e de diferenciação. Deve-se ressaltar como determinação do comportamento osteogênico, a característica cristalográfica. Esta é capaz de contribuir para qualidade do novo tecido ósseo formado. Dessa forma, modificações no tamanho dos cristais pelos processos de sinterização influenciam os eventos de adesão, proliferação, diferenciação e metabolismo celular (Rodrigues *et al.*, 2003). Sendo assim, a microfabricação dos biomateriais permite a produção pré-definida de sua arquitetura com controle preciso de seu tamanho, forma e distribuição espacial (Tan *et al.*, 2004).

O sucesso da Engenharia Tecidual Óssea é notado não somente com a diferenciação das células em contato com o implante, mas também pela capacidade de proliferação das mesmas ao colonizar a matriz tridimensional do material (Declercq *et al.*, 2004).

Portanto, a compreensão do comportamento celular sobre a superfície do implante possibilita a produção de novos materiais que apresentem uma maior compatibilidade, mimetizando reações de biocompatibilidade obtidas *in vivo*.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

- Este projeto visa caracterizar diferentes biomateriais a base de hidroxiapatita e alginato com potencial para aplicação futura em bioengenharia de tecidos;

3.2 ESPECÍFICOS

- Caracterizar por métodos de Microscopia Eletrônica de biocompósitos em forma de microesferas (com e sem calcinação posterior à sua compactação) e pastilhas (calcinadas) de hidroxiapatita nanométrica e alginato, além de biomembranas de uma única face constituídas de alginato/hidroxiapatita /gelatina (face simples);

- Determinar por difração de elétrons a composição mineral cristalina de compósitos em forma de esferas;

- Analisar por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) possíveis modificações na superfície de materiais calcinados na forma de esferas de hidroxiapatita e alginato quando submetidos às condições de cultura de células, bem como na forma de pastilhas imersas em meio de cultura;

- Avaliar por pesagem usual a capacidade das pastilhas de absorverem meio de cultura;

- Observar a capacidade de adesão e proliferação de células osteoblásticas de murinos sobre biocompósitos em forma de pastilhas de

hidroxiapatita e alginato calcinadas; através de ensaios de marcação nuclear, viabilidade celular e MEV;

- Identificar a expressão de marcadores de diferenciação de células osteoblásticas murinas sobre essas pastilhas.

4 METODOLOGIA

4.1 MATERIAL

4.1.1 Biomembranas

As biomembranas foram produzidas no Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF) de forma a representar biocompósito homogêneo, ou seja, constituídos de uma única face contendo hidroxiapatita (HA) nanométrica /alginato 2 % (ISP KELTONE LV/ 1:1)/gelatina comum (VETEC) apresentando espessura de 100 μm .

4.1.2 Esferas de alginato e hidroxiapatita (HA)

Esferas de compósitos de alginato/HA (1:18) foram sintetizadas no CBPF através do seguinte procedimento: Preparou-se 5ml de alginato de Na^+ a 2 % (ISP KELTONE LV) e misturou-se a HA na seringa para gotejar numa solução de CaCl_2 0,16 M, a temperatura ambiente e ainda, sob agitação por uma hora (neste tempo o sódio será trocado pelo cálcio). Ao gotejar na solução, formam-se esferas que foram retiradas com uma peneira, e lavadas em água destilada e secas (vai pesando até ter um peso constante) na estufa a 37°C por 24 horas. Posteriormente são levadas a um forno à 1150°C por 8 horas. Vale notar que esta HA é estequiométrica e pura. Esta produção utilizou como fonte de cálcio o nitrato de cálcio colocada em um balão onde gotejou fosfato proveniente do dehidrogeno fosfato de amônia, sob agitação e gotejamento de 80°C. Gotejamento este de 6 mL/min. Houve monitorização do ph 11,0 com a utilização de amônia. Após 2 h formou-se um precipitado que é lavado e seco na estufa de 100°C. Macerou-se com pistilo esse precipitado até virar pó.

4.1.3 Pastilhas de alginato/HA (1:18)

A mistura de 5 mL de alginato de Na⁺ a 2 % (ISP KELTONE LV) e HA foi colocada em um molde redondo em forma de disco de diâmetro de 1,3 cm (pastilha) e posteriormente transferidas para a solução de CaCl₂ 0,16M a temperatura ambiente, sob agitação por uma hora. As pastilhas foram retiradas e secas em estufa a 37°C por 24 horas e levadas ao forno à 1150°C por 8 horas. Vale notar que esta HA possui a Ca/P 1.67 e pura.

4.1.4 Origem das células

Células osteoblásticas foram obtidas a partir células isoladas da medula óssea de tíbia e fêmur de camundongos BALB/c com 8-12 semanas de idade; de acordo com o protocolo de Balduino et al (2005). Os fêmures foram removidos cirurgicamente, limpos de músculos e tecidos conectivos. Posteriormente foram tratados com 0,125% de tripsina e 0,1% de Colagenase (1:1- 5x 30 minutos, ambos reagentes Sigma).As epífises foram removidas, e os fêmures sofreram *flushing* com meio de cultura a fim de remover as células da medula. Os ossos foram fragmentados de 3-5 mm, lavados exaustivamente com BSS (*Balanced Saline Solution*) e tratados 2 vezes com 0,1% de colagenase por 30-40 minutos cada a 37°C. Os osteoblastos foram coletados a partir da segunda digestão com colagenase. E os fragmentos ósseos foram cultivados para obtenção de mais osteoblastos em meio Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM, Sigma), contendo antibiótico (100 U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina) e ainda suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS; Cultilab).

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Cultura de Osteoblastos

As células osteoblásticas murinas foram expandidas em garrafas de cultura. Para o cultivo foi utilizado o meio DMEM, suplementado com 10 % de FBS (DF 10%) a 37°C, sob atmosfera de 5 % de CO₂. O meio foi trocado duas vezes por semana. Estas culturas foram mantidas até que se aproxime a semiconfluência e, nesta fase, sofreram tratamento enzimático de tripsina 0,125%/EDTA 0,02%. A terceira subcultura foi obtida pela tripsinização da segunda subcultura, efetuada durante o crescimento celular até que a décima subcultura seja obtida. A monitoração das células foi feita pela observação em microscópio óptico invertido.

4.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

4.2.2.1 Preparação de Biomateriais

A descrição da superfície dos biomateriais foi efetuada por MEV. Através deste método, observou-se a superfície de materiais, após a montagem destes em suportes de alumínio (8 mm, Ted Pella®).

Os biomateriais foram metalizados com fina camada de ouro em equipamento Balzers Union fl-9496, por “sputtering” (na faixa de 10 a 15 nm de espessura), para produção ótima de elétrons secundários. As observações dos compósitos foram realizadas no microscópio eletrônico JEOL JSM-5310, operando a 20 kV. As imagens digitais foram obtidas através do programa Sem Afore® JEOL 3.0 Pro na resolução de 1024 x 768 pixels.

4.2.2.2 Células cultivadas sobre biomateriais

As análises da superfície dos materiais por MEV é importante, pois permite aperfeiçoar a produção dos mesmos de acordo com as informações obtidas sobre o comportamento celular.

Para fixação das células presentes nas lamínulas redondas (controle) e nas pastilhas, estas foram fixadas com solução fixadora de Karnovsky (1965) modificada: glutaraldeído a 2,5 % e paraformaldeído a 4 % em tampão cacodilato de sódio a 0,1M, com pH 7,4, na temperatura ambiente, de acordo com os tempos de estudo de cada ensaio realizado.

O material foi lavado três vezes (dez minutos cada vez) em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, na temperatura ambiente.

A pós-fixação foi feita com tetróxido de ósmio (OsO_4) a 1 % em tampão cacodilato de sódio 0,1 M por quinze minutos em temperatura ambiente e no escuro. O material foi lavado três vezes (dez minutos cada vez) em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, na temperatura ambiente.

A desidratação do material foi realizada com banhos de etanol (aproximadamente dez minutos cada), em concentrações crescentes, obedecendo a seguinte seqüência: 15%, 35%, 50%, 70%, 80%, 90% e três banhos a 100%. O material já desidratado em etanol foi seco pelo método do ponto crítico, utilizando-se CO_2 líquido em aparelho Balzers CPD 050.

As lamínulas foram cortadas com auxílio de caneta com ponta de diamante e os pedaços montados em suporte de alumínio (1/8" PIN-Ted Pella ®), sobre a fita dupla face de carbono(8 mm, Ted Pella ®). Posteriormente, foram metalizadas e observadas como descrito acima.

4.2.3 Métodos analíticos por Microscopia Eletrônica de Transmissão

Através desta Microscopia a microestrutura dos materiais pode ser avaliada, pelo protocolo descrito a seguir: Os biocompósitos foram fixados em glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,4. Posteriormente, foram lavadas (três vezes por dez minutos cada), no mesmo tampão cacodilato de sódio, e desidratadas em concentrações crescentes de acetona (10%, 35%, 50%, 70%, 80%, 90%: dois banhos de dez minutos cada) até acetona absoluta (três banhos de dez minutos cada). Foram infiltrados ainda com mistura de acetona e resina Epóxi Polybed 812, nas proporções 2:1, 1:1, 1:2, e resina pura, por 12 horas. Após esse período, o material foi depositado em molde especial de silicone contendo a mesma resina pura e orientado a fim de serem obtidos cortes transversais e longitudinais dos biomateriais. O molde foi mantido a 60°C em estufa, por 48 horas, para a polimerização da resina. Dos blocos foram feitas pirâmides contendo o material e estas foram cortadas com facas de vidro em ultramicrótomo (RMC Ultramicrotome, modelo MT 6000-XL), para obtenção de cortes semifinos (espessura de 0,5 a 0,9 μm), e com faca de diamante Pelco, para obtenção de cortes ultrafinos (espessura entre 40 e 100 nm). Observações do material foram feitas em microscópio eletrônico JEOL 1200EX a 80 kV.

Através da difração de elétrons podemos identificar fases cristalinas diretamente no microscópio eletrônico de transmissão, em regiões com dimensão nanométrica. A difração de elétrons nos fornecerá dados sobre o estado da HA nas microesferas de nanopartículas agregadas, com e sem calcinação posterior.

4.2.4 Análise da superfície das esferas calcinadas submetidas às condições necessárias a cultura de células

As esferas que foram processadas para MEV descritas acima passaram pelas seguintes condições :

- 4 esferas não sofreram nenhum procedimento adicional;
- 4 esferas foram lavadas em PBS (1x), depois em álcool 70% (1x) e posteriormente mergulhadas em DMEM por 1 h;
- 4 foram lavadas em PBS (1x), álcool 70%(1x) e mergulhadas em DF 10% por 1 h;
- 4 esferas foram lavadas em PBS (1x),álcool 70% (1x) e mergulhadas em DMEM por 4 h;
- 4 outras foram lavadas em PBS (1x), álcool 70% (1x) e mergulhadas em DF 10% por 4 h;
- 4 esferas foram lavadas em PBS (1x),álcool 70% (1x) e mergulhadas em DMEM por 24 h;
- 4 outras esferas foram lavadas em PBS (1x),álcool 70% (1x) e mergulhadas em DF 10% por 24 h.

Tais constituintes são rotineiramente empregadas nas culturas de células (álcool para esterilização, tampão para manutenção do pH e osmolaridade, e meio de cultura para mimetizar as condições de líquidos fisiológicos).

4.2.5 Análise da superfície das pastilhas por MEV

Esta análise permite obter a informação sobre a superfície de compósitos em forma de pastilhas. O processamento do compósito para microscopia segue a descrição acima de MEV para materiais, onde as imagens obtidas são das pastilhas sem nenhum processamento adicional, bem como destas imersas em meio de cultura por 48h.

4.2.6 Análise da capacidade de absorção de meio de cultura pelas pastilhas

Pesou-se em uma balança usual a pastilha de HA/alginato (18:1) seca ao ar. Posteriormente, mergulhou-se esta pastilha no meio de cultura (DF10%) em 300 μ l por 48 horas. Passado este tempo, pesou-se novamente. Subtraindo-se os pesos, obtivemos a porcentagem de absorção de meio pelo mesmo.

4.2.7 Adesão Celular observada por MEV: cultura de células sobre as pastilhas após 48h

Foram plaqueadas $2,5 \times 10^4$ (células/poço) células osteoblásticas murinas na décima primeira passagem sobre lamínulas de vidro controle e sobre as pastilhas. As análises foram feitos após 48 h de cultura por imagens de MEV, segundo descrição acima.

4.2.8 Ensaio de Proliferação Celular sobre as pastilhas

A Bisbenzimidida interage com a fita dupla de DNA tornando possível a observação da morfologia nuclear (HILWIG et al., 1975). Os núcleos brilhantes e arredondados são considerados normais. Núcleos apoptóticos apresentam corpos nucleares fragmentados.

Foram plaqueadas $2,5 \times 10^4$ (células/poço) células osteoblásticas murinas na décima primeira passagem sobre lamínulas de vidro controle e sobre as pastilhas. As análises foram feitas nos seguintes tempos: 4 h, 24 h e 48 h. Após cada tempo as células foram lavadas com meio DMEM e posteriormente fixadas com paraformaldeído 4 % por 15 minutos. Após esse tempo, os materiais foram lavados 3x (cada lavagem de 5 minutos) com PBS (1x) pH 7,4 e corados com Bisbenzimidida (1:1000) por 5 minutos. Novamente foram lavados 2 x (cada lavagem de 5 minutos) com PBS 10mM (1x) pH 7,4. As lamínulas e pastilhas foram montadas com a utilização do meio de montagem Vectashield (VECTOR) e analisadas em Microscópio invertido AXIOVERT 135 com o software Axionvision 3.1 Zeiss. As imagens foram captadas de 5 campos aleatórios com objetiva de 20x.

4.2.9 Ensaio de Viabilidade Celular (MTT)

O Método MTT (*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxy-methoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2-tetrazolium salt*) foi usado para avaliar a viabilidade das células cultivadas sobre as pastilhas. Este ensaio se baseia na redução do composto MTT pela enzima NADH desidrogenase mitocondrial em células metabolicamente ativas, gerando cristais de cor violácea chamados Formazan (Mossman & Young, 1983). Este ensaio foi realizado como descrito a seguir:

Foram plaqueadas $2,5 \times 10^4$ (células/poço) células osteoblásticas murinas na décima primeira passagem sobre o poço controle e sobre as pastilhas em placas de 4 poços. As análises foram feitas com 48 h de cultura. Após esse tempo as células foram lavadas com meio DMEM. Foram adicionados aos poços para cada 300 μ L de meio DMEM, 30 μ L de MTT por 4 h a 37°C. Em outra placa transferiu-se as pastilhas com as células voltadas para 300 μ L de DMSO (dimetilsulfóxido) por 5 minutos. Para a lamínula simplesmente acrescentou-se 300 μ L de DMSO ao poço, também por 5 minutos. Os sobrenadantes foram recolhidos para uma placa de 96 poços onde foram realizadas a leitura em placa de ELISA no comprimento de onda de 570 nm em espectrofotômetro (BIO-RAD *microplate reader*- benchmark).

4.2.10 Ensaio de Imunohistoquímica

Todos os procedimentos imunocitoquímicos foram efetuados diretamente nas células *in situ*, conforme descrito anteriormente por Tougard e cols; (1977 e 1980). As células foram submetidas a imunofluorescência indireta, fazendo uso do protocolo a seguir:

- 1 - Células na décima primeira passagem foram plaqueadas na concentração de $2,5 \times 10^4$ (células/poço) por 24 h e 72 h;
- 2 - Foram lavadas em PBS (*phosphate buffer saline*/pH 7.4 - 0,01M) para retirada de células mortas ou debris;
- 3 - Fixadas com paraformaldeído 4 % (Sigma) por 30 minutos;
- 4 - Lavadas com PBS 3 vezes por 5 minutos cada lavagem;
- 5 - Incubou-se com cloreto de amônio (NH_4Cl) 50 nM em PBS para neutralização e remoção dos grupamentos aldeídicos livres;

- 6 - Lavadas 3 vezes com PBS/Triton 0,5 % por 5 minutos cada lavagem para permeabilização da membrana celular;
- 7 - O bloqueio foi realizado utilizando-se PBS-BSA (*Bovine Serum Albumine*) 10 % e soro normal de ovelha 10 % por 1h para o bloqueio de adsorção inespecífica de imunoglobulinas;
- 8 - Incubação com anticorpo primário osteopontina (1:50) (policlonal antibody rabbit anti-mouse-(gentilmente cedido pelo Dr. Larry Fisher; *National Institute on Dental and Craniofacial Research/NIH, USA*) overnight;
- 9 - Lavou-se 3 por 5 minutos cada com PBS-Tween 0,25 % para permeabilização da membrana celular;
- 10- A revelação foi feita com anticorpo secundário *anti-rabbit IgG conjugate streptavidine* CY3 (1:150) (Sigma);
- 11- Novas lavagens com PBS-Tween 0,25% foram realizadas.
- 12- Bloqueio foi feito em BSA-Triton 0,1% por 1 h;
- 13- Incubação do anticorpo primário contra α -actina de músculo liso (*monoclonal antibody mouse ascites fluid*) (1:400) (Sigma) em PBS-BSA 10 % por 2 h.
- 14- Lavou-se com PBS-Tween 0,25 % ;
- 15- Revelou-se com o anticorpo secundário *anti- mouse fragment* F(ab) *goat antibody* FITC (1:150) (Sigma);
- 16- Lavou-se com PBS-Tween 0,25 %;
- 17- Acrescentou-se DAPI-4'-6-Diamidino-2-phenylindole (1:1000) por 5 minutos;
- 18- Lavou-se com PBS e posteriormente com água destilada;

19- Utilizou-se o meio de montagem Vectashield.

As observações das lamínulas foram feitas em microscópio óptico invertido (Axiovision 135) e das pastilhas em microscópio confocal LSM 510 META com imagens de objetiva de 40x.

5 RESULTADOS

5.1 ESFERA DE ALGINATO E HIDROXIAPATITA (1:18) – CALCINADA

Foram analisadas as superfícies das esferas calcinadas a 1150°C através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Observaram-se contornos em grãos tanto na porção externa quanto interna do material. Pela elevada temperatura a qual o material foi submetido, notou-se a fusão dos cristais de HA nanométricos bem como espaços formados pela volatilização do alginato (Figura 5 A-D).

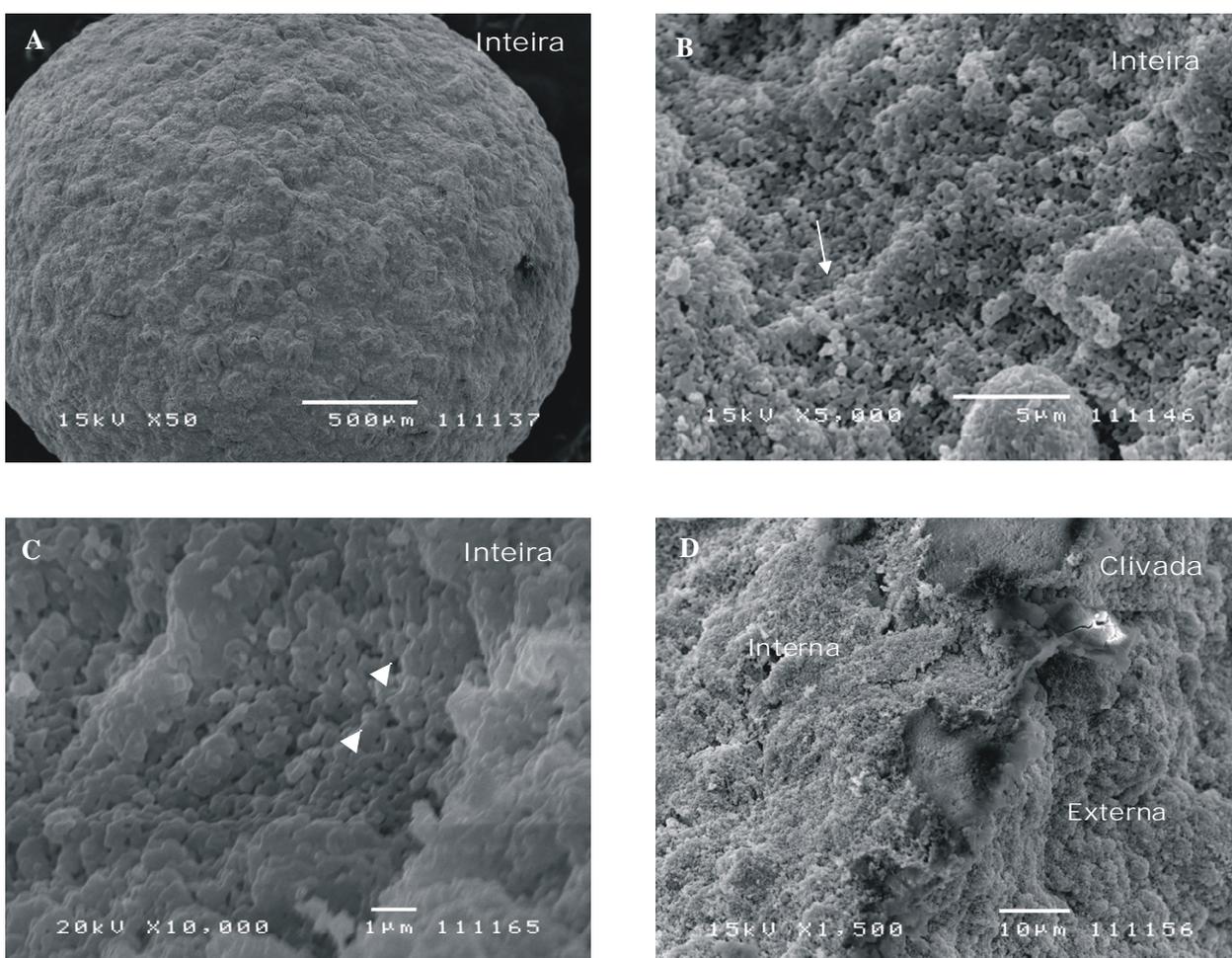


Figura 5. Imagens de MEV mostram contornos de grão na superfície do material (A a C-seta). Analisa-se a junção dos cristais de HA nanométrica e espaços formados pela perda do alginato sob condições de elevada temperatura (C-ponta da seta). Superfícies externa e interna apresentam-se semelhantes (D).

Através da Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) foi possível observar que as faces de um cristal são determinadas pelo contato do mesmo com seu vizinho. Além disso, notou-se a presença de espaços sem um arranjo geométrico definido, possivelmente pela volatilização do alginato. Logo, o material não é totalmente compacto em nível de visão por MET (Figura 6 A-C).

MET

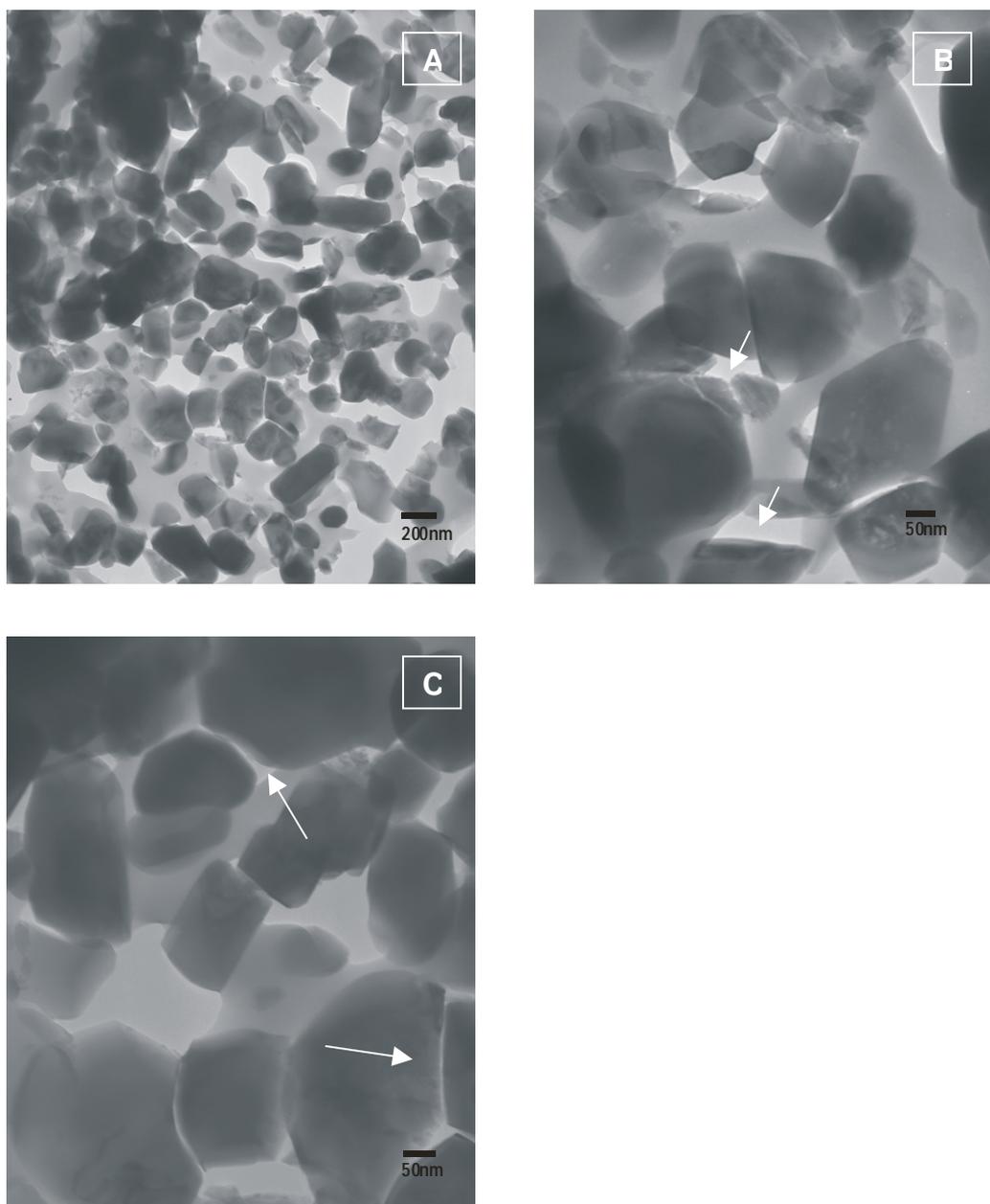


Figura 6. Observa-se por MET que o material não é totalmente compacto(A). Apresenta espaços sem arranjo geométrico entre os cristais que cresceram e se uniram(B). As faces destes são determinadas pelo seu cristal vizinho(C).

5.2 Esfera de Alginato e Hidroxiapatita (1:18)- Não calcinada

Observou-se por MEV semelhanças entre a textura interna e externa do compósito não calcinado. Notou-se uma superfície compacta com ausência dos contornos de grãos (Figura 7 A-D).

MEV

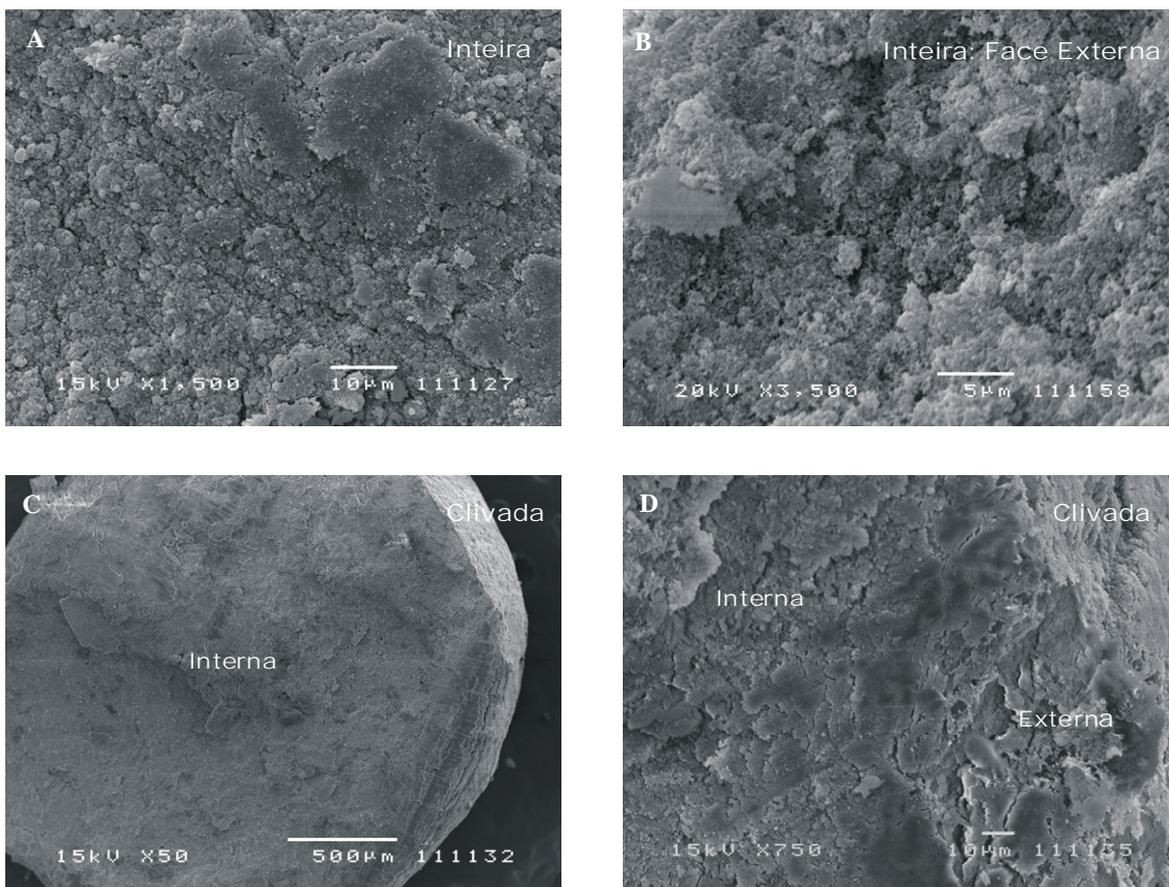


Figura 7. Observa-se pelas imagens de MEV semelhanças entre a textura externa e interna do material(D). Presença de uma superfície compacta, com ausência de orifícios na região (A) e (B). Esfera inteira, (C) e (D) Esfera clivada.

Através da difração de elétrons foi possível calcular as distâncias entre os planos cristalinos dos biomateriais calcinados ou não. Neste, notou-se a similaridade com os planos da hidroxiapatita padrão. Este resultado não sofreu alteração para esferas calcinadas visto que a perda de material orgânico não altera estrutura cristalina da HA (Figura 8-A).

Observaram-se ausências de anéis regulares no material calcinado indicando um menor número de cristais (Figura 8-B).

DIFRAÇÃO

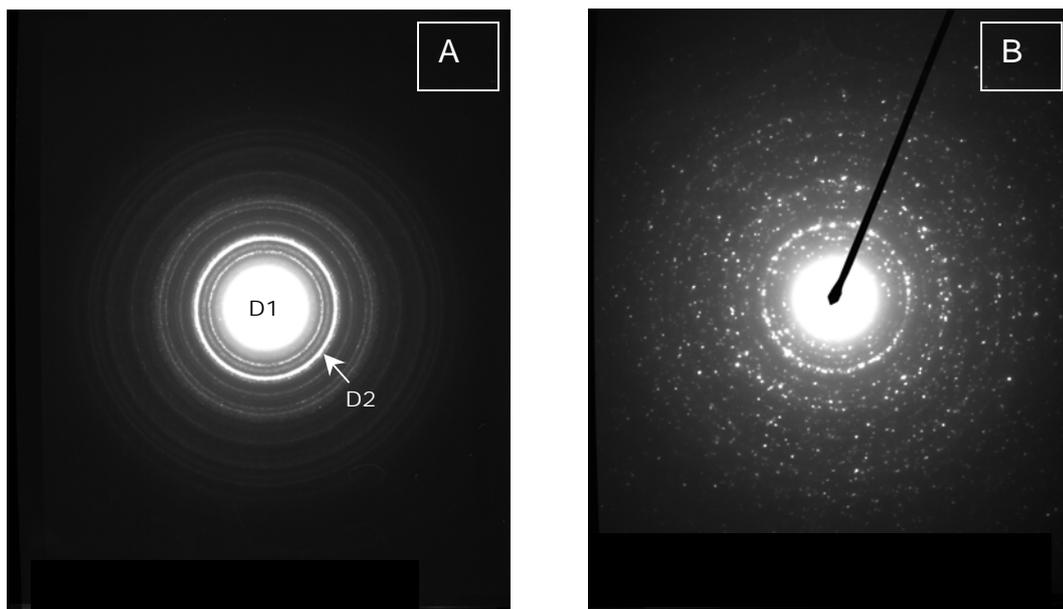


Figura 8. Difração de elétrons da esfera de Alginato e HA (A) não calcinada; (B) calcinada – Não calcinada mostrando ausência de anéis que sugerem uma região com poucos cristais embora tenham comprimentos maiores. Os anéis indicados pelas setas possuem distâncias entre os planos cristalinos (D): D1= 3,406 (A) e D2= 2,79 (A). Figuras compatíveis com a da Hidroxiapatita padrão. Voltagem 80 kV- distância de câmera 80cm.

Através das análises de MET observou-se uma mistura heterogênea de cristais com formas e comprimentos distintos (Figura 9 A-B).

MET

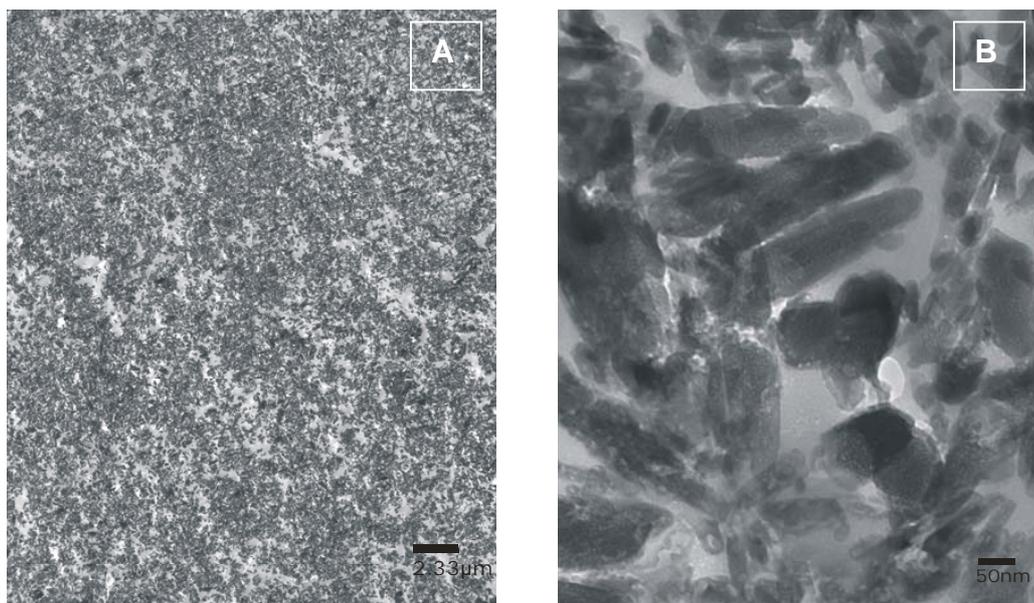


Figura 9. Observa-se por MET uma mistura heterogênea de cristais (A) em forma de espículas ou não com comprimentos distintos (B).

5.3 Membrana Simples (HA/Alg(1:1)) -100 μ m de espessura

Observou-se por MEV a aglomeração de HA, ou seja, esta não se misturou bem ao compósito (Figura 10 A-B).

MEV

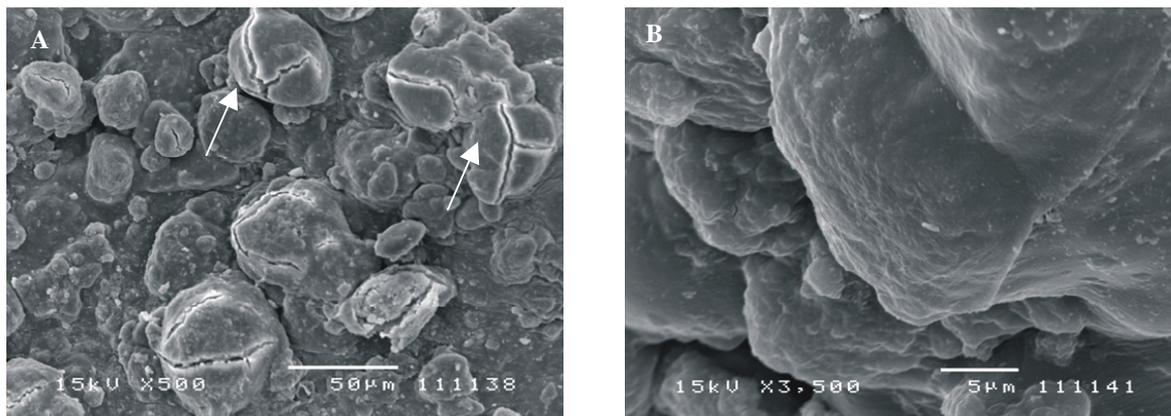


Figura 10. Observa-se pelas imagens de MEV que a HA não se mistura bem aos constituintes do material (A-seta). Formou-se aglomerados de HA que se segregou do material particulado(B).

Notou-se pelas análises de MET que a formação de uma fase rica em HA que se manteve separada das partículas de alginato. Os cristais de HA são semelhantes aos da esfera não calcinada (Figura. 11 A-F).

MET

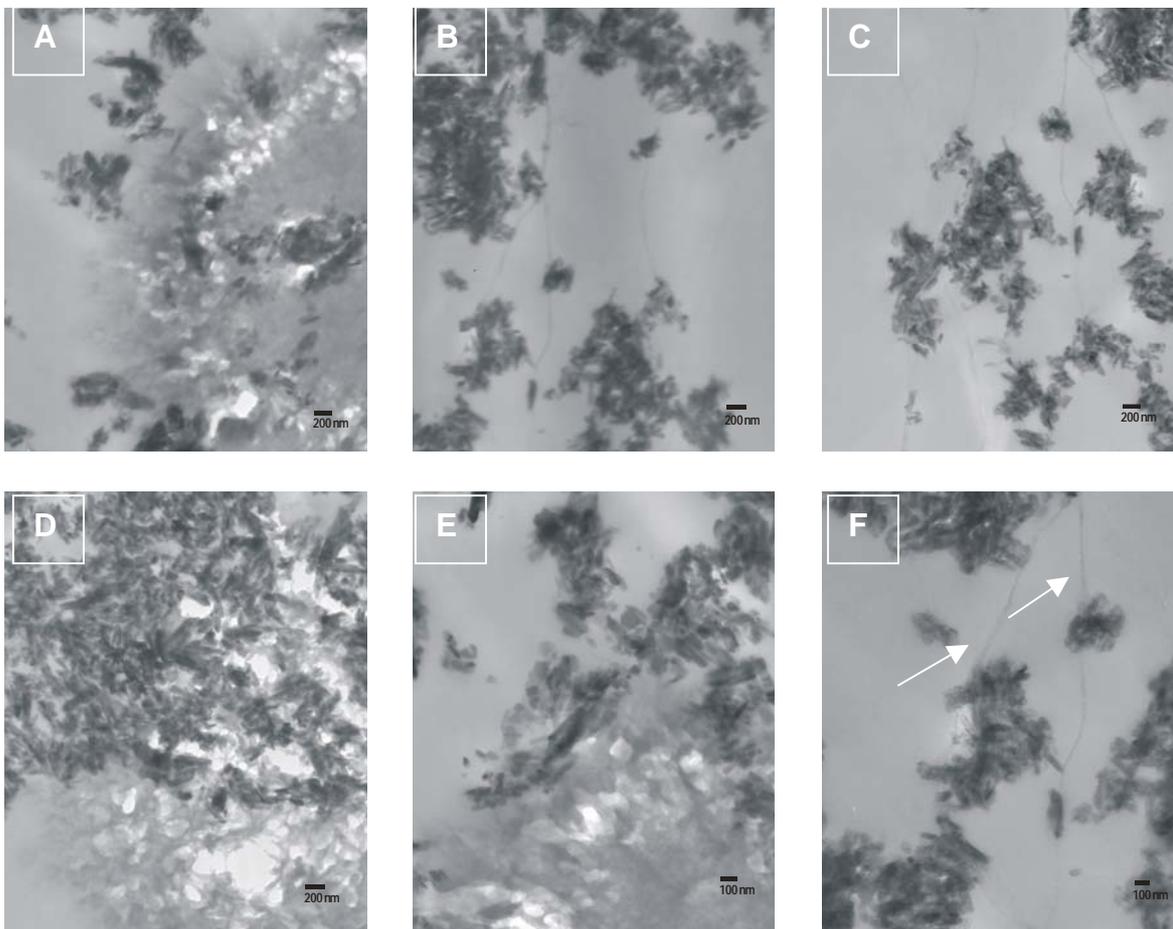


Figura 11. Imagens de MET (A-F) revelam a presença de aglomerados de HA. Esta se manteve separada dos filamentos de alginato (seta), formando um meio não homogêneo.

5.4 MEV das esferas calcinadas sob as condições de cultura

A Análise por MEV da superfície das esferas de alginato e hidroxiapatita (1:18) calcinadas a 1150°C sob as condições utilizadas para realização da cultura de células demonstraram que a superfície do material não sofre alteração (Figuras 12 A-D).

X 50



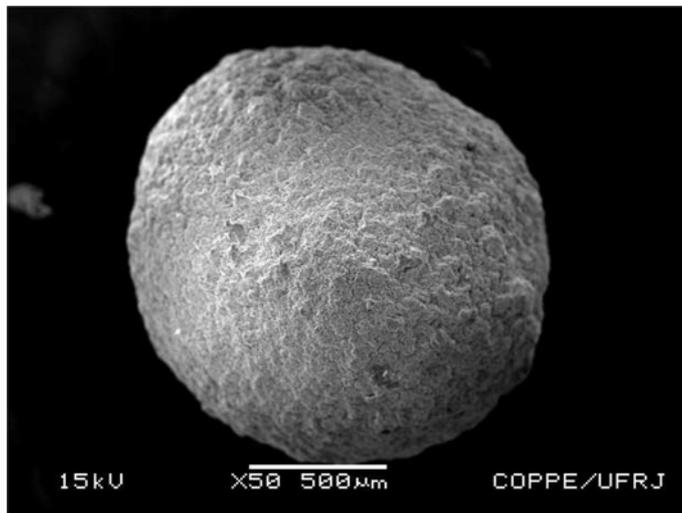
Sem procedimento adicional/controle



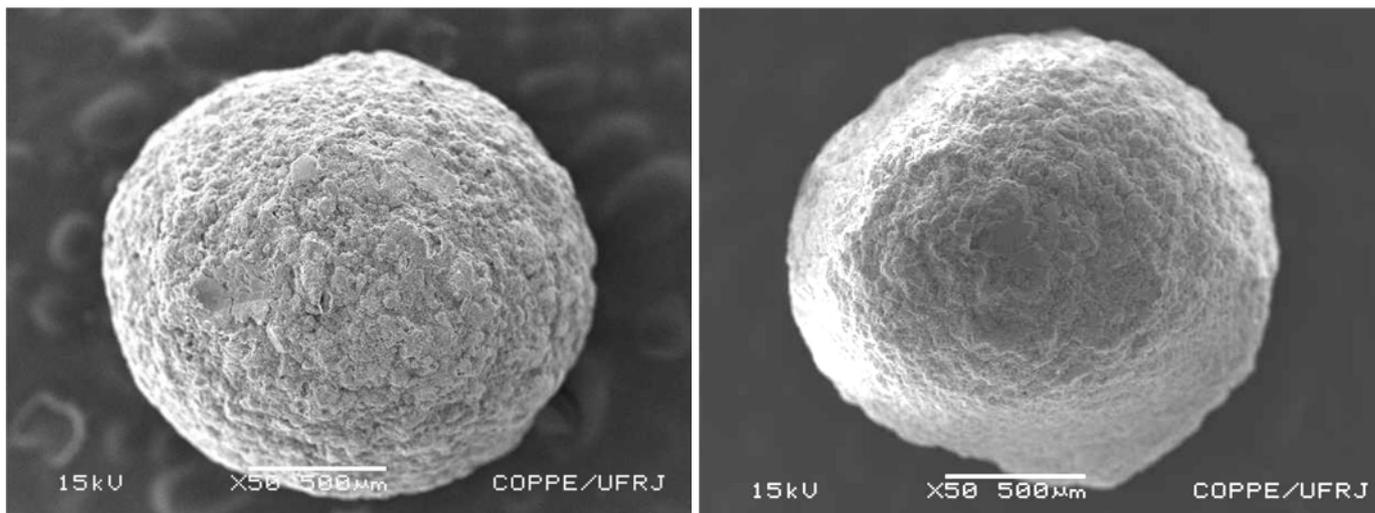
PBS + Álcool 70%



PBS + Álcool 70% + DMEM 1h



PBS + Álcool 70% + DF 10% 1h

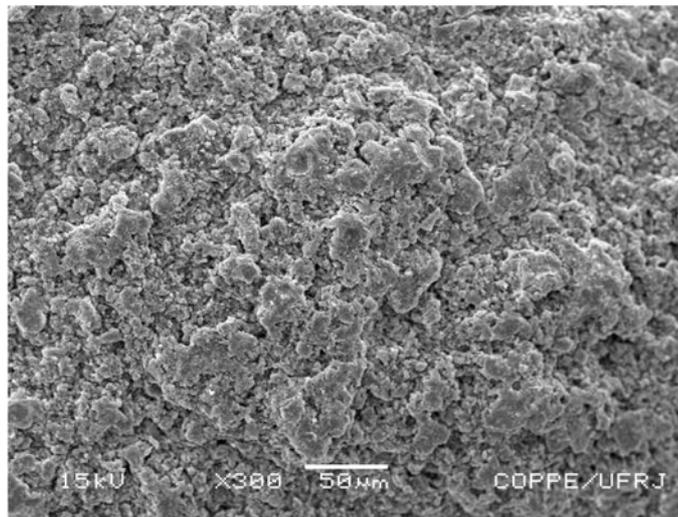
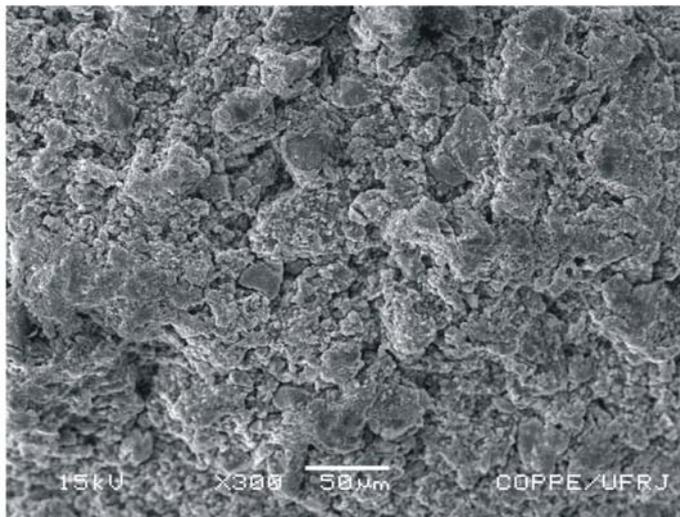


PBS + Álcool 70% + DMEM 4h

PBS + Álcool 70% + DF 10% 4h

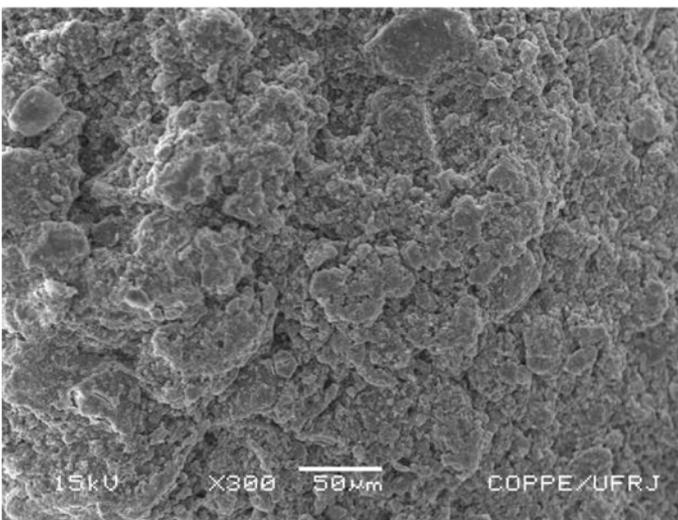
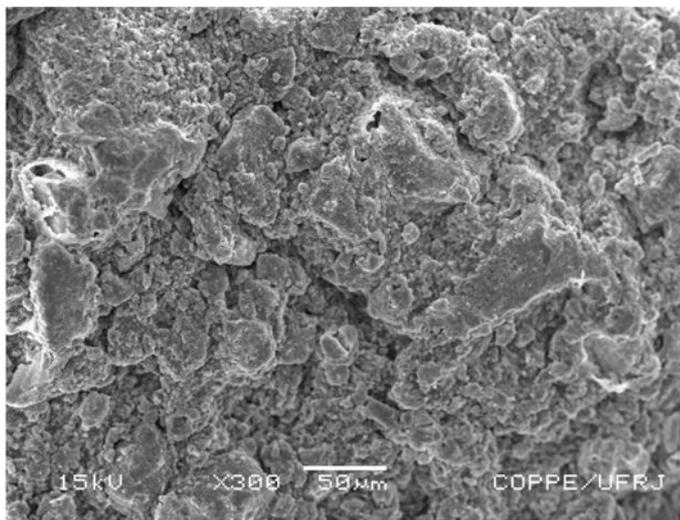
Figura 12-A. Não foram observadas diferenças na superfície do material sob condições de cultura.

X 300



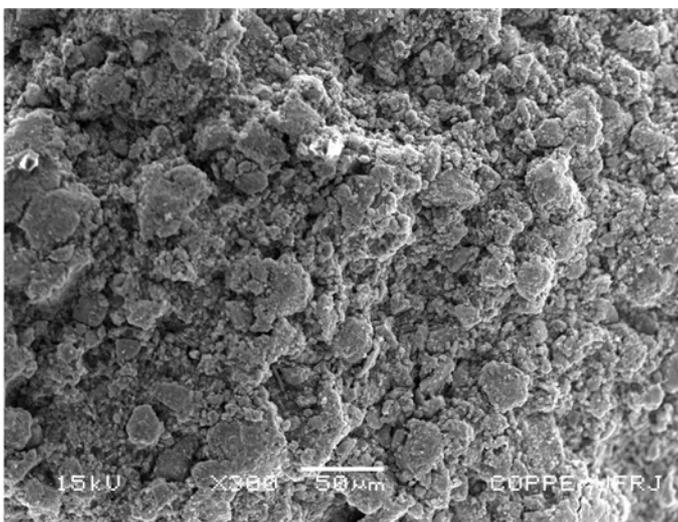
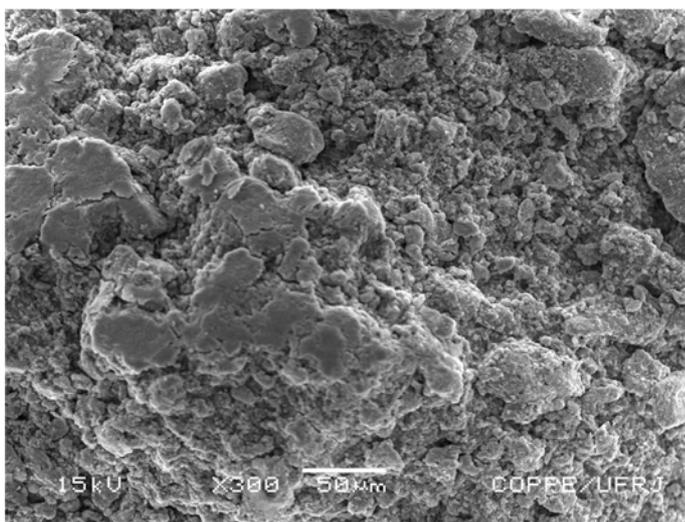
Sem procedimento adicional

PBS + Álcool 70%



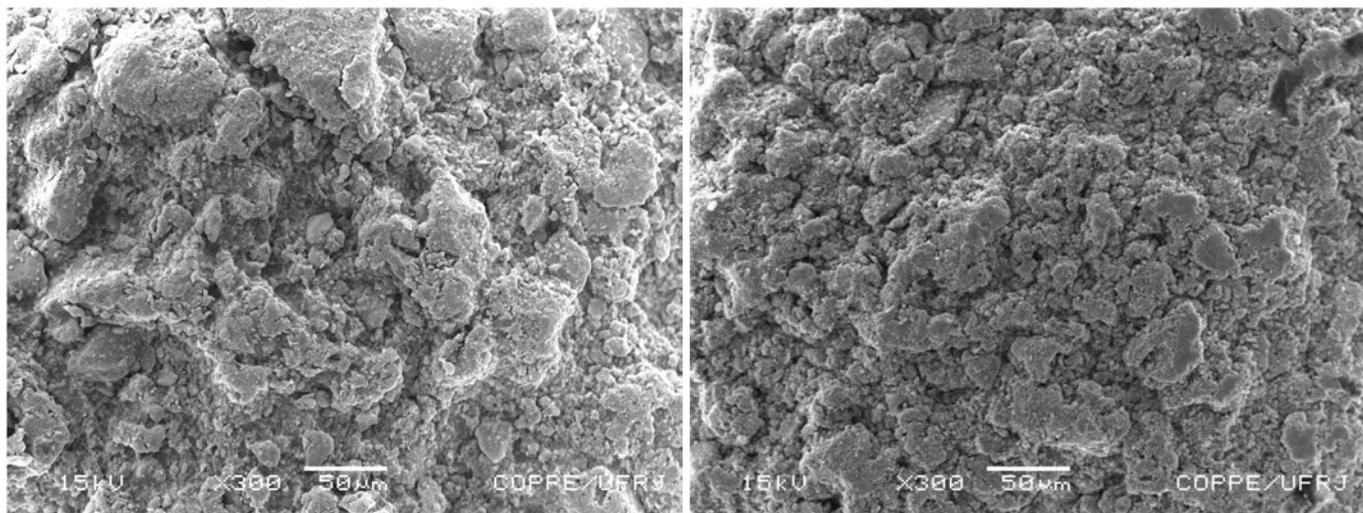
PBS + Álcool 70% + DMEM 1h

PBS + Álcool 70% + DF 10% 1h



PBS + Álcool 70% + DMEM 4h

PBS + Álcool 70% + DF 10% 4h



PBS + Álcool 70% + DMEM 24h

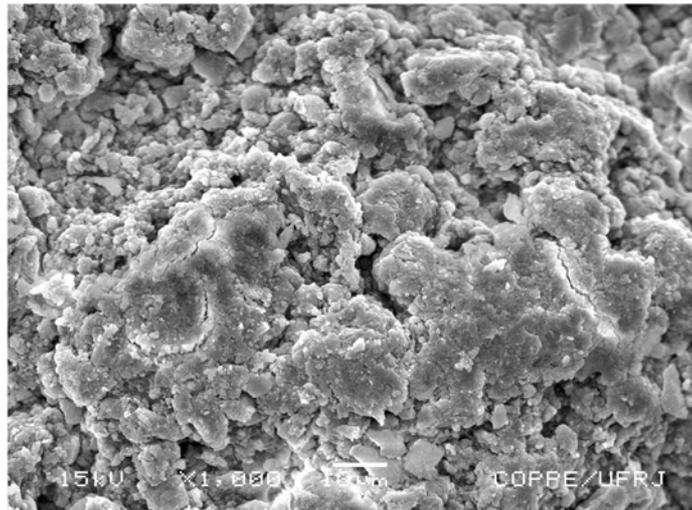
PBS + Álcool 70% + DF 10% 24h

Figura 12-B. Não foram observadas alterações na textura do material sob condições de cultura.

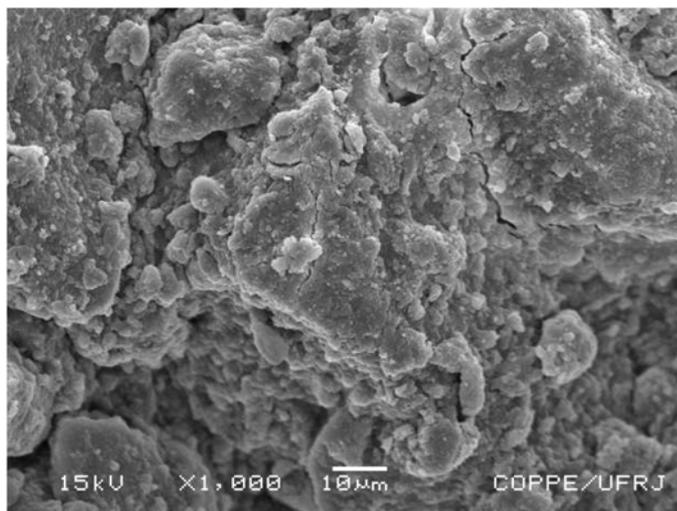
X 1000



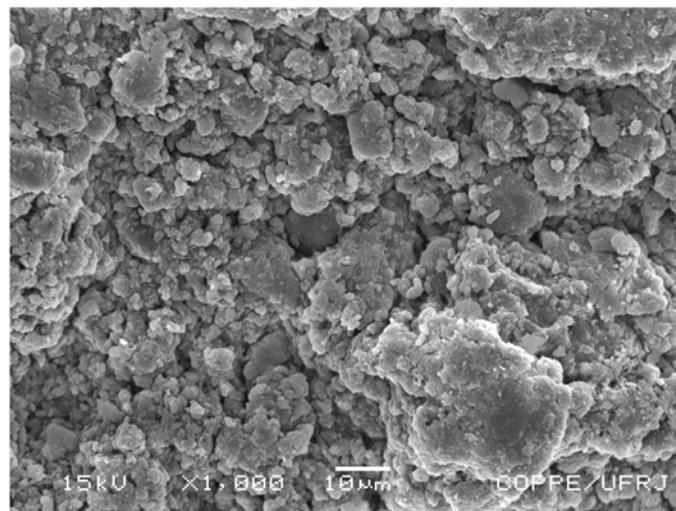
Sem procedimento adicional



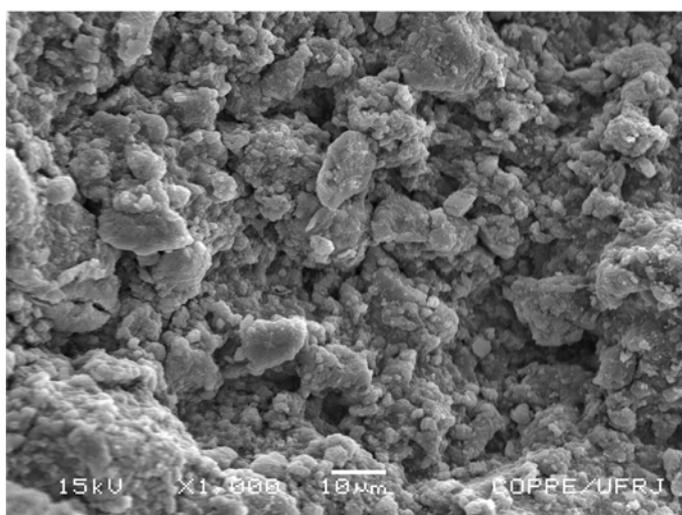
PBS + Álcool 70%



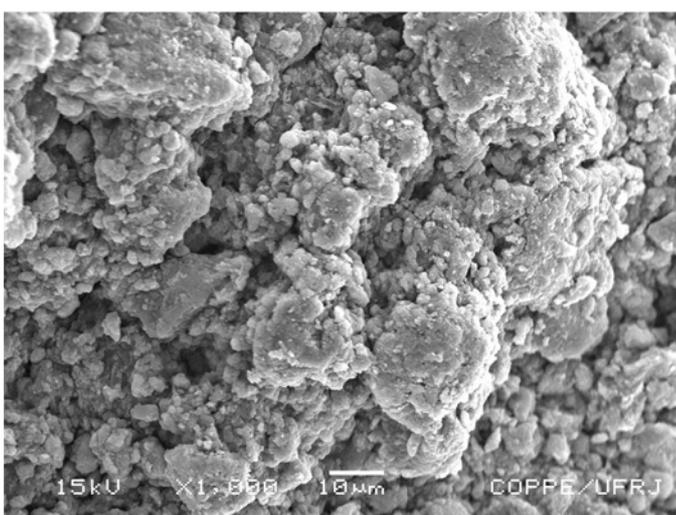
PBS + Álcool 70% + DMEM 1h



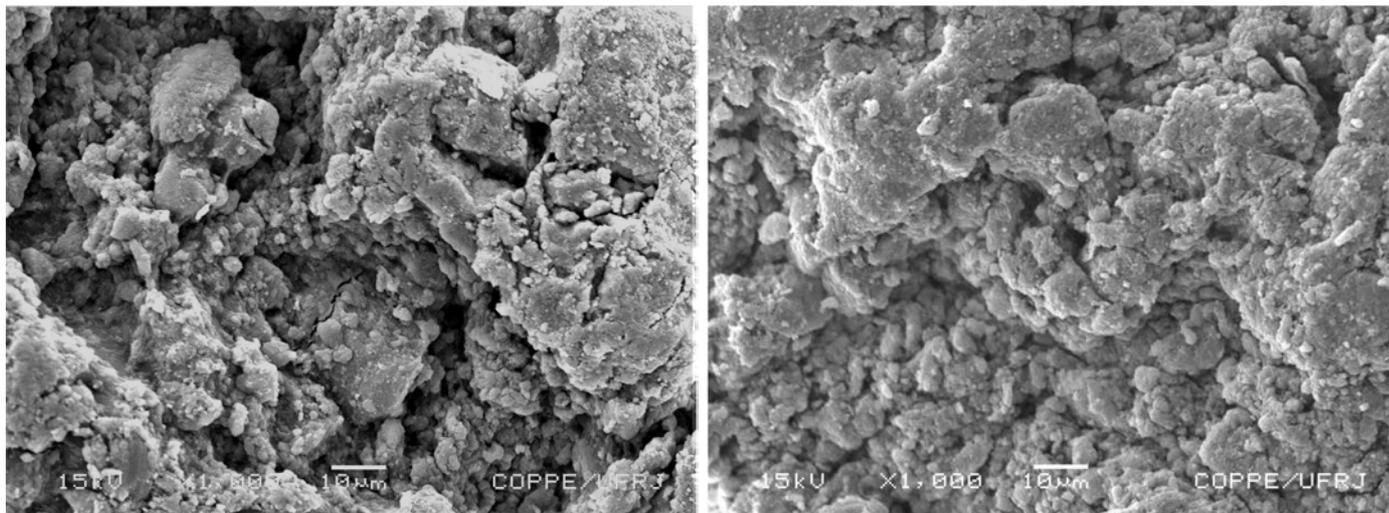
PBS + Álcool 70% + DF 10% 1h



PBS + Álcool 70% + DMEM 4h



PBS + Álcool 70% + DF 10% 4h

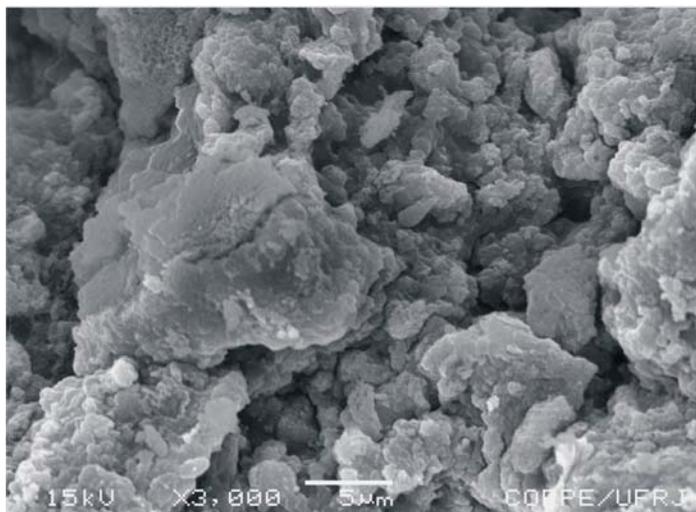


PBS + Álcool 70% + DMEM 24h

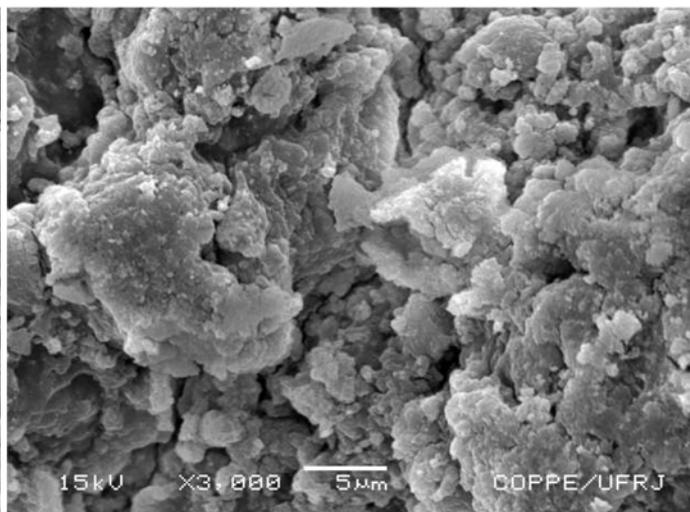
PBS + Álcool 70% + DF 10% 24h

Figura 12-C. Não foram observadas diferenças na superfície do material sob condições de cultura.

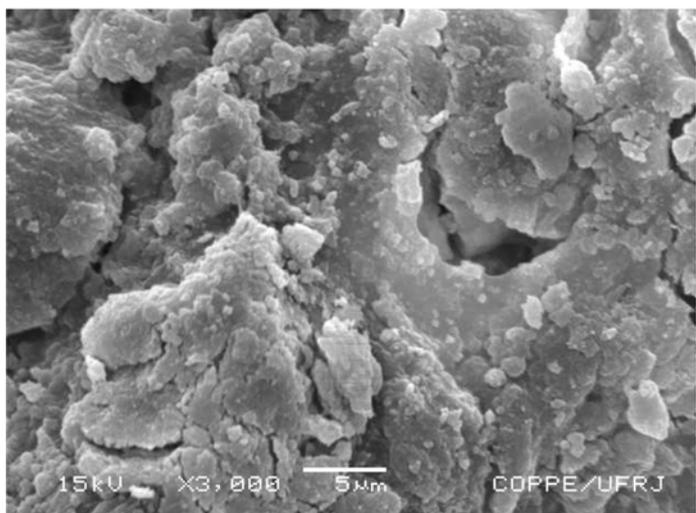
X 3000



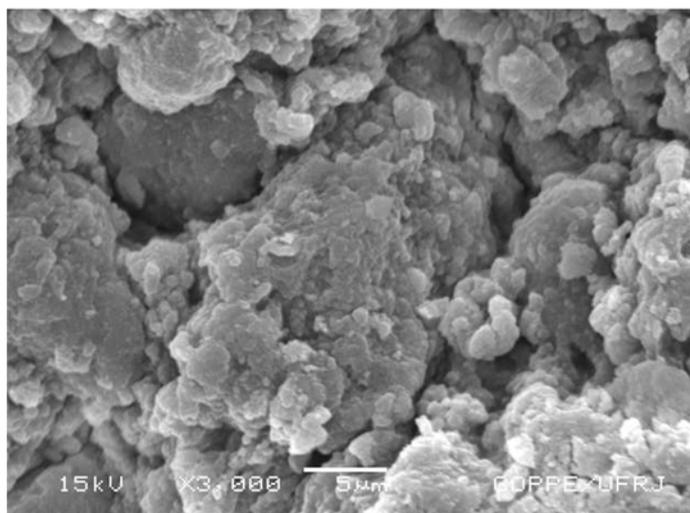
Sem procedimento adicional



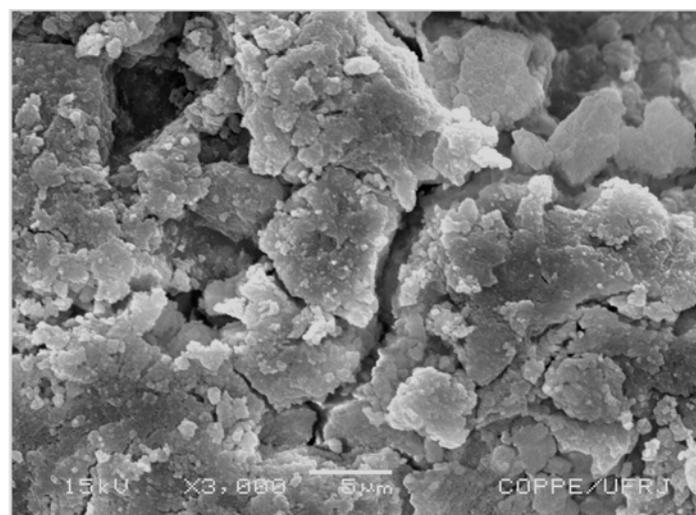
PBS + Álcool 70%



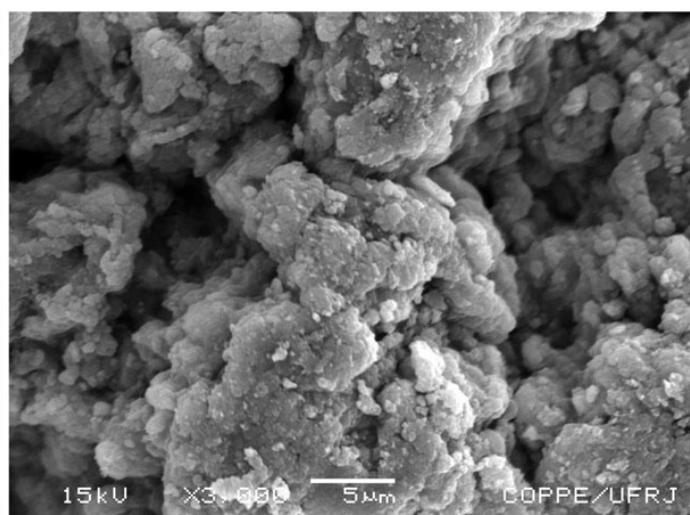
PBS + Álcool 70% + DMEM 1h



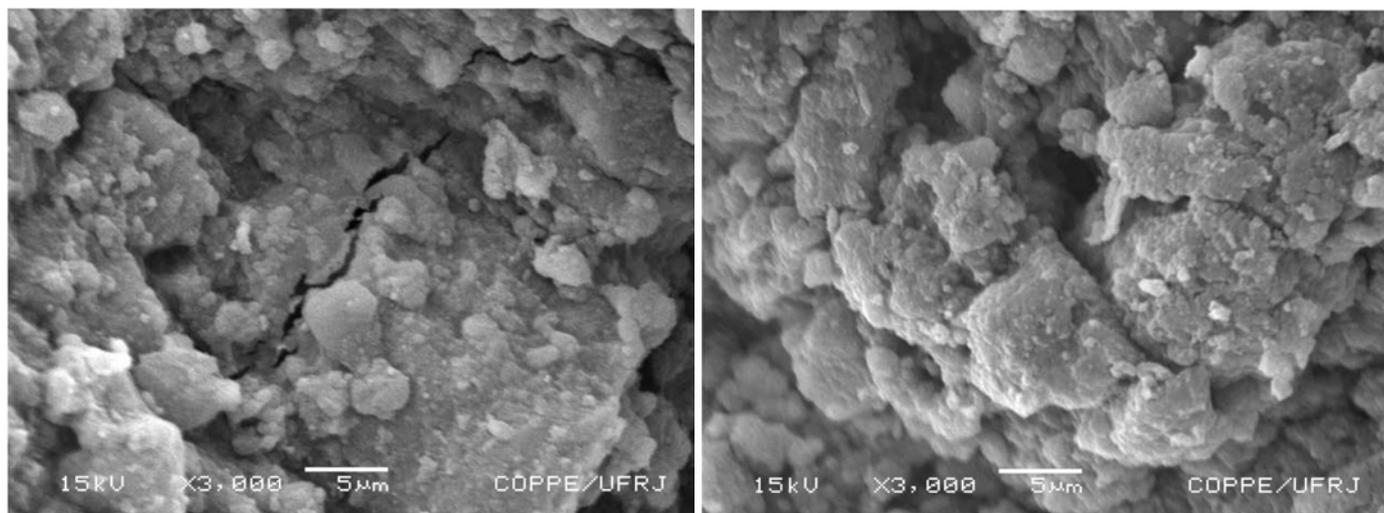
PBS + Álcool 70% + DF 10% 1h



PBS + Álcool 70% + DMEM 4h



PBS + Álcool 70% + DF 10% 4h



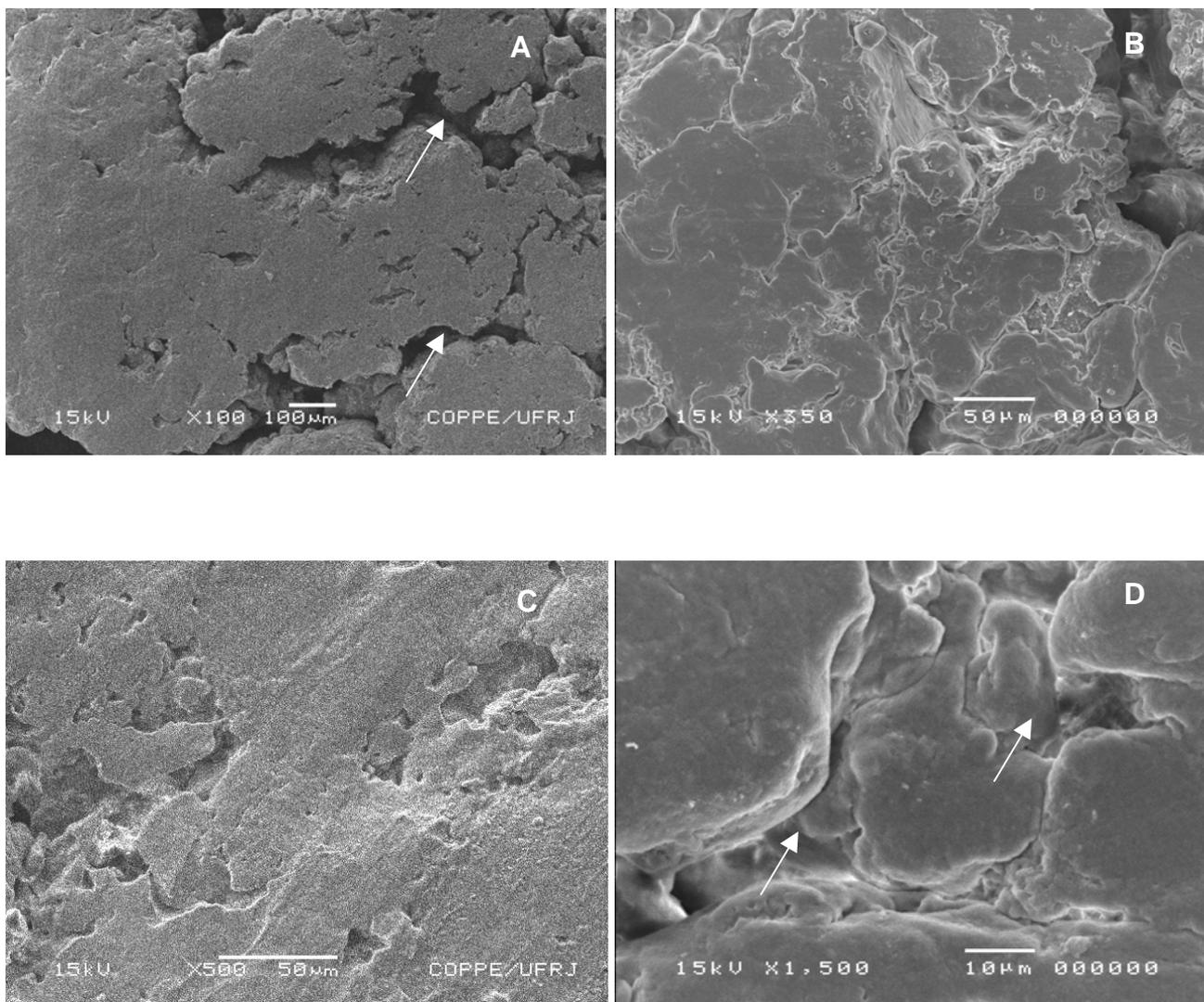
PBS + Álcool 70% + DMEM 24h

PBS + Álcool 70% + DF 10% 24h

Figura 12-D. Nas análises por MEV não foram observadas diferenças na superfície do material sob as condições de cultura.

5.5 Análise da superfície das pastilhas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Análises de MEV permitiram obter a informação de que a mudança no molde do material de esfera para pastilha levou a alterações em sua superfície em contato com o ar (Figura.13 A-E). Esta se apresenta mais lisa, com ausência de contorno em grão, com espaços no material. Enquanto a imersão em meio de cultura de 48h não modificou a textura do compósito (Figura.13-F).



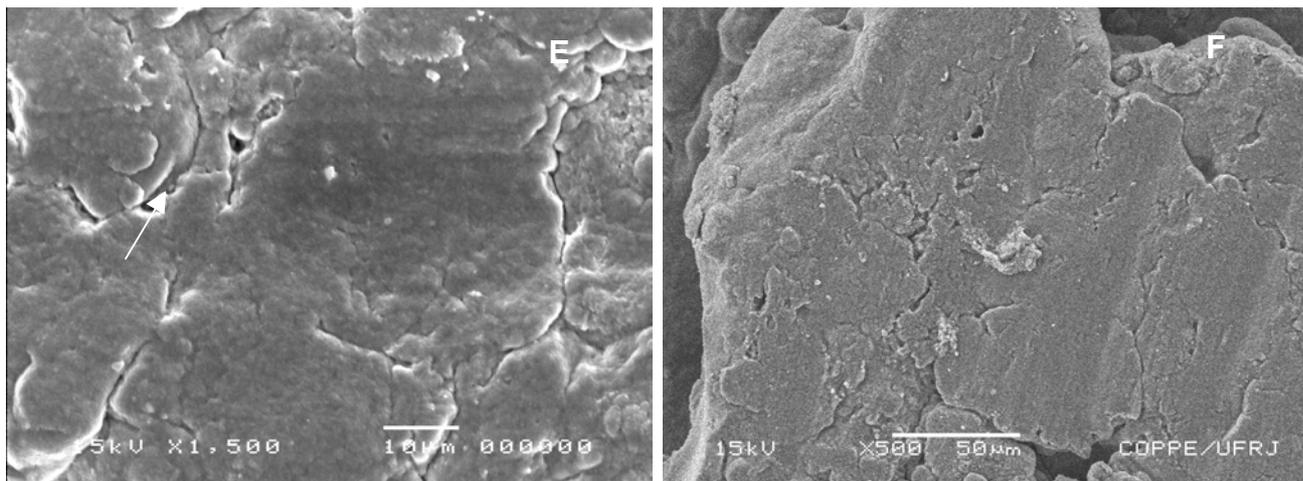


Figura 13. Imagens de MEV mostram que alterações da forma do material resultam em modificações na sua superfície se apresentando mais lisa e com espaços (seta /A-E), o que não acontece quando a imerso em meio de cultura (F).

5.6 Análise da absorção de meio de cultura pelas pastilhas

Análise da absorção de meio de cultura pelas pastilhas teve como resultado aproximadamente 24 % de meio absorvido após 48h de imersão. Já que o peso da pastilha seca foi de 0,29 g e da mergulhada foi de 0,36 g.

5.7 Adesão Celular por MEV: Cultivo de células sobre Pastilhas após 48h

Observou-se que as células aderiram, espraíram e emitiram prolongamentos para as células adjacentes quando cultivadas por 48h em lamínulas (Figura 14 A-C).

Células cultivadas sobre lamínulas/controlé

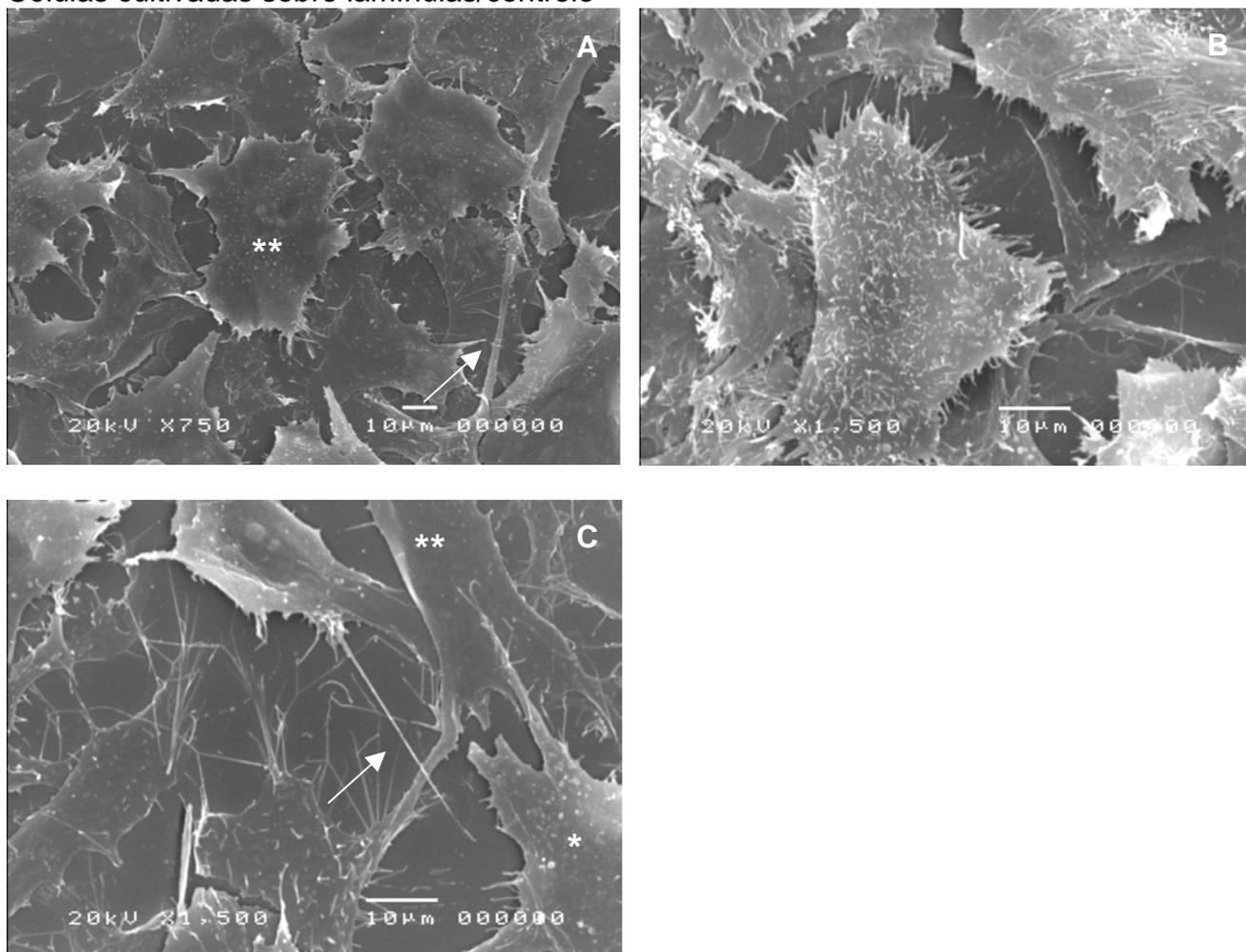
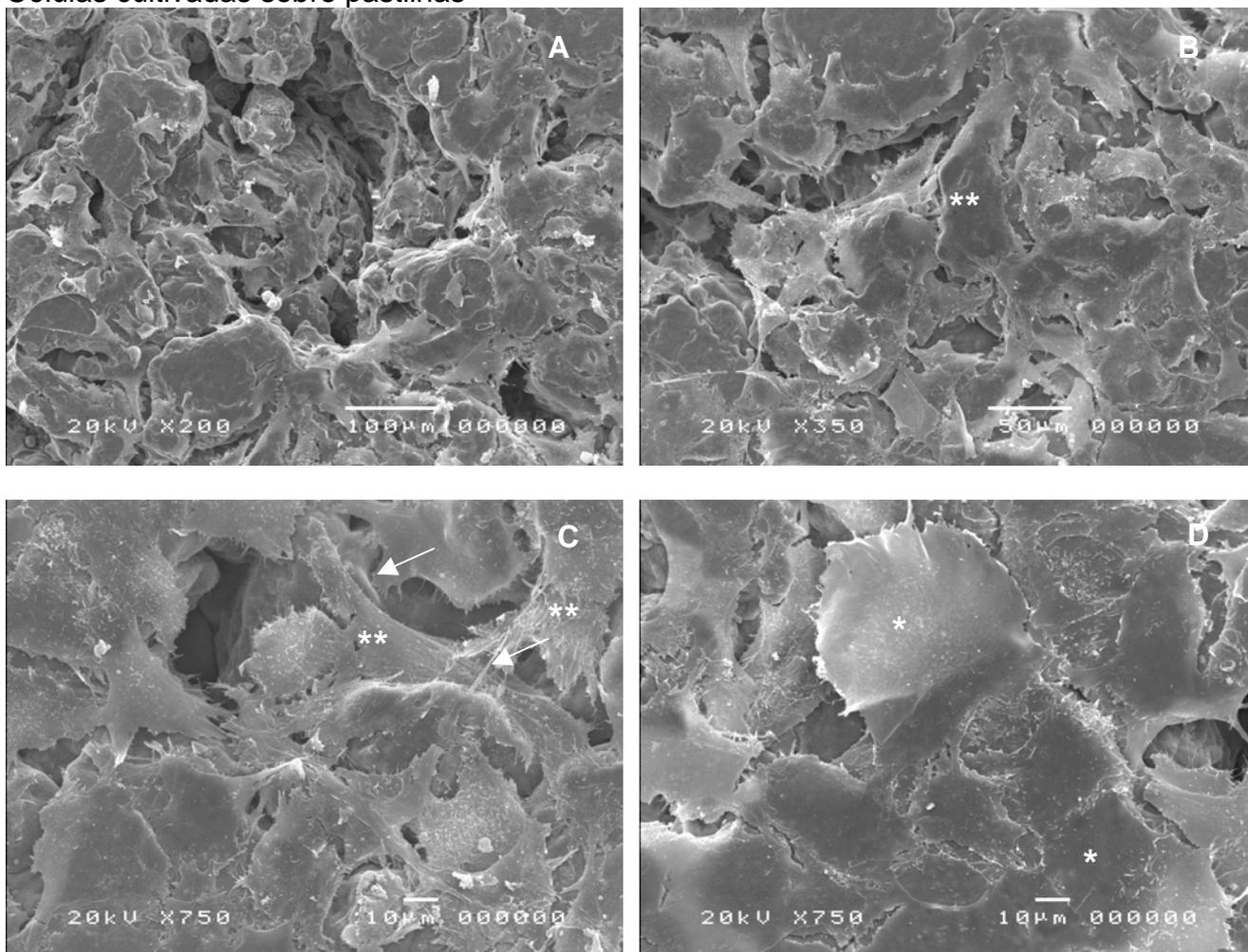


Figura 14. Observou-se a adesão (*), espraimento (**), de A-C, e a emissão de prolongamentos (setas) em 48h de cultura sobre lamínula controle.

Observou-se por MEV que as células cultivadas sobre as pastilhas com 48 h de cultura aderiram ao material. Algumas se apresentaram com morfologia espreada, e de uma maneira geral, com aspecto poligonal típico de osteoblastos. Além de emitirem prolongamentos para células vizinhas (Figura 15 A-E).

Células cultivadas sobre pastilhas



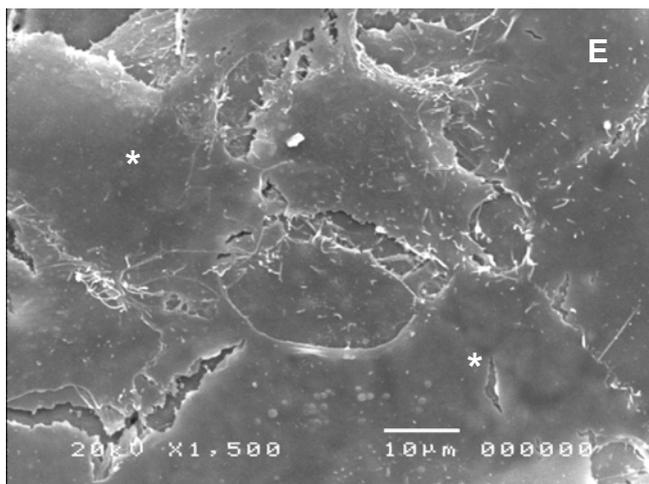
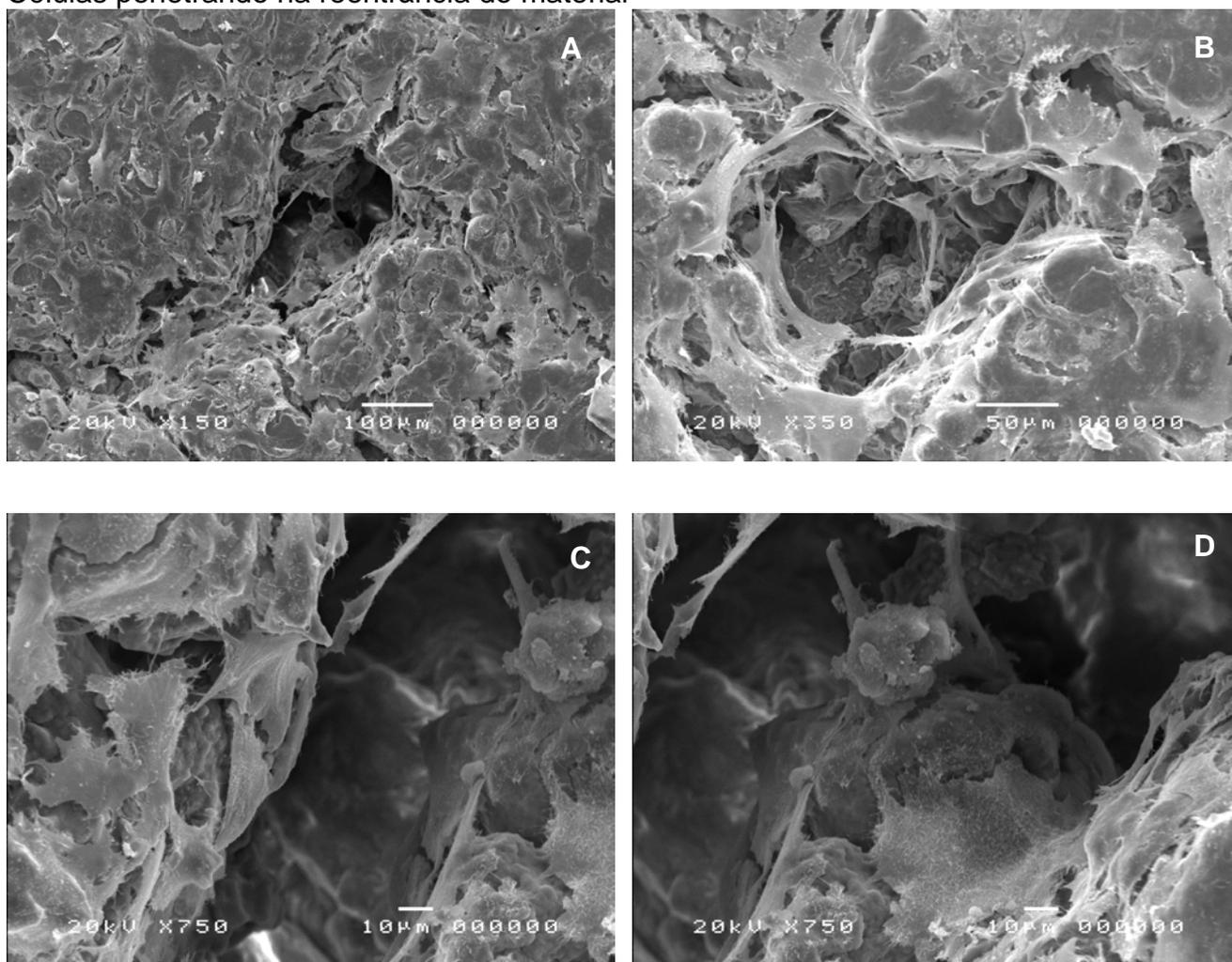


Figura 15. Observou-se que as células aderiram, espraíram (*) apresentaram aspectos poligonais típicos de osteoblastos (**), e emitiram prolongamentos para as adjacentes (setas) em 48h de cultura sobre pastilhas.

Notou-se que as células também aderiram nas reentrâncias do material
(Figura 16 A-E).

Células penetrando na reentrância do material



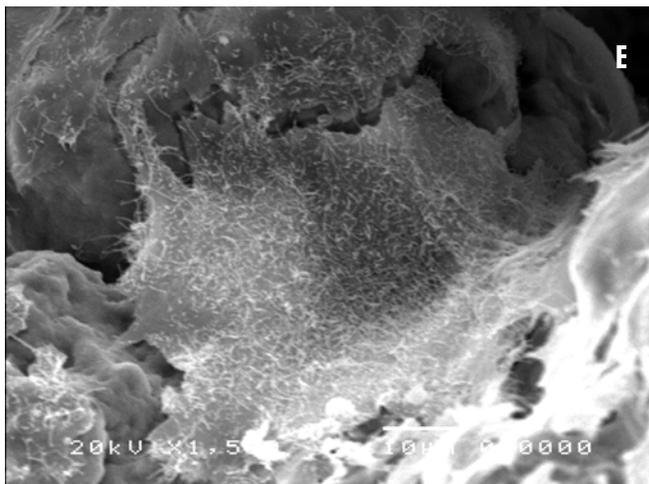


Figura 16. Há migração para reentrância da pastilha. A reentrância em menor aumento (A), células capazes de aderirem no interior da reentrância (B), borda esquerda do orifício (C), na direita (D). Nesta borda observa-se a migração celular (E).

5.8 Ensaio de Proliferação Celular

Ensaio de Adesão e Proliferação Celular de células osteoblásticas sobre as pastilhas demonstraram que no tempo inicial de cultura (4h) grande número de células adsorveu ao material. Após 24h, esse número sofreu uma redução. Passadas 48h as células não adquiriram potencial proliferativo (Gráfico 1 e Figura. 17 A-F).

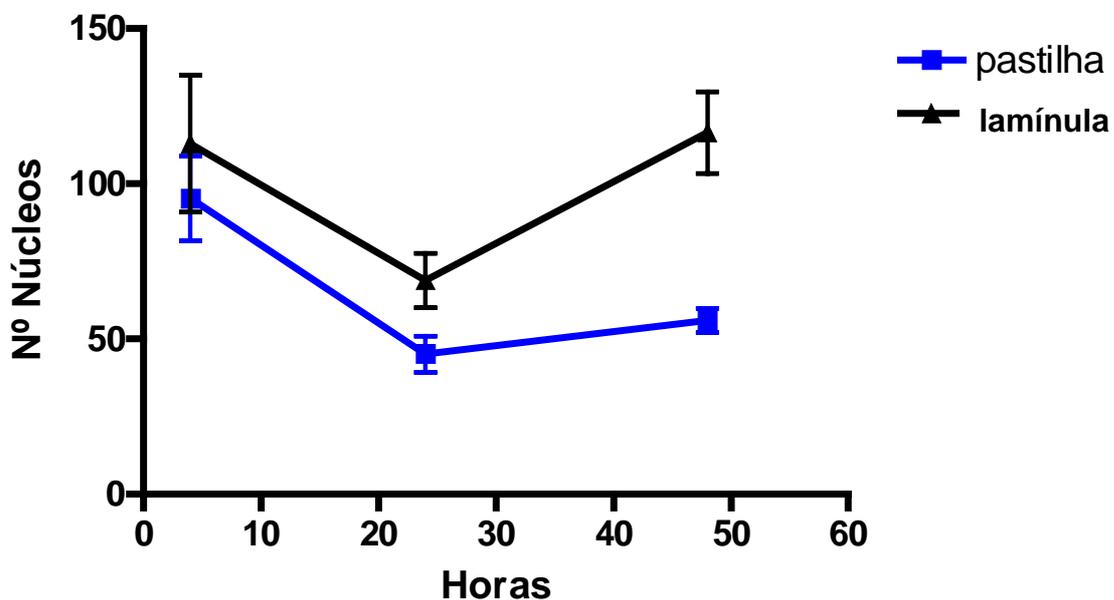


Gráfico1. Número de núcleos (células) quantificadas durante 48h, cultivadas em pastilhas de Alginato e HA, e lamínulas de vidro.

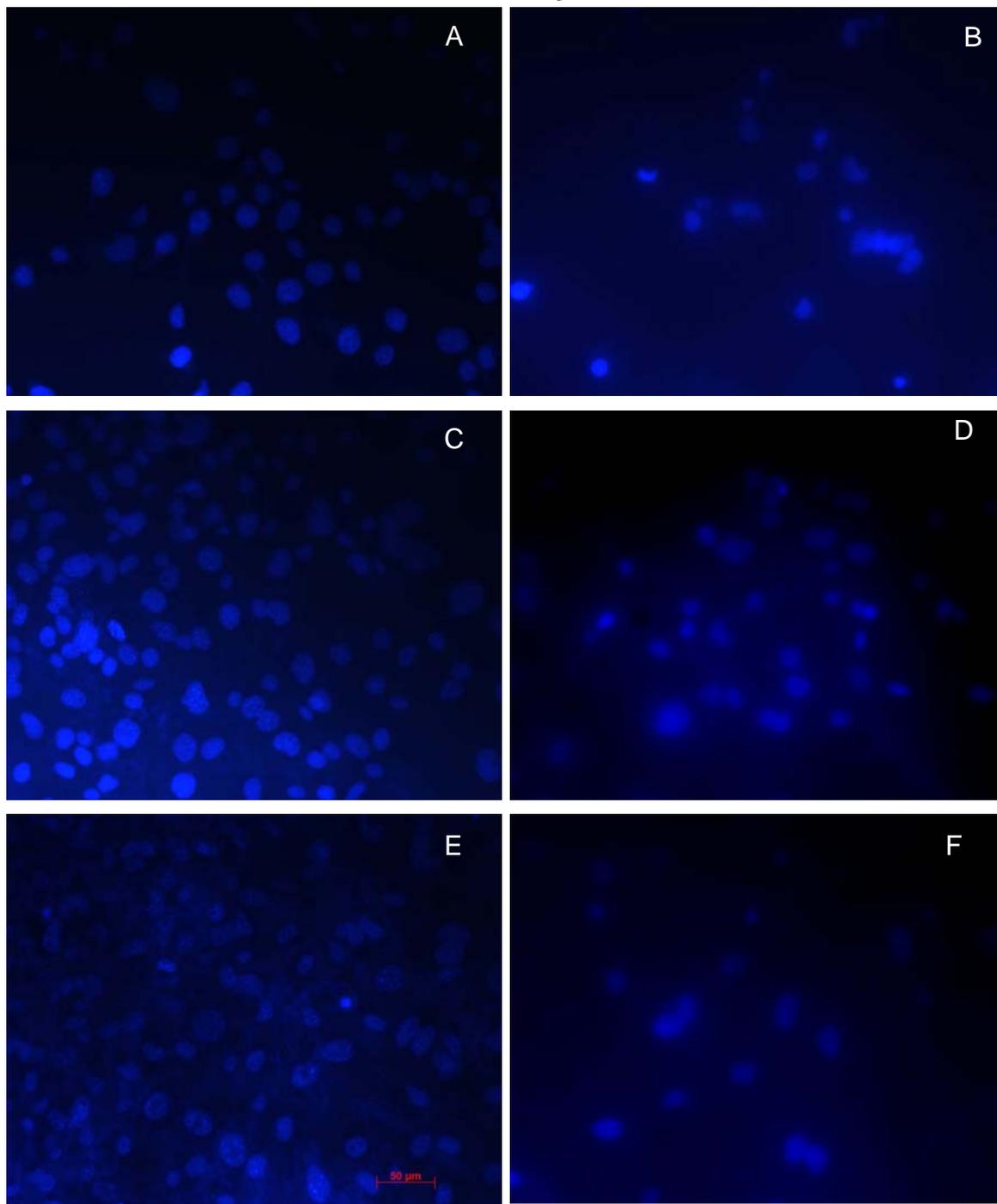
Ensaio de Proliferação Celular

Figura 17. Imagens da marcação nuclear de osteoblastos sobre lamínula/control e sobre pastilhas. Em (A) lamínula e (B) pastilha 4h, (C) lamínula e (D) pastilha 24h, (E) lamínula e (F) pastilha 48h, objetiva 20x/ barra 50 μ m.

5.9 Viabilidade Celular por MTT

Pelo ensaio de viabilidade celular por MTT, observou-se o decréscimo da viabilidade das células cultivadas sobre a pastilha após 48 h (Gráfico 2).

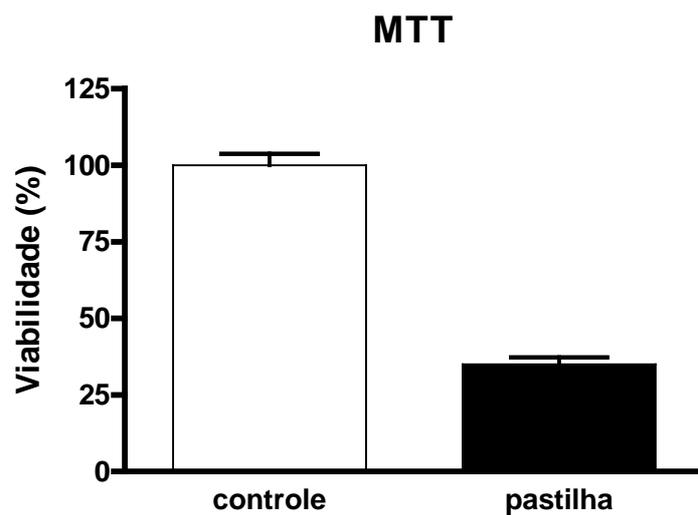


Gráfico 2. Porcentagem de células viáveis durante 48h de cultura, nas amostras controle e sobre pastilhas.

5.10 Imunohistoquímica

Observou-se nos ensaios de imunohistoquímica a expressão da osteopontina bem como α -actina de músculo liso com 24h (Figura. 18 A-D) e 72h de cultura(Figura 19 A-D) na lamínula. Notou-se sobre a pastilha diferenças na expressão desses marcadores pelas células com 24h (Figura 20 A-H) e 72h (Figura 21 A-D).

Lamínula/controle 24h

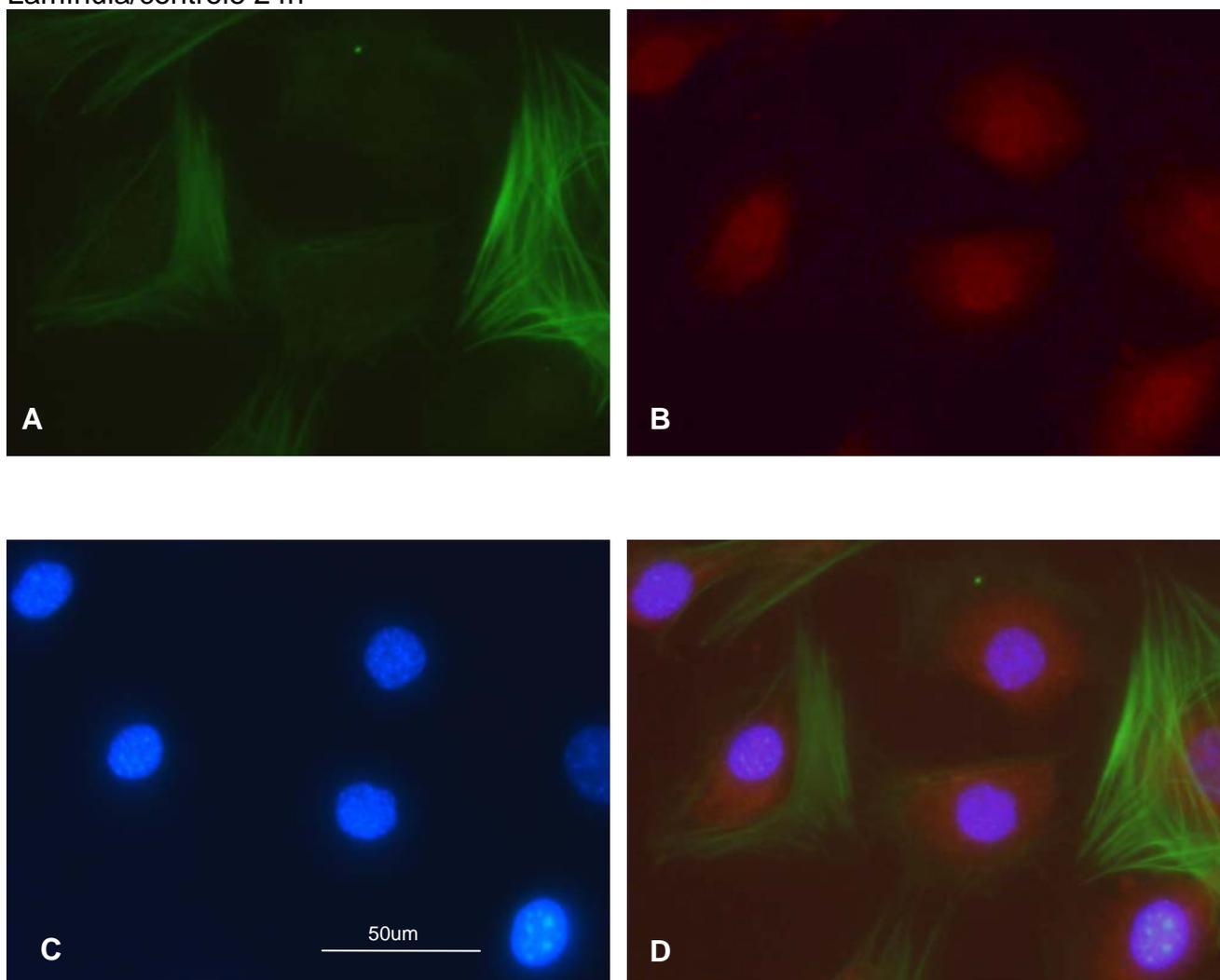
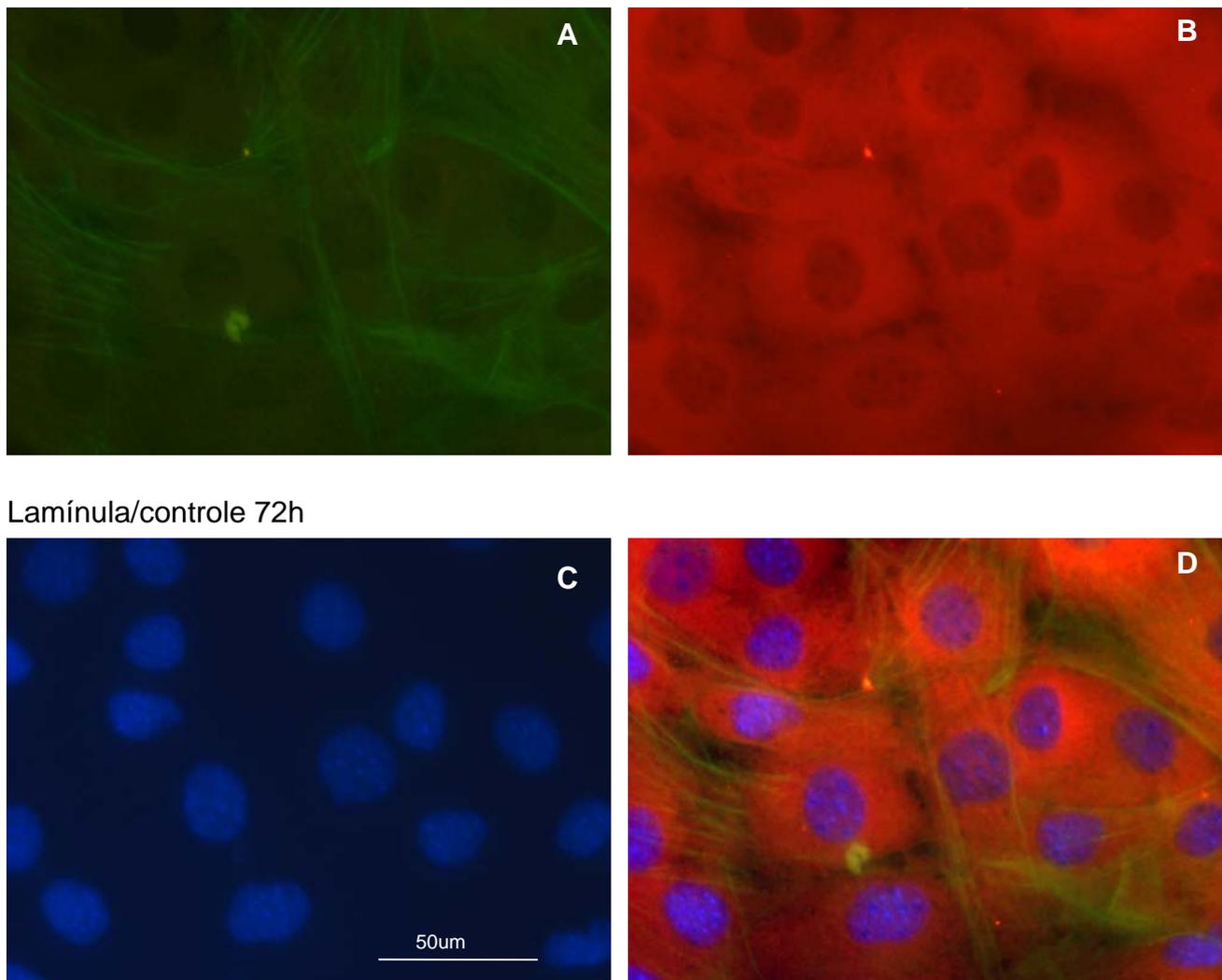
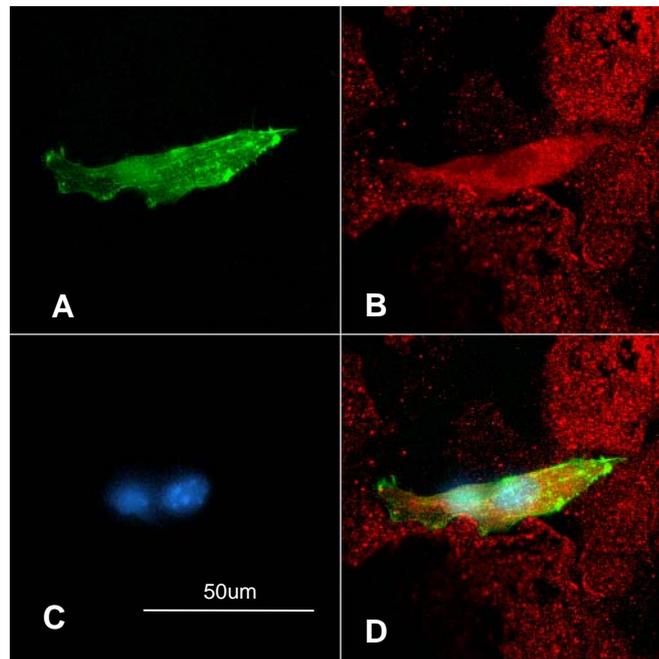


Figura 18. Imagens de Fluorescência confocal demonstram expressões pouco e muito intensas de α -actina de músculo liso(A), pouco intensas de osteopontina (B), marcação nuclear de DAPI (C) e sobreposição das imagens (D) em lamínulas com 24h de cultura.

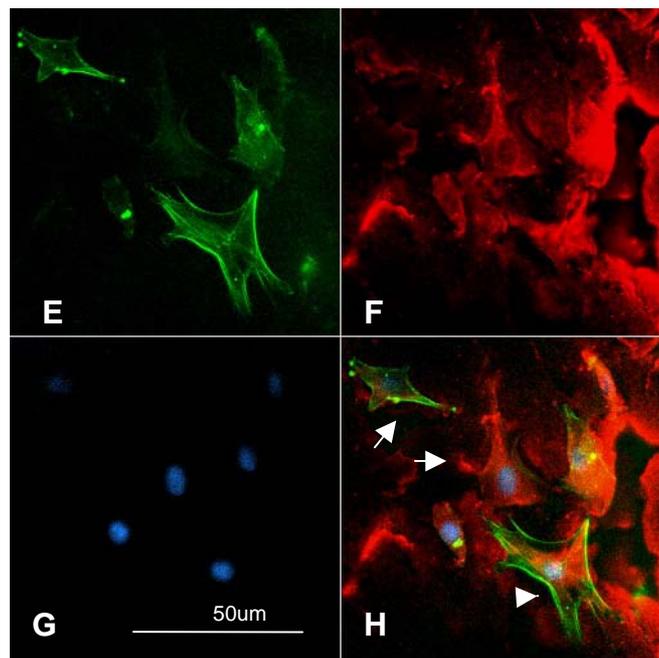


Lamínula/control 72h

Figura 19. Imagens de Fluorescência confocal demonstram expressões pouco intensas de α -actina de músculo liso(A), maiores intensidade de osteopontina (B), marcação nuclear de DAPI (C) e sobreposição das imagens (D) em lamínulas com 72h de cultura.

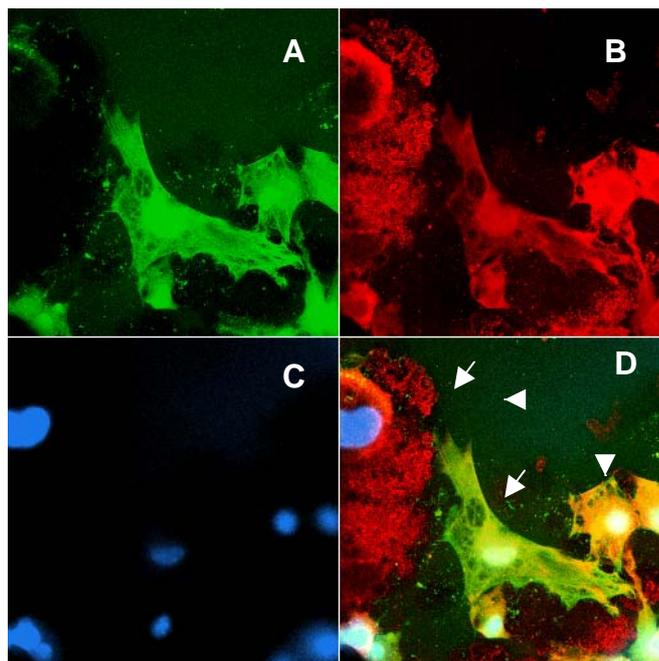


Pastilha 24h



Pastilha 24h

Figura 20. Imagens de Fluorescência confocal demonstram expressões intensas de α -actina de músculo liso (A e E), osteopontina (B e F), marcação nuclear de DAPI (C e G) e sobreposição das imagens (D e H) em pastilhas com 24h de cultura. Observa-se subpopulações que expressam um ou outro marcador (seta), como populações simultaneamente positivas proteínas (ponta da seta).



Pastilha 72h

Figura 21. Imagens de Fluorescência confocal demonstram a expressão de α -actina de músculo liso (A), osteopontina (B), DAPI (C), sobreposição (D) em pastilha de 72 h de cultura. Neste observa-se subpopulações que expressam um ou outro marcador (seta), como populações simultaneamente positivas proteínas (ponta da seta). Objetiva de 40x

6 DISCUSSÃO

Recentemente, a demanda pelo uso de materiais artificiais na área biomédica tem crescido significativamente pelo acesso limitado de autoenxertos bem como pelas respostas imunes e problemas associados à transmissão de doenças dos aloenxertos (Kim *et al.*, 2005; Otkar, 2006).

Materiais bioativos, tais como hidroxiapatita tem-se destacado significativamente entre a nova geração de biomaterias. Para enxertos ósseos estudos demonstram a capacidade osteoindutiva e osteocondutora deste fosfato de cálcio sintético (Storrie & Stupp *et al.*, 2005). Uma propriedade que pode influenciar a habilidade da hidroxiapatita e de outros fosfatos de cálcio de estimularem o crescimento ósseo, é o tamanho do poro. Especificamente ao comparar com microporos (menores que 100 μ m), evidências mostram que cerâmicas, polímeros, metais e compósitos com nanoporos estimulam a atividade do osteoblasto levando a um maior crescimento ósseo (Balasundaram *et al.*, 2006). Estudos sugerem que a nanocristalinidade da HA é encontrada no osso natural e esses cristais em nanoescala mineralizam as fibras de colágeno (Sato *et al.*, 2006).

Alginato é um biopolímero aniônico amplamente utilizado em Bioengenharia Tecidual, pois é biocompatível, hidrofílico e biodegradável sob condições fisiológicas (Li *et al.*, 2005).

Compósitos de nanohidroxiapatita (nanoHA) vêm sendo desenvolvido pela Bioengenharia Tecidual. Dentre esses materiais podemos destacar a nanoHA e colágeno. Porém estudos demonstram limitações quanto a propriedades mecânicas deste fosfato de cálcio (Zhang *et al.*, 2003).

Neste trabalho sugerimos o estudo de biocompósitos de nanoHA e alginato a fim de aprimorarmos as propriedades mecânicas de materiais constituídos deste fosfato de cálcio. Nosso estudo baseia-se na idéia de que o osso possui alguns polissacarídeos em sua composição. E dados da literatura apresentam o alginato como um polissacarídeo utilizado para preenchimento de lesões, sendo biocompatível e ainda apresentando um suporte mecânico satisfatório. Este é notado pela adição de íons divalentes, como o cálcio, na sua estrutura (modelo *egg-box*). Dessa forma, permitiria minimizar as limitações mecânicas de nanoHA (Zhang *et al.*, 2003). Além dessa associação de constituintes evitar a dispersão de partículas de HA no implante (Hsu *et al.*, 1999).

A temperatura de calcinação de nossos testes foi de 1150°C. Estudos relatam que modificações da cristalinidade das biocerâmicas podem ser induzidas pelo processo de sinterização, influenciando assim, o comportamento celular. Este processo leva a um aumento do tamanho do grão e a formação de uma HA densa. Observa-se que grãos individuais são maiores a 1100°C do que a 600°C e 900°C (Rodrigues *et al.*, 2003). Trabalhos realizados com HA sinterizada a 1250°C mostram que não há indução óssea, enquanto que compostos com a mesma composição química, porém com temperatura de sinterização de 1150°C possuem a capacidade de formar osso (Habibovic *et al.*, 2005). Vale ressaltar que dentre os materiais sintetizados, os implantes metálicos apresentam limitações na formação de compósitos submetidos a elevadas temperaturas por se degradarem abaixo de 1000°C (Wein *et al.*, 2005).

É importante notar que não há estudos de materiais nas condições de produção exatamente iguais as que foram empregadas neste trabalho.

Os biocompósitos em forma de esferas são produzidos a fim de serem utilizados como materiais de preenchimento de áreas lesionadas (Ribeiro *et al.*, 2004). Em nossas observações quanto à caracterização de esferas calcinadas, observou-se pelas imagens de MEV que a superfície do material apresenta contornos de grão. Notou-se a junção dos cristais de HA nanométrica e espaços formados pela perda do alginato sob condições de elevada temperatura. As superfícies externa e interna apresentam-se semelhantes. Análises por MET demonstram que o material não é totalmente compacto. Além de apresentar espaços sem arranjo geométrico entre os cristais que cresceram e se uniram. Descartando assim, a possibilidade destes espaços serem formados por cristais desprendidos. As faces dos cristais são determinadas pelo seu vizinho. Para esferas não calcinadas observaram-se pelas imagens de MEV semelhanças entre a textura externa e interna do material. Presença de uma superfície compacta, com ausência de orifícios na região. Pela MET nota-se uma mistura heterogênea de cristais em forma de espículas ou não com comprimentos distintos. Dados da difração de elétrons da esfera de alginato e HA para amostras não calcinadas mostraram ausência de anéis que sugerem uma região com poucos cristais. Os anéis indicados pelas setas possuem distâncias entre os planos cristalinos compatíveis com a da hidroxiapatita padrão. O resultado não se altera para esferas calcinadas visto que a perda de material orgânico não altera a HA. Este dado está de acordo com os estudos onde foram testadas diferentes concentrações de alginato em presença de tricálcio fosfato. Observou-se neste trabalho que o alginato não alterava significativamente os cristais deste fosfato de cálcio (Ribeiro *et al.*, 2004).

As Biomembranas desenvolvidas visam futuras aplicações como isolantes de um sítio de atuação de osteoblastos atraídos pela HA; evitando assim a formação de tecido fibroso com perda de sua capacidade funcional no local de formação óssea. Este material possui gelatina em sua composição. Sabe-se que esta é largamente utilizada para curativos de feridas como adesivos na clínica médica, pois apresenta uma boa viabilidade celular e não apresenta antigenicidade (Kim *et al.*, 2005). Para caracterização de biomembranas observou-se pelas imagens de MEV a presença de fases diferentes do material, onde a HA não se misturam bem aos constituintes do material. Formou-se uma fase rica em HA que se segregou do material particulado. Pela MET observamos a presença de fases diferentes do material. Formou-se uma fase rica em HA que se manteve separada das partículas de alginato, formando um meio não homogêneo. Os cristais de HA apresentaram semelhanças.

Foram analisadas as possíveis alterações das superfícies das esferas de alginato e hidroxiapatita calcinadas a 1150°C diante das condições necessárias para realização da cultura de células. Imagens de MEV demonstraram que a superfície do material não sofre alteração. Portanto, as condições de cultura não implicam na alteração da superfície. Durante este trabalho, foram selecionados para os testes iniciais com cultura de células os compósitos de esferas. Porém, diante das dificuldades de manipulação destes nos ensaios, mudamos a forma de produção para pastilhas. Imagens de MEV do material sob a forma de pastilha demonstraram que a mudança de forma de esferas calcinadas para pastilhas leva a diferenças na textura. Estas se apresentaram sem aspectos de grãos. As que foram imersas em meio de cultura por 48h reafirmam os testes realizados neste

estudo com as esferas, onde notou-se que este meio não alterou a superfície da cerâmica.

Avaliou-se a capacidade de absorção de meio de cultura pelas pastilhas que teve como resultado aproximadamente 24 % de meio absorvido após 48h de imersão. Este dado sugere a capacidade hidrofílica do material e de absorver substâncias solúveis do meio circundante.

Para materiais ortopédicos torna-se essencial determinar sua interação com células formadoras de tecido ósseo (Zhang *et al.*, 2003). Estudos *in vitro* utilizando cultura de células desempenham um importante papel no desenvolvimento de novos materiais bioativos (Olmo *et al.*, 2003). Realizaram-se ensaios *in vitro* com cultivo de osteoblastos de murinos sobre as pastilhas. Imagens de MEV demonstram que as células cultivadas sobre as pastilhas com 48 h de cultivo aderiram ao material. Algumas se apresentaram espreiadas, mas de uma maneira geral, apresentaram aspecto poligonal típico de osteoblastos. Além disso, formaram prolongamentos tornando possível o contato com a célula vizinha. Observou-se que as células também migraram para reentrâncias contidas da superfície do compósito. Vale ressaltar que as células se apresentaram com uma população relativamente maior comparada com os espaços observados entre elas na lamínula controle. Estes dados estão de acordo com o trabalho de Kim e cols, (2005), onde as células apresentaram uma adesão maior em nanocompósitos do que em materiais de dimensões micrométricas após 48 h de cultura.

Foram avaliadas os estágios iniciais de adesão e proliferação de células osteoblásticas sobre as pastilhas durante 4h, 24h e 48h. Para isto, os núcleos celulares foram marcados com bisbenzimidá. Observou-se que no tempo inicial

de cultura (4h) um grande número de células aderiu ao material. Após 24 h, esse número sofre uma redução provavelmente pelo fato de já estarem se diferenciando. Nesse tempo as células atingem cerca da metade do número inicial, aspecto observado tanto na contagem de núcleos como no ensaio de viabilidade celular.

A alta biocompatibilidade dos materiais pode ser demonstrada não somente pela boa morfologia celular de osteoblastos aderidos como também pela alta resposta aos ensaios de MTT (Zhang *et al.*, 2003). Nosso estudo demonstrou que os osteoblastos foram capazes de se aderir ao biomaterial e apresentar a expressão de proteínas existentes em osteoblastos. O cultivo deste tipo celular sobre o biomaterial em teste demonstrou que, diferentemente ao que é visto nas culturas de osteoblastos em lamínulas, o cultivo tridimensional levou provavelmente ao aparecimento de subpopulações que expressam diferencialmente os dois marcadores testados.

Sabe-se que osteoblastos possuem a capacidade de se contraírem o que pode facilitar seu controle sobre a microarquitetura da matriz óssea, inclusive das interfaces de implantes. Esse comportamento contrátil pode interferir nos poros das matrizes utilizadas pela Engenharia Tecidual alterando assim a forma do implante (Menard *et al.*, 2000). Estudos de explantes ósseos humanos para expressão de α -actina de músculo liso relatam que osteoblastos podem expressar genes para α -actina de músculo liso. Esta expressão pode ser considerada uma característica fenotípica deste tipo celular adquirida dos seus progenitores (Kinner *et al.*, 2002). *In vitro*, o nível de α -actina de músculo liso aumenta sobre matrizes rígidas. Este marcador também é expresso em células contráteis como miofibroblastos (Gabbiani, 1998).

A expressão de proteínas da matriz *in vitro* é correlacionada com a aquisição da maturação do fenótipo de osteoblastos. A osteopontina atinge picos de expressão durante a mineralização. É expressa no início da seqüência de diferenciação de osteoblastos. Portanto, células osteopontina positivas podem compreender a pré-osteoblastos a osteoblastos diferenciados. Sendo alta neste estágio de diferenciação. A marcação desta proteína no citoplasma é importante por identificar osteoblastos ativos (De oliveira *et al.*, 2003). Esta proteína de matriz atua como uma reguladora do crescimento dos cristais da hidroxiapatita (Giachelli & Steitz *et al.*, 2000; De oliveira *et al.*, 2003). Neste estudo, observou-se que as células cultivadas sobre as lamínulas controle após 24h expressaram osteopontina de forma pouco intensa, enquanto que a α -actina de músculo liso se apresentou ora com intensidade maior ou menor nas células. Após 72h, houve aumento da expressão de osteopontina e uma diminuição da expressão de α -actina de músculo liso. Possivelmente esta mudança na intensidade de expressão dos marcadores esteja refletindo a diferenciação deste tipo celular com o aumento do tempo de cultura. Esses dados estão de acordo com os estudos de Balduino e cols. (2005), onde células osteoblásticas apresentaram marcação para esta proteína como uma população de osteoblastos maduros. Entretanto, sobre pastilhas de HA e alginato por 24 h e 72 h , observou-se que um grupo de células expressava somente α -actina de músculo liso, ou somente osteopontina, havendo também células que co-expressavam essas proteínas. Sendo assim, as células cultivadas sobre o material testado constituíram subpopulações celulares. Desta forma, o material testado é capaz de permitir a adesão e diferenciação de osteoblastos sobre pastilha. Logo, é um novo material proposto com uma possível utilização pela Bioengenharia Tecidual.

7 CONCLUSÕES

- Há diferenças na superfície de materiais calcinados e os que não foram submetidos a elevadas temperaturas. O primeiro apresentou contornos em grão e o segundo apresentou compactação. Para biomembranas a HA não se misturou bem ao alginato e gelatina.

- Dados de difração mostraram que as esferas não calcinadas possuem distâncias entre os planos cristalinos compatíveis com a da hidroxiapatita padrão. O resultado não se altera para esferas calcinadas visto que a perda de material orgânico não altera a HA.

- A exposição dos compósitos às condições de cultura de células não alterou a textura de suas superfícies.

- A cerâmica testada *in vitro* é capaz de absorver meio de cultura em seu interior

- Moldes diferentes dos bicompositos levam a mudanças na sua textura.

- As células aderiram ao material, se apresentando com morfologia poligonal típica de osteoblastos, além de algumas estarem espalhadas e com capacidade de migração para reentrâncias observadas na estrutura do biocomposito. Porém, perderam a capacidade proliferativa, bem como apresentaram baixa viabilidade celular em 48h de cultura celular.

- Osteoblastos páram de proliferar para se diferenciarem. Sobre as pastilhas se subdividem quanto a expressão de marcadores de diferenciação celular tais como α -actina de músculo liso e osteopontina em um tempo maior de cultura quando cultivados no biomaterial..

Sendo assim, testes adicionais são necessários em períodos mais longos de estudo a fim de complementar as avaliações iniciais de biocerâmicas realizados neste trabalho. Estes dados estão de acordo com estudos que mostram que nanoHA e alginatos apresentam condições favoráveis a células, permitindo assim a interação entre as mesmas e as pastilhas. Portanto, é um novo material com potencial aplicabilidade em Bioengenharia Óssea

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anselme, K. Osteoblast adhesion on biomaterials. **Biomaterials**, v. 21, p.667-681, 2000.

Anselme, K.; Bigerelle M.; Dufresne, E.; Judas, D., Hardouin, P. Qualitative and quantitative study of human osteoblast adhesion on materials with various surface roughness. **J. Biomed Mater Res**, v-49, n-2, p. 155-166, 2000.

Balasundaram, G., Sato, M., Webster, T.J. Using Hydroxyapatite nanoparticles and decrease cristallinity to promote osteoblast adhesion similar to functionalizing with RGD, **Biomaterials**, v-27, p.2798-2805, 2006.

Balduino, A., Hurtado, S.P., Frazão, P., Takiya, C.M., Alves, L.

M., Nasciutti, L.E., EL-Cheikh, M.C., Borojevic, R. Bone marrow subendosteal microenvironment harbours functionally distinct haemosupportive stromal cell populations. **Cell Tissue Res**, v-319, p.255-266, 2005.

Baxter, L.C.; Franchiger, V.; Textor, M. Fibroblast and osteoblast adhesion and morphology on calcium phosphate surfaces. **European Cells and Materials**, v-4, p. 1-17, 2002.

. Bilezikian, J.P., Raisz, L.G.; Rodan, G.A. **THE OSTEOLAST LINEAGE: Principles of Bone Biology**; Academic Press, San Diego, CA, USA, p. 51-53, 1996.

- Boyan, B.D.; Hummert, T.W.; Dean, D.D.; Schwartz, Z. Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. **Biomaterials**, v-17, n.2, p.137-146,1996.
- Boyle, W.J.; Simonet, W.S.; Lacey, D.L. Osteoclast differentiation and activation. **Nature**, v-423,p.337-342, 2003.
- Burg, K.; Porter, S.; Kellam F.J. Biomaterial developments for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v-21, p.2347-2359, 2000.
- Cancedda, R.; Dozin B.; Giannoni, P.; Quarto, R. Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone. **Matrix Biology**. v-22, p.81-91, 2003.
- Canfield, A.E.; Doherty, M.J.; Ashoton, B.A. **OSTEOGENIC PONTENCIAL OF VASCULAR PERICYTES**, p.146.In: J.DAVIES. BONE ENGINEERING; Toronto, Canadá. J. DAVIES (ed),2000.
- Chang, B.; Lee C.; Hong K.; Youn H.; Ryu H.; Chung, S.; Park K. Osteoconduction at porous hydroxiapatite with various pore configuration. **Biomaterials**, v-21, p. 1291-1298, 2000.
- Davies, J. **MOLECULAR REGULATION OF OSTEOGENESIS**. p.31-34 In: J.DAVIES. BONE ENGINEERING; Toronto, Canadá. J. DAVIES (ed),2000.
- De oliveira, P.T.; Zalzal, S.F.; Irie, K.; Nanci, A. Early Expression of Bone Matrix Proteins in Osteogenic Cell Cultures. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v-51, p.633-641,2003.
- Declercq,H.; Vreken, N.; Maeyer, E.; Verbeeck, R., Schacht, E.; Ridder, L.; Cornelissen, M. Isolation, proliferation and differentiation of osteoblastic cells

to study cell/biomaterial interactions: comparison of different isolation techniques and source. **Biomaterials**, v-25, p.757-768, 2004.

Deligianni, D.D.; Katsala, N.D.; Koutsoukos, P.; Missirlis, Y.F. Effect of surface roughness of hydroxyapatite on human bone marrow cell adhesion, proliferation, differentiation and detachment strength. **Biomaterial**, v-22, p.87-96, 2001.

Dorozhkin S.V.; Epple, M. Biological and Medical Significance of calcium phosphates. **Angew Chem.Int.Ed**, v-41 p.3130-3146, 2002.

Draget, K.I.; Skajak-Braek,G.; Smindsrod,O Alginate based new materials, **International Journal of Biological Macromolecules**, v-21, p.47-55, 1997.

Drury, J.L., Mooney, D.J. Hydrogels for tissue engineering scaffolds design variables and application. **Biomaterials**, v-24, p. 4337-4351, 2003.

Ducy, P.; Schinke, T; Karsenty, G. The Osteoblast: A Sophisticated Fibroblast under Central Surveillance. **The American Association for the Advancement of Science**, v.289, n°. 5484, p.1501-1504, 2000.

Ehara, A.; Ogata, K.; Imazato, S.; Ebisu, S.; Nakano, T.; Umakoshi, Y. Effects of TCP and TetCP on MC3T3-E1 proliferation, differentiation and mineralization. **Biomaterials**, v-24, p.831-836, 2003.

Fernandes, R. M.H. Mecanismos de regulação do Metabolismo Ósseo, **Acta Médica Portuguesa**, v-11, p. 41-52, 1998.

Gabbiani,G.Evolution and clinical implications of the myofibroblast concept.**Cardiovascular Research**, v-38, p.545-548,1998.

Giachelli, C.M., Steitz, S. Osteopontin: a versatile regulator of inflammation and biomineralization.**Matrix Biology**, v-19 p.615-622, 2000.

Globus, R.K.; Doty, S.B.; Lull, J.C.; HOLMUHAMEDOV E. Fibrinectin is a survival factor for differentiated osteoblasts. **Journal of Cell Science**, v-111, p.1385-1393, 1998.

Habibovic, P., Yuan,H.,Van der valk, C.M., Meijer, G., Blitterswijk, C.A., Groot, K. 3D Microenviroment as essential element for osteoinduction by biomaterials.**Biomaterials**, v-26, p.3565-3575, 2005.

Hernandez,C.J., Majeska R.J,Schaffler M.B. Osteocyte density in woven bone, **Bone**,2004, in press.

Hilwig,I., Gropp, A. pH dependent fluorescence of DNA and RNA in cytologicstaining with "33258 Hoesht". **Exptl Cell Res**, v-91,p.457-460, 1975.

Hsu, F.Y.,Chuch, S.C.,Wang, Y.J.Microspheres of hydroxyapatite/reconstituted collagen as supports for osteoblast cell growth.**Biomaterials**, v-20, p.1931-6, 1999.

<http://www.cbceram.org.br>

<http://fmcbiopolymer.com>

Junqueira C.L., Carneiro J. **HISTOLOGIA BÁSICA**. 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,p.112, 1999.

Katchburian, E.; Arana, V. **HISTOLOGIA E EMBRIOLOGIA ORAL**. São Paulo: Panamericana, p.23-37, 1999.

Kawachi, Y.E.; Bertran A.C.; Reis, R.R.; Alves L.O. Biocerâmicas: Tendências e Perspectivas de uma Área Interdisciplinar. **Química Nova**, nº. 23, v-4, 2000.

Kierszenbaum, A.L. **HISTOLOGY AND CELL BIOLOGY: AN INTRODUCTION TO PATHOLOGY**. Toronto, Canadá: Mosby,p.119,2002.

Kierszenbaum, A.L. **HISTOLOGY AND CELL BIOLOGY AN INTRODUCTION TO PATHOLOGY**. Ed. Mosby ,p.130-135,2002.

Kim, S.; Park,M.S.; Jeon, O.; Choi, C.Y.; Kim, B. Poly (lactide-co-glycolide)/hydroxiapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v-27, p.1399-1409, 2006.

Kim, H.; KIM H.; Salih, D. Stimulation of osteoblast responses to biomimetic nanocomposites of gelatin-hydroxyapatite for tissue engineering scaffolds. **Biomaterials**, v-26, p. 5221-5230, 2005.

Kinner, B.Spector, M. Expression of smooth muscle actin in osteoblast in human bone.**Journal of Orthopedic Research**,v-20(3), p.622-32, 2002.

Kronenberg, H.M. Developmental regulation of growth plate. **Nature**,v-423, p.332-336, 2003.

- Laurecin, C.T.; Lu, H.H. **POLYMER-CERAMIC COMPOSITES FOR BONE-TISSUE ENGINEERING**. p.464 e 465 In: J.DAVIES. BONE ENGINEERING; Toronto, Canadá. J. DAVIES (ed),2000.
- Li, Z., RAMAY, H.R., Hauch,K.D., Xiao,D., Zhang,M. Chitosan-Alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v-26,p.3919-3928,2005.
- Lu, J.X.; Flautre, B.; Anselme, K.; Hardouin, P; Gallur, A.; Descamps, B.; Thierry, B. Role of interconnections in porous bioceramics on bone recolonization in vitro and in vivo. **Journal of Material Science: Material Medicine**, v-10, p.111-120, 1999.
- Mackie, E.J. Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture. **The internacional Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v-35, p.1301-1305, 2003.
- Manjubala I.; Woesz A.; Pilz C.;Rumpler, M.; Fratzl-zelman, N.; Roschger, P; Stampfl, J.; Fratzl,P. Biomimetic mineral-organic composite scaffolds with controlled internal architecture. **Journal of Materials Science in Medicine** ,v-16, p.1111-1119;2005.
- Marijnissen, W.J.C.M, VAN OSCH, G.J.V.M..**Biomaterials**, v-23, p.1511, 2002.
- Marks S.C., J.R.; Hermey D.C. **THE STRUCTURE AND DEVELOPMENT OF BONE** In: J.PBILEZIKIAN, L.G. RAISZ, G.A. RODAN (eds) PRINCIPLES OF BONE BIOLOGY.; San Diego: Academic Press, p. 3-5,1996.
- Maruyama, M.**Jounal Biomedical Materials**, Researchers, v-29,p.683,1995.

- Matsuzaka, K.; Walboomers, X.F.; Yoshinari, M.; Inoue, T.; Jansen, J.A. The attachment and growth behavior of osteoblast-like cells on microtextured surfaces. **Biomaterials**, v-24, p.2711-2719, 2003.
- Menard, C. Mitchell, S., Spector, M. Contractile behavior of smooth muscle action-containing osteoblast in collagen-GAG matrices in vitro:implant-relatedcell contraction.**Biomaterials**, v-21, p.1867-1877, 2000.
- Mizuno, M.; Fujisawa, R.; Kuboki Y. Type I Collagen- Induced Osteoblastic Differentiation of Bone-Marrow Cells Mediated by Collagen- $\alpha 2\beta 1$ Integrin Interation. **Journal of Cellular Physiology**, v-184, p. 207-213; 2000
- Mossman,P.B.; Young L.L. Testing for degrees of color blindness.**Occup Health Suff**.v- 52(8), p.49-53, 1983.
- Oktar, F.N. Hydroxyapatite-TiO₂ composites.**Materials Letters**, in press, 2006.
- Olmo, N., Martin, A.I., Salinas, A.J., Turnay, J., Vallet- regi ,M, Lizarbe, M. Bioactive sol-gel glasses with and without a hydroxycarbonate apatite layer as substrates for osteoblast cell adhesion and proliferation.**Biomaterials**, v-24, p.3383-3393, 2003.
- Puelo, D.A; Nanci, A. Understanding and controlling the bone-implante interface. **Biomaterials**, v-20, p. 2311-2321, 1999.
- Raj, N.K.K; SHARMA, C.P. Oral Insulin- A Perspective. **Journal of Biomaterials Applications**, v-17, p.183-193, 2003.

- Ribeiro, C.C.; Barrias, C.C., Barbosa, M.A. Calcium phosphate-alginate microspheres as enzyme delivery matrices. **Biomaterials**, v-18, p.4363-73, 2004.
- Risbud M. Tissue engineering implication in the treatment of organ an tissue defects. **Biogerontology**, v-2, p.117-25, 2001.
- Rodrigues, C.V.M.; Serricella, P.; Linhares, A.B.R.; Guerdes, R.M.; Borojevic, R.; Rossl, A.; Duarte, M.E.L.; Farina, M. Characterization of bovine collagen-hydroxyapatite composite scaffold for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v-24 , p.4987-4997,2003.
- Rowley, J.A.,Madlambayan, G., Mooney, D.J. Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials.**Biomaterials**, v-20,p.45-53,1999.
- Sato, M., Sambito,M., Aslani,A. Kalkhoran,M.D., Slamovitch,E.B., WEBSTER,T.J. Increased osteoblast function on undoped and yttrium-doped nanocrystalline hydroxyapatite coatings on titanium. **Biomaterials**,v-27,p.2358-2369,2006.
- Sawyer, A.A., Hennessy,K.M., Bellis,S.L. Regulation of mesenchymal stem cell attachment and spreading on hydroxyapatite by RGD peptides and adsorbed serum proteins.**Biomaterials**, v-26, p.1467-1475,2005.
- Sikavitsas, I.V.; Temenoff, S.J.; Mikos, G.A. Biomaterials and bone mechanotransduction. **Biomaterials**, v-22, p.2581-2593, 2001.
- Simpson,N.E., Stabler, C.L., Simpson, C.P., Sambanis, A., Constantinidis, I. The role of CaCl₂-guluronic acid interation on alginate encapsulated βTC3 cells. **Biomaterial** , v-25, p.2603-2610, 2004.

- Stevens, M.M.; Qanadilo, H.F.; Langer, R.; Shastri, V.P. A rapid-curing alginate gel system: utility in periosteum-derived cartilage tissue engineering. *Biomaterials*, v-25, p. 887-894, 2004.
- Storrie, H., Stupp, S.I. Cellular response to zinc-containing organoapatite: An in vitro study of proliferation, alkaline phosphatase activity and biomineralization. *Biomaterials*, v-26, p. 5492-5499, 2005.
- Suchanek, W.; Yoshimura, M.J. Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard replacement implants. *Mater. Res.* v-13, n°1, 1998.
- Tan, J.; Saltzman, W.M. Biomaterials with hierarchically defined micro- and nanoscale structure. *Biomaterials*, v.25, p. 3593-3601, 2004.
- Thian, E.S., Loh, N.H., Khor, K.A., Tor, S.B. Microstructure and mechanical properties of powder injection molded Ti-6Al-4V/HA powder. *Biomaterials*, v-23, p. 2927-2939, 2002.
- Thiery, J.P. Cell adhesion in development: a complex signaling network. *Current Opinion in Genetics & Development*, v-13, n-4, p. 365-371, 2003.
- Tougaard, C., Tixier-vidal, A., Kerdelhue, A., Jutisz, M. Etude immunocytochimique de l'évolution des cellules gonadotropes dans des cultures primaires de cellules antéhypophysaires de rat: aspects quantitatifs et ultrastructuraux. *Biol Cell*, v-28, p. 251-260, 1977.
- Tougaard, C., Picart R., Tixier-Vidal, A. Electron-microscope cytochemical studies on the secretory process in rat prolactin cells in primary culture. *Am J. Anat*, v-158, p. 471-490, 1980.

Walsh, W.R.; Christiansen, D.L. Demineralized bone matrix as a templates for mineral-organic composites. **Biomaterial**, v.10,p.1363-1371, 1995.

Wei, M., Ruys, A.j., Swain, M.V., Milthorpe, B.K., Sorrel, C.C. Hydroxyapatite – coated metals: interfacial reactions during sintering. **J Mater Sci Mater Med.**, 16(20, p.101-106, 2005.

Zhang, S.M.; Cui, F.Z.; Liao, S.S; Zhu, Y.; Han,L. Synthesis and biocompatibility of porous nanohydroxyapatite/ collagen / alginate composite. **Jounal of Materials Science:Materials in Medicine**,v.14, p.641-645, 2003.