

COMPORTAMENTO DE OSTEOLASTOS HUMANOS CULTIVADOS SOBRE
SUPERFÍCIES PLANA E ONDULADA DE PASTILHAS DENSAS DE FOSFATOS
DE CÁLCIO

Euler Araujo dos Santos

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DA COORDENAÇÃO DOS
PROGRAMAS DE PÓS-GRADUAÇÃO DE ENGENHARIA DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS
NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS EM
ENGENHARIA METALÚRGICA E DE MATERIAIS.

Aprovada por:

Prof. Glória de Almeida Soares, D.Sc.

Prof. Marcos Farina de Souza, D.Sc.

Prof. Fernando Costa e Silva Filho, D.Sc.

Prof. Ericksson Rocha e Almendra, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

MARÇO DE 2004

DOS SANTOS, EULER ARAUJO

Comportamento de osteoblastos
humanos cultivados sobre superfícies plana e
ondulada de pastilhas densas de fosfatos de
cálcio

[Rio de Janeiro] 2004

XVI, 105 p. 29,7 cm (COPPE/UFRJ,
M.Sc.,
Engenharia Metalúrgica e de Materiais, 2004)

Tese - Universidade Federal do Rio de
Janeiro, COPPE

1. Fosfatos de cálcio
2. Topografia
3. Tensão superficial
4. Cultivo de células

I. COPPE/UFRJ II. Título (série)

Amar solenemente as palmas do deserto,
o que é entrega ou adoração expectante,
e amar o inóspito, o cru,
um vaso sem flor, um chão vazio,
e o peito inerte, e a rua vista em sonho,
e uma ave de rapina.

Carlos Drummond de Andrade - *Amar*

.....
É determinismo, sim. Mas seguindo o próprio determinismo é que se é livre. Prisão seria seguir um destino que não fosse o próprio. Há uma grande liberdade em se ter um destino. Este é o nosso livre-arbítrio.

Clarice Lispector - *A descoberta do mundo*

.....
(...) uma borboleta batendo asas em Tóquio pode causar chuva no Central Park de Nova York (...) à primeira vista, o determinismo pareceria também ameaçado pelo princípio da incerteza (...)

Stephen Hawking - *O universo numa casca de nós*

.....
O raciocínio se esforça por obter conhecimentos novos a partir de conhecimentos já adquiridos, por penetrar no desconhecido a partir do já conhecido. O raciocínio lógico parte, portanto, de certas proposições admitidas e se esforça por delas extrair, por meio da mediação, se for o caso, outras proposições igualmente admitidas, ou seja, conclusões.

Henri Lafebvre - *Lógica formal e lógica dialética*

.....
E é sempre melhor o impreciso que embala do que o certo que basta, porque o que basta acaba onde basta, e onde acaba não basta, e nada que se pareça com isso devia ser o sentido da vida.

Álvaro de Campos - *A casa branca nau preta*

Àqueles que sabem que a aproximação ao que quer
que seja se faz de forma lenta e difícil.

AGRADECIMENTOS

À Glória Soares por ter acreditado em mim desde os primeiros contatos, ainda em Sergipe. Sua grande coragem em dizer sim. E aquela pergunta que sempre vem inscrita nas suas afirmações... ajudando-nos a buscar a nossa verdade – nossa resposta sobre as coisas. Obrigado pela liberdade.

Ao Marcos Farina pelas idéias físicas e metafísicas, pela honestidade no seu sentindo mais profundo. Eu, que sempre fui silencioso, tenho aprendido cada vez mais sobre os sons que podem nascer de mim. Quem mais poderia traduzir idéias simplesmente?

Às instituições CAPES e FAPERJ pelas bolsas concedidas, de fundamental importância à minha permanência aqui no Rio. Ao CNPq.

À minha mãe pela força cega com que se agarra a coisas, e acredita nelas. O modo fácil com que ela torna tudo dourado. Nada é difícil, tudo está sobre a mesa, basta alcançar com o coração. Ao meu pai pelo seu jeito *déjà vu* que ensina sobre o mundo. Acho que ele me ensinou a subir morros e descer sempre achando que vale a pena subir de novo.

Aos meus irmãos “Téié” pelo constante interesse sobre minha vida. Ao “Vavo” pelas cachaças de fim de ano que sempre nos tem deixado mais próximos. Ao “Vavau” por ter se tornado cada vez mais irmão. À “Joice” pela proteção, em anéis de... amor. Às outras primas-irmãs “Neném” por empresariar as nossas vidas, e a “Gil” por torná-las mais leves e felizes.

Aos meus velhos amigos que sempre parecem estar me dizendo sobre os segredos do mundo, mesmo de longe. Walter Brito e a sua “Monalisa num boteco”. Rogério Pagano salva-vidas, obrigado. Temos que voltar a enfrentar a correnteza-do-rio-da-serra.

Ainda mais velhos no meu coração, Vítor Júnior e Fabiane Oliveira. Pontal do Coruripe, lama de mangue e Miaba ainda estão grudados em mim. E, daqui a alguns anos, teremos um grande encontro. Uma garrafa ao mar. À Hitla Rosana pelo carinho que sempre me comoveu. À Viviane Lima pelos sentimentos que me fez saber. Saberíamos?

Aos novos amigos tomados ao Rio, Lídia Sena pela bondade (não existe outra palavra). Gostaria de um dia alcançar sua ingenuidade, que salvaria o mundo. Será que isso se conquista? Ao José Fernandes pelos pensamentos altos e leves, e pelos CDs transcendentais. À Adriana Linhares pelas conversas com as células e dias de sol em Ipanema. À Andréa Costa pela resolução de todos os problemas e cumplicidade. Roberto Salgado, Isabel Neves, Bárbara Ramos e nossas festinhas insuspeitadas. Ao Anderson Coelho pelas trilhas e rumos.

Aos bioamigos, Emanuel, Neide, Paola, Jorge, Renata, Dóris e Aline. Nosso time. Do outro lado, obrigado aos Leonardos, Rachele, Raquel, Carol e Mair pelos inúmeros salvamentos. Aos quase conterrâneos Marília, Marcelo e Ledjane. À D. Anízia por tornar nossa vida aqui no Rio mais próxima àquela anterior.

À Márcia Sader pelas minhas primeiras imagens de células em MEV, e o seu entusiasmo contagiante. Pela preocupação com minha estada aqui. À Carla Rodrigues pelas conversas *en français*, pela compreensão e pela proximidade de idéias.

À Leda Castilho pela visão das células animais do ponto de vista da engenharia. Ao Fernando Costa e Silva pela visão mais humanizada delas. Ao Alexandre Rossi pelas importantes observações e sugestões, e ao CBPF pela doação das hidroxiapatitas.

Aos meus orientadores de IC, Eunice Vieira e Reinaldo Cestari, pela constante torcida.

Ao Sr. Roberto da oficina do PEMM pelas ranhuras feitas na matriz de aço. Ao José Farias pelas aulas de Fenômenos Químicos de Interface, pelas sugestões, chaves do laboratório... À Glória Maria pela ajuda com o Goniômetro e dicas FAPERJ. À Leonice (IQ/UFRJ) pelo cuidado com os espectros de FT-IR. E ao Vinícius que me levou até ela. Ao NUCAT. À Claudia Lauria por ter tornado minha vinda pra cá mais fácil.

Àqueles que, mesmo ocultos nessa tese, são sua própria fundação.

Enfim, àquele que, somente por ele, esse trabalho foi possível.

Resumo da Tese apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (M.Sc.)

COMPORTAMENTO DE OSTEOLASTOS HUMANOS CULTIVADOS SOBRE
SUPERFÍCIES PLANA E ONDULADA DE PASTILHAS DENSAS DE FOSFATOS
DE CÁLCIO

Euler Araujo dos Santos

Março/2004

Orientadores: Glória de Almeida Soares

Marcos Farina de Souza

Programa: Engenharia Metalúrgica e de Materiais

Ondulações foram produzidas sobre metade da superfície de pastilhas densas de fosfato de cálcio de modo a se estudar a influência da topografia na orientação celular. Pastilhas constituídas de HA e α -TCP (caracterizadas por FT-IR, DRX e ângulo de contato) em concentrações variadas serviram para determinar o efeito da segunda fase (α -TCP) sobre a adesão e proliferação das células. A superfície das pastilhas foi analisada antes e após o cultivo, de modo a se identificar transformações físico-químicas ocorridas (MEV, FT-IR e XPS). Determinações morfológicas (MEV) e quantitativas (análise de imagens) mostraram que a orientação celular ocorre sobre a região ondulada gradativamente ao longo do cultivo e depende sobremaneira da densidade celular. Os resultados obtidos mostraram que os osteoblastos podem ser influenciados por padrões topográficos além daqueles descritos. Quanto à influência de segundas fases, as adesões celulares iniciais foram mais intensas sobre as pastilhas com 21,8% de α -TCP. No entanto, a proliferação celular ao longo do cultivo foi inversamente proporcional à quantidade dessa fase, confirmando o seu caráter não osteocondutor. Dessa forma, apesar do fosfato tricálcico (TCP) ser indicado como um agente facilitador da reposição óssea, em função da sua dissolução, pode-se dizer que ele influi negativamente sobre a proliferação dos osteoblastos humanos.

Abstract of Thesis presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.)

HUMAN OSTEOBLASTS BEHAVIOR ON FLAT AND UNDULATED SURFACE
OF CALCIUM PHOSPHATE TABLETS

Euler Araujo dos Santos

March/2004

Advisors: Glória de Almeida Soares
Marcos Farina de Souza

Department: Metallurgical and Materials Science Engineering

Undulations were produced on half of the calcium phosphate tablets in order to study the influence of the topography on the cellular orientation. HA tablets with different compositions of α -TCP were employed to determine the second phase effect on adhesion and proliferation of the cells. The tablets surface were characterized before and after cells culture, by using SEM, FT-IR and XPS. Morphologic (SEM) and quantitative (image processing) analysis showed a gradual cellular orientation on the undulations. This orientation seems to be dependent of cellular density used. The obtained results showed that osteoblasts can be influenced by topographical patterns besides those described. On the other hand, the cells adhesion was more intense on the tablets with 21,8% α -TCP. However, the cellular proliferation was inhibited by the increase of α -TCP concentration, confirming the non osteoconductive character of TCP. Despite of the TCP is considered as a facilitating agent for bone repairs, in function of its dissolution, it seems to negatively influence the human osteoblasts *in vitro* proliferation.

ÍNDICE

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. TECIDO ÓSSEO	4
2.1.1. MATRIZ ÓSSEA MINERALIZADA	6
2.2. BIOMATERIAIS	9
2.2.1. MATERIAIS BIOMIMÉTICOS	11
2.2.2. FOSFATOS DE CÁLCIO	12
2.2.3. FORMAÇÃO DE APATITAS BIOLÓGICAS	16
2.3. INTERAÇÃO CÉLULA/BIOMATERIAL	18
2.3.1. PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA ADESÃO CELULAR	19
2.3.2. DIFERENCIAÇÃO	21
2.3.3. OUTROS FATORES QUE AFETAM A ADESÃO	22
2.4. TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS	25
2.4.1. TÉCNICAS FÍSICAS	25
2.4.2. TÉCNICAS BIOLÓGICAS	28
CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1. MATERIAIS	31
3.1.1. HIDROXIAPATITAS	31
3.1.2. PASTILHAS DENSAS DE HA E HA/TCP	31
3.2. MÉTODOS	32
3.2.1. TOPOGRAFIA DAS PASTILHAS	32
3.2.2. COMPOSIÇÃO QUÍMICA	32
3.2.3. ENERGIA DE SUPERFÍCIE	33
3.2.4. CULTURA DE OSTEOBLASTOS	37
3.2.5. TESTE DE FOSFATASE ALCALINA	38
3.2.6. CULTURA DE OSTEOBLASTOS SOBRE PASTILHAS	39
3.2.7. MORFOLOGIA CELULAR	39
3.2.8. AVALIAÇÕES CELULARES QUANTITATIVAS	40
3.2.9. TRANSFORMAÇÕES DE SUPERFÍCIE <i>IN VITRO</i>	41
CAPÍTULO 4 – RESULTADOS	43
4.1. MATERIAIS	43
4.1.1. TOPOGRAFIA DAS PASTILHAS	43
4.1.2. COMPOSIÇÃO QUÍMICA	44
4.1.3. ENERGIA DE SUPERFÍCIE	48
4.2. COMPORTAMENTO CELULAR	52
4.2.1. TESTE DE FOSFATASE ALCALINA	52
4.2.2. ORIENTAÇÃO DOS OSTEOBLASTOS	52

4.2.3. ADESÃO E PROLIFERAÇÃO DE OSTEÓBLASTOS _____	58
4.3. TRANSFORMAÇÕES SUPERFICIAIS IN VITRO _____	66
4.3.1. DISSOLUÇÃO E REPRECIPITAÇÃO _____	66
4.3.2. TRANSFORMAÇÕES QUÍMICAS DE SUPERFÍCIE _____	69
CAPÍTULO 5 – DISCUSSÃO _____	77
CAPÍTULO 6 – CONCLUSÕES _____	91
CAPÍTULO 7 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS _____	93
CAPÍTULO 8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	94

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 2.1 - Corte histológico de tecido ósseo (PUCRS, 2002).</i>	5
<i>Figura 2.2 - Seção longitudinal de um fêmur mostrando a parte cortical e trabecular do osso (DOROZHKIN & EPPLE, 2002).</i>	6
<i>Figura 2.3 - Organização estrutural do tropocolágeno (CUERONET, 2002).</i>	8
<i>Figura 2.4. Estrutura das fibrilas em matrizes de colágeno. Cada seta corresponde a uma molécula de tropocolágeno (CUERONET, 2002).</i>	8
<i>Figura 2.5 - Modelo da acomodação dos cristais de apatita no interior das fibrilas de colágeno (modificado de DOROZHKIN & EPPLE, 2002).</i>	9
<i>Figura 2.6. Rede cristalina da hidroxiapatita (CBPF, 2002).</i>	14
<i>Figura 2.7 - Modelo sobre a formação de apatitas biológicas na superfície de biovidros (modificado de DUCHEYNE & KOKUBO, 1992).</i>	16
<i>Figura 2. 8. Ilustração sobre as etapas envolvidas no processo de adesão celular: adsorção, adesão e espraiamento (de cima para baixo).</i>	18
<i>Figura 2.9. Ilustração da adesão celular sobre um material recoberto com RDG (modificado de ANSELME, 2000).</i>	20
<i>Figura 2.10. Esquema sobre a diferenciação de células-tronco mesenquimais em células de vários tecidos (modificado de RISBUD & SITTINGER, 2002).</i>	21
<i>Figura 2.11 - Modelo representando o Método da Gota usado na determinação da energia de superfície pela molhabilidade.</i>	28
<i>Figura 3.1 - Modelo da superfície de uma pastilha após prensagem. Dois padrões topográficos podem ser identificados: uma região lisa (a) e outra ondulada (b).</i>	31
<i>Figura 3.2 - Modelo do aparato usado na determinação do ângulo de contato pelo Método da Bolha.</i>	34
<i>Figura 4.1 - Detalhes em MEV de uma pastilha após calcinação mostrando ondulações superficiais e seu perfil.</i>	43
<i>Figura 4.2 - Espectros de DRX do pó das pastilhas CD_a e CD_b calcinadas a 1150°C por 2h e 72h, respectivamente.</i>	44
<i>Figura 4.3 - Espectros de DRX do pó das pastilhas E1_a e E2_a, calcinadas a 1150°C por 2h, e E1_b calcinada a 1150°C por 72h.</i>	45

<i>Figura 4.4 - Curva de calibração para determinações da concentração de HA em sistemas bifásicos HA/α-TCP, $r^2 = 0,9978$ (OLIVEIRA et al., 2003).</i>	46
<i>Figura 4.5 - Espectros de FT-IR (transmissão) das pastilhas CD_a, EI_a e E2_a, calcinadas a 1150°C por 2h.</i>	47
<i>Figura 4.6 - Variação dos valores de ângulo de contato da água sobre uma mesma pastilha EI_a durante aproximadamente 1h40min a 25°C.</i>	48
<i>Figura 4.7 - Gráficos obtidos diretamente da ascensão capilar dos líquidos apolares nos particulados CD_a. Os coeficientes de correlação foram 0,9992, 0,9986 e 0,9986 para o n-hexano, n-heptano e n-dodecano, respectivamente.</i>	49
<i>Figura 4.8 - Gráficos obtidos diretamente da ascensão capilar dos líquidos apolares nos particulados EI_a. Os coeficientes de correlação foram 0,9982, 0,9976 e 0,9981 para o n-hexano, n-heptano e n-dodecano, respectivamente.</i>	50
<i>Figura 4.9 - Comparação das tensões superficiais obtidas pelos dois métodos descritos (Método da Bolha e Ascensão Capilar).</i>	51
<i>Figura 4.10 - Imagens de osteoblastos humanos de segunda passagem corados com um kit de teste próprio para fosfatase alcalina (Vector® Red Kit I Cat. No. SK-5100) após 7 dias em cultivo sobre lamínula.</i>	53
<i>Figura 4.11 - Micrografia por MEV de osteoblastos sobre a região plana da pastilha CD_a após 4 dias em cultura, sem qualquer orientação preferencial de longa distância.</i>	55
<i>Figura 4.12 - Micrografia por MEV mostrando células orientadas (verticalmente disposta na figura) ao longo do eixo das ondulações após 4 dias em cultura.</i>	55
<i>Figura 4.13 - Micrografia detalhada por MEV de células orientadas (obliquas na figura) sobre uma ondulação.</i>	56
<i>Figura 4.14 - Imagem por MEV mostrando várias pontes celulares entre ondulações vizinhas (setas).</i>	56
<i>Figura 4.15 - Micrografia em MEV mostrando a interface entre a região plana (parte inferior da imagem) e a ondulada (parte superior da imagem) de uma pastilha.</i>	57
<i>Figura 4.16 - Micrografia (MEV) mostrando células em camadas superiores orientadas diferentemente àquelas em contato com a superfície.</i>	57

<i>Figura 4.17 - Fração de células orientadas sobre as ondulações ao longo do tempo em cultivo, baseadas na razão entre o número de células orientadas e o número total de células sobre as ondulações.</i>	59
<i>Figura 4.18 - Dinâmica da distribuição celular ao longo do tempo sobre as ondulações e sua vizinhança.</i>	59
<i>Figura 4.19 - Micrografia (MEV) mostrando um osteoblasto no vale entre duas ondulações 4h após o início da cultura (ondulação no canto inferior direito).</i>	60
<i>Figura 4.20 - Micrografia (MEV) mostrando um osteoblasto aderido na interface ondulação/superfície plana, emitindo lamelipódios na direção da ondulação.</i>	60
<i>Figura 4.21 - Micrografia (MEV) de um osteoblasto “escalando” uma ondulação após 4 dias em cultivo.</i>	61
<i>Figura 4.22 - Micrografia (MEV) mostrando um osteoblasto com espraiamento característico na base de uma ondulação após 1 dia de cultivo.</i>	61
<i>Figura 4.23 - Micrografia (MEV) mostrando células individuais orientadas sobre uma ondulação após 7 dias de cultivo.</i>	62
<i>Figura 4.24 - Micrografia (MEV) da região entre duas ondulações mostrando grupos de células orientadas após 14 dias de cultivo.</i>	62
<i>Figura 4.25 - Curva de crescimento de osteoblastos sobre pastilhas CD_a e E1_a.</i>	64
<i>Figura 4.26 - Curva de crescimento de osteoblastos sobre pastilhas CD_a e E2_a.</i>	65
<i>Figura 4.27 - Curva de crescimento de osteoblastos sobre pastilhas CD_b e E1_b.</i>	65
<i>Figura 4.28 - Variação da porosidade de superfície das pastilhas CD_a incubadas a 37°C em DMEM suplementado com 10% de SFB e osteoblastos.</i>	66
<i>Figura 4.29 - Micrografias (MEV) representativas da superfície das pastilhas antes da incubação (A), após 4 dias (B), 7 dias (C) e 11 dias (D). Barra: 5 μm.</i>	67
<i>Figura 4.30 - Micrografia (MEV) da superfície CD_a após 4h de incubação onde podem ser vistos pequenos nódulos precipitados (setas) distribuídos homoganeamente por todos os grãos.</i>	68

<i>Figura 4.31 - Micrografia (MEV) da superfície CD_a após 7 dias de incubação. Grãos rugosos e com pequenos nódulos (setas) se destacam entre grãos lisos, sugerindo a presença de uma nova fase.</i>	68
<i>Figura 4.32 - Espectros de FT-IR (refletância difusa) obtidos na superfície plana das pastilhas CD_a ao longo do tempo de incubação a 37°C em meio de cultivo.</i>	70
<i>Figura 4.33 - Espectros de FT-IR (refletância difusa) obtidos na superfície ondulada das pastilhas CD_a ao longo do tempo de incubação a 37°C em meio de cultivo.</i>	70
<i>Figura 4.34 - Espectros de FT-IR (refletância difusa) obtidos na superfície lisa das pastilhas E1_a ao longo do tempo de incubação a 37°C em meio de cultivo.</i>	71
<i>Figura 4.35 - Espectros de FT-IR (refletância difusa) obtidos na superfície ondulada das pastilhas E1_a ao longo do tempo de incubação a 37°C em meio de cultivo.</i>	71
<i>Figura 4.36 - Espectros de FT-IR (transmissão) para o pó de pastilhas CD_a incubado a 37°C em meio de cultivo.</i>	72
<i>Figura 4.37 - Espectro geral de XPS obtido da superfície das pastilhas E_a após calcinação (pastilha controle).</i>	74
<i>Figura 4.38 - Espectro geral de XPS obtido da superfície das pastilhas E_a após cultivo de osteoblastos por 4 dias.</i>	74
<i>Figura 4.39 - Espectros detalhados de XPS das superfícies E_a após calcinação.</i>	75
<i>Figura 4.40 - Espectros detalhados de XPS das superfícies E_a após cultivo de osteoblastos por 4 dias.</i>	76

ÍNDICE DE TABELAS

<i>Tabela 3.1 - Relação entre os pós de HA usados na preparação das pastilhas, o tempo de calcinação empregado e a designação final das pastilhas obtidas. Essa designação levou em conta o nome do pó inicial (CD, E1 e E2) bem como o tempo de calcinação ($a = 2h$ e $b = 72h$).</i>	32
<i>Tabela 4.1 - Concentrações de HA e α-TCP nas pastilhas calcinadas a 1150°C por 2 e 72h em função das intensidades de difração para cada fase presente.</i>	46
<i>Tabela 4.2 - Ângulos de contato e tensões interfaciais características (sólido/vapor) das superfícies das pastilha analisadas.</i>	49
<i>Tabela 4.3 - Constantes físicas dos líquidos usados na determinação da energia de superfície das pastilhas CD_a e $E1_a$.</i>	50
<i>Tabela 4.4 - Ângulos de contato e tensões interfaciais características (sólido/vapor) dos sistemas particulados CD_a e $E1_a$.</i>	51
<i>Tabela 4.5 - Eficiência de adesão para as superfícies estudadas.</i>	63

SÍMBOLOS USADOS

ACP	fosfatos de cálcio amorfo	RGE	arginina-glicina-glutamato
HA	hidroxiapatita	BSS.CMF	solução salina balanceada livre de Ca^{2+} e Mg^{2+}
TCP	fosfato tricálcico	PBS	solução salina tamponada com fosfato
α -TCP	fosfato α -tricálcico	DMEM	meio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco
β -TCP	fosfato β -tricálcico	DRX	difração de raio-X
FAP	fluorapatita	FT-IR	espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier
OCP	fosfato octacálcico	MEV	microscopia eletrônica de varredura
CD _a	pastilha produzida com CD-HA e calcinadas a 1150°C por 2h	XPS	espectroscopia de fotoelétrons por raio-X
CD _b	pastilha produzida com CD-HA e calcinadas a 1150°C por 72h	I _{HA}	intensidade máxima de difração no plano (211) da HA
E1 _a	pastilha produzida com E1-HA e calcinadas a 1150°C por 2h	I _{α-TCP}	intensidade máxima de difração no plano (034) do α -TCP
E1 _b	pastilha produzida com E1-HA e calcinadas a 1150°C por 72h	ρ_{α}	Intensidade relativa de difração
E2 _a	pastilha produzida com E2-HA e calcinadas a 1150°C por 2h	W _{AD} ^P	trabalho de adesão polar
CD-HA	pó de HA deficiente em cálcio	W _{AD} ^D	trabalho de adesão dispersivo
E1-HA	pó de HA estequiométrica	W _{AD}	trabalho de adesão
E2-HA	pó de HA estequiométrica	γ_S^P	componente polar da tensão interfacial sólido/vapor
Ca/P	razão molar entre Ca e P	γ_S^D	componente dispersiva da tensão interfacial sólido/vapor
OP	proteínas osteogênicas	γ_S	tensão interfacial total sólido/vapor
BMP	proteínas morfogenéticas	ν	vibração do tipo estiramento (FT-IR)
RGD	arginina-glicina-aspartato	Da	Dalton (unidade de massa molecular)

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

Durante toda a vida, o tecido ósseo é constantemente produzido e reabsorvido pelo organismo num processo equilibrado que tende a manter a integridade desse tecido. Com o avanço da idade, esse equilíbrio entre formação e reabsorção é afetado de forma que a perda de massa óssea passa a ser predominante. O processo de desmineralização tende a deixar o esqueleto mais susceptível a traumatismos e, além disso, com uma menor possibilidade de recuperação. Somente nos Estados Unidos são catalogadas aproximadamente 280.000 fraturas de quadril, 700.000 de vértebras e 250.000 fraturas de colo de fêmur a cada ano, custando ao governo algo em torno de 10 bilhões de dólares (HOLLINGER *et al.*, 2000).

Os métodos tradicionais de reparos em partes do tecido ósseo danificadas baseiam-se na utilização de enxertos retirados do próprio paciente (autógenos), enxertos provenientes de animais (xenógenos), extraídos de outros indivíduos (alógenos) e sintéticos (aloplásticos) (MISCH, 1999). O enxerto autógeno apresenta inúmeras vantagens sobre os demais uma vez que ele é aplicado no local danificado ainda contendo células ósseas do próprio paciente, induzindo a uma menor probabilidade de rejeição por parte do organismo. De qualquer modo, esse procedimento é limitado pela extensão da lesão, pela forma e tamanho, e pela necessidade de se submeter o paciente a uma cirurgia adicional (TIEDEMAM *et al.*, 1995).

Enxertos alógenos ou xenógenos tendem a ser evitados devido a, pelo menos, três fatores: (a) risco em potencial de uma imunoresposta contra aloantígenos, (b) transmissão de agentes patogênicos, como víruses e (b) pela necessidade de administração de imunossupressores ao paciente (GREEN *et al.*, 2002).

O desenvolvimento de materiais aloplásticos capazes de substituir ou reparar tecidos danificados vem a ser uma das mais promissoras alternativas para contornar todos os problemas associados ao uso de enxertos naturais. Materiais metálicos com superfícies passivadas já são utilizados há muito tempo, como implantes dentários e ortopédicos, visando a esse tipo de reparo. Os dois motivos principais para o uso de

metais são: resistência compatível com as solicitações mecânicas e integração tecido/implante livre de reações imunológicas contrárias (THULL, 2002). Ainda assim, os riscos de contaminação do corpo por íons metálicos produzidos pela possível corrosão desses substratos não podem ser descartados. Outro grande problema relacionado à utilização de implantes metálicos é o carregamento diferencial entre o implante e o osso hospedeiro. O implante tende sempre a ser solicitado com cargas significativamente mais altas que o osso circunvizinho induzindo problemas de reabsorção óssea e de integração osso/implante (RAMAKRISHNA *et al.*, 2001).

Nos últimos anos, novas estratégias vêm se mostrando capazes de revolucionar os tratamentos relativos à perda de funcionalidade dos tecidos do corpo, tal como o tecido ósseo. Conhecimentos adquiridos nos ramos da biologia molecular e celular, associados ao impacto das pesquisas focadas em biomateriais, impulsionam cada vez mais esses avanços. A engenharia de tecidos busca a combinação perfeita entre células, materiais suportes que venham a acomodar o tecido neoformado e moléculas bioativas que promovam a diferenciação e o crescimento das células progenitoras sobre o material, o que significa a mimetização do tecido natural (RISBUD, 2001).

O biomaterial idealizado pela engenharia de tecidos ósseos deve englobar dois princípios básicos: (a) ser capaz de promover o desenvolvimento de uma camada superficial de apatita quando em condições fisiológicas (HENCH, 1998) e (b) facilitar a adesão, espreadimento, crescimento e diferenciação de células osteoprogenitoras sobre a sua superfície (HSU *et al.*, 1999; RISBUD *et al.*, 2002).

Materiais cerâmicos, como fosfatos de cálcio e biovidros, ainda estão longe de alcançarem propriedades mecânicas comparáveis às ósseas. No entanto, quando implantados no corpo, estabelecem um alto grau de interação com o tecido vivo ao seu redor. Diz-se que a bioatividade desses materiais está diretamente ligada a formação espontânea da camada superficial de apatita, conhecida como apatita biológica (*bone-like layer*), quando em contato com fluido biológico (KOKUBO, 1991; OHTSUKI *et al.*, 1991). A morfologia dos cristais e a composição química dessa camada são muito próximas àquela observada na fase mineral óssea (LENG *et al.*, 2003).

Além da composição química, um material para substituição óssea deve ser idealmente absorvido no local do defeito e, simultaneamente, repostado pelo tecido novo. Tanto a hidroxiapatita (HA) quanto o fosfato tricálcico (TCP) são amplamente utilizados em reparos ósseos. Apesar de ambos serem bioativos, a HA é mais estável que o TCP em condições fisiológicas no que se refere à solubilidade e à cinética de reabsorção (DOROZHKIN & EPPLÉ, 2002). Cerâmicas bifásicas HA/TCP vêm sendo desenvolvidas de modo a se obter o exato equilíbrio entre a taxa de degradação do material e a taxa de formação do novo tecido.

O cultivo *in vitro* de células ósseas sobre materiais que mimetizam a matriz extracelular do tecido a fim de se criar organotecidos biohíbridos vem sendo o grande anseio da engenharia de tecidos. Células do próprio paciente (autólogas) poderiam ser cultivadas, e o tecido resultante, aplicado diretamente no local lesionado do corpo.

O objetivo principal desse trabalho foi avaliar o comportamento *in vitro* de osteoblastos humanos cultivados sobre pastilhas densas de HA e HA/TCP, com padrões topográficos diferenciados. Três questões foram investigadas: (a) a influência de ondulações de superfície sobre o comportamento dos osteoblastos, (b) o papel da segunda fase (TCP) sobre a adesão e proliferação das células e (c) os tipos de transformações químicas que ocorrem na superfície ao longo do cultivo.

CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. TECIDO ÓSSEO

O processo evolutivo permitiu que as células do corpo desenvolvessem materiais com elevado grau de especialização, otimizando várias das suas funções. Esses materiais compõem sua matriz extracelular e desempenham papéis de suporte, transporte de substâncias tróficas e proteção, chegando até a responder a estímulos mecânicos externos, por meio de modificações de caráter estrutural, como é o caso do tecido ósseo (SISKEN, 1993; MCDONALD, 1993). Na sua grande maioria, são compostos formados por associações entre fibras poliméricas de polissacarídeos e/ou proteínas, ou ainda a associação desses polímeros com fases minerais resultantes de complexas atividades celulares.

O tecido ósseo é um sistema complexo, altamente organizado, constituído de células ósseas dispersas numa matriz mineralizada permeada por tecidos conjuntivos, hematopoéticos e cartilagens. Além de servir como suporte, ele se constitui num grande reservatório de íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} necessários em uma ampla variedade de funções metabólicas do corpo (DOROZHKIN & EPPLE, 2002).

As principais células do tecido ósseo são os osteoblastos, osteoclastos e os osteócitos. Osteoblastos são originários de células osteoprogenitoras que se desenvolvem no próprio tecido, enquanto os osteoclastos são provenientes da fusão de células hematopoéticas da medula óssea (GREEN, 1994; MARKS & HERMEY, 1996).

Os osteoblastos são encontrados, geralmente, formando uma monocamada aderente sob o perióstio ou nas superfícies endósteas do osso (MARKS & ODGREN, 2002). Uma das principais funções do osteoblasto é produzir proteínas da matriz extracelular (osteóide) como colágeno tipo I, proteoglicanas e glicoproteínas. Como consequência, osteoblastos ativos possuem complexo de Golgi proeminente e uma grande quantidade de cisternas de retículo endoplasmático rugoso. Além disso, são células polarizadas em que a secreção do osteóide se dá perpendicularmente à base da

célula. Logo, a direção do crescimento ósseo é sempre perpendicular à base dos osteoblastos (PRELE *et al.*, 2003).

Os osteócitos são osteoblastos que ficam aprisionados na matriz mineralizada (figura 2.1) e são responsáveis pela manutenção dessa matriz e pela transdução de sinais mecânicos sentidos pelo osso. Os osteoclastos são células grandes, multinucleadas originárias da fusão de precursores hematopoéticos mononucleares, bastante móveis que absorvem matriz mineralizada, participando dos processos de reabsorção e, portanto, da remodelação óssea.

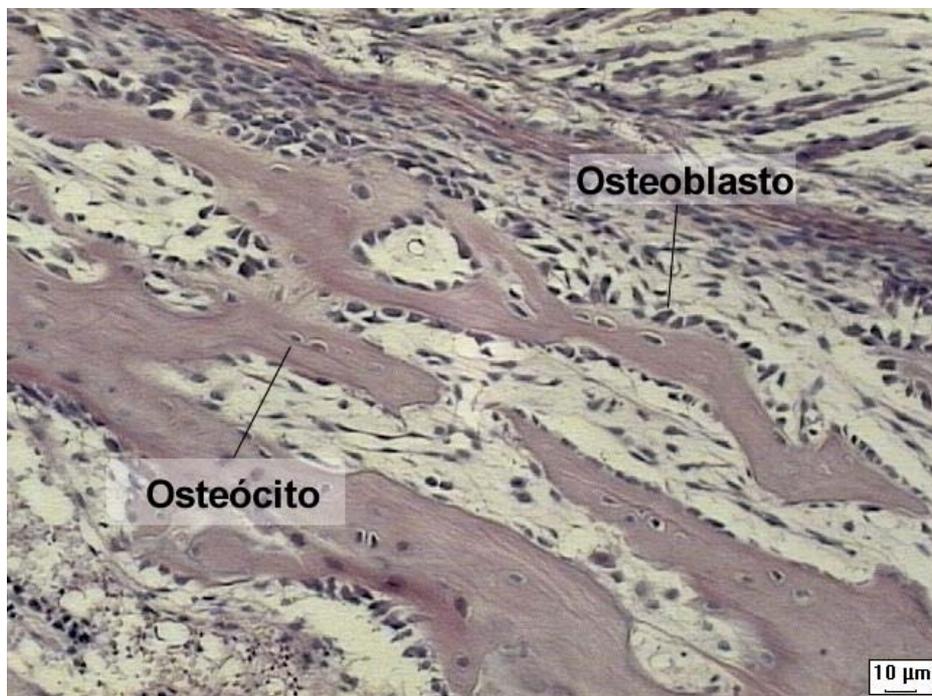


Figura 2.1 - Corte histológico de tecido ósseo (PUCRS, 2002).

Sabe-se que a diferenciação dos osteoclastos é basicamente dependente de sinalizações produzidas pela linhagem osteoblástica. Osteoblastos secretam fatores estimuladores de colônias de macrófagos, além de apresentarem na sua membrana um receptor ativador do ligante RANKL. Esse ligante tende a se ancorar ao receptor RANK presente na membrana de precursores osteoclásticos. Além disso, os osteoblastos secretam a osteoprotegerina que também age como um receptor de RANKL, podendo inibir a diferenciação osteoclástica (YASUDA *et al.*, 1998; MACKIE, 2003).

Quanto a estrutura macroscópica o osso se apresenta de duas formas: osso cortical ou compacto e osso esponjoso ou trabecular. O osso cortical consiste na camada mais externa e é formado por uma estrutura bastante densa (figura 2.2). A parte mais interna do osso, ou trabecular, tem uma aparência esponjosa, constituída de uma enorme quantidade de poros interconectados que acomodam a medula óssea.



Figura 2.2 - Seção longitudinal de um fêmur mostrando a parte cortical e trabecular do osso (DOROZHKIN & EPPLE, 2002).

Existem dois processos de desenvolvimento que levam à formação de osso: ossificação intramembranosa e ossificação endocondral (MARKS & ODGREN, 2002). O primeiro diz respeito à formação da maior parte dos ossos do crânio, e envolve células mesenquimais que se diferenciam em osteoblastos. Esses osteoblastos diferenciados tendem a secretar osteóide que, posteriormente, é mineralizada dando origem ao osso. Na ossificação endocondral, um esboço ósseo cartilaginoso é inicialmente formado e, em seguida, com a participação dos osteoclastos, é colonizado por células mesenquimais que se diferenciam em osteoblastos e iniciam a deposição de osteóide sobre o tecido cartilaginoso remanescente.

2.1.1. MATRIZ ÓSSEA MINERALIZADA

O tecido osteóide pode ser definido como a matriz extracelular óssea não mineralizada secretada pelos osteoblastos nas fases iniciais de formação do osso. O processo de mineralização do osteóide começa a ocorrer em momentos posteriores à sua produção. Os osteoblastos nunca estão diretamente apoiados sobre a matriz mineralizada e sim sobre uma fina camada de osteóide ligeiramente acima da parte mineralizada (PRELE *et al.*, 2003). A matriz mineralizada é composta basicamente de

uma fase inorgânica de sais de fosfato de cálcio, principalmente hidroxiapatita (HA), $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, depositada em fibras de colágeno. Essa apatita é comumente chamada de apatita biológica e se caracteriza por ser deficiente em cálcio, além de conter substituintes iônicos em sua estrutura. Um desses substituintes é o carbonato que está presente em proporções que variam de 4 a 7,4% em peso, o que explica o fato de se definir essa fase mineral, muitas vezes, como carboapatita ou dahlita (DOROZHKIN & EPPLE, 2002). Além do carbonato, vários outros íons e mesmo moléculas agem como substituintes, por exemplo, Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Cl^- , F^- e H_2O . À medida que a idade vai aumentando a razão Ca/P desta apatita tende a se aproximar de 1,67.

A estrutura da maioria dos tecidos que compõem o corpo dos vertebrados tem como base principal o colágeno. Seres vivos primitivos, como águas-vivas, esponjas e anêmonas sugerem que essa proteína surgiu num dos primeiros estágios de evolução das espécies (BERGEON, 1967).

Como toda proteína, o colágeno é formado por ligações seqüenciadas de polipeptídeos. Cada polipeptídeo pode ser definido como um polímero cujas unidades básicas são associações entre os 20 aminoácidos essenciais presentes no corpo humano. No colágeno, as cadeias de polipeptídeos são entrelaçadas de forma a originar uma estrutura em tripla hélice macromolecular chamada de tropocolágeno (figura 2.3). Várias macromoléculas de tropocolágeno se juntam para dar origem a uma fibrila de colágeno que, por sua vez, se agrupam para formar uma fibra de colágeno.

O peso de uma molécula de tropocolágeno gira em torno de 300.000D e cada unidade de polipeptídeo que compõe o tropocolágeno é constituída de aproximadamente 1000 aminoácidos. De cada três aminoácidos, um é glicina, que consiste no mais simples aminoácido essencial. Os dois outros aminoácidos mais comuns no colágeno são a prolina e a hidroxiprolina; este último parece deter o importante papel de estabilizar a tripla hélice (RAMACHANDRAN, 1967; NIMNI, 1995; MARTINS & GOISSIS, 1996; CUERONET, 2002).

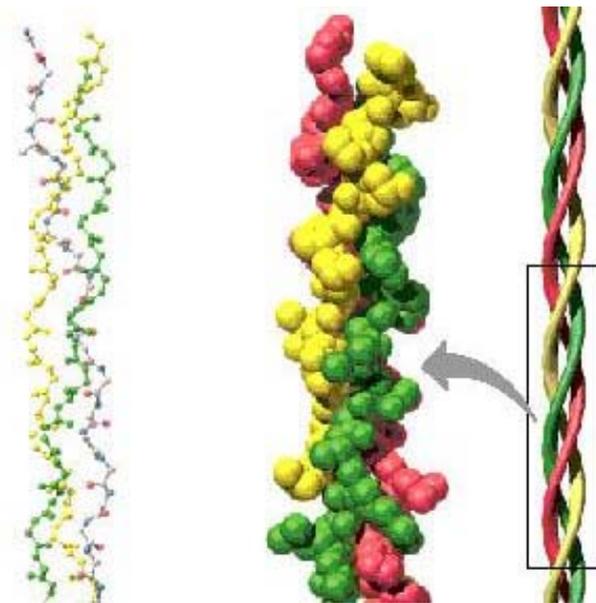


Figura 2.3 - Organização estrutural do tropocolágeno (CUERONET, 2002).

As cadeias de tropocolágeno na fibrila são orientadas entre si de acordo com a afinidade química de cada região da molécula pelos grupos da molécula mais próxima. Esta organização dá origem a zonas periódicas onde a quarta molécula coincide com a primeira (figura 2.4).

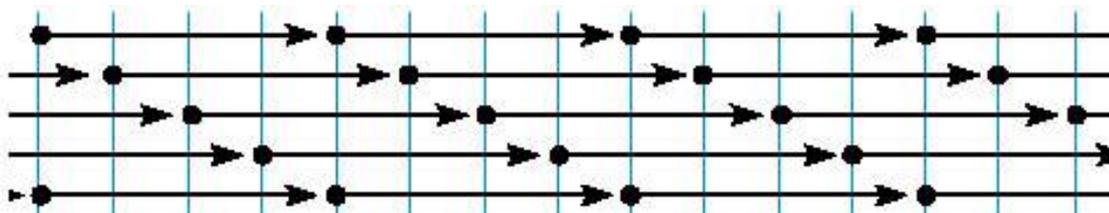


Figura 2.4. Estrutura das fibrilas em matrizes de colágeno. Cada seta corresponde a uma molécula de tropocolágeno (CUERONET, 2002).

As células produtoras de colágeno, como osteoblastos e, principalmente, fibroblastos, não sintetizam as fibrilas e sim moléculas de tropocolágeno. Tão logo essas moléculas entram em contato com o fluido biológico, a orientação acontece naturalmente entre elas em função da tendência à estabilização, observada através do aumento da entropia do sistema (CHEN *et al.*, 1995; NIMNI, 1995).

Nos tecidos humanos são reconhecidos hoje mais de 15 tipos de colágenos, diferindo entre si, pela composição química e associações entre as cadeias polipeptídicas. Alguns tecidos contêm exclusivamente um dos tipos de colágeno, outros

são formados por misturas. O tecido ósseo é constituído basicamente de colágeno tipo I, onde a tripla hélice é formada por duas cadeias idênticas de polipeptídios e uma diferente (LEE *et al.*, 2001).

A deposição da fase mineral óssea se dá, geralmente, entre as moléculas de tropocolágeno que compõem as fibrilas do colágeno, gerando um verdadeiro biocompósito (LAWSON & CZERNUSZKA, 1998; LEE *et al.*, 2001; DOROZHKIN & EPPLE, 2002). Os cristais de apatita biológica se organizam na forma de placas alongadas na direção do eixo cristalográfico *c*, paralelamente as fibrilas (ver figura 2.5). Tal organização estrutural é a responsável por todas as propriedades mecânicas observadas no osso.

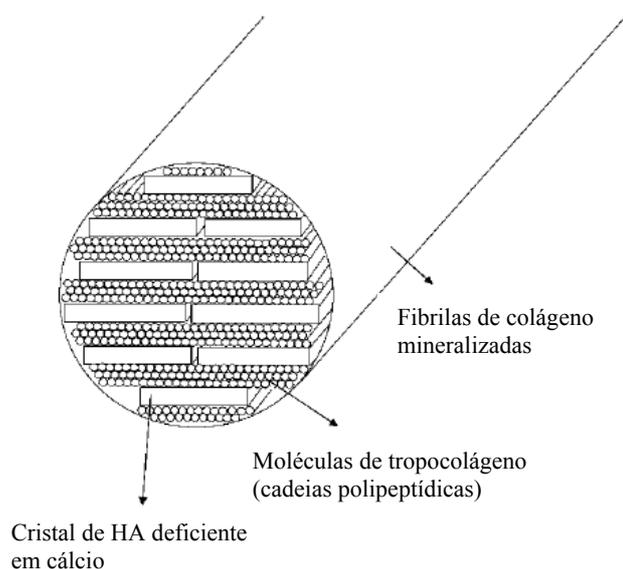


Figura 2.5 - Modelo da acomodação dos cristais de apatita no interior das fibrilas de colágeno (modificado de DOROZHKIN & EPPLE, 2002).

Recentemente, essa organização hierárquica vem sendo simulada em sínteses com relativo sucesso (HARTGERINK *et al.*, 2001; SENA *et al.*, 2004). No entanto, a interface cristais de apatita biológica/colágeno ainda é pouco compreendida.

2.2. BIOMATERIAIS

Biomateriais são definidos como todo e qualquer material, sintéticos ou não, que podem ser utilizados no corpo humano de forma a substituir, em parte ou de todo, algum tecido ou órgão do corpo. Para que um material seja classificado dessa forma é preciso que apresente propriedades físicas, químicas e biológicas compatíveis com os

tecidos vivos hospedeiros, de modo a estimular uma resposta adequada do mesmo. Tais propriedades caracterizam a biocompatibilidade (SEPÚLVEDA *et al.*, 1999).

Biomateriais são utilizados desde as civilizações mais antigas: olhos artificiais, orelhas, dentes e até narizes foram notificados em múmias egípcias. Chineses e indianos já usavam ceras, resinas e tecidos para reconstruir partes perdidas ou defeitos do corpo. Ao longo dos séculos, avanços nos tipos de materiais sintéticos, técnicas cirúrgicas e métodos de esterilização vêm permitindo o uso de biomateriais em partes do corpo nunca antes imaginadas (RAMAKRISHNA *et al.*, 2001). Além disso, esses materiais são produzidos para serem usados em tecidos do corpo que experimentam níveis consideravelmente altos de agressividade. O pH nos fluidos corpóreos de vários tecidos varia sob faixas bastante amplas (1 a 9 em alguns casos). Cotidianamente os ossos são submetidos a tensões de até 4 MPa enquanto os tendões e ligamentos suportam entre 40 e 80 MPa. Estas tensões são flutuantes e repetitivas, o que torna o ambiente ainda muito mais agressivo (BLACK, 1992). Os biomateriais para enxertos ósseos podem ser classificados de acordo com a resposta dada pelo organismo em:

Bioinertes

Materiais que não desenvolvem no organismo qualquer tipo de citotoxicidade, carcinogênese, e apresentam uma pequena ou total ausência de resposta imune. No entanto, estes materiais tendem a ser envolvidos por uma cápsula fibrosa que o isolam do meio vivo (CASTNER & RATNER, 2002).

Bioativos

Esses materiais tendem a estabelecer um elevado grau de interação com o tecido vivo promovendo adesões muito mais fortes tecido/implante, sem a formação de invólucros fibrosos (HENCH, 1998; CASTNER & RATNER, 2002).

Osteocondutores

O material permite a invasão, a adesão e a proliferação de células do tecido hospedeiro em seu interior, bem como, a sua vascularização, promovendo uma rápida integração implante/tecido (PILLIAR, 2001). Um material osteocondutor direciona o

reparo em locais onde a cicatrização ocorreria, sem utilização de enxertos, de forma precária (BURG *et al.*, 2000).

Osteoindutores

A osteoindução é definida como a capacidade do material em estimular a diferenciação de células pluripotenciais (osteoprogenitoras) em osteoblastos pela ação de moléculas bioativas presentes na superfície do biomaterial. Esse processo tende a acelerar a taxa de formação do novo tecido (PILLIAR, 2001; BOYAN *et al.*, 1999; BURG *et al.*, 2000). Materiais osteoindutores permitem a regeneração óssea em locais onde, sem a utilização de enxertos, ela não seria possível (BURG *et al.*, 2000).

2.2.1. MATERIAIS BIOMIMÉTICOS

A maior parte dos exoesqueletos produzidos por invertebrados marinhos, como os corais, constitui-se em arcabouços ideais para a regeneração óssea devido tanto a sua semelhança estrutural com o osso quanto à completa interconexão de poros, tão requeridas para uma efetiva neovascularização e invasão tecidual (PETITE *et al.*, 2000; LOUISIA *et al.*, 1999).

O uso dessas estruturas inorgânicas naturais, em reparos do tecido ósseo, tem sido motivado pela grande dificuldade em se produzir sinteticamente materiais que associem alta porosidade e resistência mecânica compatível com o osso. No entanto, tratando-se de recursos naturais finitos, aspectos ecológicos tendem a inibir sua utilização.

O biomimetismo é definido como sendo o desenvolvimento de materiais que imitam a estrutura e função de materiais criados pela natureza. Em vários casos, o biomimetismo não chega a buscar uma cópia idêntica e sim conceitos-chaves do sistema biológico que podem ser adaptados dentro do contexto de síntese (ALMQVIST *et al.*, 1999). Logo, materiais biomiméticos são, geralmente, muito menos complexos que seus correspondentes naturais e, estruturas hierarquicamente organizadas como as que são vistas entre colágeno e hidroxiapatita no tecido ósseo, ainda não foram convenientemente produzidas pela engenharia.

Além da preocupação com a manufatura de um arcabouço estrutural perfeito para o desenvolvimento de células, a mimetização da composição química superficial também deve ser considerada. Arcabouços apenas osteocondutores não se constituem em matrizes suficientemente eficazes para serem utilizadas pela engenharia de tecidos. Buscam-se materiais que, além de proporcionarem invasão tecidual e neovascularização, promovam a osteogênese. Um dos maiores avanços nessa área tem sido a purificação e a caracterização de famílias de proteínas indutoras como as proteínas morfogenéticas do osso (BMPs) e proteínas osteogênicas (OPs). Essas proteínas induzem a neoformação óssea *in vivo* (RIPAMONTI & DUNEAS, 1998). O uso de tais proteínas resulta em novas possibilidades de intervenções terapêuticas pela engenharia de tecidos (RIPAMONTI, 1999).

Outra possibilidade de criação de biomateriais osteoindutivos gira em torno da modificação superficial do biomaterial com seqüências de aminoácidos que são reconhecidas pelas células, tais como a RGD (Arg-Gly-Asp) (QUIRK *et al.*, 2001). Desde a identificação desta seqüência peptídica como uma das mediadoras da adesão celular, várias proteínas do plasma e da própria matriz extracelular do tecido, incluindo fibronectina, vitronectina, colágeno tipo I, osteopontina e sialoproteínas ósseas, vêm sendo utilizadas em associação a biomateriais. YANG *et al.* (2001) demonstraram o potencial de promoção da diferenciação de células osteoprogenitoras humanas sobre arcabouços biodegradáveis recobertos com RDG.

Outras seqüências de aminoácidos que não contêm RGD também agem como promotoras da adesão celular, tais como YIGSR (Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg) e IKVAV (Ile-Lys-Val-Ala-Val) na laminina, REDV (Arg-Glu-Asp-Val) e LDV (Leu-Asp-Val) na fibronectina e DGEA (Asp-Gly-Glu-Ala) no colágeno tipo I (TIRRELL *et al.*, 2002).

2.2.2. FOSFATOS DE CÁLCIO

Existe uma grande quantidade de fosfatos de cálcio na natureza e vários desses são vistos em calcificações normais e patológicas no corpo humano. Além da solubilidade, a razão Ca/P é um parâmetro que diferencia a maior parte desses fosfatos. Para compostos quimicamente puros essa razão varia entre 0,5 e 2,0 sendo que quanto

menor é a razão maior é a sua acidez e a sua solubilidade em água (DOROZHKIN & EPPLE, 2002). A hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ possui razão Ca/P 1,67 e é o fosfato de cálcio mais estável e menos solúvel de todos (tabela 2.1).

A HA pura cristaliza sob a forma monoclinica com espaçamento de grupo $P2_1/b$, no entanto, a temperaturas acima de $250^\circ C$, existe a transição da forma monoclinica para a hexagonal com espaçamento de grupo $P6_3/m$ (ELLIOT, 1998; KIM *et al.*, 2000). Algumas impurezas, ou substituições parciais da hidroxila por íons cloreto ou fluoreto, estabilizam a forma hexagonal a temperatura ambiente. Por esse motivo, monocristais naturais de HA geralmente exibem uma conformação hexagonal (DOROZHKIN & EPPLE, 2002). Sua densidade é $3,16 \text{ Kg/m}^3$ e os parâmetros de rede são: $a = b = 0,9423 \text{ nm}$ e $c = 0,6875 \text{ nm}$ (AOKI, 1994). Na figura 2.6 pode-se ver o arranjo de uma célula unitária da HA.

Tabela 2.1 - Propriedades de fosfatos de cálcio biologicamente importantes. O K_{ps} refere-se ao produto de solubilidade (FERNANDEZ *et al.*, 1999a; FERNANDEZ *et al.*, 1999b).

Razão Ca/P	Composto	Fórmula química	Solubilidade a $25^\circ C$ ($-\log K_{ps}$)	Solubilidade a $37^\circ C$ ($-\log K_{ps}$)
0,5	fosfato monocalcico hidratado (MCPM)	$Ca(H_2PO_4)_2 \cdot H_2O$	1,14	-
0,5	fosfato monocalcico anidro (MCPA)	$Ca(H_2PO_4)_2$	1,14	-
1,0	fosfato bicalcico bihidratado (DCPD, bruxita)	$CaHPO_4 \cdot 2H_2O$	6,59	6,63
1,0	fosfato bicalcico anidro (DCPA, monetita)	$CaHPO_4$	6,90	7,02
1,33	fosfato octacalcico (OCP)	$Ca_8(HPO_4)_2(PO_4)_4 \cdot 5H_2O$	96,6	95,9
1,5	fosfato α -tricalcico (α -TCP)	$\alpha-Ca_3(PO_4)_2$	25,5	25,5
1,5	fosfato β -tricalcico (β -TCP)	$\beta-Ca_3(PO_4)_2$	28,9	29,5
1,2-2,2	fosfato de cálcio amorfo (ACP)	$Ca_x(PO_4)_y \cdot nH_2O$	25,7 (pH 7,40)	29,9 (pH 6,00)
1,5-1,67	hidroxiapatita deficiente em cálcio (CDHA)	$Ca_{10-x}(HPO_4)_x(PO_4)_{6-x}(OH)_{2-x}$ ($0 < x < 1$)	$\approx 85,1$	$\approx 85,1$
1,67	hidroxiapatita (HA)	$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$	116,8	117,2
2,0	fosfato tetracalcico (TTCP)	$Ca_4(PO_4)_2O$	38-44	37-42

A síntese da HA pode ser conduzida através de uma reação em meio aquoso, por intermédio de reagentes contendo íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} em pH acima de 9 (AOKI, 1994). As reações podem ser do tipo ácido-base:

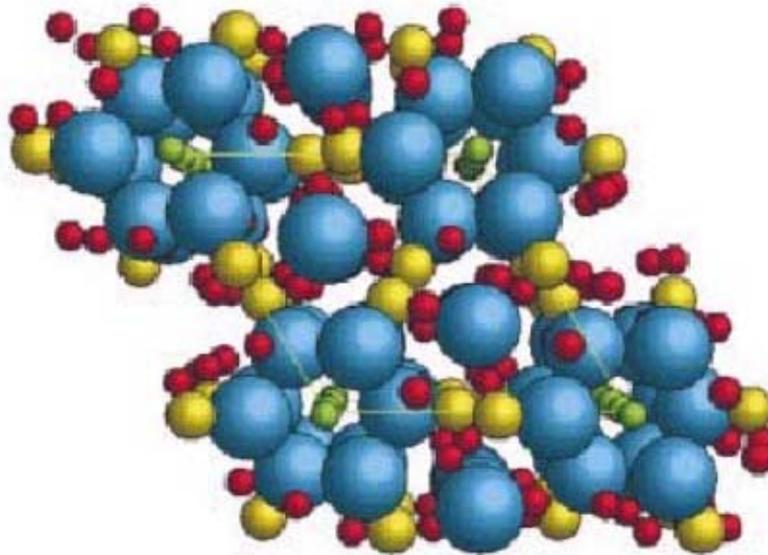


Figura 2.6. Rede cristalina da hidroxiapatita (CBPF, 2002).

Ou entre dois sais:



Hidroxiapatita cristalina pode ser obtida mais eficientemente por meio de reações em estado sólido entre fosfatos de cálcio e CaO , $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ou CaCO_3 , com temperaturas acima de 900°C e em atmosfera constituídas de H_2O e N_2 . Um exemplo é a reação entre a brushita e o carbonato de cálcio:



Monocristais de HA podem ser conseguidos por síntese hidrotérmica (AOKI, 1994; ELLIOT, 1998; DOROZHKIN & EPPLE, 2002).

Ao contrário da HA, o fosfato tricálcico (TCP), $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, nunca ocorre em calcificações biológicas, exceto a sua forma contendo magnésio $(\text{Mg,Ca})_3(\text{PO}_4)_2$. De fato, estudos recentes mostram que o TCP puro não tem propriedades osteocondutoras (HANDSCHEL *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 2004). Apesar disso, o TCP associado a HA dá origem às chamadas cerâmicas bifásicas (MONCHAU *et al.*, 2002; HAO, *et al.*, 2003; KASTEN *et al.*, 2003), que vêm sendo amplamente utilizadas como enxertos ósseos.

O TCP não pode ser precipitado de solução, estando sua produção associada à transformação de fase em estado sólido de hidroxiapatitas deficientes em cálcio submetidas a temperaturas acima de 800°C . Existem duas formas alotrópicas de TCP: α -TCP e o β -TCP. A forma α é metaestável a temperatura ambiente sendo produzida pelo aquecimento da forma β acima de 1125°C . O α -TCP é mais instável em meio aquoso podendo ser hidrolisado a misturas de outros fosfatos.

A solubilidade do TCP em água é, consideravelmente, mais elevada do que a da HA nas mesmas condições. Logo, cerâmicas bifásicas quando implantadas são passíveis de uma degradação muito mais rápida do que aquela observada para a HA. Isso pode ser interessante quando se objetiva uma substituição controlada do material implantado por tecido novo. Por outro lado, existem pelo menos duas questões ligadas ao uso de cerâmicas bifásicas que ainda não foram devidamente esclarecidas. A primeira está relacionada à concentração ideal de TCP requerida para se equilibrar a taxa de degradação do material com a taxa de formação do novo tecido. Provavelmente, esse valor deve variar de acordo com a região do implante e com o tamanho da lesão, tornando ainda mais difícil qualquer tentativa de avaliação. A segunda questão está ligada ao comportamento celular frente a essa dissolução. Ou seja, como células individuais reagem a uma superfície mecanicamente instável, onde partículas cerâmicas e grandes quantidades de íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} são liberados?

2.2.3. FORMAÇÃO DE APATITAS BIOLÓGICAS

Qualquer solução que contenha quantidades suficientemente altas de íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} está sujeita à precipitação do chamado fosfato de cálcio amorfo (ACP), $\text{Ca}_x(\text{PO}_4)_y \cdot n\text{H}_2\text{O}$ (DOROZHKIN & EPPLE, 2002). Esse fosfato amorfo é tido como um produto de transição que leva à formação de fosfatos de cálcio mais cristalinos, em soluções aquosas.

Sabe-se que o fosfato octacálcico (OCP) e hidroxiapatitas deficientes em cálcio (CDHA) têm energias de formação mais baixas que apatitas cristalinas, termodinamicamente mais estáveis. A taxa de cristalização do OCP a 37°C e pH 6,0 é muito maior do que a da HA (ELLIOT, 1994). Logo, o OCP vem sendo descrito como o precursor de apatitas em solução aquosa (BROWN *et al.*, 1987). A mudança estrutural de OCP para HA pode se dar também por meio de transformação de fase em estado sólido.

Em 1971, HENCH *et al.* descobriram que quando vidros, com determinadas composições químicas, eram colocados em contato com fluido biológico, várias alterações químicas da superfície aconteciam, tornando a superfície do material completamente diferente do seu interior. Foi descoberta uma seqüência de, pelo menos, três estágios de reações superficiais que resultavam na formação de uma fina camada de apatita sobre a superfície de tais vidros (figura 2.7).

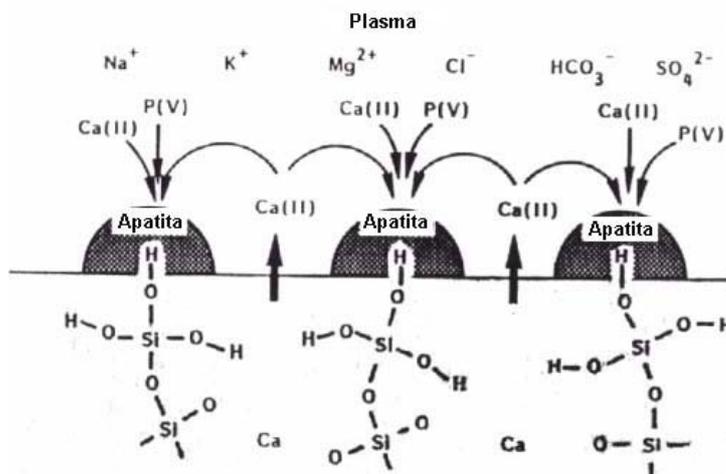


Figura 2.7 - Modelo sobre a formação de apatitas biológicas na superfície de biovidros (modificado de DUCHEYNE & KOKUBO, 1992).

A lixiviação superficial foi descrita como o primeiro estágio de transformação, onde cátions de metais alcalinos ou alcalino-terrosos superficiais eram trocados por íons H_3O^+ . Os grupamentos hidroxilas surgidos após essa troca iônica promoviam a quebra das ligações siloxana (Si-O-Si) e o silício era liberado na forma de $Si(OH)_4$. A superfície hidratada rica em grupos silanóis (Si-OH) tendia a sofrer um processo de expansão e policondensação dando origem a uma camada rica em sílica gel hidratada. O terceiro estágio era caracterizado por reações de precipitação. Os íons cálcio provenientes do próprio vidro ou vindos da solução reagiam com o fósforo em solução, sendo precipitados sobre a primeira camada de sílica hidratada (figura 2.7). A camada formada, rica em cálcio e fósforo, era inicialmente amorfa, sendo associada ao ACP. No entanto, a incorporação subsequente de substituintes, como carbonato e hidroxilas, tendia a aumentar a cristalinidade do material dando origem a uma carboapatita deficiente em cálcio, bastante semelhante à fase mineral óssea. Logo, os vidros que desenvolviam esse comportamento passaram a ser chamados de biovidros.

A partir daí, comportamentos superficiais semelhantes começaram a ser notados não só nos biovidros, mas também em HA implantadas (BECKHAM, *et al.*, 1971; HEUGHEBAERT *et al.*, 1988) e cerâmicas bifásicas (LEGEROS *et al.*, 1990; LEGEROS *et al.*, 1992). Mais tarde descobriu-se que mesmo materiais considerados inertes, como o Ti, podiam ser recobertos com tal camada quando em contato com soluções inorgânicas simuladoras do plasma sanguíneo (SBF) (KOKUBO, 1991; ANDRADE *et al.*, 2002). Uma maneira relativamente eficiente de se caracterizar a bioatividade dos materiais foi desenvolvida com base nesses estudos. O grau de bioatividade de um material passou a ser avaliado pela sua capacidade de formação de camadas de apatitas superficiais.

Exatamente duas décadas depois de Hench, Kokubo nomeou mais precisamente essas camadas formadas em superfícies, como apatitas biológicas (*bone-like layers*) (KOKUBO, 1991; OHTSUKI *et al.*, 1991). Desde então, numerosos estudos sobre a sua formação têm sido publicados. Hoje, o termo apatita biológica parece ter, pelo menos, três significados distintos: (a) apatitas, (b) apatitas deficientes em cálcio ou carbonatadas e (c) agrupamentos de pequenos nódulos cristalinos (KOKUBO, 2002).

Sabe-se que todo biomaterial, logo após entrar em contato com o tecido ósseo, tende a desenvolver uma camada de apatita biológica. A única diferença entre os vários tipos de biomateriais existentes está na cinética de deposição dessa apatita. No entanto, tais camadas são ricas em proteínas do plasma, diferentemente daquelas conseguidas em soluções de SBF *in vitro*. Mais recentemente, apatitas biológicas quimicamente semelhantes àquelas observadas *in vivo* têm sido conseguidas pela incorporação de proteínas às soluções de SBF (SERRO *et al.*, 1997; LIN *et al.*, 2001). Outro meio de se obter camadas ricas em proteínas é a incubação dos materiais em soro ou, no caso de cultura de células, no próprio meio de cultivo suplementado com soro (KIZUKI *et al.*, 2003).

2.3. INTERAÇÃO CÉLULA/BIOMATERIAL

A adesão celular influencia vários fenômenos naturais, tais como, embriogênese, manutenção estrutural dos tecidos, cicatrização, resposta imune, metástases, além da própria integração biomaterial/tecido. A biocompatibilidade está diretamente ligada ao comportamento celular frente à superfície do material (ANSELME, 2000). O termo adesão é uma expressão geral que parece englobar vários fenômenos que acontecem até que a célula esteja estável sobre o material: adsorção, adesão e espreadimento (figura 2.8).

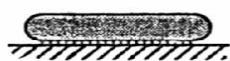


Figura 2. 8. Ilustração sobre as etapas envolvidas no processo de adesão celular: adsorção, adesão e espreadimento (de cima para baixo).

A aproximação da célula ao biomaterial é o primeiro passo para a adesão e, geralmente, envolve atrações físicas de caráter eletrostático, como atrações coulombiana e de van der Waals. Uma vez que a membrana celular lipídica desenvolve carga superficial de acordo com o pH do meio essas atrações são facilitadas. No entanto, falar sobre uma adesão efetiva nesse estágio somente por conta dessas forças é algo errôneo, uma vez que qualquer força cisalhante aplicada sobre a célula seria o suficiente para desestabilizá-la. Além disso, a etapa de aproximação é dificultada ainda mais pelo impedimento estérico causado pelas cadeias proteicas que se projetam a partir da membrana celular (KOLLER & PAPOUTSAKIS, 1995; ANSELME, 2000). Essa fase está intimamente ligada à adsorção física das células sobre o material sem, no entanto, haver qualquer tipo de interações específicas (proteínas) célula/biomaterial.

A segunda fase descrita diz respeito à fase de adesão propriamente dita. Várias biomoléculas como proteínas da matriz extracelular, proteínas da membrana celular e proteínas do citoesqueleto são envolvidas nessa fase. O reconhecimento da superfície pelas células é intermediado por proteínas que conduzem sinais de transdução até o núcleo celular. No núcleo, por sua vez, fatores de transcrição que regulam a expressão genética celular, são produzidos (ANSELME, 2000).

A matriz extracelular óssea é constituída de aproximadamente 90% de proteínas colagenosas (colágeno I e IV), 10% de proteínas não colagenosas (osteocalcina, osteonectina, sialoproteínas, glicoproteínas, osteopontina e fibronectina), fatores de crescimento e proteínas morfogenéticas ósseas. Todas elas são sintetizadas pelos osteoblastos e muitas delas atuam nesse processo de adesão celular (ANSELME, 2000; ANSELME *et al.*, 2000).

2.3.1. PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA ADESÃO CELULAR

Muitas das proteínas presentes na matriz extracelular detêm quimiotaxia ou propriedades adesivas por efeito de uma seqüência de aminoácidos RGD (Arg-Gly-Asp) que é reconhecida seletivamente pelos receptores distribuídos ao longo da membrana celular: integrinas (figura 2.9) (MALAVAL *et al.*, 1996; GRZESIK & ROBEY, 1994).

Algumas pesquisas mostram que seqüências sintéticas de GRGDS (Gly-Arg-Gly-Asp-Ser) são inibidoras da adesão celular (GRZESIK & ROBEY, 1994). Isso sugere que do mesmo modo que existem seqüências que facilitam a adesão outras são inibidoras. A resistência com que as células se ligam ao substrato varia conforme a seqüência associada ao processo. Células da calvária de ratos apresentaram uma melhor adesão sobre superfícies recobertas com RGD do que com RGE (REZANIA *et al.*, 1997). Mesmo a conformação espacial dessas moléculas parece influenciar a adesão de células osteoprogenitoras (VERRIER *et al.*, 1998).

Os sítios de adesão célula/biomaterial são chamados de contatos focais e a sua parte exterior é formada pelas integrinas. As integrinas são famílias de heterodímeros que consistem em associações não covalentes entre unidades α e β (figura 2.9).

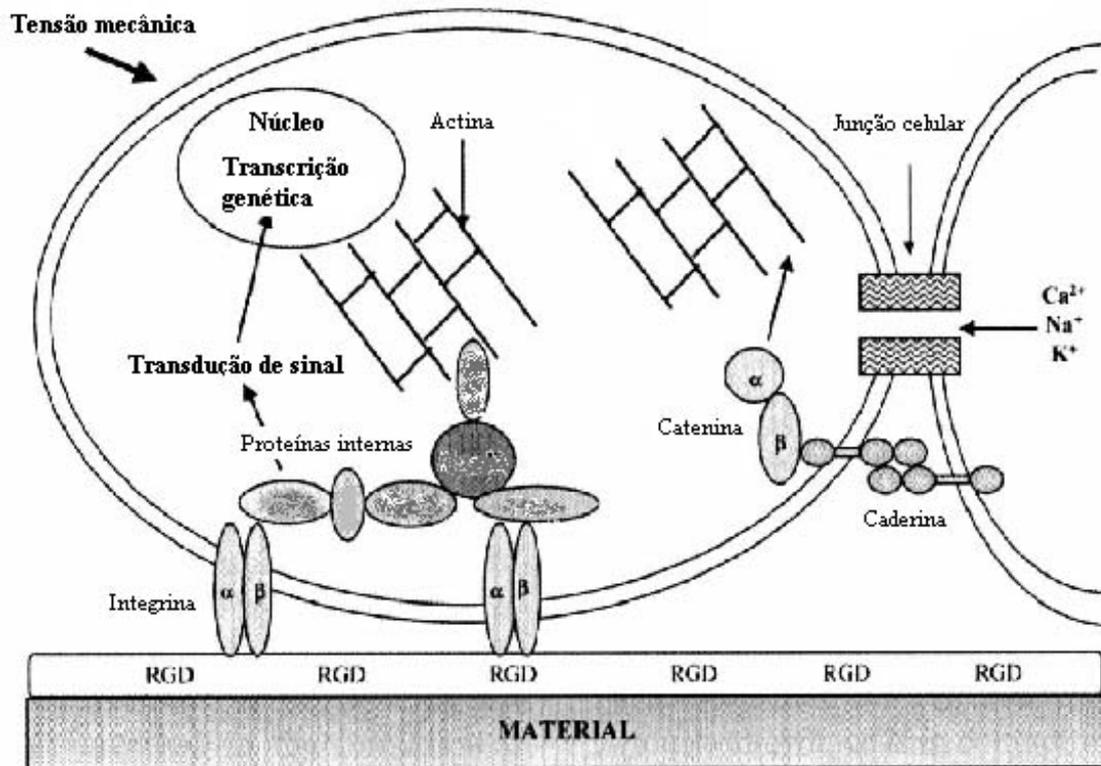


Figura 2.9. Ilustração da adesão celular sobre um material recoberto com RGD (modificado de ANSELME, 2000).

Cada integrina possui uma parte extracelular, uma parte membranar e outra parte menor citoplasmática. Esses heterodímeros se ligam a proteínas internas como talina e vinculina (figura 2.9). A ligação de todas essas proteínas, desde as integrinas até as

proteínas internas, serve para transmitir sinais de reconhecimento superficial até o interior da célula. As informações chegam ao núcleo celular por meio de reações bioquímicas que se propagam no citoplasma. Ao sinal favorável de adesão o núcleo estimula a produção de feixes de proteínas do citoesqueleto que são arranjados em sua periferia próximo à membrana celular estruturando as projeções celulares e facilitando a adesão (CRAIG & JOHNSON, 1996; ANSELME, 2000).

2.3.2. DIFERENCIAÇÃO

Células tronco pluripotenciais provenientes de embriões humanos são cultivadas com sucesso e podem se diferenciar nos mais diversos tipos de tecido e órgãos do corpo de acordo com o meio em que elas se encontram. Por essa razão, elas são vistas como tendo uma capacidade ilimitada de recomposição de tecidos do corpo danificados (THOMSON *et al.*, 1998). No entanto, questões éticas impedem o desenvolvimento de tais propósitos. Atualmente, uma grande atenção tem sido dada a células-tronco mesenquimais extraídas da medula óssea que podem se diferenciar, de igual modo, em células de vários tecidos (GERSON, 1999) (figura 2.10).

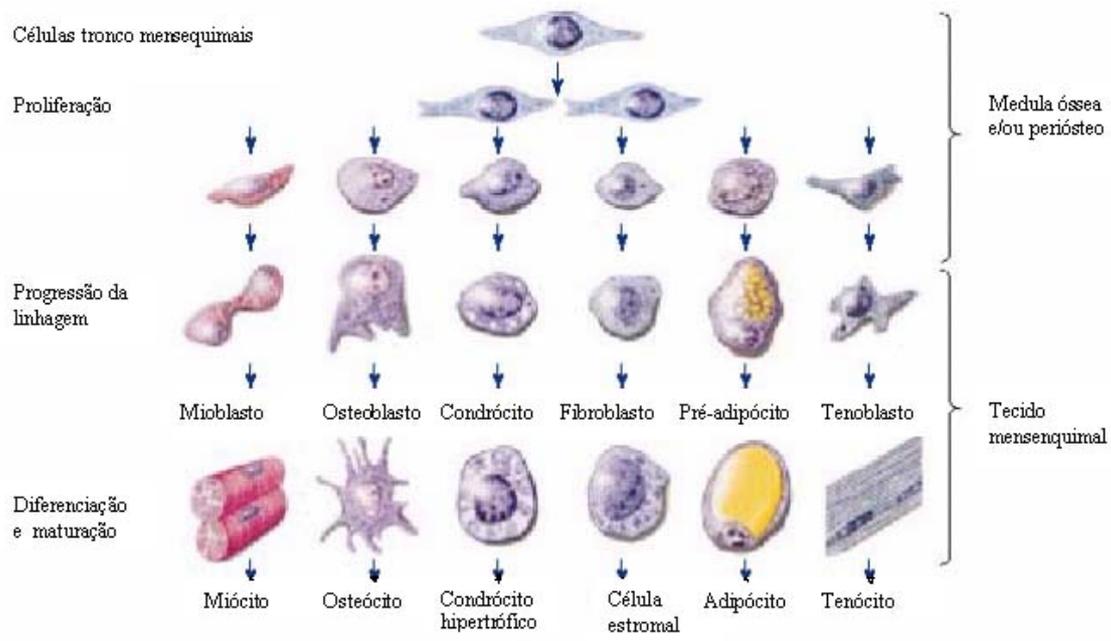


Figura 2.10. Esquema sobre a diferenciação de células-tronco mesenquimais em células de vários tecidos (modificado de RISBUD & SITTINGER, 2002).

Após a fase de adesão, em que a célula estabelece o primeiro contato com um substrato que pode representar um biomaterial, vem a fase de espraiamento. Somente a partir desse momento é que a célula começa a expressar o seu fenótipo, sintetizando proteínas da matriz extracelular e adquirindo sua forma específica (CHESMEL *et al.*, 1995).

As variáveis que influenciam no processo de adesão celular parecem influenciar também no processo de diferenciação celular, uma vez que eles estão inteiramente interligados (ANSELME, 2000). As expressões de proteínas como a osteopontina e a sialoproteína por células tronco mesenquimais de ratos são mais intensas sobre HA do que sobre Ti ou vitrocerâmicas (OZAWA & KASUGAI, 1996). Condrócitos adquirem forma poligonal quando em meio contendo fibronectina do plasma. No entanto, quando estão num meio contendo fibronectina celular, sua forma se torna plana e alongada (KOLLER & PAPOUTSAKIS, 1995). HEALY *et al.* (1996) mostraram que células ósseas fixadas sobre um material com diferentes cargas superficiais iniciam a mineralização, preferencialmente, em sítios carregados positivamente.

2.3.3. OUTROS FATORES QUE AFETAM A ADESÃO

Topografia

A comparação do comportamento de osteoblastos sobre biomateriais mostra que eles reagem diferentemente de acordo com a rugosidade superficial do material. Vários trabalhos relatam que superfícies mais rugosas tendem a acomodar melhor as células (DINIZ *et al.*, 2002). KNABE *et al.* (2002) observaram que o crescimento de osteoblastos foi muito mais acentuado e homogêneo sobre as superfícies rugosas quando comparado à superfície polida de titânio. A expressão do fenótipo das células parece estar ligada diretamente, entre outros aspectos, à rugosidade do material (BOYAN & SCHWARTZ, 1999).

ROSA *et al.* (2003) mostraram que a microporosidade de superfície em pastilhas de hidroxiapatita parece não afetar nos momentos iniciais de adesão (até 2h) de osteoblastos murinos sendo que, a longo prazo, a proliferação, síntese de proteínas e a mineralização são favorecidas com o aumento dessa microporosidade. DELIGIANNI *et*

al. (2001) já haviam mostrado anteriormente que a proliferação de osteoblastos humanos está diretamente ligada a rugosidade de superfície.

Materiais macroporosos, ou que possuem poros maiores que as células, desempenham funções diferentes daquelas observadas em materiais microporosos, e ainda podem ser vistos diferentemente quando se fala em poros simples ou interconectados. Poros simples e profundos geralmente não são próprios à invasão celular, uma vez que estes ambientes não apresentam condições favoráveis de circulação de nutrientes e subprodutos do metabolismo celular. A interconexão de poros favorece sobremaneira a migração de células para o interior do implante induzindo uma mais rápida neoformação tecidual e angiogênese.

Sabe-se que poros interconectados menores que 10 μ m inibem a invasão celular, poros entre 15 e 50 μ m propiciam a neovascularização, poros entre 50 e 150 μ m permitem o crescimento da osteóide e acima de 150 μ m facilitam a mineralização da osteóide formada (HULBERT *et al.*, 1973). Um trabalho mais recente (CERRONI *et al.*, 2002) usando pequenos blocos de hidroxiapatita com poros interconectados e células MC3T3-E1 (linhagem osteoblástica), mostrou bons resultados no que se refere à invasão e proliferação celular para volume de poros entre 30 e 60%.

Um outro fenômeno importante causado pela topografia é a orientação celular. Vários trabalhos mostram que ranhuras superficiais nas dimensões celulares induzem a orientação de grupos ou células individuais ao longo do seu eixo (DEN BRABER *et al.* 1995; MATSUZAKA *et al.*, 2003). Essa orientação ocorre pela organização ordenada de células com espraiamento preferencial paralelo às ranhuras. A principal motivação para o estudo detalhado desse fenômeno é a possibilidade de criação de arcaibouços para o desenvolvimento de tecidos direcionalmente organizados, como aqueles verificados em tendões. Além disso, sabe-se que osteoblastos orientados tendem a mineralizar mais rapidamente (BRUNETTE & CHEHROUDI, 1999). Assim, osteointegrações tecido/implante mais eficientes podem ser conseguidas utilizando-se tal fenômeno.

Principalmente em materiais bioinertes como o titânio, ligas metálicas usadas como implante ou polímeros, a topografia da superfície tem um papel fundamental no

aumento da interação célula/substrato, já que não existe qualquer tipo de atrativo químico que facilite a adesão.

Hidrofilicidade

As células de um modo geral preferem substratos hidrofílicos aos hidrofóbicos (ALTANKOV & GROTH, 1995; LIAO *et al.*, 2003). Isso pode ser explicado, em parte, pela própria constituição da membrana celular lipídica que, sendo altamente hidratada, tende a desenvolver melhores contatos com superfícies igualmente hidratadas. Além disso, várias das interações célula/material só são possíveis graças ao caráter hidrofílico desse material. Materiais hidrofóbicos como alguns polímeros densos, quando biocompatíveis, tendem a ser bioinertes e não bioativos. Polímeros altamente hidratados, como os hidrogéis utilizados em reparos dos tecidos moles do corpo são altamente bioativos e estabelecem ligações com tecidos (LESNÝ *et al.*, 2002; AMBROSIO *et al.*, 2002).

Energia de superfície

A energia de superfície influi diretamente sobre dois fenômenos extremamente importantes para uma interação eficiente célula/biomaterial: adsorção de proteínas e aproximação celular. O primeiro estágio logo após a implantação de qualquer material no corpo está associado à adsorção de proteínas na sua superfície. O contato entre as células e o biomaterial é intermediado, portanto, por tais camadas protéicas adsorvidas (ANSELME, 2000; CASTNER & RATNER, 2002).

A presença de grupamentos químicos doadores e receptores de elétrons na mesma molécula fazem das proteínas compostos capazes de serem adsorvidos sobre os mais variados materiais. Assim, os sítios superficiais disponíveis à adsorção de proteínas são formados, basicamente, por afinidades químicas. Tais afinidades se refletem diretamente na energia de superfície dessas regiões. No entanto, mesmo locais onde a química superficial é invariável a energia de superfície pode adquirir grandezas diferentes devido a modificações físicas de superfície. A energia de superfície medida sobre um material pode ser definida, então, como um reflexo das suas características físicas e químicas.

Sabe-se que a aproximação celular também é dirigida, em parte, pela energia de superfície, por meio de afinidades químicas semelhantes às aquelas exibidas por moléculas (KOLLER & PAPOUTSAKIS, 1995). A associação entre a adsorção de proteínas e aproximação celular, regidas pela energia de superfície, parece definir uma maior ou menor adesão de células sobre os materiais. HALLAB *et al.* (2001) mostraram que, sob certas condições, a energia de superfície pode ser mais importante que a rugosidade superficial para uma melhor adesão e proliferação celular. Apesar do grande número de mediadores no processo de adesão celular, SCHAKENRAAD *et al.* (1988) sugeriram que a energia de superfície foi o fator determinante na aproximação de células sobre superfícies poliméricas e superfícies recobertas com camadas de proteínas.

2.4. TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS

2.4.1. TÉCNICAS FÍSICAS

Difração de raios-X (DRX)

Na técnica de DRX um feixe de raio-X é incidido sobre a amostra, em um ângulo tal que permite a sua reflexão. Essa reflexão tende a se dar nos planos atômicos mais superficiais da amostra. Como existe sempre um leve atraso entre um raio que incidiu sobre um plano e outro que incidiu num plano logo abaixo, uma vez que as trajetórias são paralelas, pode-se determinar a distância entre os planos através da lei de Bragg. No plano do detector, as situações que representam interferências construtivas dos raios refletidos são dadas por:

$$n\lambda = 2d\sin\theta \quad 2.1$$

onde:

λ = comprimento de onda

d = distância entre os planos do cristal

θ = ângulo entre a superfície e os raios refletidos

$n = 1, 2, 3, \dots$

Logo, a quantidade de fases presentes, pureza do material, fases simples ou múltiplas, grau de cristalinidade dessas fases, quantidade de fase cristalina em relação a

amorfa e tamanho de cristais, de acordo com os parâmetros de rede do material, podem ser obtidos por esta técnica (LEGEROS *et al.*, 1995).

Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR)

A técnica FT-IR (*Fourier transform infrared spectroscopy*) é um método não destrutivo de análise que está fundamentado no fato de que grupos moleculares absorvem energia em comprimentos de onda definidos do espectro infravermelho provocando vibrações, torções e deformações das ligações interatômicas. A alta especificidade dessa absorção permite a caracterização de quais grupos químicos são sensibilizados em tais comprimentos de onda. A Transformada de Fourier aplicada a esta técnica permite a amplificação dos sinais e da resolução, melhorando a caracterização do material (GRAINGER & HEALY, 1999).

Além de informações sobre a natureza química do material, a técnica FT-IR permite ainda especulações sobre a cristalinidade do material (LEGEROS *et al.*, 1995). Pode-se dizer que tudo que é observado na difração de raios-X também pode ser observado no infravermelho, no entanto, a difração de raios-X não indica a natureza dos constituintes químicos da amostra. Uma das grandes vantagens da análise por infravermelho é que ela pode ser conduzida em líquidos (orgânicos ou inorgânicos) e sólidos (cristalinos ou amorfos).

Espectroscopia de Fotoelétrons por Raios-X (XPS)

A técnica de XPS (*X-ray photoelectron spectroscopy*) também é conhecida como Análise Química por Espectroscopia de Elétrons (ESCA, *electron spectroscopy for chemical analysis*) e se baseia no efeito fotoelétrico descrito por Einstein em 1905. Raios-X que bombardeiam a amostra interagem com seus átomos superficiais energizando alguns elétrons que emergem da amostra sob a forma de fotoelétrons. A medida dessa energia informa sobre a natureza dos átomos superficiais e os tipos de ligações presentes. O XPS pode distinguir entre espécies oxidadas e não oxidadas e pode ser aplicado a todos os materiais sólidos como polímeros e vidros, identificando todos os elementos químicos existentes, exceto hidrogênio e hélio. Informações de átomos em até 10 nm de profundidade da superfície são obtidas desde que estes estejam em concentrações locais superiores a 0,1%. Além disso, essa técnica pode ser conduzida

para superfícies planas ou polidas, rugosas, esféricas ou pós (SLOMKOWSKI *et al.*, 2000), e sem causar danos à superfície (método não destrutivo).

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Na microscopia eletrônica de varredura, um feixe de elétrons acelerados varre toda a superfície da amostra (por meio de lentes eletromagnéticas), gerando vários tipos de sinais (elétrons secundários, elétrons retroespalhados, fótons, raios-X, etc.). Para cada sinal, um detector específico deve ser usado. Elétrons secundários de baixa energia constituem, talvez, o sinal mais importante adquirido por MEV, e são provenientes de profundidades que variam entre 5 e 50nm (profundidade de escape). A emissão de elétrons retroespalhados é aumentada pelo aumento do número atômico dos átomos constituintes, servindo pra obtenção de imagens contrastadas de regiões com diferentes composições.

Como o comprimento de onda associado aos elétrons é bastante reduzido, se consegue aumentos entre 10 e 100000X e uma resolução de 300nm (com 1000X de aumento). Além disso, a profundidade de foco é de até 0,1mm (com 1000X de aumento), permitindo melhores imagens de superfícies rugosas, uma vez que os níveis topográficos da região observada são preservados. Amostras não condutoras devem ser recobertas com uma película condutora de ouro para permitir a produção de eletrosn secundários, impossibilitando o reaproveitamento da amostra (técnica destrutiva). O acoplamento de um sensor EDS (*energy dispersive X-ray spectrometer*) pode ainda qualificar e semiquantificar elementos químicos presentes na amostra, no que se conhece como microanálise por raio-X (FARINA, 1998; GRAINGER & HEALY, 1999; MANNHEIMER, 2002).

Ângulo de contato

A medida do ângulo de contato é baseada na avaliação morfológica de uma gota de líquido sobre uma superfície sólida. Essa avaliação é feita por meio de um aparelho denominado Goniômetro, próprio para a determinação do ângulo θ formado entre a superfície sólida e a tangente ao líquido sobre o sólido, partindo de um vértice comum (figura 2.11).

De uma relação vetorial entre as diferentes tensões interfaciais envolvidas, temos a equação de Young (KWOK & NEUMANN, 1999)

$$\gamma_{SV} = \gamma_{SL} + \gamma_{LV}\cos\theta \quad 2.2$$

onde, γ_{SV} , γ_{SL} e γ_{LV} são, respectivamente, as tensões interfaciais sólido-vapor, sólido-líquido e líquido-vapor. O valor numérico obtido θ pode ser usado em várias determinações características da superfície estudada. O grau de molhabilidade da superfície e previsões do comportamento de líquidos de naturezas diferentes sobre o mesmo material podem ser facilmente obtidos. Ou seja, a hidrofilicidade ou hidrofobicidade das superfícies podem ser avaliadas assim. Mais detalhadamente, pode-se avaliar a energia livre superficial (ΔG_s), trabalho de adesão (W_{ad}) e ainda as componentes polares (γ_s^P) e dispersivas (γ_s^D) que compõem a tensão superficial (γ_s). Existem vários métodos para determinação do ângulo de contato. Pela facilidade, o método brevemente descrito acima (Método da Gota) e seu inverso (Método da Bolha) são os mais usados em superfícies sólidas. No entanto, métodos menos diretos, como o da Ascensão Capilar, são usados em sistemas mais complexos como, por exemplo, sólidos particulados.

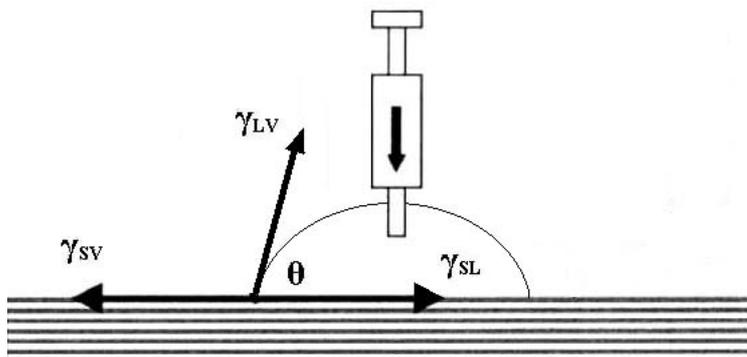


Figura 2.11 - Modelo representando o Método da Gota usado na determinação da energia de superfície pela molhabilidade.

2.4.2. TÉCNICAS BIOLÓGICAS

Adesão e proliferação de células (in vitro)

Testes *in vitro* são conduzidos obrigatoriamente antes de qualquer teste *in vivo* por questões éticas e práticas. Existem vários tipos de células que podem ser usadas em estudos *in vitro*. O uso de cada uma delas vai depender do material que se quer testar ou do tipo de avaliação que se quer fazer. A avaliação da biocompatibilidade de materiais

usados em reparos ósseos é conduzida, geralmente, com osteoblastos. Quando a avaliação é sobre uma possível toxicidade outros tipos de células podem ser utilizadas. Células com muitas passagens são menos resistentes e detêm uma menor atividade que as células da primeira geração. Testes mais rigorosos necessitam de células da primeira geração, pois estas conseguem expressar seu fenótipo de forma razoável.

Apesar dos testes *in vivo* simularem a situação real na qual o implante irá funcionar eles também deixam a desejar, uma vez que estes testes são feitos geralmente em outras espécies de mamíferos, não humanos. O nível de carregamento, aspectos comportamentais, alimentares e metabólicos são diferentes em cada espécie de mamífero e caracterizam-se em variáveis que afetam o resultado desses testes. De qualquer modo, avaliações *in vitro* disponibilizam informações rápidas e de baixo custo sobre a biocompatibilidade do material (BLACK, 1992). Vários métodos podem ser utilizados a fim de se avaliar citotoxicidade, grau de adesão celular, proliferação de células, expressão de proteínas da matriz extracelular e (no caso das células ósseas) mineralização.

Microscopia de Fluorescência

A emissão de luz por uma substância que é estimulada térmica, luminosa ou quimicamente é chamada de luminescência. Tais estímulos promovem, energeticamente, elétrons em níveis de energia mais baixos para níveis mais elevados (estado excitado). O retorno desses elétrons à posição de equilíbrio acontece acompanhado da liberação de energia sob a forma de luz. Quando a excitação é causada pela luz incidente, o fenômeno de emissão é dito fotoluminescente. A fotoluminescência é dividida ainda em fluorescência e fosforescência. Quando a emissão de luz é encerrada no mesmo instante que a fonte estimuladora é retirada, o fenômeno é classificado como fluorescente. Por outro lado, na fosforescência, mesmo após a retirada da fonte de excitação, a emissão ainda pode ser vista por algum tempo.

O microscópio de fluorescência se baseia na excitação de uma amostra fotosensível à luz em algum comprimento de onda definido, e na captação da luz emitida pela amostra (NIKON, 2002). As principais vantagens de se utilizar esta técnica são:

- Substâncias específicas tais como proteínas, antígenos, DNA e RNA podem ser observados seletivamente;
- Mesmo espécies que não são auto-luminescentes podem ser processadas de modo a se tornarem luminescentes, pelo emprego de fluorocromos;
- Espécies que não podem ser observadas em microscópio óptico comum são facilmente observadas devido ao contraste da fluorescência;
- Diversos tipos de informações são obtidas pela luz da fluorescência permitindo análises quantitativas e qualitativas da amostra.

CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

3.1.1. HIDROXIAPATITAS

Hidroxiapatitas estequiométricas (E-HA) e deficientes em cálcio (CD-HA) foram sintetizadas pelo método de precipitação em solução (MAVROPOULOS *et al.*, 2003) no Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF). Análises químicas permitiram a avaliação da razão Ca/P para cada uma das hidroxiapatitas. Os teores de cálcio e fósforo foram obtidos, respectivamente, via titulação complexométrica usando EDTA e espectrofotometria de absorção molecular (BALMAIN *et al.*, 1982). Três pós de HA com razões Ca/P distintas foram obtidos: $1,58 \pm 0,02$ (CD-HA), $1,66 \pm 0,02$ (E1-HA) e $1,67 \pm 0,02$ (E2-HA). Análises adicionais de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) e difração de raio-X (DRX) confirmaram parâmetros cristalográficos e composição química dos pós.

3.1.2. PASTILHAS DENSAS DE HA E HA/TCP

Pastilhas densas com 7,6mm de diâmetro e 1,1mm de altura foram produzidas por prensagem uniaxial de 100mg de pó de HA, sob uma carga de 500Kg (108MPa) durante 15min, usando uma matriz de aço temperado. Ranhuras paralelas foram usinadas sobre metade da superfície da matriz de prensagem, deixando a outra metade lisa. Após a prensagem, a superfície das pastilhas obtidas exibiram uma imagem negativa da matriz de aço, contendo, igualmente, duas regiões, uma lisa e outra ondulada (figura 3.1).

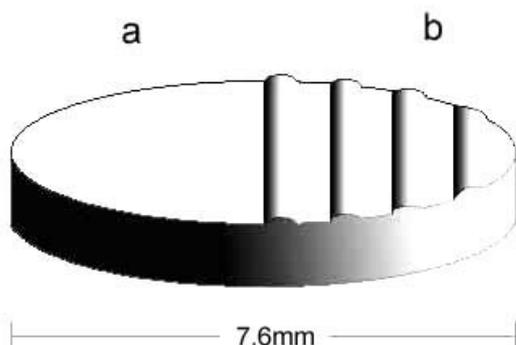


Figura 3.1 - Modelo da superfície de uma pastilha após prensagem. Dois padrões topográficos podem ser identificados: uma região lisa (a) e outra ondulada (b).

Após a prensagem, as pastilhas foram divididas em dois grupos. O primeiro grupo foi calcinado a 1150°C por 2h e o segundo, por 72h, com o intuito de aumentar sua resistência mecânica e produzir pastilhas bifásicas constituídas de HA estequiométrica e fosfato tricálcico (TCP), pela decomposição das HA deficientes em cálcio. Com isso, 5 tipos de pastilhas foram produzidos, como resumido na tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Relação entre os pós de HA usados na preparação das pastilhas, o tempo de calcinação empregado e a designação final das pastilhas obtidas. Essa designação levou em conta o nome do pó inicial (CD, E1 e E2) bem como o tempo de calcinação (a = 2h e b = 72h).

Pós de HA	Tempo de calcinação a 1150°C (h)	Pastilhas obtidas
CD-HA	2	CD _a
	72	CD _b
E1-HA	2	E1 _a
	72	E1 _b
E2-HA	2	E2 _a

3.2. MÉTODOS

3.2.1. TOPOGRAFIA DAS PASTILHAS

A topografia da região ondulada sobre as pastilhas foi avaliada por meio de Análise de Imagens. Usando microscopia eletrônica de varredura (MEV), várias imagens da seção transversal de uma pastilha foram capturadas e processadas digitalmente de modo a se obter o perfil dessa região, incluindo medidas mais precisas de largura, altura, raio de curvatura e distância entre as ondulações. O microscópio usado foi o modelo JSM-5310 da JEOL. Os programas específicos de análise de imagens Adobe® Photoshop® 6.0 e Global Lab Image® foram usados, respectivamente, para ajustar e segmentar as imagens, e efetuar as medições.

3.2.2. COMPOSIÇÃO QUÍMICA

A composição química das pastilhas após calcinação foi investigada por meio de FT-IR e DRX, usando o pó obtido da trituração de pastilhas. Os espectros de DRX foram obtidos variando 2θ de 10° a 100°, com uma velocidade de 1°/min e passo de

0,05° em um difratômetro de alta resolução RIGAKU MINIFLEX (Núcleo de Catálise - PEQ/COPPE/UFRJ). Os parâmetros da célula unitária dos compostos identificados foram refinados usando o programa Celref com auxílio dos cartões contidos no JCPDS (HA nº 9-432, α -TCP nº 29-0359 e β -TCP nº 9-169). As quantidades das fases presentes em cada pastilha puderam ser determinadas pela utilização de uma curva de calibração obtida da relação linear entre as intensidades máximas relativas de reflexão dos compostos em questão $\rho_{\alpha} = I_{\text{HA}}(211)/[I_{\text{HA}}(211) + I_{\alpha\text{-TCP}}(034)]$ e a quantidade de α -TCP contida numa mistura padrão conhecida HA/ α -TCP (OLIVEIRA *et al.*, 2003).

A análise de FT-IR foi executada pelo método de pastilhas de KBr, no modo transmitância, varrendo o espectro de 4000 a 400 cm^{-1} e usando um espectrômetro NICOLET MagnaIR-760 (Laboratório de Análises - IQ/UFRJ).

3.2.3. ENERGIA DE SUPERFÍCIE

Dois métodos distintos foram usados na determinação do ângulo de contato sobre as cerâmicas usadas: Método da Bolha e Ascensão Capilar. A partir do ângulo obtido, a energia de superfície pôde ser calculada.

Método da Bolha

Este método se constitui numa inversão do usual Método da Gota. As pastilhas CD_a e E1_a foram fixadas horizontalmente sobre um suporte que foi imerso no líquido em questão. Soltou-se uma pequena bolha de ar, por meio de uma seringa invertida, que se depositou sob a superfície da pastilha (figura 3.2). Usando um goniômetro acoplado a um computador, a imagem da bolha foi captada. O valor do ângulo de contato foi calculado automaticamente com base nas tangentes interfaciais horizontais e verticais, no lado direito e esquerdo da imagem projetada, totalizando quatro valores. De acordo com a convenção estabelecida para o Método da Gota, o ângulo de contato é sempre aquele formado entre a superfície sólida e a tangente ao líquido sobre o sólido partindo de um vértice comum (DECKER *et al.*, 1999). Isso implica dizer que o valor obtido no Método da Bolha não se adequa à regra acima, uma vez que o ângulo calculado pelo goniômetro α é formado entre a superfície sólida e a tangente ao ar sobre o sólido

(vértice comum). Logo, para o Método da Bolha, o ângulo real θ deve ser o valor suplementar ao obtido: $\theta = (180^\circ - \alpha)$.

Os líquidos usados foram água MilliQ e glicerol (VETEC, grau analítico) sob uma temperatura de 25°C. Para cada líquido, foram usadas 3 pastilhas de cada grupo. Avaliaram-se 6 bolhas sobre regiões diferentes da superfície de uma mesma pastilha e, para cada bolha, 10 medidas de ângulo de contato foram tomadas. Calculou-se o valor médio do ângulo de contato, e o erro, associado ao desvio padrão.

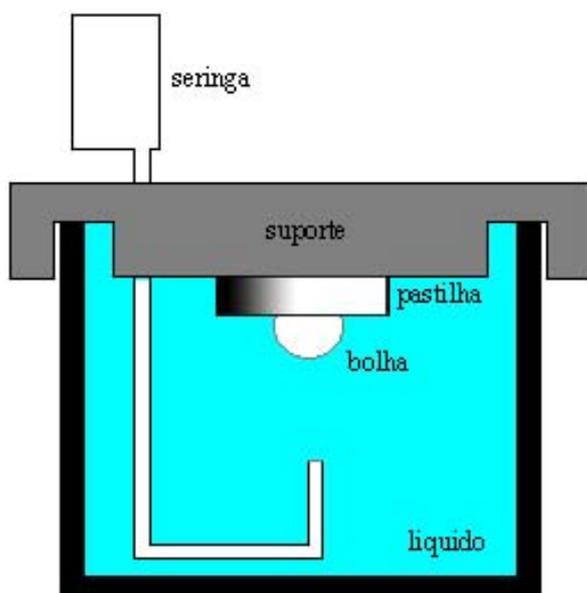


Figura 3.2 - Modelo do aparato usado na determinação do ângulo de contato pelo Método da Bolha.

Antes das medidas, realizaram-se alguns testes para fixar as melhores condições de trabalho, como a influência do tempo e do tamanho das bolhas no valor obtido. Assim, vários tamanhos de bolha foram testados. Do mesmo modo, investigou-se uma possível variação significativa nos valores de ângulo de contato ao longo de 2h, para uma mesma pastilha e líquido. É importante salientar que todas as medidas foram efetuadas sobre a região plana da pastilha.

De posse dos valores obtidos para o ângulo de contato da água e glicerol, a tensão superficial das pastilhas e suas componentes polar e dispersiva foram calculadas pelo método da aproximação geométrica descrito, primeiramente, por OWENS & WENDT (1969).

Sabe-se que o trabalho de adesão (W_{ad}) é definido como,

$$W_{ad} = \gamma_S + \gamma_L - \gamma_{SL} \quad 3.1$$

onde, $\gamma_S \sim \gamma_{SV}$ e $\gamma_L \sim \gamma_{LV}$. Este trabalho pode ser separado em dois componentes distintos, um dispersivo W_{ad}^D (referente às forças de London) e outro polar W_{ad}^P (referentes a forças de Keesom e Debye, e outras forças de caráter polar):

$$W_{ad} = W_{ad}^D + W_{ad}^P \quad 3.2$$

Sabe-se que,

$$W_{ad} = 2(\gamma_S \gamma_L)^{1/2} \quad 3.3$$

Combinando as equações 2.2, 3.1, 3.2 e 3.3 temos,

$$(1 + \cos\theta)\gamma_L = 2[(\gamma_S^D \gamma_L^D)^{1/2} + (\gamma_S^P \gamma_L^P)^{1/2}] \quad 3.4$$

onde, γ_S^D e γ_S^P são as tensões superficiais dispersiva e polar, respectivamente, da superfície sólida estudada, e γ_L^D e γ_L^P são as tensões superficiais dispersiva e polar, respectivamente, do líquido usado (tabeladas).

A determinação do ângulo de contato pelo Método da Bolha foi realizado no Laboratório de Química de Interface e Colóides - PEMM/COPPE/UFRJ.

Ascensão Capilar

O método da Ascensão Capilar é indicado principalmente para a determinação do ângulo de contato de materiais particulados (LIU *et al.*, 1997). Dessa forma, 300mg do pó obtido pela trituração de pastilhas CD_a e E1_a foram colocados num capilar graduado (2mm de diâmetro), fechado na sua extremidade inferior por uma membrana permeável, e compactados até atingirem uma altura fixa dentro do capilar. A extremidade permeável do capilar foi, então, colocada em contato com o líquido em questão e a velocidade de ascensão desse líquido dentro do capilar foi medida. Após cada ascensão, secou-se o sistema a 60°C por 30min a fim de se efetuar uma nova

ascensão com outro líquido. Esse procedimento foi realizado em triplicada para cada líquido usado, sendo que, duas compactações foram feitas para cada tipo de pastilha.

A taxa de ascensão do líquido no capilar pôde ser relacionada com o ângulo de contato pela equação de Washburn (SIEBOLD *et al.*, 2000),

$$h^2 = t\gamma_L r \cos\theta / 2\eta \quad 3.5$$

onde, h é a altura do líquido penetrante em determinado instante t , γ_L é a tensão superficial (líquido-vapor) do líquido usado, r é o raio médio dos poros entre as partículas, η é a viscosidade do líquido e θ é o ângulo de contato. O valor de r é dependente do grau de compactação entre as partículas, logo, cada sistema possui um r característico. A presença de duas variáveis impossibilita o uso direto dessa equação. No entanto, r pode ser conseguido pela ascensão de líquidos que molhem completamente a amostra, ou seja, que definam um ângulo de contato de 0° ($\cos \theta = 1$). Assim,

$$r = (h^2/t) / 2\eta\gamma_L \quad 3.6$$

A reta definida pela equação acima pode ser traçada pelo uso de, pelo menos, três alcanos líquidos ($\cos\theta = 0^\circ$), onde o coeficiente angular da reta é o próprio r . Neste trabalho, *n*-hexano, *n*-heptano e *n*-dodecano (VETEC, grau analítico) foram usados. Após a determinação do valor de r , os ângulos de contato de dois outros líquidos (éter e acetona) puderam ser facilmente obtidos pela aplicação da equação 3.4. De forma idêntica ao item descrito anteriormente, por meio da aproximação geométrica de OWENS & WENDT (1969) definida pela equação 3.3, os valores de tensão superficial γ_s , γ_s^D e γ_s^P foram calculados.

A escolha de éter e acetona deve-se ao fato de que estas substâncias não reagem quimicamente com a superfície, permitindo a reutilização das amostras.

3.2.4. CULTURA DE OSTEOLASTOS

Todos o procedimentos com células foram conduzidos no Banco de Células do Rio de Janeiro do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho/UFRJ.

Cultura Primária

Osteoblastos humanos foram extraídos de amostras ósseas obtidas de intervenções cirúrgicas no Hospital de Traumatologia-Ortopedia do Rio de Janeiro sob supervisão do Comitê de Ética da Universidade Federal do Rio de Janeiro. As amostras (explantes) foram cortadas em pequenos pedaços com cerca de 1cm de diâmetro e lavadas extensiva e repetidamente em solução salina tamponada com fosfato (PBS). Em seguida, as amostras foram tratadas com colagenase IA (duas imersões de 1 e 2h, respectivamente, a 37°C) para remover células aderentes e não-aderentes superficiais, expondo a parte trabecular interna do osso. A atividade da colagenase foi inibida pela adição de meio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) e suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Após nova lavagem em PBS, cada explante foi colocado em garrafas de cultivo de 25cm² contendo um filme líquido de DMEM suplementado com 10% de SFB e antibióticos (100U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina), raso o suficiente para molhar somente a base de cada explante. Todos os procedimentos anteriores foram efetuados em atmosfera estéril, dentro do fluxo laminar. O cultivo foi conduzido em um incubador a 37°C, sob uma atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5% de CO₂, e com trocas do meio de cultivo a cada três dias.

Manutenção da cultura (sub-cultivos)

Logo que as culturas primárias atingiram confluência (ocuparam cerca de 80% da superfície disponível na garrafa) os explantes foram retirados cuidadosamente e colocados em outra garrafa contendo um filme de DMEM suplementado, para promover a migração de mais células, de modo igual ao descrito anteriormente. As células em confluência, já sem o explante, foram lavadas com uma solução salina balanceada livre de íons cálcio e magnésio (BSS.CMF) e tratadas com tripsina até que os contatos de adesão célula/superfície e célula/célula estivessem desfeitos, e a maior parte das células estivesse em suspensão. A visualização das células foi feita em um microscópio de contraste de fases (LEICA DM IL 090). Finalizou-se a ação da tripsina pela adição de

DMEM suplementado com 10% de soro e a suspensão de células resultante foi imediatamente centrifugada a 1300rpm durante 5min. O sobrenadante isento de células foi descartado e as células ressuspendidas em DMEM suplementado com 10% de SFB sem antibióticos. Cerca de 2cm³ dessa suspensão foram transferidos para uma garrafa de cultivo de 25cm², incubados em estufa a 37°C, sob uma atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5% de CO₂ e com trocas do meio de cultivo a cada três dias.

O procedimento descrito acima caracteriza uma passagem celular. Então, após a primeira tripsinização, diz-se que as células deixam de ser uma cultura primária e passam a ser designadas como células de primeira passagem. A cada tripsinização, uma passagem a mais é incorporada. Ao atingirem confluência, as células são novamente tratadas com tripsina e expandidas em uma nova garrafa de cultivo, conforme descrito. Dessa forma, as culturas foram expandidas até a terceira passagem.

Uma outra parte das células em cultura primária foi tripsinizada, centrifugada, ressuspendida em SFB contendo 10% do agente crioscópico dimetilsufóxido, colocada em tubos de criopreservação, identificada e congelada imediatamente em nitrogênio líquido, servindo como um estoque de células.

3.2.5. TESTE DE FOSFATASE ALCALINA

Aproximadamente 10⁴ células em segunda passagem foram semeadas em lâminas de vidro dentro de placas de cultivo de 4 poços e cultivadas em DMEM suplementado com 10% de SFB. Após 7 dias em cultivo, as células foram lavadas três vezes com PBS, fixadas em solução de formaldeído (4%) em PBS por 15min, lavadas novamente com PBS e tratadas em tampão Tris-HCl (pH 8,2) para fosfatase alcalina. As células foram coradas usando um *kit* de teste próprio para fosfatase alcalina (Vector® Red Kit I Cat. No. SK-5100) seguindo as instruções do fabricante, por 1h, protegidas do contato direto com a luz, lavadas com PBS e água bidestilada. A marcação das células foi avaliada pelo uso de microscopia de fluorescência (microscópio ZEISS Axioskop II Plus) no Laboratório de Neuro-Histologia e Ultraestrutura - ICB/UFRJ.

3.2.6. CULTURA DE OSTEOLASTOS SOBRE PASTILHAS

Inicialmente as pastilhas foram esterilizadas por imersão durante 10min em etanol e aquecimento em estufa a 120°C por 48h. O método usual de autoclavagem foi substituído pela possibilidade de transformação química de superfície e dissolução do TCP. Para promover uma melhor adesão celular e estabilizar o pH inicial do meio de cultivo, as pastilhas foram colocadas nas placas de cultivo e imersas em DMEM suplementado com 10% de SFB por 1h antes da inoculação de células. Tal procedimento é comumente relatado em estudos semelhantes (ANSELME, 2000; MONCHAU *et al.*, 2002).

Quatro experimentos usando células em terceira passagem foram efetuados para avaliar o efeito das ondulações, da energia de superfície, da composição química e do número de células plaqueadas sobre os comportamentos de adesão, proliferação e migração celular. No primeiro experimento, cerca de $2,5 \times 10^4$ células foram inoculadas sobre as pastilhas CD_a. No segundo, cerca de $4,0 \times 10^3$ células foram plaqueadas sobre cada pastilha (CD_a e E1_a). No terceiro, as pastilhas CD_a e E2_a foram usadas com $1,3 \times 10^4$ células sobre cada uma delas. E no quarto, $2,0 \times 10^3$ células foram inoculadas sobre cada pastilha (CD_b e E1_b). As células foram monitoradas em 4h, 1, 2, 4, 7 e 14 dias em cultivo. Eficiência de adesão, proliferação, migração e morfologia das células foram avaliadas.

3.2.7. MORFOLOGIA CELULAR

A morfologia das células sobre as pastilhas foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Células aderidas foram fixadas usando uma solução de glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ por 1h e pós-fixadas com uma solução de tetróxido de ósmio 1,0% em tampão cacodilato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ por 15min. Após fixação, as células foram desidratadas por imersão em soluções aquosas de etanol com concentrações crescentes (15%, 35%, 50%, 70%, 90% e 100%). Cada imersão durou cerca de 10min tomando-se o cuidado de nunca deixar a amostra secar, para evitar danos à estrutura da membrana das células. As amostras foram secas usando aparelho de ponto crítico de CO₂ (BAL-TEC CPD 030) no Instituto de Microbiologia

Professor Paulo de Góes - CCS/UFRJ, recobertas com um filme de ouro por *sputtering* (aparato Balzers) e examinadas criteriosamente em microscópios eletrônicos de varredura ZEISS DSM 940A (Laboratório de Microscopia Eletrônica - PEMM/COPPE/UFRJ) e JEOL JSM-5310 (Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer - ICB/UFRJ).

3.2.8. AVALIAÇÕES CELULARES QUANTITATIVAS

Eficiência na Adesão

Por meio da razão entre o número de células aderidas, até 4h após o plaqueamento, e o número de células inoculadas sobre as pastilhas, obtiveram-se índices relacionados à eficiência com que as células se ligaram a cada substrato.

Proliferação Celular

A quantificação das células sobre as pastilhas foi efetuada por meio de microscopia óptica de reflexão (OLYMPUS BX 60M), no Laboratório de Análise de Imagens - PEMM/COPPE/UFRJ. As pastilhas contendo células foram cuidadosamente lavadas com PBS a 37°C, a fim de se remover eventuais células mortas e/ou não aderidas à superfície, e fixadas em metanol por 20min. Em seguida, as células foram lavadas com água destilada e coradas com uma solução PBS/Giemsa (4:1) por 5min. Para cada pastilha, 25 imagens de superfície foram capturadas no microscópio usando objetiva de 5X e ocular de 10X. A aquisição digital das imagens e o seu processamento pelos programas Adobe® Photoshop® 6.0 e Global Lab Image® permitiram a determinação do número de células na superfície. Cada núcleo corado correspondeu a uma célula. Logo, a unidade de medida adotada foi número de células por área de superfície. Essa avaliação foi realizada nos tempos de 4h, 1, 2, 4, 7 e 14 dias.

Preferência topográfica e orientação celular

De modo semelhante ao descrito acima, uma avaliação mais criteriosa pôde ser feita com relação à variação do número de células sobre as ondulações e nas regiões planas vizinhas, ao longo do cultivo, sendo possível o estudo das preferências celulares em relação a aspectos topográficos superficiais. Todas as determinações levaram em consideração o aumento de área provocado pela ondulação.

O número de células com espraio preferencial na mesma direção das ondulações pôde ser monitorado ao longo do cultivo. Essa avaliação baseou-se na razão entre o número de células orientadas e o número total de células sobre as ondulações. Somente as células arranjadas paralelamente às ondulações e dispostas sobre elas foram consideradas orientadas.

3.2.9. TRANSFORMAÇÕES DE SUPERFÍCIE *IN VITRO*

Porosidade

A variação na porosidade superficial das pastilhas CD_a foi monitorada ao longo do cultivo com células (4, 7 e 11 dias) por Análise de Imagens. Para a aquisição das imagens, a superfície da pastilha foi dividida em quatro áreas. De cada região, 4 imagens em MEV (ZEISS DSM 940A), no modo elétrons retroespalhados e sob um aumento de 2000X, foram capturadas digitalmente, totalizando 16 imagens por pastilha. Usando o programa Global Lab Image[®], a ocupação da superfície por poros (%) foi obtida.

Química de Superfície (FT-IR)

As pastilhas CD_a e E1_a foram incubadas (sem adição de células) em DMEM suplementado com 10% de SFB em estufa a 37°C, sob uma atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5% de CO₂ e com trocas do meio de cultivo a cada três dias, identicamente a um cultivo normal de células. Após o período de incubação, as pastilhas foram lavadas em água MilliQ e secas a temperatura ambiente em dessecador, sob vácuo. Análises de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (no modo refletância difusa), foram conduzidas tanto sobre a superfície lisa quanto sobre a região ondulada das pastilhas, em 4 e 14 dias após a incubação.

Em outro experimento, as pastilhas CD_a e E1_a foram trituradas separadamente e o pó resultante, incubado em placas de cultivo com 2mL de DMEM suplementado com 10% de SFB em estufa a 37°C, sob uma atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5% de CO₂ e com trocas do meio de cultivo a cada três dias. Após incubação em 2 horas, 4, 7 e 14 dias, o meio de cultivo foi cuidadosamente retirado, as amostras, lavadas com água MilliQ a 14°C e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. A secagem foi

conduzida por liofilização (liofilizador de mesa FTS SYSTEM, Flexi-Dry FD-1-54A) no Laboratório de Ressonância Paramagnética Eletrônica - CBPF, por 24h. Após secagem as amostras foram analisadas por FT-IR pelo método de pastilhas de KBr, no modo absorvância, varrendo o espectro de 4000 a 400cm⁻¹.

As análises dos dois experimentos acima foram realizados num espectrômetro NICOLET MagnaIR-760 no Laboratório de Análises - IQ/UFRJ.

Química de Superfície (XPS)

Osteoblastos foram inoculados sobre uma pastilha E1_a e cultivados nas mesmas condições descritas no item 3.2.6, por 4 dias. Então, a pastilha foi lavada com solução salina balanceada livre de íons cálcio e magnésio (BSS.CMF) e tratadas com tripsina para desfazer os contatos de adesão célula/superfície, deixando-a livre de células. Lavou-se em água MilliQ e secou-se a temperatura ambiente em dessecador de sílica sob vácuo. Como controle, uma outra pastilha E1_a não cultivada, foi, do mesmo modo que a primeira, lavada em BSS.CMF, tratadas com tripsina, lavada com água MilliQ e seca a temperatura ambiente em dessecador de sílica sob vácuo. As duas pastilhas foram submetidas à análise superficial via espectroscopia de fotoelétrons por raios-X (XPS 1257 PHI) no Núcleo de Catálise - PEQ/COPPE/UFRJ. O aparelho foi operado a 12kV em um ângulo de 54°, com energia K α do Al (1486,6eV) e diâmetro de feixe de aproximadamente 5mm². Nenhum bombardeamento com elétrons foi feito de modo a se obter informações apenas da camada mais externa de superfície (até 10nm). Espectros mais detalhados foram obtidos para os elementos carbono, cálcio, fósforo, oxigênio e nitrogênio.

CAPÍTULO 4 – RESULTADOS

4.1. MATERIAIS

4.1.1. TOPOGRAFIA DAS PASTILHAS

As pastilhas calcinadas por 2h a 1150°C sofreram uma redução de 21,0% no seu diâmetro original, ficando com 6,0mm de diâmetro e 1,0mm de altura. Aquelas calcinadas a 1150°C por 72h sofreram uma redução de 28,9%, ficando com 5,4mm de diâmetro e 0,9mm de altura.

Na figura 4.1, pode-se observar uma imagem em MEV da região ondulada de uma pastilha e seu perfil. O contorno das ondulações foi obtido pela montagem de imagens laterais de uma mesma pastilha. Não houve homogeneidade na disposição, altura e largura das ondulações. As alturas variaram de 10 até 85 μ m (base a topo), e as larguras entre 87 e 235 μ m. A distância entre as ondulações vizinhas variaram de 92 a 456 μ m (cume a cume). Apesar dessas variações de altura e largura, o raio de curvatura foi o mesmo para todas elas (\sim 175 μ m).

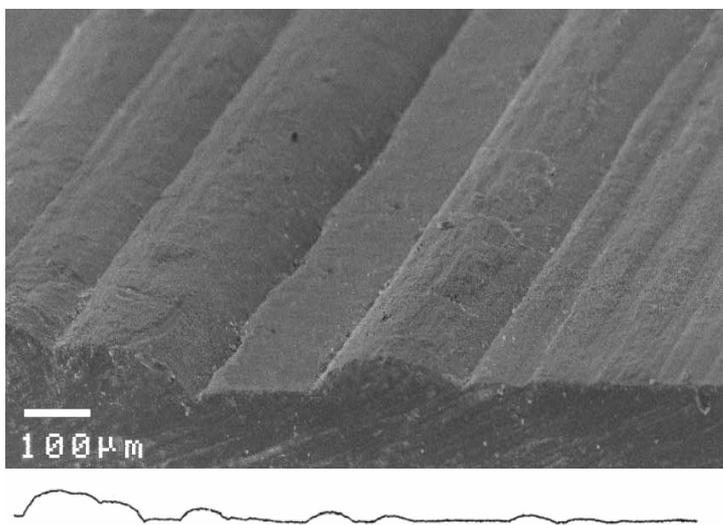


Figura 4.1 - Detalhes em MEV de uma pastilha após calcinação mostrando ondulações superficiais e seu perfil.

De uma maneira geral, nenhum padrão topográfico diferenciado, no que se refere ao grau de microporosidade e rugosidade de superfície, foi observado por MEV entre as regiões planas e ondulações. As pastilhas que apresentaram defeitos, gerados no momento de prensagem, foram descartadas.

4.1.2. COMPOSIÇÃO QUÍMICA

Os padrões de DRX das pastilhas CD_a, CD_b, E1_a e E1_b confirmaram a presença tanto de hidroxiapatita (HA) quanto de fosfato α -tricálcico (α -TCP). Os picos característicos correspondentes aos planos de difração da HA (2 1 1) e do α -TCP (0 3 4) foram identificados em ângulos de difração 2θ de 31,8° e 30,7°, respectivamente (ver figuras IV.2 e IV.3). O padrão de difração da pastilha E2_a corresponde ao padrão de uma HA pura, sem qualquer traço de TCP (ver figura 4.3). O pico característico da forma alotrópica β -TCP (0 2 1 0) em $2\theta = 31,0^\circ$ não foi significativo em nenhuma das amostras.

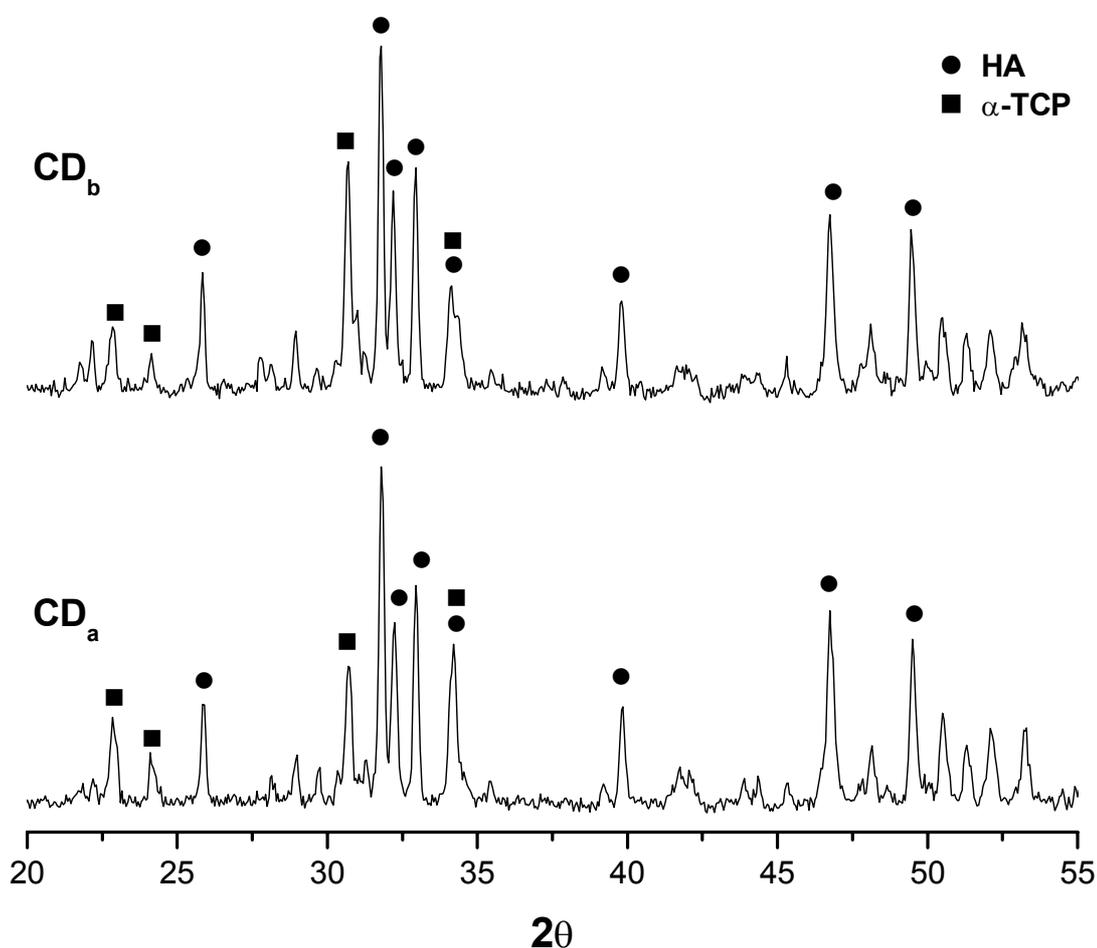


Figura 4.2 - Espectros de DRX do pó das pastilhas CD_a e CD_b calcinadas a 1150°C por 2h e 72h, respectivamente.

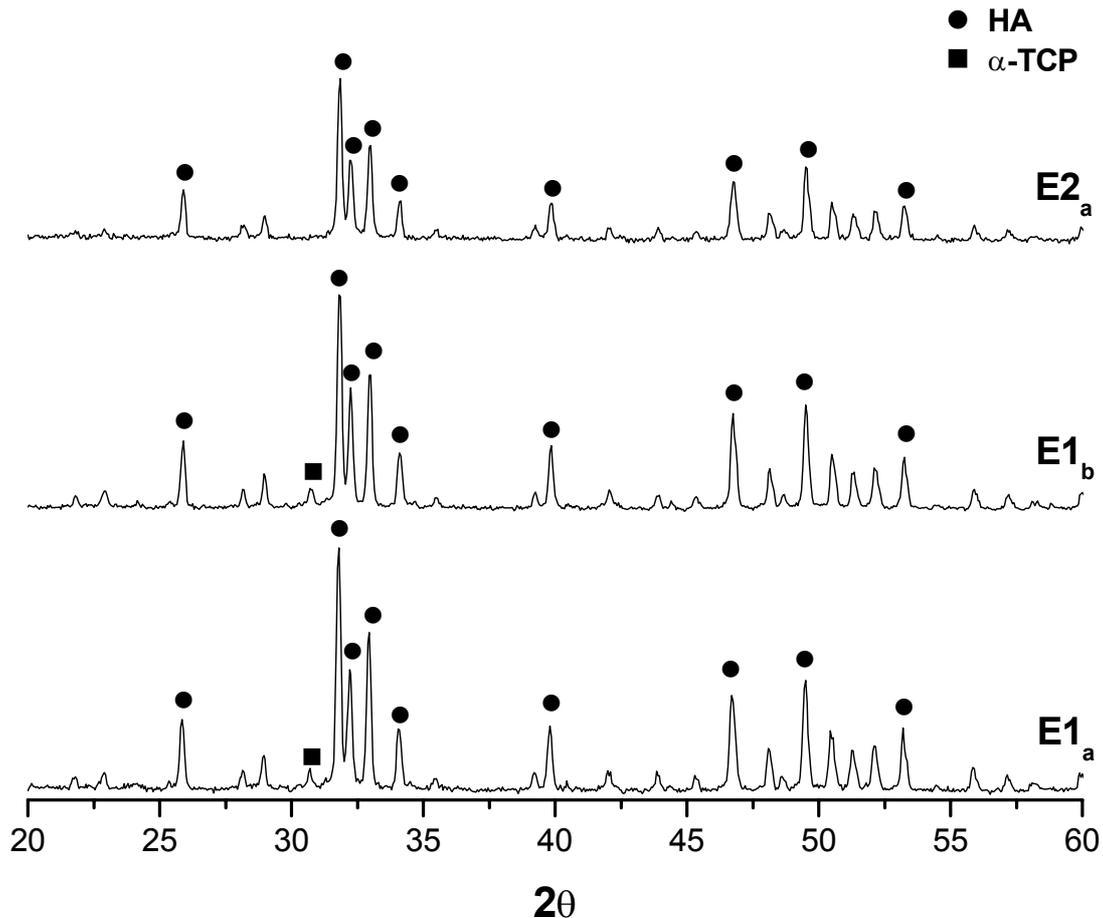


Figura 4.3 - Espectros de DRX do pó das pastilhas E1_a e E2_a, calcinadas a 1150°C por 2h, e E1_b calcinada a 1150°C por 72h.

Os valores de intensidade máxima de difração obtidos dos espectros para as formas HA (I_{HA}) e α -TCP ($I_{\alpha-TCP}$) foram inseridos na equação $\rho_{\alpha} = I_{HA}(211)/[I_{HA}(211) + I_{\alpha-TCP}(034)]$ para obtenção do valor de intensidade relativa de difração ρ_{α} . Aplicando-se este valor à curva de calibração (OLIVEIRA *et al.*, 2003) mostrada na figura 4.4 e definida pela equação 4.1, os valores de concentração de HA (X_{HA}) no sistema bifásico foram determinados.

$$X_{HA} = 122,749\rho_{\alpha} - 12,63 \quad 4.1$$

O coeficiente de correlação para a curva de calibração usada foi de 0,9989 ($r^2 = 0,9978$). Os valores de intensidade de difração da HA (I_{HA}), do α -TCP ($I_{\alpha-TCP}$),

intensidade relativa de difração (ρ_α) e as concentrações calculadas de HA e α -TCP nas pastilhas estão listados na tabela 4.1, abaixo.

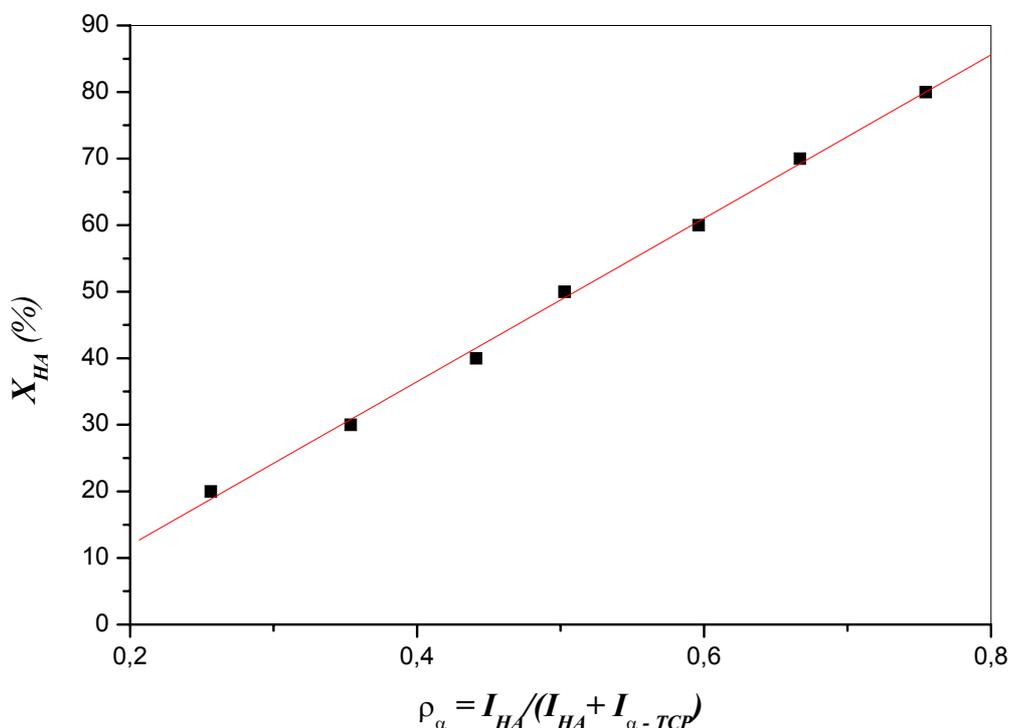


Figura 4.4 - Curva de calibração para determinações da concentração de HA em sistemas bifásicos HA/ α -TCP, $r^2 = 0,9978$ (OLIVEIRA *et al.*, 2003).

Tabela 4.1 - Concentrações de HA e α -TCP nas pastilhas calcinadas a 1150°C por 2 e 72h em função das intensidades de difração para cada fase presente.

Pastilha	Tempo de calcinação (h)	I_{HA}	$I_{\alpha-TCP}$	ρ_α	Composição (%)	
					HA	α -TCP
CD _a	2	783,67	355,8	0,74	78,2	21,8
CD _b	72	809,03	559,63	0,59	59,8	40,2
E1 _a	2	1350,61	172,77	0,88	~ 95,4	~ 4,6
E1 _b	72	1189,95	160,86	0,88	~ 95,4	~ 4,6
E2 _a	2	907,24	-	1	100,0	-

Apenas as pastilhas calcinadas a 1150°C por 2h foram avaliadas adicionalmente por FT-IR. Os espectros obtidos confirmaram as transformações identificadas por DRX. Bandas de absorção características de grupos PO_4^{3-} (570, 602, 962, 1046 e 1089 cm^{-1}) e

OH^- estrutural (3570 e 632cm^{-1}) presentes na HA foram observadas. Além disso, bandas adicionais de TCP (944 e 971cm^{-1}) foram encontradas nos espectros das pastilhas CD_a , confirmando a presença da segunda fase (ver figura 4.5). O espectro da pastilha E1_a não mostrou bandas na região de absorção do TCP, apesar de conterem $\sim 4,6\%$ de α -TCP (ver figuras 4.5). O espectro da pastilha E2_a corresponde a um espectro padrão de uma hidroxiapatita estequiométrica, sem qualquer segunda fase inserida. O pico correspondente ao OH estrutural em 3572cm^{-1} cresce na mesma medida em que a concentração de HA torna-se maior ($\text{CD}_a < \text{E1}_a < \text{E2}_a$).

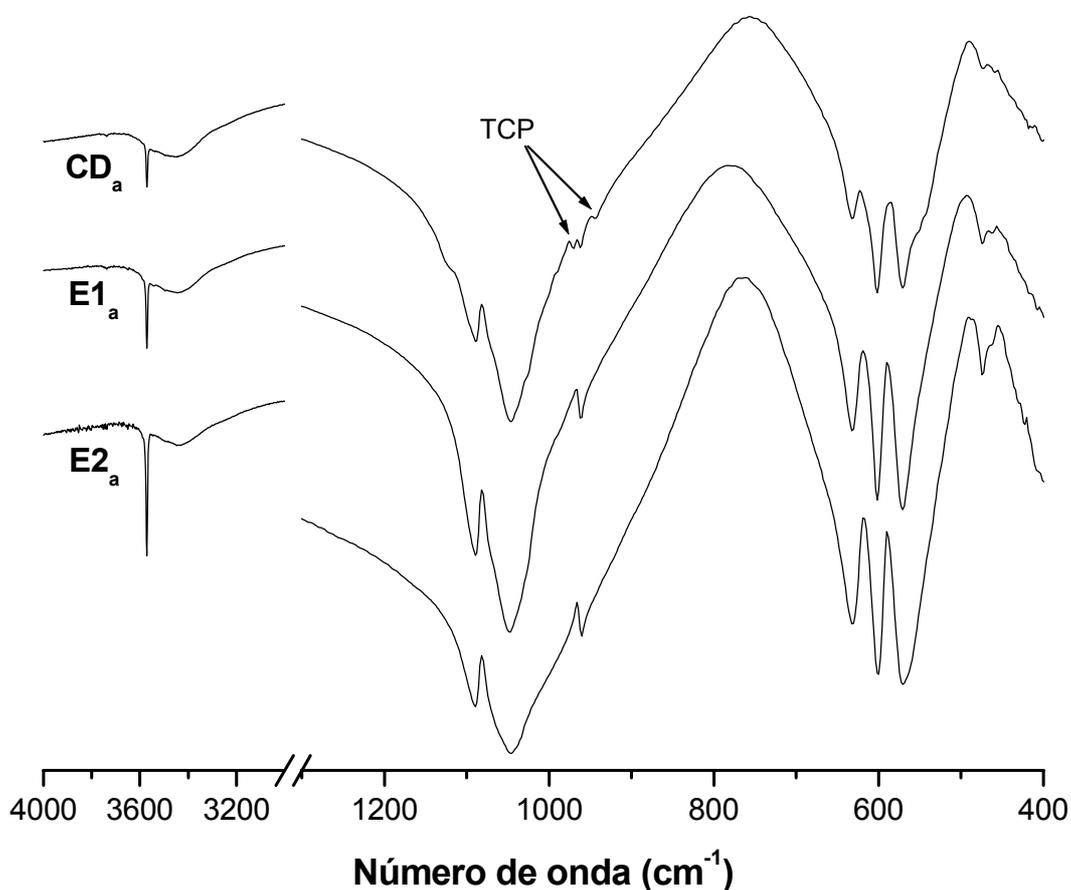


Figura 4.5 - Espectros de FT-IR (transmissão) das pastilhas CD_a , E1_a e E2_a , calcinadas a 1150°C por 2h.

4.1.3. ENERGIA DE SUPERFÍCIE

Método da Bolha

Os testes preliminares para determinação do tempo de medida do ângulo de contato não revelaram nenhuma variação significativa ($p = 0,01$; $n = 4$) nos valores obtidos, por até 1h40min após o início das determinações (figura 4.6). Todas as determinações seguintes foram efetuadas dentro desse período. No entanto, tamanhos de bolhas discrepantes entre si influenciam sobremaneira os resultados de ângulo de contato. Para solucionar esse problema, todas as bolhas que se ajustaram precisamente à janela de medida (tamanho fixo) do goniômetro exibida na tela do computador, foram aproveitadas.

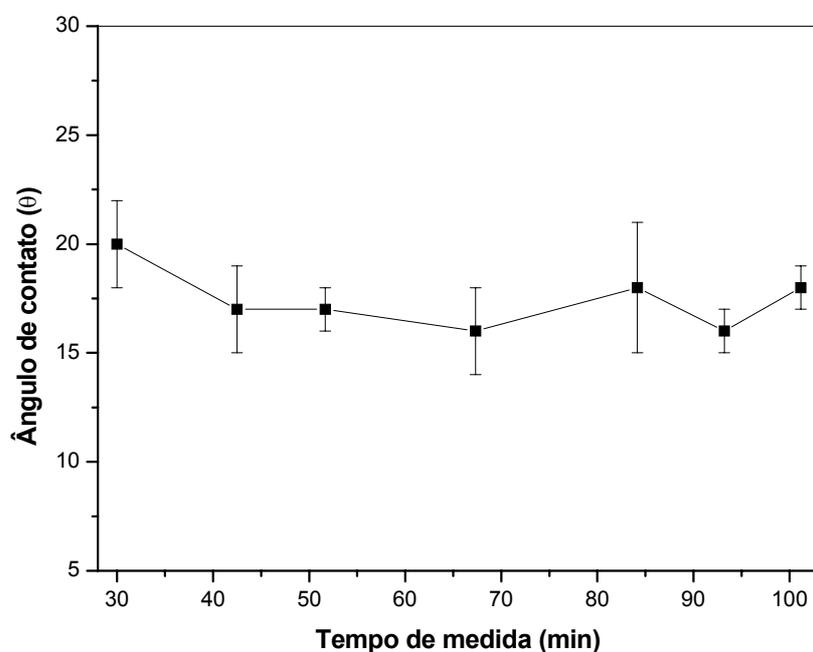


Figura 4.6 - Variação dos valores de ângulo de contato da água sobre uma mesma pastilha E1_a durante aproximadamente 1h40min a 25°C.

Somente as pastilhas CD_a e E1_a foram submetidas ao método da bolha. Para cada bolha avaliada 10 medidas de ângulo de contato foram tomadas, sendo que, 6 bolhas, em regiões diferentes de uma mesma pastilha, foram estudadas. Os ângulos obtidos foram expressos pela média aritmética entre todos os valores conseguidos para cada pastilha e o erro, associado ao desvio padrão. Os ângulos de contato da água apontam uma alta hidrofilicidade de superfície nas duas amostras. No entanto, a hidrofilicidade nas

pastilhas E1_a é ligeiramente mais elevada que nas CD_a (tabela 4.2). Usando as tensões interfaciais (líquido/vapor) da água ($\gamma_L = 72,8$; $\gamma_L^D = 21,8$ e $\gamma_L^P = 51,0 \text{ mJ m}^{-2}$) e do glicerol ($\gamma_L = 64,0$; $\gamma_L^D = 34,0$ e $\gamma_L^P = 30,0 \text{ mJ m}^{-2}$), e os valores correspondentes aos respectivos ângulos de contato, pôde-se calcular, igualmente, as tensões interfaciais (sólido/vapor) características das superfícies analisadas (tabela 4.2).

Tabela 4.2 - Ângulos de contato e tensões interfaciais características (sólido/vapor) das superfícies das pastilha analisadas.

Pastilha	$\theta_{\text{água}}$	θ_{glicerol}	Tensões Interfaciais (mJ m^{-2})		
			γ_S	γ_S^D	γ_S^P
CD _a	$29 \pm 5^\circ$	$34 \pm 2^\circ$	67,72	7,60	60,12
E1 _a	$18 \pm 4^\circ$	$29 \pm 2^\circ$	75,61	6,03	69,58

Ascensão Capilar

As velocidades de ascensão (h^2/t) dos alcanos *n*-hexano, *n*-heptano e *n*-dodecano no interior do capilar contendo as amostras particuladas, foram medidas por meio das curvas $h^2 \times t$ mostradas nas figuras IV.7 e IV.8. O valor h^2/t refere-se ao coeficiente angular das curvas de ascensão efetuadas.

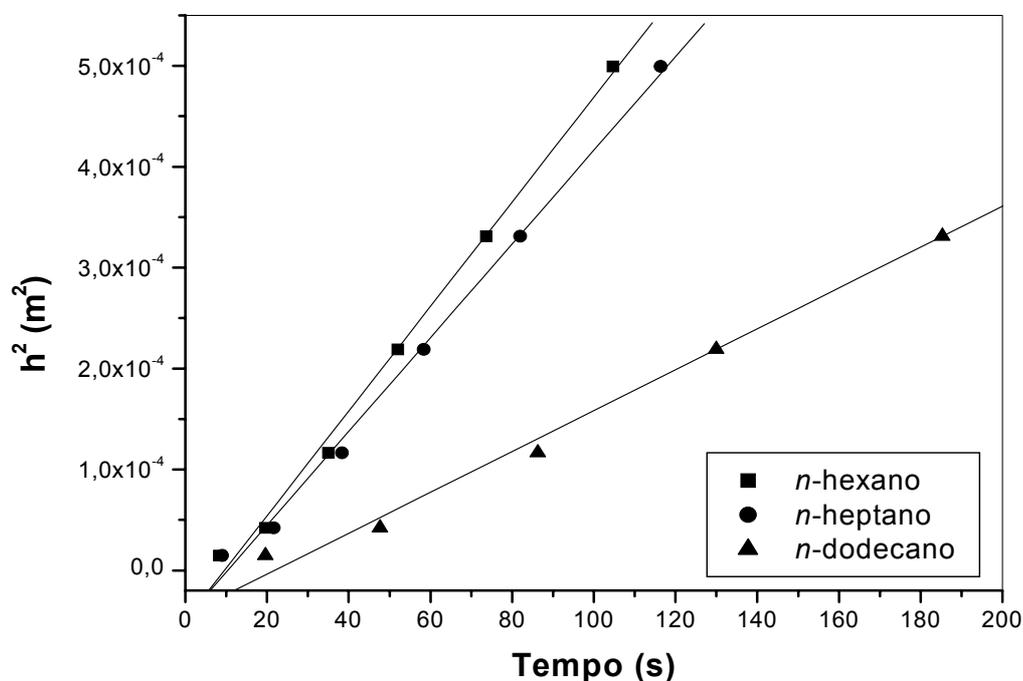


Figura 4.7 - Gráficos obtidos diretamente da ascensão capilar dos líquidos apolares nos particulados CD_a. Os coeficientes de correlação foram 0,9992, 0,9986 e 0,9986 para o *n*-hexano, *n*-heptano e *n*-dodecano, respectivamente.

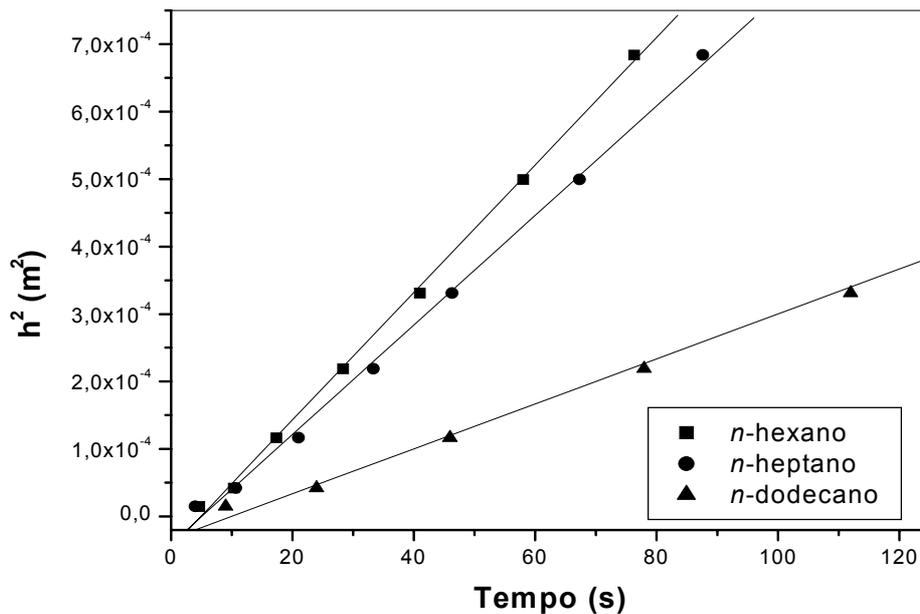


Figura 4.8 - Gráficos obtidos diretamente da ascensão capilar dos líquidos apolares nos particulados E1_a. Os coeficientes de correlação foram 0,9982, 0,9976 e 0,9981 para o *n*-hexano, *n*-heptano e *n*-dodecano, respectivamente.

O valores das tensões interfaciais (líquido/vapor) de todos os líquidos utilizados estão listados na tabela 4.3. As velocidades de ascensão dos *n*-alcanos são inversamente proporcionais a quantidade de átomos de carbono presentes. Como se trata de cadeias alifáticas, o aumento do número de carbonos está diretamente ligado ao aumento da viscosidade e, portanto, da redução de velocidade. Essa redução é mais evidente na amostra E1_a que na CD_a.

Tabela 4.3 - Constantes físicas dos líquidos usados na determinação da energia de superfície das pastilhas CD_a e E1_a.

Alcanos	η (cP)	Tensões interfaciais (mJ m ⁻²)			h^2/t ($\times 10^{-6}$ m ² s ⁻¹)	
		γ_L	γ_L^D	γ_L^P	CD _a	E1 _a
<i>n</i> -hexano	0,326	18,4	18,4	-	5,95	9,15
<i>n</i> -heptano	0,409	20,1	20,1	-	5,24	7,64
<i>n</i> -dodecano	1,508	27,6	27,6	-	2,08	3,01
éter etílico	0,360	17,0	15,0	2,0	6,41	8,45
acetona	0,240	25,2	16,5	8,7	6,99	9,89

Os valores de r foram determinados pelo coeficiente angular das curvas $2\eta(h^2/t) \times \gamma_L$ obtidas para os três alcanos. O valor de r para o sistema CD_a foi de $2,61 \times 10^{-7}$ m. Para o sistema contendo E1_a, foi de $3,5 \times 10^{-7}$ m. O diâmetro médio de poros relativo aos espaços entre as partículas no primeiro sistema compactado foi consideravelmente menor que no segundo, sugerindo que as partículas do sistema CD_a são menores que as E1_a. Os valores de ângulo de contato foram determinados por meio da equação 3.5. Seguindo a descrição feita no item 2.3 do capítulo 3, os valores de tensão superficial dos sistemas estudados foram definidos (tabela 4.4).

Tabela 4.4 - Ângulos de contato e tensões interfaciais características (sólido/vapor) dos sistemas particulados CD_a e E1_a.

Pastilha	$\theta_{éter}$	$\theta_{acetona}$	Tensões Interfaciais (mJ m^{-2})		
			γ_S	γ_S^D	γ_S^P
CD _a	46,1	40,1	27,48	3,75	23,73
E1 _a	47,0	36,2	31,16	3,03	28,13

Os valores de tensões superficiais obtidos pelo método da bolha são sempre maiores que aqueles obtidos pela ascensão capilar (figura 4.9).

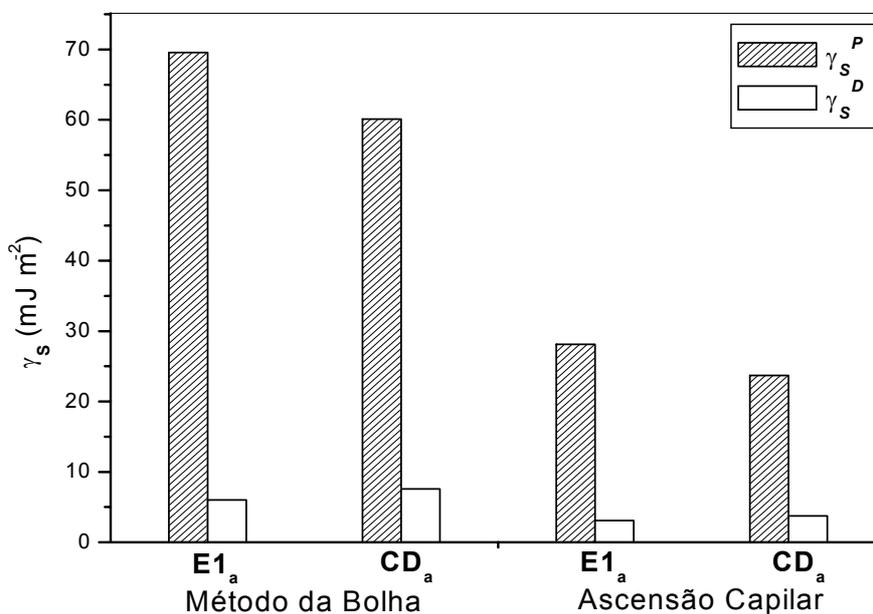


Figura 4.9 - Comparação das tensões superficiais obtidas pelos dois métodos descritos (Método da Bolha e Ascensão Capilar).

4.2. COMPORTAMENTO CELULAR

4.2.1. TESTE DE FOSFATASE ALCALINA

A atividade de fosfatase alcalina nos osteoblastos de segunda passagem, cultivados por 7 dias em lamínulas de vidro, foi identificada na membrana da maioria das células cultivadas, sob uma coloração vermelha, como pode ser visto na figura 4.10.

4.2.2. ORIENTAÇÃO DOS OSTEOLASTOS

O comportamento dos osteoblastos frente às ondulações de superfície foi avaliado usando apenas pastilhas do tipo CD_a, a fim de se eliminar variáveis adicionais. No primeiro experimento, cerca de $2,5 \times 10^4$ células foram plaqueadas sobre cada pastilha. Após 4 dias de cultivo, as imagens de MEV revelaram células completamente aderidas e espreiadas sobre a superfície das pastilhas sem, no entanto, estarem em confluência. As células sobre a região plana da pastilha não apresentaram qualquer orientação particular de longa distância, estando aleatoriamente distribuídas (figura 4.11). Contrariamente, sobre a região ondulada, células orientadas por longas distâncias, e na mesma direção das ondulações foram facilmente notadas (figura 4.12).

Morfologicamente, os osteoblastos adquiriram um espreiamento polarizado sobre as ondulações, tornando-se bastante alongados. Várias células polarizadas e arranjadas em paralelo sobre uma ondulação podem ser vistas na figura 4.13. Tal comportamento pôde ser observado tanto sobre as ondulações menores quanto sobre as maiores. Por outro lado, sempre que ondulações vizinhas encontravam-se em distâncias menores que $100\mu\text{m}$ (cume a cume), as células formaram pontes entre elas (figura 4.14). Numa avaliação rápida e qualitativa, um número reduzido de células foi visto nas regiões planas entre as ondulações, quando comparado ao número de células observado sobre as ondulações (figuras 4.12 e 4.14).

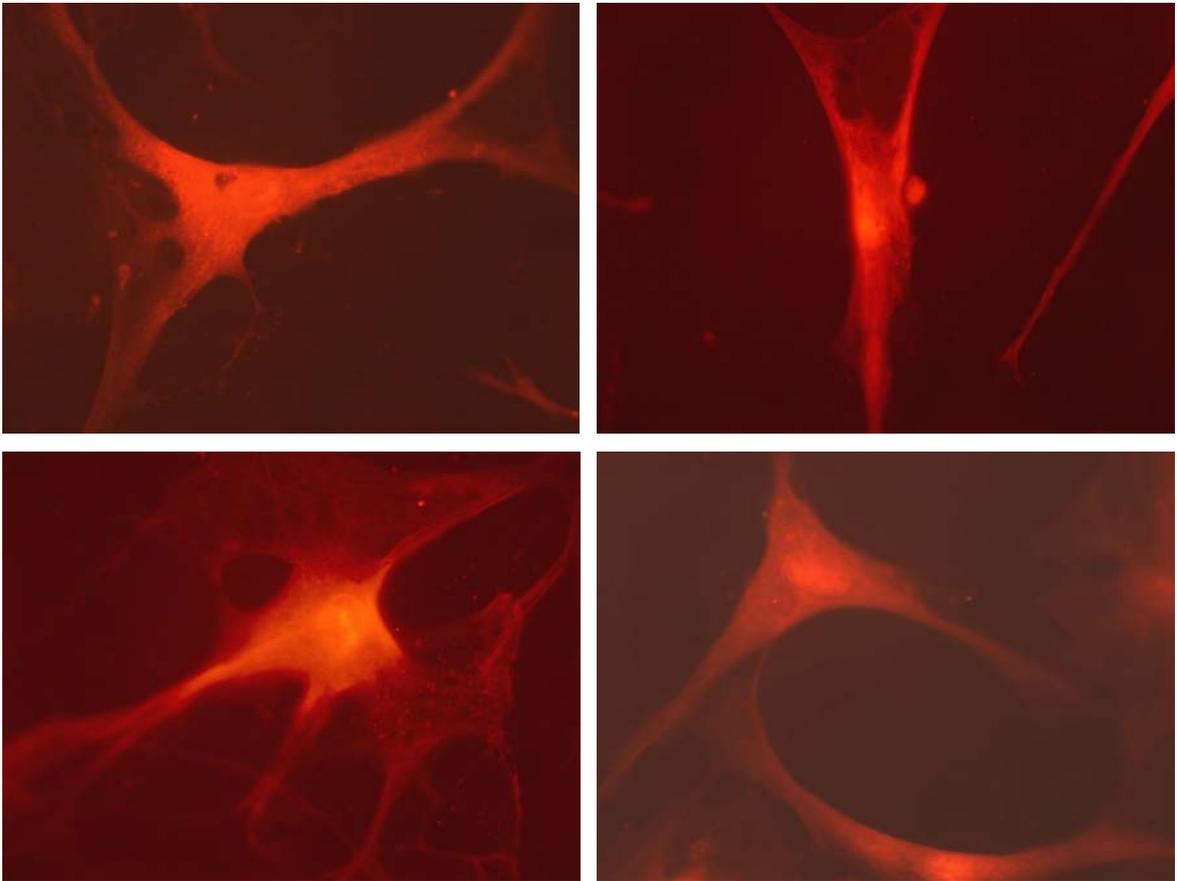


Figura 4.10 - Imagens de osteoblastos humanos de segunda passagem corados com um *kit* de teste próprio para fosfatase alcalina (Vector[®] Red Kit I Cat. No. SK-5100) após 7 dias em cultivo sobre lamínula.

A quase ausência de células entre ondulações vizinhas sugeriu algum tipo de não adequação das células àquela região e, portanto, migração para a região ondulada próxima. Na figura 4.15 pode-se observar a interface entre a região plana e ondulada da pastilha. Osteoblastos sobre a superfície plana, ao alcançarem a primeira ondulação, parecem mudar sua direção de espraiamento em quase 90°. Após 7 dias de cultivo, as células se encontravam em estado de pós-confluência, sendo que, em algumas regiões, foi possível observar duplas camadas de células. As células dispostas nas camadas superiores não apresentaram qualquer orientação particular relativamente à topografia das pastilhas, diferentemente daquelas em contato direto com a superfície ondulada. (figura 4.16).

Usando uma densidade de células cerca de 6 vezes menor sobre o mesmo tipo de pastilha (CD_a), verificou-se um ligeiro atraso no espraiamento inicial das células. Mesmo no quarto dia de cultivo ainda foi possível observar algumas células de formato semi-esférico, sem presença de projeções como filopódios ou lamelipódios. De modo similar, a orientação das células foi atrasada.

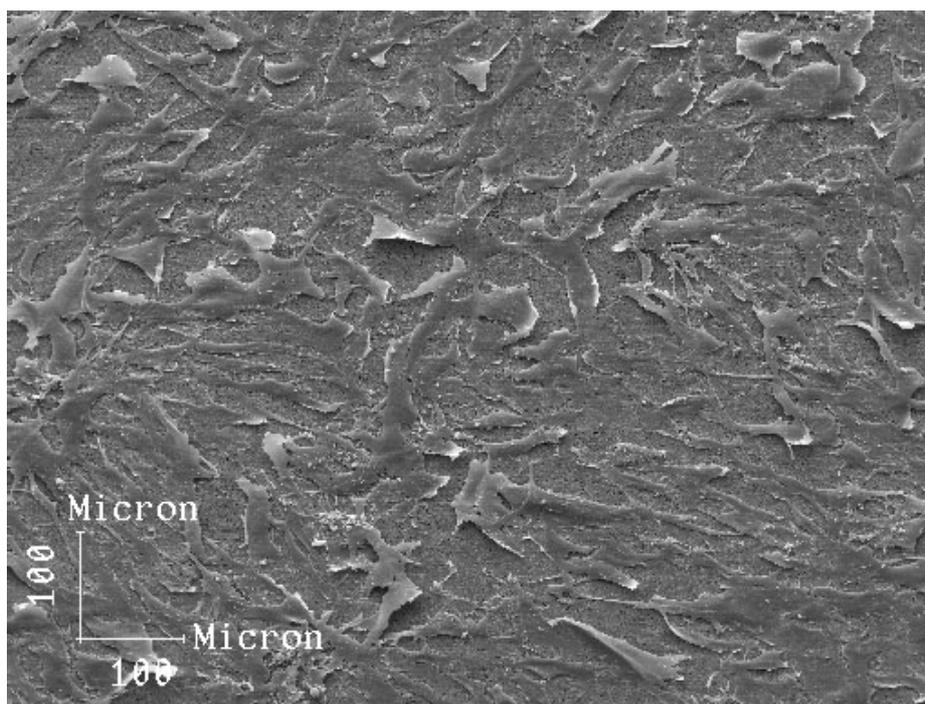


Figura 4.11 - Micrografia por MEV de osteoblastos sobre a região plana da pastilha CD_a após 4 dias em cultura, sem qualquer orientação preferencial de longa distância.

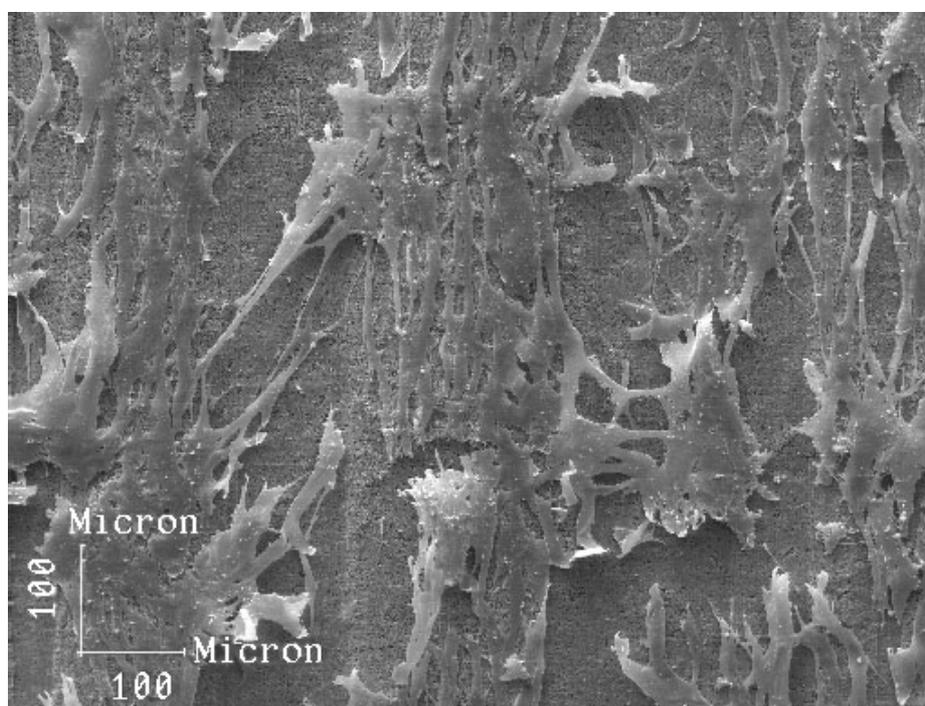


Figura 4.12 - Micrografia por MEV mostrando células orientadas (verticalmente disposta na figura) ao longo do eixo das ondulações após 4 dias em cultura.

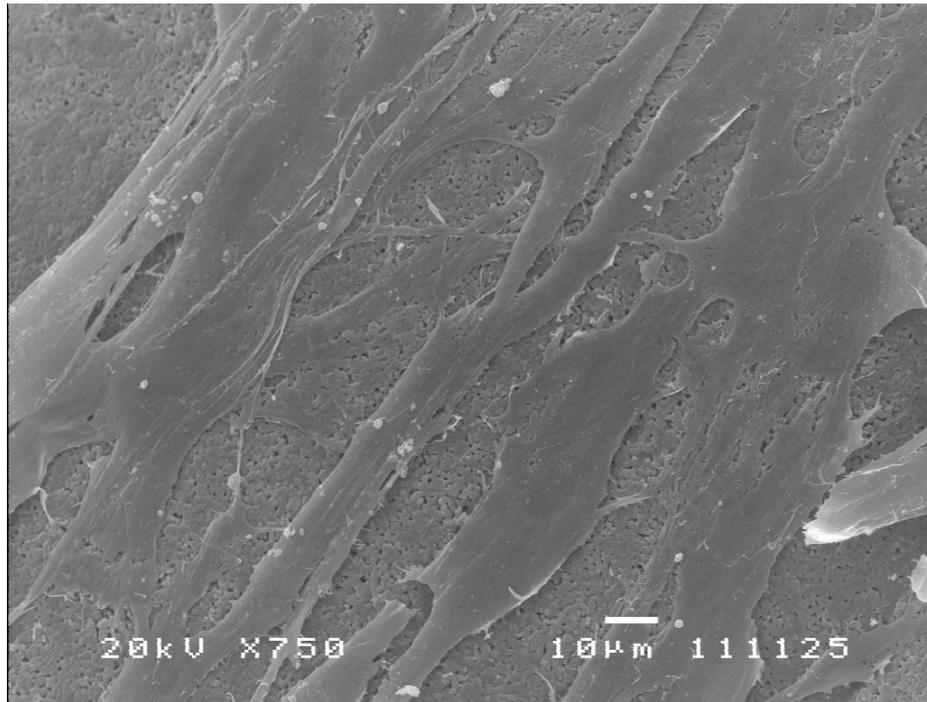


Figura 4.13 - Micrografia detalhada por MEV de células orientadas (oblíquas na figura) sobre uma ondulação.

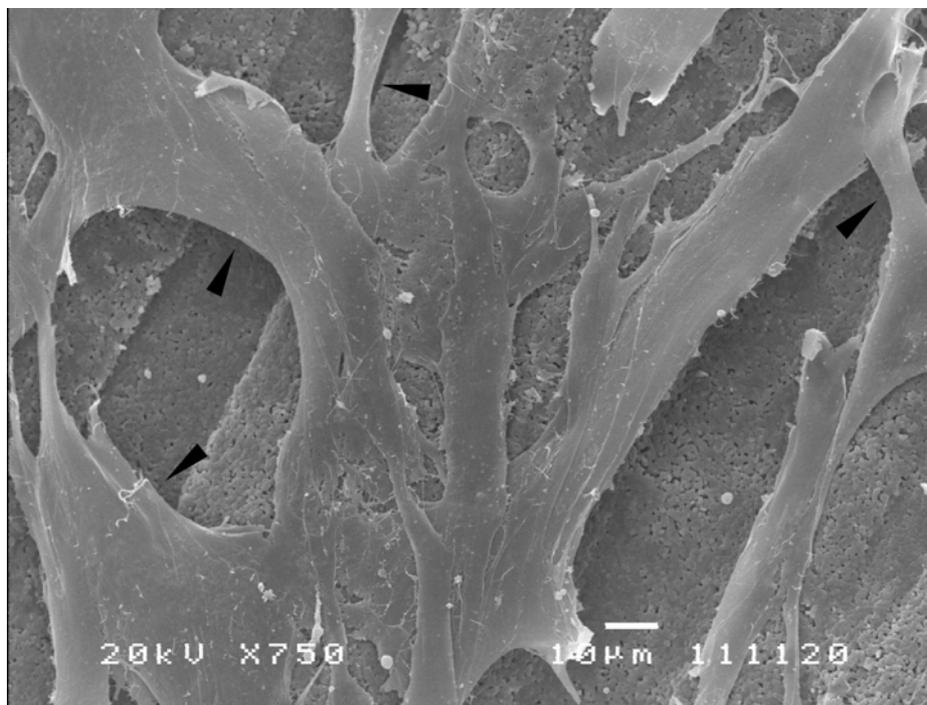


Figura 4.14 - Imagem por MEV mostrando várias pontes celulares entre ondulações vizinhas (setas).

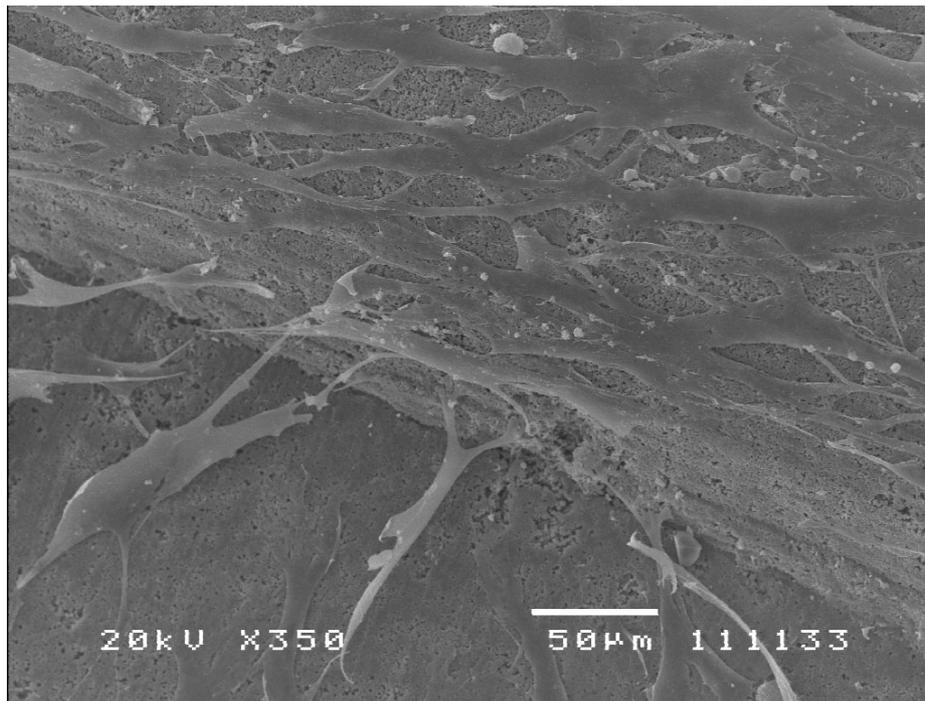


Figura 4.15 - Micrografia em MEV mostrando a interface entre a região plana (parte inferior da imagem) e a ondulada (parte superior da imagem) de uma pastilha.

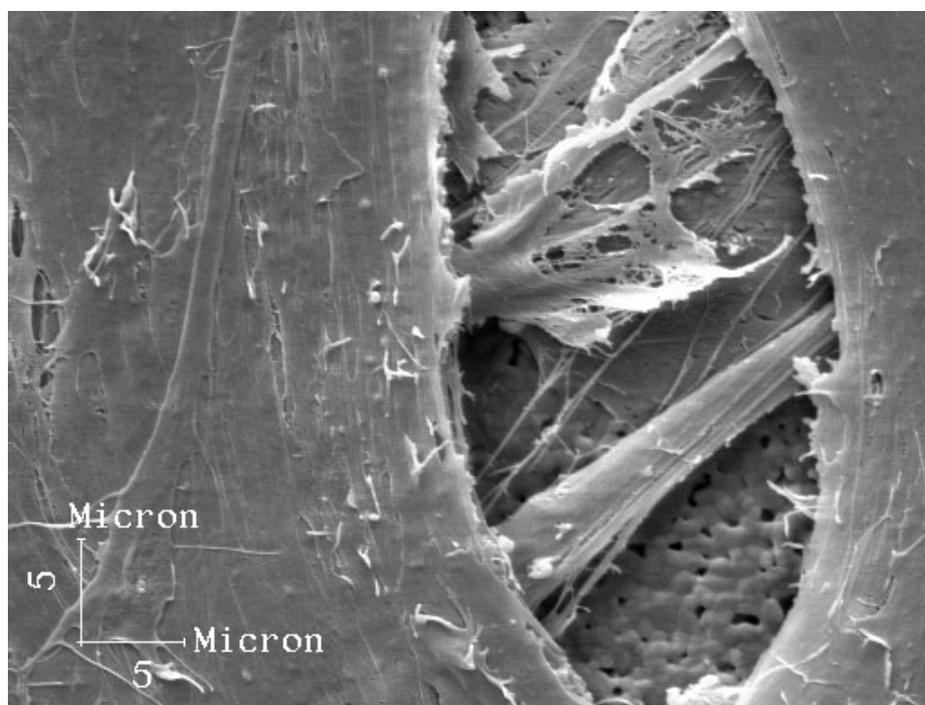


Figura 4.16 - Micrografia (MEV) mostrando células em camadas superiores orientadas diferentemente àquelas em contato com a superfície.

Na figura 4.17 pode-se verificar a orientação gradual dos osteoblastos ao longo do tempo em cultura. Nota-se que mesmo no quarto dia menos de 35% das células estavam orientadas. A aparente preferência pelas ondulações expressas pelos osteoblastos e inicialmente observada qualitativamente por MEV, foi confirmada com uma análise quantitativa que levou em conta a variação da densidade celular (células/área) sobre as ondulações e sobre as regiões planas vizinhas usando microscopia óptica (figura 4.18).

Inicialmente, o número de células nas superfícies planas vizinhas às ondulações era sempre maior que o número de células sobre elas. Uma grande quantidade de células pôde ser observada na base das ondulações 4 horas após terem sido plaqueadas (ver figura 4.19). Mesmo algumas células já aderidas e emitindo prolongamentos foram vistas nesse tempo (figura 4.20). Após o quarto dia essa situação se inverte e o número de células sobre as ondulações começa a se sobrepor. Células com morfologia similar àquelas mostradas nas figuras 4.21 e 4.22 puderam ser vistas após o primeiro dia em cultura, indicando algum tipo de migração celular na direção das ondulações. Após 7 dias, células isoladas e grupos de células com espraiamento polarizado (orientadas) puderam ser facilmente observadas (ver figuras 4.23 e 4.24).

4.2.3. ADESÃO E PROLIFERAÇÃO DE OSTEOBLASTOS

Eficiência de adesão

A eficiência de adesão se refere à fração de células aderidas após 4 horas de cultivo em relação ao número total de células plaqueadas sobre a pastilha. Portanto, uma eficiência de 100% significaria que todas as células plaqueadas aderiram efetivamente após 4 horas.

Cada poço, em placas de cultivo de 48 poços, dispõe de uma área de superfície de $\sim 102,0\text{mm}^2$. Levando-se em conta que todas as células precipitam sobre a superfície do poço e se distribuem homogeneamente sobre ela, a densidade de células que deveria estar presente sobre uma pastilha dentro de um poço, pode ser facilmente calculada. O valor real de células aderidas sobre a superfície foi calculado por meio de análise de imagens sobre microscopia óptica.

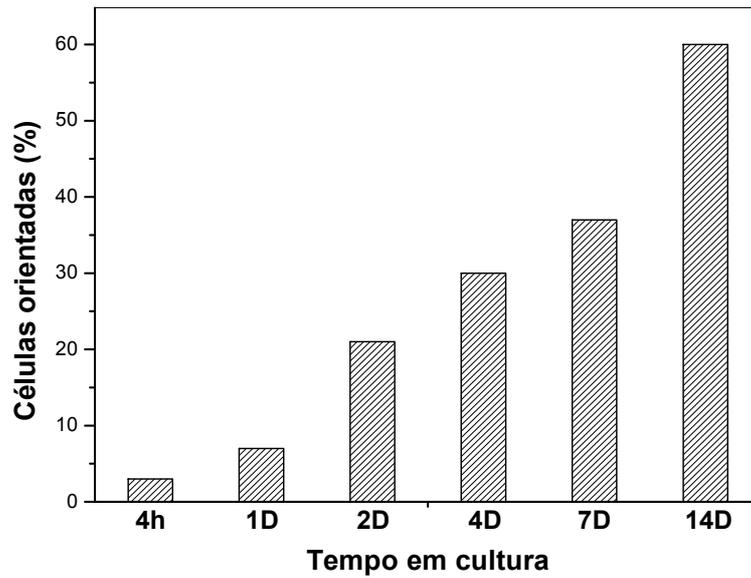


Figura 4.17 - Fração de células orientadas sobre as ondulações ao longo do tempo em cultivo, baseadas na razão entre o número de células orientadas e o número total de células sobre as ondulações.

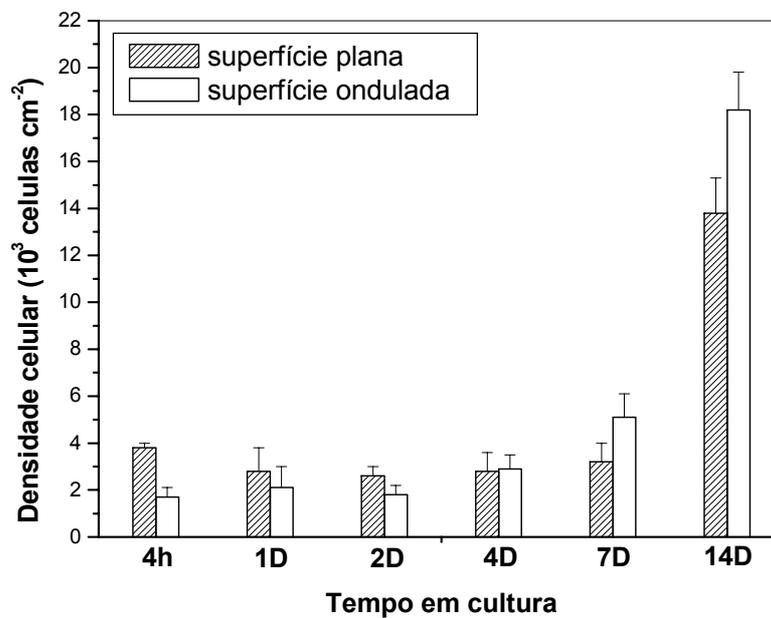


Figura 4.18 - Dinâmica da distribuição celular ao longo do tempo sobre as ondulações e sua vizinhança.



Figura 4.19 - Micrografia (MEV) mostrando um osteoblasto no vale entre duas ondulações 4h após o início da cultura (ondulação no canto inferior direito).

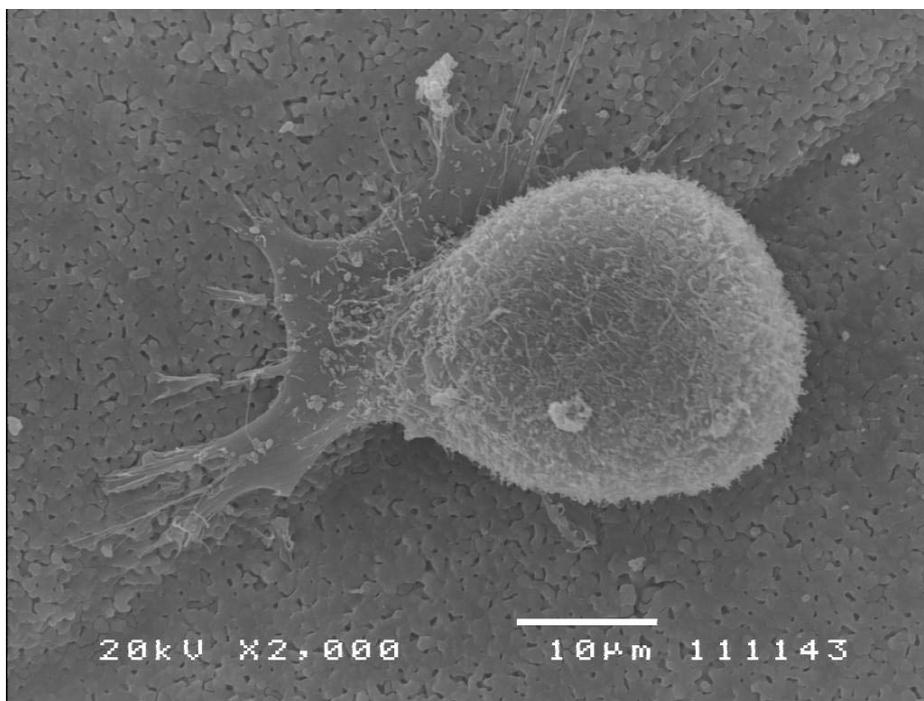


Figura 4.20 - Micrografia (MEV) mostrando um osteoblasto aderido na interface ondulação/superfície plana, emitindo lamelipódios na direção da ondulação.

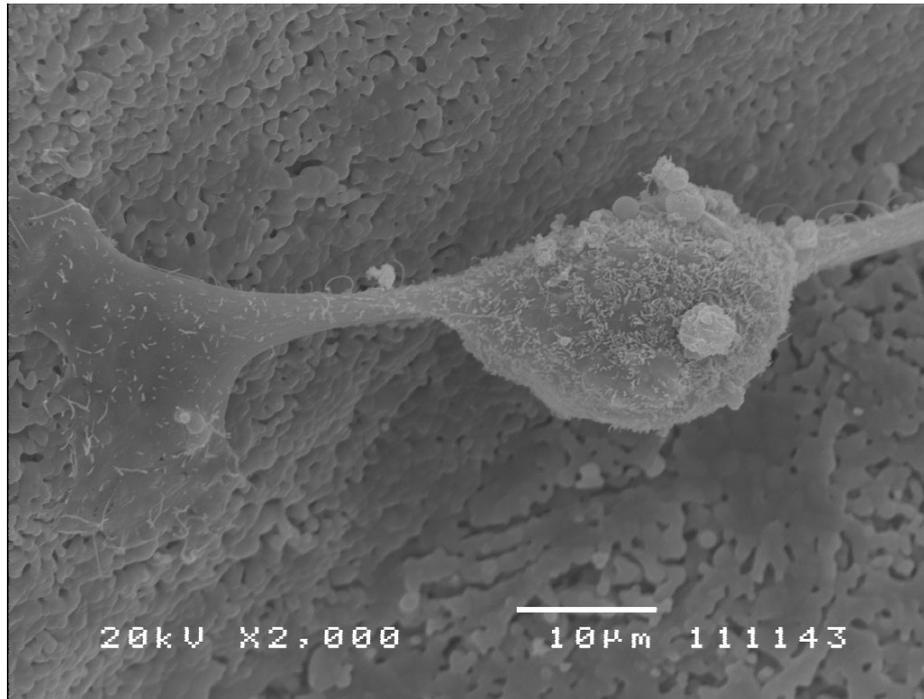


Figura 4.21 - Micrografia (MEV) de um osteoblasto “escalando” uma ondulação após 4 dias em cultivo.

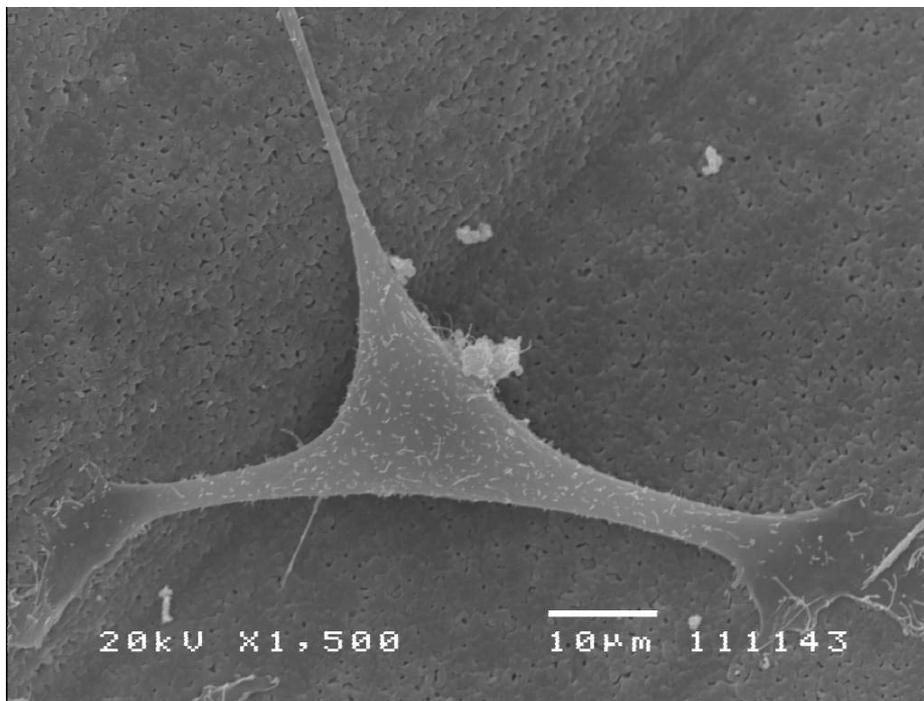


Figura 4.22 - Micrografia (MEV) mostrando um osteoblasto com espraio característico na base de uma ondulação após 1 dia de cultivo.

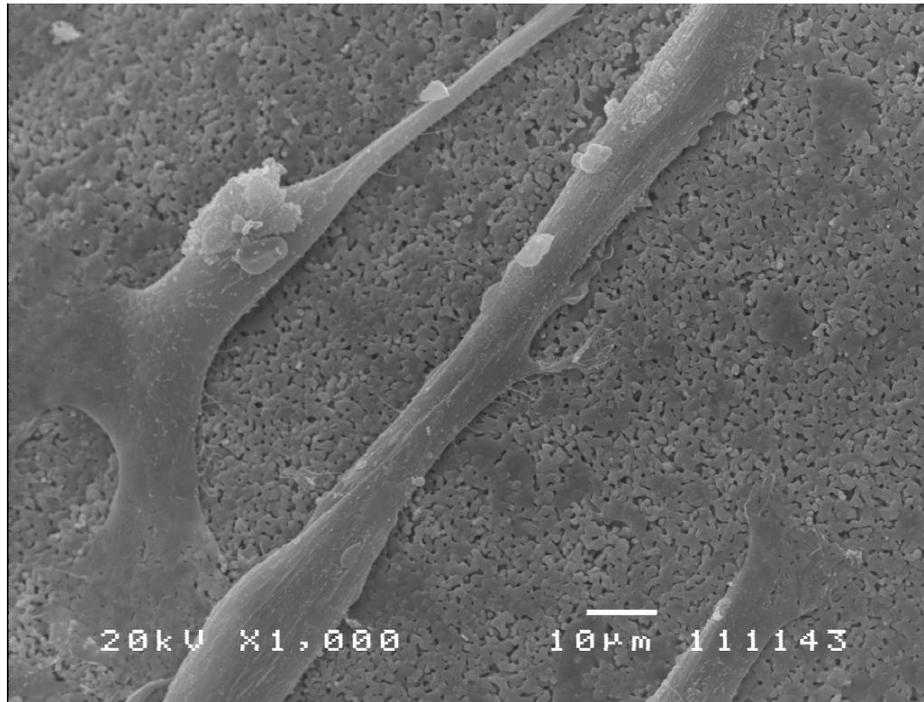


Figura 4.23 - Micrografia (MEV) mostrando células individuais orientadas sobre uma ondulação após 7 dias de cultivo.

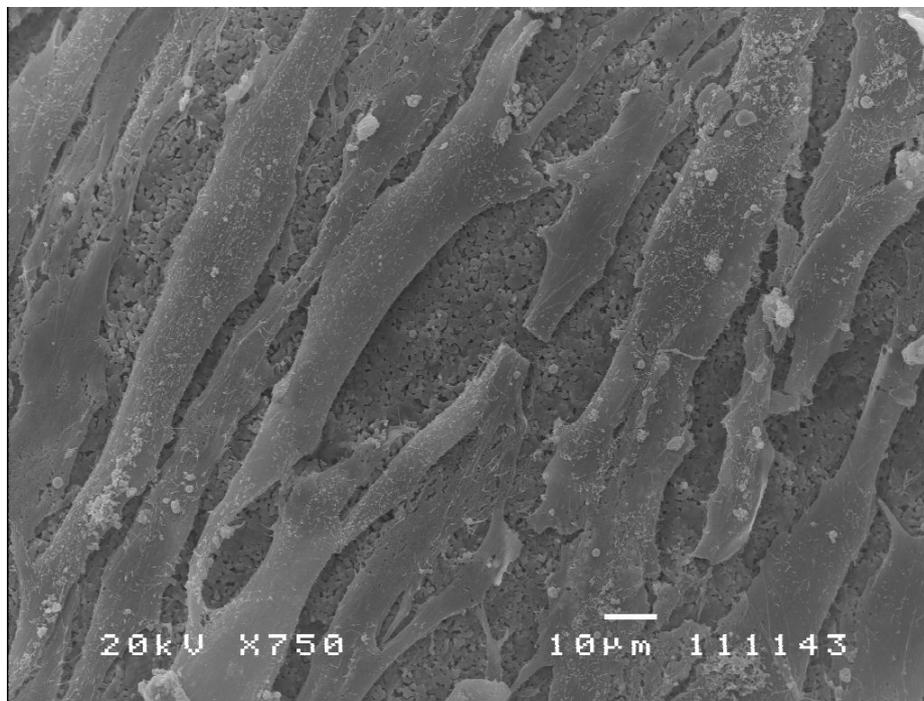


Figura 4.24 - Micrografia (MEV) da região entre duas ondulações mostrando grupos de células orientadas após 14 dias de cultivo.

A tabela 4.5 lista a eficiência de adesão dos osteoblastos após 4h de cultivo nas diversas pastilhas testadas. O valor total de células plaqueadas também é mostrado.

Tabela 4.5 - Eficiência de adesão para as superfícies estudadas.

Experimento	Total de osteoblastos plaqueados	Pastilhas	Eficiência de adesão (%)
1	$\sim 4,0 \times 10^3$	CD _a	77 ± 10
		E1 _a	62 ± 10
2	$\sim 1,3 \times 10^4$	CD _a	88 ± 17
		E2 _a	76 ± 18
3	$\sim 2,0 \times 10^3$	CD _b	35 ± 5
		E1 _b	50 ± 7

Os valores de eficiência obtidos revelam valores significativamente diferentes ($p = 0,01$; $n = 25$) entre as pastilhas CD e E dos experimentos 1 e 3. No primeiro experimento, um número maior de células aderiram, inicialmente, sobre as pastilhas CD_a. No terceiro experimento, mais células aderiram nas pastilhas E1_b do que nas CD_b. Não existiu diferença estatística entre as eficiências sobre as pastilhas CD_a e E2_a para o segundo experimento.

Proliferação celular

A proliferação dos osteoblastos sobre as pastilhas estudadas nos 3 experimentos relatados no item acima foi determinada via análise de imagens em microscopia óptica. Os gráficos de crescimento de células podem ser vistos nas figuras 4.25, 4.26 e 4.27 para os experimentos 1, 2 e 3, respectivamente. Após 4h do início do primeiro experimento, a quantidade de células aderidas sobre a pastilha E1_a foi menor que sobre a pastilha CD_a ($p = 0,01$; $n = 25$). Um dia após o início do experimento, uma diminuição notável no número de células pôde ser observada tanto sobre as pastilhas CD_a quanto sobre E1_a. No entanto, essa diminuição foi mais acentuada sobre as pastilhas CD_a. Do segundo até o sétimo dia, um aumento sutil no número de células foi observado sobre as duas pastilhas, podendo-se associar esse período à fase *lag* observada também em cultura de células animais. Somente após 7 dias de cultivo a proliferação celular começa a entrar na fase exponencial de crescimento, igualmente sobre as duas pastilhas. É importante notar que, exceto para os tempos iniciais, a tendência de proliferação entre as duas pastilhas estudadas foi muito semelhante, no entanto, após o primeiro dia, a quantidade de células sobre E1_a foi sempre maior que sobre CD_a. Uma situação muito

próxima àquela vista no primeiro experimento foi observada no segundo experimento. Após 4h o número de células sobre as duas pastilhas (CD_a e $E2_a$) foi estatisticamente igual. A redução das células vista no primeiro experimento depois de um dia de cultivo foi, de igual modo, observada sobre as duas pastilhas, no entanto, essa redução se prolongou até o segundo dia nas pastilhas CD_a . A partir do segundo dia, o número de células sobre as pastilhas $E2_a$ foi sempre maior que sobre as pastilhas CD_a , descrevendo um perfil de curva muito semelhante ao observado no primeiro experimento. A fase *lag*, sugerida pela curva de proliferação, bastante desenvolvida do primeiro experimento, foi notavelmente reduzida no segundo. De qualquer modo, até 14 dias de cultivo nenhum perfil de crescimento exponencial foi verificado, tendo, a curva, um caráter linear muito mais acentuado, sem exibir, portanto, grande proliferação celular. No terceiro experimento o número de células aderidas nas primeiras 4h de cultivo foi enormemente baixo para as duas pastilhas CD_b e $E1_b$. Após um dia, o número de células se eleva até o segundo dia sobre as duas pastilhas ($p = 0,01; n = 25$), permanecendo quase constante até o quarto dia. A fase exponencial de crescimento foi alcançada já a partir do sétimo dia. Desde 4h, uma maior quantidade de células foi vista sobre as pastilhas $E1_b$ e após 14 dias de cultivo essa quantidade foi cerca de duas vezes maior que na CD_b . Nenhuma tendência de morte celular foi notada nos tempos iniciais de cultivo.

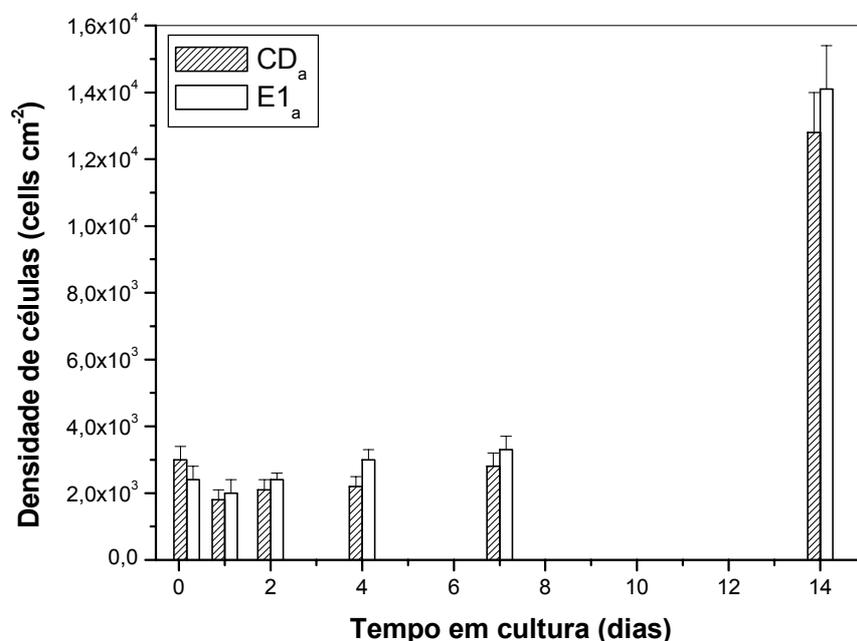


Figura 4.25 - Curva de crescimento de osteoblastos sobre pastilhas CD_a e $E1_a$.

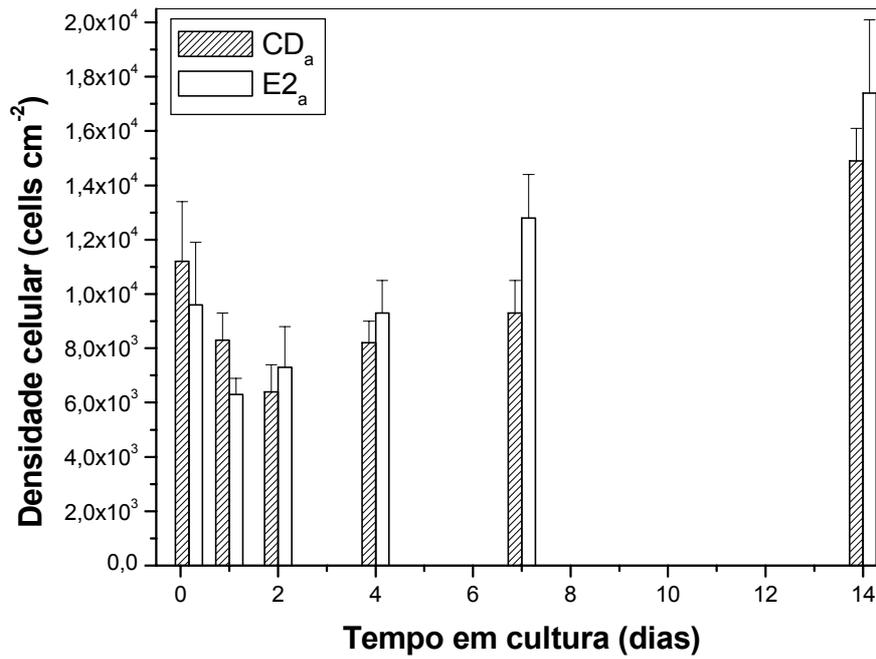


Figura 4.26 - Curva de crescimento de osteoblastos sobre pastilhas CD_a e E2_a.

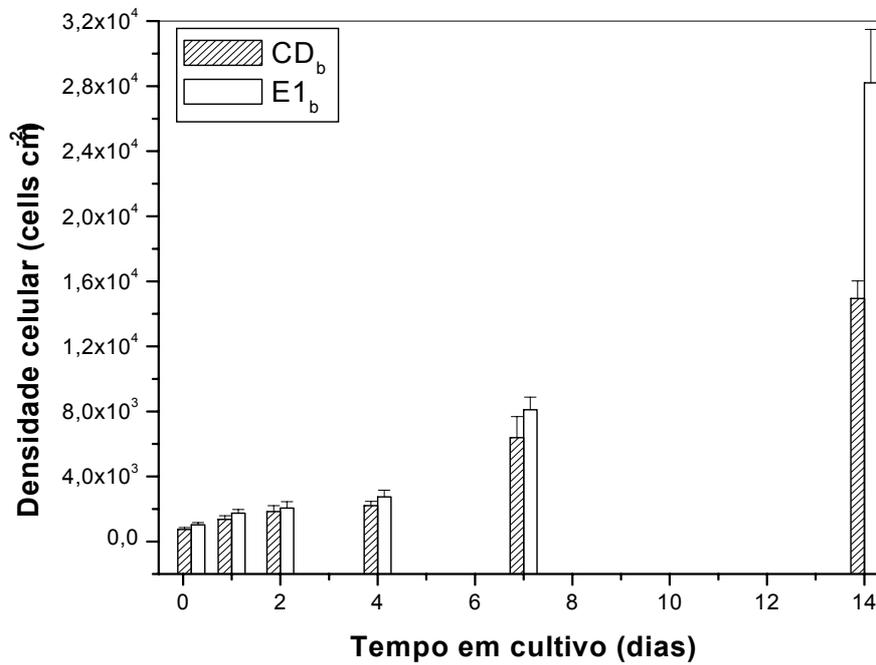


Figura 4.27 - Curva de crescimento de osteoblastos sobre pastilhas CD_b e E1_b.

4.3. TRANSFORMAÇÕES SUPERFICIAIS *IN VITRO*

4.3.1. DISSOLUÇÃO E REPRECIPITAÇÃO

O comportamento de dissolução das pastilhas contendo 21,8% de α -TCP (CD_a) foi monitorado indiretamente por meio de uma avaliação quantitativa da variação de microporosidade na superfície das pastilhas incubadas com células após 4, 7 e 11 dias em cultura (ver figura 4.28 e 4.29). Apesar da alta temperatura de calcinação usada (1150°C) observou-se que, antes da incubação, 7,9% (2,23mm²) da superfície da pastilha era ocupado por microporos (figuras 4.28 e 4.29). Após 4 dias de incubação, um significativo aumento de porosidade foi observado, principalmente no contorno de grão (figura 4.28 e 4.29). No entanto, após 7 dias de incubação, a porosidade decresceu e se manteve constante ($p = 0,01$; $n = 16$) até o décimo primeiro dia. Imagens de superfície (MEV), com aumentos elevados após 4h de incubação, mostram pequenos nódulos de precipitação homogeneamente distribuídos por sobre a superfície (figura 4.30). Após 7 dias de incubação, começam a aparecer grãos distintos, menores, bastante rugosos e pontuados com nódulos (figura 4.31). É importante notar a ausência dessa morfologia em grãos próximos, similares àqueles vistos na figura 4.30. Morfologias semelhantes também foram observadas até o 14^o dia de incubação.

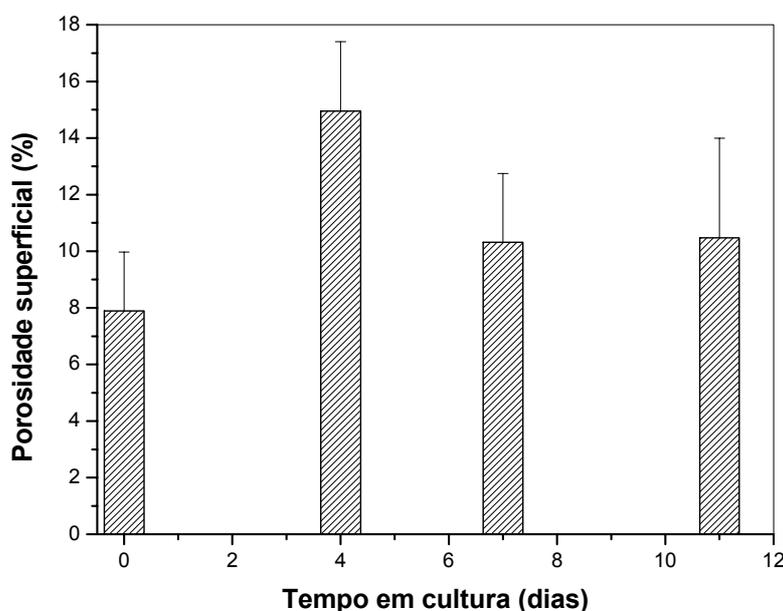


Figura 4.28 - Variação da porosidade de superfície das pastilhas CD_a incubadas a 37°C em DMEM suplementado com 10% de SFB e osteoblastos.

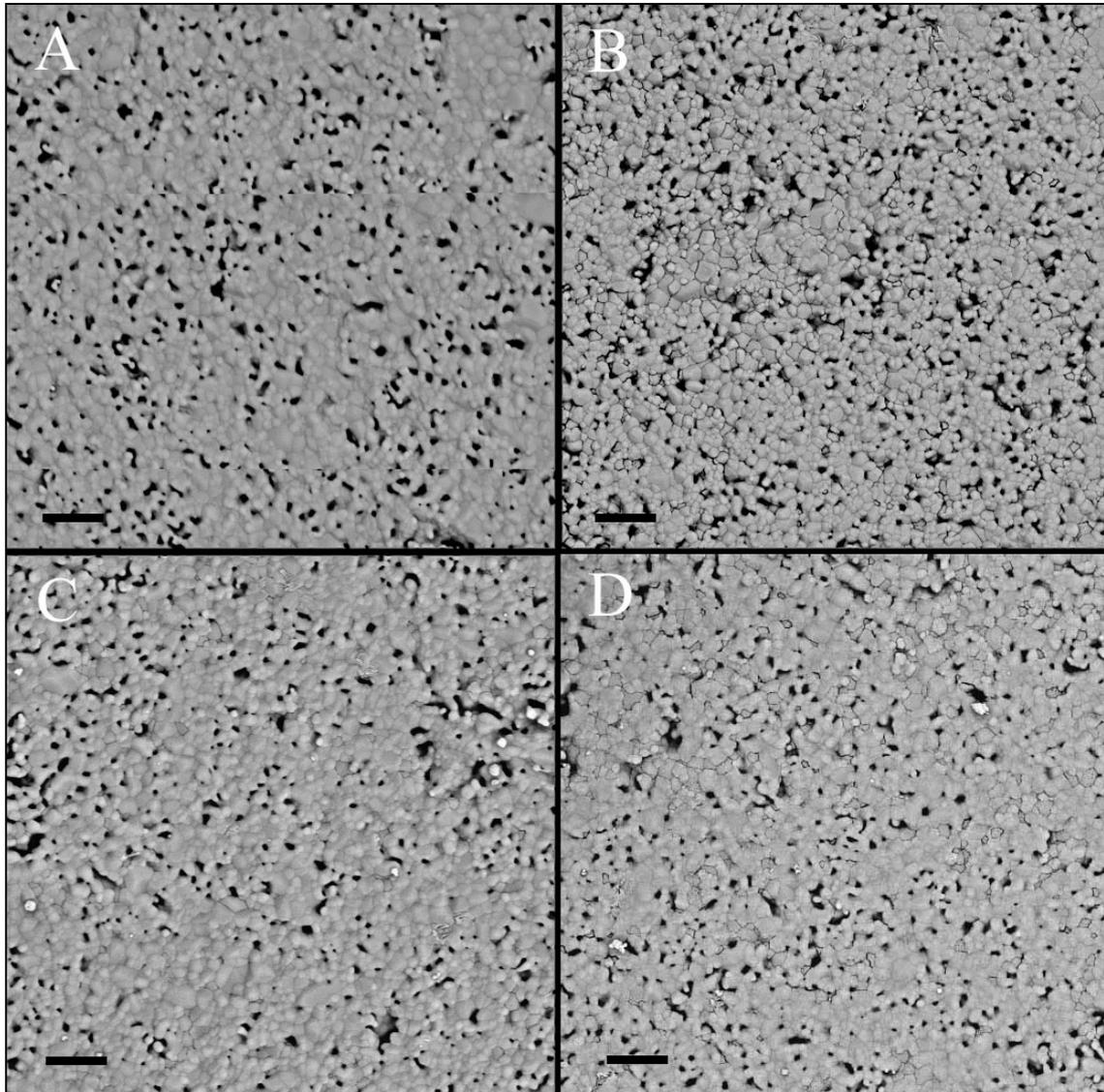


Figura 4.29 - Micrografias (MEV) representativas da superfície das pastilhas antes da incubação (A), após 4 dias (B), 7 dias (C) e 11 dias (D). Barra: 5 μm .

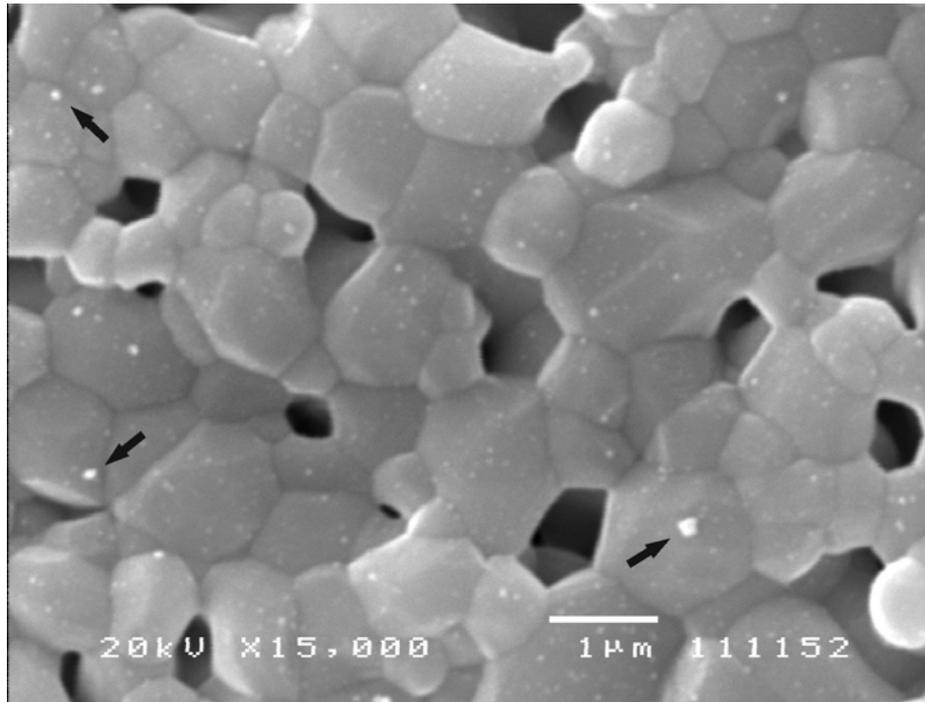


Figura 4.30 - Micrografia (MEV) da superfície CD_a após 4h de incubação onde podem ser vistos pequenos nódulos precipitados (setas) distribuídos homogeneamente por todos os grãos.

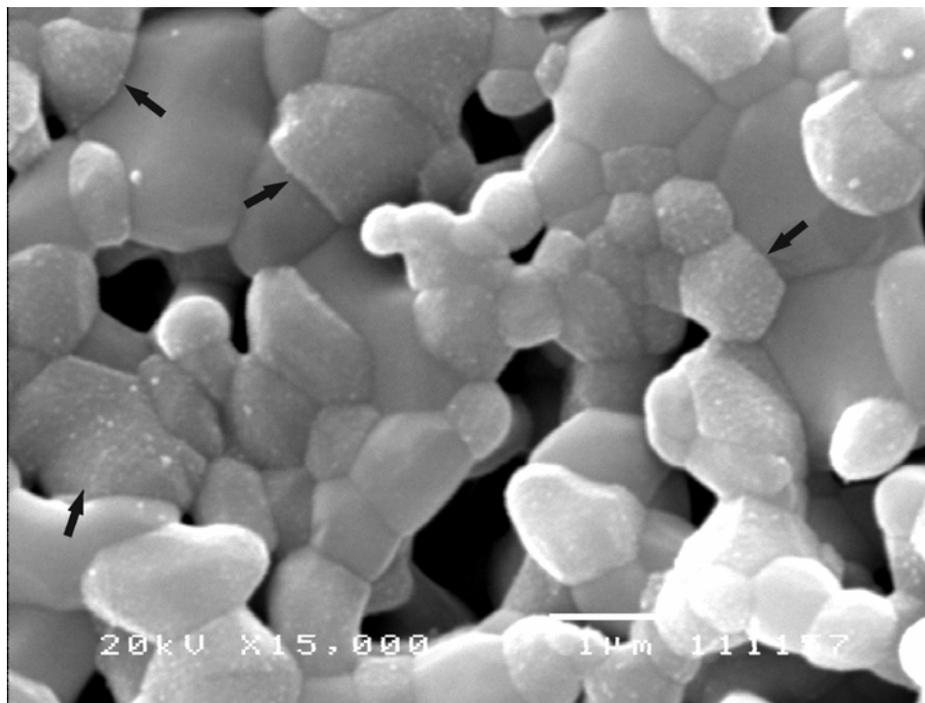


Figura 4.31 - Micrografia (MEV) da superfície CD_a após 7 dias de incubação. Grãos rugosos e com pequenos nódulos (setas) se destacam entre grãos lisos, sugerindo a presença de uma nova fase.

4.3.2. TRANSFORMAÇÕES QUÍMICAS DE SUPERFÍCIE

FT-IR (Refletância Difusa)

Ainda buscando maiores informações sobre as transformações ocorridas na superfície, as pastilhas CD_a e E1_a foram monitoradas por espectroscopia de infravermelho, no modo refletância difusa, em 4 e 14 dias após incubação com células. Os espectros de refletância difusa da superfície plana das pastilhas CD_a e E1_a podem ser vistos na figura 4.32 e 4.34, respectivamente. Espectros obtidos da região ondulada das pastilhas CD_a e E1_a podem ser vistos nas figuras 4.33 e 4.35, respectivamente.

Uma das principais modificações ocorridas ao longo do cultivo vistas no espectro da região plana CD_a foi uma leve redução da intensidade do pico de absorção ligado a νOH (630cm⁻¹) característico de HA, em 4 dias de incubação. Reduções semelhantes não foram observadas em outros espectros.

Bandas na região de 1100, 1070, 1050, 605 e 570cm⁻¹ atribuídas a grupamentos PO₄ de HA (LIN *et al.*, 2001) foram observadas em todos os espectros. Na região de vibração dos grupamentos HPO₄ (1150-1125cm⁻¹) foi possível observar, geralmente em 14 dias, um sutil alargamento e/ou aumento na intensidade de reflexão das bandas (figuras 4.32 e 4.33). Nas pastilhas E1_a, essa região parece não ser alterada ao longo da incubação. No entanto, o alargamento das bandas de PO₄ (1050-1080cm⁻¹) nos espectros das pastilhas E1_a (figuras 4.34 e 4.35) foi observado ao longo do tempo em cultivo.

Fracos picos de reflexão característicos de PO₄ em TCP aparecem na região de 1140, 550 e 540cm⁻¹ nos espectros feitos sobre a região ondulada das pastilhas CD_a (figura 4.33). É importante notar que, mesmo pouco intensos, eles aparecem em todos os tempos avaliados. No entanto, os espectros obtidos sobre a parte plana das pastilhas CD_a não apresentam esses picos (figura 4.32). As superfícies lisa e ondulada das pastilhas E1_a também não apresentaram bandas de TCP (figura 4.34 e 4.35).

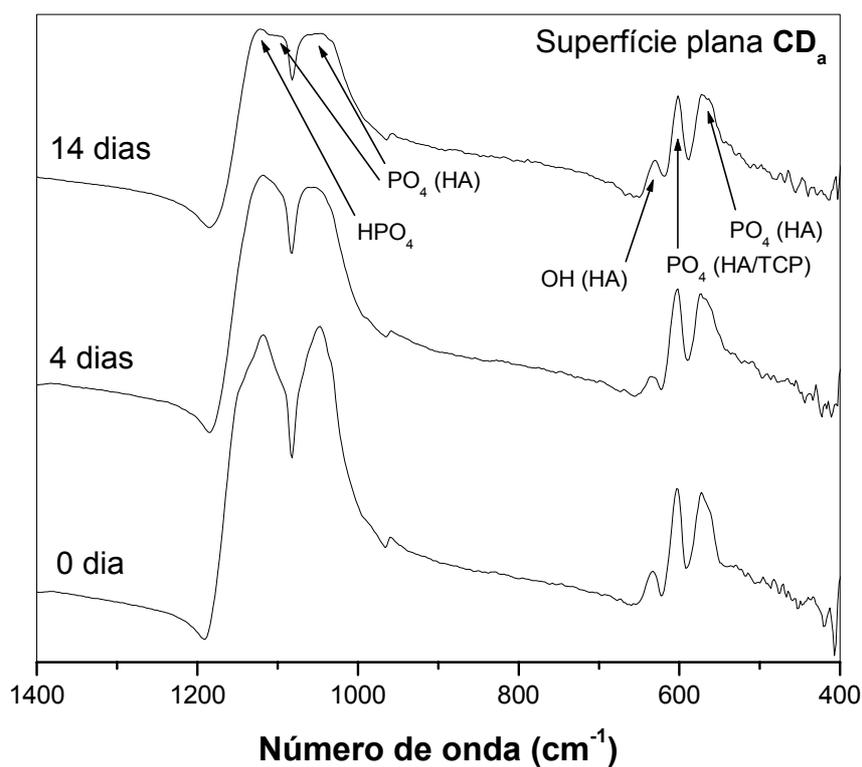


Figura 4.32 - Espectros de FT-IR (refletância difusa) obtidos na superfície plana das pastilhas CD_a ao longo do tempo de incubação a 37°C em meio de cultivo.

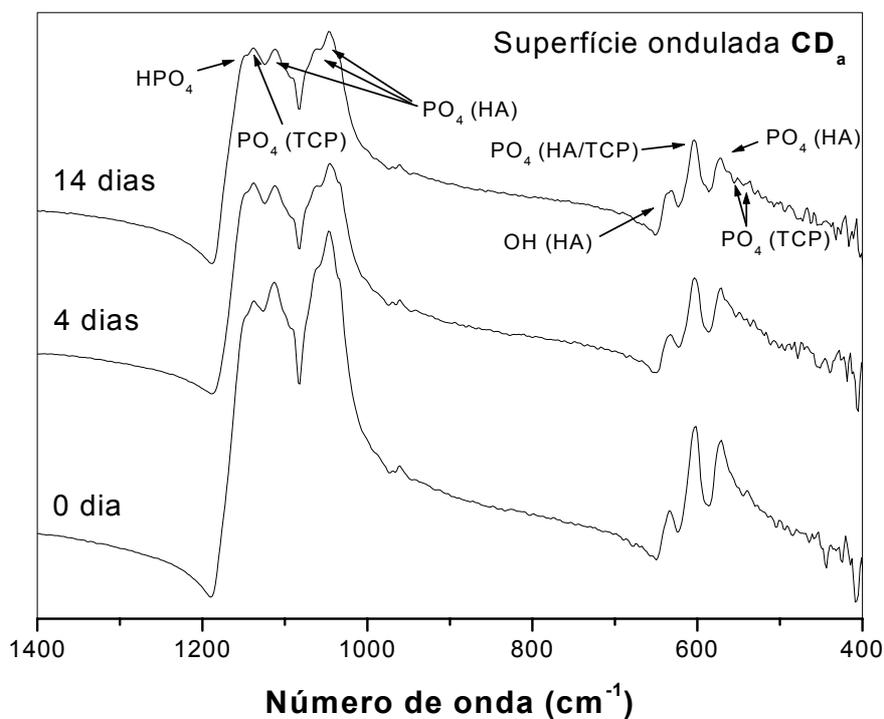


Figura 4.33 - Espectros de FT-IR (refletância difusa) obtidos na superfície ondulada das pastilhas CD_a ao longo do tempo de incubação a 37°C em meio de cultivo.

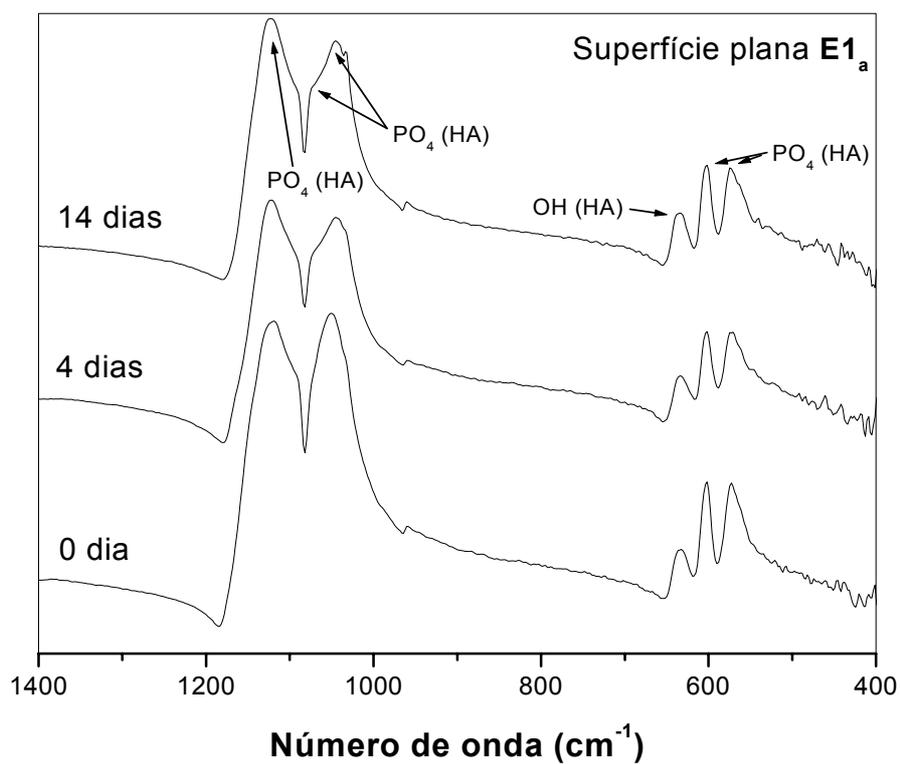


Figura 4.34 - Espectros de FT-IR (refletância difusa) obtidos na superfície lisa das pastilhas E1_a ao longo do tempo de incubação a 37°C em meio de cultivo.

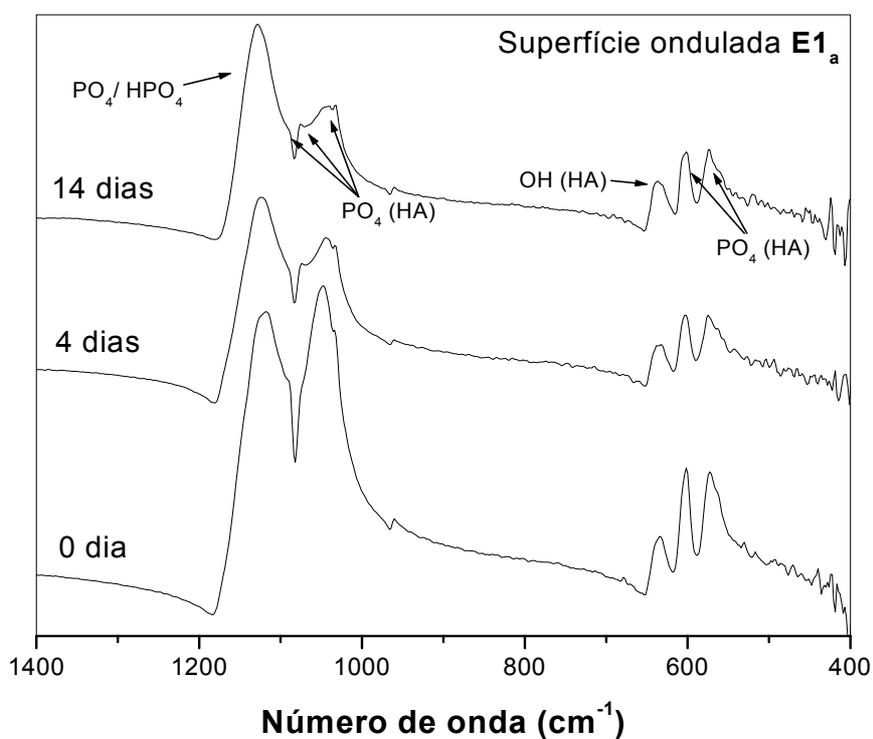


Figura 4.35 - Espectros de FT-IR (refletância difusa) obtidos na superfície ondulada das pastilhas E1_a ao longo do tempo de incubação a 37°C em meio de cultivo.

FT-IR (Transmissão)

As pastilhas CD_a e E1_a foram trituradas e incubadas a 37°C em meio de cultivo por 14 dias a fim de se obter espectros FT-IR (no modo normal) mais detalhados sobre as transformações químicas de superfície ocorridas ao longo do tempo. O material particulado tem uma maior área de superfície quando comparado a pastilhas densas e, portanto, todas as transformações químicas de superfície devem ser mais evidentes. No entanto, os espectros obtidos 4h, 4, 7 e 14 dias após início da incubação não indicaram qualquer tipo de transformação de superfície (figura 4.36).

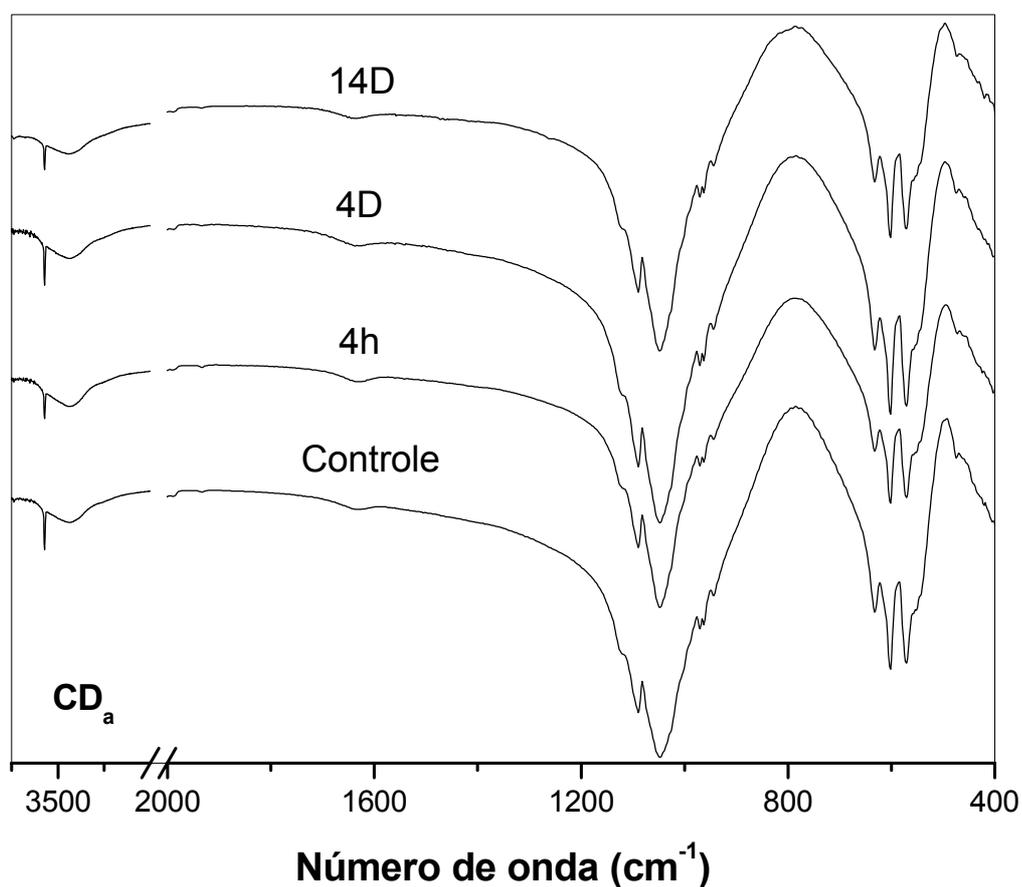


Figura 4.36 - Espectros de FT-IR (transmissão) para o pó de pastilhas CD_a incubado a 37°C em meio de cultivo.

XPS

O espectro geral de XPS obtido na superfície plana das pastilhas E1_a após calcinação pode ser visto na figura 4.37. Picos correspondentes a C, O, Ca e P foram identificados e espectros detalhados, nas regiões correspondentes a cada elemento, foram traçados (figura 4.39). Osteoblastos cultivados por 4 dias sobre a pastilha E1_a foram removidos por tripsinização e a superfície, isenta de células, avaliada também por XPS. Além de todos os elementos identificados na superfície da pastilha controle (C, O, Ca e P), o espectro geral obtido revelou a presença de nitrogênio (401,0eV) (figura 4.38). Cada curva foi integrada e, por meio do fator de sensibilidade e da área sob a curva obtida para cada elemento, a quantidade de cada um deles (% atômico) foi determinada (programa XPS-Quantification) (ver tabela 4.6).

O espectro do C 1s exibiu um pico bem definido na região de 286,4eV característico de carbono contaminante. Nenhuma deconvolução gerou subpicos de carbono pertencentes a CO₃²⁻ (289,6eV) ou ligação C-N de aminas (285,6eV). Os cerca de 7,1% de carbono presentes na amostra foi relacionado apenas ao carbono contaminante. Oxigênios pertencentes a PO₄³⁻ (532,6eV) foram identificados nos espectros de O 1s. A presença desse elemento em ligações Ca-O (231,3eV) não pode ser observada, provavelmente em função da sobreposição de sinal produzido pelos grupos PO₄³⁻, mais abundantes. O Ca 2p foi identificado em picos localizados a 349,0 e 352,0eV. Ligações entre P-O características de grupos P₂O₅ foram observadas para valores de energia de 135,1eV. De posse dos valores relativos de concentração, a razão Ca/P da superfície foi definida em 1,62.

Espectros detalhados podem ser visto na figura 4.40. A curva espectral do C 1s pôde ser decomposta em três subpicos em regiões de energia associados a ligações do tipo CO₃²⁻ (289,6eV), C-N (285,4eV) e C contaminante (286,4eV), numa concentração total de 49,4%. Os espectros de O 1s, Ca 2p e P 2p foram muito semelhantes aos obtidos da superfície controle.

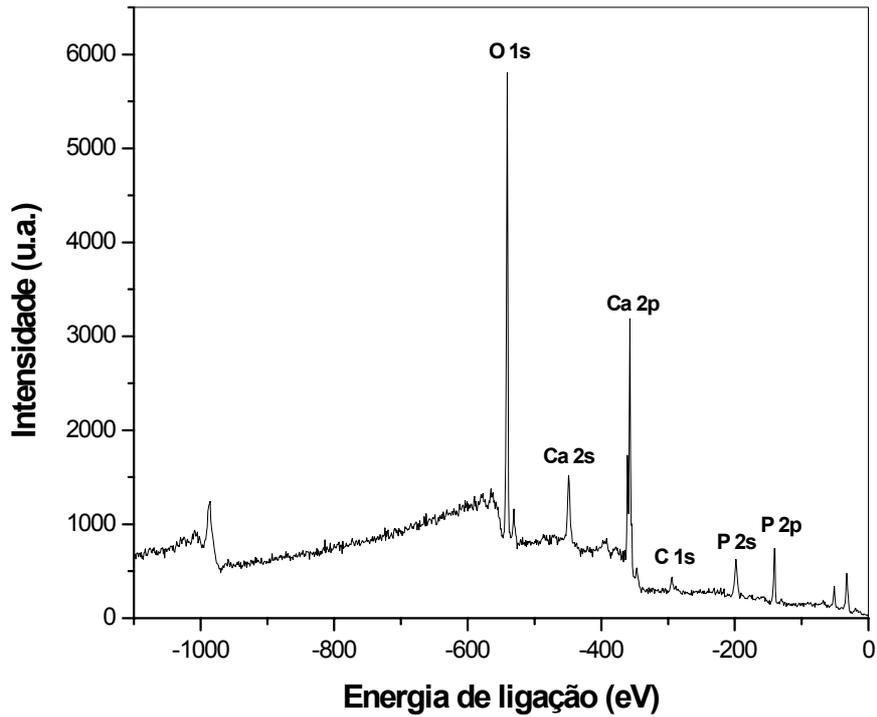


Figura 4.37 - Espectro geral de XPS obtido da superfície das pastilhas E_a após calcinação (pastilha controle).

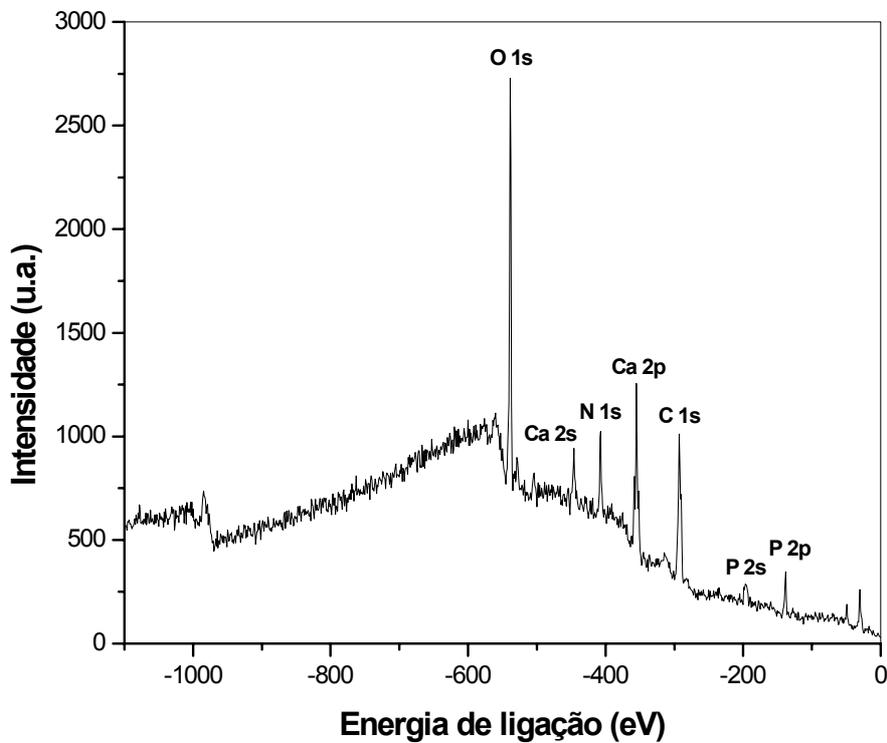


Figura 4.38 - Espectro geral de XPS obtido da superfície das pastilhas E_a após cultivo de osteoblastos por 4 dias.

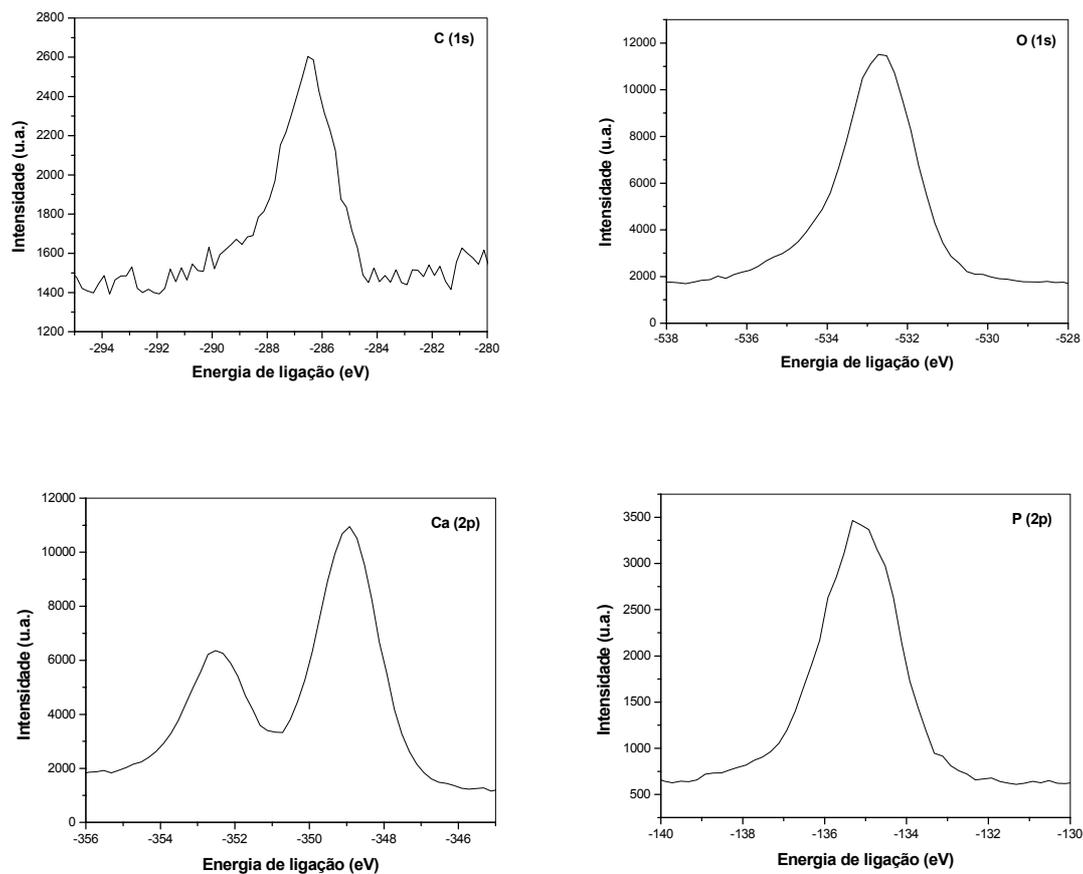


Figura 4.39 - Espectros detalhados de XPS das superfícies E_a após calcinação.

Tabela 4.6 - Concentrações atômicas (%) dos elementos encontrados nas superfícies das pastilhas E1_a antes e após 4 dias de cultivo. O erro associado ao método é de ± 10%.

Elementos	Antes do cultivo	Após cultivo
C	7,1	49,4
O	61,5	27,1
Ca	19,4	7,8
P	12,0	5,7
N	-	9,9

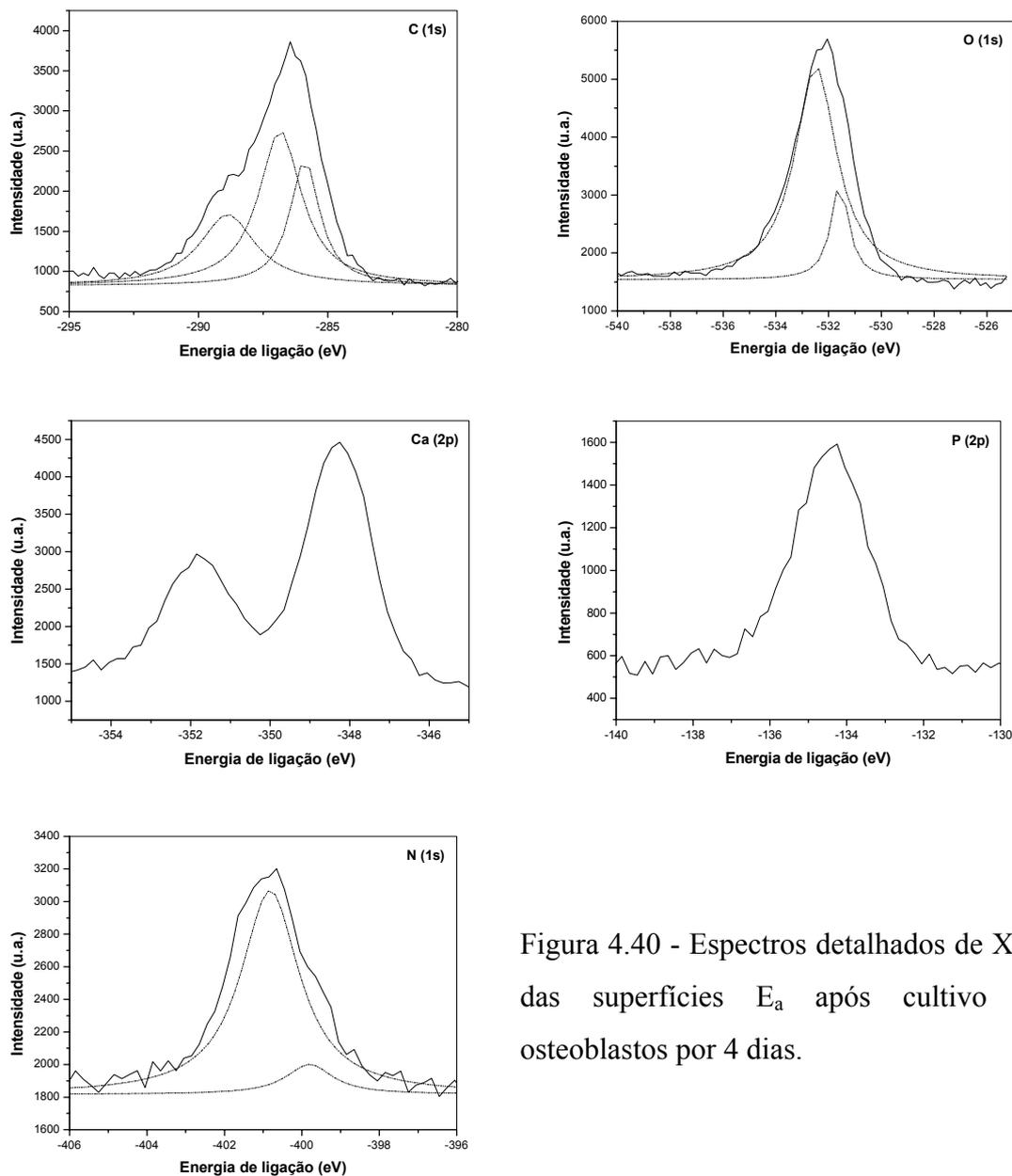


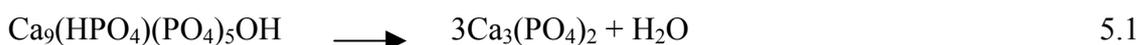
Figura 4.40 - Espectros detalhados de XPS das superfícies E_a após cultivo de osteoblastos por 4 dias.

Ligações do tipo P_2O_5 (532,6eV) e Ca-O (531,3eV) foram identificadas pela deconvolução da curva na região de energia do O 1s. Igualmente, a decomposição do espectro para a região de energia do N 1s revelou a presença de ligações do tipo $H_4N^+CHRCOO^-$ (400,9eV) e H_2N-R (399,6eV). O nitrogênio compõe cerca de 9,9% dos elementos identificados na superfície após cultivo com osteoblastos. A razão Ca/P calculada foi de 1,37.

CAPÍTULO 5 – DISCUSSÃO

A compactação de pós cerâmicos sob altas pressões gera condições ótimas para que várias transformações de caráter físico e químico ocorram durante a calcinação em altas temperaturas. O contato íntimo entre as partículas facilita sobremaneira a difusão no estado sólido e, conseqüentemente, contrações, diminuição da rugosidade de superfície e mudanças de fase. Portanto, as contrações observadas nas pastilhas após calcinação estão coerentes com a alta temperatura de calcinação empregada e os tempos utilizados (OLIVEIRA *et al.*, 2003). No entanto, mesmo apresentando um nível elevado de contração, a avaliação da porosidade superficial para as pastilhas CD_a, calcinadas a 1150°C por 2h, revelou a presença de cerca de 7,6% de microporos (relativamente a área total da pastilha), refletindo a, relativamente, baixa pressão de compactação (108MPa). Esta microporosidade esteve distribuída homoganeamente sobre toda a superfície da pastilha. Nenhuma avaliação quantitativa foi feita sobre as superfícies das pastilhas calcinadas a 1150°C por 72h, no entanto, considerando-se a maior contração observada, a microporosidade de superfície deve ser menor que 7,6%.

Temperaturas acima de 800°C são suficientes para transformar HA deficientes em cálcio (Ca/P < 1,67) em β -TCP de acordo com a equação 5.1. Acima de 1125°C, a forma alotrópica β se torna instável, sendo transformada na forma α . Calcinações de HA deficientes acima dessa temperatura produzem predominantemente α -TCP (DOROZHKIN & EPPLE, 2002; PEÑA & VALLET-REGI, 2003), o que justifica a ausência de β -TCP em todas as pastilhas calcinadas (figuras 4.2 e 4.3, tabela 4.1). De qualquer forma, essa ausência contribuiu para a exclusão de mais uma variável no sistema estudado, a qual tornaria as avaliações de comportamento celular frente à química de superfície muito mais complicadas e imprecisas.



A utilização de um tempo mais longo de calcinação (72h) possibilitou uma maior quantidade de fase transformada na CD-HA, indicando que tais transformações não são instantâneas e, mesmo a 1150°C, ainda se prolongam por mais de 2h. No entanto, as pastilhas E1_a e E1_b (produzidas com hidroxiapatita estequiométrica E1-HA),

sofreram transformações semelhantes sob diferentes tempos de calcinação, sugerindo que toda a transformação de fase ocorreu em até 2h após o início da calcinação a 1150°C. Deve existir, portanto, um tempo de calcinação limite, a partir do qual nenhuma transformação acontece, dependente apenas da razão Ca/P das amostras. Algo semelhante foi observado por PEÑA & VALLET-REGI (2003) em fosfatos com razões Ca/P variando de 1,50 a 1,67, submetidos a várias temperaturas e tempos de calcinação.

A avaliação da composição química das pastilhas por FT-IR é muitas vezes bastante difícil, pois praticamente todos os grupamentos fosfatos vibram na mesma região, dificultando tanto a caracterização dos seus vários tipos como a identificação da sua presença (GADALETA *et al.*, 1995; PEÑA & VALLET-REGI, 2003). Adicionalmente, os dados disponíveis na literatura envolvendo identificação de fosfatos de cálcio por FT-IR nem sempre identificam de forma clara as bandas presentes. Isso fica mais acentuado quando a fase estudada encontra-se numa baixa concentração, como no caso das pastilhas E1_a. Logo, apesar dos espectros de DRX das pastilhas E1_a e E1_b terem mostrado picos característicos de α -TCP (figura 4.3), o espectro FT-IR (transmissão) da pastilha E1_a (figura 4.5) não possuiu qualquer banda relativa a essa fase. Isso parece sugerir que 4,6% de α -TCP, para a metodologia empregada, parece não ser passível de identificação por esta técnica.

As avaliações de ângulo de contato foram realizadas sobre as superfícies CD_a e E1_a apenas, a fim de se verificar alguma relação com a adesão e proliferação dos osteoblastos. A opção pelo método da bolha ao invés do método da gota se deveu, sobretudo, pela impossibilidade em se realizar as medidas, uma vez que logo que a gota pendente tocava a superfície da pastilha, era rápida e completamente absorvida. Isso apontou, inicialmente, a presença de algum tipo de porosidade que viesse justificar tal absorção. Posteriormente, imagens de MEV, como a mostrada na figura 4.25, aliadas à avaliação quantitativa de porosidade de superfície (figura 4.24), vieram confirmar o caráter microporoso das superfícies analisadas. A aparente não influência do tempo sobre os valores de ângulo de contato sugeridos pelo gráfico da figura 4.6 é contrário ao que geralmente é observado em determinações de ângulo de contato pelo método da gota sobre cerâmicas (REDEY *et al.*, 2000). Essa estabilidade parece estar intimamente ligada ao fato de que, no método usado (método da bolha), a amostra foi completamente

submersa no líquido, promovendo uma interface homogênea líquido/sólido em toda a extensão da superfície. Sabe-se que heterogeneidades químicas e físicas de superfície são uma das principais responsáveis pelo espreadimento espontâneo de líquidos (histerese) em superfícies sólidas (DECKER *et al.*, 1999; WEGE *et al.*, 2003). Do mesmo modo, os valores obtidos para o ângulo de contato foram muitos baixos quando comparados aos dados geralmente apresentados pela literatura para cerâmicas de fosfato, que variam entre 44° (TCP) e 75,2° (fluorapatita, FAP) (LIU *et al.*, 1997; SUZUKI *et al.*, 1999). Obviamente, os valores de ângulo de contato para uma mesma substância podem variar amplamente dependendo da porosidade, rugosidade e, mesmo, do grau de cristalinidade do material, sendo praticamente impossível comparar valores de forma exata. No entanto, os valores encontrados (tabela 4.2) parecem inferir um grau de hidrofobicidade que não é próprio dos fosfatos de cálcio.

Pelo método da ascensão capilar, os valores de ângulo de contato obtidos (tabela 4.4) se aproximaram muito daqueles determinados na literatura (SUZUKI *et al.*, 1999). Comparando-se os dois métodos usados na obtenção do ângulo de contato para o cálculo das componentes polares γ_S^P e dispersivas γ_S^D da tensão superficial (figura 4.9), podemos observar que os valores de tensão obtidos pelo método da bolha são consideravelmente maiores que aqueles obtidos pela ascensão capilar. Mais precisamente, os valores de γ_S^P e γ_S^D (método da bolha) parecem sempre cerca de duas vezes maiores que os outros. A existência de um provável fator de correção para as energias obtidas aponta para a existência de um erro, associado a algum dos dois métodos. Se levarmos em conta o grau de microporosidade e a própria absorção de líquido exibida pelas pastilhas quando submetidas ao método da gota, é razoável dizer que, as pastilhas, após terem sido imersas (método da bolha), foram completamente preenchidas pelo líquido em questão. Se o ângulo de contato é sempre aquele formado entre a superfície sólida e a tangente ao líquido sobre o sólido (DECKER *et al.*, 1999), a existência de poros de superfície preenchidos de líquido tenderá a exibir ângulos menores, já que a superfície possuirá uma menor área de interface sólido/líquido. Ou seja, para o caso particular da água, a superfície se tornará aparentemente mais hidrofílica. Tais considerações podem explicar a alta hidrofobicidade de superfície exibida pelas pastilhas CD_a e E1_a (método da bolha).

Tratando-se de dois sistemas diferentes (pastilhas e partículas), as tensões superficiais obtidas pelos dois métodos devem ser, obviamente, diferentes. O aumento de área superficial induz, necessariamente, um aumento da tensão total do sistema. Logo, os resultados obtidos indicam que esse aumento parece não ter grande importância nesse caso particular, uma vez que γ_S (calculado pela ascensão capilar) foi ainda muito menor que o valor obtido pelo método da bolha. Isso ajuda a comprovar que a alta hidrofiliabilidade de superfície observada não é real.

Parece verdade dizer que o aumento da concentração de α -TCP faz com que a tensão interfacial dispersiva γ_S^D aumente ao mesmo tempo em que a componente polar γ_S^P diminui (tabela 4.4, figura 4.9). No entanto, a tensão interfacial total diminui. As variações de tensão verificadas para as pastilhas CD_a e E1_a, apesar de existirem, são bastante discretas, muito provavelmente porque as concentrações de α -TCP não são suficientemente diferentes para produzir mudanças de tensão consideráveis. Valores relativamente próximos também foram observados por LIU *et al.* (1997) para fosfatos diferentes como, por exemplo, HA (28,5mJ m⁻²), fosfato octacálcico (21,6mJ m⁻²) e FAP (32,4mJ m⁻²).

Sabe-se que vários tipos de células expressam fosfatase alcalina (OWEN & FERIEDENSTEIN, 1988). Esta enzima encontra-se ancorada à membrana plasmática via ligações tipo glicosil-fosfatidilinositol (LOW, 1989) e é comumente associada ao fenótipo osteoblástico, não apenas pela facilidade com que ela pode ser identificada, mas também por estar presente em quase todos os seus estágios de diferenciação (HARRIS, 1990). De qualquer modo, a identificação da fosfatase alcalina como forma de caracterizar células do tipo osteoblastos não se constitui no método mais preciso quando utilizado individualmente, uma vez que outros tipos celulares também a expressam. Então, sua utilização deve vir sempre acompanhada de outros procedimentos analíticos que auxiliem tal caracterização. Neste trabalho, as células foram extraídas da superfície de explantes ósseos por meio de migração. O processo de migração das células, por si, constitui-se num método seletivo de isolamento de osteoblastos uma vez que grande parte das células hematopoiéticas não-aderentes, e mesmo adipócitos, são excluídos nesse estágio (MARIE *et al.* 1989; FRESHNEY, 1994). Aliado a isso, cada passagem celular tende a isolar cada vez mais as células em

questão (FRESHNEY, 1994). Logo, a execução criteriosa de todos esses procedimentos, associada ao teste de fosfatase alcalina pode caracterizar precisamente osteoblastos isolados.

O fenômeno de orientação celular (DUNN, 1982; CURTIS & WILKINSON, 1997; TRANQUILLO, 1999) vem sendo descrito em trabalhos recentes como uma grande promessa quanto à mimetização em laboratório de tecidos altamente organizados (TURNER *et al.*, 2003). Vários tipos de células reconhecem padrões topográficos de superfície e respondem a eles de diversas maneiras. A microtopografia de superfície influi sobre a adesão, proliferação, morfologia, diferenciação e expressão gênica das células (CLARK *et al.*, 1990; BRITLAND *et al.*, 1996; RAJNICEK *et al.*, 1997; SCHWARTZ *et al.*, 2001; DALBY *et al.*, 2003). No entanto, ainda não se sabe exatamente como as células se orientam sobre superfícies cerâmicas.

Neste trabalho, o uso de dois padrões topográficos (plano e ondulado) sobre uma mesma superfície permitiu que os osteoblastos humanos fossem submetidos a superfícies quimicamente semelhantes, mas topograficamente diferentes. Além disso, as ondulações foram produzidas no momento da prensagem, como uma imagem negativa da superfície do molde de aço, fazendo com que cada pastilha fosse uma cópia idêntica da outra. Tais cuidados tornaram possível a exclusão de variáveis indesejáveis que poderiam influenciar as determinações, como no caso de ranhuras superficiais criadas por meio de lixamento.

O uso de diferentes quantidades de células pareceu influir diretamente no comportamento de orientação das células sobre o material testado. Quando cerca de $2,5 \times 10^4$ células foram plaqueadas, a orientação foi vista já no quarto dia. No entanto, usando $4,0 \times 10^3$ células, somente no 14º dia mais de 50% das células estiveram orientadas (figura 4.17). A função das células plaqueadas é basicamente dependente de (a) receptores de membrana específicos (integrinas), usados por elas para interagir com a superfície do material, (b) fatores de crescimento presentes no meio externo e (c) interações com células vizinhas (KIM & MOONEY, 1998). De acordo com LO *et al.* (2000), células individuais reagem diferentemente a gradientes de dureza de superfície (durotaxia) que grupos de células. Células vizinhas podem transmitir facilmente sinais

mecânicos da superfície via contato direto célula-célula ampliando ou mascarando as preferências de células individuais. Por outro lado, células produzem fatores de sinalização que agem regulando suas próprias atividades (SECHLER & SCHWARZBAUER, 1998). Sabe-se que moléculas como vitronectina e fibronectina induzem a adesão célula/substrato e quando tais moléculas não estão presentes na superfície as células começam imediatamente a sintetizá-las numa tentativa de facilitar a adesão (SECHLER & SCHWARZBAUER, 1998; MANN *et al.*, 1999). O mesmo acontece com outras proteínas necessárias à vida das células. Assim, quantidades maiores de células tendem a elevar a concentração desses fatores reguladores no meio de cultivo acelerando os estágios de adesão, proliferação e movimento das células. De qualquer modo, parece existir um limite superior (células/área) a partir do qual esses estágios são dificultados (WIEDMANN-AL-AHMAD *et al.*, 2002).

Cerca de 4h após terem sido plaqueadas, um grande número de células pôde ser observado nas superfícies planas entre as ondulações (figura 4.18, 4.19 e 4.20). Este fato é perfeitamente aceitável, uma vez que as ondulações apresentam regiões de declividades suficientemente elevadas para que a maior parte das células, decantadas pela ação da força gravitacional, deslizem sobre a superfície se depositando nas regiões mais baixas, entre as ondulações. Após alguns dias, o número de células sobre as ondulações cresce gradativamente sugerindo dois tipos de mecanismos diferentes: migração e proliferação celular. Osteoblastos não são células de natureza predominantemente migratórias. No entanto, sempre que existem, no sistema, gradientes relacionados a fatores que os influenciam, a migração é observada. Portanto, migrações podem ter ocorrido principalmente com células bastante próximas às ondulações, ou seja, aquelas que conseguem sentir sua presença por meio da emissão de pseudopodes (figura 4.21). Além da possível migração, a proliferação celular sobre as ondulações foi muito mais intensa do que nas superfícies planas vizinhas. Isso pode ser deduzido, pois, supondo que o aumento do número de células sobre as ondulações fosse causado apenas por migração, igual número de células deveria ser perdido na superfície plana vizinha. Como isso não é verdade (figura 4.18), o aumento de osteoblastos sobre as ondulações deve-se em muito maior grau à sua maior proliferação sobre essas regiões.

Osteoblastos espalhados têm comprimentos que variam entre 20 e 80µm (DELIGIANNI *et al.*, 2001), logo, 80µm parece ser a distância limite para que um osteoblasto estabeleça contato entre duas ondulações vizinhas. Neste trabalho, sempre que as ondulações vizinhas encontravam-se muito próximas (<95µm), as células formavam pontes entre elas, sugerindo que mesmo espalhamentos maiores que 80µm são passíveis de acontecerem, como consequência da topografia de superfície.

Recentemente, MATSUZAKA *et al.* (2003) observaram o comportamento de células tipo osteoblastos, cultivados sobre superfícies contendo microranuras, em substratos de poliestireno, com até 1,5µm de profundidade. Quando a largura entre as ranhuras era menor que 2µm a tendência das células era formar pontes sobre as ranhuras, no entanto, distâncias entre 5 e 10 µm permitiam que as células tocassem o fundo das ranhuras. Provavelmente, tal fenômeno não poderia ser observado se ranhuras com mesma largura e profundidades maiores fossem testadas uma vez que, para alcançar o fundo da ranhura as células deveriam se espalhar muito mais e, portanto, consumir uma maior quantidade de energia reorganizando seu citoesqueleto. Por outro lado, qualquer tentativa de comparar testes com substratos quimicamente diferentes não é conclusiva, pois o comportamento celular é também altamente dependente da química de superfície (ANSELME, 2000). ZINGER *et al.* (2004) observaram que osteoblastos não conseguem reconhecer superfícies de Ti pontuadas com cavidades hemisféricas de 10µm de diâmetro, fazendo pontes sobre elas. Quando as cavidades possuem 30 e 100µm as células tendem a se acomodar no interior. Assim, uma provável relação deve existir entre largura e profundidade a partir da qual a formação de pontes é mais favorável para as células.

Uma das principais questões que vêm sempre atreladas a influência da superfície sobre a orientação das células, diz respeito às dimensões topográficas estudadas. Parece ser razoável dizer que osteoblastos respondem apenas a padrões de superfície que são compatíveis com seu próprio tamanho (BOYAN & SCHWARTZ, 1999). Neste trabalho, as dimensões das ondulações (mesmo aquelas menores) foram consideravelmente superiores as dos osteoblastos. Logo, a microtopografia da superfície foi criteriosamente avaliada por MEV de modo a se identificar qualquer padrão diferenciado que pudesse justificar tanto a orientação celular quanto a preferência das

células pelas ondulações. Como já mencionado, quantitativamente, não existiram diferenças significativas de porosidade entre as regiões plana e ondulada, o que parece descartar a possibilidade da migração celular ser provocada pelo aumento de porosidade. Por outro lado, a orientação celular está sempre relacionada a desenhos microtopográficos paralelos, geralmente na forma de ranhuras ou sulcos na superfície. A avaliação cuidadosa das imagens obtidas apontou a inexistência de desenhos de superfície, com dimensões próximas àquelas sugeridas pela literatura (figuras 4.19-4.23). Recentemente, ROSE *et al.* (no prelo) sugeriram que a proliferação de osteoblastos pode ser modulada dentro de tubos de HA apenas pela modificação do raio de curvatura desses tubos. Os raios de curvatura estudados variaram de 170 a 421 μ m, estando muito acima das dimensões osteoblásticas. Outros trabalhos vêm mostrando como a macroarquitetura pode mudar o comportamento dos mais variados tipos de células (ZHAO *et al.*, 1997; KIM *et al.*, 1998; FROSCHE *et al.*, 2002). Mesmo CURTIS & WILKINSON, em 1997 já haviam relatado que células em superfícies curvas podem sofrer uma compressão diferenciada sobre seus mecanorreceptores induzindo a mudanças de comportamento. Tais observações aliadas aos resultados apresentados neste trabalho parecem sugerir que os osteoblastos podem responder a topografias de superfície superiores àquelas descritas pela literatura.

A eficiência de adesão das células é um parâmetro que indica o grau de afinidade inicial das células frente ao material. Como se trata de um teste feito após 4 horas do início do cultivo, essa afinidade pode ser diretamente relacionada a características químicas e/ou físicas da superfície do substrato usado. Apesar da HA e suas associações com outras fases de fosfatos serem consideradas biocompatíveis e osteocondutoras, muitos estudos *in vitro* com osteoblastos mostram sempre eficiências de adesão abaixo de 100%, muitas vezes, abaixo de 60% (KASTEN *et al.*, 2003). No presente trabalho, as pastilhas contendo 21,8% de α -TCP (CD_a) pareceram inicialmente acomodar melhor as células do que aquelas contendo 4,6% (E1_a, E1_b) (ver tabela 4.5). O α -TCP não é obtido por precipitação em meio aquoso e, conseqüentemente, sua presença nunca está associada a calcificações biológicas em seres vivos (DOROZHKIN & EPPLE, 2002). Esse fato parece justificar o caráter não osteocondutor exibido pelo α -TCP puro (HANDSCHEL *et al.*, 2002). Portanto, do ponto de vista químico, parece não existir nenhum motivo para uma maior eficiência de adesão sobre as pastilhas CD_a, que

exibem um teor maior de α -TCP. O aumento do caráter polar da tensão superficial muitas vezes é associado a um aumento na adesão de osteoblastos (REDEY *et al.*, 2000). De um modo geral, o aumento da tensão superficial total vem sempre ligado a uma maior adesão de células sobre materiais. Mesmo os valores de tensão superficial observados para as pastilhas CD_a e E1_a não parecem explicar o comportamento dos osteoblastos descrito acima. Um leve aumento na componente dispersiva pôde ser observado nas pastilhas com maior teor de α -TCP. PONSONNET *et al.* (2003) conseguiram justificar maiores proliferações de fibroblastos sobre Ti pelo aumento dessa componente. No entanto, tratando-se de células diferentes e superfícies inertes, qualquer comparação com o sistema em questão pode ser errônea.

A curva de proliferação de osteoblastos no primeiro experimento (figura 4.25) exibiu um perfil que sugere os primeiros estágios associados a curvas de crescimento de células animais (FRESHNEY, 1994). Até o sétimo dia, grosso modo, quase não existiu variação na quantidade de células, indicando uma fase de adaptação (*lag*) lenta, onde o metabolismo celular está muito mais direcionado à otimização do ambiente externo (produzindo proteínas de matriz extracelular) e, portanto, onde as divisões celulares são escassas. Células dependentes de ancoragem, como os osteoblastos, necessitam direta e indiretamente de substratos quimicamente semelhantes à matriz extracelular correspondente (FRESHNEY, 1994). Somente a partir da segunda semana de cultivo a fase exponencial, associada à duplicação celular, é alcançada. Curvas de crescimento de osteoblastos semelhantes, onde a fase *lag* se prolonga por até 4 dias, foram mostradas por WANG *et al.* (2004), em superfícies de fosfatos de cálcio. A redução do número de células sobre as pastilhas, após o primeiro dia de cultivo, indica algum tipo de instabilidade das células sobre o material. E, justamente na superfície onde se verificou uma maior eficiência de adesão (CD_a), tal comportamento é notado mais efetivamente. HANEIN *et al.* (1993) observaram um comportamento bastante parecido em fibroblastos cultivados sobre duas superfícies distintas de monocristais de tartarato de cálcio tetrahidratado. Foi notado que uma das faces do cristal permitia uma adesão muito mais rápida e, portanto, independente de proteínas (interações não-específicas) enquanto que na outra face, a adesão era lenta e dependente de proteínas (interações específicas). No entanto, sobre a superfície onde a adesão foi mais rápida, grande parte das células morreu em até 24h. Esse comportamento confirma que interações não-

específicas não são suficientes para induzir o espraiamento e, conseqüentemente, a expressão do fenótipo das células (CHESMEL *et al.*, 1995; KOLLER & PAPOUTSAKIS, 1995; ANSELME, 2000).

Uma situação muito próxima àquela vista no primeiro experimento foi observada no segundo experimento. Apesar da pastilha E1_a ter uma concentração de α -TCP diferente da E2_a (E1_a ~ 4,6% e E2_a ~ 0,0%), tal diferença não parece ser capaz de modificar o comportamento de proliferação das células uma vez que não houve diferenças entre as curvas dos dois experimentos. No entanto, a utilização de uma concentração de células quase 3 vezes maior, parece ter agido diretamente sobre a capacidade de multiplicação das células, deixando o perfil da curva, antes abrupto a partir do sétimo dia no primeiro experimento, com uma declividade suave no segundo. Provavelmente, o recobrimento de toda a área de superfície, disponível para a formação de uma monocamada de células, é muito mais rápido quando se usam quantidades de células elevadas. Mesmo não existindo qualquer indício de que os osteoblastos humanos possuam inibição por contato *in vitro* (DOS SANTOS *et al.*, 2003), grandes populações de células sobre áreas pequenas parecem inibir sua própria proliferação (WIEDMANN-AL-AHMAD *et al.*, 2002).

As pastilhas calcinadas a 1150°C por 72 horas (CD_b e E1_b) parecem muito mais inadequadas a adesão celular, uma vez que a eficiência de adesão foi muito mais baixa sobre elas (tabela 4.5). Após 4h a quantidade de células sobre as superfícies aumentou gradativamente até o quarto dia de cultivo. Esse aumento, não podendo ser atribuído à proliferação celular, uma vez que 24 horas não são suficientes à duplicação de um osteoblasto normal recém plaqueado, sugere um demasiado atraso na adesão das células sobre a superfície. O aumento na concentração de α -TCP na pastilha CD_b, de 21,8% para 40,2%, poderia explicar esse comportamento se, sobre E1_b (contendo a mesma quantidade de α -TCP das pastilhas E1_a), a eficiência de adesão tivesse permanecido inalterada. Como as concentrações são iguais, a adesão parece estar, neste caso, estritamente ligada ao maior tempo de calcinação. Uma das principais modificações ocorridas após calcinações prolongadas é o aumento do grau de compactação das pastilhas, como verificado anteriormente. Portanto, a redução da microporosidade de superfície deve ter tido um papel fundamental tanto na baixa eficiência de adesão

quanto no seu atraso sobre a superfície (DELIGIANNI *et al.*, 2001; ROSA *et al.*, 2003; ZINGER *et al.*, 2004). Apesar deste atraso, a fase exponencial de crescimento foi alcançada já no sétimo dia e a taxa de proliferação sobre a pastilha E1_b foi a mais alta entre todos os experimentos. Por uma semana, não houve discrepâncias entre o número de células na superfície CD_b e na E1_b. No entanto, com 14 dias de cultivo o número de células sobre a pastilha E1_b foi cerca de duas vezes maior que na CD_b, confirmando a influencia negativa do α -TCP sobre a proliferação dos osteoblastos, já sugerida pelos dois experimentos anteriores. Adicionalmente, pôde-se ver que, ao contrário dos outros experimentos, não houve mortes celulares logo após o primeiro dia de cultivo. Isso parece se justificar, pois o atraso na adesão, causado provavelmente pela diminuição de poros, não impede a adsorção de proteínas na superfície ao longo do tempo, tornando-a muito mais adequada a adesão posterior das células via interações celulares específicas.

Sabe-se que o TCP é consideravelmente mais solúvel que a HA sob mesmas condições e que, portanto, cerâmicas bifásicas com tal composição tendem a sofrer transformações superficiais tão logo entrem em contato com meios aquosos (HENCH *et al.*, 1971). A incubação das pastilhas a 37°C em meio de cultivo, por si só, já deve promover transformações de superfície que vão desde dissoluções até reprecipitações de apatitas biológicas com proteínas incorporadas (BECKHAM, *et al.*, 1971; HEUGHEBAERT *et al.*, 1988; LEGEROS *et al.*, 1990; KOKUBO, 1991; OHTSUKI *et al.*, 1991; LEGEROS *et al.*, 1992). Aliada a isso, a adição de células à superfície das pastilhas pode contribuir sobremaneira para que essas modificações aconteçam mais acentuadamente (SERRO *et al.*, 1997; LIN *et al.*, 2001; KIZUKI *et al.*, 2003). O primeiro teste relativo às transformações de superfície *in vitro* baseou-se na observação da variação da microporosidade das pastilhas CD_a após contato com meio de cultivo e células, ou seja, sobre o mecanismo dissolução/reprecipitação. O gráfico de variação de microporosidade (figura 4.28) associado às imagens obtidas (figura 4.29) parece apontar uma dissolução que ocorreu predominantemente no contorno de grão, o que está de acordo com WENG *et al.* (1997). Considerando que a solubilidade do α -TCP é quase 5 vezes maior que a da HA a 37°C, é razoável dizer que tal variação de porosidade está muito mais relacionada à sua dissolução do que à dissolução da HA. Provavelmente, a dissolução da segunda fase α -TCP predominou sobre a reprecipitação até o quarto dia de incubação. O decréscimo de microporosidade observado entre o quarto e o sétimo

dia sugere que a reprecipitação começa a se sobrepor à dissolução somente após esse período. O fato de existir uma certa estabilidade na dissolução após o sétimo dia de incubação indica dois acontecimentos igualmente prováveis: (a) houve uma dissolução gradual do α -TCP das camadas mais externas até aquelas mais internas, onde a dissolução foi dificultada proporcionalmente à maior profundidade dessas camadas, e então, (b) somente após o quarto dia, o processo de reprecipitação começou a predominar sobre a dissolução. A primeira proposição parece ser coerente com o fato de que a dissolução em microporos é bastante dificultada pela fácil supersaturação do meio com íons dissociados (OLIVEIRA *et al.*, 2003). Logo, quanto mais interno for o processo de dissolução, maior será a saturação do meio.

Imagens da superfície da pastilha CD_a (MEV), com aumentos elevados após 4h de incubação, mostraram pequenos nódulos precipitados homoganeamente distribuídos por sobre a superfície (figura 4.30) que pareceram se fundir e crescer até formar grãos maiores, como aqueles vistos após 7 dias em cultivo (figura 4.31). Essas imagens deixam clara a presença de uma fase nova que provavelmente se depositou e/ou se transformou ao longo da incubação. Logo, a diminuição de porosidade observada a partir do sétimo dia em cultivo parece ser justificada com o fechamento dos poros causados pela nova fase.

Os espectros de FT-IR no modo refletância difusa obtidos nas superfícies plana e ondulada das pastilhas CD_a e E1_a também apontaram transformações químicas de superfície ao longo do cultivo. Sobre a região plana da pastilha CD_a após 4 dias de cultivo, uma leve redução de intensidade do pico de ν OH (630cm^{-1}) sugeriu algum tipo de transformação de superfície (figura 4.32). A dissolução máxima mostrada no gráfico de variação da microporosidade (figura 4.29) ocorreu exatamente no quarto dia de cultivo. Muito provavelmente, se a reprecipitação não acontecesse simultaneamente com a dissolução, o pico em 630cm^{-1} deveria se tornar muito mais evidente no quarto dia, uma vez que, sobre a superfície, a razão HA/ α -TCP se tornaria cada vez maior. A diminuição na intensidade desse pico confirma tanto a incorporação, já no quarto dia, de grupos PO_4^{3-} vindos de solução, quanto a perda de hidroxila da estrutura da HA (LIN *et al.*, 2001). O próprio alargamento de bandas, visto na região de 1150 a 1050cm^{-1} em 4 e 14 dias, sugerem transformações de fase na superfície. Bandas na região de 1130cm^{-1}

são características de vibrações HPO_4 provenientes de apatitas recém formadas (LIN *et al.*, 2001). Os espectros obtidos da região ondulada das pastilhas CD_a parecem mais definidos que os espectros feitos na região plana (figura 4.33). Os picos característicos de TCP, antes quase inexistentes, são mais evidentes. Sabe-se que superfícies topograficamente diferentes induzem, às vezes, transformações de fase diferentes quando em temperaturas elevadas. Uma possível explicação para a presença de TCP apenas na região contendo ondulações pode estar baseada numa transformação de fase diferenciada entre as duas regiões. Ou seja, a quantidade de TCP sobre as ondulações seria maior que na superfície plana. Obviamente, se essa transformação ocorreu verdadeiramente, isso não é coerente com o fato dos osteoblastos migrarem e proliferarem muito mais por sobre as ondulações (figura 4.18), já que concentrações elevadas de TCP inibem sua proliferação (figura 4.27). No entanto, tais diferenças de concentração não podem ser desconsideradas. Tanto sobre as regiões plana e ondulada das pastilhas E1_a as modificações foram menos intensas. Somente alargamentos de bandas nas regiões de PO_4 ao longo do cultivo sugerem alguma transformação de superfície. A menor saturação das microregiões sobre a superfície com íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} , por conta de uma menor dissolução da HA, comparada ao TCP, pode ser uma das causas dessa menor transformação de fase.

Os espectros de FT-IR (transmitância), ao contrário do que se esperava, não revelaram quaisquer transformações de fase ao longo do cultivo (figura 4.36). Particulados detêm uma maior área de superfície e, possivelmente, as transformações sugeridas nos espectros de refletância difusa ocorreram muito mais intensamente. No entanto, a quantidade de precipitado parece não ter sido suficiente para gerar absorções características de carboapatitas, OCP ou qualquer outro precipitado que pudesse ser identificado.

Picos correspondentes a C, O, Ca e P foram identificados no espectro geral de XPS obtido na superfície plana das pastilhas E1_a após calcinação (figura 4.37). A razão Ca/P obtida pelo cálculo da área sob a curva em cada espectros detalhados, nas regiões correspondentes a cada elemento, foi de 1,62. Essa razão Ca/P é própria de HA deficientes em cálcio, no entanto, levando-se em conta a presença de 4,6% de α -TCP nas pastilhas E1_a e a ausência de CO_3^{2-} na superfície, esse valor deve ser um reflexo

apenas da menor razão Ca/P exibida pelo α -TCP (Ca/P = 1,50). Sobre a superfície E1_a isenta de células, após cultivo por 4 dias, os elementos C, O, Ca, P e N foram identificados (figura 4.38). Ligações C-N foram notadas confirmando a presença de proteínas na superfície. Tanto as proteínas adsorvidas do meio de cultivo, quanto proteínas decorrentes das interações específicas osteoblastos/superfície devem estar presentes, uma vez que o processo de tripsinização empregado não é capaz de remover todas elas da superfície. A incubação das células em presença de dióxido de carbono facilita sobremaneira a carbonatação da superfície. O CO₂ reage facilmente com água gerando o ácido carbônico (H₂CO₃), altamente instável, que pode ser incorporado à superfície na forma de CO₃²⁻, o que justifica o alto teor encontrado nas pastilhas. A razão Ca/P determinada foi de 1,37. O fosfato octacálcico OCP é considerado um precursor de apatitas em meio aquoso e possui uma razão Ca/P de 1,33, muito próxima a exibida pela superfície após 4 dias em cultivo. Além disso, a diminuição da razão Ca/P pode ser atribuída ainda a incorporação de fósforo orgânico, proveniente de proteínas e mesmo pedaços de células retidos na superfície. De qualquer modo, apesar dos espectros FT-IR não apontarem grandes transformações nas superfícies E1_a, elas ocorreram. Isso indicaria, como esperado, o maior potencial analítico do XPS em análises de superfície, quando comparado a técnicas como DRX e FT-IR.

CAPÍTULO 6 – CONCLUSÕES

1. Para uma mesma temperatura de calcinação, as transformações de fase parecem ser muito mais dependentes da razão Ca/P das hidroxiapatitas que do tempo de calcinação empregado. As pastilhas CD_a, CD_b, E1_a, e E1_b podem ser consideradas sistemas cerâmicos bifásicos compostos de misturas de HA (estequiométrica) e α -TCP. Apenas a pastilha E2_a se constitui num sistema monofásico de HA estequiométrica. Concentrações de até 4,6% de α -TCP, para os sistemas estudados e metodologia empregada, não são passíveis de caracterização via FT-IR.
2. Por até 1h40min, não existiram variações significativas nos valores de ângulo de contato, obtidos pelo método da bolha, capazes de inviabilizar as determinações. A microporosidade de superfície induz avaliações imprecisas de ângulo de contato (método da bolha), sugerindo uma alta hidroflicidade de superfície. Os valores de energia de superfície obtidos pelo método da ascensão capilar são sempre cerca de duas vezes menores que aqueles obtidos pelo método da bolha.
3. A componente dispersiva da energia de superfície γ_S^D cresce com o aumento da concentração de α -TCP. Inversamente, a componente polar γ_S^D aumenta com o aumento da concentração de HA. O sistema E1_a possui uma tensão superficial total γ_S maior que o CD_a.
4. As células usadas podem ser caracterizadas como osteoblastos humanos.
5. Ondulações de superfície, nas dimensões usadas, induzem arranjos orientados de osteoblastos ao longo do seu eixo. Essa orientação acontece gradativamente ao longo do tempo em cultivo, sendo consideravelmente mais rápida para densidades celulares crescentes.
6. Após 4h de cultivo, o número de células nas superfícies planas entre as ondulações é sempre menor que o número de células sobre elas. Ao longo do

cultivo, os osteoblastos migram dessas superfícies planas próximas para as ondulações. Adicionalmente, a proliferação celular é maior sobre as ondulações.

7. As células aderem inicialmente muito mais sobre as pastilhas CD_a do que sobre as pastilhas E1_a. No entanto, essa adesão parece ter um caráter não-específico grande. Por outro lado, a redução de microporosidade diminui a eficiência de adesão sobre as pastilhas CD_b e E1_b, quando comparado a CD_a e E1_a, respectivamente. A adesão posterior, nesse caso, parece ter um caráter específico muito maior, pela incorporação de proteínas à superfície. A tensão superficial, exibida pelas pastilhas, não parece intervir nos processos observados.
8. O aumento da concentração de α -TCP nos sistemas bifásicos inibiu a proliferação dos osteoblastos ao longo do cultivo.
9. Densidades elevadas de osteoblastos sobre as pastilhas pareceram diminuir sua proliferação.
10. A dissolução da fase α -TCP nas pastilhas CD_a se sobrepõe ao processo de reprecipitação até o 4^o dia de cultivo. A partir de então, a reprecipitação parece predominar sobre a dissolução. Pequenos nódulos de precipitado são observados sobre os grãos em pastilhas CD_a já no quarto dia de incubação. Após 7 dias, outras fases são observadas na superfície.
11. Transformações de fases na superfície das pastilhas CD_a e E1_a, ao longo do cultivo, também são apontadas pelos espectros de FT-IR (refletância difusa). A maior dissolução verificada inicialmente nas pastilhas CD_a permite, por outro lado, uma maior precipitação de fases novas.
12. Os espectros de XPS mostram que uma grande quantidade de carbonato e proteína é incorporada à superfície das pastilhas E1_a após 4 dias em cultivo. A razão Ca/P obtida para a superfície é próxima à razão característica do fosfato octacálcico OCP.

CAPÍTULO 7 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudar mais detalhadamente as transformações químicas ocorridas na superfície ao longo do cultivo, caracterizando a nova fase precipitada.
- Verificar as possíveis transformações na expressão fenotípica dos osteoblastos frente aos sistemas bifásicos estudados.
- Avaliar qualitativa e quantitativamente o comportamento de osteoblastos sobre superfícies de biomateriais projetadas com desenhos topográficos específicos.

CAPÍTULO 8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMQVIST, N., THONSON, N.H., SMITH, B.L. *et al.*, 1999, “Methods for fabricating and characterizing a new generation of biomimetic materials”, *Mater. Sci. Eng.*, v. 7, pp. 34-43.
- ALTANKOV, G., GROTH, T., 1994, “Reorganization of substratum-bound fibronectin on hydrophilic and hydrophobic materials is related to biocompatibility”, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, v. 5, pp. 732-737.
- AMBROSIO, L. *et al.*, 2002, “Advanced composite hydrogels for implant and tissue engineering applications”, *P. Le Techio*, v. 80, pp. 80-125.
- ANDRADE, M.C., FILGUEIRAS, M.R.T., OGASAWARA, T., 2002, “Hydrothermal nucleation of hydroxyapatite on titanium surface”, *J. Eur. Cer. Soc.*, v. 22, pp. 505-510.
- ANSELME, K., 2000, “Osteoblast adhesion on biomaterials”, *Biomaterials*, v. 21, pp. 667-681.
- ANSELME, K., BIGERELLE, M., NOEL, B. *et al.*, 2000, “Qualitative and quantitative study of human osteoblast adhesion on materials with various surface roughness”, *J. Biomed. Mater. Res.*, v. 49, pp. 155-166.
- AOKI, H., 1994, In: *Medical application of hydroxyapatite*. 1st ed., Tokyo, Ishiyaku, EuroAmericana.
- BALMAIN, N., LEGROS, R., BONEL, G., 1982, “X-ray diffraction of calcinated bone tissue: a reliable method for the determination of bone Ca/P molar ratio”, *Calcif Tissue Int*, v. 34, pp. S93-S98.
- BECKHAM, L.L., GREENLEE JR, T.K., CREBO, A.R., 1971, “Bone formation at a ceramic implant interface”, *Calcif. Tiss. Res.*, v. 8, pp. 165-171.
- BERGEON, M.T., 1967, “Collagen: a review”, *J. Okla State Med. Assoc.*, v. 60, pp. 330-332.
- BERRIDGE, M.V., TAN, A.S., 1993 “Characterization of cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction”, *Arch. Biochem. Biophysics*, v. 303, pp. 474-482.
- BLACK, J., 1992, “Biological performance of materials: fundamentals of biocompatibility”, Marcel Dakker (ed.), New York.
- BOYAN, B.D., SCHWARTZ, Z., 1999, “Modulation of osteogenesis via implant surface design”, In: Davies, J.E. (ed.), *Bone Engineering*, Toronto, pp. 232-239.

- BOSKEY, A.L., WRIGHT, T.M., BLANK, R.D., 1999, "Collagen and bone strength", *J. Biomed. Mater. Res.*, v. 14, pp.330-335.
- BOYAN, B.D., LOHMANN, C.H., ROMERO, J., 1999, "Bone and cartilage tissue engineering", *Clin. Plastic Surg.*, v. 26, pp. 629-645.
- BRITLAND, S., MORGAN, H., WOJIAK-STODART, B. *et al.*, 1996, "Synergistic and hierarchical adhesive and topographic guidance of BHK cells", *Exp. Cell Res.*, v. 228, pp. 313-325.
- BROWN, W.E., EIDELMAN, N., TOMAZIC, B., 1987, "Ocatocalcium phosphate as precursor in biomineral formation", *Adv. Dent. Res.*, v. 1, pp. 306-313.
- BRUNETTE, D.M., CHEHROUDI, B., 1999, "The effects of the surface topography of micromachined titanium substrata on cells behavior *in vitro* and *in vivo*", *J. Biomech. Eng.*, v. 1121, pp. 47-57.
- BURG, K.J.L., PORTER, S., KELLAM, J.F., 2000, "Biomaterial developments for bone tissue engineering", *Biomaterials*, v. 21, pp. 2347-2359.
- CASTNER, D.G., RATNER, B.D., 2002, "Biomedical surface science: foundations to frontiers", *Surf. Sci.*, v. 500, pp. 28-60.
- CBPF – CENTRO BRASILEIRO DE PESQUISAS FÍSICAS, 2002, <http://www.cbpf.br/RevistaCBPF/pdf/BioMat.pdf>, acesso em 22 de outubro.
- CERRONI, L., FILOCAMO, R., FABBRI, M., *et al.*, 2002; "Growth of osteoblast-like cells on porous hydroxyapatite ceramics: an *in vitro* study", *Biomol. Eng.*, v. 19, pp. 119-124.
- CHANG, M.C., TANAKA, J., 2002, "FT-IR study for hydroxyapatite/collagen nanocomposite cross-linked by gluteraldehyde", *Biomaterials*, v. 23, pp. 4811-4818.
- CHEN, J.M., SHELDON, A., PINCUS, M.R., 1995, "Three dimensional energy-minimized model of human type II smith collagen microfibrill", *J. Biomol. Struct. Dyn.*, v. 12, pp. 1129-1156.
- CHESMEL, K.D., CLARK, C.C. *et al.*, 1995, "Cellular responses to chemical and morphologic aspects of biomaterial surfaces. II. The biosynthetic and migratory response of bone cell populations", *J. Biomed. Mater. Res.*, v. 29, pp. 1101-1110.
- CLARK, P., CONNOLY, P., CURTIS, A.S.G. *et al.*, 1990, "Topographical control of cell behavior: II multiple grooved substrata", *Development*, v. 108, pp. 635-644.
- CRAIG, S.W., JOHNSON, R.P., 1996, "Assembly of focal adhesion: progress, paradigms, and portents", *Curr. Opin. Cell. Mol. Endocrinol.*, v. 8, pp. 74-85.
- CUERONET – ESTRUCTURA DEL COLÁGENO, 2002, <http://www.cueronet.com/tecnica/colageno.htm>, acesso em 22 de outubro.

- CURTIS, A., WILKINSON, C., 1997, "Topographical control of cells", *Biomaterials*, v. 18, pp.1573-1583.
- DALBY, M.J., DE SILVIO, L., HARPER, E.J., BONFIELD, W., 2001, "Initial interaction of osteoblasts with the surfaces of a hydroxyapatite-poly(methylmethacrylate) cement", *Biomaterials*, v. 22, pp. 1739-1747.
- DALBY, M.J., GIANNARAS, D., RIEHLE, M.O. *et al.*, 2003, "Rapid fibroblast adhesion to 27 nm high polymer demixed nano-topography", *Biomaterials*, v. 25, pp. 77-83.
- DECKER, E.L., FRANK, B., SUO, Y, CAROFF, S., 1999, "Physics of contact angle measurement", *Colloids and Surfaces A*, v. 156, pp. 177-189.
- DELIGIANNI, D.D., KATSALA, N.D., KOUTSOUKOS, P.G., MISSIRLIS, Y.F., 2001, "Effect of surface roughness of hydroxyapatite on human bone marrow cell adhesion, proliferation, differentiation and detachment strength", *Biomaterials*, v. 22, pp. 87-96.
- DEN BRADER, E.T., DE RUIJTER, J.E., SMITS, H.T.J. *et al.*, 1995, "Effect of parallel surface microgrooves and surface energy on cell growth", *J. Biomed. Mater. Res.*, v. 29, pp. 511-518.
- DINIZ, M.G., 2001, *Influência de tratamentos superficiais sobre chapas de titânio na osteogênese em culturas de células com origem na medula óssea*, Tese de D.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- DINIZ, M.G., SOARES, G.A., COELHO, M.J., FERNANDES, M.H., 2002, "Surface topography modulates the osteogenesis in human bone marrow cell culture grown on titanium samples prepared by a combination of mechanical and acid treatment", *Journal of Mater. Sci.*, v. 13, pp. 421-432.
- DI SILVIO, L., DALBY, M.J., BONFIELD, W., 2002, "Osteoblast behavior on HA/PE composite surfaces with different HA volumes", *Biomaterials*, v. 23, pp. 101-107.
- DOROZHKIN, S.V., EPPLE, M., 2002, "Biological and medical significance of calcium phosphates", *Angew. Chem. Int. Ed.*, v. 41, pp. 3130-3146.
- DOS SANTOS, E.A., LINHARES, A.B.R., ROSSI, A.M. *et al.*, 2003, "Orientation of human osteoblast cells on biphasic calcium phosphates tablets with undulated topography", *Key Engineering Materials*, v. 254-256, pp. 793-796.
- DUCHEYNE, P., KOKUBO, T., 1992, "Bioactivity of glasses ceramics", In: Kokubo, T. (ed.), *Bone-bonding biomaterials*, Reed Healthcare Communications, Berlim, pp. 31-46.
- DUNN, G.A., 1982, "Contact guidance of cultured tissue cells: a survey of potentially relevant properties of the substratum". In: Bellairs, R., Curtis, A.S.G., Dunn, G.A. (eds.), *Cell Behavior*, Cambridge University Press, Cambridge, pp. 247-280.

- ELLIOT, J.C., 1998, *Les matériaux en phosphate de calcium. Aspects fondamentaux*, Brès, E., Hardouin, P., (eds.), Sauramps Medical, Montpellier.
- ELLIOT, J.C., 1994, "Structure and chemistry of the apatite and other calcium orthophosphates", In: *Studies in Inorganic Chemistry*, Elsevier, Amsterdam, pp. 12-22.
- FARINA, M., 1998, "Fundamentos de microscopia analítica para biólogos", In: De Souza, W. (ed.), *Técnicas Básicas de Microscopia Eletrônica Aplicada as Ciências Biológicas*, Rio de Janeiro, Brasil, Sociedade Brasileira de Microscopia.
- FERMOR, B., GUNDLE, R., EVANS, M. *et al.*, 1998 "Primary human osteoblast proliferation and prostaglandin E₂ release in response to mechanical strain in vitro", *Bone*, v. 22, pp. 637-643.
- FERNANDEZ, E., GIL, F.J., GINEBRA, M.P. *et al.*, 1999a, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, v. 10, pp. 169-176.
- FERNANDEZ, E., GIL, F.J., GINEBRA, M.P. *et al.*, 1999b, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, v. 10, pp. 177-183.
- FRESHNEY, R.I., 1994, "Advantages of tissue culture". In: Freshney, R.I. (ed.), *Culture of animal cells: a manual of basic technique*, 3 ed., chapter 1, New York, USA, Wiley-Liss.
- FROSCHE, K.H., BARVENCIK, F., LOHMANN, C.H. *et al.*, 2002, "Migration, matrix production and bone lamellar formation of human osteoblast-like cells in porous titanium implants", *Cell Tiss. Org.*, v. 170, pp. 214-227.
- GADALETA, S.J., PASCHALIS, E.P., BETTS, F. *et al.*, 1995, "Fourier transform infrared spectroscopy of the solution-mediated conversion of amorphous calcium phosphate to hydroxyapatite: new correlations between X-ray diffraction and infrared data", *Calc. Tiss. Inter.*, v. 58, pp. 9-16.
- GERSON, S.L., 1999, "Mesenchymal stem cells: no longer second class marrow citizens", *Nat. Med.*, v. 5, pp. 262-264.
- GRAINGER, D.W., HEALY, K.E., 1999, "Biomaterial surface analysis", In: Andreas F. von Recum (ed.), *Handbook of Biomaterials Evaluation*, USA, pp. 115-141.
- GREEN, J., 1994, "The physicochemical structure of bone: cellular and noncellular Elements", *Min. Electrol. Metab.*, v. 20, pp. 7-15.
- GREEN, D., WALSH, D., MANN, S., OREFFO, R.O.C., 2002, "The potential of biomimesis in bone tissue engineering: lessons from the design and synthesis of invertebrate skeletons", *Bone*, v. 30, pp. 810-815.

- GRZESIK, W.J., ROBEY, P.G., 1994, "Bone matrix RGD glycoproteins: immunolocalization and interaction with human primary osteoblastic bone cells in vitro", *J. Bone Miner. Res.*, v. 9, pp. 487-496.
- HALLAB, N., BUNDY, K., O'CONNOR, K. *et al.*, 2001, "Evaluation of metallic and polymeric biomaterial surface energy and surface roughness characteristics for directed cell adhesion", *Tissue Eng.*, v. 71, pp. 55-71.
- HAO, H., AMIZUKA, N., ODA, K. *et al.*, 1996, "A histological evaluation on self-setting α -tricalcium phosphate applied in the rat bone cavity", *Biomaterials*, v. 25, pp. 431-442.
- HANDSCHEL, J., WIESMANN, H.P., STRATMANN, U. *et al.*, 2002, "TCP is hardly resorbed and not osteoconductive in a non-loading calvarial model", *Biomaterials*, v. 23, pp. 1689-1695.
- HANEIN, D., SABANAY, H., ADDADI, L., *et al.*, 1993, "Selective interactions of cells with crystal surfaces", *J. Cell Sci.*, v. 104, pp. 275-288.
- HARRIS, H., 1990, "The human alkaline phosphatase: what we know and what we don't know", *Clin Chim Acta*, v. 186, pp. 133-150.
- HARTGERINK, J.D., BENIASH, E., STUPP, S.I., 2001, "Self-assembly and mineralization of peptide-amphiphile nanofibers", *Science*, v. 294, pp. 1684-1688.
- HEALY, K.E., THOMAS, C.H., REZANIA, A. *et al.*, 1996, "Kinetics of bone cell organization and mineralization on materials with patterned surface chemistry", *Biomaterials*, v. 17, pp. 195-208.
- HENCH, L.L., SPLITER, R.J., ALLEN, W.C. *et al.*, 1971, "Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials", *J. Biomed. Mater. Res.*, v. 2, pp. 117-141.
- HENCH, L.L., 1998, "Bioactive materials: the potential for tissue regeneration", *J. Biomed. Mater. Res.*, v. 41, pp. 511-517.
- HEUGHEBAERT, M., LEGEROS, R.Z., GINESTE, M. *et al.*, 1988, "Physicochemical characterization of deposits associated with HA ceramics implanted in non-osseous sites", *J. Biomed. Mater. Res.*, v. 22, pp. 257-268.
- HOLLINGER, J.O., WINN, S., BANADIO, J., 2000, "Options for tissue engineering to address challenges of the ageing skeleton", *Tissue Eng.*, v. 6, pp. 341-350.
- HSU, F.Y., CHUEH, S., WANG, Y.J., 1999, "Microspheres of hydroxyapatite/reconstituted collagen as supports for osteoblast cell growth", *Biomaterials*, v. 20, pp. 1931-1936.
- HULBERT, S.F. *et al.*, 1973, *J. Biomed. Mater. Res.*, v. 4, pp. 1-23.
- ITOH, S., KIKUCHI, M., KOYAMA, Y. *et al.*, 2002, "Development of an artificial vertebral body using a novel biomaterial, hydroxyapatite/collagen composite", *Biomaterials*, v. 23, pp. 3919-3926.

- KASTEN, P. LUGINBUHL, R. GRIENSVEN, M. *et al.*, 2003, "Comparison of human bone marrow stromal cells seeded on calcium-deficient hydroxyapatite, β -tricalcium phosphate and demineralized bone matrix", *Biomaterials*, v. 24, pp. 2593-2603.
- KIM, B.S., MOONEY, D.J., 1998, "Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering", *Trends biotech.*, v. 16, pp. 224-230.
- KIM, J.Y.; FENTON, R.R.; HUNTER, B.A. *et al.*, 2000; *Aust. J. Chem.*, v. 53, pp. 679-686.
- KIM. S.S., UTSUNOMIYA, H., KOSKI, J.A. *et al.*, 1998, "Survival and function of hepatocytes on a novel three-dimensional synthetic biodegradable polymer scaffold with an intrinsic network of channels, *Ann. Surg.*, v. 228, pp. 8-13.
- KIZUKI, T., OHGAKI, M., KATSURA, M. *et al.*, 2003, "Effect of bone-like layer growth from culture medium on adherence of osteoblast-like cells", *Biomaterials*, v. 24, pp. 941-947.
- KNABE, C., KLAR, F., FITZNER, R. *et al.*, 2002, "In vitro investigation of titanium and hydroxyapatite dental implant surfaces using a rat bone marrow stromal cell culture system", *Biomaterials*, v. 23, pp. 3235-3245.
- KOKUBO, T., 1991, "Bioactive glass ceramics: properties and applications", *Biomaterials*, v. 12, pp. 155-163.
- KOKUBO, T., 2002, Private communication in March 2002.
- KOLLER, M.R., PAPOUTSAKIS, E.T., 1995, "Cell adhesion in animal cell culture: physiological and fluid-mechanical implications", In: Hjortso, M.A. & Roos, J.W. (eds.), *Cell Adhesion*, New York, pp. 61-111.
- KWOK, D.Y., NEUMANN, A.W., 1999, "Contact angle measurement and contact angle interpretation", *Adv. Colloid Inter. Sci.*, v. 81, pp. 167-249
- LAWSON, A.C., CZERNUSZKA, J.T., 1998, "Collagen-calcium phosphate composites", *Proc. Instn. Mech. Engrs.*, v. 212, pp. 413-425.
- LEGEROS, R.Z., DACULSI, G., 1990, "In vivo transformation of biphasic calcium phosphate ceramics: ultrastructural and physiochemical characterization", In: Yamamuro, T., Hench, L.L., Wilsonhench, J. (eds.), *Handbook of Bioactive Ceramics*, v. 2, pp. 17-28.
- LEGEROS, R.Z., DACULSI, G., ORLY, I. *et al.*, 1992, "Formation of carbonate apatite on calcium phosphate materials: dissolution/precipitation processes", In: Ducheyn, P., Kokubo, T., Van Blitterswijk, C.A. (eds.), *Bone-boding materials*, pp. 01-212.

- LEGEROS, R.Z., LEGEROS, J.P., DACULSI, G. *et al.*, 1995, "Calcium phosphate biomaterials: preparation, properties and biodegradations", In: *Encyclopedic Handbook of Biomaterials Anal*, Marcel, D. (ed.), New York, part B, v. 1, pp. 1429-1463.
- LENG, Y., CHEN, J., QU, S., 2003, "TEM study of calcium phosphate precipitation on HA/TCP ceramics", *Biomaterials*, v. 24, pp. 2125-2131.
- LESNÝ, P., DE CROOS, J., PĚÁDNÝ, M. *et al.*, 2002, "Polymer hidrogels usable for nervous tissue repair", *J. Chem. Neuroan.*, v. 23, pp. 243-247.
- LO, C.M., WANG, H.B., DEMBO, M. *et al.* 2000, "Cell movement is guided by the rigidity of the substrate", *Biophys.*, v. 79, pp. 144-152.
- CHERN LIN, J.H., KUO, K.H., DING S.J. *et al.*, 2001, "Surface reaction of stoichiometric and calcium-deficient hydroxyapatite in simulated body fluid", *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, v. 12, pp. 731-741.
- LIAO, H., ANDERSSON, A., SUTHERLAND, D. *et al.*, 2003, "Response of osteoblast-like cells to microstructural model surfaces *in vitro*", *Biomaterials*, v. 24, pp. 649-654.
- LIU, Y., WU, W., SETHURAMAN, G. *et al.*, 1997, "Intergrowth of calcium phosphates: an interfacial energy approach", *J. Cristal. Growth*, v. 174, pp. 386-392.
- LOUISIA, S., STROMBONI, M., MEUNIER, A. *et al.*, 1999, "Coral grafting supplemented with bone marrow", *J. Bone Joint Surg. Br.*, v. 81 pp. 719-724.
- LOW, M.G., 1989, "The glycosyl-phosphatidylnositol membrane proteins", *Biochem. Biophys. Acta*, v. 988, pp. 427-454.
- MACKIE, E.J., 2003, "Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture", *Inter. J. Biochem. Cell Biol.*, v. 35 pp. 1301-1305.
- MALAVAL, L., CHENU, C., DELMAS, P.D., 1996, "Protéines de l'os. Maladies métaboliques osseuses de l'adulte", In: *Flammarion Médecine Sciences*, Kuntz D. (ed.), Paris, pp. 17-35.
- MALININ, T.I., 1992, "Acquisition and banking of bone allografts", In: *Bone Grafts and Bone Substitutes*, Habal, M.B., Reddi, A.H. (eds.), London.
- MANN, B.K., TSAI, A.T., SCOTT-BURDEN, T., WEST, J.L., 1999, "Modification of surfaces with cell adhesion peptides alters extracellular matrix deposition", *Biomaterials*, v. 20, pp. 2281-2286.
- MANNHEIMER, W.A., 2002, "Microscopia Eletrônica de Varredura", In: *"Microscopia dos Materiais – Introdução"*, E-papers, Rio de Janeiro.

- MARIE, P.J., LOMRI, A., SABBAGH, A., BASLE, M., 1989, "Culture and behavior of osteoblastic cells isolated from normal trabecular bone surfaces", *In Vitro Cell. Develop. Biol.*, v. 25, pp. 373-380.
- MARKS, S.C., HERMEY, D.C., 1996, "The Structure and Developing of Bone". In: *Principals of Bone Biology*, Bilezikian, J.P., Raisz, L.G., Rodan, G.A. (eds.), London, Academic Press, pp. 3-14.
- MARKS, S.C., ODGREN, P.R., 2002, "The Structure and Developing of Bone". In: *Principals of Bone Biology*, BILEZIKIAN, J.P., RAISZ, L.G., RODAN, G.A. (eds.), San Diego, Academic Press, v. 1, pp. 3-15.
- MARTINS, V.C.A., GOISSIS, G., 1996, "Colágeno aniônico como matriz para deposição orientada de minerais de fosfato de cálcio", *Polímeros: ciência e tecnologia*, out/dez, p. 30-37.
- MAVROPOULOS, E., ROSSI, A.M., DA ROCHA, N.C.C. *et al.*, 2003, "Dissolution of calcium-deficient hydroxyapatite synthesized at different conditions", *Biomaterials*, v. 50, pp. 203-207.
- MONCHAU, F., LEFÈVRE, A., DESCAMPS, M. *et al.*, 2002, "In vitro studies of human and rat osteoclast activity on hydroxyapatite, β -tricalcium phosphate, calcium carbonate", *Biomol. Eng.*, v. 19, pp. 143-152.
- MCDONALD, F., 1993, *Eur. Journal of Orthod.*, v. 15 pp. 175-183.
- MISCH, C., 1999, *Contemporary Implant Dentistry*, Mosby.
- NIKON, 2002, Fluorescence Microscopes; In: *Technical bulletin*, ed. Nikon Corporation.
- NIMNI, M.E., 1995, "Collagen: molecular structure and biomaterial properties", In: *Encyclopedic handbook of biomaterials and bioengineering*, Wise, D.L. *et al.* (eds.), New York, pp. 1229-1243.
- OHTSUKI, C., KUSHITANI, H., KOKUBO, T., 1991, "Apatite formation on the surface of ceravital-type glass-ceramic in the body", *J. Biomed. Mater. Res.*, v. 25, pp. 1363-1370.
- OLIVEIRA, J.F., AGUIAR, P.F., ROSSI, A.M. *et al.*, 2003 "Effect of process parameters on the characteristics of porous calcium phosphate ceramics for bone tissue scaffolds", *Art. Org.*, v. 3, pp. 386-391.
- OWEN, M., FRIEDENSTEIN, A.J., 1988, "Stromall stem cells: morrow-derived osteogenic precursors". *Ciba. Found. Symp.*, v. 136, pp. 42-60.
- OWENS, D.K., WENDT, R.C., 1969, "Estimation of the surface free energy of polymers", *J. Appl. Polym.*, v. 13, pp. 1741-1747.

- OZAWA, S., KASUGAI, S., 1996, "Evaluation of implant materials (hydroxyapatite, glass-ceramic, titanium) in rat bone marrow stromal cell culture", *Biomaterials*, v. 17, pp. 23-29.
- PEÑA, J., VALLET-REGI, M., 2003, "Hydroxyapatite, tricalcium phosphate and biphasic materials prepared by a liquid mix technique", *J. Europ. Ceram. Soc.*, v. 23, pp. 1687-1696.
- PETITE, H., VIATEAU, V., BENSAID, W. *et al.*, 2000, "Tissue-engineering bone regeneration", *Nat. Biotechnol.*, v. 18 pp. 959-963.
- PILLIAR, R.M., FILIAGGI, M.J., WELLS, J.D. *et al.*, 2001, "Porous calcium polyphosphate scaffolds for bone substitute application – in vitro characterization", *Biomaterials*, v. 22 pp. 963-972.
- PONSONNET, L., REYBIER, K., JAFFREZIC, N. *et al.*, 2003, "Relationship between surface properties (roughness, wettability) of titanium and titanium alloys and cell behaviour", *Mater. Sci. Eng. C*, v. 23, pp. 551-560.
- PRÊLE, C.M., HORTON, M.A., CATERINA, P. *et al.*, 2003, "Identification of the molecular mechanisms contributing to polarized trafficking in osteoblasts", *Exp. Cell. Res.*, v. 282 pp. 24-34.
- PUCRS – TECIDO ÓSSEO, 2002, http://www.pucrs.br/igg/geronto/atlasvirtual/tecido_osseo.htm; acesso em 17 de novembro.
- QUIRK, R.A., CHAN, W.C., DAVIES, M.C. *et al.*, 2001, "Poly(L-lysine)-GRGDS as a biomimetic surface modifier for poly (lactic acid)", *Biomaterials*, v. 22 pp. 865-872.
- RAJNICEK, A., MCCAIG, C., 1997, "Guidance of CNS growth cones by substratum grooves and ridges: effects of inhibitors of the cytoskeleton, calcium channels and signal transduction pathways", *J. Cell Sci.*, v. 110, pp. 2915-2924.
- RAMACHANDRAN, G.N., 1967, *Treatise on Collagen*, Academic Press, London, v.1, pp. 337-353.
- RAMAKRISHNA, S., MAYER, J., WINTERMANTEL, E., LEONG, K.W., 2001, "Biomedical applications of polymer-composite materials: un review", *Comp. Sci. and Technol.*, v. 61, pp. 1189-1224.
- REDEY, S.A., NARDIN, M., BERNACHE-ASSOLANT, D. *et al.*, 2000, "Behavior of human osteoblastic cells on stoichiometric hydroxyapatite and type A carbonate apatite: role of surface energy", *J. Biomater. Res.*, v. 50, pp. 353-364.
- REZANIA, A., THOMAS, C.H., BRANGER, A.B. *et al.*, 1997, "The detachment strength and morphology of bone cells contacting materials modified with a peptide sequence found within bone sialoprotein", *J. Bone Mater. Res.*, v. 37, pp. 9-19.

- RIPAMONTI, U., DUNEAS, N., 1998, "Tissue morphogenesis and regeneration by bone morphogenetic proteins", *Plast. Reconst. Surg.*, v. 101, pp. 227-239.
- RIPAMONTI, U., 1999, "Smart biomaterials with intrinsic osteoinductivity: geometric control of bone differentiation", In: Davies, J.E., (ed.), *Bone Engineering*; Toronto, pp. 215-222.
- RISBUD, M., 2001, "Tissue engineering: implications in the treatment of organ and tissue defects", *Biogerontology*, v. 2, pp. 117-125.
- RISBUD, M., SITTINGER, M., 2002, "Tissue engineering: advances in in vitro cartilage generation", *Trends Biotechn.*, v. 20, pp. 351-356.
- ROSA, A.L., BELOTI, M.M., VAN NOORT, R., 2003, "Osteoblastic differentiation of cultured rat bone marrow cells on hydroxyapatite with different surface topography", *Dent. Mater.*, v. 19, pp. 768-772.
- ROSE, F.R., CYSTER, L.A., GRANT, D.M. *et al.*, 2004, "In vitro assessment of cell penetration into porous hydroxyapatite scaffolds with a central aligned channel", *Biomaterials*, (no prelo).
- SCHAKENRAAD, J.M., BUSSCHER, Ch.R.H., WILDEVUUR, J. *et al.*, 1988, "Thermodynamic aspects of cell spreading on solid substrate", *J. Cell Biophys.*, v. 13, pp. 75-91.
- SCHWARTZ, Z., LOHMANN, C.H., SISK, M., *et al.*, 2001, "Local factor production by MG63 osteoblast-like cells in response to surface roughness and 1,25-(OH)₂D₃ is mediated via protein kinase C- and protein kinase A-dependent pathways^{*1}", *Biomaterials*, v. 22, pp. 731-741.
- SECHLER, J.L., SCHWARZBAUER, J.E., 1998, "Control of cell cycle progression by fibronectin matrix architecture", *J. Biol. Chem.*, v. 11, pp. 25533-25536.
- SENA, L.A., SERRICELA, P., BOROJEVIC, R. *et al.*, 2004, "Synthesis and characterization of hydroxyapatite on collagen gel", *Key Eng. Mater.*, v. 254-256, pp. 493-496.
- SEPÚLVEDA, P., PANDOLFELLI, V.C., ROGERO, S.O. *et al.*, 1999, "Hidroxiapatita porosa produzida através do processo *gelcasting* de espumas visando aplicações biomédicas", *Cerâmicas*, v. 45, pp. 1-12.
- SERRO, A.P.V.A., FERNANDES, A.C., JESUS, B. *et al.*, 1997, "The influence of proteins on calcium phosphate deposition over titanium implants studied by dynamic contact angle analysis and XPS", *Coll. Surf. B*, v. 10, pp. 95-104.
- SIEBOLD, A., NARDIN, M., SCHULTZ, J. *et al.*, 2000, "Effect of dynamic contact angle on capillary rise phenomena", *Coll. Surf. A*, v. 161, pp. 81-87.
- SISKEN, B.F., WALKER, J., ORGEL, M., 1993, *Cell. Biochem.*, v. 52, pp. 404-409.

- SLOMKOWSKI, S., KOWALCZYK, D., CHEHIMI, M.M., DEALAMAR, M., 2000, "Ray photoelectron spectroscopy as a tool for studies of the surface layer of microspheres. The case of polystyrene and poly(styrene-acrolein) microspheres with attached human serum albumin", *J. Coll. and Polym. Sci.*, v. 396, pp. 0351b.
- THOMSON, J.A. *et al.*, 1998, "Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts", *Science*, v. 282, pp. 1145-1147.
- THULL, R., 2002, "Physicochemical principles of tissue material interactions", *Biomol. Eng.*, v. 19, pp. 43-50.
- TIEDEMAN J.J., GARVIN, K.L., KILE, T.A., CONNOLLY, J.F., 1995, "The role of a composite, demineralized bone matrix and bone marrow in the treatment of osseous defects", *Orthopaedics*, v. 18, pp. 1153-1158.
- TIRRELL, M.; KOKKOLI, E.; BIESALSKI, M., 2002, "The role of surface science in bioengineering materials", *Surf. Sci.*, v. 500, pp. 61-83.
- TRANQUILLO, R.T., 1999, "Self-organization of tissue-equivalents: the nature and role of contact guidance", *Biochem. Soc. Symp.*, v.65, pp. 27-42.
- TURNER, A.M.P., DOWELL, N., TURNER, S.W.P. *et al.*, 2003, "The interactions between central nervous system cells and topography modified surfaces". In: Piston, D., Bruley, J., Anderson, I.M. *et al.* (eds), *Proceedings Microscopy and Microanalysis*, Cambridge University Press, San Antonio, 1280CD.
- VERRIER, S.; JONKCZYK, A.; DARD, M.; AMEDEE, J.; 1998, "Effect of linear and cyclic RGD-containing peptides on osteoprogenitor cell adhesion onto extracellular matrix proteins", *J. Bone Miner. Res.*, v. 23, pp. S535.
- YANG, X.B., ROACH, H.I., CLARKE, N.M. *et al.*, 2001, "Human osteoprogenitor growth and differentiation on synthetic biodegradable structures after surface modification", *Bone*, v. 29, pp. 523-531.
- YASUDA, H., SHIMA, N., NAKAGAWA, N. *et al.*, 1998, "Osteoblast differentiation factor is a ligand for osteoprogenitor/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 95, pp. 3597-3602.
- WANG, C., DUAN, Y., MARKOVIC, B. *et al.*, 2004, "Phenotypic expression of bone-related genes in osteoblasts grown on calcium phosphates ceramics with different phase compositions", *Biomaterials*, v. 25, pp. 2507-2514.
- WEGE, H.A., AGUILAR, J.A., RODRIGUEZ-VALVERDE, M.A. *et al.*, 2003, "Dynamic contact angle and spreading rate measurements for the characterization of the effect of dentin surface treatments", *Colloid and Inter. Sci.*, v. 263, pp. 162-169.

- WENG, J., LIU, Q., WOLKE, J.G.C. *et al.*, 1997, "Formation and characteristics of the apatite layer on plasma-sprayed hydroxyapatite coatings in simulated body fluid", *Biomaterials*, v. 18, pp. 1027-1053.
- WIEDMANN-AL-AHMAD, M., GUTWALD, R., LAUER, G. *et al.*, 2002, "How to optimize seeding and culturing of human osteoblast-like cells on various biomaterials", *Biomaterials*, v. 23, pp. 3319-3328.
- ZHAO, Q., DROOT, J., LAURELL, T. *et al.*, 1997, "Rat sciatic nerve regeneration through a micromachined silicon chip", *Biomaterials*, v. 18, pp. 75-80.
- ZINGER, O., ANSELME, K., DENZER, A. *et al.*, 2004, "Time-dependent morphology and adhesion of osteoblastic cells on titanium model surfaces featuring scale-resolved topography", *Biomaterials*, v. 25, pp. 2695-2711.