

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO COMPORTAMENTO DE CÉLULAS
OSTEOPROGENITORAS E MACRÓFAGOS HUMANOS EM PASTILHAS DE
FOSFATO TRICÁLCICO COM E SEM MAGNÉSIO

Débora dos Santos Tavares

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Metalúrgica e de Materiais, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Engenharia de Metalúrgica e de Materiais.

Orientadores: Glória Dulce de Almeida Soares

José Mauro Granjeiro

Karine Anselme

Rio de Janeiro

Junho de 2012

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO COMPORTAMENTO DE CÉLULAS
OSTEOPROGENITORAS E MACRÓFAGOS HUMANOS EM PASTILHAS DE
FOSFATO TRICÁLCICO COM E SEM MAGNÉSIO

Débora dos Santos Tavares

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO LUIZ
COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA (COPPE) DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS
NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS EM
ENGENHARIA METALÚRGICA E DE MATERIAIS.

Examinada por:

Prof. Gloria Dulce de Almeida Soares, D.Sc.

Prof. José Mauro Granjeiro, D.Sc.

Dr. Karine Anselme, Ph. D.

Prof. Rossana Mara da Silva Moreira Thiré, D.Sc.

Prof. Euler Araujo dos Santos, D.Sc.

Prof. Edson Jorge Lima Moreira, D.Sc.

Prof. Marcelo Henrique Prado da Silva, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ – BRASIL

JUNHO DE 2012

Tavares, Débora dos Santos

Avaliação in vitro do comportamento de células osteoprogenitoras e macrófagos humanos em pastilhas de fosfato tricálcico com e sem magnésio / Débora dos Santos Tavares – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2012.

XIV, 119. p.: il.; 29,7 cm.

Orientadores: Gloria Dulce de Almeida Soares

José Mauro Granjeiro

Karine Anselme

Tese (doutorado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais, 2012.

Referências Bibliográficas: p. 99-109.

1. Fosfato tricálcico. 2. Células osteoprogenitoras. 3. Macrófagos. I. Soares, Gloria Dulce de Almeida, et al. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais. III. Título.

À minha mãe, pelo apoio incondicional.

“Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo. Todos nós sabemos alguma coisa. Todos nós ignoramos alguma coisa. Por isso aprendemos sempre.”

Paulo Freire

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me abençoar todos os dias;

À minha família, por todo o carinho, apoio, incentivo e confiança em minhas decisões;

Aos meus orientadores Gloria Soares e José Granjeiro pela orientação, paciência e carinho. À Karine Anselme, pour m'avoir accueilli au sein de l'équipe « Bio » et pour les moments d'apprentissage et d'encouragement.

Aos professores, técnicos e funcionários do PEMM, pela ajuda e convívio;

Aos meus queridos amigos, do Brasil e da França, que me ajudaram nesta longa trajetória;

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a minha formação acadêmica, profissional e humana;

Ao CNPq, CAPES, CNRS e FAPERJ pelo suporte financeiro.

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

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO COMPORTAMENTO DE CÉLULAS
OSTEOPROGENITORAS E MACRÓFAGOS HUMANOS EM PASTILHAS DE
FOSFATO TRICÁLCICO COM E SEM MAGNÉSIO

Débora dos Santos Tavares

Junho / 2012

Orientadores: Gloria Dulce de Almeida Soares

José Mauro Granjeiro

Karine Anselme

Programa: Engenharia Metalúrgica e de Materiais

A necessidade de inovações na área de regeneração óssea cresce continuamente devido ao aumento da expectativa de vida, com consequente aumento da taxa de doenças crônicas. Neste contexto, a implantação de substitutos ósseos como as biocerâmicas de fosfato de cálcio, vem avançando a cada dia. Os objetivos deste trabalho foram: avaliar o comportamento *in vitro* de células osteoprogenitoras STRO+1A cultivadas sobre as pastilhas de fosfato tricálcico (β -TCP) com e sem magnésio (β -TCMP; Mg/Ca = 0,15) em meio estático e dinâmico (vazão 0,3mL/min), assim como a resposta de macrófagos humanos após o contato com o extrato dos grânulos dos materiais (ISO10993-12: 2007). O β -TCMP e β -TCP foram obtidos através da sinterização de uma apatita cálcio-deficiente parcialmente substituída por magnésio, e do TCP comercial (Merck), respectivamente. Os difratogramas e os espectros de infravermelho confirmaram a presença do β -TCP ou β -TCMP como única fase. A espectrometria de plasma indicou razão Mg/Ca de 0,14. Células STRO+1A foram inoculadas (5×10^3 células/amostra) e cultivadas em 37°C/5% CO₂ por até 21 dias, onde avaliou-se a proliferação e diferenciação celular. Não foi observada diferença na densidade celular entre as amostras após 21 dias de cultura, tanto sob condição estática quanto dinâmica, porém, parece que o ambiente dinâmico acelerou a diferenciação osteoblástica. O β -TCMP, de modo geral, não modificou a resposta de macrófagos ativados (perfil de citocinas), ou não, por lipopolissacarídeo bacteriano, cultivados por até 72 horas com o extrato dos biomateriais, quando comparado ao β -TCP. A partir dos resultados obtidos, ambos os materiais parecem ser promissores para terapia de perdas ósseas.

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

IN VITRO EVALUATION OF THE BEHAVIOR OF HUMAN OSTEOPROGENITOR
CELLS AND MACROPHAGES ONTO TRICALCIUM PHOSPHATE DENSE TABLETS
DOPED OR NOT WITH MAGNESIUM

Débora dos Santos Tavares

June / 2012

Advisors: Gloria Dulce de Almeida Soares

José Mauro Granjeiro

Karine Anselme

Department: Metallurgical and Material Engineering

Research on bone tissue regeneration is constantly expanding due to the improvement of life expectancy with a consequent increase in the rate of chronic diseases. The aim of this work was to evaluate the *in vitro* behavior of STRO+1A osteoprogenitor cells cultured onto dense tablets of tricalcium phosphate doped (β -TCMP, Mg/Ca = 0.15) or not (β -TCP) with magnesium under static and dynamic (flow rate of 0.3 mL/min), as well as the response of human macrophages after contact with the granules extracts of the materials (ISO10993-12: 2007). The β -TCMP and β -TCP tablets were obtained by sintering a calcium-deficient apatite doped with magnesium and commercial TCP (Merck), respectively. The diffractograms and infrared spectra confirmed the presence of β -TCP and β -TCMP with a Mg/Ca ratio of 0.14 (plasma spectrometry). A cell density of 5×10^3 was inoculated onto the tablets and then STRO+1A were cultured at 37°C/5% CO₂ for up to 21 days, in which the proliferation and differentiation rate were assessed. There was no difference in cell density between the materials after 21 days of culture, neither under static nor dynamic conditions; however, it seems that the dynamic environment accelerated osteoblast differentiation. In a general way, β -TCMP did not change the response of macrophages (cytokine profile), activated or not, by bacterial lipopolysaccharide, cultured for up to 72 hours with the extracts of biomaterials, when compared to β -TCP. Based on these results, both materials appear to be adequate for bone loss therapy.

Résumé de la Thèse présentée à COPPE/UFRJ comme partie des conditions nécessaire pour l'obtention du titre de Docteur en Science (D. Sc.).

ÉVALUATION *IN VITRO* DU COMPORTEMENT DE CELLULES
OSTEOPROGENITRICES ET DE MACROPHAGES HUMAINS SUR DES PASTILLES
DE PHOSPHATE TRICALCIQUE DOPEE OU NON AVEC DU MAGNESIUM

Débora dos Santos Tavares
Juin / 2012

Directeurs de thèse: Gloria Dulce de Almeida Soares

José Mauro Granjeiro

Karine Anselme

Département: Ingénierie Métallurgique et des Matériaux

En raison de l'augmentation de l'espérance de vie, le nombre de personnes âgées et par conséquent le taux de maladies chroniques augmente de plus en plus nécessitant le développement de nouveaux biomatériaux permettant la réparation osseuse. Le but de cette étude était d'évaluer le comportement *in vitro* de cellules ostéoprogénitrices STRO+1A cultivées sur des pastilles de phosphate tricalcique dopées (β -TCMP, Mg/Ca = 0,15) ou non (β -TCP) avec du magnésium dans un environnement statique et dynamique (débit de 0,3 mL/min), ainsi que la réponse de macrophages humains après contact avec des extraits des matériaux (ISO10993-12: 2007). Les pastilles de β -TCMP et β -TCP ont été obtenues par frittage respectivement d'une apatite calcium déficiente en calcium dopée au magnésium et de TCP (Merck). Les diffractogrammes et les spectres infrarouge ont confirmé la production de β -TCP et de β -TCMP, ratio Mg/Ca = 0,14 (spectrométrie par émission plasma). Des cellules ostéoprogénitrices STRO+1A ont été cultivées sur des pastilles pendant 21 jours et leur comportement de prolifération et de différenciation cellulaire ont été vérifiés. Aucune différence entre les deux pastilles n'a été observée concernant le nombre de cellules après 21 jours de culture, ni sous condition statique ni dynamique. Cependant, il semble que l'environnement dynamique accélère la différenciation ostéoblastique. D'une façon générale, le β -TCMP n'a pas modifié la réponse des macrophages (le profil des cytokines) activés ou non par du lipopolysaccharide bactérien, cultivés pendant 72 heures avec des extraits de biomatériaux, par rapport au β -TCP. D'après ces résultats, les deux biomatériaux semblent être prometteurs pour le traitement des pertes osseuses.

SUMÁRIO

CHAPITRE I (a) - INTRODUCTION	1
CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO	4
CHAPITRE II (a) - BIBLIOGRAPHIE	7
CAPÍTULO II – REVISÃO DE LITERATURA	9
II.1 – BIOCERÂMICAS DE FOSFATO DE CÁLCIO	9
II.2 – DISSOLUÇÃO IÔNICA DE FOSFATOS DE CÁLCIO.....	14
II.3 – BIOREACTORES	17
II.3 – METABOLISMO ÓSSEO	19
II.4 – MACRÓFAGOS E BIOMATERIAIS.....	23
CHAPITRE III (a) – OBJECTIF GENERAL	30
CAPÍTULO III – OBJETIVOS	31
III.1 – GERAIS	31
III.2 – ESPECÍFICOS.....	31
CHAPITRE IV (a) – MATERIELS ET METHODES	32
CAPÍTULO IV – MATERIAIS E MÉTODOS	35
IV.1. OBTENÇÃO DO β -TCP PURO E DO β -TCMP (Mg/Ca = 0,15)	35
IV.1a) <i>Síntese do pó</i>	35
IV.1b) <i>Produção das pastilhas e grânulos densos</i>	36
IV.2. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS MATERIAIS	37
IV.3. DEGRADAÇÃO DAS PASTILHAS EM MEIO DE CULTURA.....	38
IV.3a) <i>Sistemas estático e dinâmico</i>	38
IV.3b) <i>Morfologia superficial das pastilhas e análise do meio de cultura</i>	39
IV.4. CULTURA DE CELULAS OSTEOPROGENITORAS STRO+1A.....	40
IV.4a) <i>Cultura sob condição estática e dinâmica</i>	40
IV.4b) <i>Avaliação da atividade (proliferação) celular</i>	41

IV.4c) Avaliação da diferenciação osteoblástica.....	42
IV.5. CULTURA DE MACRÓFAGOS HUMANOS	42
IV.5a) Inoculação do extrato dos grânulos densos	43
IV.5b) Dosagem de citocinas secretadas	44
IV.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45
CHAPITRE V (a) – RESULTATS ET DISCUSSION	46
CAPÍTULO V – RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
V.1. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS MATERIAIS	51
V.2. DEGRADAÇÃO DAS PASTILHAS EM MEIO DE CULTURA.....	55
V.2a) Análise em condição estática	56
V.2b) Análise em condição dinâmica.....	63
V.3 CULTURA DE CELULAS STRO+1A SOBRE AS PASTILHAS	70
V.3b) Análise da proliferação celular em condições estática e dinâmica	70
V.3c) Análise da diferenciação osteoblástica em condições estática e dinâmica	76
V.4 CULTURA DE MACRÓFAGOS EM CONTATO COM EXTRATO DOS GRÂNULOS DENSOS.....	82
CHAPITRE VI (a) - CONCLUSIONS	93
CAPÍTULO VI - CONCLUSÕES.....	95
CHAPITRE VII (a) – SUGGESTIONS D’ETUDES FUTURES	97
CAPÍTULO VII – SUGESTÕES FUTURAS	98
CAPÍTULO VIII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99
ANEXO I – DADOS BRUTOS DAS CONCENTRAÇÕES DE CITOCINAS	110
ANEXO II – CONVENÇÃO DE CO-TUTELA DE TESE.....	114

LISTA DE FIGURAS

Figura II.1 - Diagrama esquemático do bioreator por perfusão em incubadora a 37°C/5%CO ₂ (sistema aberto). Um tubo de silicone conduz o meio de cultura fresco acoplado a uma garrafa de vidro com filtro de ar para a câmara de cultura contendo as amostras em sentido transversal ao fluxo (as amostras são separadas por um filtro). O fluxo continua através do tubo de silicone até a garrafa de saída de meio. Uma bomba peristáltica localizada antes da câmara mantém o fluxo de meio de cultura constante (2 mL/h).	19
Figura II.2 - Desenho esquemático mostrando o papel da tríade molecular OPG/RANK/RANKL no controle da remodelação óssea. Adaptado de THIRUNAVUKARASU et al., 2000.....	22
Figura II.3 - Diagrama esquemático do papel de citocinas secretadas por macrófagos nos processos de inflamação e cicatrização. Adaptado de BRODBECK et al, 2003. ..	24
Figura IV.1 – Diagrama esquemático das pastilhas após sinterização, mostrando a diferença no diâmetro (áreas β -TCP = $116,8 \pm 2,2 \text{ mm}^2$; β -TCMP = $98,8 \pm 1,7 \text{ mm}^2$). 36	
Figura IV.2 - Diagrama esquemático do bioreator em sistema fechado, onde o mesmo meio de cultura circula continuamente através da câmara de cultura.	39
Figura V.1 - Micrografia eletrônica (MEV; aumento 1000X) e perfis 3D/rugosidade média (AFM) da superfície das pastilhas de β -TCP e β -TCMP após sinterização a 1150°C/2h.....	52
Figura V.2 - Difrátogramas do β -TCP (ficha 09-0169 JCPDS – programa PCPDFWIN) e β -TCMP (ficha 87-1582 JCPDS – programa PCPDFWIN) após sinterização a 1150°C/2h.....	54
Figura V.3 - Espectros de FTIR do β -TCP e β -TCMP após sinterização a 1150°C.....	55
Figura V.4 - Alteração na concentração média de íon Ca em amostras sob condição estática de meio de cultura em contato com pastilhas de β -TCP e β -TCMP em (a) MNC e (b) MC. Diferença significativa ($p < 0,05$; ANOVA) entre os tempos (* - mesma amostra) e entre as amostras (# - mesmo tempo); liberação de Ca da pastilha para o meio (+); precipitação de Ca na pastilha a partir do meio (–).	57
Figura V.5 - Alteração na concentração média de íon $(\text{PO}_4)^{3-}$ em amostras sob condição estática de meio de cultura em contato com pastilhas de β -TCP e β -TCMP em (a) MNC e (b) MC. Diferença significativa ($p < 0,05$; ANOVA) entre os tempos (* -	

mesma amostra) e entre as amostras (# - mesmo tempo); liberação de $(\text{PO}_4)^{3-}$ da pastilha para o meio (+); precipitação de $(\text{PO}_4)^{3-}$ na pastilha a partir do meio (-).....	59
Figura V.6 - Alteração na concentração média de íon Mg em amostras sob condição estática de meio de cultura em contato com pastilhas de β -TCMP em (a) MNC e (b) MC. Asteriscos indicam diferença significativa ($p < 0,05$; ANOVA) entre os tempos (* - mesma amostra); liberação de Mg da pastilha para o meio (+).....	61
Figura V.7 - Micrografia das superfícies das pastilhas de β -TCP e β -TCMP após 21 dias de incubação em MC sob condição estática. As imagens das outras superfícies são similares às aqui apresentadas.	63
Figura V.8 - Alteração na concentração média de íon Ca em amostras sob condição dinâmica de meio de cultura em contato com pastilhas de β -TCP e β -TCMP em (a) MNC e (b) MC. Diferença significativa ($p < 0,05$; ANOVA) entre os tempos (* - mesma amostra) e entre as amostras (# - mesmo tempo); liberação de Ca da pastilha para o meio (+); precipitação de Ca na pastilha a partir do meio (-).	65
Figura V.9 - Alteração na concentração média de íon $(\text{PO}_4)^{3-}$ em amostras sob condição dinâmica de meio de cultura em contato com pastilhas de β -TCP e β -TCMP em (a) MNC e (b) MC. Diferença significativa ($p < 0,05$; ANOVA) entre os tempos (* - mesma amostra) e entre as amostras (# - mesmo tempo); liberação de $(\text{PO}_4)^{3-}$ da pastilha para o meio (+); precipitação de $(\text{PO}_4)^{3-}$ na pastilha a partir do meio (-).....	67
Figura V.10 - Alteração na concentração média de íon Mg em amostras sob condição dinâmica de meio de cultura em contato com pastilhas de β -TCMP em (a) MNC e (b) MC. Asteriscos indicam diferença significativa ($p < 0,05$; ANOVA) entre os tempos (* - mesma amostra); liberação de Mg da pastilha para o meio (+); precipitação de Mg na pastilha a partir do meio (-).	68
Figura V.11 - Micrografia das superfícies das pastilhas de β -TCP e β -TCMP após 21 dias de incubação em MC sob condição dinâmica. As imagens das outras superfícies são similares às aqui apresentadas.	70
Figura V.12 - Número de células aderentes ao longo do tempo sobre as superfícies de β -TCP e β -TCMP em (a) condição estática e (b) condição dinâmica. Diferenças significativas para um mesmo tempo de cultura entre as superfícies cerâmicas (*). ...	72
Figura V.13 - Micrografias obtidas por MEV das células STRO+1A cultivadas sobre as superfícies das pastilhas em condição estática e dinâmica (7 dias); aumento 2500X.	73

Figura V.14 - Micrografias obtidas por MEV das células STRO+1A cultivadas sobre as superfícies das pastilhas em condição estática e dinâmica (14 dias); aumento 2500X.	74
Figura V.15 - Micrografias obtidas por MEV das células STRO+1A cultivadas sobre as superfícies das pastilhas em condição estática e dinâmica (21 dias); aumento 2500X.	75
Figura V.16 - Nível de atividade da fosfatase alcalina ao longo do tempo sobre as superfícies de β -TCP e β -TCMP em (a) condição estática e (b) condição dinâmica. Diferença significativa para um mesmo tempo de cultura entre as superfícies cerâmicas (*).	78
Figura V.17 - Nível de produção de colágeno ao longo do tempo sobre as superfícies de β -TCP e β -TCMP em (a) condição estática e (b) condição dinâmica. Diferença significativa para um mesmo tempo de cultura entre as superfícies cerâmicas (*).	80
Figura V.18 - Efeito do LPS na produção de nitrito pelos macrófagos. * Diferença significativa ($p < 0,05$).	82
Figura V.19 - Produção de citocinas (pg/mL) a partir de macrófagos cultivados com os extratos dos grânulos de β -TCP, β -TCMP e TCPS (poliestireno de cultura de tecidos) após 24, 48 e 72h. Uma escala de cores de concentrações foi incluída na parte superior. Os dados são mostrados como médias. $\uparrow \downarrow$ Aumenta ou diminui com a ativação dos macrófagos.	83
Figura V.20 - Produção de citocinas (pg/mL) agrupadas em (a) pró ou anti-reparo e (b) pró ou anti-inflamação a partir de macrófagos não-ativados cultivados com os extratos dos grânulos de β -TCP, β -TCMP e TCPS (controle) após 24, 48 e 72h. Os dados são mostrados como média $\pm$ desvio padrão (razão pró/anti).	86
Figura V.21 - Produção de citocinas (pg/mL) agrupadas em (a) pró ou anti-reparo e (b) pró ou anti-inflamação a partir de macrófagos ativados cultivados com os extratos dos grânulos de β -TCP, β -TCMP e TCPS (controle) após 24, 48 e 72h. Os dados são mostrados como média $\pm$ desvio padrão (razão pró/anti).	90

LISTA DE TABELAS

Tabela V.1 - Rugosidade das superfícies de β -TCP e β -TCMP medida por AFM após 21 dias de imersão em meio não completo (MNC) e meio completo (MC) sob condição estática. “Controle” corresponde ao tempo zero, ou seja, antes da imersão.	63
Tabela V.2 - Rugosidade das superfícies de β -TCP e β -TCMP medida por AFM após 21 dias de imersão em meio não completo (MNC) e meio completo (MC) sob condição dinâmica. “Controle” corresponde ao tempo zero, ou seja, antes da imersão.	70
Tabela V.3 - Avaliação da proliferação celular ao longo do tempo em condições estática (Est) e dinâmica (Din).	76
Tabela V.4 - Avaliação da atividade da fosfatase alcalina sob condições estática (Est) e dinâmica (Din).	79
Tabela V.5 - Avaliação da secreção de colágeno sob condições estática (Est) e dinâmica (Din).	81
Tabela V.6 - Avaliação do perfil de produção de citocinas quanto ao reparo tecidual e inflamação (pró ou anti) por macrófagos ativados e não-ativados após contato com extrato dos biomateriais (β -TCP e β -TCMP) e controle (TCPS).	92

CHAPITRE I (a)

INTRODUCTION

Les biocéramiques phosphocalciques (biomatériaux synthétiques) sont de plus en plus utilisées pour remplacer les os: leur composition qui ressemble à la partie minérale de l'os permet le développement d'un nouveau tissu osseux. Les plus utilisées sont l'hydroxyapatite (HA) et le phosphate tricalcique- β (β -TCP). Bien que l'HA soit biocompatible, elle est très peu résorbable, ne permettant pas un remplacement efficace par de l'os néoformé (BARRERE, VAN BLITTERSWIJK e DE GROOT, 2006).

La bioingénierie tissulaire est un domaine interdisciplinaire qui étudie la combinaison de cellules, de substances biochimiques et de matériaux afin d'améliorer, de restaurer ou de maintenir l'intégrité des tissus et des organes. En ce qui concerne les propriétés chimiques des biocéramiques, des modifications dans la structure peuvent être obtenues par de nouvelles synthèses de phosphates de calcium dopés avec différents ions (DOROZHKIN, 2007). Le magnésium (Mg) est un cation qui suscite un intérêt particulier car sa déficience dans l'organisme affecte toutes les étapes du métabolisme osseux (LANDI, LOGROSCINO, *et al.*, 2008). Pour cette raison, du β -TCP dopé avec du magnésium a été étudié en tant que greffe osseuse.

L'un des mécanismes responsables de la bioactivité des biocéramiques consiste en la dissolution des ions calcium et phosphate, contribuant ainsi à l'accumulation de ces ions entre l'os et l'implant, qui favorise ensuite une apposition osseuse plus rapide sur la surface de l'implant. Le fait que la substitution partielle du calcium par le magnésium dans la structure du TCP augmente significativement le taux de dissolution est un facteur majeur pour comprendre son mécanisme d'action, ainsi

que l'évaluation de l'effet de l'ion magnésium sur le métabolisme des cellules osseuses (GUTH, CAMPION, *et al.*, 2011).

Au niveau cellulaire, l'équilibre entre la formation et la résorption osseuse implique la régulation coordonnée et l'interaction de deux types de cellules, les ostéoblastes qui forment l'os et les ostéoclastes qui résorbent l'os (THIRUNAVUKKARASU, HALLADAY, *et al.*, 2000). Dans ce contexte, des recherches récentes montrent que les bioréacteurs (*culture cellulaire* en régime *dynamique*) sont essentiels dans le domaine de la bioingénierie, non seulement car ils offrent un environnement *in vitro* plus proche des conditions du vivant, avec un flux constant de milieu de culture, mais surtout car ils permettent des études systématiques de la réponse cellulaire à différents signaux mécaniques et biochimiques (CHEN e HU, 2006).

L'implantation du biomatériau dans l'organisme provoque un traumatisme tissulaire et ensuite une inflammation, liée à la réaction de cicatrisation. De nombreuses cytokines, cruciales pour l'intégration osseuse du matériau, coordonnent la réaction de l'organisme (KIRKPATRICK, KRUMP-KONVALINKOVA, *et al.*, 2002). La résolution de la réponse inflammatoire et la progression de la cicatrisation coïncident avec la différenciation des monocytes en macrophages adhérents sur le biomatériau, qui peuvent ensuite fusionner et former des cellules géantes. C'est pour ces raisons que les cytokines responsables du recrutement et de l'activité des macrophages et des cellules géantes adhérentes aux biomatériaux sont largement étudiés actuellement (BRODBECK, NAKAYAMA, *et al.*, 2002).

Cette thèse propose l'évaluation du comportement *in vitro* de cellules ostéoprogénitrices cultivées dans un environnement statique et dynamique sur des pastilles de β -TCP dopées ou non avec du Mg (β -TCMP ; raison Mg/Ca = 0,15). De plus, une étude biomimétique a été réalisée afin de comprendre la cinétique de dissolution des biocéramiques quand elles sont immergées dans le milieu de culture

cellulaire. L'interaction de ces biomatériaux avec des macrophages humains *in vitro* a aussi été analysée, par la détection et la quantification des cytokines qui interviennent dans l'inflammation. L'influence topographique a été exclue car la rugosité superficielle déterminée grâce à la microscopie à force atomique n'est pas différente entre les pastilles, permettant d'évaluer seulement l'influence chimique sur les réponses biologiques.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

A implantação de substitutos ósseos como as biocerâmicas de fosfato de cálcio vem aumentando progressivamente em substituição aos auto ou aloenxertos. Estas apresentam várias vantagens: previnem tempos cirúrgicos adicionais, visto que são sintéticas (auto-enxertos necessitam de dois tempos cirúrgicos – um para sua retirada e outro para implantação de enxerto) e transferência de doenças e reações imunológicas, já que não são provenientes de outras pessoas (LEGEROS, 2002). Biocerâmicas de fosfato de cálcio possuem uma característica ímpar em sua utilização como substitutos ósseos quando comparadas com outros biomateriais: sua composição semelhante à parte mineral do osso (hidroxiapatita) promove um arcabouço adequado para o processo de formação óssea. As mais utilizadas são a hidroxiapatita (HA) e fosfato tricálcico na fase beta (β -TCP). Apesar de ser altamente biocompatível a HA é pouco reabsorvível, não permitindo uma substituição efetiva por tecido ósseo neoformado. A grande vantagem do β -TCP é ser mais solúvel que a HA, sendo mais rapidamente reabsorvido no organismo (BARRERE, VAN BLITTERSWIJK e DE GROOT, 2006). Um dos principais objetivos na área de bioengenharia é a síntese de um material que seja reabsorvido na medida em que o novo tecido é formado.

A bioengenharia é uma área interdisciplinar que estuda a combinação de células, materiais e substâncias bioquímicas em várias formas para melhorar, restaurar ou manter a integridade de tecidos e até mesmo órgãos. No caso de enxertos ósseos, o objetivo principal é desenvolver arcabouços sintéticos porosos constituídos basicamente de cerâmicas de fosfatos de cálcio. Por isto, atualmente, as pesquisas estão direcionadas para diferentes modificações nos fosfatos de cálcio. Em

relação as suas propriedades químicas, as modificações incluem novas sínteses de fosfatos de cálcio substituídos parcialmente por vários íons (DOROZHKIN, 2007). O magnésio é um cátion que desperta especial interesse, pois sua deficiência afeta todas as etapas do metabolismo ósseo (LANDI, LOGROSCINO, *et al.*, 2008). Por conseguinte, o β -TCP, e mesmo outros fosfatos, biovidros, ligas metálicas, contendo magnésio vem sendo estudado como substituto ósseo.

Tem sido proposto que um dos mecanismos subjacentes responsáveis pela bioatividade de cerâmicas envolve a dissolução dos fosfatos de cálcio, onde a dissolução leva a aumentos na concentração destes íons entre o osso existente e o enxerto implantado, favorecendo uma aposição óssea mais rápida na superfície do enxerto. A verificação de que se a substituição de magnésio no TCP aumenta significativamente a taxa de dissolução é um fator importante para entender seu mecanismo de ação, em conjunto com a avaliação do efeito do íon magnésio sobre o metabolismo das células ósseas (GUTH, CAMPION, *et al.*, 2011).

O crescimento, desenvolvimento e manutenção do tecido ósseo em mamíferos é um processo altamente regulado. O nível de massa óssea é dependente do equilíbrio entre formação e reabsorção óssea. No nível celular, este equilíbrio envolve a regulação coordenada e a interação de dois tipos celulares em especial: osteoblastos, que formam osso, e osteoclastos, que reabsorvem o osso. Osteoblastos controlam as atividades de reabsorção óssea dos osteoclastos e estão também diretamente envolvidos na diferenciação de osteoclastos. (THIRUNAVUKKARASU, HALLADAY, *et al.*, 2000).

Neste contexto, pesquisas recentes mostram que bioreatores (cultura de células em meio dinâmico) são essenciais na área da bioengenharia, porque fornecem um ambiente *in vitro* mais próximo às condições *in vivo*, com fluxo constante de meio de cultura, controle da temperatura e pH. Além disso, permitem a realização de

estudos sistemáticos da resposta celular a vários sinais mecânicos e bioquímicos (CHEN e HU, 2006).

A implantação de um biomaterial envolve trauma tecidual, que induz uma resposta inflamatória conjugada a reação de reparo tecidual, composta de várias etapas: angiogênese, ativação de fibroblastos e remodelação da matriz. Inúmeras citocinas inflamatórias estão envolvidas nesta reação do organismo, que são cruciais para a biointegração do material com o osso (KIRKPATRICK, KRUMP-KONVALINKOVA, *et al.*, 2002). A resolução da resposta inflamatória e a progressão da cicatrização da ferida coincidem com a diferenciação de monócitos em macrófagos, que podem se fundir e formar células gigantes de corpo estranho. As células gigantes são responsáveis por danos e degradação prematura do implante através de sua capacidade fagocítica e secreção de enzimas. Portanto, as citocinas envolvidas na modulação da presença e atividade de macrófagos e células gigantes aderentes ao biomaterial e sua resposta como um todo à superfície do material estão sendo amplamente pesquisadas (BRODBECK, NAKAYAMA, *et al.*, 2002).

O presente trabalho tem como objetivo a avaliação *in vitro* do comportamento de células osteoprogenitoras sob condições estática e dinâmica em pastilhas de β -TCP e β -TCP parcialmente substituído por Mg (razão Mg/Ca = 0,15). Um estudo biomimético foi realizado visando compreender a cinética de dissolução das cerâmicas quando imersas em meio de cultura celular. A interação destes materiais com macrófagos humanos *in vitro* também foi analisada, através da detecção e quantificação de citocinas mediadoras do processo inflamatório. A influência topográfica foi descartada através da determinação da rugosidade superficial das pastilhas por microscopia de força atômica, logo foi possível avaliar apenas a influência química nas respostas biológicas.

CHAPITRE II (a)

BIBLIOGRAPHIE

En raison de l'amélioration de la qualité de vie et de l'augmentation de l'espérance de vie, le nombre de personnes âgées et par conséquent le taux de maladies chroniques augmente de plus en plus. Désormais, la recherche dans le domaine de la régénération osseuse augmente aussi continuellement pour satisfaire les besoins de la chirurgie ostéoarticulaire et maxillofaciale (HABIBOVIC e DE GROOT, 2007).

Le phosphate tricalcique (TCP) a été largement étudié comme greffe osseuse, car il est plus soluble que l'hydroxyapatite (HA), permettant un remplacement progressif du biomatériau par l'os néoformé (BARRERE, VAN BLITTERSWIJK e DE GROOT, 2006; DOROZHKIN, 2007). Parmi les substituants cationiques du TCP, le magnésium (Mg) possède des caractéristiques intéressantes, car il est le quatrième cation en termes d'abondance dans le corps et le second dans le milieu intracellulaire. Par ailleurs, environ 50-60% du magnésium se trouvent dans les os, et la carence en magnésium dans l'alimentation a déjà été considérée comme un facteur de risque pour l'ostéoporose. De plus, le magnésium joue un rôle important dans l'activité des cellules osseuses (BIGI, COJAZZI, *et al.*, 1997; WOLF e CITTADINI, 2003; RUDE e GRUBER, 2004; LANDI, LOGROSCINO, *et al.*, 2008).

En effet, l'échange ionique, c'est à dire, la dissolution des ions calcium et phosphate est également responsable de la bioactivité de phosphates de calcium, puisque l'augmentation du niveau de ces ions dans l'espace os-greffe peut favoriser l'apposition osseuse par les ostéoblastes qui utilisent ces ions pour fabriquer le tissu osseux (GUTH, CAMPION, *et al.*, 2011).

L'association des biomatériaux à des cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse (par exemple les cellules *STRO+1A*) contribue au développement d'innovations en bioingénierie osseuse, grâce à leur capacité de se différencier en de nombreuses cellules spécialisées, comme des ostéoblastes (OYAJOB, LOMRI, *et al.*, 1999; AHDJODJ, LASMOLES, *et al.*, 2001). D'autre part, le développement de bioréacteurs à perfusion, qui permettent la circulation en continu du milieu de culture, apparaît désormais indispensable à la culture des cellules sur les biomatériaux supports pour la fabrication de substituts osseux cellularisés. De plus, la contrainte de cisaillement induite par la dynamique des fluides (ex. milieu de culture cellulaire) dans les bioréacteurs joue aussi un rôle très important dans la stimulation cellulaire par l'activation de signaux mécanotransducteurs dans les ostéoblastes (PLUNKETT e O'BRIEN, 2011).

D'autre part, l'interaction entre les cellules immunitaires et la surface d'un matériau, appelée réaction à corps étranger, où la cellule la plus importante est le macrophage, détermine ou au moins influence fortement le succès ou l'échec d'un matériau implanté. Considérant que l'expression des cytokines par des macrophages est plus élevée lorsque la biocompatibilité des biomatériaux est réduite, les études des cytokines produites en présence des biomatériaux deviennent de plus en plus nécessaires (HUMMEL, CZERLINSKI, *et al.*, 1994).

Il apparaît donc essentiel d'élaborer de nouveaux matériaux possédant des capacités de reconstruction du tissu osseux. D'après les informations déjà mentionnées, l'étude du comportement des cellules ostéoprogénitrices ainsi que des macrophages humains sur des pastilles de phosphate tricalcique dopées ou non avec du magnésium est donc pertinente dans le domaine de la bioingénierie.

CAPÍTULO II

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

II.1 – BIOCERÂMICAS DE FOSFATO DE CÁLCIO

A necessidade de inovações na área de regeneração óssea cresce continuamente devido à melhoria na qualidade de vida com aumento da expectativa de vida. Uma das consequências desse fenômeno é o aumento de lesões e doenças ósseas em pessoas mais idosas, que apresentam uma capacidade de regeneração óssea diminuída. Defeitos em tecidos orais e crânio-faciais, resultantes de trauma, tumores ou infecções são um desafio clínico e sua restauração depende de esforços conjuntos da ciência e bioengenharia (HABIBOVIC e DE GROOT, 2007; DOROZHKIN, 2010).

O osso é um órgão importante que apresenta como funções a sustentação do corpo, proteção de órgãos internos e também atua como local de armazenamento e fonte de íons, principalmente cálcio e fosfato. A capacidade de regeneração do tecido ósseo humano perdido ou danificado é limitada. Quando a perda óssea é muito extensa, um enxerto torna-se necessário. Auto-enxertos são substitutos ósseos obtidos de local diferente da área da lesão, mas do mesmo indivíduo, aumentando a morbidade e com grande possibilidade de mais de um tempo cirúrgico. Aloenxertos são substitutos ósseos obtidos de outro indivíduo da mesma espécie, com importantes questões referentes a infecções devido a contaminações do enxerto com vírus e/ou bactérias e imunogenicidade. Neste contexto, um especial destaque tem-se atribuído aos biomateriais sintéticos para a reconstrução de tecidos ósseos danificados, apresentando reduzida contaminação patogênica e quantidade disponível ilimitada

(DEN BOER, WIPPERMANN, *et al.*, 2003; KAMINTAKAHARA, OHTSUKI e MIYAZAKI, 2008).

O tecido ósseo é altamente mineralizado, composto por uma matriz orgânica reforçada por depósitos de cristais de fosfatos de cálcio, ou seja, um compósito natural. Seus principais constituintes são: minerais de fosfatos de cálcio, como hidroxiapatita (50-60%), colágeno (30-40%) e água (até 10%). A matriz orgânica calcificada envolve as células ósseas que participam do metabolismo ósseo, como as células osteoprogenitoras, osteoblastos, osteócitos e osteoclastos (BARRERE, VAN BLITTERSWIJK e DE GROOT, 2006; DOROZHKIN, 2007).

Baseando-se nas características e composição do tecido ósseo, vários biomateriais são continuamente desenvolvidos para sua utilização no processo de regeneração óssea. Biomateriais são materiais sintéticos ou naturais utilizados na substituição de partes do organismo ou para funcionamento em contato direto com tecido vivo. As cerâmicas de fosfato de cálcio são amplamente utilizadas como substitutos ósseos em virtude de sua similaridade com a fase mineral do osso e por serem bioativas (se ligando quimicamente ao osso). As biocerâmicas mais utilizadas são a hidroxiapatita (HA) e fosfato tricálcico (TCP) (VALLET-REGI e GONZALEZ-CALBET, 2004; KAMINTAKAHARA, OHTSUKI e MIYAZAKI, 2008; DOROZHKIN, 2010).

De modo geral, um biomaterial para enxerto ósseo deve apresentar uma taxa de biodegradação comparável à taxa de formação de tecido ósseo, ou seja, entre alguns meses e cerca de 2 anos. A HA exibe solubilidade e cinética de reabsorção mais lentas quando comparada ao TCP: enquanto a HA permanece em defeitos ósseos muitos anos após o implante, o TCP é reabsorvido em cerca de 6 meses a 1 ano, tempo dependente de vários fatores como razão Ca/P, grau de cristalinidade, etc (BARRERE, VAN BLITTERSWIJK e DE GROOT, 2006; DOROZHKIN, 2007).

A hidroxiapatita, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, é o fosfato de cálcio mais estável sob temperatura normal. As apatitas biológicas possuem várias substituições em sua rede cristalina, que alteram sua estrutura e geralmente apresentam efeitos críticos nas propriedades minerais, como solubilidade, dureza, deformação, estabilidade térmica entre outros. Dentre os íons substituintes relatados na literatura estão: F^- , Cl^- , Na^+ , K^+ , Fe^{+2} , Zn^{+2} , Sr^{+2} , Mg^{+2} , CO_3^{-2} . Por apresentar uma estrutura cristalina, dependendo do íon substituinte, existem limites quanto à quantidade que determinado íon pode ser incorporado (WOPENKA e PASTERIS, 2005; DOROZHKIN, 2007; SHADANBAZ e DIAS, 2012).

O fosfato tricálcico $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$ tem sido amplamente estudado por apresentar uma solubilidade maior que a da HA, possibilitando uma substituição gradativa do biomaterial por tecido ósseo neoformado. O fosfato tricálcico não pode ser obtido por precipitação em meio aquoso, mas sim por calcinação de apatitas cálcio deficiente, apresentando duas fases distintas: α -TCP e β -TCP. A fase alfa é obtida após tratamento térmico acima de 1125°C e a fase beta acima de 800°C . Apesar de suas composições químicas similares, seus perfis cristalográficos diferentes resultam em padrões de reabsorção distintos: β -TCP é menos solúvel em água que α -TCP. Além disso, a fase beta é estável a temperatura ambiente. A alta reatividade e, conseqüentemente, a alta taxa de dissolução do α -TCP *in vitro* e *in vivo* limitam sua aplicação no campo biomédico. Por outro lado, a menor taxa de dissolução do β -TCP, juntamente com sua estabilidade química e resistência mecânica adequadas preenche os requisitos dos materiais reabsorvíveis de substituição óssea. O β -TCP puro não ocorre em calcificações biológicas, somente sua forma parcialmente substituída por magnésio (Mg) chamada de β -TCMP, de fórmula química $(\text{Ca,Mg})_3(\text{PO}_4)_2$, é encontrada em tártaro dentário, cálculo renal e salivar, cáries dentárias (BARRERE, VAN BLITTERSWIJK e DE GROOT, 2006; KAMINTAKAHARA, OHTSUKI e MIYAZAKI, 2008; DOROZHKIN, 2010).

Kondo e colaboradores (2005) examinaram cortes histológicos de côneos femorais de ratos implantados com β -TCP. Observou-se neoformação óssea após 7 dias, com substituição da região do implante por medula óssea decorridos 28 dias. Células multinucleadas que aderiram ao β -TCP em todas as fases assemelhavam-se a osteoclastos que continuamente reabsorviam o biomaterial (KONDO, OGOSE, *et al.*, 2005). Em conjunto com os resultados de outro estudo *in vivo* descrito por Shiratori e colaboradores (2005), conclui-se que β -TCP é um material osteocondutor visto que tanto a reabsorção do material quanto a formação óssea foram iniciadas em fase precoce após a implantação (SHIRATORI, MATSUZAKA, *et al.*, 2005).

Dentre os substituintes catiônicos dos fosfatos de cálcio, o magnésio merece destaque especial, por ser um dos mais importantes íons bivalentes associados ao tecido biológico. Magnésio é o quarto cátion mais abundante no corpo e o segundo mais prevalente no meio intracelular. Em termos fisiológicos, é essencial em muitas reações enzimáticas. Aproximadamente 50-60% do magnésio localiza-se nos ossos, incorporado nos cristais de HA e a deficiência de magnésio na dieta já foi implicada como fator de risco para osteoporose. Quanto às substituições catiônicas na apatita, o íon magnésio é o mais abundante, com aproximadamente 6% mol na cartilagem e tecido ósseo durante a fase inicial da osteogênese, com tendência de redução no osso maduro. Além disso, o magnésio tem um papel importante na atividade das células ósseas. É mitogênico para osteoblastos e sua depleção causa inibição do crescimento celular *in vitro* devido à resultante redução na síntese de DNA, RNA e proteínas (BIGI, COJAZZI, *et al.*, 1997; WOLF e CITTADINI, 2003; RUDE e GRUBER, 2004; LANDI, LOGROSCINO, *et al.*, 2008).

Biomateriais contendo magnésio já foram sintetizados, dentre eles HA e β -TCP substituídas parcialmente por magnésio. Landi e colaboradores (2008) sintetizaram uma série de pós de HA contendo 5-10% Mg, em seguida produziram grânulos de HA-Mg 5,7% e implantaram em defeitos no osso femoral de coelhos: a osteocondutividade

(capacidade de suportar o desenvolvimento ósseo) e a reabsorção do material foi maior quando comparado ao resultado obtido com HA comercial. Klammert e colaboradores (2010) cultivaram células MC3T3-E1 em contato com *scaffolds* de TCP de fórmula $Mg_{2,25}Ca_{0,75}(PO_4)_2$ durante 21 dias. Verificou-se um aumento considerável na proliferação celular e expressão de fosfatase alcalina, sugerindo um futuro promissor na sua utilização como substituto ósseo (KLAMMERT, REUTHER, *et al.*, 2010). Zhao e colaboradores (2011) compararam o efeito do recobrimento de titânio por HA e HA parcialmente substituída por Mg [$Mg/(Mg + Ca) = 10\%$ mol] na indução da osteogênese *in vitro* e osseointegração *in vivo*. Células MC3T3-E1 cultivadas sobre o titânio revestido por Mg-HA promoveram diferenciação osteogênica *in vitro* e podem melhorar a osseointegração do implante durante as fases iniciais de cicatrização óssea quando comparado com o revestimento de HA pura (ZHAO, JIANG, *et al.*, 2011).

Sader e colaboradores (2009) cultivaram osteoblastos humanos (SaOs2) sob pastilhas sinterizadas de β -TCMP (relação Mg/Ca = 0,2 mol) e de β -TCP (MERCK) por 4 horas, 24 horas e 7 dias. Verificou-se uma maior proliferação de osteoblastos no β -TCMP quando comparado ao β -TCP. Estes dados preliminares demonstraram que β -TCMP promove adesão e proliferação de osteoblastos humanos. Ainda, a incorporação de magnésio em apatitas cálcio deficientes seguida de sinterização a 1000°C parece ser uma rota eficaz de obtenção de pastilhas densas com estrutura cristalina do β -TCP, apresentando potencial aplicação em regeneração óssea. (SADER, LEGEROS e SOARES, 2009). Contudo, parte do magnésio poderia estar adsorvida a superfície do material, já que o máximo de substituição de cálcio (Ca) por Mg na estrutura do β -TCP é de 0,15 mol (ARAÚJO, SADER, *et al.*, 2009).

Além da frequente utilização como substituto ósseo, recentemente, tem-se estudado nanopartículas de fosfato de cálcio para transferência de DNA ao invés de vetores virais, devido à sua biocompatibilidade, condensação de DNA e capacidade de

transferência de genes. Nesta área, nanopartículas de fosfato de cálcio parcialmente substituídas por Mg foram sintetizadas e caracterizadas físico-quimicamente. Concluiu-se que a presença de íons de Mg reduzem o tamanho da partícula e a cristalinidade das amostras; aumentam a carga positiva da superfície assim como a fração de β -TCP na fração de fases do fosfato de cálcio. Essas propriedades conferem um aumento da capacidade de condensação de DNA, área superficial específica e velocidade de dissolução das amostras, tornando-as assim adequadas para utilização como partículas de transferência de genes (HANIFI, FATHI e VARSHOSAZ, 2010).

II.2 – DISSOLUÇÃO IÔNICA DE FOSFATOS DE CÁLCIO

Um dos mecanismos responsáveis pela bioatividade de fosfatos de cálcio envolve a saída de íons cálcio e fosfato da rede cristalina, com o consequente aumento da concentração de cálcio e fosfato nos espaços entre o osso existente e o enxerto implantado, o que pode favorecer uma aposição óssea mais rápida na superfície do enxerto. Assim sendo, considera-se que biomateriais sintéticos que aceleram o processo de dissolução poderiam potencialmente promover a formação mais rápida de uma camada de apatita e acelerar o processo cicatricial na região do implante (GUTH, CAMPION, *et al.*, 2011).

De fato, a reabsorção *in vivo* de materiais baseados no β -TCP é controlada por dois fatores: sua própria dissolução no meio e a mediada por células (LI, ITO, *et al.*, 2009). Fatores que afetam a solubilidade dos fosfatos de cálcio incluem o método de síntese, a cristalinidade, a densidade e o grau de substituições iônicas na rede cristalina da apatita (FULMER, ISON, *et al.*, 2002).

No trabalho realizado por Li e colaboradores (2009), pós de β -TCMP (0, 2,3, 4,9, 7,3 e 10,1% de Mg) foram imersos em solução tampão 0,08 mol/L de ácido acético/acetato de sódio com pH 5,5 a 25°C por até 27 meses. Observou-se que a

redução da solubilidade do material pode ser atribuída à maior estabilidade estrutural com o aumento da incorporação de íons magnésio. Isto porque a estrutura do β -TCP pode acomodar íons com raio iônico na faixa de 0,06 a 0,08 nm (o raio iônico do Mg é 0,072 nm). O grau de dissolução dos materiais é um fator importante, pois está diretamente relacionada à quantidade de íons disponíveis no meio para a neoformação óssea (LI, ITO, *et al.*, 2009). No entanto, também foi reportado que Mg poderia diminuir a cristalinidade e assim aumentar a solubilidade de fosfatos quando substituindo parcialmente o Ca na rede cristalina (MARCHI, DANTAS, *et al.*, 2007; JIA, ZHOU, *et al.*, 2010).

Soluções simuladoras do fluido corporal (SBF) e tampão Tris-HCl são frequentemente utilizados como meio de imersão para avaliar o comportamento *in vitro* de dissolução dos fosfatos de cálcio, assim como alterações de superfície (FULMER, ISON, *et al.*, 2002; MONTEIRO, ROCHA, *et al.*, 2003). Em solução tipo SBF, que apresenta composição inorgânica similar ao plasma sanguíneo humano, os processos de dissolução geralmente são acompanhados por precipitação devido à sua alta concentração de íons cálcio e fosfato (YANG, THOMPSON, *et al.*, 2008). Em adição, materiais bioativos caracterizam-se por sua integração com o tecido ósseo através da formação de uma camada de apatita, que se forma na superfície em contato com o fluido corporal (ZHAO, WANG, *et al.*, 2005; KOKUBO e TAKADAMA, 2006).

A apatita formada é semelhante à biológica, corroborando a aplicação da solução SBF em estudos *in vitro*. No entanto, a presença de proteínas no sangue é um fator importante no que tange a integração ou rejeição de um biomaterial quando implantado *in vivo*. Quando um biomaterial é implantado, as proteínas se adsorvem rapidamente à superfície deste, sendo um dos indicadores do sucesso clínico do implante. A solução SBF simula os níveis iônicos do sangue humano, mas não inclui proteínas. Como o objetivo é prever a bioatividade *in vivo*, meio de cultura celular é um sistema bem estabelecido que simula de modo mais fidedigno o ambiente *in vivo*,

podendo ser utilizado com ou sem proteínas. (JUHASZ, BEST, *et al.*, 2008; LEE, LENG, *et al.*, 2011).

Kandori e colaboradores (2005) estudaram a cinética de dissolução e troca iônica de partículas sintéticas de HA na ausência e na presença de proteínas em diferentes soluções aquosas a 15°C. Na ausência de proteínas, partículas de HA se dissolveram em pequenas proporções de íons cálcio (0,09-0,14 $\mu\text{mol.m}^{-2}$) e fosfato (0,01-0,08 $\mu\text{mol.m}^{-2}$) em soluções de KCl, CaCl_2 , BaCl_2 e AlCl_3 . A concentração de cálcio aumentou conforme a relação Ca/P da HA aumentou, enquanto que a concentração de fosfato diminuiu. Na presença de albumina de soro bovino (BSA), as partículas de HA se dissolveram de modo ligeiramente mais rápido do que nos ensaios sem proteína. Este fato foi explicado pela complexação de íons adsorvidos a grupos funcionais das proteínas. A adsorção às proteínas no meio induziu uma redução de nas concentrações de cálcio e fósforo em meio aquoso (KANDORI, MASUNARI e ISHIKAWA, 2005).

Zhao e colaboradores (2011) compararam o efeito do recobrimento de titânio por HA e HA parcialmente substituída por Mg [$\text{Mg}/(\text{Mg} + \text{Ca}) = 10\% \text{ mol}$] na indução da osteogênese *in vitro* e osseointegração *in vivo*. Células MC3T3-E1 cultivadas sobre o titânio revestido por Mg-HA promoveram diferenciação osteogênica *in vitro*, podendo melhorar a osseointegração do implante durante as fases iniciais de cicatrização óssea quando comparado com o revestimento de HA pura (ZHAO, JIANG, *et al.*, 2011).

Da Silva e colaboradores (2010) monitoraram as variações nas concentrações de cálcio e fosfato no meio de cultura completo e incompleto em contato com pastilhas de HA e HA parcialmente substituída por silício (HA-Si), sob condição estática e dinâmica por até 14 dias. Concluiu-se que a imersão estática favorece o processo de dissolução da HA enquanto a condição dinâmica inicialmente induz uma precipitação de fosfato seguida de uma leve dissolução. Estes resultados *in vitro* indicaram uma

manutenção constante dos níveis de cálcio, mas principalmente uma redução da concentração de fosfato em meio de cultura. Portanto, pode-se esperar uma precipitação de uma camada de apatita nas amostras com uma relação de Ca/P inferior a 1,67, correspondente a uma apatita Ca-deficiente (DA SILVA, MATEESCU, *et al.*, 2010).

Guth e colaboradores (2011) avaliaram a troca iônica em pastilhas de HA e HA-Si (Si = 2,6% em peso) em meio de cultura completo (com soro fetal bovino) e incompleto (sem soro fetal bovino) sob condição estática e semi-dinâmica (substituição periódica do meio de cultura) por até 28 dias. Em meio incompleto, variações na concentração de Ca não foram observadas em relação a nenhum dos aspectos (química das pastilhas e condições de cultura). Em meio completo, íons Ca foram liberados da HA-Si sob condições estática e semi-dinâmica, enquanto que com HA a concentração de Ca foi reduzida sob condição semi-dinâmica. Uma redução na concentração de fosfato foi observada em todas as situações, embora maior em meio completo sob condição semi-dinâmica. O estudo mostrou que, sob condições fisiológicas o reservatório de íons disponíveis tanto da HA quanto da HA-Si, na ausência de proteínas do soro é limitado, mas que a presença destas proporcionou uma maior troca iônica, em particular com HA-Si (GUTH, CAMPION, *et al.*, 2011).

II.3 – BIOREATORES

A cultura de células ósseas tem sido realizada tradicionalmente em frascos de poliestireno (ambiente estático) com substâncias bioativas tais como a dexametasona e ácido ascórbico para linhagens ósseas específicas. Bioreatores ósseos disponíveis atualmente permitem o monitoramento adequado e controle de determinados parâmetros biológicos, físicos e químicos durante o processo de formação óssea *in*

vitro (RAUH, MILAN e GUNTHER, 2011). De modo geral, bioreatores são fabricados para alcançar ao menos uma das seguintes funções: distribuição celular uniforme, manutenção da concentração de gases e nutrientes no meio de cultura, transporte de nutrientes às células, exposição das células a estímulo físico e obtenção de informações a respeito da formação tecidual tridimensional. Bioreatores do tipo frascos giratórios assim como frascos perfundidos também têm sido utilizados para aumentar a proliferação celular em *scaffolds* ósseos. Estudos que utilizam bioreatores para semeadura de células e circulação de meio de cultura através de *scaffolds* possibilitam a remoção de resíduos e difusão de nutrientes. Em adição, estes mostraram aumentar a proliferação de células ósseas (STEVENS, YANG, *et al.*, 2008).

Existem vários tipos de bioreatores que podem ser classificados pelo modo que estimulam as células, como por compressão, rotação, tensão, perfusão, entre outros. Entre esses, as culturas por perfusão de fluxo apresentam uma aplicação particular para substitutos ósseos porque acredita-se que a tensão cisalhante induzida pela dinâmica do fluido seja o estímulo mecânico mais importante na ativação de sinais mecanotransdutores dos osteoblastos (PLUNKETT e O'BRIEN, 2011). Forças aplicadas ao osso durante o movimento corporal resultam em alterações na pressão hidrostática, deformação celular direta e tensão cisalhante induzida pelo fluxo de fluido intersticial ósseo e campo elétrico (RAUH, MILAN e GUNTHER, 2011).

Os bioreatores por perfusão de fluxo geralmente consistem de uma bomba e uma câmara para cultura unidos por tubos, além de dois reservatórios de meio de cultura (um de entrada e outro de saída). O biomaterial é mantido na posição transversal ao fluxo de meio (Figura II.1) (RAUH, MILAN e GUNTHER, 2011). O osso, como todos os órgãos, é continuamente perfundido por fluido intersticial devido a pressão vascular e carga mecânica. Quando um implante, como HA ou TCP, substitui uma região óssea danificada, estará em contato com a composição complexa de líquido ósseo intersticial que circula a 2 mL/h (WANG, UEMURA, *et al.*, 2003).

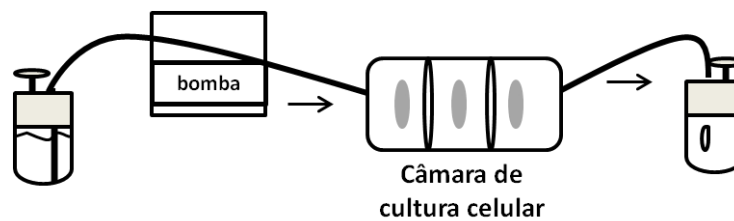


Figura II.1- Diagrama esquemático do bioreator por perfusão em incubadora a 37°C/5%CO₂ (sistema aberto). Um tubo de silicone conduz o meio de cultura fresco acoplado a uma garrafa de vidro com filtro de ar para a câmara de cultura contendo as amostras em sentido transversal ao fluxo (as amostras são separadas por um filtro). O fluxo continua através do tubo de silicone até a garrafa de saída de meio. Uma bomba peristáltica localizada antes da câmara mantém o fluxo de meio de cultura constante (2 mL/h).

Estudos demonstraram que o fluxo de meio de cultura pode estimular as células ósseas com um consequente aumento de marcadores de formação óssea, podendo também favorecer a mineralização. Bioreatores por perfusão de meio aumentam a expressão de fosfatase alcalina (enzima envolvida na mineralização da matriz óssea) após 7 e 14 dias em uma proporção maior quando comparados com frascos rotatórios, sendo portanto o tipo mais utilizado (GOLDSTEIN, JUAREZ, *et al.*, 2001; PLUNKETT e O'BRIEN, 2011).

II.3 – METABOLISMO ÓSSEO

O osso é uma estrutura porosa mineralizada composta de células, vasos e cristais de fosfato de cálcio (hidroxiapatita). Sua proporção varia de acordo com o tipo de osso e região, e seus componentes estruturais consistem em matriz extracelular (altamente mineralizada), colágeno e células. A remodelação pode ser descrita como o processo no qual o osso é renovado, permitindo a manutenção da forma, qualidade e tamanho do esqueleto. Esta é realizada através da reparação de micro fraturas e da

modificação da estrutura em resposta a tensão e outras forças biomecânicas. Todo o processo é coordenado pela ação de osteoclastos e osteoblastos, organizados em unidades multicelulares ósseas que seguem uma seqüência de eventos de ativação-reabsorção-formação (HADJIDAKIS e ANDROULAKIS, 2006; DATTA, NG, *et al.*, 2008).

Os osteoblastos, responsáveis pela formação óssea, são envoltos pela própria matriz que sintetizam podendo tornar-se osteócitos, células altamente diferenciadas que apresentam atividade de formação óssea muito menor que os osteoblastos (DATTA, NG, *et al.*, 2008; LEE, KIM, *et al.*, 2008). Osteoclastos, em sua maioria, são células multinucleadas altamente diferenciadas provenientes da linhagem monocítica, formadas para reabsorver a matriz óssea. Outras células presentes no microambiente ósseo como monócitos, macrófagos, linfócitos e células endoteliais também contribuem para a remodelação óssea, seja pelo contato direto com células ósseas ou pela secreção de fatores solúveis. A osteoclastogênese é dependente de duas citocinas chaves: RANKL (receptor ativador do fator nuclear – κ B ligante) e M-CSF (fator estimulante de colônias de macrófagos). M-CSF é essencial para a proliferação das células progenitoras de osteoclastos e RANKL controla diretamente o processo de diferenciação através da ativação de RANK (receptor ativador do fator nuclear – κ B) (DATTA, NG, *et al.*, 2008; THEOLEYRE, WITTRANT, *et al.*, 2004; ZHANG, EGAÑA, *et al.*, 2012).

Recentemente, várias células mesenquimais, tais como as embrionárias derivadas da medula óssea, do sangue umbilical, do tecido adiposo, da polpa dentária ou do tecido muscular têm recebido uma atenção especial na área da bioengenharia óssea devido à sua capacidade biológica distinta de se diferenciarem em linhagens osteogênicas (SEON, KIM, *et al.*, 2010; BAPTISTA, SILVA, *et al.*, 2011). Neste contexto, destacam-se as células mesenquimais derivadas dos estroma ósseo, que parecem se diferenciar *in vitro* em osteoblastos, condrócitos ou adipócitos sob

estímulo adequado no meio de cultura. Como exemplo, podemos citar as células STRO+1A derivadas da medula óssea fetal humana, isoladas e caracterizadas como linhagem clonal homogênea e osteogênica (OYAJOB, LOMRI, *et al.*, 1999; AHDJODJ, LASMOLES, *et al.*, 2001). A diferenciação para quaisquer das três linhagens está sob o controle de fatores hormonais e locais. Dexametasona (Dex), proteínas morfogenéticas ósseas (BMP) e vitamina D3 podem induzir células estromais da medula de rato e humana a se diferenciar em células osteoblásticas, demonstrado pela expressão de osteocalcina, fosfatase alcalina e colágeno tipo I (AHDJODJ, LASMOLES, *et al.*, 2001; HENG, CAO, *et al.*, 2004).

A formação óssea ocorre em três fases sucessivas: a produção e maturação da matriz osteóide, seguido da sua mineralização. Inicialmente, os osteoblastos produzem matriz osteóide pela rápida deposição de colágeno. Em seguida há um aumento na taxa de mineralização para alcançar o nível de síntese de colágeno. Na fase final a taxa de síntese de colágeno é reduzida e a mineralização continua até que a matriz osteóide torne-se completamente mineralizada (HADJIDAKIS e ANDROULAKIS, 2006; DATTA, NG, *et al.*, 2008).

Os osteoclastos reabsorvem o osso por acidificação e proteólise da matriz óssea e dos cristais de hidroxiapatita encapsulados. A primeira etapa da reabsorção da matriz óssea é a mobilização dos cristais de hidroxiapatita por digestão da sua ligação ao colágeno. Em seguida, as fibras de colágeno residuais são digeridas por catepsinas ou collagenases ativadas, que são então internalizados pelas células (HADJIDAKIS e ANDROULAKIS, 2006; DATTA, NG, *et al.*, 2008).

A tríade molecular OPG/RANK/RANKL está no centro da coordenação da remodelação óssea. RANKL, expresso na superfície de células pré-osteobásticas, liga-se a RANK, na superfície de células precursoras de osteoclastos. M-CSF, que se liga a seu receptor nas células pré-osteoclásticas, parece ser essencial para o desenvolvimento dos osteoclastos, pois é o determinante primário deste grupo de

células precursoras. Entretanto, RANKL é um fator crítico para a diferenciação, fusão em células multinucleadas, ativação e sobrevivência dos osteoclastos. Ademais, osteoblastos também secretam osteoprotegerina (OPG), um membro solúvel da superfamília do receptor do fator de necrose tumoral que age como um ligante de RANKL impedindo sua interação com o seu receptor RANK. Assim sendo, OPG caracteriza-se como um potente inibidor da diferenciação, sobrevivência e ativação dos osteoclastos *in vitro* e reabsorção óssea *in vivo* (Figura II.2) (THIRUNAVUKKARASU, HALLADAY, *et al.*, 2000).

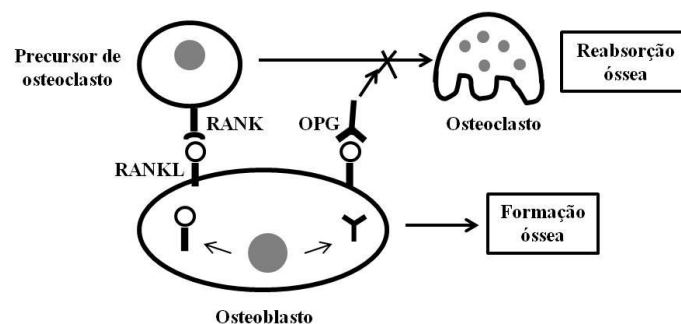


Figura II.2 - Desenho esquemático mostrando o papel da tríade molecular OPG/RANK/RANKL no controle da remodelação óssea. Adaptado de THIRUNAVUKKARASU *et al.*, 2000.

O isolamento e caracterização de componentes celulares e extracelulares da matriz óssea resultaram no desenvolvimento de marcadores moleculares que refletem a formação ou reabsorção óssea. A fosfatase alcalina, por exemplo, secretada por osteoblastos no processo de formação óssea, é responsável pela remoção de fosfatos de muitos tipos de moléculas, incluindo nucleotídeos e proteínas. Sua função exata ainda é desconhecida, mas definitivamente apresenta um papel importante na formação de matriz osteóide e sua posterior mineralização. No osso, o colágeno é sintetizado por osteoblastos, sob a forma de procolágeno. Cerca de 85% das proteínas da matriz óssea são colagênicas, predominantemente do tipo I. Estas moléculas

precursoras são caracterizadas por peptídeos de pequenas extensões terminais: o propeptídio (N-) amino terminal e o propeptídio (C-) carboxi terminal (SEIBEL, 2005).

II.4 – MACRÓFAGOS E BIOMATERIAIS

A interação entre células do sistema imunológico e a superfície de um material, chamada de reação de corpo estranho, acredita-se determinar, ou pelo menos influenciar fortemente, o sucesso ou fracasso de um material implantado. A reação de corpo estranho, composta por macrófagos e células gigantes do tipo corpo estranho (originadas pela fusão de macrófagos), é a última etapa da resposta inflamatória e cicatricial após a implantação de um biomaterial. Esta pode ser dividida em duas fases: uma fase inflamatória imediatamente após o implante, que neutraliza os patógenos e remove tecido danificado, e uma fase de reparação que inclui a cicatrização e reconstituição do local do implante através da regeneração do tecido danificado no local da injúria. Embora as fases de inflamação e cicatrização sejam caracterizadas por uma variedade de tipos de células, incluindo neutrófilos, fibroblastos, células endoteliais e plaquetas, o tipo predominante de célula na superfície de um implante de longo prazo são os macrófagos (ANDERSON, 2001; ANDERSON, RODRIGUEZ e CHANG, 2008; SCHUTTE, PARISI-AMON e REICHERT, 2009).

Os macrófagos estão presentes em todos os tecidos e podem se fundir uns com os outros formando células gigantes, essenciais durante a resposta imunológica a partículas estranhas (VIGNERY, 2005). Estes são capazes de fagocitar partículas, transportá-las para o sistema linfático e apresentá-las às células T, desencadeando reações imunes. Além disso, existem relatos demonstrando a transdiferenciação de macrófagos em osteoclastos na presença de RANKL em tecidos inflamados (RIVOLLIER, MAZZORANA, *et al.*, 2004; LANGE, SCHILLING, *et al.*, 2009).

Uma vez que a biocompatibilidade é reduzida quando biomateriais induzem uma elevada produção de citocinas, a indução da expressão destas pode ser usada para avaliar a intensidade de uma reação imune anti-biomaterial (HUMMEL, CZERLINSKI, *et al.*, 1994; DING, SUN e ZHANG, 2007; DING, SUN e ZHANG, 2009). As citocinas constituem uma rede complexa de proteínas secretadas por inúmeras células inflamatórias e de cicatrização (isto é, linfócitos, macrófagos, monócitos, fibroblastos e neutrófilos), que se ligam a receptores de superfície celulares influenciando o comportamento das mesmas (JONES, CHANG, *et al.*, 2007). Citocinas pró-inflamatórias, tais como interleucina-1 (IL-1), IL-6, e interferon-gama (IFN- γ), podem aumentar a produção de neutrófilos, estimular a proliferação e maturação de linfócitos. Citocinas anti-inflamatórias (isto é, IL-10, IL-4 e IL-13) são capazes de modular os efeitos de citocinas pró-inflamatórias por inibição da produção de citocinas e/ou bloqueio da ligação com receptores na superfície celular (JONES, CHANG, *et al.*, 2007; GORDON, 2003). As principais citocinas envolvidas no processo de reparo tecidual e inflamação estão relacionadas na Figura II.3 (BRODBECK, VOSKERICIAN, *et al.*, 2003).

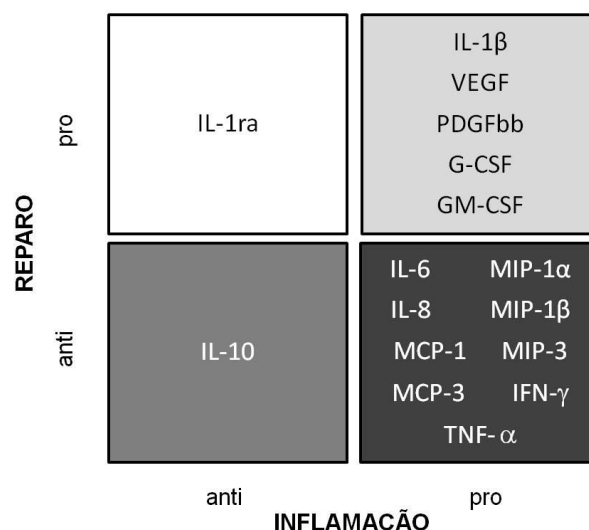


Figura II.3 - Diagrama esquemático do papel de citocinas secretadas por macrófagos nos processos de inflamação e cicatrização. Adaptado de BRODBECK *et al.*, 2003.

Infecções associadas a biomateriais constituem um grave problema clínico que é difícil de tratar e, muitas vezes necessita de substituição do implante. Os agentes patogênicos, geralmente bactérias, podem ser introduzidos na superfície do implante durante a cirurgia e competir com células hospedeiras na tentativa de se integrar. Durante a infecção, os macrófagos detectam as bactérias através de receptores de superfície celular que se ligam a proteínas bacterianas e opsoninas (SUBBIAHDOSS, FERNANDEZ, *et al.*, 2011). Em seguida, estes são ativados e secretam proteínas e citocinas, além de recrutar outras células imunes para o local. Contudo, a presença de um corpo estranho pode prejudicar o sistema imune e, conseqüentemente, números baixos de bactérias aderentes já podem ser suficientes para causar uma infecção (BOELEN, DANKERT, *et al.*, 2000).

Lipopolissacarídeo (LPS), um componente da membrana externa de bactérias Gram negativas, é um potente ativador de monócitos e macrófagos. LPS desencadeia a produção abundante de citocinas. A exposição de macrófagos ao LPS bacteriano inicia uma cascata de transdução de sinais que desencadeia um aumento da produção de nitrito (NO_2^-), a secreção de citocinas pró-inflamatórias, e aumento da atividade bactericida, as quais são características típicas de um macrófago ativado (MENG e LOWELL, 1997).

Jones e colaboradores (2007), através da cultura de macrófagos humanos obtidos a partir de sangue periférico, quantificaram a expressão de citocinas por ELISA (técnica imuno-enzimática) após contato com filmes de polietileno de diferentes químicas de superfície (hidrofóbico, hidrofílico e iônico) por até 10 dias. IL-4 (15ng/ml) foi adicionado nos dias 3 e 7 ao meio de cultura para promover a fusão dos macrófagos. De modo geral, a secreção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e IL-6) foi reduzida com o tempo, enquanto citocinas anti-inflamatórias, como IL-10, aumentaram progressivamente. A resolução da resposta inflamatória foi evidenciada por uma diminuição na secreção de IL-8 e MIP-1 β com o decorrer dos dias (JONES, CHANG, *et al.*, 2007).

Ding e colaboradores (2007) estimularam macrófagos peritoneais de ratos com diferentes extratos de biomateriais de acordo com as normas ISO 10993-12 e a expressão das citocinas TNF- α e IL-1 β foi medido por RT-PCR. Foi observada uma expressão significativamente aumentada por macrófagos não estimulados por LPS após contato com extrato do controle positivo (cloreto de polivinila - PVC contendo 8% de estanho), e politetrafluoroetileno (PTFE), em comparação ao controle negativo (poliestireno de cultura de tecidos - TCPS). A liga metálica NPG também induziu uma produção moderada de citocinas moderada, contudo ácido poli-lático co-glicólico (PLGA), β -TCP, e cimento de fosfato de cálcio (CPC) não induziram uma expressão detectável. Os níveis de TNF- α e IL-1 β aumentaram quando macrófagos estimulados por LPS (1 μ g/mL) entraram em contacto com os extratos dos biomateriais. O controle positivo e PTFE induziram uma elevada expressão das citocinas, enquanto PLGA, NPG, β -TCP e CPC induziram uma expressão moderada. Os resultados mostraram que β -TCP e CPC apresentaram uma boa biocompatibilidade, e CPC foi o mais biocompatível de todos os biomateriais testados (DING, SUN e ZHANG, 2007).

Em outro estudo, os autores cultivaram macrófagos de ratos estimulados por LPS (1 μ g/ml) com extratos dos mesmos biomateriais por 2 horas, onde dosagens de citocinas no sobrenadante da cultura revelaram que a expressão de TNF- α e IL-1 β foi aumentada por PTFE, PLGA e a liga metálica. Células humanas endoteliais da veia umbilical (ECV-304) foram cultivadas com meio de cultura RPMI-1640, e com meio de cultura de macrófagos estimulados por LPS (contendo TNF- α e IL-1 β). Em seguida, foram estimuladas pelos extratos dos biomateriais (1g/5ml de meio por 72 h a 37°C). Os níveis de RNAm (ácido ribonucleico) da proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) foram medidos por RT-PCR em ambos os meios. O nível de MCP-1 das células cultivadas com o sobrenadante de cultura de macrófagos (TNF- α e IL-1 β) foi maior que o das cultivadas com somente meio de cultura expostas aos mesmos extratos dos biomateriais. A expressão de MCP-1 foi maior em todos os grupos de

biomateriais que estavam em contato com as células endoteliais previamente estimuladas por TNF- α e IL-1 β (meio de cultura dos macrófagos). Concluiu-se que a expressão de MCP-1 foi regulada pelo TNF- α e IL-1 β e sua expressão poderia ser utilizada como marcador do grau da resposta imune induzida por biomateriais (DING, SUN e ZHANG, 2009).

Lange e colaboradores (2009) investigaram os efeitos de partículas de HA e β -TCP do mesmo tamanho em células mononucleares de sangue periférico humano *in vitro*. Como controle positivo foi utilizado LPS e zymosan (1 μ g/ml) bacterianos. A produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL1- β , IL-8) e outras envolvidas na diferenciação de células dendríticas em osteoclastos (OPG, RANKL, M-CSF, GM-CSF) foram determinadas por ELISA. Após 6 e 18 horas de incubação, ambos os materiais causaram uma indução muito similar de TNF- α , IL1- β e IL-8. Não foram detectados efeitos sobre a produção do M-CSF e OPG. No entanto, em contraste com HA, β -TCP causou menos indução de GM-CSF, e nenhuma indução de RANKL, ambos conhecidos por promover a proliferação de células dendríticas e osteoclastogênese, respectivamente. Concluiu-se que partículas de β -TCP apresentam uma menor probabilidade de induzir osteoclastos e subsequente reabsorção óssea quando comparada às partículas de HA (LANGE, SCHILLING, *et al.*, 2009).

O mesmo grupo realizou outro estudo no qual foram investigados os efeitos de partículas de β -TCP de diferentes tamanhos (1, 3, 13, 32 e 40 μ m) em monócitos derivados de sangue periférico na secreção de TNF- α , IL-1 β e IL-8 após 6 e 18 h de incubação, bem como os níveis intracelulares em subpopulações determinadas de monócitos após 12 h. β -TCP (1 μ m) não induziu qualquer produção de citocina após 6 h, mas aumentou levemente a produção de TNF- α , IL-1 β e IL-8 após 18 h. Partículas maiores (32 e 40 μ m) induziram níveis mais elevados de citocinas devido a um aumento do número de monócitos produtores. Concluiu-se que um menor tamanho de

partícula inicial do β -TCP induz um perfil de citocinas menos inflamatório quando comparadas com partículas maiores (LANGE, SCHILLING, *et al.*, 2011).

Citocinas foram analisadas a partir de sobrenadantes de monócitos e macrófagos da linhagem monocítica THP-1 (ATCC) cultivados em biomateriais com diferentes químicas de superfície. Inicialmente, 27 citocinas foram analisadas através da tecnologia Luminex, contudo somente nove foram selecionadas para continuar o estudo, a partir das concentrações medidas e papel na reação de corpo estranho: TNF- α , MCP-1, proteína inflamatória de macrófagos-1 α (MIP-1 α), IL-8, IL-1 β , IL-6, fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), IL-1ra, IL-10. Estas foram medidas em sobrenadantes de culturas de monócitos/macrófagos em diferentes fases de ativação (estimulados por LPS – 1 μ g/ml por 24 horas) e diferenciação (estimulados por PMA – 50nM por 72 horas) semeados em polietileno (PE), poliuretano (PU), PTFE, polimetacrilato de metila (PMMA). TCPS e PVC com estanho foram utilizados como controle negativo e positivo, respectivamente. Os resultados mostraram um aumento global das citocinas e na produção do fator de crescimento à medida que os monócitos eram ativados ou diferenciados em macrófagos e que o perfil de citocinas dominante era pró-inflamatório e anti-reparo tecidual. No entanto, a produção de citocinas foi apenas ligeiramente afetada pela química de superfície dos quatro biomateriais testados (SCHUTTE, PARISI-AMON e REICHERT, 2009).

Basicamente, o sistema Luminex baseia-se em microesferas de poliestireno com 5,6 μ m de diâmetro coradas internamente com dois fluorocromos distintos. Através da utilização de quantidades precisas de cada um destes fluorocromos, mais de 100 esferas diferentes são criadas, possibilitando a detecção de vários analitos (DNA, RNA, proteínas ou citocinas alvo) em uma mesma amostra simultaneamente (DUNBAR, 2006).

Além do aspecto inflamatório por si só, mas ainda neste contexto, surgem cada vez mais evidências de uma complexa ligação entre o tecido ósseo e o sistema imune,

e que a inibição da inflamação também apresenta efeitos no osso. Osteoimunologia é um campo emergente de pesquisa dedicado à investigação das interações entre o sistema imunológico e esquelético. Essas interações não são apenas mediadas pela liberação de citocinas, mas também por contato direto célula-célula (CAETANO-LOPES, CANHÃO e FONSECA, 2009). Em geral, citocinas pró-reabsorção, como o fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina 1 (IL-1), controlam o sistema imune essencialmente pela estimulação de M-CSF (aumentando o número de células pré-osteoclásticas) e através de aumento direto da expressão de RANKL (KHOSLA, 2001). A citocina IL-1 apresenta duas formas: IL1- α (liberada por células em apoptose) e IL1- β (produzida por macrófagos), mas sua atividade biológica é indistinguível, induzem a reabsorção óssea. IL-1ra (antagonista do receptor da IL-1) é uma pequena molécula que inibe a atividade biológica da IL-1, ocupando seu receptor tipo I sem suscitar uma resposta de transdução de sinal. Estudos indicaram que IL-10 reduz a secreção das citocinas inflamatórias IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α e GM-CSF por monócitos/macrófagos, aumentando a produção de IL-1ra (TRINDADE, LIND, *et al.*, 2001; LEE, KIM, *et al.*, 2008).

CHAPITRE III (a)

OBJECTIF GÉNÉRAL

Cette thèse a été développée pour évaluer le comportement *in vitro* de cellules ostéoprogénitrices cultivées dans un environnement statique et dynamique sur des pastilles de β -TCP dopées ou non avec du Mg (β -TCMP ; raison Mg/Ca = 0,15). La cinétique de dissolution des biocéramiques immergées dans le milieu de culture cellulaire a été aussi observée à travers la quantification des ions calcium, magnésium et phosphate dans le milieu. De plus, la réponse des macrophages humains après contact avec des extraits de granules de matériaux a été également évaluée, par la quantification des cytokines produites.

CAPÍTULO III

OBJETIVOS

III.1 – GERAIS

O principal objetivo desse trabalho foi avaliar o comportamento *in vitro* de células osteoprogenitoras cultivadas sobre as pastilhas de fosfato tricálcico com e sem magnésio em meio estático e dinâmico. Em adição, foi avaliado também o comportamento de macrófagos humanos *in vitro* após o contato com o extrato dos grânulos dos materiais, obtidos após trituração das pastilhas.

III.2 – ESPECÍFICOS

- Produzir e caracterizar fosfato tricálcico substituído parcialmente por Mg (TCMP);
- Produzir pastilhas de TCP comercial (Merck), e caracterizá-las, sendo este o material referência para comparação dos resultados obtidos com β -TCMP;
- Avaliar a cinética de degradação das pastilhas de β -TCP e β -TCMP em meio de cultura completo (com proteína) e incompleto (sem proteína), sob condições estática e dinâmica, através da detecção de alterações na concentração iônica;
- Avaliar o comportamento (proliferação e diferenciação) de células de linhagem osteoblástica humana *in vitro* sobre as pastilhas dos biomateriais, sob condições estática e dinâmica, via dosagens de proteínas ósseas e análise de imagens celulares;
- Avaliar o perfil de citocinas secretadas por macrófagos humanos *in vitro* após contato com o extrato dos materiais.

CHAPITRE IV (a)

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Production et caractérisation physico-chimique des échantillons

Vu que le phosphate tricalcique ne peut pas être obtenu par précipitation dans une solution aqueuse en raison de son instabilité dans l'eau, il a été synthétisé par frittage à haute température d'une *apatite déficiente en calcium* (SADER, LEGEROS e SOARES, 2009). L'apatite déficiente en calcium dopée au magnésium (ratio Ca/Mg = 0,15) a été obtenue par précipitation dans un milieu aqueux à partir d'une solution aqueuse d'hydroxyde de calcium $[\text{Ca}(\text{OH})_2]$, pur à 96%, Merck] à 1,3 M et de chlorure de magnésium à 2,8 M $[\text{MgCl}_2 \cdot 0,6 \text{ H}_2\text{O}]$, PA, Merck], et d'une deuxième solution d'acide phosphorique à 0,17 M $[\text{H}_3\text{PO}_4]$, pur à 85%, Merck]. Les solutions préparées ont été ajoutées lentement grâce à des pompes péristaltiques dans 50 ml d'eau pendant 3 heures sous agitation mécanique constante, à la température de 39°C et au pH=9, maintenu par l'addition d'une solution d'hydroxyde d'ammonium à 50%. Le produit de la réaction a été maintenu pendant 3 heures dans les conditions de synthèse pour stabiliser la formation de l'apatite. Ensuite, il a été rincé avec de l'eau ultra pure jusqu'au pH de 7, puis mis à sécher dans le four pendant deux jours à 37°C. Finalement, la poudre obtenue a été broyée et tamisée à 125 μm manuellement.

La mise en forme des poudres (du TCP - Merck et de la poudre synthétisée avec du magnésium) sous forme de *pastille* a été assurée par pressage sous vide, à froid. Ensuite, elles ont été frittées à 1150°C pendant 2 heures à l'air (chauffage et refroidissement de 3,3°C/min) puis stérilisées à sec (180°C/1,5 heure).

Les échantillons ont été caractérisés par : diffraction de rayons-X (DRX), spectroscopie d'infrarouge, microscopie électronique à balayage (MEB), microscopie à

force atomique et spectrométrie par émission plasma (ICP). Le dosage des ions calcium, phosphate et magnésium a été effectué après l'immersion des pastilles en environnement statique et dynamique dans le milieu de culture complet (avec addition de 10% de *sérum de veau fœtal*) ou non, grâce à des kits Diasys.

Culture des cellules ostéoprogénitrices en régime statique et dynamique

Des cellules ostéoprogénitrices STRO+1A (inoculation de 5×10^5 cellules/échantillon) ont été cultivées en régime statique et dynamique sur des pastilles de β -TCP et β -TCMP pendant 7, 14 et 21 jours. Leur prolifération et leur différenciation cellulaire ont été vérifiés dans les deux régimes de culture cellulaire. De la dexaméthasone à 10^{-8} M a été ajoutée au milieu de culture afin de stimuler la différenciation ostéoblastique. Pour la condition statique, les cellules ont été cultivées dans des plaques 24 puits. Pour la condition dynamique, les cellules ont été d'abord maintenues pendant 24 heures en condition statique pour atteindre une adhésion complète. Ensuite, les pastilles avec les cellules adhérentes ont été installées dans les bioréacteurs (Figure II.1). Un flux de 0,03 ml/min, la vitesse du fluide interstitiel dans l'os, a été établi entre les bouteilles d'« entrée » et de « sortie » (WANG, UEMURA, *et al.*, 2003).

La méthode du MTT a été utilisée afin de vérifier la viabilité/prolifération cellulaire. La morphologie cellulaire a été observée par MEB et la différenciation cellulaire a été quantifiée par des dosages de l'activité phosphatase alcaline et de la synthèse de pro-collagène de type I.

Culture des macrophages en régime statique

Les macrophages humains ont été isolés à partir de sang périphérique de donneurs sains, et une partie a ensuite été activée par des lipopolysaccharides (LPS)

(10ng/mL pendant 1 heure), activation confirmée par l'augmentation de la concentration en *nitrites* dans le surnageant de culture (MENG e LOWELL, 1997). Les cellules (10^6 cellules/puits) en culture ont été incubées avec des extraits des deux matériaux (sous forme de granules de 250-500 μm) obtenus dans des conditions normalisées (ISO10993-12, 2007).

Après 24, 48 et 72 heures, 100 μL du surnageant de culture ont été recueillis et congelés à -80°C pour la détermination ultérieure des cytokines sécrétées. La quantification de 16 cytokines a été effectuée par la technologie Luminex[®] et les cytokines produites ont été classées en fonction de leur rôle dans la guérison et l'inflammation (Figure II.3).

CAPÍTULO IV

MATERIAIS E MÉTODOS

IV.1. OBTENÇÃO DO β -TCP PURO E DO β -TCMP (Mg/Ca = 0,15)

IV.1a) Síntese do pó

Para a síntese do β -TCMP, os números de mols foram definidos em função da composição desejada, 0,15 mol/L, levando-se em consideração a razão molar (Ca + Mg)/P igual a 1,5.

Visto que o fosfato tricálcico não pode ser obtido por precipitação em meio aquoso devido a sua instabilidade em água, este foi produzido através da calcinação de uma apatita cálcio deficiente (SADER, LEGEROS e SOARES, 2009). A apatita cálcio deficiente substituída por magnésio foi obtida pelo método de precipitação em meio aquoso a partir de uma solução aquosa de hidróxido de cálcio [$\text{Ca}(\text{OH})_2$, 96% puro, Merck] a 1,3mol/L, contendo cloreto de magnésio [$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, P.A., Merck] a 0,17mol/L e ácido fosfórico [H_3PO_4 , 85% puro, Merck] 2,8mol/L. As soluções de cálcio/magnésio e ácido fosfórico foram adicionadas lentamente, com o auxílio de bombas peristálticas, a 50 ml de água durante 3 horas, sob agitação mecânica constante, a 39°C e pH 9, mantido pela adição de uma solução de hidróxido de amônio a 50%. O produto da reação foi deixado em suspensão, com agitação e aquecimento a 39°C constantes por 3 horas (tempo de digestão). Em seguida, este foi deixado somente sob agitação por 24 horas à temperatura ambiente.

O precipitado foi filtrado até alcançar pH 7 com água ultra pura (Purelab UHQ, Elga), e então posto para secar na estufa por dois dias a 37°C. O pó resultante foi triturado em grau de ágata manualmente e peneirado a 125 µm.

IV.1b) Produção das pastilhas e grânulos densos

Tanto o pó da apatita Ca deficiente substituída por Mg quanto o pó comercial do TCP (Merck, puro, Darmstadt, Alemanha) foram peneirados de modo a selecionar a fração < 125 µm.

Foi utilizada uma matriz metálica de 13 mm de diâmetro para obtenção das pastilhas, através de prensagem uniaxial a frio (prensa CARVER), sob tensão compressiva de 216 MPa, lubrificada com ácido oleico. Visando alcançar uma máxima densificação, as mesmas foram sinterizadas a 1150°C por 2 horas em ar (taxa de resfriamento e aquecimento de 3,3°C/min) em forno tipo mufla (Quimis), com a eliminação do ácido oleico durante o aquecimento.

Devido a diferentes níveis de densificação, o diâmetro das pastilhas após sinterização foi também alterado de modo diferenciado para os dois materiais (Figura IV.1), conforme já descrito na literatura (SADER, LEGEROS e SOARES, 2009).

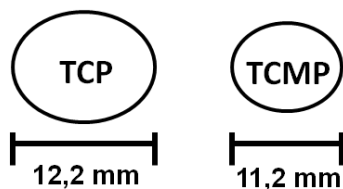


Figura IV.1 – Diagrama esquemático das pastilhas após sinterização, mostrando a diferença no diâmetro (áreas β -TCP = $116,8 \pm 2,2 \text{ mm}^2$; β -TCMP = $98,8 \pm 1,7 \text{ mm}^2$).

Seguindo as diretrizes da norma ISO 10993-12: 2007, para uma aproximação da aplicação clínica dos biomateriais em questão, grânulos densos foram produzidos,

para o ensaio *in vitro* com macrófagos humanos. As pastilhas sinterizadas foram cominuídas manualmente (gral e pistilo) e os grânulos densos resultantes foram peneirados até alcançarem a faixa de 250 a 500 μm .

IV.2. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS MATERIAIS

O microscópio eletrônico de varredura é um equipamento capaz de produzir imagens de alta ampliação e resolução. A morfologia das pastilhas foi observada com auxílio de microscopia eletrônica de varredura - MEV JEOL JSM 6460-LV (Laboratório de Microscopia Eletrônica - PEMM/COPPE/UFRJ).

Microscopia de força atômica (AFM, *atomic force microscopy*), no modo contato intermitente, foi usada para caracterizar a rugosidade média de superfície, R_a , a partir de 3 imagens quadradas (10 X 10 μm) de regiões diferentes de uma mesma amostra. Todas as medidas foram realizadas no IS2M/CNRS, em nanoscópio do tipo AFM Multimode Nanoscope IV.

As percentagens de cálcio, fósforo e magnésio nas duas amostras foram determinadas por espectroscopia de emissão atômica com plasma induzido (ICP, *inductively coupled plasma*, PerkinElmer Optima 3000, USA - EMBRAPA).

A técnica de difração de raios X foi utilizada para determinação das fases cristalinas dos materiais após sinterização. O equipamento usado foi o difratômetro SHIMADZU (XRD 6000), configuração theta-2theta, com raio goniométrico de 185 mm e alvo de cobre (radiação $\text{CuK}\alpha$) do Laboratório Multiusuários do PEMM/COPPE/UFRJ. A faixa angular selecionada foi de 0° a 80° , contudo os difratogramas apresentados mostrarão a faixa de 20° a 40° para facilitar a observação dos picos característicos dos materiais. Os traçados resultantes foram analisados no

programa PCPDFWIN e comparados com a biblioteca de padrões de difração conhecidos (JCPDS, *Joint Committee on Powder Diffraction Standards*).

A técnica de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR, *Fourier transformed infrared spectroscopy*) permite a identificação dos modos de vibração molecular em seus respectivos comprimentos de onda, característicos de cada grupamento químico presente. A análise FTIR (Perkin Elmer, Spectrum 100) foi realizada em pastilhas contendo brometo de potássio (KBr) na seguinte proporção: 0,002g de pó obtido pela trituração das pastilhas sinterizadas, para 0,4g de brometo de potássio (KBr, Merck), no Laboratório Multiusuários do PEMM/COPPE/UFRJ. Os espectros foram obtidos com resolução 4 cm^{-1} , ganho 1, região espectral 4000 a 500 cm^{-1} e 16 varreduras (média).

IV.3. DEGRADAÇÃO DAS PASTILHAS EM MEIO DE CULTURA

IV.3a) Sistemas estático e dinâmico

No ensaio estático, as amostras foram dispostas em placas de 24 poços para cultura celular e incubadas em atmosfera a 37°C/5%CO₂ (Hera Cell, France). Em seguida, essas foram imersas em meio de cultura não completo Iscove (Sigma-Aldrich, EUA) ou completo (suplementado com 10% de soro fetal bovino-SFB) (VWR International, EUA) por 7, 14 e 21 dias, sem trocas de meio durante o experimento.

O ensaio dinâmico foi realizado em um bioreator comercial (Minucells, Alemanha), incubado em atmosfera a 37°C/5%CO₂. As amostras foram imersas em meio de cultura não completo ISCOVE (Sigma-Aldrich, EUA) ou completo (suplementado com 10% de soro fetal bovino) (VWR International, EUA) por 7, 14 e 21 dias, também sem trocas de meio durante o experimento. Uma bomba peristáltica (tipo IPC-N8 de ISMATEC) manteve um fluxo constante de 2mL de meio/hora em todo o

sistema. O sistema era composto de somente uma garrafa (sistema fechado): o meio de cultura completo (ou não) passava pela câmara de cultura contendo somente uma amostra e esse mesmo meio retornava para a câmara de cultura (Figura IV.2). Com a utilização de um sistema fechado dinâmico, foi possível avaliar o efeito do fluxo de meio na degradação das pastilhas. Nos dias pré-determinados a garrafa contendo o meio era aberta no fluxo laminar onde se tirava uma alíquota de 1 mL para posterior dosagem de cálcio, fosfato e magnésio.

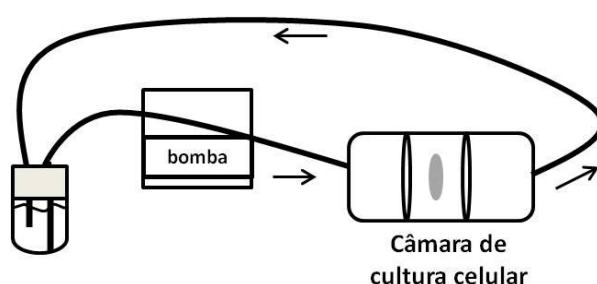


Figura IV.2 - Diagrama esquemático do bioreator em sistema fechado, onde o mesmo meio de cultura circula continuamente através da câmara de cultura.

Todo o sistema era esterilizado antes de cada experimento a 105°C e a 1 Bar em uma autoclave modelo VARIOKLAV do tipo 300/400/500 EP-Z. Já as pastilhas foram esterilizadas em calor seco a 180°C por 1,5 hora.

IV.3b) Morfologia superficial das pastilhas e análise do meio de cultura

As superfícies das pastilhas antes e após imersão no meio de cultura foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) em um microscópio JEOL JSM 6460LV, para verificar a possível formação de cristais de fosfato de cálcio.

A variação da concentração de cálcio, fosfato e magnésio em função do tempo foi determinada através de método colorimétrico utilizando os kits Calcium AS Fluid

Stable e Phosphate Fluid Stable, Magnesium XL Fluid Stable (Diasys, França). As análises dos grupos foram realizadas após 7, 14 e 21 dias no meio de cultura ISCOVE (Sigma-Aldrich, EUA) completo e não-completo, em condição estática e dinâmica.

IV.4. CULTURA DE CELULAS OSTEOPROGENITORAS STRO+1A

IV.4a) Cultura sob condição estática e dinâmica

Células osteoprogenitoras STRO+1A (OYAJOB, LOMRI, *et al.*, 1999) foram cultivadas em meio de cultura do tipo ISCOVE (Sigma-Aldrich, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (VWR International, EUA), 1% de L-glutamina e 1% de penicilina-estreptomicina (Sigma-Aldrich, EUA). Para indução da diferenciação osteoblástica, foi adicionada dexametasona a 10^{-8} M (Sigma-Aldrich, EUA) ao meio, tanto em condição estática quanto dinâmica (HENG, CAO, *et al.*, 2004).

As amostras esterilizadas foram dispostas em placas de 24 poços, recobertas com gel de ágar (2% em água). A densidade de 5×10^3 células foi inoculada sobre as pastilhas e incubadas a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂ por 7, 14 e 21 dias, em condição estática.

Para a condição dinâmica, o sistema era composto de duas garrafas, a primeira contendo meio de cultura ISCOVE completo, e a segunda de saída do meio, após passagem pela câmara de cultura onde estavam três amostras (Figura II.1). Foi inoculada a mesma densidade celular, no entanto as pastilhas foram deixadas 24 horas em condição estática na incubadora a CO₂ para garantir a adesão celular sobre as superfícies das mesmas. Em cada câmara de cultura foi colocada três pastilhas a velocidade de meio de 2mL/h (velocidade do líquido ósseo intersticial) (WANG, UEMURA, *et al.*, 2003). Os tempos de análise foram os mesmos da condição estática.

IV.4b) Avaliação da atividade (proliferação) celular

A atividade celular foi obtida através do método colorimétrico utilizando Methyl-thiazolyl-tetrazolium – MTT (Sigma-Aldrich, EUA). Este método baseia-se na redução do sal tetrazólico dentro das mitocôndrias ativas formando um sal de formazan. Uma solução de 5 mg/mL MTT diluída 10X em tampão fosfato – PBS (Sigma-Aldrich, EUA) foi colocada em contato com as amostras e incubada a 37°C por 3h. Após a retirada do MTT, foi colocado isopropanol (Carlos Erba Reagents, França) em meio ácido (0,3% de HCl) durante 10 min. A absorbância foi lida a 570 nm pelo leitor de placa ELISA – ELX800UV (Bio-Tech Instruments, EUA). A quantificação das células viáveis sobre as pastilhas foi efetuada indiretamente pela observação da sua atividade mitocondrial, através de uma correlação linear (curva padrão) entre a absorbância e a concentração de células STRO+1A (de 1×10^3 a 5×10^3 células/mL). O número de células em cada tempo de cultura foi ajustado de acordo com a superfície as pastilhas (área) e foi expresso como células/mm².

Em ambas as condições estática e dinâmica, as células foram fixadas para a análise da morfologia celular e grau de confluência por MEV. As amostras, para cada tempo de cultura, foram rinsadas com tampão fosfato PBS, e fixadas em solução Karnovsky (4,0% formaldeído, 2,5% gluteraldeído em tampão PBS) por 24 horas. Após fixação, as células foram rinsadas em um tampão NaK₂P 0,175% por três horas (com trocas a cada 1 hora) e desidratadas por banhos sucessivos de soluções alcólicas com as seguintes concentrações: 50, 70, 80, 95 e 100% (dois banhos de 5 minutos para cada concentração alcoólica). Em seguida, as células foram imersas em uma solução etanol/hexametildisilano (HMDS, Sigma) 50:50 (vol/vol) por 30 min, e após em HMDS 100% por 30 min. O HMDS foi retirado e as amostras foram deixadas sob exaustão por 24 horas, para evaporar todo o restante de HMDS ainda presente no interior das células. As amostras foram metalizadas com ouro e examinadas em MEV.

IV.4c) Avaliação da diferenciação osteoblástica

As amostras foram permeabilizadas com 0,5% de triton X-100 e incubadas em solução tampão alcalina de p-nitrofenilfosfato como substrato (20mM p-nitrofenilfosfato + 100mM dietanolamina 98% + 10mM $MgCl_2$, pH9.5) durante 30 minutos a 37°C. A reação enzimática foi finalizada pela adição de 0,1M ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) em uma solução de 1M de hidróxido de sódio. A atividade enzimática foi medida pela absorbância a 405nm no leitor de ELISA – ELX800UV (Bio-Tech Instruments, EUA), ou seja, pela determinação colorimétrica do p-nitrofenol (produto da hidrólise do p-nitrofenilfosfato). Todos os reagentes utilizados durante o procedimento experimental foram provenientes da Sigma-Aldrich. Finalmente, a atividade da fosfatase alcalina foi calculada a partir uma curva padrão de p-nitrofenilfosfato (de 50 a 3200 nmol/L), e os resultados foram expressos em nanomols de p-nitrofenol (PNP) produzido por 10^4 células (nmol PNP/ 10^4 céls).

A dosagem de colágeno (pro-colágeno I - PIP) no meio de cultura foi realizada através de um ensaio imunoenzimático colorimétrico com o kit Procollagen Type I C-Peptide (PIP) da empresa TAKARA (cat#MK101, França), de acordo com as instruções do fabricante. A absorbância foi lida a 450nm pelo leitor de ELISA – ELX800UV (Bio-Tech Instruments, EUA). A quantidade de colágeno foi calculada a partir uma curva padrão de PIP contido no kit (de 10 a 640 ng/mL), e os resultados foram expressos em picogramas de PIP por 10^4 células (pgPIP/ 10^4 céls). Os valores obtidos foram normalizados pelo dado referente a quantidade de células em cada tempo de cultura proveniente do ensaio MTT, e expressos como pgPIP/ 10^4 céls.

IV.5. CULTURA DE MACRÓFAGOS HUMANOS

Esta parte do estudo foi realizada no Laboratório de Microbiologia Oral da Faculdade de Odontologia (USP – Bauru, SP). Monócitos foram isolados do sangue

periférico humano de voluntário saudável por método de centrifugação por gradiente de densidade. Resumidamente, o sangue (10-15 mL) foi diluído 1:2 com meio RPMI 1640 incompleto (Gibco, Brasil), adicionado em Ficoll-Paque 1083, e centrifugado a 400xg durante 28 min. As células mononucleares resultantes foram lavadas três vezes com 15 volumes de meio RPMI 1640 frio por centrifugação a 350xg durante 10 min a 4°C. O precipitado de células foi ressuspenso em 1 mL de meio RPMI 1640 contendo L-glutamina e 10% de soro fetal de bovino e cultivadas durante 7 dias com fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos - GM-CSF (104 U/mL; Sigma, Brasil). As células não aderentes foram descartadas por lavagem com solução tampão PBS em 24 h de cultura. Os macrófagos foram semeados em placas numa densidade de 10^5 células por poço. Uma parte dos macrófagos foi ativada pela adição de LPS (10ng/mL; Sigma, Brasil) durante 1 h, seguido por lavagem com PBS três vezes para remover quaisquer resíduos de LPS.

A ativação foi verificada pela determinação dos níveis de nitrito no sobrenadante da cultura de macrófagos, que é um metabolito estável de radicais de óxido nítrico, reconhecidamente produzido por macrófagos ativados (MENG e LOWELL, 1997). Após a exposição a LPS, 100 µL do sobrenadante de cultura foi adicionado a um igual volume de reagente de Griess (1% sulfanilamida, 0,1% de N-1-naftil-etilenodiamina, ácido fosfórico a 2,5%) numa placa de microtitulação estéril, e a absorvância foi registada a 540 nm. Os níveis de nitrito foram calculados a partir de uma curva padrão de NaNO_2 com concentrações conhecidas (de 1,6 a 200 µM).

IV.5a) Inoculação do extrato dos grânulos densos

Primeiramente, foi obtido o extrato dos grânulos esterilizados (180°C/1,5h) na faixa de 250-500 µm, pela incubação de 1 grama de cada amostra em 10mL de meio de cultura RPMI sem soro fetal bovino em incubadora com 5% de CO_2 a 37°C por 24

horas, de acordo com norma padrão ISO (ISO10993-12, 2007). O extrato consiste no meio de cultura adicionado à parte solúvel do material. O meio de cultura RPMI dos macrófagos (densidade de 1×10^6 células) na placa de cultura foi substituído pelo extrato e o SFB foi acrescido de modo a atingir uma concentração final de 10%. Após 24 horas, 48 e 72 horas coletou-se 100 µl de sobrenadante da cultura, que foram armazenados em freezer a -80°C para dosagem posterior das citocinas secretadas. Como grupo controle cultivou-se os macrófagos com meio RPMI suplementado com SFB. O ensaio foi realizado em triplicata para cada material/tempo e condição (macrófago ativado e não ativado).

IV.5b) Dosagem de citocinas secretadas

Os sobrenadantes armazenados foram analisados para detecção de citocinas no Luminex. Inicialmente, um kit de 16 citocinas foi utilizado (G-CSF, IL-1β, IL-6, IL-8, IL-1ra, MCP-1, MCP-3, MIP-1α, MIP-1β, MIP-3α, TNF-α, PDGF-bb – fator de crescimento derivado de plaquetas, VEGF – fator de crescimento endotelial vascular, IL-10, IFN-γ, GM-CSF) para rastrear potenciais citocinas que poderiam ser secretadas. Dentre essas, apenas as 11 primeiras foram selecionadas para posterior análise baseando-se nas concentrações medidas e no seu papel no processo inflamatório. O ensaio foi realizado de acordo com as instruções do fabricante com todos os reagentes do kit (Kit Procarta Cytokine Assay da Panomics, EUA). Foi feito um pool das amostras em triplicata e, em seguida, executados em duplicata para a medição das citocinas no Luminex. Concentrações da amostra (pg/mL) foram determinadas a partir da intensidade média de fluorescência em comparação com uma curva padrão de quatro ou cinco parâmetros gerada a partir de padrões de concentrações conhecidas contidos no kit. Os valores obtidos foram normalizados pelo dado referente a quantidade de citocinas produzidas pelo grupo controle,

cultivado com meio de cultura suplementado com soro fetal bovino em placa de poliestireno de cultura de tecidos (TCPS).

IV.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizada uma análise descritiva a partir do cálculo da média e desvio-padrão em cada grupo. Em seguida, utilizou-se o teste de Kolmogorov-Smirnov para análise da distribuição normal. Após a identificação da normalidade dos dados, aplicou-se a análise de variância do tipo ANOVA a um critério (one-way) e o teste de Tukey: diferenças com $p < 0,05$ foram consideradas significativas. Todo o estudo quantitativo envolvendo células foi realizado em triplicatas de ensaio.

CHAPITRE V (a)

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Caractérisation physico-chimique des échantillons

Les valeurs des rapports $(Ca + Mg)/P$ et Mg/Ca du β -TCMP ont été définies comme 1,45 et 0,14 par ICP, respectivement. Le rapport molaire $(Ca+Mg)/P$ du β -TCP a été défini comme 1,38, aussi par ICP. L'interaction cellule-matériau est fortement influencée par la rugosité et la topographie de la surface du substrat (PONCHE, BIGERELLE e ANSELME, 2010). Vu que les deux pastilles pressées possèdent des valeurs de rugosité de surface similaires (Figure V.1), on considère que seule la chimie est variable entre les matériaux.

Les pics de diffraction (Figure V.2) observés pour la pastille de TCP (2θ : 31,05, 34,43 et 27,84°) correspondent à ceux du β -TCP (fiche JCPDS n°09-0169), tandis que les pics de la pastille synthétisée à partir de la poudre dopée (2θ : 31,31, 34,8 e 28,13°) correspondent à ceux du β -TCMP (fiche JCPDS n°87-1582). L'incorporation du magnésium dans la structure du TCP est démontrée par le déplacement à droite des pics des diagrammes DRX (selon les angles 2θ). Ceci traduit une substitution partielle du Ca par le Mg qui provoque une contraction de la cellule unitaire suivie d'une stabilisation de sa structure (TARDEI, GRIGORE, *et al.*, 2006). Les spectres FTIR (Figure V.3) montrent, pour les deux types de matériaux, les bandes d'adsorption relatives aux groupements PO_4 caractéristiques des phosphates tricalciques (GIBSON, REHMAN, *et al.*, 2000; SADER, LEGEROS e SOARES, 2009).

Dissolution des pastilles

a) En régime statique

La Figure V.4 montre la variation de la concentration en Ca après l'immersion des pastilles de β -TCP et de β -TCMP dans le milieu de culture complet (MC) ou non (MNC) pendant 7, 14 et 21 jours. Il a été constaté que la présence de protéines modifie l'échange ionique de l'ion calcium pour les deux matériaux. Ce fait peut être expliqué par la complexation d'ions dissous dans le milieu de culture avec des groupes fonctionnels des protéines (KANDORI, MASUNARI e ISHIKAWA, 2005). La libération supérieure de Ca par des pastilles de β -TCMP peut être associée à sa bioactivité, un concept récemment relié à la disponibilité des ions dans l'environnement osseux et promouvant la formation de l'os par les ostéoblastes (GUTH, CAMPION, *et al.*, 2011).

La présence des protéines n'a pas modifié la concentration des ions PO_4 dans le milieu de culture ni pour le β -TCP ni pour le β -TCMP (Figure V.5). La libération des ions Mg a été vérifiée dans le MC et le MNC, et augmente avec le temps (Figure V.6).

Des études ont rapporté que le Mg pouvait diminuer la cristallinité de l'apatite et augmenter la solubilité des phosphates de calcium à cause d'une substitution partielle du Ca dans le réseau cristallin (MARCHI, DANTAS, *et al.*, 2007; JIA, ZHOU, *et al.*, 2010). Bien que nous n'ayons pas observé une réduction de la cristallinité du β -TCMP, une plus grande libération de Ca et de Mg à partir du β -TCMP a été vérifiée par rapport au β -TCP.

b) En régime dynamique

La présence des protéines n'a pas modifié l'échange ionique du Ca dans l'environnement dynamique, pour les pastilles de β -TCMP. Dans le cas du β -TCP, un changement du comportement a été observé après 21 jours d'immersion dans le MNC (Figure V.8). Comme ce comportement n'a pas été vérifié en régime statique, on peut

conclure que la vitesse du milieu de culture change probablement le taux de dissolution des pastilles.

En ce qui concerne les ions $(\text{PO}_4)^{3-}$ (Figure V.9), en général, la présence de protéines ne modifie pas l'échange ionique après 21 jours d'immersion dynamique, contrairement à ce qui est observé en régime statique. De plus, il semble que le flux de milieu de culture

favorise le maintien des ions $(\text{PO}_4)^{3-}$ dans le milieu, vu qu'une précipitation de $(\text{PO}_4)^{3-}$ est observée en régime statique.

La libération des ions Mg dans le milieu a été observée à partir de 14 jours d'immersion dans un environnement dynamique alors qu'en régime statique la libération commence dès 7 jours (Figure V.10). Le flux de milieu de culture est probablement responsable de la différence de comportement observé.

Culture des cellules ostéoprogénitrices en régime statique et dynamique

Le nombre de cellules observées sur les surfaces des deux matériaux était le même à la fin de la période de culture (21 jours), que ce soit en régime statique ou dynamique (Figure V.12).

Dans un environnement statique, on n'a pas trouvé de différences significatives de l'activité phosphatase alcaline, entre les deux types de matériaux au même temps de culture. Par contre, en régime dynamique, une augmentation de l'activité phosphatase alcaline des échantillons de β -TCMP a été observée à tous les temps de l'étude, suggérant que la présence de magnésium n'a pas inhibé la différenciation ostéoblastique (Figure V.16). De plus, les pics d'activité phosphatase alcaline pour les deux échantillons étaient à 21 jours et à 7 jours de culture, en régime statique et dynamique, respectivement. Cela suggère que les forces de cisaillement, le transport

de masse et d'oxygène grâce au passage d'un flux constant de milieu accélère la production de l'enzyme.

Concernant la synthèse de collagène (Figure V.17), une production supérieure est observée sur le β -TCMP par rapport au β -TCP à 7 et 14 jours de culture, suggérant que la présence de Mg peut stimuler la formation du tissu osseux. Toutefois, le système dynamique augmente de façon significative la synthèse de collagène à tous les temps de l'étude (Tableau V.5). Lors de la différenciation ostéoblastique, les cellules expriment différents facteurs (phosphatase alcaline, collagène de type I, ostéopontine, etc.) qui participent à la formation du tissu ostéoïde (la matrice organique de l'os) puis à sa minéralisation (SHU, MCMULLEN, *et al.*, 2003; LIAN e STEIN, 1992). Donc, d'une façon générale, la stimulation des cellules par le passage d'un flux constant de milieu de culture promeut l'expression du phénotype ostéoblastique.

Culture des macrophages en régime statique

L'analyse des données actuelles est limitée en raison d'un possible effet cytotoxique sur les macrophages en culture des extraits des biomatériaux. En effet, une production supérieure de cytokines peut refléter aussi un plus grand nombre de cellules viables. Afin de comparer effectivement la production de cytokines, le nombre de macrophages viables dans toutes les conditions établies reste à évaluer avant la publication de ces résultats.

D'après la Figure V.19, les macrophages non-activés produisent surtout des cytokines anti-inflammatoires et pro-guérison, un résultat similaire à celui trouvé par Schutte et al. (2009), qui ont évalué la production de cytokines par des macrophages non-activés après contact avec différents matériaux. Lors de l'analyse du ratio pro-anti, il n'y a pratiquement aucune différence entre les biomatériaux, ce qui suggère que le β -TCP dopé avec du Mg ne modifie pas la réponse biologique des macrophages. Par

ailleurs, le graphique montre que la production de cytokines du groupe témoin (TCPS) est supérieure à celle des biomatériaux, mais cette augmentation reste à valider par le calcul de la viabilité cellulaire, comme expliqué ci-dessus.

En ce qui concerne la guérison (Figure V.20), le profil anti prédomine pour le β -TCMP et le groupe témoin (TCPS), tandis que le β -TCP montre un profil pro-cicatrisant. Par rapport à l'inflammation, les deux matériaux montrent un profil anti-inflammatoire, tandis que le TCPS a une tendance vers l'équilibre pro-anti. Bien qu'ils présentent le même profil lorsqu'on considère la quantité de cytokines produites, il y a une différence entre les deux matériaux, indiquant que le β -TCP dopé avec du Mg, par la modification de ses propriétés physico-chimiques par exemple, affecte différemment la réponse des macrophages.

Les biomatériaux analysés ont induit plutôt un profil anti-inflammatoire, c'est à dire que des macrophages activés par LPS exposés aux biomatériaux ont une production inhibée de cytokines inflammatoires. Ceci peut être mis en rapport avec le fait que les infections liées à l'implantation des biomatériaux sont difficiles à traiter. En effet, des études antérieures ont montré que les cellules immunitaires peuvent tout à fait perdre leur capacité à éliminer des bactéries en présence de biomatériaux (SUBBIAHDOSS, FERNANDEZ, *et al.*, 2011; WATANABE, ICHIKI, *et al.*, 2007).

CAPÍTULO V

RESULTADOS E DISCUSSÃO

V.1. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS MATERIAIS

A partir da análise pelo método ICP, a razão molar (Ca+Mg)/P do β -TCMP foi definida como sendo 1,45 e a razão Mg/Ca foi de 0,14, dados próximos dos valores teóricos [(Ca+Mg)/P = 1,5; Mg/Ca = 0,15]. Já para o β -TCP, a razão molar (Ca+Mg)/P foi de 1,38.

Verificou-se que o grau de compactação dos pós foi diferente. As pastilhas de β -TCMP exibiram uma contração volumétrica maior após a sinterização quando comparado ao β -TCP, refletida no diâmetro reduzido das pastilhas de β -TCMP (11,2 mm) quando comparada ao β -TCP (12,2 mm). A Figura V.I mostra as micrografias eletrônicas das superfícies de (a) β -TCP e (b) β -TCMP após sinterização a 1150°C, assim como a rugosidade média superficial medida no microscópio de força atômica. As amostras apresentaram valores de rugosidade muito próximos, 96 ± 18 nm para o β -TCP e 105 ± 29 nm para o β -TCMP, sem diferença significativa.

Um fator importante na interação célula-material é a rugosidade e topografia da superfície (TAKAMORI, CRUZ, *et al.*, 2008; PONCHE, BIGERELLE e ANSELME, 2010). Superfícies nanoestruturadas (irregularidades menores que 100 nm), são geralmente considerado benéficas para adesão e crescimento celular, enquanto que superfícies microestruturadas apresentam um comportamento mais controverso (por exemplo, podem dificultar o espreadamento e proliferação das células, mas favorecer a diferenciação, particularmente em células osteogênicas) (BACAKOVA, FILOVA, *et al.*, 2011). Considerando que as pastilhas em questão apresentam valores de rugosidade

muito próximos, foi possível considerar como variável somente a química dos materiais.

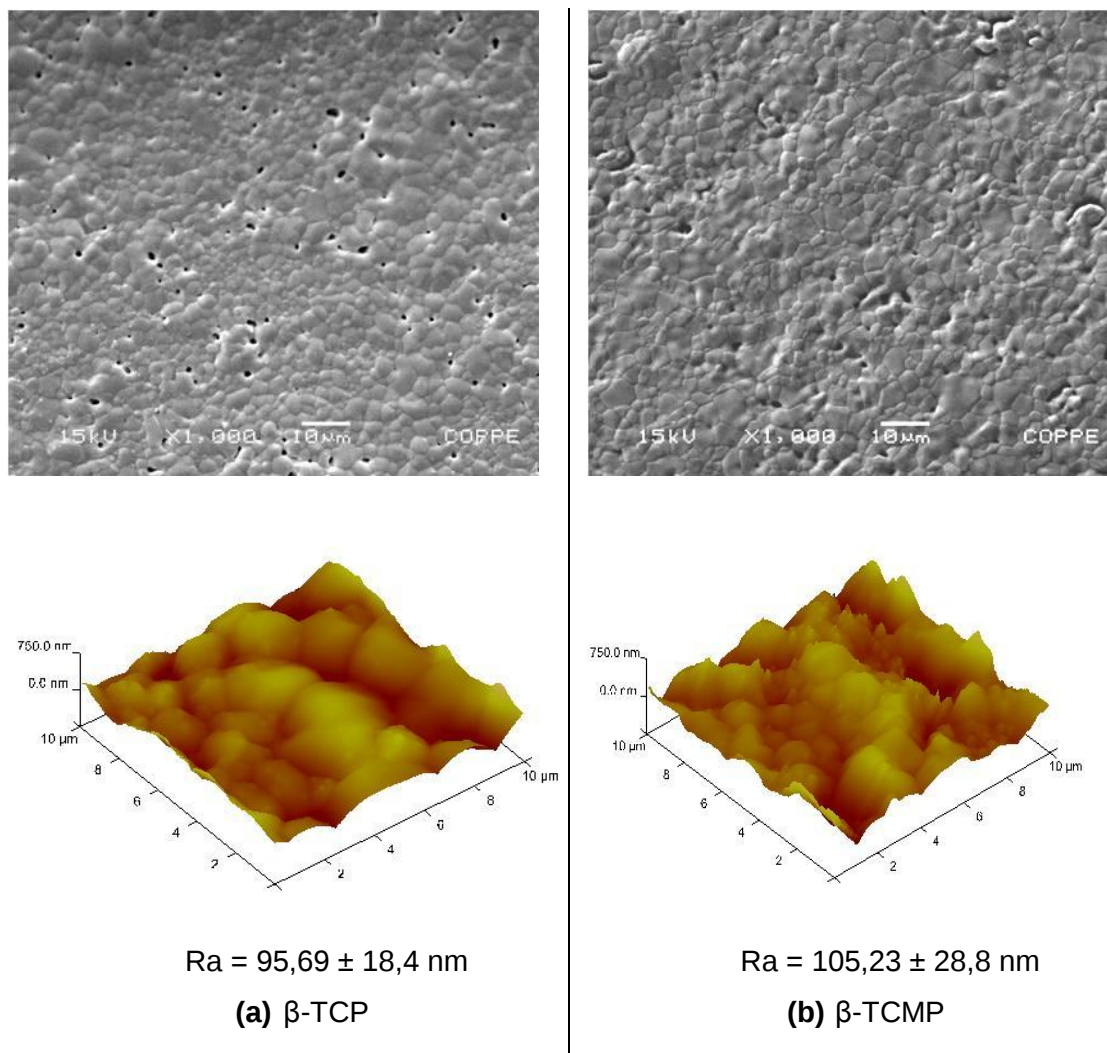


Figura V.I - Micrografia eletrônica (MEV; aumento 1000X) e perfis 3D/rugosidade média (AFM) da superfície das pastilhas de β -TCP e β -TCMP após sinterização a 1150°C/2h.

Parte das pastilhas foram trituradas para a obtenção de grânulos que foram utilizados nos ensaios com os macrófagos humanos, segundo as diretrizes da norma ISO 10993-12:2007. De modo geral, o aumento da área superficial específica de biomateriais reabsorvíveis associada com uma redução do tamanho dos grânulos pode facilitar a sua dissolução, em função do aumento da área de superfície em

contato com o fluido tissular no local da implantação (MURAKAMI, HONDA, *et al.*, 2010). Deste modo, também visando a eliminação da variável área de superfície, os grânulos de ambos os materiais foram peneirados selecionando a faixa de 250-500 μ m. Mais uma vez, somente a variável química dos materiais permanece para a análise biológica.

A Figura V.2 mostra os difratogramas de raios X de ambos os materiais sinterizados. O padrão de difração obtido a partir do fosfato tricálcico comercial apresenta picos de difração intensos em 2θ : 31,05, 34,43 e 27,84°, correspondendo à ficha 09-0169 JCPDS do β -TCP. Já o padrão de difração do fosfato tricálcio substituído parcialmente por Mg confirmou a presença do β -TCMP (ficha 87-1582 JCPDS) através da identificação de picos intensos em 2θ : 31,31, 34,8 e 28,13°.

A incorporação de Mg na estrutura do TCP refletiu-se no deslocamento dos picos no difratograma (evidenciado pelos ângulos 2θ), devido à substituição parcial de Mg-por-Ca, causando uma contração na dimensão da célula unitária e estabilização da estrutura. Este efeito pode ser atribuído ao menor raio iônico do Mg (0,65 Å) em relação ao Ca (0,99 Å): substituições por íons de menor dimensão levam a uma deformação na rede cristalina, favorecendo sua contração e, ao mesmo tempo, a estabilização da estrutura (TARDEI, GRIGORE, *et al.*, 2006).

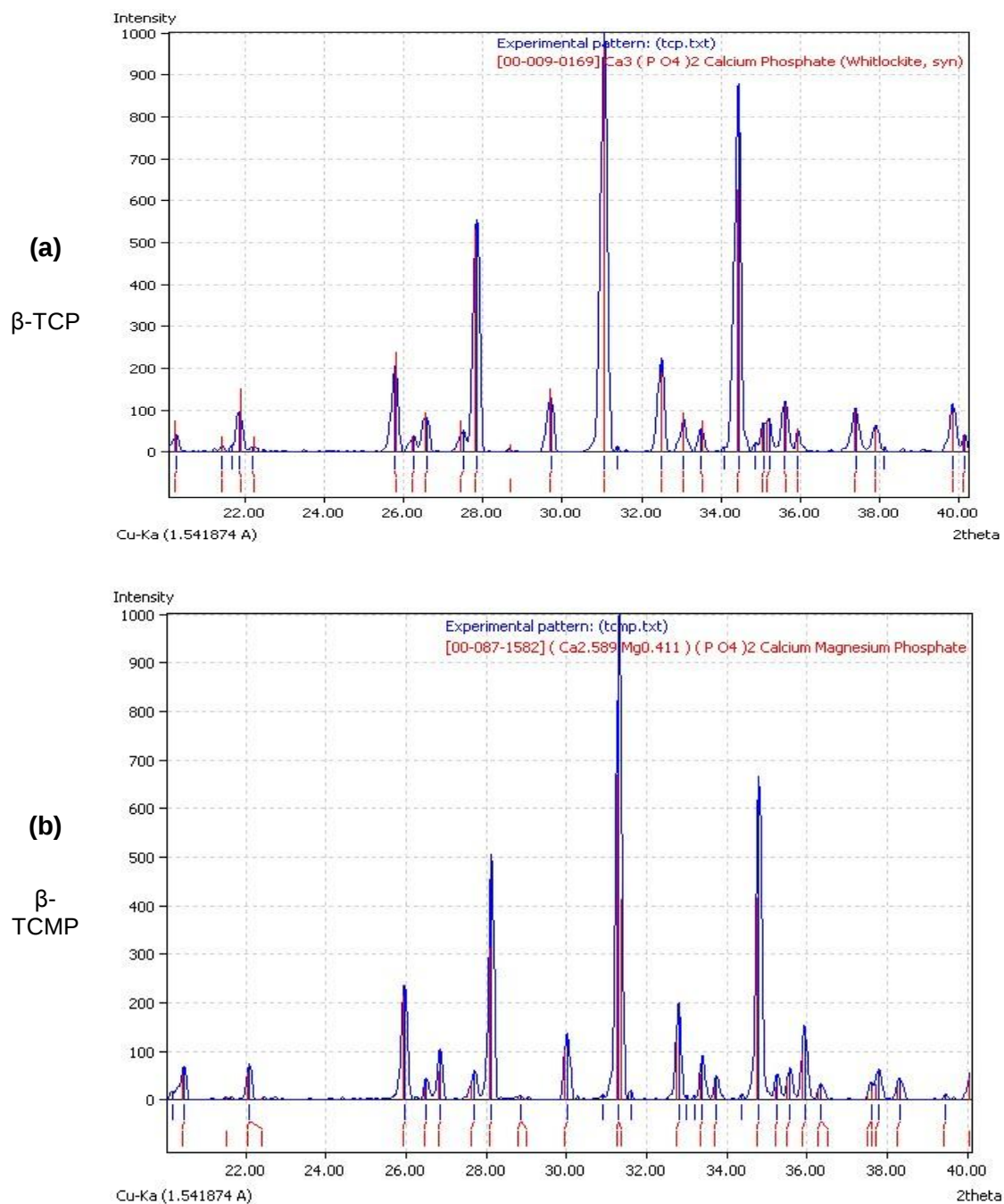


Figura V.2 - Difractogramas do β -TCP (ficha 09-0169 JCPDS – programa PCPDFWIN) e β -TCMP (ficha 87-1582 JCPDS – programa PCPDFWIN) após sinterização a 1150°C/2h.

Os espectros de FTIR (Figura V.3) do β -TCP e β -TCMP após sinterização mostram bandas de fosfato a 1126 e 1025 (ν_3) cm^{-1} , bem como em 604 e 554 (ν_4) cm^{-1} .

¹ para ambos os materiais, características de fosfatos tricálcico (GIBSON, REHMAN, *et al.*, 2000; SADER, LEGEROS e SOARES, 2009).

Esses resultados em conjunto indicam que foram produzidas pastilhas monofásicas com composição β -TCP e β -TCMP e rugosidade superficial similar.

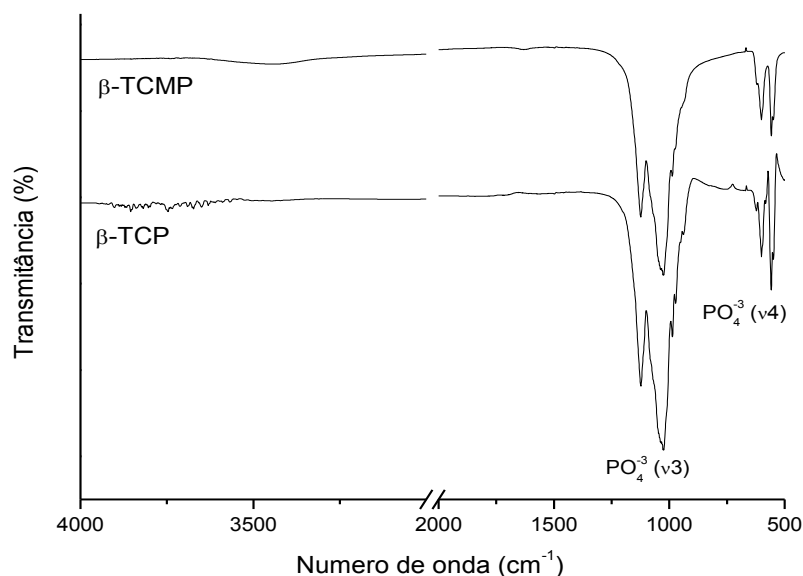


Figura V.3 - Espectros de FTIR do β -TCP e β -TCMP após sinterização a 1150°C.

V.2. DEGRADAÇÃO DAS PASTILHAS EM MEIO DE CULTURA

Foi determinada a variação da concentração de cálcio, fosfato e magnésio em função do tempo de imersão das pastilhas de β -TCP e β -TCMP em meios de cultura não completo (MNC) e completo (MC) em condições estática e dinâmica (sistema fechado - 2mL/h). Os dados foram expressos como a concentração dos íons no meio subtraída da concentração inicial no meio ISCOVE. Assim sendo, valores positivos refletem uma liberação de íons das pastilhas para o meio e valores negativos uma

precipitação destes sobre as pastilhas. Em adição, a superfície das pastilhas foi verificada ao MEV e AFM ao fim de 21 dias para verificar a formação de cristais de fosfato de cálcio e alterações na rugosidade superficial.

V.2a) Análise em condição estática

A Figura V.4 apresenta a variação na concentração de Ca^{2+} após imersão das pastilhas de β -TCP e β -TCMP em MNC e MC por 7, 14 e 21 dias. Tanto para as amostras de MNC quanto para as de MC em contato com β -TCP, verificou-se uma precipitação de Ca durante todo o período estudado, com tendência significativa de redução dessa precipitação ao fim de 21 dias (MNC).

Quanto às amostras de MNC em contato com β -TCMP, verificou-se uma liberação gradativa de Ca^{2+} ao longo do período de imersão ($p < 0,05$). Já nas amostras de MC para o β -TCMP, inicialmente verificou-se uma precipitação de Ca^{2+} (7 dias), porém ao fim de 21 dias há uma liberação de Ca^{2+} .

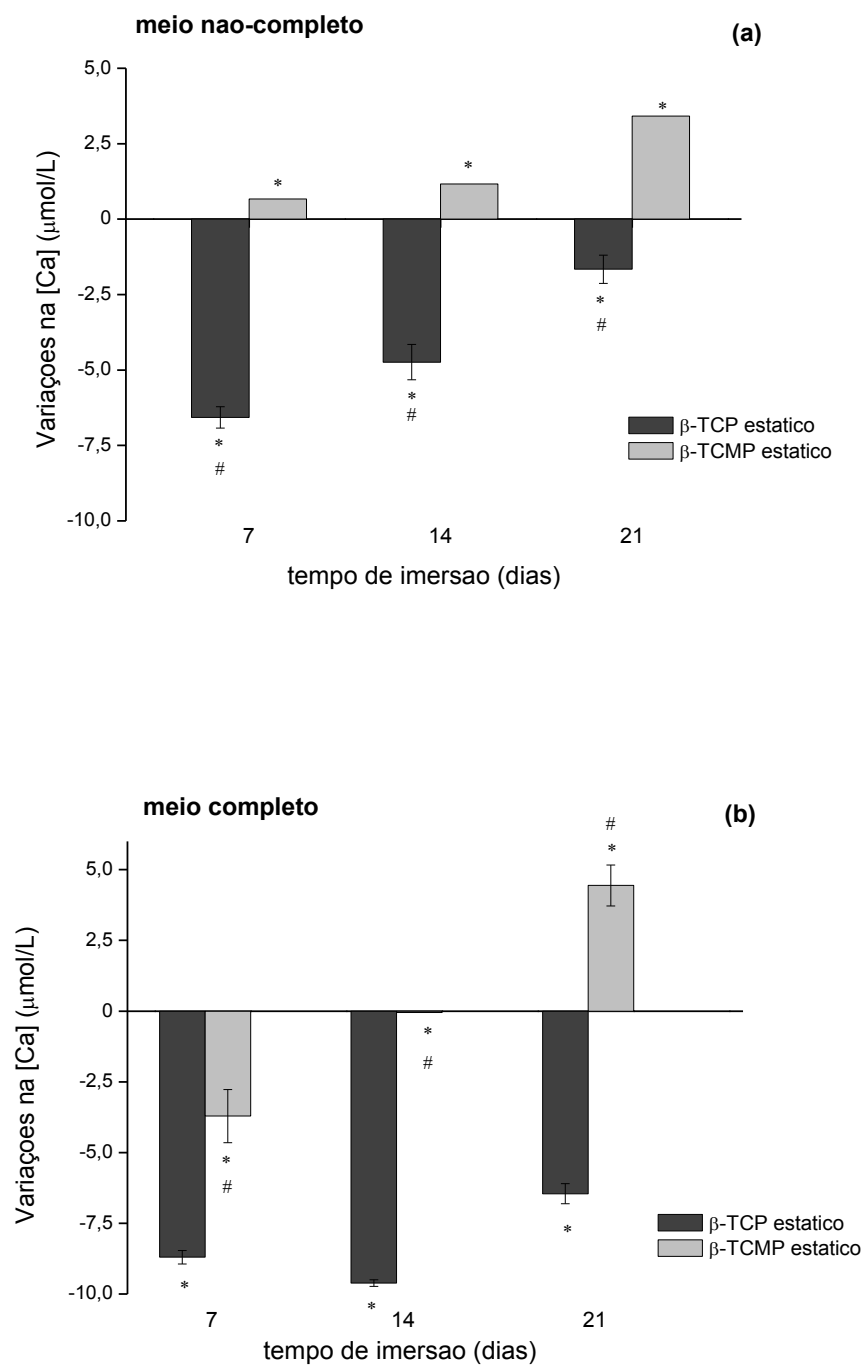


Figura V.4 - Alteração na concentração média de íon Ca em amostras sob condição estática de meio de cultura em contato com pastilhas de β -TCP e β -TCMP em (a) MNC e (b) MC. Diferença significativa ($p < 0,05$; ANOVA) entre os tempos (* - mesma amostra) e entre as amostras (# - mesmo tempo); liberação de Ca da pastilha para o meio (+); precipitação de Ca na pastilha a partir do meio (-).

Assim sendo, ficou evidenciado que a presença de proteínas influencia a dinâmica de dissolução do íon Ca^{2+} em meio estático, para ambos os materiais. No caso do β -TCP, houve precipitação mais intensa no MC, já para o β -TCMP, no MC foi observada uma precipitação inicial de Ca^{2+} (7 dias), ao contrário do comportamento em MNC. Contudo, o β -TCMP apresentou de modo geral um perfil de liberação de Ca^{2+} ao fim de 21 dias, principalmente em MNC.

O comportamento observado de maior redução do íon Ca^{2+} no MC, ou seja, na presença de proteínas, já foi reportado anteriormente, e explicado pela complexação de íons dissolvidos a grupos funcionais das proteínas, reduzindo a sua detecção no meio (KANDORI, MASUNARI e ISHIKAWA, 2005).

A maior liberação de Ca^{2+} pelas pastilhas de β -TCMP pode favorecer sua bioatividade, conceito associado a disponibilidade de íons no meio favorecendo a deposição óssea por osteoblastos na região do implante (GUTH, CAMPION, *et al.*, 2011).

A Figura V.5 apresenta a variação na concentração de $(\text{PO}_4)^{3-}$ após imersão das pastilhas de β -TCP e β -TCMP em MC e MNC por 7, 14 e 21 dias. Para as amostras de MNC em contato com β -TCP, verificou-se uma precipitação de $(\text{PO}_4)^{3-}$ durante todo o período estudado. Já nas amostras de MC para o β -TCP, houve também precipitação durante todo o período, com aumento significativo dessa ao fim de 21 dias.

Quanto às amostras de MNC em contato com β -TCMP, verificou-se também uma precipitação de $(\text{PO}_4)^{3-}$, que aumentou ao longo do período de imersão. Já nas amostras de MC para o β -TCMP, observou-se o mesmo comportamento.

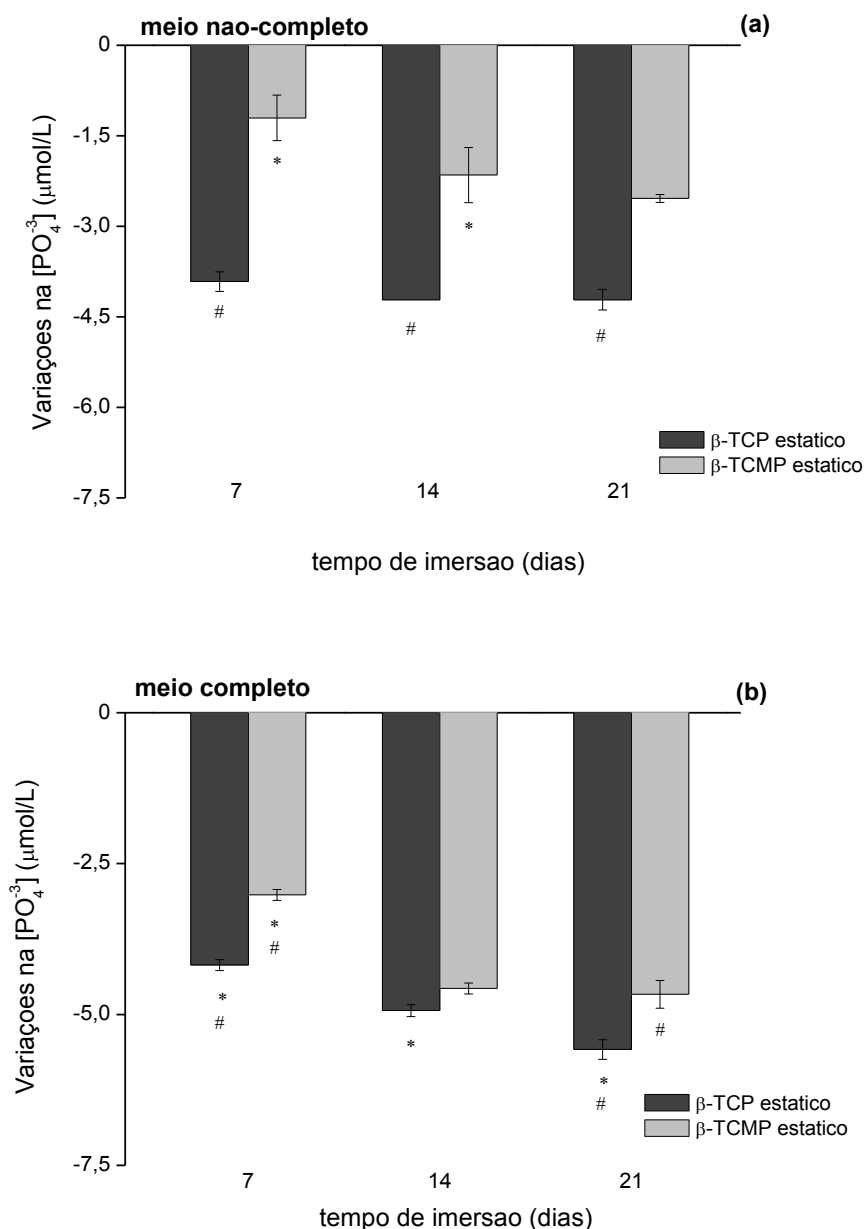


Figura V.5 - Alteração na concentração média de íon $(\text{PO}_4)^{3-}$ em amostras sob condição estática de meio de cultura em contato com pastilhas de β -TCP e β -TCMP em (a) MNC e (b) MC. Diferença significativa ($p < 0,05$; ANOVA) entre os tempos (* - mesma amostra) e entre as amostras (# - mesmo tempo); liberação de $(\text{PO}_4)^{3-}$ da pastilha para o meio (+); precipitação de $(\text{PO}_4)^{3-}$ na pastilha a partir do meio (-).

Quanto à dinâmica de dissolução do íon $(\text{PO}_4)^{3-}$, de modo geral, a presença de proteínas não exerceu influência em meio estático, visto que para ambos os materiais e condições foi observado um comportamento de precipitação. Entretanto,

comparando-se o β -TCP e o β -TCMP, o primeiro apresentou uma precipitação de $(\text{PO}_4)^{3-}$ mais acentuada em ambos os meios (MC e MNC), diferença esta maior no MNC ($p < 0,05$). Os resultados estão de acordo com o estudo descrito por Guth e colaboradores (2011) em pastilhas de HA-Si e HA incubadas em MC e MNC por até 28 dias, onde também verificaram uma redução da concentração de íons $(\text{PO}_4)^{3-}$ disponíveis nos meios analisados.

Apesar de vários estudos envolvendo biocerâmicas de fosfato de cálcio parcialmente substituídas haverem detectado certo grau de dissolução dos materiais, deve-se determinar a taxa de liberação do íon dopado, e uma discussão acerca dos níveis que devem ser alcançados para obtenção de um efeito terapêutico deve ser estimulada (BOHNER, 2009). Isto porque a possibilidade de que a liberação de Ca^{2+} , e não do íon dopante, ser responsável pelo possível resultado biológico positivo deve ser considerada, uma vez que os íons Ca^{2+} são conhecidos por apresentarem um forte efeito sobre as células ósseas, em particular os osteoblastos (DVOARK, SIDDIQUA, *et al.*, 2004). Uma análise da degradação dos materiais avaliada somente pela liberação de Ca^{2+} e $(\text{PO}_4)^{3-}$ não pressupõe a liberação do íon dopante da rede cristalina (BOHNER, 2009). Neste ponto, torna-se importante verificar a liberação do Mg^{2+} no meio para então associar o efeito da incorporação deste ao resultado biológico observado.

A Figura V.6 apresenta a variação na concentração de Mg^{2+} após imersão das pastilhas de β -TCMP em MC e MNC por 7, 14 e 21 dias. Para as amostras de MNC e MC em contato com β -TCMP, verificou-se uma liberação de Mg^{2+} durante todo o período estudado, com aumento significativo ao fim de 21 dias.

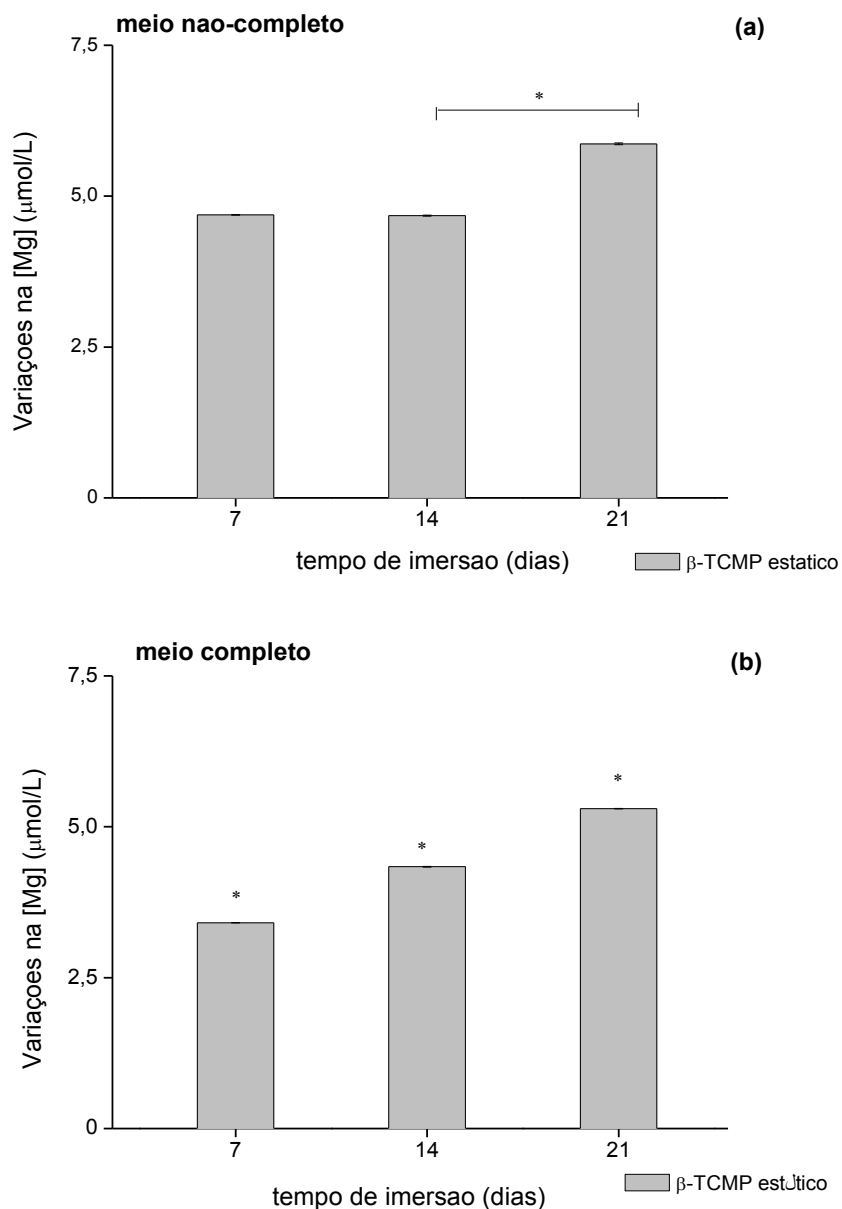


Figura V.6 - Alteração na concentração média de íon Mg em amostras sob condição estática de meio de cultura em contato com pastilhas de β -TCMP em (a) MNC e (b) MC. Asteriscos indicam diferença significativa ($p < 0,05$; ANOVA) entre os tempos (* - mesma amostra); liberação de Mg da pastilha para o meio (+).

Quanto à dissolução de íons Mg^{2+} , comprovou-se a sua liberação independente da presença de proteínas (MNC e MC), que aumentou com o passar dos dias de incubação. Estudos relataram que o Mg^{2+} poderia diminuir a cristalinidade da apatita e assim aumentar a solubilidade de fosfatos de cálcio, quando substituindo parcialmente

o Ca na rede cristalina (MARCHI, DANTAS, *et al.*, 2007; JIA, ZHOU, *et al.*, 2010). Apesar de não ter sido observada uma diminuição na cristalinidade do β -TCMP quando comparado ao β -TCP, através dos dados aqui reportados, verificou-se uma maior liberação de Ca^{2+} e Mg^{2+} do β -TCMP, assim como uma menor sorção de $(\text{PO}_4)^{3-}$ do β -TCMP em relação ao β -TCP.

De acordo com Monteiro e colaboradores (2003), o processo de dissolução-precipitação de fosfatos de cálcio é cíclico e rápido, podendo ser dividido em três etapas. Na primeira (30 minutos), a dissolução é muito intensa e predomina sobre a precipitação de novas fases de fosfato de cálcio. No intervalo de 30-80 min, a taxa de precipitação aumenta e equilibra-se com a dissolução. Depois, a precipitação de nova fase de fosfato de cálcio predomina na cinética de dissolução/precipitação (MONTEIRO, CAMPOS DA ROCHA, *et al.*, 2003). Isso sugere uma cinética mais lenta de dissolução-precipitação para o β -TCMP, já que o menor tempo deste estudo foi de 7 dias e o processo dissolução-precipitação se inicia em questão de minutos, ou ainda a ocorrência de mais de um ciclo deste processo dinâmico.

Na verdade, substitutos ósseos de fosfato de cálcio são mecanicamente frágeis (DOROZHKIN, 2007). Assim, parece que a melhor estratégia para o reparo de um defeito ósseo é favorecer uma rápida neoformação óssea na região do defeito, implicando na substituição completa do biomaterial por osso neoformado (BOHNER, 2009).

Após 21 dias de incubação em MC e MNC, verificou-se a formação de cristais de apatita sobre a superfície de ambas as pastilhas, conforme exemplificado na Figura V.7. As micrografias mostraram que a capacidade de induzir a formação de apatita foi similar entre as biocerâmicas, independente da presença de proteína no meio, ao término do período de incubação. Em adição, a Tabela V.1 apresenta os valores de rugosidade (R_a) média para β -TCP e β -TCMP após 21 dias de imersão em MC e MNC

sob condição estática. Não houve diferença significativa na rugosidade superficial das pastilhas após os testes de degradação.

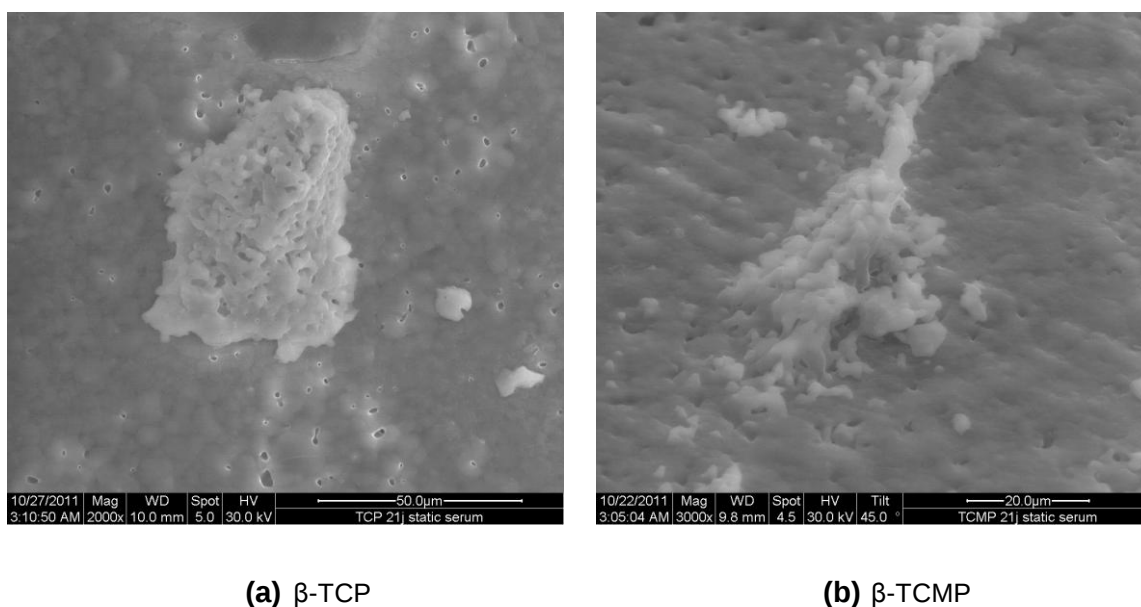


Figura V.7 - Micrografia das superfícies das pastilhas de β -TCP e β -TCMP após 21 dias de incubação em MC sob condição estática. As imagens das outras superfícies são similares às aqui apresentadas.

Tabela V.1 - Rugosidade das superfícies de β -TCP e β -TCMP medida por AFM após 21 dias de imersão em meio não completo (MNC) e meio completo (MC) sob condição estática. “Controle” corresponde ao tempo zero, ou seja, antes da imersão.

Pastilhas	Meio não-completo	Meio completo
	Ra (nm)	Ra (nm)
β -TCP controle	95,7 $\pm$ 18,4	
β -TCP após 21 dias	92,0 $\pm$ 11,4	95,2 $\pm$ 20,2
β -TCMP controle	105,2 $\pm$ 28,8	
β -TCMP após 21 dias	98,4 $\pm$ 11,1	79,8 $\pm$ 12,1

V.2b) Análise em condição dinâmica

Apesar da eliminação da variável quantidade de meio de cultura nos ensaios estáticos e dinâmicos através da fórmula química $C=m/v$ (C = concentração; m =massa;

v=volume), já que o kit utilizado nos fornece a concentração e o volume é um dado pré-determinado em ambos os casos, a quantidade de íons ofertada no início do experimento por pastilha permanece diferente (maior em condição dinâmica), não permitindo uma comparação fidedigna com o sistema estático. Outro aspecto que dificulta a comparação dos dois sistemas diz respeito aos materiais utilizados para a fabricação do bioreator. No sistema estático a degradação foi efetuada em placas de 24 poços de poliestireno e no caso do biorreator utilizou-se câmara de teflon e tubos de silicone. Apesar de ambos serem polímeros, ensaios em recipientes diferentes, na geometria e material, podem influenciar a cinética de precipitação de fosfatos de cálcio (MARQUES, 2003).

A Figura V.8 apresenta a variação na concentração de Ca^{2+} após imersão das pastilhas de β -TCP e β -TCMP em MC e MNC por 7, 14 e 21 dias. Para as amostras de MNC em contato com β -TCP, verificou-se uma precipitação de Ca^{2+} até 14 dias, em 21 dias o comportamento observado foi de liberação. Já nas amostras de MC para o β -TCP, houve também precipitação durante todo o período.

Quanto às amostras de MNC em contato com β -TCMP, verificou-se uma precipitação de Ca^{2+} ao longo do período de imersão, mesmo comportamento observado em MC.

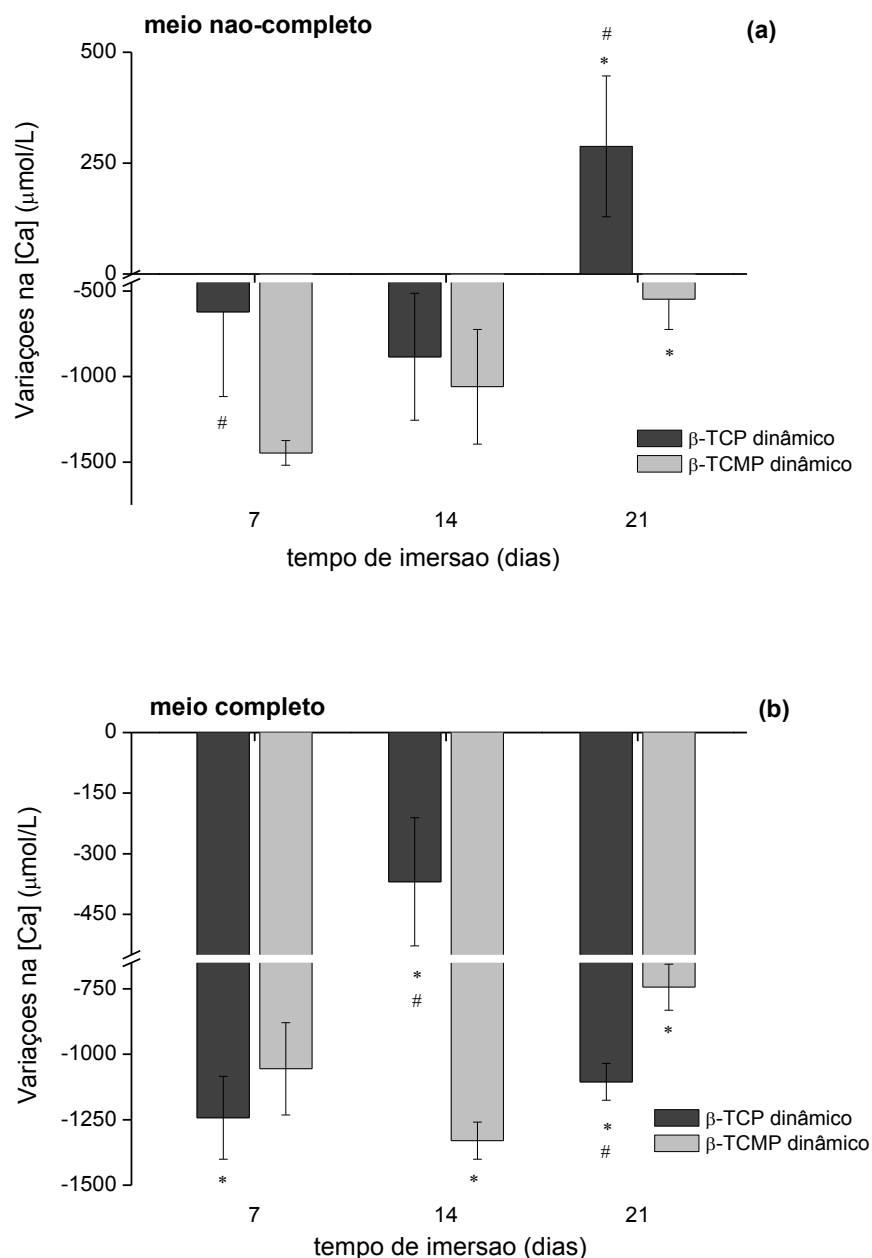


Figura V.8 - Alteração na concentração média de íon Ca em amostras sob condição dinâmica de meio de cultura em contato com pastilhas de β -TCP e β -TCMP em (a) MNC e (b) MC. Diferença significativa ($p < 0,05$; ANOVA) entre os tempos (* - mesma amostra) e entre as amostras (# - mesmo tempo); liberação de Ca da pastilha para o meio (+); precipitação de Ca na pastilha a partir do meio (-).

Assim sendo, de modo geral, a presença de proteínas não influenciou a dinâmica de dissolução do íon Ca^{2+} em meio dinâmico para o β -TCMP, já que não

houve alteração no perfil de precipitação observado. No caso do β -TCP, houve mudança de comportamento em 21 dias no MNC. Esta evidência é oposta à observada em meio estático, onde efetivamente a presença de proteínas alterou a troca iônica pastilha-meio, sugerindo um efeito da velocidade do fluxo de meio de cultura no grau de dissolução das pastilhas.

Da Silva e colaboradores (2010) monitoraram as variações nas concentrações de cálcio e fosfato de meio de cultura completo e incompleto em contato com pastilhas de HA e HA-Si, sob condição estática e dinâmica por até 14 dias. Não houve diferença na concentração de cálcio em nenhuma das condições/pastilhas analisadas, contudo os autores utilizaram um sistema dinâmico aberto, ou seja, com troca constante do meio de cultura. Deste modo, duas variáveis estão presentes: reposição de meio novo e o fluxo do mesmo, limitando uma comparação de resultados.

A Figura V.9 apresenta a variação na concentração de $(\text{PO}_4)^{3-}$ após imersão das pastilhas de β -TCP e β -TCMP em MC e MNC por 7, 14 e 21 dias. Para as amostras de MNC em contato com β -TCP, verificou-se uma liberação de $(\text{PO}_4)^{3-}$ durante todo o período estudado. Já nas amostras de MC para o β -TCP, houve predomínio de liberação de $(\text{PO}_4)^{3-}$, com pontual precipitação em 14 dias. Quanto às amostras de MNC e MC em contato com β -TCMP, verificou-se uma liberação de $(\text{PO}_4)^{3-}$ nos meios.

Quanto à dinâmica de dissolução do íon $(\text{PO}_4)^{3-}$, verificou-se que a presença de proteínas, de modo geral, não exerce influência em meio dinâmico, ao final de 21 dias de imersão. O comportamento observado em meio dinâmico foi o oposto do meio estático: nesse último não houve influência do tipo de meio (MC ou MNC) na troca iônica, porém observou-se precipitação ao invés de liberação. Finalmente, parece que a imersão dinâmica, ou seja, o fluxo de meio de cultura favorece a liberação de $(\text{PO}_4)^{3-}$ no meio.

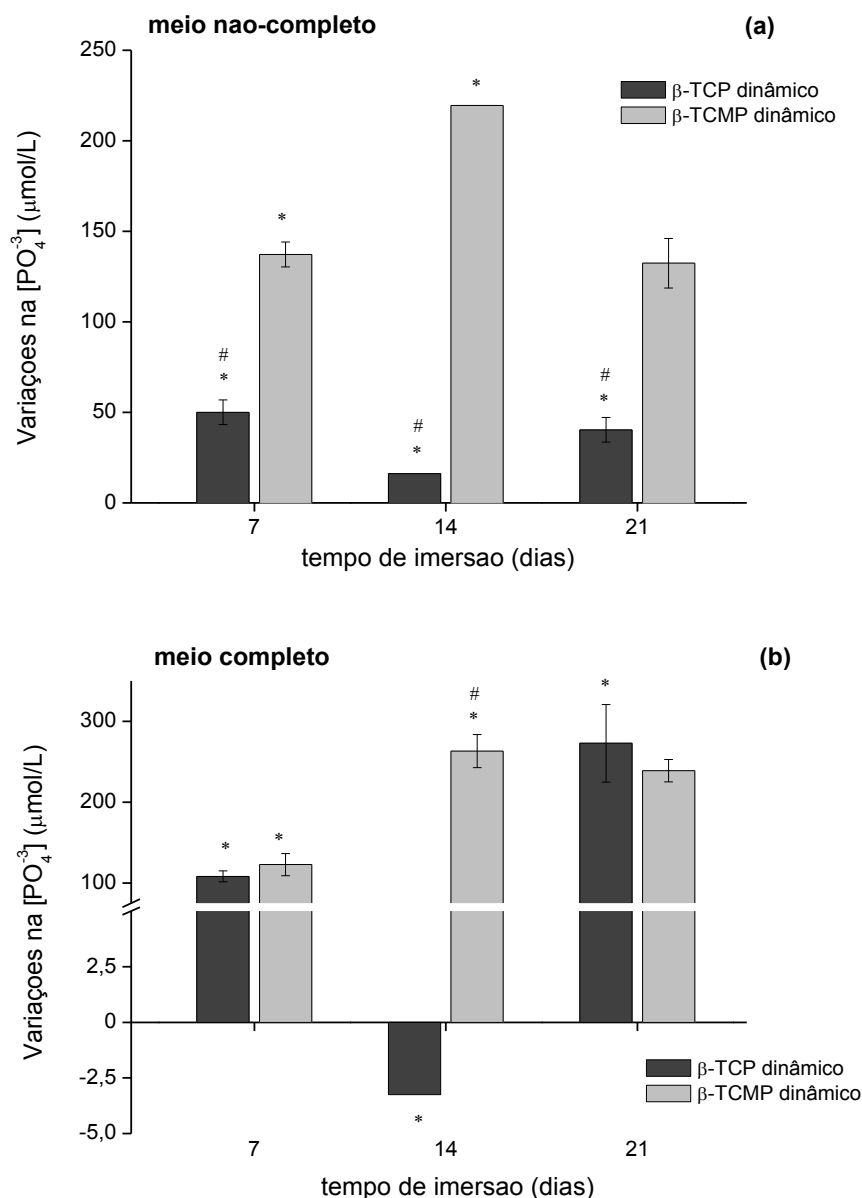


Figura V.9 - Alteração na concentração média de íon $(\text{PO}_4)^{3-}$ em amostras sob condição dinâmica de meio de cultura em contato com pastilhas de β -TCP e β -TCMP em (a) MNC e (b) MC. Diferença significativa ($p < 0,05$; ANOVA) entre os tempos (* - mesma amostra) e entre as amostras (# - mesmo tempo); liberação de $(\text{PO}_4)^{3-}$ da pastilha para o meio (+); precipitação de $(\text{PO}_4)^{3-}$ na pastilha a partir do meio (-).

A Figura V.10 apresenta a variação na concentração de Mg^{2+} após imersão das pastilhas de β -TCMP em MC e MNC por 7, 14 e 21 dias. Para as amostras de MNC, verificou-se uma precipitação inicial de Mg^{2+} (7 dias), seguida de liberação no meio até

21 dias. Em MC, observou-se praticamente o mesmo comportamento, em 7 dias não houve mudança na concentração iônica de Mg^{2+} em relação a quantidade inicial, seguida de liberação a partir de 14 dias. Parece que a presença de proteínas em ambiente dinâmico favorece uma liberação mais rápida de magnésio para o meio.

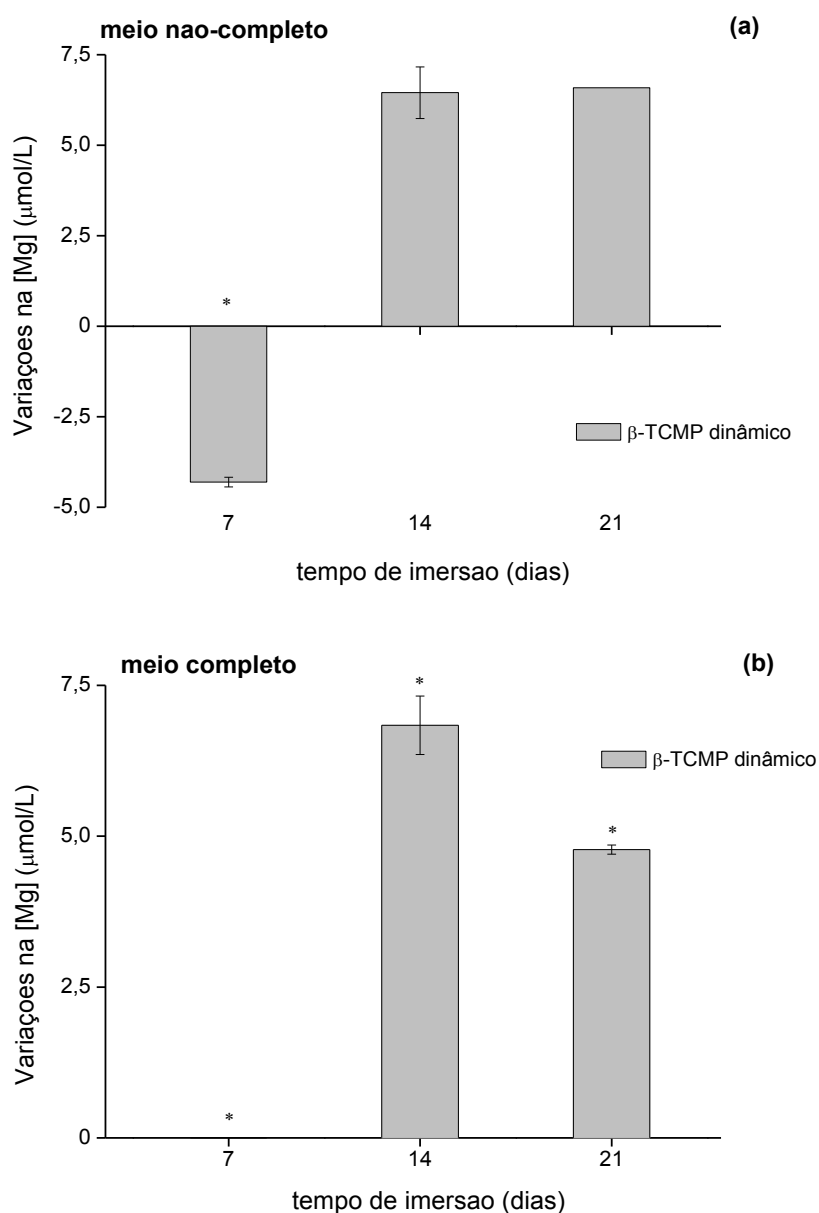


Figura V.10 - Alteração na concentração média de íon Mg em amostras sob condição dinâmica de meio de cultura em contato com pastilhas de β -TCMP em (a) MNC e (b) MC. Asteriscos indicam diferença significativa ($p < 0,05$; ANOVA) entre os tempos (* - mesma amostra); liberação de Mg da pastilha para o meio (+); precipitação de Mg na pastilha a partir do meio (-).

Quanto à dissolução de íons Mg, comprovou-se a sua liberação independente da presença de proteínas (MNC e MC), em ambiente estático. Em ambiente dinâmico também foi comprovada a liberação de magnésio, contudo somente a partir de 14 dias, independente do tipo de meio. Isso sugere que o fluxo de meio influencia a troca iônica de Mg pastilha-meio. Esta diferença torna-se relevante quando da análise da resposta biológica inicial (até 7 dias) de osteoblastos em contato com pastilhas deste biomaterial.

Após 21 dias de incubação em MC e MNC, verificou-se a formação de cristais de apatita sobre a superfície de ambas as pastilhas, conforme exemplificado na Figura V.11. As micrografias mostraram a formação de apatita para ambos os materiais após 21 dias, independente da presença de proteína no meio, mesmo comportamento observado em condição estática. Em adição, a Tabela V.2 apresenta os valores de rugosidade (Ra) média para β -TCP e β -TCMP após 21 dias de imersão em MC e MNC sob condição dinâmica. De modo geral, não houve diferença significativa na rugosidade superficial das pastilhas, exceto para o β -TCP em meio completo, onde se verificou um aumento significativo da rugosidade, sugestivo de dissolução ou intensa precipitação na pastilha. Contudo, os valores finais de Ca e $(\text{PO}_4)^{3-}$ sugerem a prevalência da dissolução.

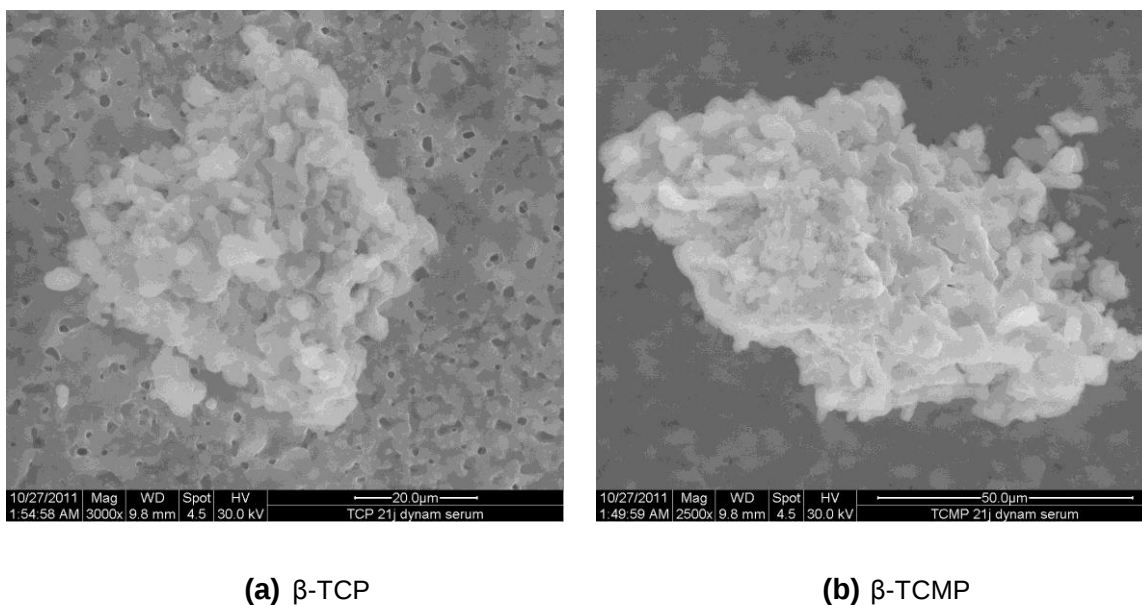


Figura V.11 - Micrografia das superfícies das pastilhas de β -TCP e β -TCMP após 21 dias de incubação em MC sob condição dinâmica. As imagens das outras superfícies são similares às aqui apresentadas.

Tabela V.2 - Rugosidade das superfícies de β -TCP e β -TCMP medida por AFM após 21 dias de imersão em meio não completo (MNC) e meio completo (MC) sob condição dinâmica. “Controle” corresponde ao tempo zero, ou seja, antes da imersão.

Pastilhas	Meio não-completo	Meio completo
	Ra (nm)	Ra (nm)
β -TCP controle	95,7 $\pm$ 18,4	
β -TCP após 21 dias	100,27 $\pm$ 6,24	212,83 $\pm$ 12,4 *
β -TCMP controle	105,2 $\pm$ 28,8	
β -TCMP após 21 dias	95 $\pm$ 11,3	76,7 $\pm$ 12,2

* ($p < 0,05$) na comparação entre β -TCP controle e após 21 dias em MC

V.3 CULTURA DE CELULAS STRO+1A SOBRE AS PASTILHAS

V.3b) Análise da proliferação celular em condições estática e dinâmica

Em condição estática (Figura V.12), inicialmente o número de células nas amostras de β -TCMP foi maior ($p < 0,05$). Contudo, ao fim do período estudado (21

dias), a densidade celular sobre as superfícies das pastilhas foi a mesma. Em adição, ao observar o perfil da curva de proliferação celular, tornou-se evidente que para o β -TCP a confluência celular foi alcançada em 14 dias, ao contrário do verificado para o β -TCMP, onde a proliferação celular apresenta perfil ascendente até 21 dias.

Já em condição dinâmica (Figura V.12), verificou-se uma inversão do comportamento em ambiente estático: inicialmente o número de células nas amostras de β -TCP foi maior ($p < 0,05$). Porém, mais uma vez, ao fim do período estudado (21 dias), a densidade celular sobre as superfícies das pastilhas foi a mesma. Em contrapartida, ao observar o perfil da curva de proliferação celular, ambas as amostras apresentaram perfil ascendente até 21 dias.

Os resultados obtidos estão de acordo com o estudo de Sader e colaboradores (2009), que relataram uma maior proliferação celular em condição estática sobre pastilhas de β -TCMP (Mg/Ca = 0,2 mol) por até 7 dias quando comparado ao β -TCP. As observações ao MEV das células cultivadas sobre as superfícies das pastilhas corroboram os dados de densidade celular obtido pelo ensaio do MTT (Figuras V.13, V.14 e V.15). Ainda, verificou-se visualmente a formação de matriz extracelular e certo grau de mineralização em ambas as pastilhas após 21 dias de cultura celular.

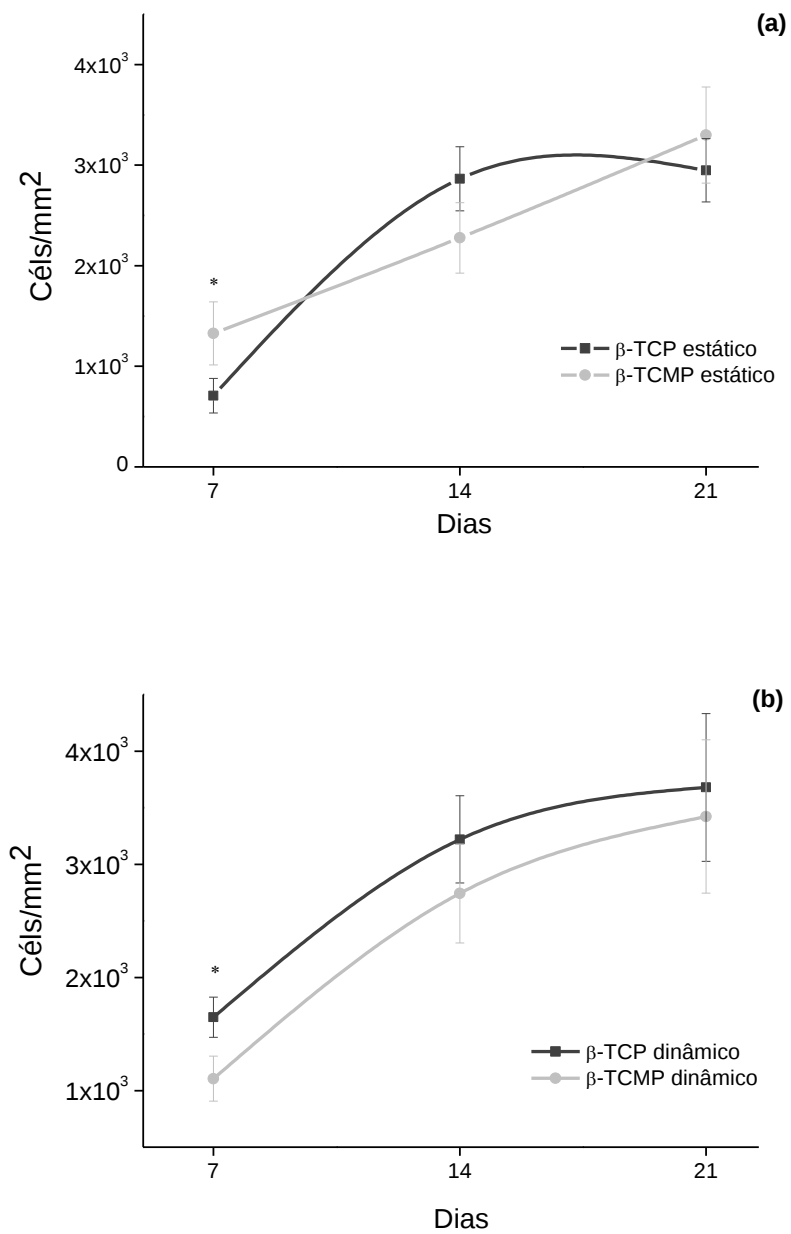
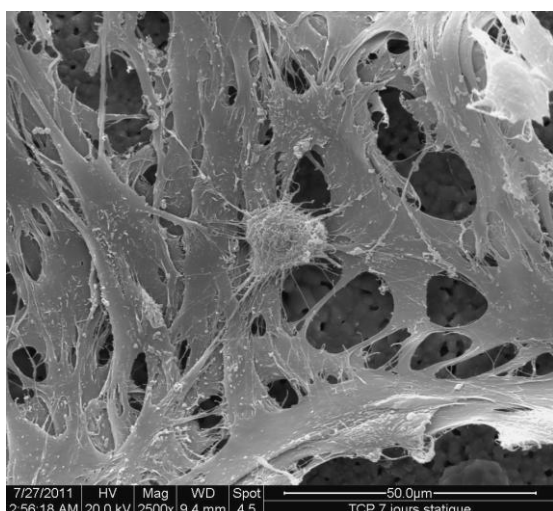
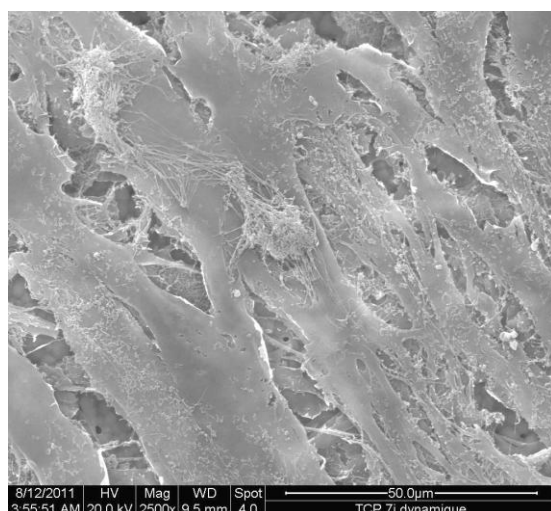


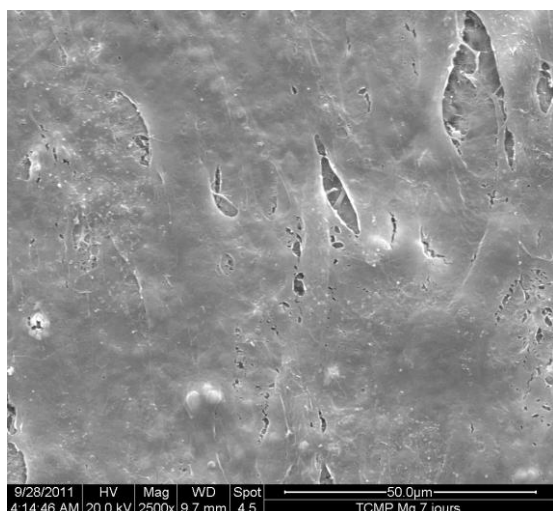
Figura V.12 - Número de células aderentes ao longo do tempo sobre as superfícies de β -TCP e β -TCMP em (a) condição estática e (b) condição dinâmica. Diferenças significativas para um mesmo tempo de cultura entre as superfícies cerâmicas (*).



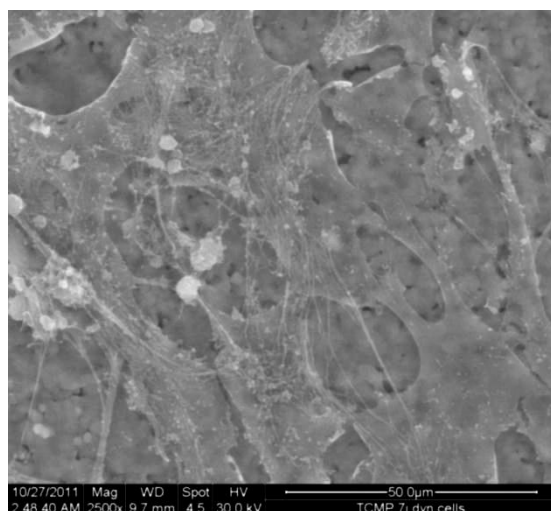
(a) β -TCP (Estático/7 dias)



(b) β -TCP (Dinâmico/7 dias)

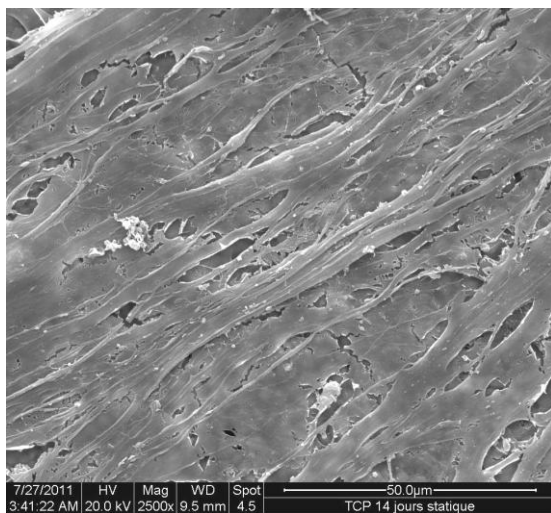


(c) β -TCMP (Estático/7 dias)

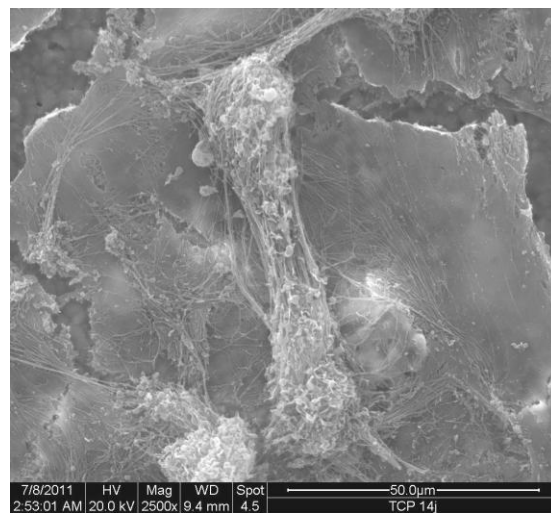


(d) β -TCMP (Dinâmico/7 dias)

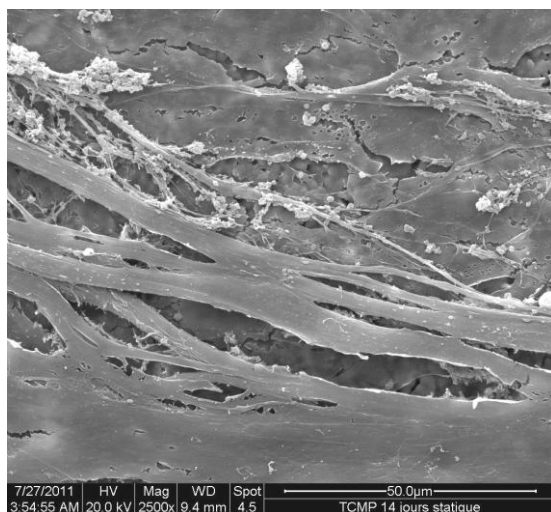
Figura V.13 - Micrografias obtidas por MEV das células STRO+1A cultivadas sobre as superfícies das pastilhas em condição estática e dinâmica (7 dias); aumento 2500X.



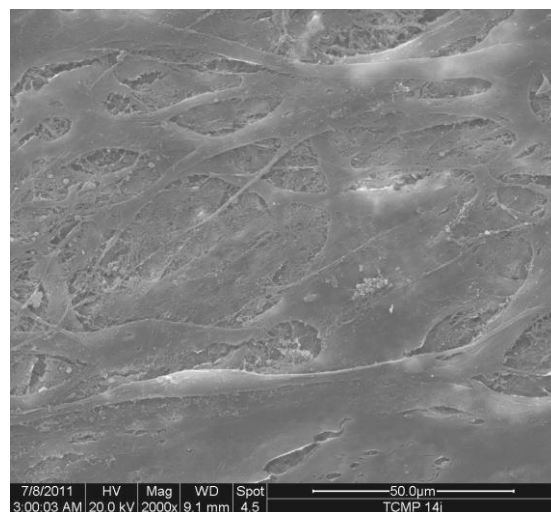
(a) β -TCP (Estático/14 dias)



(b) β -TCP (Dinâmico/14 dias)

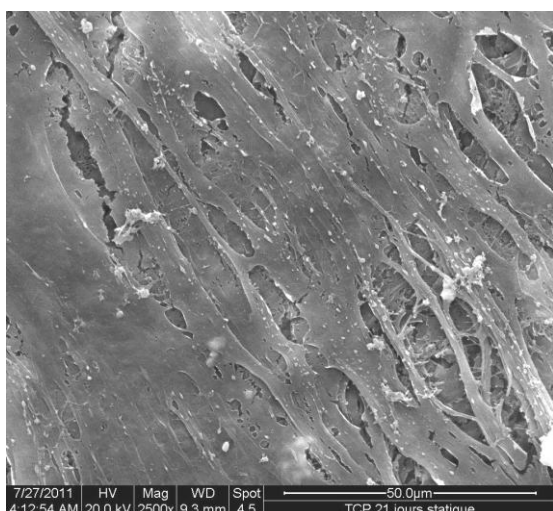


(c) β -TCMP (Estático/14 dias)

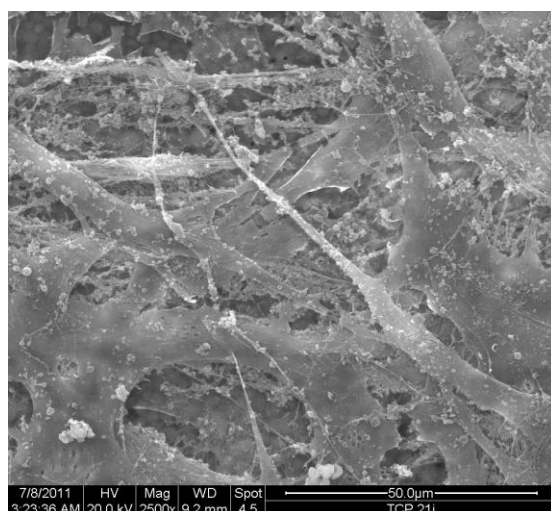


(d) β -TCMP (Dinâmico/14 dias)

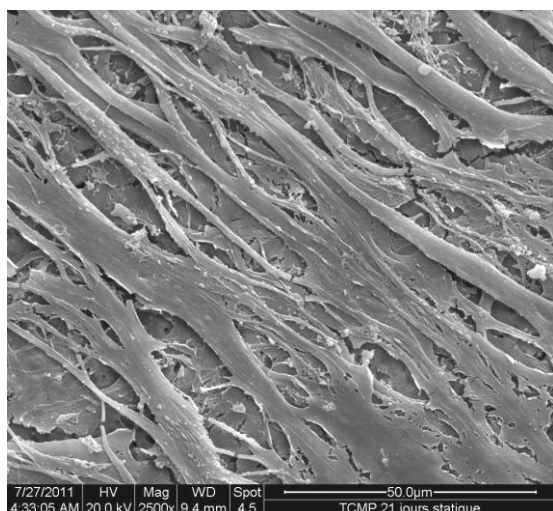
Figura V.14 - Micrografias obtidas por MEV das células STRO+1A cultivadas sobre as superfícies das pastilhas em condição estática e dinâmica (14 dias); aumento 2500X.



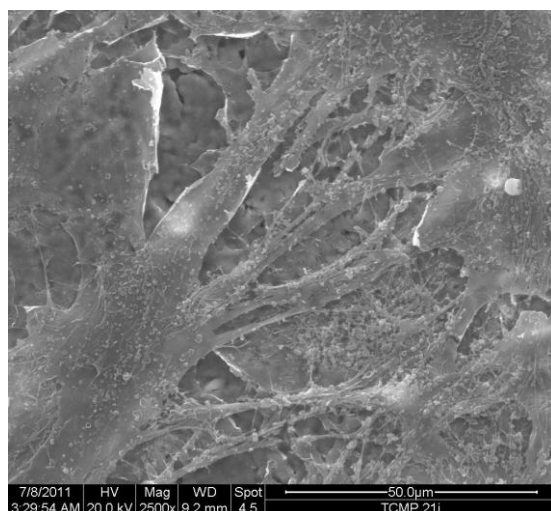
(a) β -TCP (Estático/21 dias)



(b) β -TCP (Dinâmico/21 dias)



(c) β -TCMP (Estático/21 dias)



(d) β -TCMP (Dinâmico/21 dias)

Figura V.15 - Micrografias obtidas por MEV das células STRO+1A cultivadas sobre as superfícies das pastilhas em condição estática e dinâmica (21 dias); aumento 2500X.

A Tabela V.3 resume a proliferação celular em ambas as pastilhas, comparando-se as médias celulares sob condições estática e dinâmica. De modo geral, o fluxo dinâmico de meio de cultura não influenciou de modo significativo a proliferação celular. Nos tempos onde se observou diferença entre ambientes estático e dinâmico, o meio dinâmico estimulou mais a proliferação celular. Estes resultados estão de acordo com relatos de que a cultura dinâmica melhora a homogeneidade da distribuição das células e da matriz, e que tensões de cisalhamento aplicadas pelo

fluxo do meio estimulam a proliferação e diferenciação celular. Além disso, o sistema dinâmico melhora o transporte de massa, assegurando uma nutrição contínua de células e remoção de produtos metabólicos residuais. Já a cultura estática apresenta questões importantes como produtos metabólicos residuais acumulados, difusão limitada e muitas vezes resultam em células e matriz extracelular heterogênea (DA SILVA, MATEESCU, *et al.*, 2010; MEINEL, KARAGEORGIU, *et al.*, 2004).

Tabela V.3 - Avaliação da proliferação celular ao longo do tempo em condições estática (Est) e dinâmica (Din).

Proliferação celular		Resposta
β -TCP β -TCMP	7 dias →	Din > Est
		Est = Din
β -TCP β -TCMP	14 dias →	Est = Din
		Din = Est
β -TCP β -TCMP	21 dias →	Din > Est
		Est = Din

V.3c) Análise da diferenciação osteoblástica em condições estática e dinâmica

Como já reportado, a dexametasona é uma substância capaz de induzir a diferenciação osteoblástica de células mesenquimais da medula óssea, como a STRO+1A, exatamente de acordo com o protocolo aqui utilizado (AHDJOUJ, LASMOLES, *et al.*, 2001; HENG, CAO, *et al.*, 2004).

Três períodos distintos na expressão de genes que codificam os marcadores de fenótipo osteoblástico podem ser definidos: um período de proliferação (nos primeiros 12 dias), um período de desenvolvimento da matriz extracelular (12^o-18^o

dia), e um período de mineralização (a partir do 18º dia). Durante o período de proliferação, fundamental para o desenvolvimento do fenótipo ósseo, vários genes associados com a formação da matriz extracelular (colágeno tipo I principalmente) são ativamente expressos. No período de desenvolvimento da matriz extracelular, caracterizado por uma série de modificações na sua composição e organização, a expressão da enzima fosfatase alcalina aumenta significativamente. Com o início da fase de mineralização, outros genes são expressos, como osteocalcina, osteopontina, entre outros (SHU, MCMULLEN, *et al.*, 2003; LIAN e STEIN, 1992).

Em condição estática, não se observou diferença significativa na produção de fosfatase alcalina entre as pastilhas em mesmo tempo. Já em condição dinâmica verificou-se uma maior produção da enzima para as amostras de β -TCMP em todos os tempos ($p < 0,05$), sugerindo que a presença de Mg não inibiu a diferenciação osteoblástica (Figura V.16). Os resultados estão de acordo com outros autores que utilizaram fosfatos de cálcio em contato com osteoblastos. A secreção de fosfatase alcalina na presença de cerâmicas bifásicas (HA-TCP) dopadas com Mg foi aumentada quando comparada a cerâmica bifásica sem Mg (KANNAN, GOETZ-NEUNHOEFFER, *et al.*, 2009). Klammert e colaboradores (2010) já haviam relatado um aumento considerável na expressão de fosfatase alcalina após a cultura por 21 dias de células MC3T3-E1 em contato com scaffolds de β -TCMP de fórmula $\text{Mg}_{2,25}\text{Ca}_{0,75}(\text{PO}_4)_2$.

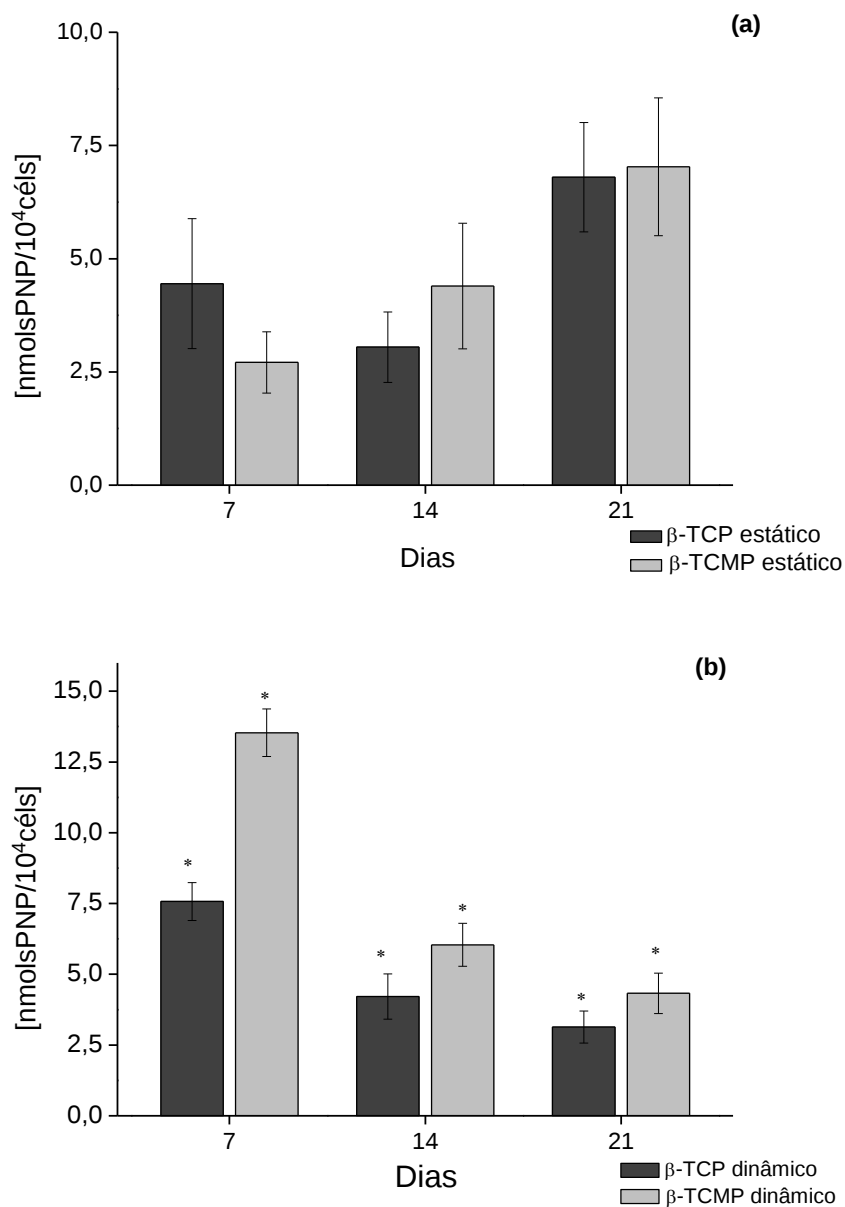


Figura V.16 - Nível de atividade da fosfatase alcalina ao longo do tempo sobre as superfícies de β -TCP e β -TCMP em (a) condição estática e (b) condição dinâmica. Diferença significativa para um mesmo tempo de cultura entre as superfícies cerâmicas (*).

Ademais, em condição estática (Figura V.17), o pico de atividade da fosfatase alcalina para ambas as amostras foi em 21 dias. Já em condição dinâmica, o pico de produção de fosfatase alcalina foi em 7 dias, também para ambos os materiais. Isso sugere que a tensão resultante do fluxo de meio da condição dinâmica associado a troca de meio constante acelerou a produção da enzima. Conforme descrito na Tabela

V., ao final de 21 dias foi observada uma menor produção de fosfatase alcalina em ambiente dinâmico quando comparado ao estático. A proliferação, o metabolismo e a diferenciação de células mesenquimais podem ser afetados por mudanças em seu microambiente, como fonte nutricional e estresse mecânico. Assim sendo, é evidente que diferentes condições de cultura celular devem ser consideradas na expansão e utilização clínica destas células (CHEN, ZHOU e TAN, 2009). A redução da atividade de fosfatase alcalina após 21 dias em ambiente dinâmico quando comparada ao ambiente estático pode ser atribuída ao estresse causado pelo fluxo de meio, induzindo uma possível desdiferenciação.

Tabela V.4 - Avaliação da atividade da fosfatase alcalina sob condições estática (Est) e dinâmica (Din).

Marcador ósseo	Amostra/Tempo	Resposta
Fosfatase Alcalina	β -TCP	Din > Est
	β -TCMP 7 dias →	Din > Est
	β -TCP	Est = Din
	β -TCMP 14 dias →	Est = Din
	β -TCP	Din < Est
	β -TCMP 21 dias →	Din < Est

Em condições estática e dinâmica (Figura V.17), observou-se diferença significativa na produção de colágeno entre as pastilhas nos tempos de 7 e 21 dias, onde o β -TCMP apresentou uma secreção maior, sugerindo que a presença de Mg possa estimular a produção de matriz extracelular óssea (colágeno é o principal constituinte da matriz).

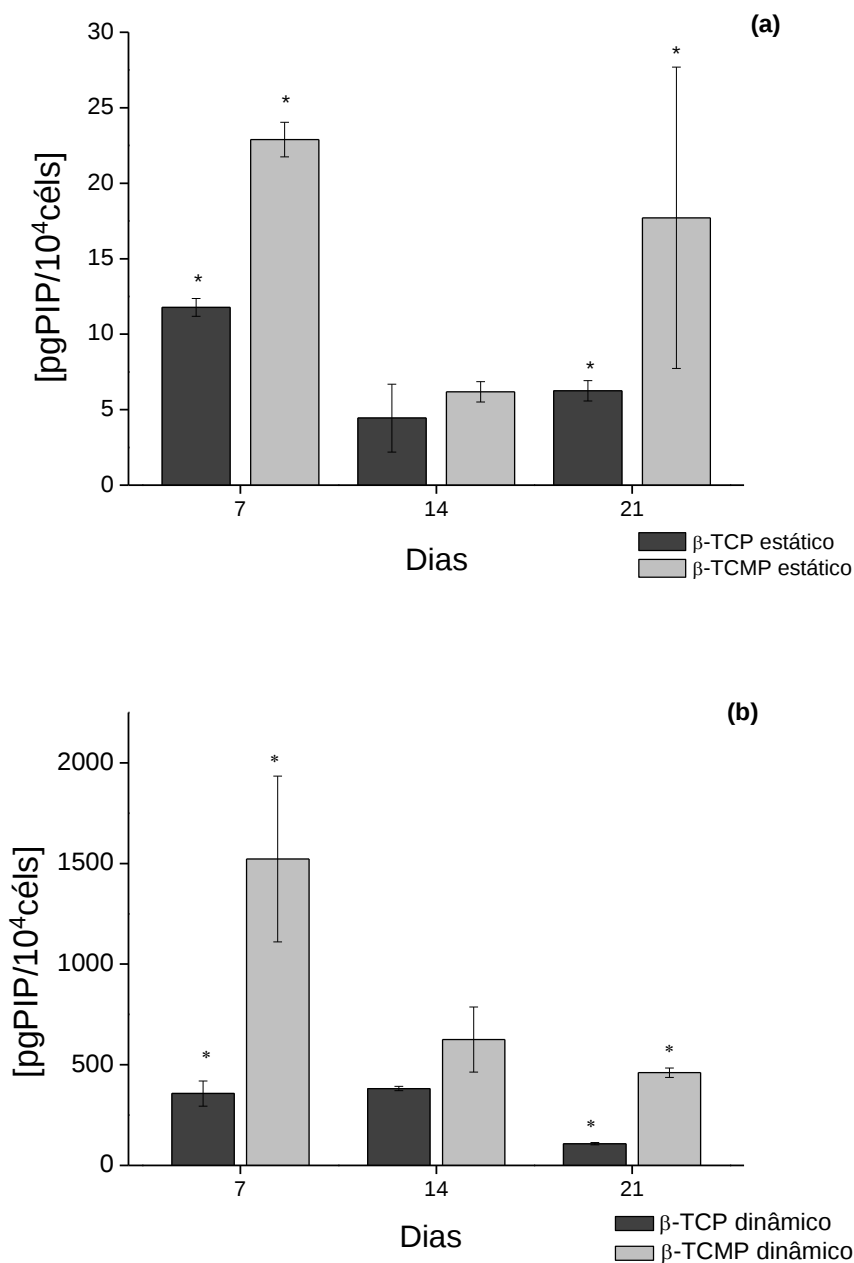


Figura V.17 - Nível de produção de colágeno ao longo do tempo sobre as superfícies de β -TCP e β -TCMP em (a) condição estática e (b) condição dinâmica. Diferença significativa para um mesmo tempo de cultura entre as superfícies cerâmicas (*).

Ademais, o pico de secreção de colágeno foi o mesmo para os dois materiais (7 dias) em ambientes estático e dinâmico. Durante o fluxo de meio, as forças de cisalhamento se opõem a adesão celular. Apesar do fluxo corresponder ao fisiológico, possivelmente não perturbando a adesão celular na superfície dos materiais, esta

pode ser forte o suficiente para quebrar ou evitar a formação de algumas das ligações celulares (YU, BOTCHWEY, *et al.*, 2004). Assim sendo, a produção acentuada de colágeno a 7 dias de cultura pode refletir uma maior produção de matriz extracelular para, desse modo, tornar a adesão celular mais efetiva. Entretanto, a condição dinâmica aumentou significativamente a secreção de colágeno em todos os tempos estudados (Tabela V.) quando comparada a condição estática, ou seja, é possível também que o fluxo de meio da condição dinâmica associado à troca de meio constante aumente a secreção de matriz extracelular óssea. Sabe-se que a condição dinâmica se aproxima mais da realidade, uma vez que o fluxo utilizado de 2mL/h corresponde à circulação do líquido ósseo intersticial (WANG, UEMURA, *et al.*, 2003).

Tabela V.5 - Avaliação da secreção de colágeno sob condições estática (Est) e dinâmica (Din).

Marcador ósseo	Amostra/Tempo	Resposta
Colágeno	β -TCP	Din > Est
	β -TCMP 7 dias $\rightarrow$	Din > Est
	β -TCP	Din > Est
	β -TCMP 14 dias $\rightarrow$	Din > Est
	β -TCP	Din > Est
	β -TCMP 21 dias $\rightarrow$	Din > Est

A adição de Mg não mostrou diferenças significativas na proliferação dos osteoblastos. Quanto à secreção de colágeno, uma interessante elevação foi observada quando da incubação com β -TCMP. Dependendo da finalidade da utilização de um biomaterial no reparo ósseo, este efeito observado pode ser interessante, porque a primeira fase no processo de formação óssea por osteoblastos é a secreção de colágeno. Em adição, a produção de fosfatase alcalina, enzima envolvida no processo de mineralização óssea, foi aumentada em osteoblastos

incubados com β -TCMP. Sabe-se que a mineralização da matriz extracelular é essencial na formação do tecido ósseo.

V.4 CULTURA DE MACRÓFAGOS EM CONTATO COM EXTRATO DOS GRÂNULOS DENSOS

A viabilidade de macrófagos humanos foi avaliada previamente através da liberação de óxido nítrico (NO), pois é sabido que macrófagos humanos ativados produzem NO (MOSSER, 2003). Os resultados demonstraram uma maior produção em macrófagos tratados com LPS quando comparados ao grupo não tratado ($p < 0,05$), como mostrado na Figura V.18. Estes dados comprovaram que o tratamento com LPS resultou em uma efetiva ativação dos macrófagos.

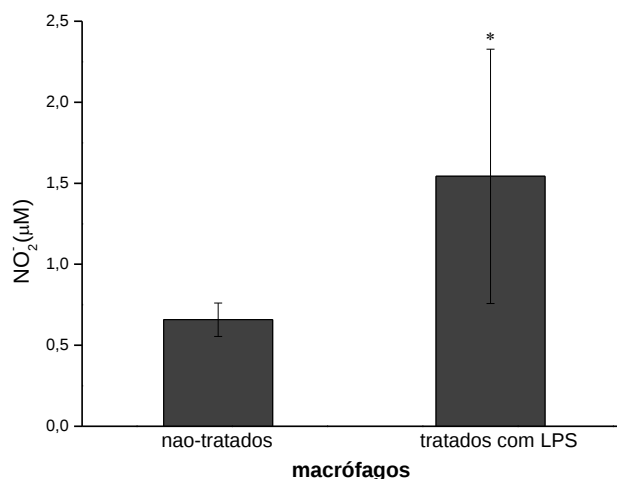


Figura V.18 - Efeito do LPS na produção de nitrito pelos macrófagos. * Diferença significativa ($p < 0,05$).

Os dados brutos das concentrações das citocinas em cada tempo e condição celular encontram-se no Anexo I. De uma varredura inicial de 16 citocinas, 11 (G-CSF,

IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-1ra, MCP-1, MCP-3, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-3 α , TNF- α) foram selecionadas para inclusão nos resultados baseando-se nas suas concentrações (detectáveis) e relevância na reação de corpo estranho (Figura II.2). Visando apresentar os dados de uma maneira mais adequada para analisar os perfis de produção de citocinas, estes foram convertidos em um mapa de cores, conforme Figura V.19.

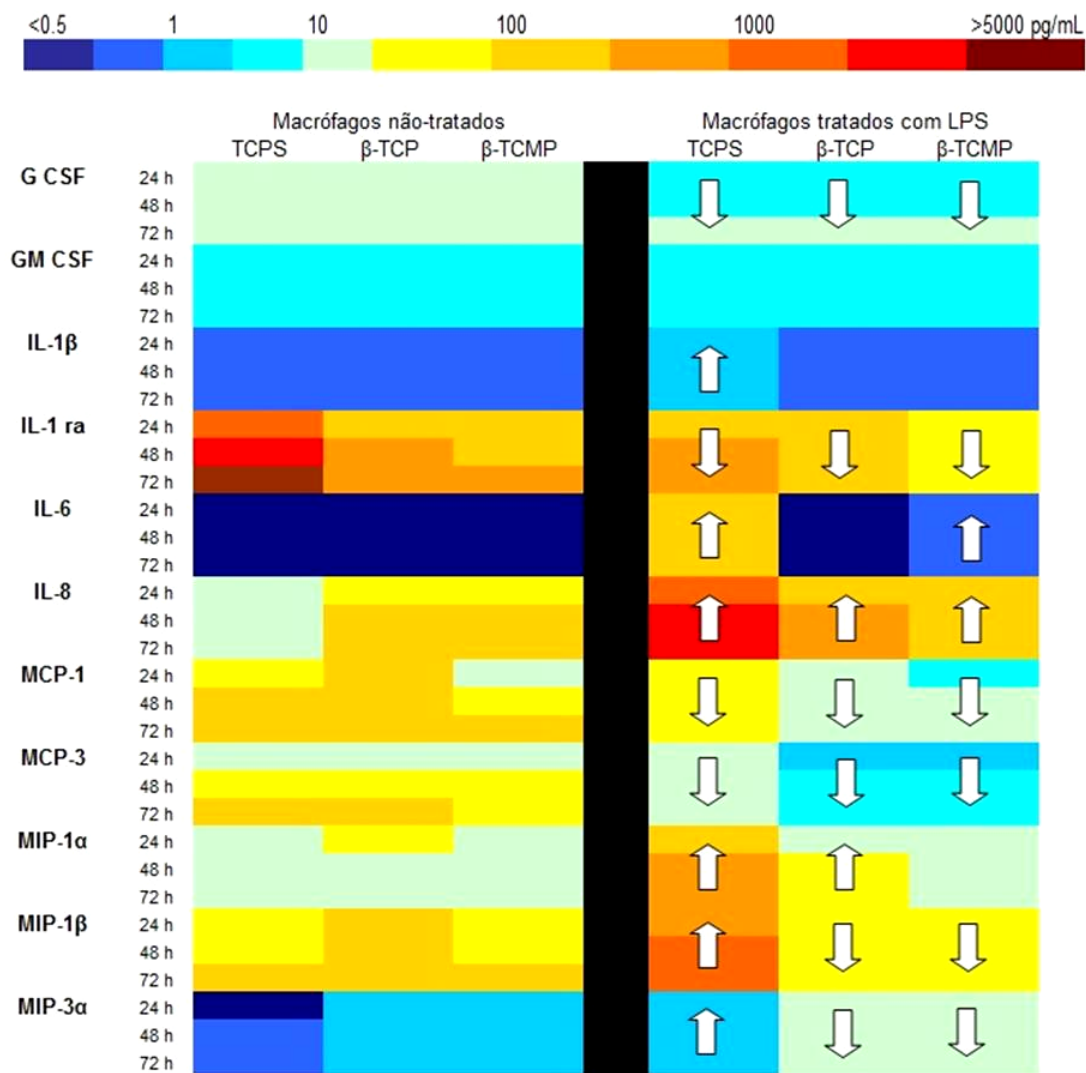


Figura V.19 - Produção de citocinas (pg/mL) a partir de macrófagos cultivados com os extratos dos grânulos de β -TCP, β -TCMP e TCPS (poliestireno de cultura de tecidos) após 24, 48 e 72h. Uma escala de cores de concentrações foi incluída na parte superior. Os dados são mostrados como médias. $\uparrow$ $\downarrow$ Aumenta ou diminui com a ativação dos macrófagos.

De modo geral, a produção de citocinas aumentou de 24 para 48 e 72 horas, em ambas as condições de tratamento (macrófagos ativados ou não por LPS). No grupo não-ativado, um maior nível ($> 100\text{pg/mL}$) de produção de IL-1ra foi observado, enquanto que no grupo ativado a maior produção observada foi na citocina IL-8. Em ambos os grupos, o controle (TCPS) foi o que apresentou uma maior produção, quando comparado aos biomateriais. Isto sugere que os biomateriais reduzem a produção das citocinas, porém, como não foi avaliada a quantidade de macrófagos viáveis após a exposição aos extratos dos grânulos, este fato pode refletir simplesmente um número maior de células produtoras no grupo TCPS. A IL-1 está no centro da resposta inflamatória, por sua capacidade de recrutar neutrófilos, ativar linfócitos e induzir a produção de mediadores inflamatórios. IL-1ra (antagonista do receptor da IL-1) é uma pequena molécula que inibe a atividade biológica da IL-1, através da ocupação do seu receptor celular. Já a IL-8 é uma citocina pró-inflamatória que atua como um potente quimioatrator de leucócitos (TRINDADE, LIND, *et al.*, 2001; ANDERSON, RODRIGUEZ e CHANG, 2008).

Comparando-se os dois grupos de macrófagos (tratados e não-tratados com LPS), verificou-se um aumento, após a ativação das seguintes citocinas: no grupo controle (TCPS) – IL-1 β , IL-6, IL-8, MIP-1 α e β , MIP-3 α (proteína inflamatória de macrófagos); no grupo β -TCP – IL-8, MIP-1 α ; no grupo β -TCMP - IL-6, IL-8, todas citocinas pró-inflamatórias. Destaca-se a citocina IL-8, a única que apresentou aumentos nos dois materiais e também no controle.

A IL-6 não só induz a ativação de neutrófilos como também pode atrasar a eliminação fagocítica dos neutrófilos senescente prolongando desta forma sua ação local. O fator estimulante de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF) atua sobre a linhagem de macrófagos, enquanto o fator estimulante de colônias de granulócitos (G-CSF) atua seletivamente em células da linhagem de granulócitos. O

G-CSF ativa neutrófilos, enquanto que GM-CSF ativa neutrófilos, eosinófilos e monócitos/macrófagos. As proteínas quimioatratantes de monócitos (MCP) funcionam como potentes quimioatratantes para monócitos, basófilos, eosinófilos e linfócitos T, excluindo-se os neutrófilos. Já as proteínas inflamatórias de macrófagos (MIP) atuam no recrutamento e ativação de monócitos, linfócitos T e neutrófilos (MURDOCH e FINN, 2000; ANDERSON, RODRIGUEZ e CHANG, 2008).

A análise dos dados obtidos é limitada devido ao possível efeito citotóxico em parte dos macrófagos cultivados com os extratos dos biomateriais. Consequentemente, uma maior produção de citocinas pode refletir somente uma maior quantidade de células viáveis. Para a publicação destes resultados, de modo a efetivamente comparar a produção de citocinas, será realizada a quantificação dos macrófagos viáveis após exposição aos extratos, assim como no grupo controle. Deste modo, a produção de citocinas será apresentada como picogramas/célula.

Como a produção individual de citocinas é de difícil interpretação, também foi analisada a resposta integrada de classes de citocinas, agrupadas de acordo com seu papel na inflamação e reparo tecidual em anti e pró, como descrito no capítulo revisão de literatura na Figura II.2.

A Figura V.20 mostra o perfil de secreção de citocinas dos macrófagos não-ativados subdividido em pró-anti reparo (a) e pró-anti inflamação (b), enfatizando a razão pró/anti. De modo geral, os dados mostram que os macrófagos não-ativados produziram predominantemente citocinas anti-inflamatórias e pró-reparo, resultado semelhante ao encontrado por Schutte e colaboradores (2009) ao estudarem a produção de citocinas por macrófagos não-ativados após contato com diferentes materiais. Ao considerar-se a razão pró-anti, praticamente não houve diferença entre os biomateriais, sugerindo que o β -TCMP não afetou a resposta biológica dos macrófagos. Além disso, o gráfico mostra que a produção de citocinas do grupo controle (TCPS) é maior que a dos biomateriais, contudo este aumento é questionável,

conforme já explicado anteriormente. Também se pode observar que a produção de citocinas aumenta com o tempo, sendo este fato mais marcante no grupo TCPS.

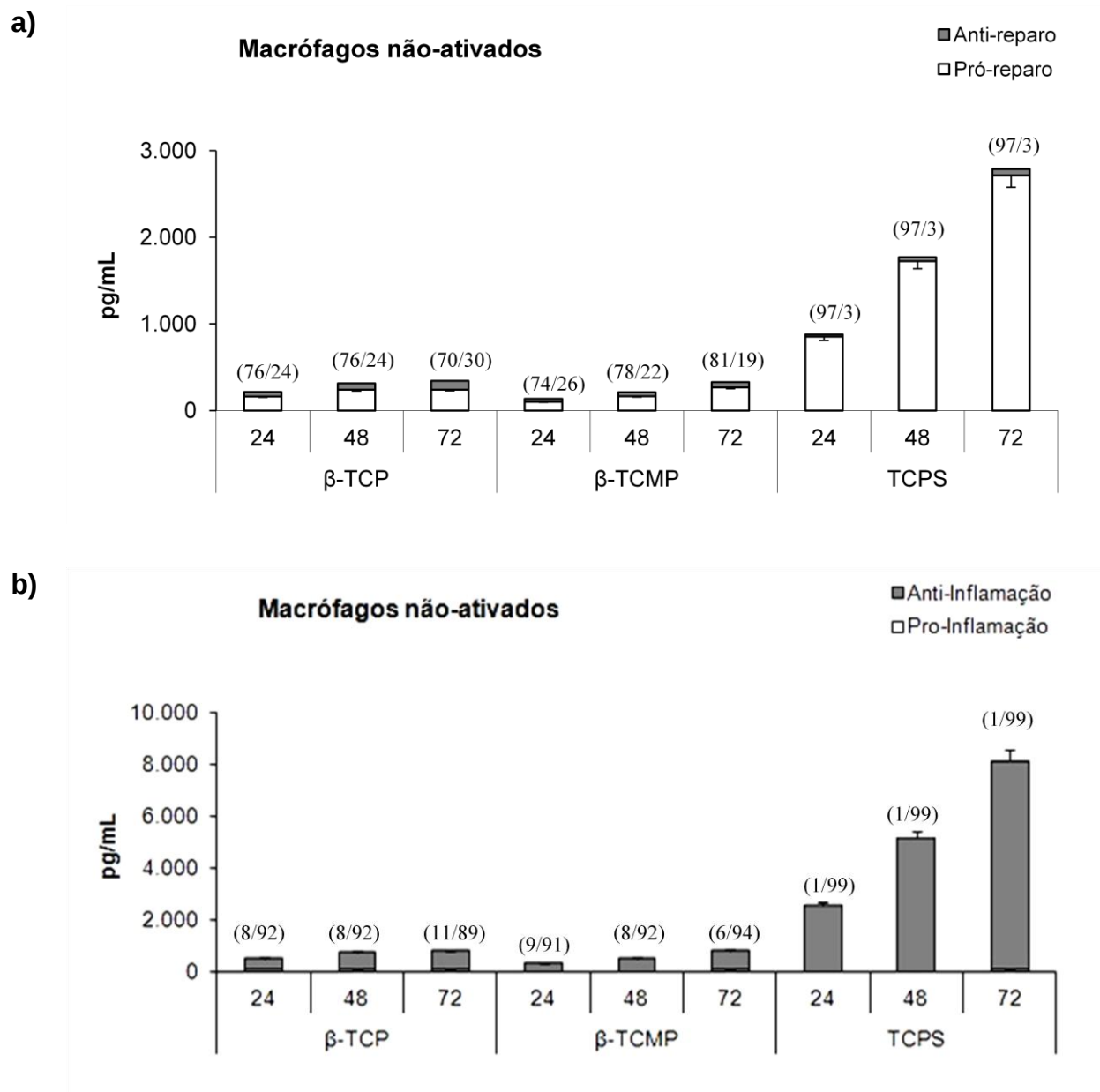


Figura V.20 - Produção de citocinas (pg/mL) agrupadas em (a) pró ou anti-reparo e (b) pró ou anti-inflamação a partir de macrófagos não-ativados cultivados com os extratos dos grânulos de β-TCP, β-TCMP e TCPS (controle) após 24, 48 e 72h. Os dados são mostrados como média ± desvio padrão (razão pró/anti).

Embora o TCPS seja comumente utilizado para a cultura de células, este é considerado uma superfície estranha para monócitos/macrófagos, de modo semelhante à de outros biomateriais. Por esta razão, Schutte e colaboradores (2009) avaliaram o TCPS como um “biomaterial controle”, em comparação com co-polímero hidroxietil-metacrilato polietilenoglicol (HEMA-PEG), verificando que a produção de citocinas por macrófagos após contato com ambos os materiais foi semelhante, concluindo que o TCPS é um material controle adequado para estudos com macrófagos.

Biomateriais podem ativar respostas de macrófagos de modo similar a bactérias gram-negativas ou LPS, no entanto, as consequências da invasão microbiana e implantação de um biomaterial são diferentes. Micróbios causam infecções, que são resolvidas por respostas imunes adaptativas através da ativação de linfócitos B e T, enquanto que o implante da maioria de biomateriais sintéticos provoca inflamação e respostas de corpo estranho (XIA e TRIFFITT, 2006).

Uma vez que os macrófagos estão intimamente envolvidos na resposta imune e inflamação, exibindo atividade microbicida, citotóxica, provocando dano tecidual e participando de reações de corpo estranho, em um primeiro momento acredita-se que as respostas de macrófagos em situações de implantação de uma biomaterial são principalmente voltadas para o lado negativo em termos de reparo e regeneração tecidual. Portanto, é muito importante enfatizar aqui que, além da sua função na resposta imune e inflamação, os macrófagos desempenham também um papel crítico na regeneração de tecidos. Estudos de cicatrização de feridas têm mostrado que, se a infiltração de macrófagos é impedida, a cicatrização é severamente comprometida (MARTIN, 1997; XIA e TRIFFITT, 2006).

O primeiro passo para um reparo tecidual eficaz é a eliminação de detritos consistindo de tecido danificado, células necróticas e apoptóticas, assim como partículas provenientes de biomateriais, por exemplo. Os macrófagos preparam o

tecido para o reparo tanto por fagocitose de detritos como também pela produção de enzimas, incluindo proteinases e collagenases para a reorganização do tecido. O segundo passo é o recrutamento de células citocina-regulado, assim como sua migração, proliferação e formação da matriz extracelular. Os macrófagos secretam fatores de crescimento de fibroblastos, de endotélio, entre outros visando a regeneração tecidual (ANDERSON, 2001; ANDERSON, RODRIGUEZ e CHANG, 2008; XIA e TRIFFITT, 2006; KOH e DIPIETRO, 2011).

Na literatura pesquisada, não foram encontrados estudos com macrófagos envolvendo a produção de citocinas frente aos materiais em questão que nos permitisse uma comparação de resultados. O perfil de citocinas de ambos os materiais voltado para uma resposta pró-reparo e anti-inflamação é promissor, conforme exposto, visto que no experimento com macrófagos não-ativados uma situação de implantação do biomaterial na ausência de infecção foi simulada, na qual uma resposta inflamatória exacerbada não é necessária. Como o β -TCP é um biomaterial já comercializado, os resultados descritos não contra-indicam o uso do β -TCMP como enxerto ósseo. Em adição, a maioria das citocinas pró-inflamatórias induzem reabsorção óssea, direta ou indiretamente; contudo, a resposta de células mesenquimais a essas citocinas ainda não foi completamente elucidada (ANDERSON, RODRIGUEZ e CHANG, 2008; OMAR, GRANELI, *et al.*, 2011).

A Figura V.21 mostra o perfil de secreção de citocinas dos macrófagos ativados com LPS bacteriano subdividido em pró-anti reparo (a) e pró-anti inflamação (b), enfatizando a razão pró/anti. Em relação ao reparo, houve predomínio do perfil anti para o β -TCMP e controle (TCPS), enquanto o β -TCP apresentou perfil pró-reparo, tendendo para o equilíbrio. Quanto à inflamação, ambos os materiais apresentaram perfil anti-inflamatório, enquanto o TCPS apresentou uma tendência de equilíbrio entre os perfis pró e anti-inflamação. Apesar de apresentarem o mesmo perfil, ao se considerar a quantidade de citocinas produzidas, existe uma diferença entre os dois

materiais, sugerindo que o Mg na estrutura do TCP, mesmo que de modo indireto, por alteração de suas propriedades físico-químicas, por exemplo, afeta a resposta dos macrófagos de modo diferenciado. Schutte e colaboradores (2009), observaram um perfil de citocinas pró-inflamatório e anti-reparo tecidual, este último coerente com os resultados obtidos para o β -TCP e β -TCMP, após exposição de macrófagos ativados por LPS à vários biomateriais.

O gráfico mostra também que a produção de citocinas do grupo controle (TCPS) é maior que a dos biomateriais e que, de modo geral, as citocinas apresentam uma tendência de aumento com o tempo, como o observado no experimento com macrófagos não-ativados.

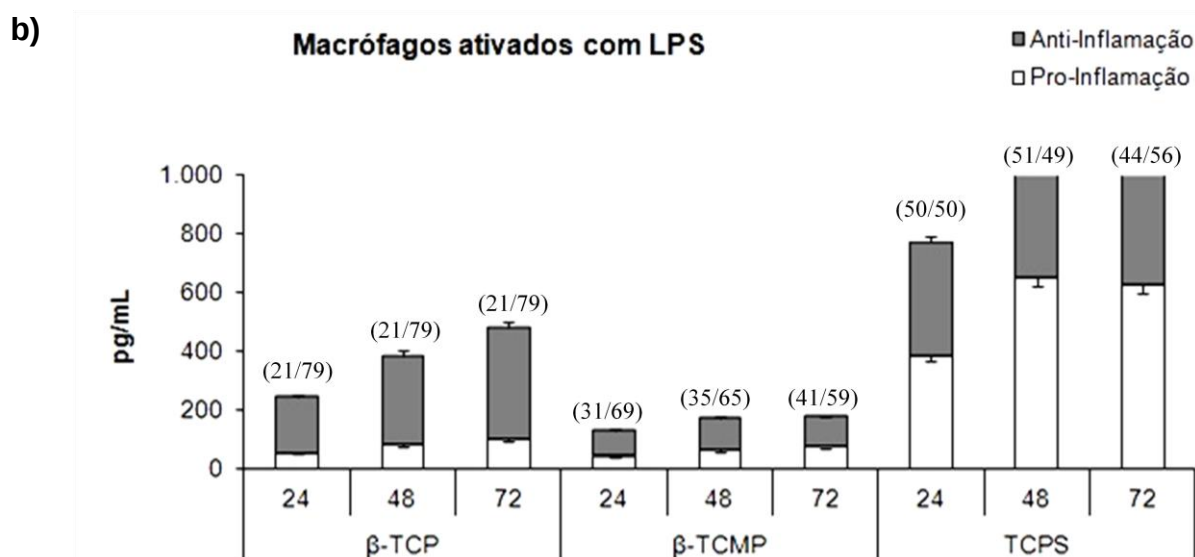
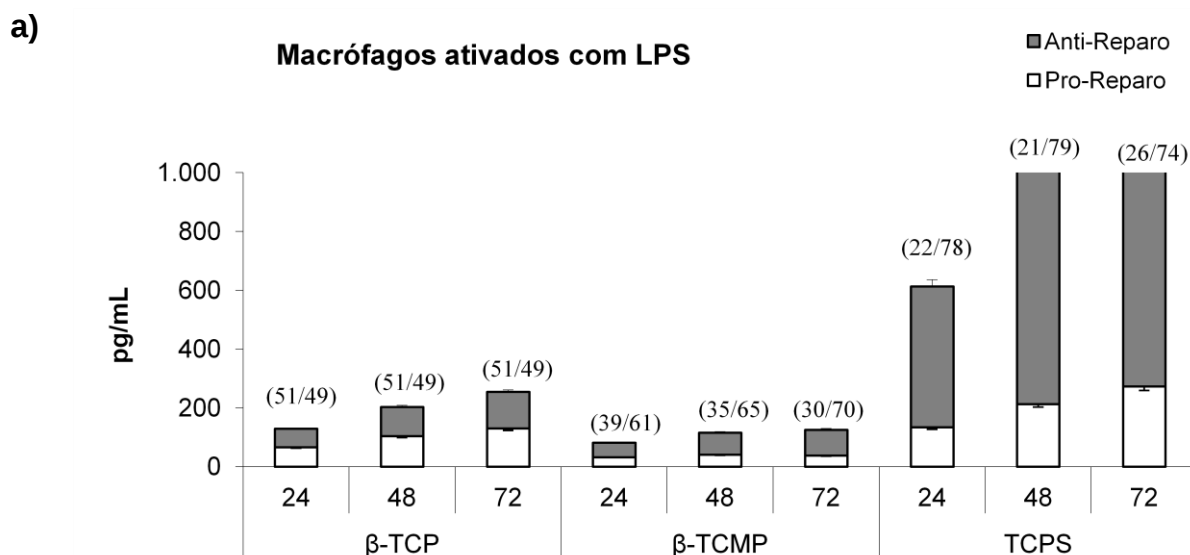


Figura V.21 - Produção de citocinas (pg/mL) agrupadas em (a) pró ou anti-reparo e (b) pró ou anti-inflamação a partir de macrófagos ativados cultivados com os extratos dos grânulos de β -TCP, β -TCMP e TCPS (controle) após 24, 48 e 72h. Os dados são mostrados como média $\pm$ desvio padrão (razão pró/anti).

Infecções ocorrem ao redor de implantes mesmo após a inoculação de pequena quantidade de bactérias no biomaterial. Apesar da presença de macrófagos e granulócitos em torno do implante, estes microrganismos não são eliminados. Tais infecções são caracterizados pela sua evolução prolongada, tipicamente observada no tecido periprotético (ZIMMERLI e SENDI, 2011). Considerando-se essas

características clínicas, foi levantada a hipótese de que a interação de granulócitos com uma superfície não-fagocitável (isto é, do implante), ou, alternativamente, com partículas de desgaste, pode prejudicar a função de granulócitos (BERNARD, VAUDAUX, *et al.*, 2005).

Sabe-se que infecções associadas a biomateriais são geralmente de origem bacteriana e que LPS é um polissacarídeo bacteriano capaz de ativar macrófagos (MENG e LOWELL, 1997); assim sendo, o contato de macrófagos com LPS simula uma situação de infecção associada a biomaterial, permitindo uma análise da resposta dessas células nesta situação peculiar previamente planejada.

A resposta inflamatória é uma tentativa de proteção do organismo visando a eliminação de estímulos nocivos, como microrganismos e a iniciação do processo de cura. Infecções associadas a biomateriais constituem um grave problema clínico de difícil tratamento que, muitas vezes, necessita de substituição do implante. Estes podem ser contaminados por microorganismos de diferentes maneiras, seja por via direta durante a cirurgia (peri-operatória) ou durante a hospitalização (pós-operatória) (SUBBIAHDOSS, FERNANDEZ, *et al.*, 2011).

Os biomateriais analisados apresentaram um perfil anti-inflamatório, ou seja, macrófagos ativados por LPS expostos aos biomateriais inibiram a produção de citocinas inflamatórias, observação condizente com o fato de que infecções relacionadas a biomateriais são de difícil tratamento. Além disso, estudos prévios já demonstraram que células imunes podem de fato perder sua capacidade de eliminação de bactérias na presença de biomateriais (SUBBIAHDOSS, FERNANDEZ, *et al.*, 2011; WATANABE, ICHIKI, *et al.*, 2007).

O β -TCMP apresentou um perfil anti-cicatrização, similar ao controle (TCPS), ou seja, é possível que na presença de infecção bacteriana, além da resposta inflamatória, o reparo tecidual também seja inibido. O comportamento observado no β -TCP, de modo geral, foi um equilíbrio anti-pró, tendendo para o reparo, além de anti-

inflamatório. Os dados demonstram que a presença de Mg no TCP afeta de modo negativo a resposta biológica de macrófagos ativados por LPS, visto que a expressão de citocinas pró-reparo é reduzida (SUBBIAHDOSS, FERNANDEZ, *et al.*, 2011). Contudo, este resultado é considerado favorável, já que o controle apresentou o mesmo comportamento.

Ao comparar-se os resultados dos macrófagos não-ativados e ativados (Tabela V.6), as citocinas abrangidas no reparo foram as que apresentaram uma alteração mais significativa no perfil: de pró para anti. Ou seja, os biomateriais na presença de infecção apresentam uma tendência a reduzir a expressão de citocinas envolvidas no reparo tecidual, porém mantém o perfil anti-inflamação, necessário para a eliminação de microorganismos associados a estes.

Tabela V.6 - Avaliação do perfil de produção de citocinas quanto ao reparo tecidual e inflamação (pró ou anti) pro macrófagos ativados e não-ativados após contato com extrato dos biomateriais (β -TCP e β -TCMP) e controle (TCPS).

Perfil de citocinas		Reparo tecidual	Inflamação
β -TCP	Macrófagos não-ativados	Pró > Anti	Anti > Pró
β -TCMP		Pró > Anti	Anti > Pró
TCPS		Pró > Anti	Anti > Pró
β -TCP	Macrófagos ativados	Anti = Pró	Anti > Pró
β -TCMP		Anti > Pró	Anti > Pró
TCPS		Anti > Pró	Anti = Pró

Estudos mais aprofundados sobre o mecanismo de degradação de biomateriais por macrófagos, assim como a resposta contra bactérias associadas a implantes e reparo de tecidos são fundamentais na melhoria dos biomateriais utilizados na engenharia tecidual e medicina regenerativa.

CHAPITRE VI (a)

CONCLUSIONS

- Les biomatériaux synthétisés ont été identifiés comme du phosphate tricalcique- β (β -TCP) et du β -TCP dopé avec du Mg (β -TCMP), par diffraction de rayons-X. La présence de Mg, probablement en solution solide dans le phosphate tricalcique, a été confirmée grâce à la spectrométrie par émission plasma.
- De manière générale, l'addition de protéines dans le milieu de culture ne modifie pas le comportement de précipitation/dissolution ionique des deux matériaux, tant en régime statique que dynamique. De plus, après incubation dans les milieux de culture (avec ou sans protéines) pendant 21 jours, en régime statique et dynamique, la formation des cristaux de phosphate de calcium sur la surface des deux échantillons a été observée, ce qui est considéré comme un marqueur de bioactivité des céramiques.
- En ce qui concerne la prolifération des cellules ostéoprogénitrices STRO+1A, on n'a pas observé de différence significative entre les matériaux sur le nombre de cellules après 21 jours de culture que ce soit en régime statique ou dynamique.
- À propos de la différenciation ostéoblastique des cellules STRO+1A, les échantillons de β -TCMP ont induit une activité phosphatase alcaline supérieure à tous les temps de l'étude dans un environnement dynamique, tandis que dans un environnement statique la production de l'enzyme était similaire sur les deux matériaux. L'incorporation du Mg dans la structure cristalline du TCP tel que le flux

de milieu de culture ont favorisé la différenciation ostéoblastique des cellules STRO+1A.

- D'une façon générale, une production de collagène supérieure par les cellules STRO+1A a été observée dans les échantillons de β -TCMP (7 et 21 jours) quelque soit le régime (statique ou dynamique), ce qui suggère que la présence de magnésium a stimulé la production de matrice osseuse.
- Selon les résultats obtenus, il apparaît, qu'en régime dynamique, les forces de cisaillement appliquées sur les cellules par le flux du milieu (0,03 ml/min, la vitesse du fluide interstitiel dans l'os) associées au renouvellement constant du milieu de culture accélèrent la différenciation des ostéoblastes.
- Le matériau synthétisé, le β -TCMP, par comparaison avec le β -TCP, ne modifie en général pas la réponse des macrophages, activés ou non par les LPS.

CAPÍTULO VI

CONCLUSÕES

- Por difração de raios X foi identificada uma única fase nas pastilhas e grânulos sinterizados: fosfato tricálcico (β -TCP), no material sem magnésio e whitlockita magnésiana (β -TCMP) no material contendo magnésio. Nesses últimos, foi confirmada, por espectroscopia de plasma, a presença de Mg, provavelmente em solução sólida no fosfato tricálcico.
- De modo geral, a presença de proteínas no meio de cultura parece não influenciar o comportamento de precipitação/dissolução de ambos os materiais sob condição estática e dinâmica. Além disso, após a incubação em ambos os meios de cultura (com ou sem proteínas), em condições estática e dinâmica por 21 dias, verificou-se a formação de cristais de fosfato de cálcio sobre a superfície de ambos os materiais, o que é considerado um indicativo da bioatividade das cerâmicas.
- A presença de Mg na estrutura do TCP não modificou a taxa de proliferação das células osteoprogenitoras STRO+1A, tanto sob condição estática quanto dinâmica, após 21 dias de cultura.
- Quanto à diferenciação osteoblástica das células STRO+1A, verificou-se uma maior produção de fosfatase alcalina nas amostras de β -TCMP em todos os tempos sob condição dinâmica, enquanto que sob condição estática, a produção foi similar para ambos os materiais. A presença de Mg na estrutura do TCP em conjunto com os efeitos do fluxo dinâmico de meio estimularam a função osteoblástica das células STRO+1A.

- De modo geral, verificou-se uma maior produção de colágeno tipo I pelas células STRO+1A cultivadas sobre as pastilhas de β -TCMP, em ambas as condições de cultura, quando comparado ao β -TCP: a presença de Mg estimulou a secreção de colágeno de modo diferenciado, favorecendo assim a deposição de matriz extracelular.
- Observou-se um deslocamento do pico de produção de fosfatase alcalina de 21 dias (ambiente estático) para 7 dias (ambiente dinâmico) em ambos os materiais, ou seja, o fluxo dinâmico de meio de cultura acelerou a expressão do fenótipo osteoblástico. Sabe-se que a tensão resultante do fluxo de meio (similar ao líquido intersticial ósseo) da condição dinâmica associado à troca de meio constante é um fator importante para a diferenciação osteoblástica.
- O material sintetizado, β -TCMP, de modo geral, não modificou a resposta de macrófagos ativados ou não por LPS, quando comparado ao β -TCP.

CHAPITRE VII (a)

SUGGESTIONS D'ETUDES FUTURES

- Étudier la cinétique de dégradation des matériaux sous forme de granules, plus proches de l'application clinique, dans un environnement statique et dynamique ;
- Évaluer l'adsorption des protéines à la surface des biocéramiques, ainsi que l'effet sur la cinétique de dissolution/précipitation après immersion dans le milieu de culture complet ;
- Évaluer la production *in vitro* d'autres protéines osseuses, comme OPG et RANKL, qui jouent un rôle central dans la régulation du métabolisme osseux ;
- Évaluer l'effet des cytokines inflammatoires sur le métabolisme osseux à travers la co-culture de macrophages et d'ostéoblastes avec les extraits des biomatériaux.

CAPÍTULO VII

SUGESTÕES FUTURAS

- Estudar a cinética de degradação dos materiais em forma de grânulos, aproximando-se da aplicação clínica, em tempos menores que 24 horas, tanto em meio estático quanto em dinâmico;
- Avaliar a adsorção de proteínas na superfície das cerâmicas, após imersão em meio completo, correlacionado seu efeito na cinética de dissolução/precipitação dos materiais;
- Avaliar a produção *in vitro* de outras proteínas do metabolismo ósseo por osteoblastos, como RANKL e OPG, que apresentam papel central na regulação do metabolismo ósseo;
- Avaliar o efeito das citocinas inflamatórias produzidas pelos macrófagos no metabolismo ósseo, através da co-cultura de macrófagos e osteoblastos com o extrato dos biomateriais.

CAPÍTULO VIII

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHDJOUDJ, S. et al. Reciprocal control of osteoblast/chondroblast and osteoblast/adipocyte differentiation of multipotential clonal human marrow stromal F/STRO-1(+) cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 81, n. 1, p. 23-38, 2001.

ANDERSON, J. Biological responses to materials. **Annual Review of Materials Research**, v. 31, n. 1, p. 81-110, 2001.

ANDERSON, J.; RODRIGUEZ, A.; CHANG, D. Foreign body reaction to biomaterials. **Seminars in Immunology**, v. 20, n. 2, p. 86-100, 2008.

ARAÚJO, J. et al. Maximum substitution of magnesium for calcium sites in Mg- β -TCP structure determined by X-ray powder diffraction with the Rietveld refinement. **Materials Chemistry and Physics**, v. 118, n. 2-3, p. 337-340, 2009.

BACAKOVA, L. et al. Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 739-767, 2011.

BAPTISTA, L. et al. Processing of Lipoaspirate Samples for Optimal Mesenchymal Stem Cells Isolation. In: SERDEV, N. **Advanced Techniques in Liposuction and Fat Transfer**. [S.l.]: InTech, 2011. Cap. 11, p. 181-202.

BARRERE, F.; VAN BLITTERSWIJK, C.; DE GROOT, K. Bone regeneration: molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics. **International Journal of Nanomedicine**, v. 1, n. 3, p. 317-332, 2006.

BERNARD, L. et al. The inhibition of neutrophil antibacterial activity by ultra-high molecular weight polyethylene particles. **Biomaterials**, 26, n. 27, 2005. 5552-5557.

BIGI, A. et al. Chemical and structural characterization of the mineral phase from cortical and trabecular bone. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 68, n. 1, p. 45-51, 1997.

BOELEN, J. et al. Biomaterial-associated persistence of *Staphylococcus epidermidis* in pericatheter macrophages. **Journal of Infectious Diseases**, v. 181, n. 4, p. 1337-1349, 2000.

BOHNER, M. Silicon-substituted calcium phosphates - a critical view. **Biomaterials**, v. 30, n. 32, p. 6403-6406, 2009.

BRODBECK, W. et al. Biomaterial surface chemistry dictates adherent monocyte/macrophage cytokine expression in vitro. **Cytokine**, v. 18, n. 6, p. 311-319, 2002.

BRODBECK, W. et al. In vivo leukocyte cytokine mRNA responses to biomaterials are dependent on surface chemistry. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 64, n. 2, p. 320-329, 2003.

CAETANO-LOPES, J.; CANHÃO, H.; FONSECA, J. Osteoimmunology — The hidden immune regulation of bone. **Autoimmunity Reviews**, v. 8, n. 3, p. 250-255, 2009.

CHEN, H.; HU, Y. Bioreactors for tissue engineering. **Biotechnology Letters**, v. 28, n. 18, p. 1415-1423, 2006.

CHEN, T.; ZHOU, Y.; TAN, W. Influence of lactic acid on the proliferation, metabolism, and differentiation of rabbit mesenchymal stem cells. **Cell Biology and Toxicology**, v. 25, n. 6, p. 573-586, 2009.

CIVITELLI, R.; ARMAMENTO-VILLAREA, R.; NAPOLI, N. Bone turnover markers: understanding their value in clinical trials and clinical practice. **Osteoporosis International**, v. 20, n. 6, p. 843-851, 2009.

DA SILVA, H. et al. Surface transformation of silicon-doped hydroxyapatite immersed in culture medium under dynamic and static conditions. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, n. 1, p. 349-355, 2010.

DATTA, H. et al. The cell biology of bone metabolism. **Journal of Clinical Pathology**, v. 61, n. 5, p. 577-587, 2008.

DEN BOER, F. et al. Healing of segmental bone defects with granular porous hydroxyapatite augmented with recombinant human osteogenic protein-1 or autologous bone marrow. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 21, n. 3, p. 521-528, 2003.

DING, T.; SUN, J.; ZHANG, P. Immune evaluation of biomaterials in TNF-alpha and IL-1beta at mRNA level. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 18, n. 11, p. 2233-2236, 2007.

DING, T.; SUN, J.; ZHANG, P. Study on MCP-1 related to inflammation induced by biomaterials. **Biomedical Materials**, v. 4, n. 3, p. 1-4, 2009.

DOROZHKIN, S. Calcium orthophosphates. **Journal of Materials Science**, v. 42, p. 1061-1095, 2007.

DOROZHKIN, S. Calcium Orthophosphates as Bioceramics: State of the Art. **Journal of Functional Biomaterials**, v. 1, p. 22-107, 2010.

DUNBAR, S. Applications of Luminex xMAP technology for rapid, high-throughput multiplexed nucleic acid detection. **Clinica Chimica Acta**, v. 363, n. 1-2, p. 71-82, 2006.

DVOARK, M. et al. Physiological changes in extracellular calcium concentration directly control osteoblast function in the absence of calciotropic hormones. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 14, p. 5140-5145, 2004.

FULMER, M. et al. Measurements of the solubilities and dissolution rates of several hydroxyapatites. **Biomaterials**, v. 23, n. 3, p. 751-755, 2002.

GIBSON, I. et al. Characterization of the transformation from calcium-deficient apatite to beta-tricalcium phosphate. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 11, n. 12, p. 799-804, 2000.

GOLDSTEIN, A. et al. Effect of convection on osteoblastic cell growth and function in biodegradable polymer foam scaffolds. **Biomaterials**, v. 22, n. 11, p. 1279-1288, 2001.

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, p. 23-35, 2003.

GUTH, K. et al. Effects of serum protein on ionic exchange between culture medium and microporous hydroxyapatite and silicate-substituted hydroxyapatite. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 22, n. 10, p. 2155-2164, 2011.

HABIBOVIC, P.; DE GROOT, K. Osteoinductive biomaterials - properties and relevance in bone repair. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 1, n. 1, p. 25-32, 2007.

HADJIDAKIS, D.; ANDROULAKIS, I. Bone remodeling. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1092, p. 385-396, 2006.

HANIFI, A.; FATHI, M. S. H.; VARSHOSAZ, J. Mg²⁺ substituted calcium phosphate nano particles synthesis for non viral gene delivery application. **Journal of Material Science: Materials in Medicine**, v. 21, n. 8, p. 2393-2401, 2010.

HAYLOCK, D.; NILSSON, S. Osteopontin: a bridge between bone and blood. **British Journal of Haematology**, v. 134, p. 467-474, 2006.

HENG, B. et al. Strategies for directing the differentiation of stem cells into the osteogenic lineage in vitro. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 19, n. 9, p. 1379-1394, 2004.

HOFMANN, M. et al. High-strength resorbable brushite bone cement with controlled drug-releasing capabilities. **Acta Biomaterialia**, v. 5, n. 1, p. 43-49, 2009.

HUMMEL, M. et al. Interleukin-6 and interleukin-8 concentrations as predictors of outcome in ventricular assist device patients before heart transplantation. **Critical Care Medicine**, v. 22, n. 3, p. 448-454, 1994.

ISO10993-12. Biological evaluation of medical devices - Part 12: Sample preparation and reference materials. Geneva: [s.n.], 2007.

JIA, J. et al. Development of magnesium calcium phosphate biocement for bone regeneration. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 7, n. 49, p. 1171-1180, 2010.

JONES, J. et al. Proteomic analysis and quantification of cytokines and chemokines from biomaterial surface-adherent macrophages and foreign body giant cells. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 83, n. 3, p. 585-596, 2007.

JUHASZ, J. et al. Biological control of apatite growth in simulated body fluid and human blood serum. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 19, n. 4, p. 1823-1829, 2008.

KAMINTAKAHARA, M.; OHTSUKI, C.; MIYAZAKI, T. Review Paper: Behavior of ceramic biomaterials derived from tricalcium phosphate in physiological condition. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 23, n. 3, p. 197-212, 2008.

KANDORI, K.; MASUNARI, A.; ISHIKAWA, T. Study on adsorption mechanism of proteins onto synthetic calcium hydroxyapatites through ionic concentration measurements. **Calcified Tissue International**, v. 76, n. 3, p. 194-206, 2005.

KANNAN, S. et al. Rietveld structure and in vitro analysis on the influence of magnesium in biphasic (hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate) mixtures. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 90, n. 1, p. 409-411, 2009.

KHOSLA, S. Minireview: The OPG/RANKL/RANK system. **Endocrinology**, v. 142, n. 12, p. 5050-5055, 2001.

KIRKPATRICK, C. et al. Tissue response and biomaterial integration: the efficacy of in vitro methods. **Biomolecular Engineering**, v. 19, n. 2-6, p. 211-217, 2002.

KLAMMERT, U. et al. Phase composition, mechanical performance and in vitro biocompatibility of hydraulic setting calcium magnesium phosphate cement. **Acta Biomaterialia**, v. 6, n. 4, p. 1529-1535, 2010.

KOH, T.; DIPIETRO, L. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 13, n. 23, p. 1-12, 2011.

KOKUBO, T.; TAKADAMA, H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? **Biomaterials**, v. 27, n. 15, p. 2907-2915, 2006.

KONDO, N. et al. Bone formation and resorption of highly purified beta-tricalcium phosphate in the rat femoral condyle. **Biomaterials**, v. 26, n. 28, p. 5600-5608, 2005.

KUENG, W.; SILBER, E.; EPPENBERGER, U. Quantification of cells cultured on 96-well plates. **Analytical Biochemistry**, v. 182, n. 1, p. 16-19, 1989.

LANDI, E. et al. Biomimetic Mg-substituted hydroxyapatite: from synthesis to in vivo behaviour. **Journal of Material Science: Materials in Medicine**, v. 19, n. 1, p. 239-247, 2008.

LANGE, T. et al. Proinflammatory and osteoclastogenic effects of beta-tricalciumphosphate and hydroxyapatite particles on human mononuclear cells in vitro. **Biomaterials**, v. 30, n. 29, p. 5312-5318, 2009.

LANGE, T. et al. Size dependent induction of proinflammatory cytokines and cytotoxicity of particulate beta-tricalciumphosphate in vitro. **Biomaterials**, v. 32, n. 17, p. 4067-4075, 2011.

LEE, J. et al. Cell culture medium as an alternative to conventional simulated body fluid. **Acta Biomaterialia**, v. 7, n. 6, p. 2615-2622, 2011.

LEE, S. et al. Osteoimmunology: cytokines and the skeletal system. **BMB Reports**, v. 41, n. 7, p. 495-510, 2008.

LEGEROS, R. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 395, p. 81-98, 2002.

LI, X. et al. Solubility of Mg-containing beta-tricalcium phosphate at 25 degrees C. **Acta Biomaterialia**, v. 5, n. 1, p. 508-517, 2009.

LIAN, J.; STEIN, G. Concepts of osteoblast growth and differentiation: basis for modulation of bone cell development and tissue formation. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 3, n. 3, p. 269-305, 1992.

MARCHI, J. et al. Influence of Mg-substitution on the physicochemical properties of calcium phosphate powders. **Materials Research Bulletin**, v. 42, n. 6, p. 1040-1050, 2007.

MARQUES, P. Reações de Superfície de Cerâmicos de Fosfato de Cálcio em Plasma Simulado. 196 p. ed. Tese de doutorado apresentada a Universidade de Aveiro: Departamento de Engenharia Cerâmica e do Vidro e Departamento de Química, 2003.

MARTIN, P. Wound healing-aiming for perfect skin regeneration. **Science**, 276, n. 5309, 1997. 75-81.

MEINEL, L. et al. Bone tissue engineering using human mesenchymal stem cells: effects of scaffold material and medium flow. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 32, n. 1, p. 112-122, 2004.

MENG, F.; LOWELL, C. Lipopolysaccharide (LPS)-induced Macrophage Activation and Signal Transduction in the Absence of Src-Family Kinases Hck, Fgr, and Lyn. **Journal of Experimental Medicine**, v. 185, n. 9, p. 1661-1670, 1997.

MONTEIRO, M. et al. Dissolution properties of calcium phosphate granules with different compositions in simulated body fluid. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 65A, n. 2, p. 299-305, 2003.

MOSSER, D. The many faces of macrophage activation. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 73, n. 2, p. 209-212, 2003.

MURAKAMI, Y. et al. Comparative study on bone regeneration by synthetic octacalcium phosphate with various granule sizes. **Acta Biomaterialia**, v. 6, n. 4, p. 1542-1548, 2010.

MURDOCH, C.; FINN, A. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. **Blood**, v. 95, n. 10, p. 3032-3046, 2000.

OMAR, O. et al. The stimulation of an osteogenic response by classical monocyte activation. **Biomaterials**, v. 32, n. 32, p. 8190-8204, 2011.

ONO, N. et al. Osteopontin negatively regulates parathyroid hormone receptor signaling in osteoblasts. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 28, p. 19400-19409, 2008.

OYAJOB, B. et al. Isolation and characterization of human clonogenic osteoblast progenitors immunoselected from fetal bone marrow stroma using STRO-1 monoclonal antibody. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 14, n. 3, p. 351-361, 1999.

PLUNKETT, N.; O'BRIEN, F. Bioreactors in tissue engineering. **Technology and Health Care**, v. 19, p. 55-69, 2011.

PONCHE, A.; BIGERELLE, M.; ANSELME, K. Relative influence of surface topography and surface chemistry on cell response to bone implant materials. Part 1: physico-chemical effects. **Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine**, v. 224, n. 12, p. 1471-1486, 2010.

RAUH, J.; MILAN, F.; GUNTHER, K. S. M. Bioreactor systems for bone tissue engineering. **Tissue Engineering: Part B**, v. 14, n. 4, p. 263-280, 2011.

RIVOLLIER, A. et al. Immature dendritic cell transdifferentiation into osteoclasts: a novel pathway sustained by the rheumatoid arthritis microenvironment. **Blood**, v. 104, n. 13, p. 4029-4037, 2004.

RUDE, R.; GRUBER, H. Magnesium deficiency and osteoporosis: animal and human observations. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 15, n. 12, p. 710-716, 2004.

SADER, M.; LEGEROS, R.; SOARES, G. Human osteoblasts adhesion and proliferation on magnesium-substituted tricalcium phosphate dense tablets. **Journal of Material Science: Materials in Medicine**, v. 20, n. 2, p. 521-527, 2009.

SCHUTTE, R.; PARISI-AMON, A.; REICHERT, W. Cytokine profiling using monocytes/macrophages cultured on common biomaterials with a range of surface

chemistries. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 88, n. 1, p. 128-139, 2009.

SEIBEL, M. Biochemical markers of bone turnover: part I: biochemistry and variability. **Clinical Biochemist Reviews**, v. 26, n. 4, p. 97-122, 2005.

SEON, J. et al. Stem cells in bone tissue engineering. **Biomedical Materials**, v. 5, n. 6, p. 1-15, 2010.

SHADANBAZ, S.; DIAS, G. Calcium phosphate coatings on magnesium alloys for biomedical applications: a review. **Acta Biomaterialia**, v. 8, n. 1, p. 20-30, 2012.

SHIRATORI, K. et al. Bone formation in beta-tricalcium phosphate-filled bone defects of the rat femur: morphometric analysis and expression of bone related protein mRNA. **Biomedical Research**, v. 26, n. 2, p. 51-59, 2005.

SHU, R. et al. Hydroxyapatite accelerates differentiation and suppresses growth of MC3T3-E1 osteoblasts. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 67, n. 4, p. 1196-1204, 2003.

STEVENS, B. et al. A review of materials, fabrication methods, and strategies used to enhance bone regeneration in engineered bone tissues. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 85, n. 2, p. 573-582, 2008.

SUBBIAHDOSS, G. et al. In Vitro Interactions between Bacteria, Osteoblast-Like Cells and Macrophages in the Pathogenesis of Biomaterial-Associated Infections. **PLoS ONE**, v. 6, n. 9, p. 1-8, 2011.

TAKAMORI, E. et al. Effect of roughness of zirconia and titanium on fibroblast adhesion. **Artificial Organs**, v. 32, n. 4, p. 305-309, 2008.

TARDEI, C. et al. The study of Mg²⁺ /Ca²⁺ substitution of β -tricalcium phosphate. **Journal of optoelectronics and advanced materials**, v. 8, n. 2, p. 568-571, 2006.

THEOLEYRE, S. et al. The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 15, n. 6, p. 457-475, 2004.

THIRUNAVUKKARASU, K. et al. The osteoblast-specific transcription factor Cbfa1 contributes to the expression of osteoprotegerin, a potent inhibitor of osteoclast differentiation and function. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 33, p. 25163-25172, 2000.

TRINDADE, M. et al. Interleukin-10 inhibits polymethylmethacrylate particle induced interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha release by human monocyte/macrophages in vitro. **Biomaterials**, v. 22, n. 15, p. 2067-2073, 2001.

VALLET-REGI, M.; GONZALEZ-CALBET, J. Calcium phosphates as substitution of bone tissues. **Progress in Solid State Chemistry**, v. 32, n. 1-2, p. 1-31, 2004.

VIGNERY, A. Macrophage fusion: the making of osteoclasts and giant cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 202, n. 3, p. 337-340, 2005.

WANG, Y. et al. Application of perfusion culture system improves in vitro and in vivo osteogenesis of bone marrow-derived osteoblastic cells in porous ceramic materials. **Tissue Engineering**, v. 9, n. 6, p. 1205-1214, 2003.

WATANABE, I. et al. TLR2-mediated survival of Staphylococcus aureus in macrophages: a novel bacterial strategy against host innate immunity. **Journal of Immunology**, v. 178, n. 8, p. 4917-4925, 2007.

WOLF, F.; CITTADINI, A. Chemistry and biochemistry of magnesium. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 24, n. 1-3, p. 3-9, 2003.

WOPENKA, B.; PASTERIS, J. A mineralogical perspective on the apatite in bone. **Materials Science and Engineering C**, v. 25, p. 131-143, 2005.

XIA, Z.; TRIFFITT, J. A review on macrophage responses to biomaterials. **Biomedical Materials**, v. 1, p. R1-R9, 2006.

YANG, H. et al. Dissolution characteristics of extrusion freeformed hydroxyapatite–tricalcium phosphate scaffolds. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 19, n. 11, p. 3345-3353, 2008.

YU, X. et al. Bioreactor-based bone tissue engineering: the influence of dynamic flow on osteoblast phenotypic expression and matrix mineralization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 101, n. 31, 2004. 11203-11208.

ZHANG, Z. et al. Cell-based resorption assays for bone graft substitutes. **Acta Biomaterialia**, v. 8, n. 1, p. 13-19, 2012.

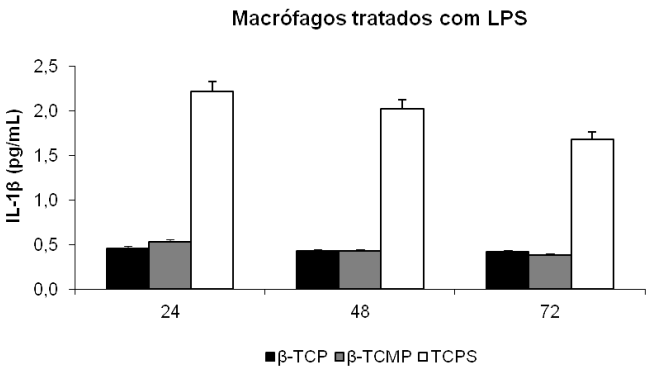
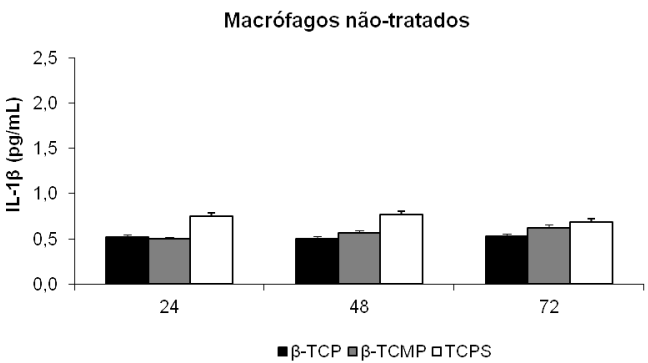
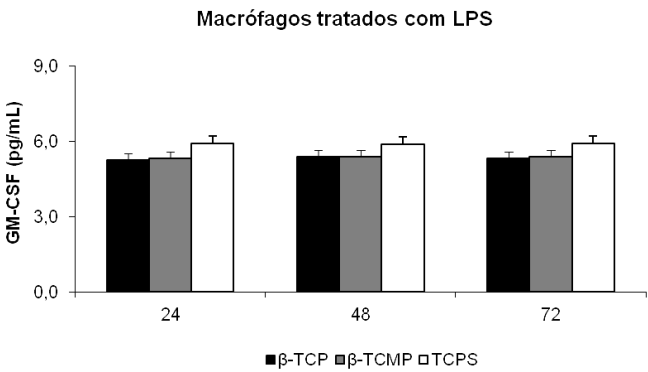
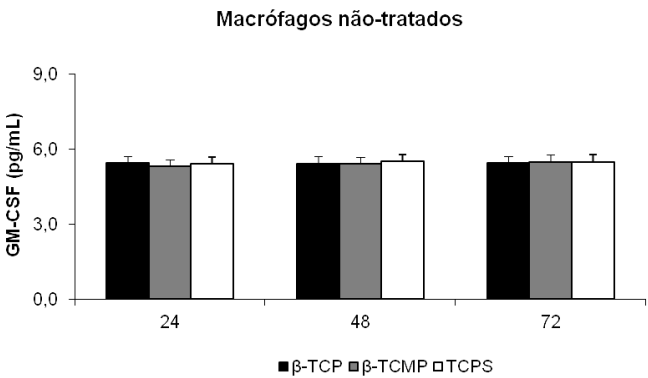
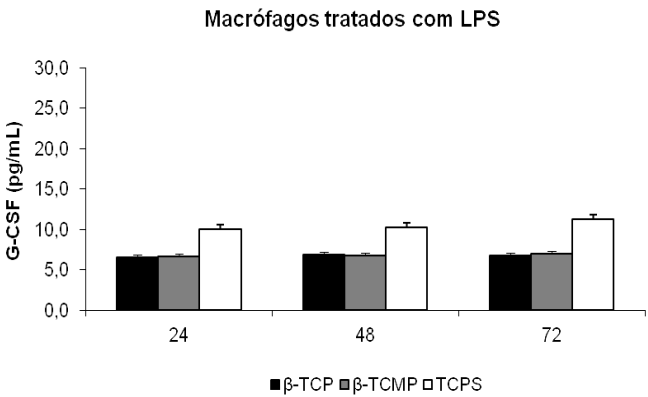
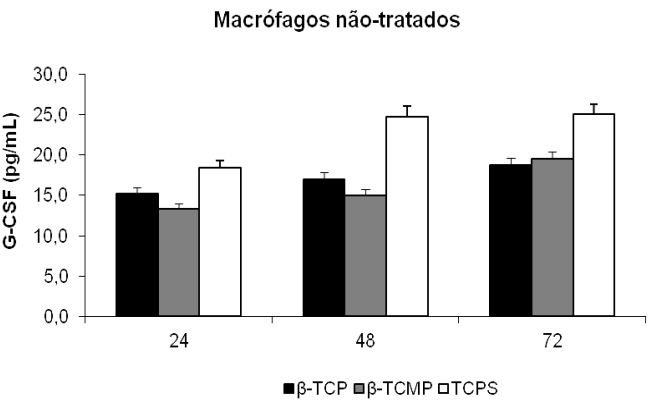
ZHAO, S. et al. Effects of magnesium-substituted nanohydroxyapatite coating on implant osseointegration. **Clinical Oral Implants Research**, v. 6, p. 1-8, 2011.

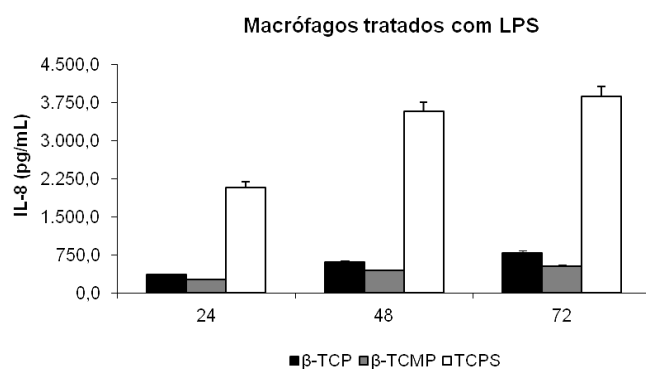
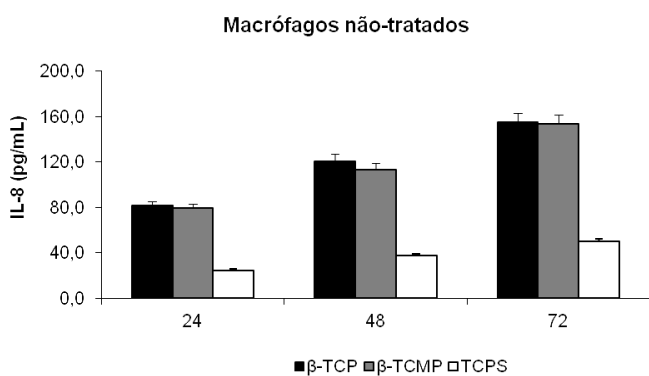
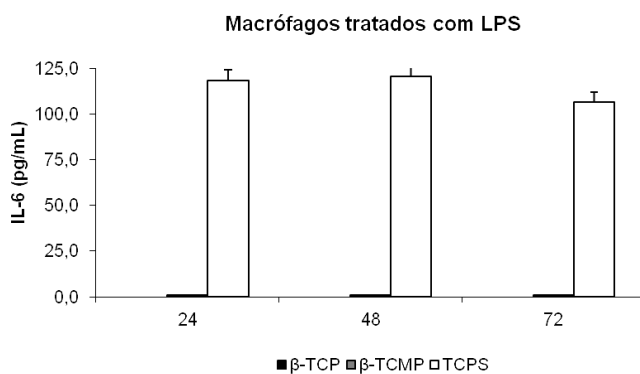
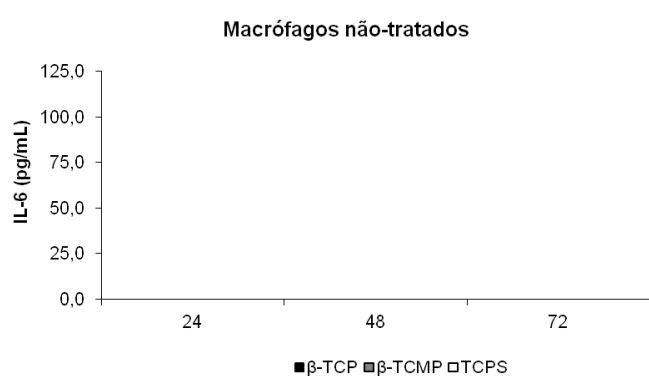
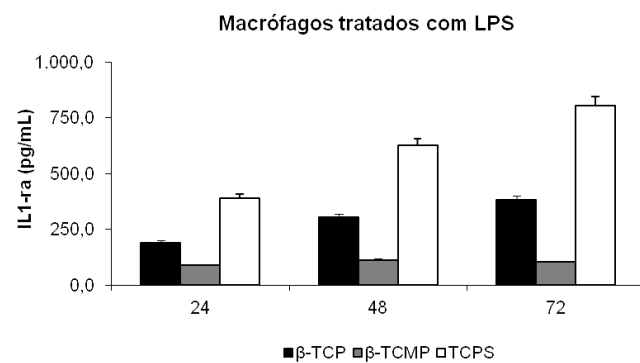
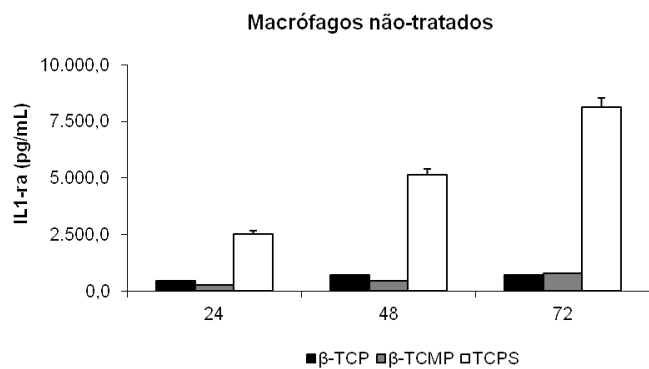
ZHAO, W. et al. The self-setting properties and in vitro bioactivity of tricalcium silicate. **Biomaterials**, v. 26, n. 31, p. 6113-6121, 2005.

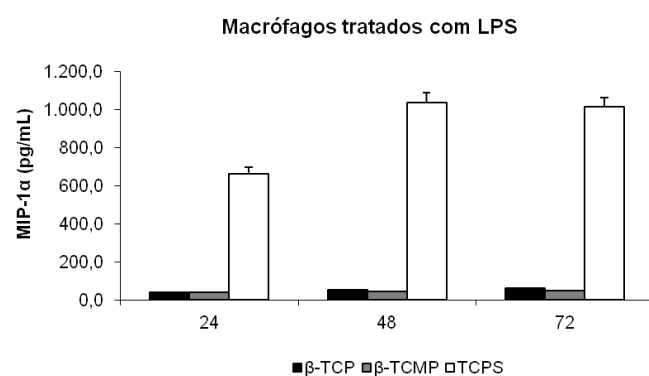
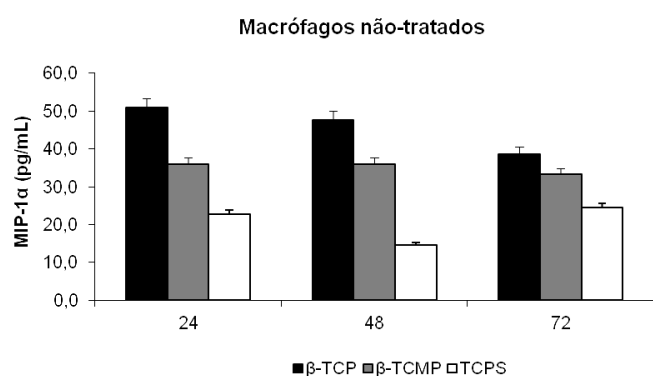
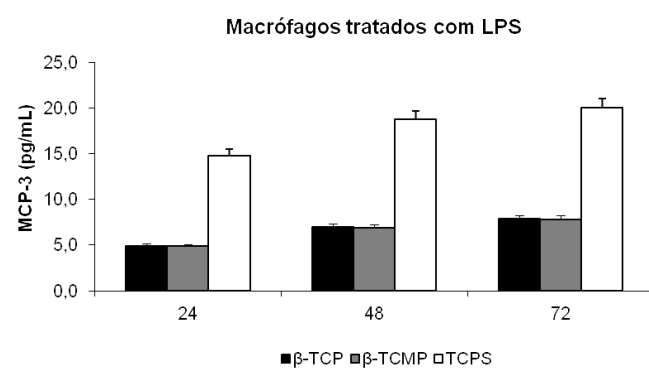
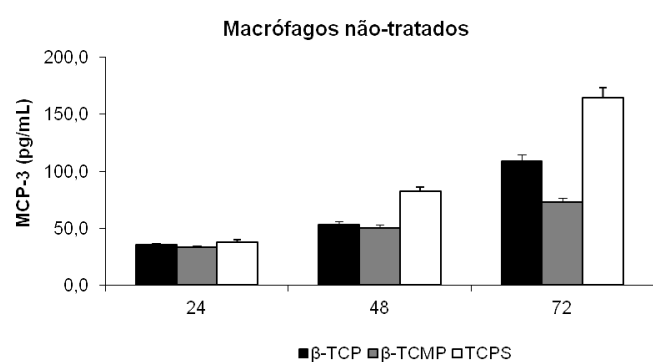
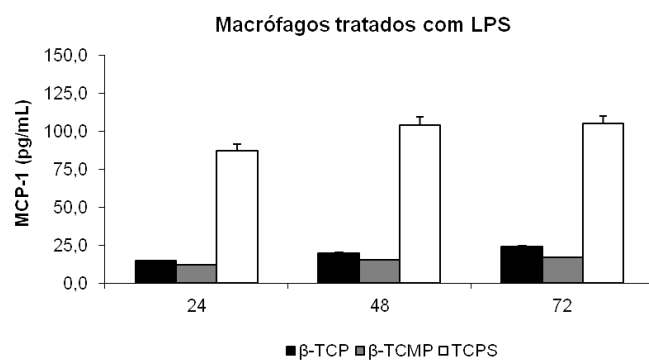
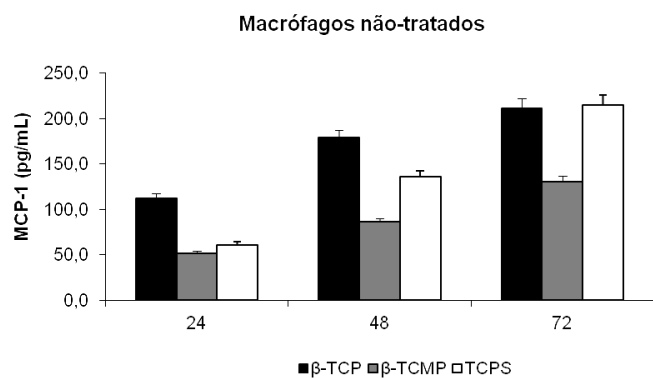
ZIMMERLI, I. W.; SENDI, P. Pathogenesis of implant-associated infection: the role of the host. **Seminars in Immunopathology**, v. 33, n. 3, p. 295-306, 2011.

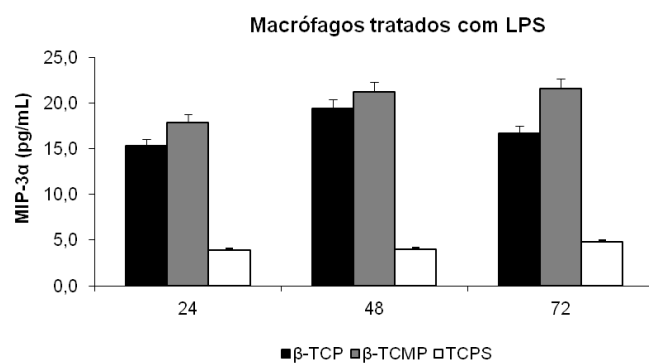
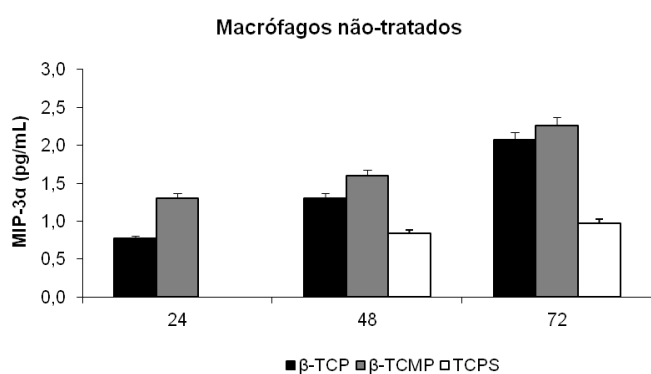
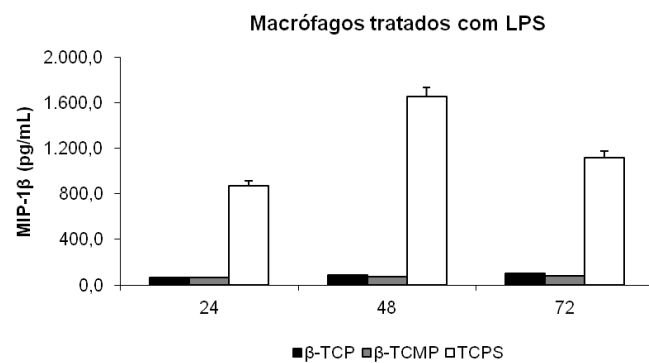
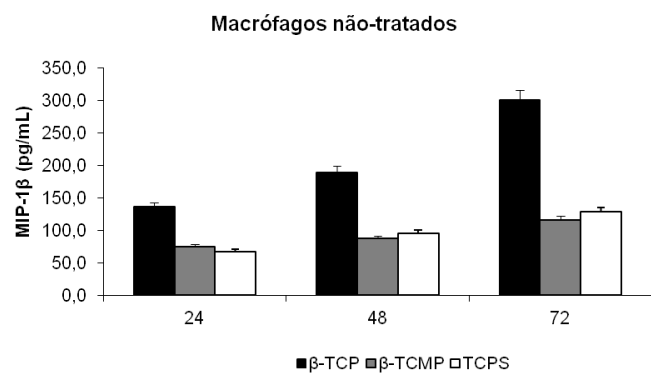
ANEXO I

Dados brutos da concentração das citocinas detectadas no sobrenadante de macrófagos cultivados com extrato dos biomateriais (média com desvio padrão).









ANEXO II

CONVENÇÃO DE CO-TUTELA DE TESE

Entre as Universidade de Haute-Alsace e Universidade Federal do Rio de Janeiro

Favorecida: Debora dos Santos TAVARES

Vistas as disposições legais em vigor no Rio de Janeiro e no Brasil.

Vistas as disposições legais e regulamentares francesas que regem a cooperação entre as instituições públicas em caráter científico, cultural e profissional com outras instituições públicas ou privadas, na França e no estrangeiro, e em particular:

- O código de educação, em especial os artigos L. 123-7, L. 612-7, D. 123-12, D. 123-13 e D. 123-14,
- O decreto modificado n° 2002-482 em aplicação ao sistema francês de ensino superior da construção do espaço europeu de ensino superior,
- O despacho de 25 de setembro de 1985, relativo às regras de apresentação, comunicação e reprodução de teses ou trabalho apresentado na defesa de tese de doutorado,
- O despacho de 7 de Agosto de 2006, sobre os estudos de doutoramento,
- Os despachos de 06 de janeiro de 2005 e de 07 de agosto de 2006, relativa à co-tutela internacional de tese,
- O parecer do Conselho Nacional de Educação Superior e de Pesquisa de 15 de novembro de 2004.

A Universidade de Haute Alsace (UHA)

sediada na rua Frères Lumière, n° 2, Mulhouse, 68.093, França, representada por seu Presidente Professor Alain Brillard,

e a Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

sediada na Avenida Pedro Calmon, n° 550 - Prédio da Reitoria, Cidade Universitária, Rio de Janeiro, 21941-901, Rio de Janeiro, RJ, Brasil,

animadas pelo desejo comum de desenvolver sua cooperação científica através da mobilidade de seus estudantes de doutorado,

adotam as seguintes medidas relativas à preparação de uma tese em co-tutela por

Debora dos Santos Tavares

abaixo designada por "a Doutoranda".

I - PROCEDIMENTOS ADMINISTRATIVOS

Artigo 1º

A contar do ano letivo 2009-2010 e por uma duração prevista de três anos (*), é posto em prática um processo de co-tutela de tese em favor de

Debora dos Santos Tavares

nascida em 12 de março de 1982, no Rio de Janeiro (Brasil) domiciliada na Rua Barao de Mesquita, 909/904, Grajaú, 20540-002, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Abaixo designada “**a Doutoranda**”, Mestre em Patologia.

A proposta de tese apresentado pela Doutoranda (): Estudo *in vitro* do fosfato tricálcico e do fosfato tricálcico contendo magnésio com osteoblastos e monócitos/macrófagos humanos.**

() Como exceção, um ano suplementar poderá ser concedido pelos presidentes das duas instituições sob proposta conjunta dos dois orientadores.*

*(**) Para os Doutorandos provenientes de fora do Espaço Europeu de Educação a dispensa do título de mestrado pode ser concedida aos candidatos que tenham concluído e validado os estudos universitários correspondentes, no mínimo, ao Bac +5, tendo já completado os créditos teóricos e/ou experimentais em nível equivalente ao grau de mestre e que possa justificar uma iniciação à pesquisa que conduziu a uma publicação ou monografia. Em todos os casos, esta monografia (mesmo em caráter confidencial) deverá ser apresentada junto com o processo de pedido de dispensa.*

*(***) No que corresponde à UHA, a proposta de tese, proposta conjuntamente pelos dois co-orientadores, é detida sob a responsabilidade dos chefes das instituições principais, após a consulta à Secretaria responsável pela Escola de Pós-Graduação.*

Artigo 2º

A preparação do doutorado se efetuará tanto na UHA quanto na UFRJ, por períodos alternados de trabalho igualmente divididos entre as duas universidades parceiras, na França e no Brasil. No âmbito do acordo CAPES-COFECUB No. 628/09 relativo ao programa de cooperação entre a UFRJ e UHA durante o período de 2008-2012 o seguinte calendário foi aprovado (*):

Ano Letivo 2009 - 2010: UFRJ

Ano Letivo 2010 - 2011: UHA

Ano Letivo 2011 - 2012: UFRJ

Em caso de prorrogação por um período suplementar, uma solicitação formal às duas universidades deverá ser efetuada.

Sob reserva dos dispositivos previstos no artigo 13, uma modificação da duração desses períodos poderá ser autorizada pelas duas universidades parceiras (no que diz respeito à

UHA pela Escola de Doutorado) com base nas necessidades materiais ou oportunidades científicas que apareçam durante o andamento do trabalho.

() Todo o período passado em um só país não poderá ser inferior à 30%.*

Artigo 3º

Na UHA, a Doutoranda trabalhará no Instituto de Ciência dos Materiais de Mulhouse (IS2M) e na UFRJ, no Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais (PEMM/COPPE).

A Doutoranda deverá estar inscrita obrigatoriamente nas duas instituições parceiras. Quanto à UHA, esta inscrição administrativa na Secretaria de serviço escolar deverá ser renovada no início de cada ano escolar.

Cada ano, as taxas de inscrição serão pagas à instituição onde a Doutoranda permanecerá principalmente durante o ano letivo considerado, de acordo com os períodos de trabalho comumente definidos no artigo 2. No entanto, cada instituição irá recolher as taxas de inscrição pelo menos uma vez durante os três anos de tese. A instituição parceira concordará, mediante apresentação de justificativas apropriadas, em isentar as taxas de inscrição durante este período. Assim:

- Para o ano letivo 2009 - 2010, serão pagas à UFRJ
- Para o ano letivo 2010 - 2011, serão pagas à UHA
- Para o ano letivo 2011 - 2012, serão pagas à UFRJ
- Em caso de prorrogação por um período suplementar através de solicitação, a taxa de inscrição deverá ser paga à universidade correspondente.

Durante a primeira inscrição de Doutorado, a carta de acesso às teses da UHA e a carta de informática deverão ser assinadas pela Doutoranda, seus orientadores de tese, pelo diretor da Escola de Doutorado e pelo responsável do laboratório. A Doutoranda também deverá assinar um acordo de confidencialidade.

Artigo 4º

Durante sua estadia na UHA, a Doutoranda se inscreverá no Sistema de Seguridade Social, ~~sob regime de estudante~~(*). 

() Na França, a cobertura social da Doutoranda deverá ser fornecida por uma cotização para a Seguridade Social, sob a responsabilidade da Doutoranda, paga durante o processo de inscrição na UHA.*

- *Se a Doutoranda está inscrita antes da idade limite de 28 anos, ela poderá ainda ser beneficiada por uma duração máxima de quatro anos, na Seguridade social de estudante (artigos 381-4, R381 e R381-5-7 do código de Seguridade Social). Em complemento, recomenda-se a adesão a um Sistema de Seguridade para estudantes.*
- *A Doutoranda deverá inscrever-se em um seguro voluntário juntamente à Seguridade Social (seguridade à doença, despesas de saúde, morte, invalidez, incapacidade para o trabalho).*

Adicionalmente, a Doutoranda deverá obter um contrato de Seguridade de

Responsabilidade Civil. As justificativas correspondentes serão divulgadas no momento da inscrição na UHA.

Artigo 5 °

O alojamento da Doutoranda deverá estar assegurado, na medida do possível, pelos serviços competentes da universidade oferecidos em cada país.

No mais, a UFRJ, universidade de origem da Doutoranda, se esforçará em fornecer um financiamento recorrente. Em qualquer caso, durante a estadia na UHA, o financiamento, deverá ser fornecido por fontes brasileiras e pelo menos igual ao oferecido pelo governo francês aos doutorandos estrangeiros, consistindo em um montante mínimo de R\$ 10.000,00 oriundo do projeto CAPES / COFECUB e um montante adicional de R\$ 20.000 oriundo de financiamentos pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

II – MODALIDADES PEDAGOGICAS

Artigo 6 °

A tese será preparada sob a co-orientação da Doutora Karine ANSELME na UHA, e da Professora Doutora Glória Dulce de Almeida SOARES e Professor Doutor José Mauro Granjeiro na UFRJ, que se comprometem a assumir a responsabilidade conjunta e solidariamente em relação à Doutoranda.

Durante o período de permanência na UHA, a Doutoranda participará dos cursos de formação, palestras, seminários e cursos organizados pela Escola de Doutorado. Durante o período de permanência na UFRJ, ela deverá estar presente aos cursos de formação, palestras, seminários e cursos que serão organizados. Em qualquer caso, a autorização da defesa de tese será emitida pela parte francesa, se a Doutoranda frequentar os cursos de formação da Escola de Doutorado da UHA, proporcional a sua estadia na UHA.

Artigo 7 °

A defesa oral da tese será organizada segundo às leis e os costumes em vigor na UFRJ, onde ela será feita. As duas instituições, em conjunto, decidirão a composição do júri sobre a proposta dos orientadores da tese. A defesa só poderá ser realizada após a obtenção do consentimento de ambas as universidades parceiras.

Artigo 8 °

A comissão para a defesa de tese deverá incluir:

- Pelo menos um representante de cada um das duas instituições parceiras.
 - Pelo menos dois cientistas externos às duas instituições.
- Deverá ser composta por 5-8 membros. Todos os membros da comissão deverão ser doutores e metade deles, pelo menos, deverá ser habilitado a orientar pesquisas em nível

de doutorado. As regras universitárias em vigor na universidade UFRJ (especialmente a decisão do CPEG nº 06/01), serão respeitadas.

Artigo 9 °

A tese será escrita em Português e será acompanhada por um resumo contendo pelo menos duas páginas por capítulo em francês. Deverá ser feita uma menção à co-tutela e aos dois diplomas que serão obtidos. A defesa da tese será em Português, na UFRJ, na qual o resumo da tese será apresentado oralmente em francês.

Artigo 10 °

Um único relatório será elaborado após a defesa (*). Ele deverá ser traduzido em francês.

Sobre a proposta da comissão de defesa:

A Universidade da Haute-Alsace conferirá ao candidato o grau de doutor. De acordo com a legislação francesa em vigor, será atribuído o diploma de Doutor da Universidade da Haute-Alsace, no qual será atribuído uma indicação da especialidade ou disciplina, o título da tese, uma referência à co-tutela internacional, nomes e títulos dos membros da comissão e a data da defesa.

- A UFRJ emitirá o diploma de Doutor em Ciências em Engenharia Metalúrgica e de Materiais (área de concentração: Biomateriais), em conformidade com a regulamentação e práticas em vigor no Brasil.

() A referência à co-tutela e a menção de ambos os títulos obtidos deverão estar incluídos na ata de defesa da tese.*

Artigo 11 °

O arquivamento, comunicação e reprodução da tese serão efetuados na França e, possivelmente, no país parceiro, de acordo com a regulamentação em vigor.

Artigo 12 °

A proposta de tese, assim como a publicação, a exploração e a proteção dos resultados da pesquisa oriundas do trabalho da Doutoranda nas duas instituições serão realizadas de comum acordo entre os dirigentes de ambos os laboratórios parceiros em conformidade com as regulamentações existentes e procedimentos específicos para cada país. Qualquer litígio será resolvido por mútuo acordo entre os presidentes (ou seus representantes) de ambas as instituições parceiras.

Artigo 13 °

Em caso de alterações ou ajustes necessários durante a preparação da tese de doutorado, uma emenda à presente Convenção será adotada em conformidade com as exigências atuais de ambos os países e suas modalidades de inscrição ao doutorado.

Carimbos das instituições, nomes e assinaturas:

Feito em 5 exemplares originais em francês e em 5 exemplares originais em português.

Mulhouse, 16 juillet 2010.

Debora dos Santos TAVARES


Doutoranda

Rio de Janeiro,

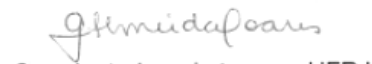
Dra. Karine ANSELME


Co-orientadora da tese na UHA

Prof. Dr. José Mauro Granjeiro


Co-orientador da tese na UFRJ

Profa. Dra. Gloria D. de Almeida SOARES


Co-orientadora da tese na UFRJ

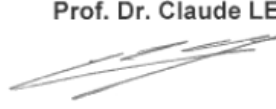
Profa. Dra. Cathie VIX


Diretora do IIS2M (UHA)

Prof. Dr. Luis Marcelo TAVARES

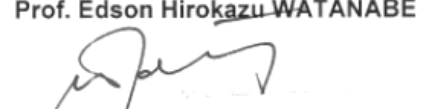

Coordenador do PEMM (UFRJ)

Prof. Dr. Claude LE DRIAN


Diretor da Escola de Doutorado Jean-Henri Lambert (UHA)



Prof. Edson Hirokazu WATANABE


Diretor Acadêmico da COPPE (UFRJ)

Prof. Alain BRILLARD

Pour le Président et par délégation
Le Vice-président

Pr. B. DURAND
Presidente da UHA



Prof. Aloisio TEIXEIRA


Reitor da UFRJ
Pro-Reitor de Pós-Graduação e Pesquisa
Rio de Janeiro 2010