

Juliana Almeida Domingues

**“Influência dos “*whiskers*” de Wollastonita em
Cimento de Fosfato de Cálcio no comportamento de
células osteoblásticas”**

Campinas, 2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

Juliana Almeida Domingues

**“Influência dos “whiskers” de Wollastonita em
Cimento de Fosfato de Cálcio no comportamento
de células osteoblásticas”**

Este exemplar corresponde à redação final
da Dissertação defendida pela candidata
Juliana Almeida Domingues
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biologia da
UNICAMP para obtenção do
Título de Mestra em Biologia
Celular e Estrutural, na área de
Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. José Angelo Camilli
Coorientadora: Profa. Dra. Eliana Aparecida Rezende Duek



Campinas, 2013

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

D713i Domingues, Juliana Almeida, 1986-
Influência dos "*whiskers*" de wollastonita em cimento de fosfato de cálcio no comportamento de células osteoblásticas / Juliana Almeida Domingues. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: José Angelo Camilli.
Coorientador: Eliana Aparecida de Rezende Duek.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Fosfato de cálcio. 2. Proliferação de células. 3. Wollastonita. I. Camilli, José Angelo, 1963-. II. Duek, Eliana Aparecida de Rezende. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Influence of "*whiskers*" of wollastonite in calcium phosphate cement behavior of osteoblastic cell

Palavras-chave em inglês:

Calcium phosphate

Cell proliferation

Wollastonite

Área de concentração: Biologia Celular

Titulação: Mestra em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

José Angelo Camilli [Orientador]

Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira

Cecília Amélia Carvalho Zaváglia

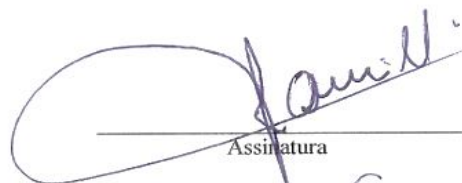
Data de defesa: 29-07-2013

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural

Campinas, 29 de julho de 2013.

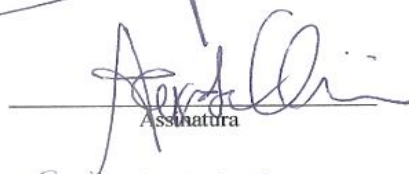
BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Angelo Camilli (Orientador)



Assinatura

Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira



Assinatura

Profa. Dra. Cecília Amélia Carvalho Zavaglia



Assinatura

Profa. Dra. Moema de Alencar Hausen

Assinatura

Prof. Dr. Wagner Jose Favaro

Assinatura

DEDICATÓRIA

“Dedico este trabalho a minha filha Mariane por ter que compreender minha ausência e me dar forças e motivo para lutar. Que meu esforço sirva de exemplo em sua trajetória”.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador José Angelo Camilli, por me receber como sua aluna acreditando em meu trabalho.

À minha co-orientadora Eliana Ap. de Rezende Duek, primeiramente pela amizade, por sempre acreditar em meu trabalho, por todo incentivo e por disponibilizar seu laboratório.

À minha família por me ajudarem com minha filha.

À minha querida filha por ser o motivo para eu querer sempre progredir.

A todos os amigos do Laboratório de Biomateriais, pois cada um contribuiu de alguma forma para realização desse trabalho, em especial ao André, por todo conhecimento compartilhado e paciência e a Adriana por me ajudar com a correção desse trabalho.

Ao professor Bertran pela paciência, ensinamentos e por acreditar em meu trabalho.

À Mariana Motisuke por desenvolver os materiais testados nesse trabalho e ajudar com a compreensão desses.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural.

À CAPES/DS pela bolsa de mestrado e ao auxílio financeiro da CAPES/PROAP.

À Líliam pela competência e cuidados com as documentações exigidas.

SUMÁRIO

1. ASPECTOS GERAIS	1
2. LITERATURA	4
2.1 TECIDO ÓSSEO	4
2.2 BIOMATERIAIS PARA REPARO ÓSSEO.....	7
2.3 CIMENTO DE FOSFATOS DE CÁLCIO.....	8
2.4 REFORÇO COM “WHISKERS” DE WOLLASTONITA.....	10
2.5 INTERAÇÃO DAS CÉLULAS COM OS BIOMATERIAIS	12
3. OBJETIVOS.....	17
3.1 OBJETIVOS GERAIS.....	17
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
4. MATERIAIS E MÉTODOS	18
4.1 PREPARAÇÃO DOS CIMENTOS DE FOSFATO DE CÁLCIO PARA CULTURA CELULAR	18
4.2 ISOLAMENTO DAS CÉLULAS OSTEOBLÁSTICAS.....	18
4.3 VIABILIDADE CELULAR	19
4.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	20
4.5 ATIVIDADE DA FOSFATASE ALCALINA	20
4.6 QUANTIFICAÇÃO DE CÁLCIO.....	21
4.7 EXPRESSÃO DE OSTEOCALCINA.....	21
ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	22
5. RESULTADOS.....	23
5.1 VIABILIDADE CELULAR	24
5.2 MORFOLOGIA CELULAR	27
5.3 ATIVIDADE DA FOSFATASE ALCALINA	28
5.4 PRODUÇÃO DE MATRIZ MINERALIZADA	28
5.5 EXPRESSÃO DE OSTEOCALCINA	30
DISCUSSÃO.....	31
CONCLUSÕES	37
REFERÊNCIAS	38

‘LISTA DE ABREVIATURAS

CFC	Cimento de Fosfato de Cálcio
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	dimetil sulfóxido
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FAC	Fosfatase Alcalina
CDHA	Hidróxiapatita Deficiente em Cálcio
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil brometo de tetrazólio
PBS	“Phosphate Buffered Saline”
RGD	arginina – lisina – ácido aspártico
RT-PCR	“Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction”
SFB	Soro Fetal Bovino
α TCP	α -Fosfato Tricálcico
β TCP	β -Fosfato Tricálcico

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. ESQUEMA ILUSTRANDO A MONTAGEM DAS FIBRILAS E FIBRAS DE COLÁGENO ASSOCIADAS AOS CRISTAIS DE HIDROXIAPATITA.....	5
FIGURA 2. ESQUEMA ILUSTRANDO A DISPOSIÇÃO DAS GLICOPROTEÍNAS OSTEOLACINA E OSTEOPONTINA NA MATRIZ EXTRACELULAR ÓSSEO.	66
FIGURA 3. ESQUEMA DO PAPEL DAS INTEGRINAS MEDIANDO AS INTERAÇÕES ENTRE A MATRIZ EXTRACELULAR E O CITOESQUELETO.	13
FIGURA 4. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO FENÔMENO QUE OCORRE NA SUPERFÍCIE DA HIDROXIAPATITA APÓS IMPLANTE.	14
FIGURA 5. EXPLANTE DAS CÉLULAS OSTEOLÁSTICAS, APÓS TRÊS DIAS DE CULTURA, VISUALIZADAS ATRAVÉS DE UM MICROSCOPIA DE LUZ	23
FIGURA 6. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DOS ENSAIOS DE MTT, APÓS 1 E 4 DIAS DE CULTIVO CELULAR.....	22
FIGURA 7. CÉLULAS OSTEOLÁSTICAS CULTIVADAS: NA PLACA DE POLIESTIRENO (A); CDHA PURA APÓS 24 HORAS DE CULTIVO (B) E (C) CDHA PURA APÓS QUATRO DIAS DE CULTIVO.....	23
FIGURA 8. MUDANÇA DE PH PROVOCADA PELAS CDHAS QUANDO EM CONTATO COM O DMEM PURO APÓS 24 HORAS DE INCUBAÇÃO EM ESTUFA CONTENDO 5% DE CO ₂ A 37°C.	225
FIGURA 9. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DOS ENSAIOS DE MTT, APÓS 1, 7 E 14 DIAS DE CULTIVO CELULAR.....	24
FIGURA 10. MICROGRAFIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DAS AMOSTRAS DE CDHA, SEM “WHISKERS” DE WOLLASTONITA, COM 5% DE “WHISKERS” DE WOLLASTONITA E COM 10% “WHISKERS” DE WOLLASTONITA, APÓS 1, 7 E 14 DIAS DE CULTIVO CELULAR.....	25

FIGURA 11. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA CONCENTRAÇÃO DE FOSFATASE ALCALINA ATIVA, APÓS 7, 10 E 14 DIAS DE CULTIVO CELULAR.	26
FIGURA 12. QUANTIFICAÇÃO DE CÁLCIO ATRAVÉS DO ENSAIO DE ALIZARIN RED APÓS 14 DIAS DE CULTIVO CELULAR NBOS CIMENTOS.	27
FIGURA 13. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA CONCENTRAÇÃO DE OSTEOCALCINA, APÓS 7, 10 E 14 DIAS DE CULTIVO CELULAR.	28

LISTA DE TABELA

TABELA 1: CLASSIFICAÇÃO DE ALGUNS FOSFATOS DE CÁLCIO (HENCH, 1999). 8

RESUMO

“Influência dos “whiskers” de Wollastonita em Cimento de Fosfato de Cálcio no comportamento de células osteoblásticas”

Cimentos de fosfato de cálcio (CFC) a base de α -TCP, que originam como processo final de cura uma hidroxiapatita deficiente em cálcio (CDHA) são muito utilizados como biomateriais para osso, por possuírem similaridade estrutural e química à porção inorgânica do tecido ósseo. Porém o uso dos CFC se restringe a pequenos defeitos bucomaxilofaciais e recobrimento de próteses metálicas, em função do déficit considerável de suas propriedades mecânicas. Visando melhorar as propriedades mecânicas dos CFCs estudos têm sido direcionados à aplicação de fibras de vários materiais, como as fibras de carbono, as fibras de vidro, as de carboneto, entre outras. No entanto, muitas dessas fibras introduzidas se mostraram tóxicas às células, impedindo sua aplicação clínica. Recentemente, os “whiskers” (fibras curtas de monocristal) de biocerâmicas vêm sendo estudados como outro tipo de reforço, cujos resultados têm se mostrado promissores por melhorarem as propriedades mecânicas e biológicas dos materiais. Nesse trabalho, a resposta biológica das CDHA pura e contendo 5 e 10% de “whiskers” de wollastonita, foram estudadas através de um sistema de cultivo celular com células osteoblásticas, o qual tem sido muito utilizado para elucidar a resposta celular em biomateriais. Porém cultivar células em CDHAs não é uma tarefa fácil, pois o processo de hidrólise sofrido por esses materiais promove a liberação de íons para o meio de cultura, o que acarreta na mudança de pH e concentração iônica do meio. Essas mudanças promoveram a morte das células após 48h de cultivo. Foi possível manter as células viáveis ao longo do tempo realizando a lavagem dos discos de CDHA com DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) antes da semeadura e também com a troca diária do meio de cultura. Nossos resultados demonstraram que as CDHA contendo “whiskers” foram capazes de estimular a proliferação celular quando comparadas com a placa de poliestireno e a CDHA pura. No ensaio de MEV foi possível observar uma densa camada celular na superfície da CDHA contendo 10% de “whiskers”. A atividade da fosfatase alcalina (FAC) foi significativamente maior nas CDHAs contendo “whiskers”, sendo proporcional a concentração de “whiskers” wollastonita nas amostras, o ensaio de

mineralização corroborou com o ensaio de FAC, no qual a CDHA contendo 10% de “whiskers” apresentou maior produção de matriz mineralizada. Tendo-se em vista os presentes resultados pode-se dizer que as CDHA contendo “whiskers” de wollastonita são biomateriais promissores para engenharia tecidual óssea, pois foram capazes de estimular a proliferação e diferenciação celular, além da resistência mecânica melhorada pela adição dos “whiskers”.

Palavras-chave - α -TCP, cimentos de fosfato de cálcio, proliferação celular, wollastonita.

ABSTRACT

“Influence of "whiskers" of wollastonite in Calcium Phosphate Cement behavior of osteoblastic cells”

Calcium phosphate cements (CFCs) are widely used as biomaterials for bone because they have chemical and structural similarity to the inorganic portion of bone tissue. But the use of CFCs is restricted to maxillofacial small defects and coating metallic prostheses, due to the considerable deficit of its mechanical properties. In order to improve the mechanical properties of CFCs studies have focused on the application of fibers of many materials such as carbon fibers, glass fibers, carbide fibers among others. However, many of these fibers are shown toxic to the cells, preventing their clinical application. Recently, the "whiskers" (short crystal fibers) of bioceramics have been studied as another type of reinforcement and the results have shown promise for improving the mechanical and biological properties of materials. In this work the biological response of hydroxyapatites deficient in calcium (CDHA) pure and containing 5 and 10% “whiskers” of wollastonite, were studied using a cell culture system with osteoblastic cells, which has long been used to elucidate the cell behavior in biomaterials. However cultivating cells in CDHAs is not an easy task because the hydrolysis process undergone by such materials promotes the release of ions to the culture medium, which results in the change of pH and ionic concentration of the medium. These changes promoted cell death after 48 h of cultivation. Cell viability was maintained for 14 days by a simple washing of CDHA discs with DMEM before cell culture and also with daily changes of culture medium. Our results demonstrate that CDHA containing “whiskers” were able to stimulate cell proliferation when compared to the polystyrene plate and CDHA pure. In the assay by SEM was possible to see a dense cell layer on the surface of the CDHA containing 10% "whisker." The alkaline phosphatase activity (ALP) was significantly higher in CDHAs containing “whiskers” being proportional to the concentration of “whiskers” wollastonite samples. The mineralization assay corroborated with ALP assay in which the CDHA containing 10% "whisker "showed higher production of mineralized matrix. In summary the CDHAs

containing “whiskers” of wollastonite are excellent biomaterials for bone tissue engineering, because they were able to stimulate cell proliferation and differentiation, as well as mechanical strength improved by the addition of "whiskers".

Key-Words – α - TCP, calcium phosphate cements, cell proliferation, wollastonite.

1. ASPECTOS GERAIS

O osso possui uma alta capacidade regenerativa, principalmente em pessoas jovens, o que permite bom reparo na maioria das fraturas (Boyle *et al.*, 2003). Porém, em grandes defeitos ósseos causados por infecções, ressecção de tumores e traumas graves, o tecido ósseo não se regenera espontaneamente sendo necessária intervenção cirúrgica para introdução de um suporte que favoreça a regeneração (Bauer *et al.*, 2000).

As terapias mais utilizadas para o tratamento de falhas ósseas incluem autoenxertos e aloenxertos (Burg, *et al.*, 2000; Bauer *et al.*, 2000). Os autoenxertos são os ideais porque diminuem os riscos de transmissão de doenças e rejeição tecidual, contudo, a área doadora é limitada e a retirada do tecido ósseo do próprio paciente pode causar complicações como infecções, dores crônicas e hematomas (Silber *et al.*, 2003; Tiedeman *et al.*, 1995). Já o uso de aloenxertos pode causar rejeição imunológica, além de possuir maior potencial de transmissão de doenças (VanderVord *et al.*, 2005; Mankin *et al.*, 2005).

Procurando solucionar tais problemas, vários materiais sintéticos têm sido desenvolvidos como cerâmicas, ligas metálicas, polímeros e compósitos para aplicação como biomateriais que possam substituir os enxertos ósseos (Liu & Czernuszka, 2007).

Dentre as cerâmicas, o α -TCP, um fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 = \text{TCP}$), tem recebido grande atenção atualmente como matéria-prima para vários cimentos ósseos injetáveis e compósitos para tecido ósseo, por ser mais biorreabsorvível que os outros materiais utilizados comercialmente como a hidroxiapatita e o β -TCP, sendo dessa forma capaz de ser substituído mais rapidamente por osso neoformado (Carrodegua & De Aza, 2011).

Contudo, cimentos a base de α -TCP apresentam um déficit considerável quanto as suas propriedades mecânicas, impossibilitando sua utilização como implantes em regiões que demandam maior força mecânica, restringindo assim, seu uso a pequenos defeitos bucomaxilofaciais e recobrimento de próteses metálicas (Yamamoto *et al.*, 1996). Assim, diversas formulações têm sido pesquisadas a fim de melhorar as propriedades mecânicas desses cimentos, sem modificar sua biocompatibilidade e bioatividade.

Um tipo de reforço ao cimento de fosfato de cálcio (CFC) que, recentemente vêm sendo estudado são os “whiskers” formados por pequenos monocristais alongados com alta resistência mecânica. Nos trabalhos nos quais é estudada a adição de “whiskers” obteve-se êxito com o material resultante, aumentando sua tenacidade à fratura em até 57% relacionada diretamente a quantidade de “whiskers” adicionado e a morfologia destes (Muller *et al.*, 2007). Os whiskers podem ser obtidos a partir de vários materiais, como os compostos por fosfatos (whiskers de hidroxiapatita), carbonatos (whiskers de aragonita), e silicatos de cálcio (whiskers de wollastonita) (Krüger & Groll, 2012).

O silício tem recebido grande atenção como um elemento a ser adicionado em compostos de fosfato de cálcio, gerando materiais com desempenho biológico superior, pois mostra um papel essencial nos eventos metabólicos que induzem a neoformação óssea (Carlisle, 1980). Estudos demonstram que a wollastonita ($\text{Ca}_3[\text{Si}_3\text{O}_9]$), possui excelente bioatividade *in vitro*, e a taxa de formação de apatita em sua superfície é mais rápida que em outras cerâmicas biocompatíveis (cerâmicas capazes de formar em superfície uma camada de apatita semelhante a biológica) quando em fluido biológico simulado (solução com concentrações iônicas e pH semelhantes ao do plasma humano) (Cortés *et al.*, 2004). Além disso, soluções com altas concentrações de silício (Si) promoveram a expressão de genes relacionados com a atividade óssea, estimulando a proliferação em osteoblastos e promovendo neoformação óssea (Xynos *et al.*, 2000).

Para ser utilizado como um implante, o material sintético precisa possuir propriedades mecânicas adequadas a sua aplicação, ser biocompatível e bioativo. Para ser considerado bioativo é necessário que o material promova a adesão, crescimento celular e estimulação da expressão de genes necessários para o processo de mineralização (Xiang *et al.*, 2011).

Nos estudos realizados por Chou *et al.* (1995), demonstrou-se que as características química e físicas da superfície dos materiais influenciam o comportamento celular. Atualmente é esperado dos biomateriais, que esses, além de permitirem a adesão e crescimento celular, também possibilitem ou estimulem a manutenção do fenótipo celular alvo. Portanto, a avaliação da citocompatibilidade contribui muito para compreensão da resposta celular frente ao biomaterial, propiciando a melhora no desenvolvimento dos

biomateriais bioativos do qual se espera estimular interações celulares específicas (Hench & Polak, 2002). As técnicas utilizadas para analisar a citocompatibilidade entre as células e o material foram revisadas por Hunt *et al.* (1995) e incluem ELISA, hibridização *in situ*, Northern blotting, Western blotting e RT-PCR.

Dessa forma, este trabalho teve por objetivo avaliar a influência da adição de reforços de “whiskers” de wollastonita em cimentos a base de α - fosfato tricálcico sobre a morfologia, proliferação, síntese de proteínas indicativas de diferenciação e mineralização de células osteoblásticas em cultura celular.

2. LITERATURA

2.1 Tecido ósseo

O tecido ósseo é um tipo de tecido conjuntivo especializado, altamente vascularizado, sendo continuamente remodelado durante toda vida do indivíduo. É o principal constituinte do esqueleto, desempenhando papel importante na locomoção, suporte para tecidos moles, proteção de órgãos vitais como os contidos na caixa craniana e torácica e no canal medular. Além dessas funções estruturais, o osso funciona como um depósito de cálcio e fósforo mantendo a homeostase desses íons no sangue através da liberação ou armazenamento na matriz óssea (Stevens, 2008).

O tecido ósseo pode se apresentar na forma compacta ou esponjosa. O osso compacto, não apresenta espaços medulares, existindo nesse além dos canalículos, um conjunto de canais que são percorridos por nervos e vasos sanguíneos: canais de Volkmann e canais de Havers. O osso esponjoso mostra trabéculas e espículas ósseas ramificadas, nesse não há canais de Havers, mas existem arranjos irregulares em lamelas. As lamelas possuem lacunas que abrigam osteócitos que são nutridos por difusão a partir da cavidade medular (Gartner & Hiatt, 1997).

Exceto nas superfícies das articulações sinoviais, o osso está envolto pelo perióstio, formado por uma camada externa de tecido conjuntivo denso e uma interna que contém células osteoprogenitoras. O endóstio, um tecido conjuntivo delgado, reveste as cavidades do osso esponjoso, os canais medulares, os canais de Havers e de Volkamann, esse tecido é constituído de uma única camada de células osteoprogenitoras e de osteoblastos (Gartner & Hiatt, 1997).

Esse tecido é formado por células e material extracelular calcificado, a matriz óssea. Entre os componentes celulares estão os osteócitos, os quais se situam em cavidades ou lacunas no interior da matriz; os osteoblastos, que sintetizam a parte orgânica da matriz e dirigem sua mineralização, estando localizados na periferia da matriz extracelular, e os osteoclastos, células gigantes que reabsorvem o tecido ósseo, participando do processo de remodelação (Junqueira & Carneiro, 2008).

Os osteoblastos são essenciais para o desenvolvimento, crescimento, função, reparo e manutenção do osso, por serem responsáveis pela formação orgânica da matriz extracelular, através da síntese e secreção de colágeno tipo I, fatores de crescimento e glicoproteínas (Jayakumar & Di Silvio, 2010).

Após o estabelecimento de uma matriz extracelular pelos osteoblastos composta predominantemente por colágeno tipo I, ocorre o processo de mineralização através da deposição de minerais de hidroxiapatita, um fosfato de cálcio, entre as fibras de colágeno, como mostrado na Fig. 1 (Rho, *et al.*, 1998).

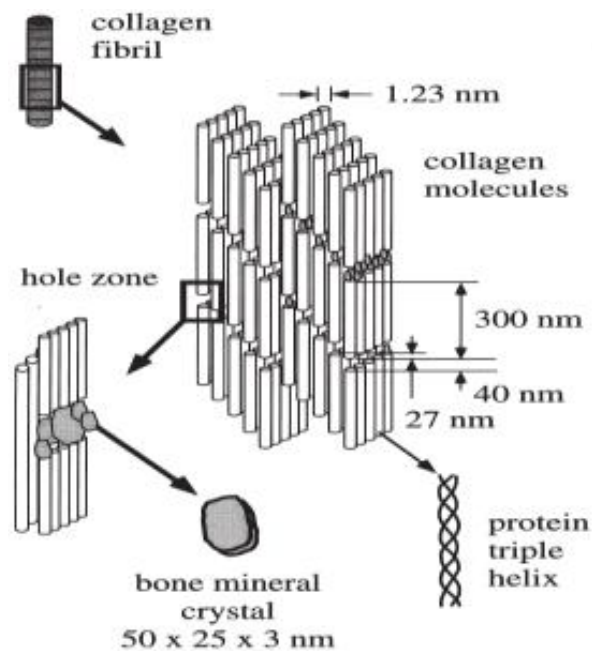


Figura 1. Esquema ilustrando a montagem das fibrilas e fibras de colágeno associadas aos cristais de hidroxiapatita. O padrão de espaçamento de 67 nm resulta na presença de lacunas adjacentes (40 nm) e regiões de sobreposição (27 nm) na montagem das moléculas (Rho, *et al.*, 1998).

O processo de mineralização tem início com a formação de vesículas por brotamento da superfície da membrana dos osteoblastos (Anderson, 1995). Essas vesículas são ricas em fosfatase alcalina (FAC), que hidroliza substratos fosfato para liberar fosfato inorgânico, o qual se liga ao cálcio formando a hidroxiapatita, a parte mineral do osso (Orimo & Shimada, 2008). O pico da atividade da FAC geralmente coincide com o início

do processo de mineralização (Lian & Stein, 1995), sendo muito utilizada como marcador de diferenciação inicial dos osteoblastos em estudos de engenharia tecidual óssea (Yang, *et al.*, 2012; Mestres, *et al.*, 2012; Martinez, *et al.*, 2012).

Dentre as proteínas não-colagênicas da matriz extracelular secretada pelos osteoblastos está a osteocalcina, a qual se liga fortemente a cristais de hidroxiapatita do osso e regula o tamanho e orientação desses. O complexo formado entre a osteocalcina e hidroxiapatita se liga às fibras de colágeno por meio da osteopontina como mostrado na Fig. 2. A osteocalcina é sintetizada por osteoblastos maduros, sendo utilizada como marcador tardio. Essa proteína é uma das proteínas não-colagenosas mais abundantes da matriz óssea. Sua secreção tem início com o processo de mineralização e o aumento na sua síntese ocorre com a deposição de hidroxiapatita durante o desenvolvimento esquelético (Hauschka & Reid, 1978; Jayakumar & Di Silvio, 2010).

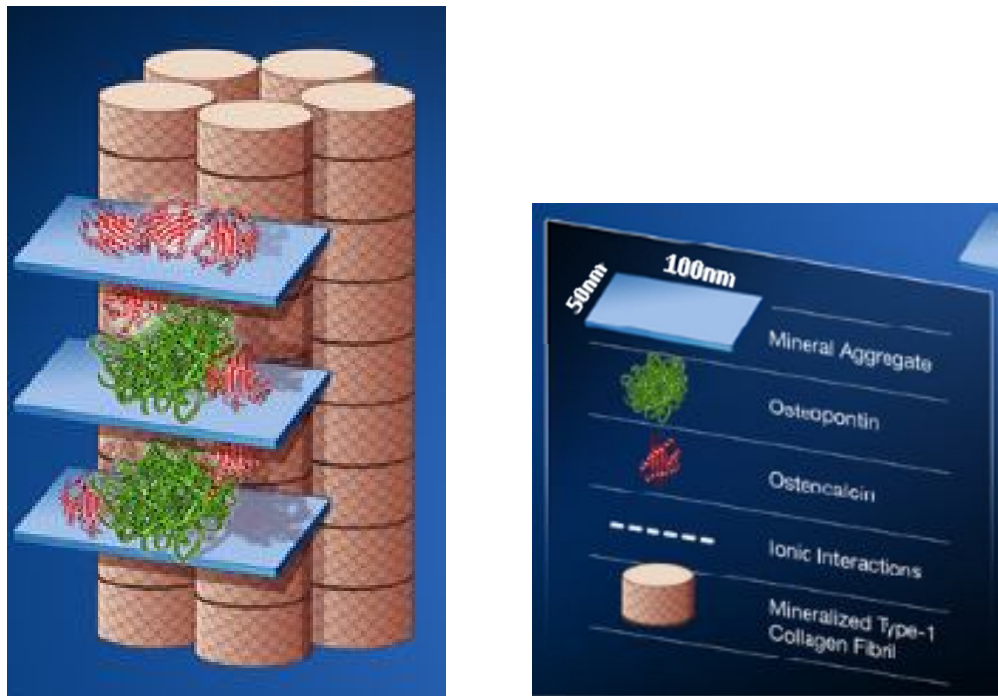


Figura 2. Esquema ilustrando a disposição das glicoproteínas osteocalcina e osteopontina na matriz extracelular óssea. A osteocalcina interage diretamente com o mineral, e se liga a osteopontina, que medeia a ligação do complexo osteocalcina-hidroxiapatita às fibras de colágeno (adaptado de Poudarik, *et al.*, 2012).

2.2 Biomateriais para osso

Em grandes defeitos ósseos causados por ressecção de tumores, ou traumas, não ocorre à regeneração espontânea desses acarretando geralmente em uma incapacidade funcional grave. Várias abordagens terapêuticas têm sido investigadas para esse fim, como por exemplo, implantes autógenos (Finkemeier, 2002), implante de diferentes biomateriais (Wiltfang *et al.*, 2002), entre outras.

Segundo a Conferência de Consenso em Biomateriais para aplicações clínicas de 1982, entende-se por biomaterial (Williams, 1987): “Toda substância (com exceção de drogas) ou combinação de substâncias, de origem sintética ou natural, que durante um período de tempo indeterminado é empregado como um todo ou parte integrante de um sistema para tratamento, ampliação ou substituição de quaisquer tecidos, órgãos ou funções corporais”.

O biomaterial ideal para engenharia tecidual óssea deve respeitar alguns requisitos como ser biorreabsorvível (o material é degradado ou solubilizado em fluidos tissulares, desaparecendo do sítio de implantação) e biocompatível (não causar reações adversas, tóxicas ou carcinogênicas ao paciente). Entretanto, com a evolução dos biomateriais, estes conceitos de biocompatibilidade e biodegradabilidade fazem parte de uma segunda geração de biomateriais. Na primeira geração, foram desenvolvidos os materiais então considerados bioinertes, cujo foco para seu desenvolvimento era o de não provocar reação de corpo estranho no organismo. Já a terceira geração, inclui os materiais capazes de estimular respostas celulares específicas a nível molecular (Hench & Polak, 2002).

No caso do tecido ósseo para ser considerado um material ideal esse necessita ser osteoindutor (capaz de promover a diferenciação de células progenitoras em linhagens osteoblásticas); osteocondutor (apoiar e incentivar o crescimento ósseo a partir do tecido ósseo periférico) e ser capaz de osteointegração (integrar-se com o tecido ósseo circundante) (Stevens, 2008).

2.3 Cimento de Fosfatos de Cálcio

O tecido ósseo é um material compósito natural feito a partir da combinação de componentes orgânicos com componentes inorgânicos junto com proteínas não-colagenosas. A porção inorgânica do osso é formada por hidroxiapatita carbonatada com a fórmula química $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ e razão de Ca:P de 1,67 que é um fosfato de cálcio cristalino, o qual proporciona rigidez e alta resistência a compressão ao osso (Vallet-Regí & González-Calbet, 2004).

Devido à similaridade estrutural e química a porção inorgânica do osso, vários materiais cerâmicos a base de fosfato de cálcio, são utilizados clinicamente para reparo e reconstrução esquelética (Manzonoa & Vallet-Regí, 2012).

Os fosfatos de cálcio são classificados de acordo com a razão molar de Ca/P, como mostrado na tabela 1.

Tabela 1: Classificação de alguns fosfatos de cálcio (Hench, 1999).

Fosfato de cálcio	Sigla	Fórmula química	Razão Ca/P
Metafosfato de Cálcio	CPM	$\text{Ca}(\text{PO}_3)_2$	0,5
Pirofosfato de Cálcio	CPP	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$	1
Fosfato de Cálcio Anidro (monetita)	DCP	CaHPO_4	1
Hidrogenofosfato de Cálcio Diidratado (Brushita)	DCPD	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1
Fosfato Octacálcico	OCP	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,33
Fosfato tricálcico (α, β)	TCP	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5
Hidroxiapatita HA	HA	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,67
Fosfato Tetracálcico	TTCP	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	2

Os produtos de degradação dos fosfatos de cálcio induzem a neoformação óssea, estando fortemente ligado a bioatividade, o processo de dissolução é seguido pela reprecipitação de uma hidroxiapatita carbonatada, a qual possui composição e estrutura química muito semelhante a fase mineral do osso (Tay *et al.*; 1999).

Dentre os fosfatos de cálcio, encontra-se o cimento de fosfato de cálcio, que foi inicialmente desenvolvido por Brown e Chow em 1986. Esses materiais são constituídos por um o componente sólido que formará uma pasta moldável quando misturado com água ou uma solução aquosa, sendo que sua resistência mecânica aumenta progressivamente, alcançando seu valor máximo após um período de tempo que pode ser de horas a dias. Já o termo “cimento de fosfato de cálcio” foi introduzido por Gruninger e colaboradores (Driessens *et al.*, 1993). Segundo eles, um cimento desse tipo pode ser preparado misturando-se um sal de fosfato de cálcio com água ou com uma solução aquosa para que se forme uma pasta que reagirá à temperatura ambiente ou corporal a fim de dar lugar a um precipitado que contenha um ou mais fosfatos de cálcio e endureça por meio do intercruzamento dos cristais deste precipitado (Yuan, *et al.*, 2000).

As principais vantagens dos cimentos de fosfato de cálcio são:

- são moldáveis, o que garante ótimo contato na superfície osso/implante mesmo em defeitos com geometria complexa;
- habilidade de curar espontaneamente *in vivo*;
- preparação durante o ato cirúrgico;
- biocompatibilidade, bioatividade, biorreabsorbilidade.

Os fosfatos de cálcio mais utilizados clinicamente são a hidroxiapatita e fosfato tricálcico, que podem ser α ou β , dependendo da temperatura de calcinação (Manzonoa & Vallet-Regí, 2012).

Embora todos os componentes nos grupos dos fosfatos de cálcio tenham constituição química similar, seus perfis cristalográficos diferem o que resulta em diferentes padrões de solubilidade. O α -fosfato tricálcico (α -Ca₃(PO₄)₂, α -TCP) é mais solúvel que o β -fosfato tricálcico que são mais solúveis que a hidroxiapatita (Bohner, 2000). Isso faz do α -TCP um material ideal para implante, pois é capaz de ser substituído por osso neoformado mais rapidamente que outros materiais a base de fosfato de cálcio utilizados clinicamente (Carrodegas & De Aza, 2011).

Estudos mostraram que após um período de 12 meses o β -TCP foi totalmente absorvido (Hench & Wilson, 1993). Enquanto que um implante ósseo constituído de HA permanecerá mesmo depois de 3 ou 4 anos de implantação (Bens-Nissan & Pezzoti, 2007). Yamada *et al.* (2006) realizaram um estudo *in vivo* em coelhos comparando o processo de degradação do β e α -TCP os quais foram implantados na calvária desses animais. Os animais foram sacrificados após 2, 4 e 8 semanas. Nenhuma diferença foi observada após 2 semanas, mas após 4 e 8 semanas diferenças significativas foram observadas entre os materiais. O bloco de α -TCP iniciou o processo de degradação após 4 semanas, enquanto que no bloco de β -TCP o processo de degradação teve início após 8 semanas.

Os fosfatos de cálcio α e β -fosfato tricálcico são obtidos por reação no estado sólido de uma mistura 1:2 (molar) de CaCO_3 (carbonato de cálcio) e CaHPO_4 (monetita). O cimento é obtido através de uma pasta na qual se mistura um pó (fosfatos de cálcio) a uma solução aquosa contendo 2,5% em massa de Na_2HPO_4 (fosfato de sódio bibásico anidro) (Motisuke, 2010).

O α -TCP é obtido após tratamento térmico do β -TCP, onde se aquece este até 1250°C , por 15 horas, seguido de choque térmico (Santos, 2002). Esse cimento produz como resultado da reação de cura uma fase de hidroxiapatita deficiente em cálcio ($\text{Ca}_9(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5(\text{OH})$, CDHA), muito similar à apatita biológica. A formação dessa camada de apatita é essencial para permitir que os materiais artificiais implantados integrem-se ao osso adjacente (Hench, 1991).

2.4 Reforço com “whiskers” de Wollastonita

O cimento de fosfato de cálcio apresenta um déficit considerável quanto as suas propriedades mecânicas, que inviabiliza sua utilização como implantes em regiões que demandam maior esforço mecânico (Yamamoto *et al.*, 1996).

Assim, diversos dispositivos têm sido pesquisados a fim de melhorar as propriedades mecânicas desses cimentos, sem modificar sua biocompatibilidade e bioatividade. Além disso, nenhum procedimento com o intuito de tornar o CFC mais

resistente mecanicamente deve modificar suas propriedades de manejo e nem aumentar seu custo de produção em larga escala (Dagang et al., 2007). Uma das abordagens mais bem sucedidas para melhorar a propriedade mecânica dos CFCs é o reforço com fibras (Callister & Rethwisch, 2009). Diante disso os “whiskers” que possuem formato naturalmente acicular formado por pequenos monocristais alongados com alta resistência mecânica competem com outros materiais fibrosos como reforço dos CFCs.

Esses reforços podem ser obtidos a partir de vários materiais, como os compostos por fosfatos (whiskers de hidroxiapatita), carbonatos (whiskers de aragonita), polímeros biodegradáveis (chitosana, poly(lactide-co-glycolide), poly(3-caprolactone)) e silicatos de cálcio (whiskers de wollastonita) (Krüger & Groll, 2012). Contudo, alguns desses reforços se mostraram citotóxicos em estudos *in vitro* e outros não contribuíram significativamente para um aumento da resistência mecânica e nem a tenacidade à fratura (Hockin *et al.*, 2001; Motisuke, 2010).

Recentemente biocerâmicas a base de silicato de cálcio têm sido estudadas como um substituto potencial para o tecido ósseo, pois demonstram bioatividade superior a outros materiais bioativos (Ni, *et al.*, 2006). Essa bioatividade é atribuída à presença de silício.

Além disso, estudos tem sugerido que a adição de silício em biomateriais como hidroxiapatita e biovidros influenciam o metabolismo de células osteoblásticas envolvido no processo de mineralização (Bosetti, 2005; Porter, 2006). Também, soluções com alta concentração de silício promovem a expressão de genes relacionados com a atividade óssea, estimula a proliferação de células osteoblásticas e promove a neoformação óssea (Gupta *et al.*, 2007).

A wollastonita (CaSiO_3 , CS), uma das formas de cerâmicas a base de silicato de cálcio, tem sido utilizada como reforço de alguns materiais como hidroxiapatita (Padmanabhan *et al.*, 2012) e poli(ϵ -caprolactona) (Wei *et al.*, 2009). Estudos demonstram que a wollastonita, possui excelente bioatividade *in vitro*, e a taxa de formação de apatita em sua superfície é mais rápida que em outras cerâmicas biocompatíveis quando em fluido biológico simulado (solução com concentrações iônicas semelhantes ao do plasma humano) (Cortés *et al.*, 2004; Siriphannon, 2000), em meio de cultura celular (Sarmiento, *et al.*, 2004) e após implante *in vivo* (Xu, *et al.*, 2008). A formação de uma camada de

hidroxiapatita semelhante a do osso é importante para que o material possa ligar-se ao tecido ósseo vivo (Kim *et al.*, 1995).

Em um estudo realizado por Motisuke (dados não publicados), a adição de “whiskers” de wollastonita em CFC a base de α -TCP elevou a resistência mecânica à compressão axial em 248% para as amostras contendo 5% em massa de “whiskers” e 123% para as amostras contendo 10% de “whiskers” em relação ao CFC puro, indicando que adição de 5% apresentou resultados superiores quanto à resistência.

2.5 Interação das células com os biomateriais

Quando um biomaterial é colocado em meio de cultura ou mesmo implantado *in vivo*, ocorre inicialmente a adsorção de proteínas do plasma sanguíneo ou soro fetal bovino contido no meio de cultura na superfície desse material, esse processo irá permitir e facilitar a adesão celular (Ratner, *et al.*, 2013; Boyan *et al.*, 1996). Essas proteínas irão modular a resposta das células frente ao biomaterial, promovendo a expressão de diferentes integrinas pelas células. A adesão celular requer, uma estreita interação entre o substrato, a célula e o seu citoesqueleto ocupando as integrinas um papel pivô na mediação deste sistema de coordenação e integração (Siebers, *et al.*, 2005) (Fig. 3).

As integrinas são moléculas de adesão localizadas na membrana celular, necessárias para interação das células com a matriz ou substrato, exercendo um papel essencial no controle dos processos de adesão, migração, diferenciação e até apoptose das células. Após sua interação com o substrato ou matriz, atuam como transdutores de sinais, ocasionado frequentemente na mudança da expressão gênica condicionado o destino e comportamento celular (Balasundaram *et al.*, 2006)

As integrinas ligam-se de forma específica a determinadas proteínas da matriz extracelular. Essas proteínas contém geralmente uma sequência de aminoácidos conhecidas como RGD (arginina-lisina-ácido aspártico). A sequência RGD está presente em muitas proteínas da matriz extracelular como fibronectina e vitronectina (Siebers, *et al.*, 2005).

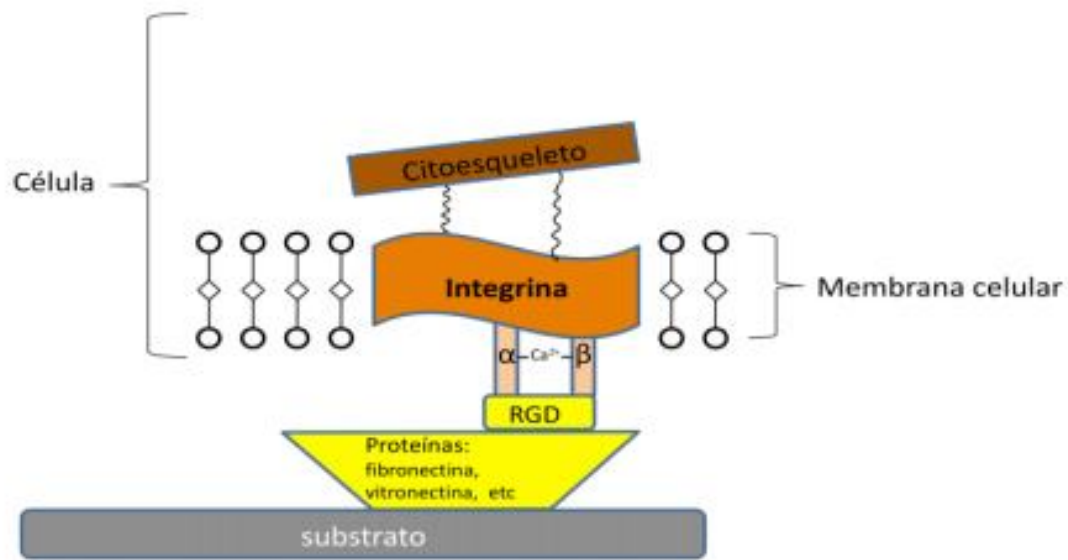


Figura 3. Esquema do papel das integrinas mediando as interações entre a matriz extracelular e o citoesqueleto. Esquema de Balasundaram *et al.*, 2006, adaptado por Martins, 2009.

A adsorção de proteínas em cimentos de fosfato de cálcio, segundo Bertazzo, *et al.*, (2010), ocorre após um processo de dissolução e reprecipitação do cimento quando imersão em fluido corpóreo ou soro, levando a formação de uma camada de apatita em sua superfície. A adesão celular só irá ocorrer após a adsorção de proteínas na superfície desses materiais (Fig. 4).

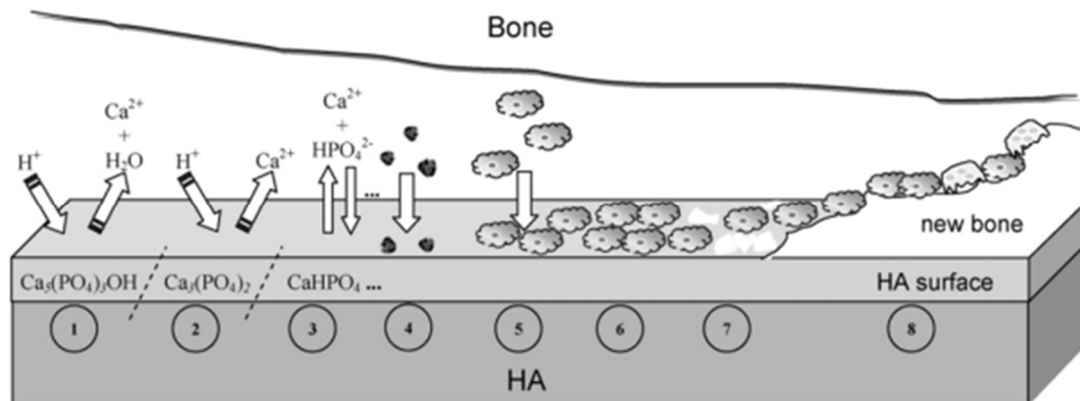


Figura 4. Representação esquemática do fenômeno que ocorre na superfície da Hidroxiapatita após implante. (1) Início do processo de dissolução após o implante. (2) Continuação do processo de dissolução. (3) Equilíbrio entre a solução fisiológica e a superfície da hidroxiapatita. (4) Adsorção de proteínas. (5 e 6) Adesão celular e proliferação. (7) Início da produção de osso novo. (8) Novo osso neoformado e metabolismo ósseo natural (Bertazzo, *et al.*, 2010).

2.6 Modelos *in vitro* para teste dos Fosfatos de Cálcio

O desenvolvimento de testes *in vitro* baseados em cultura celular é um desafio importante do século XXI, pois esses ensaios permitem a redução no número de animais utilizados na avaliação da biocompatibilidade de um biomaterial e são mais facilmente controlados.

Segundo Hench *et al.* (2010) alguns fatores devem ser abordados nos ensaios *in vitro* a fim de assegurar sua aplicação *in vivo*. Dentre esses fatores estaria o uso de células de linhagens oriundas de cultivo primário com fenótipo maturo, para que se possa analisar a manutenção desse fenótipo, já que alguns materiais podem causar a desdiferenciação celular. Atualmente, tem sido muito utilizado o uso de linhagens celulares imortais, porém

o uso desse tipo celular não seria interessante já que essas não são capazes de expressar todas as proteínas características do fenótipo celular maturo.

Uma das formas de estudar o comportamento celular *in vitro* em fosfato tricálcico é através do uso desses materiais em forma de extratos, o denominado cultivo indireto (Ehara *et al.*, 2003; Santos *et al.*; 2002; Rossa *et al.*, 2005), devido ao efeito citotóxico causado por esses materiais nas condições estagnadas da cultura celular.

Utilizando o método de cultivo celular direto Tamai, *et al.* (2006), concluíram que o α -TCP é mais citotóxico que a hidroxiapatita e que o β -TCP. Os autores atribuíram essa toxicidade ao fato do α -TCP ser mais solúvel e hidrolisar mais rapidamente em uma hidroxiapatita deficiente em cálcio comparado aos outros cimentos a base fosfatos de cálcio, a hidrólise desse material liberaria, então, ácido fosfórico para o meio de cultura causando a acidificação do mesmo o que teria promovido a morte das células.

Além da queda do pH, as concentrações de cálcio e fósforo no meio de cultura também foram responsáveis por promover estresse aos osteoblastos, limitando muito o crescimento e diferenciação dessas células (Hempel *et al.*, 2004). Outros autores, entretanto, sugerem que o cálcio e fósforo liberados para o meio de cultura são responsáveis por induzirem a bioatividade aos biomateriais à base de fosfato de cálcio (Zapanta, 2002; Boynde *et al.*, 1999).

Quando implantado, o α -TCP demonstra excelente biocompatibilidade com o osso, que se caracteriza pela rápida deposição de osso neoformado na superfície do cimento, provando que o cimento é osteocondutor e apropriado para uso clínico. A razão para a excelente biocompatibilidade *in vivo*, pode ser a vascularização, que fornece um fluxo contínuo em torno do implante inserido que pode eluir a toxicidade do cimento (Ooms *et al.*, 2002).

Outra forma de estudar a influência das modificações iônicas provocadas por cimentos à base de α -TCP no meio de cultura sobre a resposta de células osteoblásticas, de forma a evitar a influência da superfície dessas amostras sobre as células, foi sugerida por

Gustavsson, J *et al.* (2012), que utilizaram um sistema de membrana permeável a proteínas e íons, capaz de separar fisicamente as células dos cimentos, mas compartilhando o mesmo ambiente aquoso. Esses autores observaram absorção de cálcio e fósforo pelo cimento, o que teria reduzido significativamente a capacidade das células osteoblásticas em depositar cálcio na matriz extracelular.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Analisar a influência da adição de “whiskers” de Wollastonita no Cimento a base de α - Fosfato Tricálcico sobre o metabolismo das células osteoblásticas, por meio da morfologia, proliferação e produção de proteínas específicas desse tipo celular indicativo de diferenciação, e mineralização.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Estabelecer procedimentos de preparo das amostras de CDHAs para permitir que essas sejam adequadas para o cultivo celular;
- 2- Analisar a influência da adição de “whiskers” de Wollastonita nas CDHA sobre as células osteoblásticas por meio da:
 - morfologia;
 - viabilidade celular;
 - síntese de proteínas indicativas de diferenciação como a fosfatase alcalina e osteocalcina;
 - produção de matriz mineralizada.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Preparação dos Cimentos de Fosfato de Cálcio para Cultura Celular

O material utilizado nesse estudo consiste em um CFC a base de α -TCP reforçado com “whiskers” de Wolastonita, desenvolvido pelo Instituto de Química da UNICAMP sob a supervisão do Prof. Dr Celso Aparecido Bertran. Resumidamente, o [alfa]-fosfato tricálcico foi obtido pela reação no estado sólido de carbonato de cálcio (CaCO_3 , CC-RC, Synth) e monetita (CaHPO_4 , M-RC, Synth) a 1300°C durante 6 horas. Os “whiskers” de wollastonita foram sintetizados pelo método de fusão de sais (Motisuke, 2012). Os pós de α -TCP e “whiskers” de wollastonita foram então, misturados nas proporções de 5 e 10% em massa de “whiskers”. Para obtenção dos cimentos os pós foram adicionados a uma solução aquosa contendo 2,5% em massa de Na_2HPO_4 (fosfato de sódio bibásico anidro) (Motisuke, 2010). Os materiais testados em cultura de células foram discos com 8 mm de diâmetro. Como controle foram utilizadas placas de poliestireno. Para que se pudesse atribuir os resultados obtidos ao reforço de “whiskers” de Wolastonita, foram testados α -TCP sem whiskers” de Wolastonita e com 5% e 10% de whiskers” de Wolastonita. Antes do cultivo celular os cimentos permaneceram por uma semana em solução de Ringer para terminar o processo de cura resultando em uma CDHA, sendo posteriormente lavados por 24 hs em água milli-Q, secos em estufa e esterilizados em autoclave à 121°C por 30 min, após os cimentos foram lavados por três dias com trocas diárias de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) puro.

4.2 Isolamento das células osteoblásticas

As células osteoblásticas foram obtidas da calvária de ratos Lewis com aproximadamente 20 dias de idade pelo método de explante. Para isso, os animais foram sacrificados e a calota craniana retirada, sendo posteriormente imersas em DMEM contendo $150\ \mu\text{g/mL}$ de gentamicina e $15\ \mu\text{g/mL}$ de anfotericina B. Em seguida, o tecido mole foi eliminado com um bisturi. A calota craniana foi fragmentada e imersa em frasco contendo meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e antibiótico. Os frascos foram mantidos em estufa à 37°C a uma atmosfera de 5% de CO_2 . O meio de cultura foi trocado parcialmente na proporção 50/50, a fim de manter o meio

condicionado, a cada três dias. As células foram utilizadas até a quarta passagem. O protocolo utilizado foi aprovado pelo comitê de ética no uso de animais – CEUA – Unicamp (nº2606-01).

4.3 Viabilidade celular

O estudo piloto da viabilidade celular foi realizado após 1 e 4 dias. A técnica empregada nesse ensaio, foi desenvolvida por Mosmann (1983), utiliza o reagente MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium brometo), que é clivado somente por células vivas e metabolicamente ativas, formando o precipitado azul denominado formazan, detectável espectrofotometricamente.

As amostras do cimento com 6 mm de diâmetro foram imersas em placa de cultura de poliestireno de 96 poços contendo DMEM puro e mantidas a 37°C por 1 dia antes da semeadura. Em seguida, as células foram semeadas a uma concentração de 5×10^3 cél/poço em DMEM contendo 10% de soro fetal bovino. Sendo então incubadas a 37°C, com trocas de meio a cada dois dias. Passado os tempos de cultivo os poços foram lavados três vezes com DMEM.

Após a lavagem, foi adicionado a cada poço, 200 µL de meio DMEM contendo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil brometo de tetrazólio MTT (5mg/mL), seguindo-se um período de incubação de 4 horas a 37 °C no escuro. A solução contendo MTT foi substituída por uma solução de 200 µL de dimetil sulfóxido (DMSO) no caso das células cultivadas na placa de poliestireno, enquanto que as amostras de α TCP, por possuírem diâmetro menor que o poço e procurando evitar a contabilização das células aderidas à placa de poliestireno, essas amostras foram retiradas de seus respectivos poços e imersas em novos poços contendo DMSO. Em seguida, 100 µL das soluções contidas nos poços foram transferidas para uma nova coluna da placa (controle e amostra), e a absorbância do MTT lida em leitor de microplacas Elx-800-UV (Bio-Tek Instruments, EUA), com emprego de filtro com comprimento de onda de 570 nm. A quantidade de formazan produzida é diretamente proporcional à atividade metabólica e ao número de células vivas. A absorbância foi obtida por área.

Procurando-se evitar a morte das células cultivadas nas CDHA as amostras do cimento dessa vez com 8 mm de diâmetro foram imersas em placa de cultura de poliestireno de 24 poços contendo DMEM puro e mantidas a 37°C por 3 dias com trocas diárias antes da semeadura. Em seguida, as células foram semeadas a uma concentração de 3×10^4 cél/poço em DMEM contendo 10% de soro fetal bovino, sendo então incubadas a 37°C, com trocas diárias de meio. Passado os tempos de cultivo procedeu-se o ensaio de MTT semelhante ao ensaio piloto. Porém por se tratar de uma amostra maior que a testada no ensaio piloto utilizou-se um volume maior de meio DMEM contendo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil brometo de tetrazólio MTT (5mg/mL) correspondente a 1mL, e também 1 mL de dimetil sulfóxido (DMSO). As amostras também foram retiradas de seus respectivos poços e imersas em novos poços contendo DMSO. Em seguida, 0,5 mL das soluções contidas nos poços foram transferidas para uma nova coluna da placa (controle e amostra), e a absorbância do MTT lida em leitor de microplacas Elx-800-UV (Bio-Tek Instruments, EUA), com emprego de filtro com comprimento de onda de 570 nm. A absorbância foi obtida por área.

4.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia das células nos cimentos foi observada através da microscopia eletrônica de varredura, após 1, 7 e 14 dias de cultura. As amostras foram fixadas em 4% de paraformaldeído, 2,5% de glutaraldeído, 0,03% de ácido pícrico e 1% de ácido tânico em DMEM por 30 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foram lavadas duas vezes com PBS, pós-fixadas com 1% de tetróxido de ósmio por 15 minutos e desidratadas em série crescente de etanol (50, 60, 70, 80, 90 e 100%) por 15 minutos cada. As amostras foram secas em Ponto Crítico (Balzers CTD 030), recobertas por ouro (Balzers SCD 050) e observadas e um microscópio eletrônico de varredura (JEOL JXA-840A).

4.5 Atividade da fosfatase alcalina (FAC)

A enzima fosfatase alcalina (FAC) é conhecida como um marcador inicial da diferenciação osteoblástica (Orimo H, 2010; Sila-Asna, *et al.*, 2007). Sendo expressa após o período de proliferação celular (Barrère, 2004). Estudos sugerem que a FAC hidrolisa substratos fosfato liberando fosfato inorgânico envolvido na iniciação da mineralização da

matriz extracelular (Balcerzak *et al.*, 2003). Portanto, para verificar a retenção do fenótipo osteoblástico das células cultivadas nas CDHAs foi mensurada a atividade da FAC. O método colorimétrico utilizado baseia-se na conversão do p-nitrofenil fosfato em p-nitrofenol na presença de fosfatase alcalina. Para realização desse ensaio as células foram semeadas no arcabouço a uma concentração de 3×10^4 cel/poço, em meio DMEM acrescido de 3 mM de β -glicerolfosfato, 0,1mM de ácido ascórbico e 10^{-8} M de dexametasona, a atividade da fosfatase alcalina foi mensurada após 7, 10 e 14 dias. Para isso, os arcabouços foram lavados duas vezes com PBS e as células lisadas com Triton X-100, conforme instruções do protocolo (Anaspec, SensoLyte® pNPP Alkaline Phosphatase Assay Kit). A produção de p-nitrofenol foi determinada pelo mensuramento da absorbância em leitor de microplacas Elx-800-UV (Bio-Tek Instruments, EUA), com filtro no comprimento de onda de 405 nm.

4.6 Quantificação de cálcio

O Alizarin red cora depósitos de cálcio intracelular e cálcio ligado a proteínas e proteoglicanos, (Mathews, *et al.*, 2011), esse corante é útil para analisar a deposição de matriz mineralizada pelos osteoblastos.

Esse ensaio foi realizado após 14 dias de cultivo celular, tempo necessário para observar mineralização da matriz. Para isso, os cimentos foram fixados com 70% de etanol por 1 hora a 4°C e corados com 10% de Vermelho de Alizarina (Sigma) por 10 minutos. Após este período, procederam-se cinco lavagens com água destilada e o precipitado vermelho da matriz foi solubilizado com 10% cloreto de cetilpiridínio (Sigma). A densidade óptica da solução foi determinada espectrofotometricamente a 562 nm.

4.7 Expressão de Osteocalcina

A fase final da diferenciação osteoblástica é a mineralização, onde a matriz extracelular contém principalmente fosfato de cálcio na forma de hidroxiapatita, que é secretada e depositada por osteoblastos maduros (Clarke, 2008). Osteocalcina é um marcador de estágios tardios dos osteoblastos, indicando sua maturação. A osteocalcina é exclusivamente secretada por osteoblastos madurados no final do processo de mineralização (Kim, 1993).

Para verificar a maturação das células osteoblásticas foi analisada a expressão de osteocalcina, para isso o sobrenadante da cultura das células cultivadas nos cimentos foram coletados após 7, 10 e 14 dias de cultura. O sobrenadante foi centrifugado por 20 min a 1000 xg e estocado em alíquotas a -20° até sua utilização, conforme instruções do kit de ELISA utilizado (Life Science Inc., Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit, Osteocalcin), o kit consiste em um ensaio imunoenzimático do tipo sanduíche para detecção quantitativa da osteocalcina no sobrenadante celular.

Análise Estatística

Para realização dos testes quantitativos foi comparado os tratamentos através de variância de um critério (ANOVA). Havendo diferença estatística ($p < 0,05$), o teste de Tukey foi utilizado para comparar cada par dos tratamentos.

5. RESULTADOS

As células osteoblásticas utilizadas foram obtidas pelo método de explante da calota craniana de ratos Lewis com aproximadamente 20 dias. Na figura 5 é possível observar as células osteoblásticas migrando a partir de um fragmento ósseo.

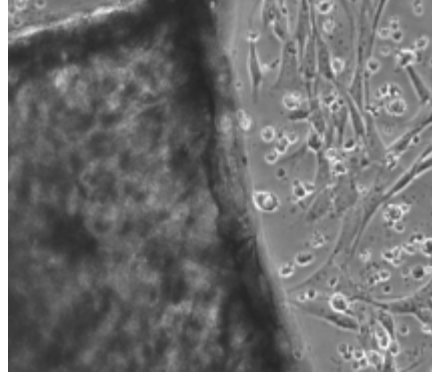


Figura 5. Explante das células osteoblásticas, após três dias de cultura, observadas por microscopia de luz, aumento de 200X.

5.1 Viabilidade celular

O estudo piloto da viabilidade celular mostra morte celular após 4 dias de cultivo em todas as amostras de CDHA (Fig. 6). Na Fig. 7 é possível notar as células mortas na interface entre a amostra de CDHA pura e a placa. Devido a esse resultado procedeu-se a lavagem das CDHA com DMEM puro por 3 dias com troca diária de meio antes do cultivo celular, durante as lavagens as CDHAs foram mantidas em estufa de cultura celular contendo 5% de CO₂ a 37°C. Esse procedimento foi realizado para evitar o *stress* as células provavelmente causado pela mudança de pH, o qual é mais acentuado na CDHA pura (Fig. 8), na terceira lavagem não observa-se mais mudança de pH do meio de cultura. Com isso e com a troca diária do meio de cultura após cultivo celular foi possível manter as células vivas e em crescimento ao longo do tempo em todas as CDHA testadas. Dessa forma, os ensaios, então, foram realizados após 1, 7 e 14 dias de cultivo. O crescimento celular na CDHA com 5% de “whiskers” de Wollastonita foi significativamente maior ($p < 0,01$) quando comparado com a placa de poliestireno e o cimento puro (Fig. 9).

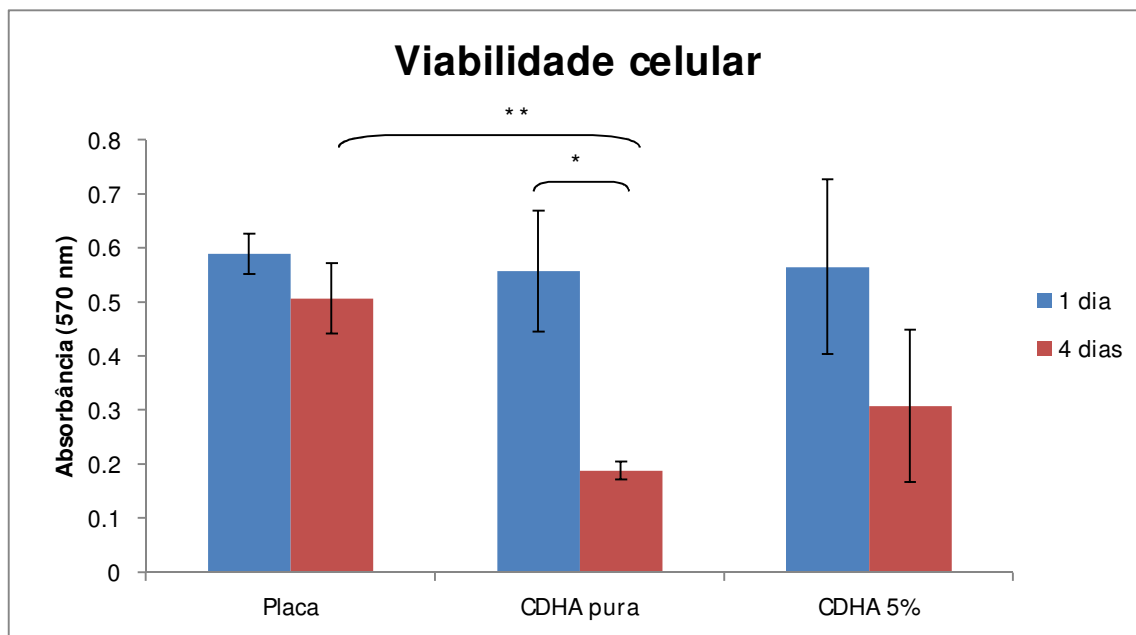


Figura 6. Representação gráfica dos ensaios de MTT, após 1 e 4 dias de cultivo celular. Resultados expressos em média com desvio padrão. * $p < 0,01$; ** $p < 0,05$.

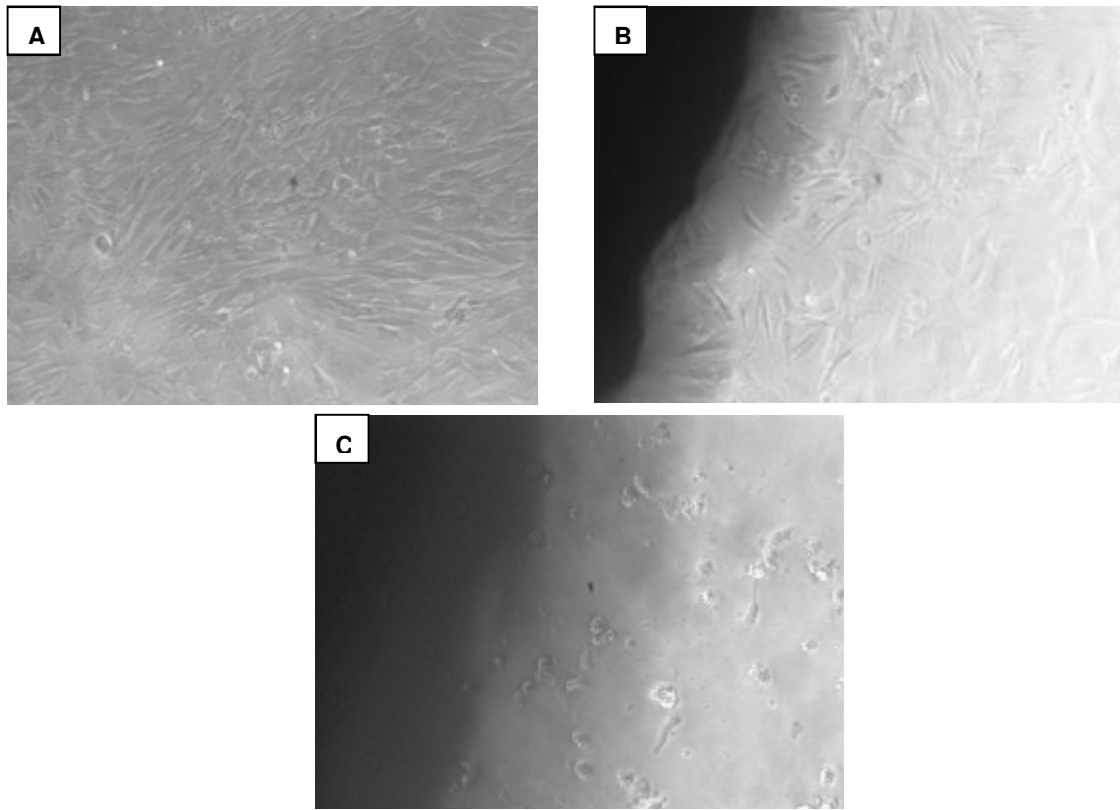


Figura 7. Células osteoblásticas cultivadas: na placa de poliestireno (a); CDHA pura após 24 horas de cultivo (b) e (c) CDHA pura após quatro dias de cultivo, visualizadas através de um microscópio de luz invertido, aumento de 20X.

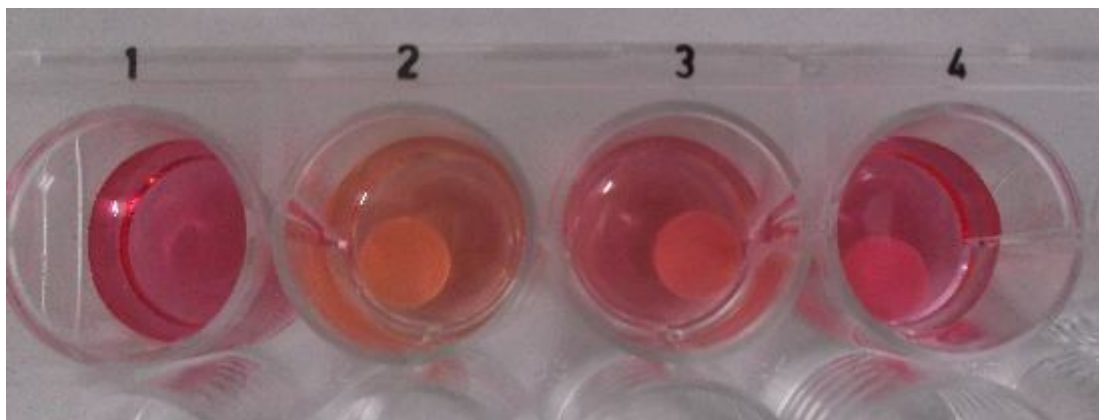


Figura 8. Mudança de pH provocada pelas CDHAs quando em contato com o DMEM puro após 24 horas de incubação em estufa contendo 5% de CO₂ a 37°C. Poço 1: DMEM puro

sem amostra, poço 2: CDHA pura imersa em DMEM puro, poço 3: CDHA contendo 5% de “whiskers” de wollastonita em DMEM puro e poço 4: CDHA contendo 10% de “whiskers” de wollastonita em DMEM puro.

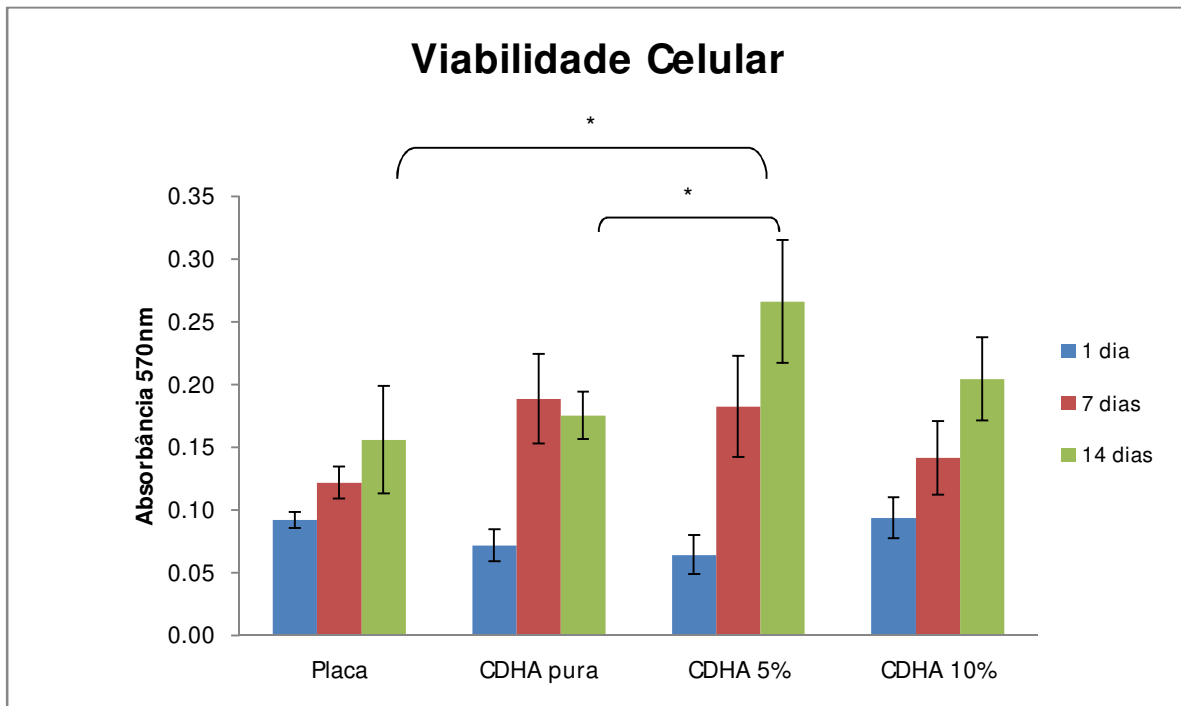


Figura 9. Representação gráfica dos ensaios de MTT, após 1, 7 e 14 dias de cultivo celular. Resultados expressos em média com desvio padrão. * $p < 0,01$.

5.2 Morfologia celular

As micrografias eletrônicas mostram a morfologia das células osteoblásticas cultivadas nas amostras de cimentos após 1, 7 e 14 dias (Fig. 10). As células foram capazes de aderir e espriair em todas as amostras testadas. No cimento contendo 10% de “whiskers” de wollastonita após 14 dias de cultivo celular, é possível notar que as células encontram-se mais espriaidas formando uma camada celular confluyente.

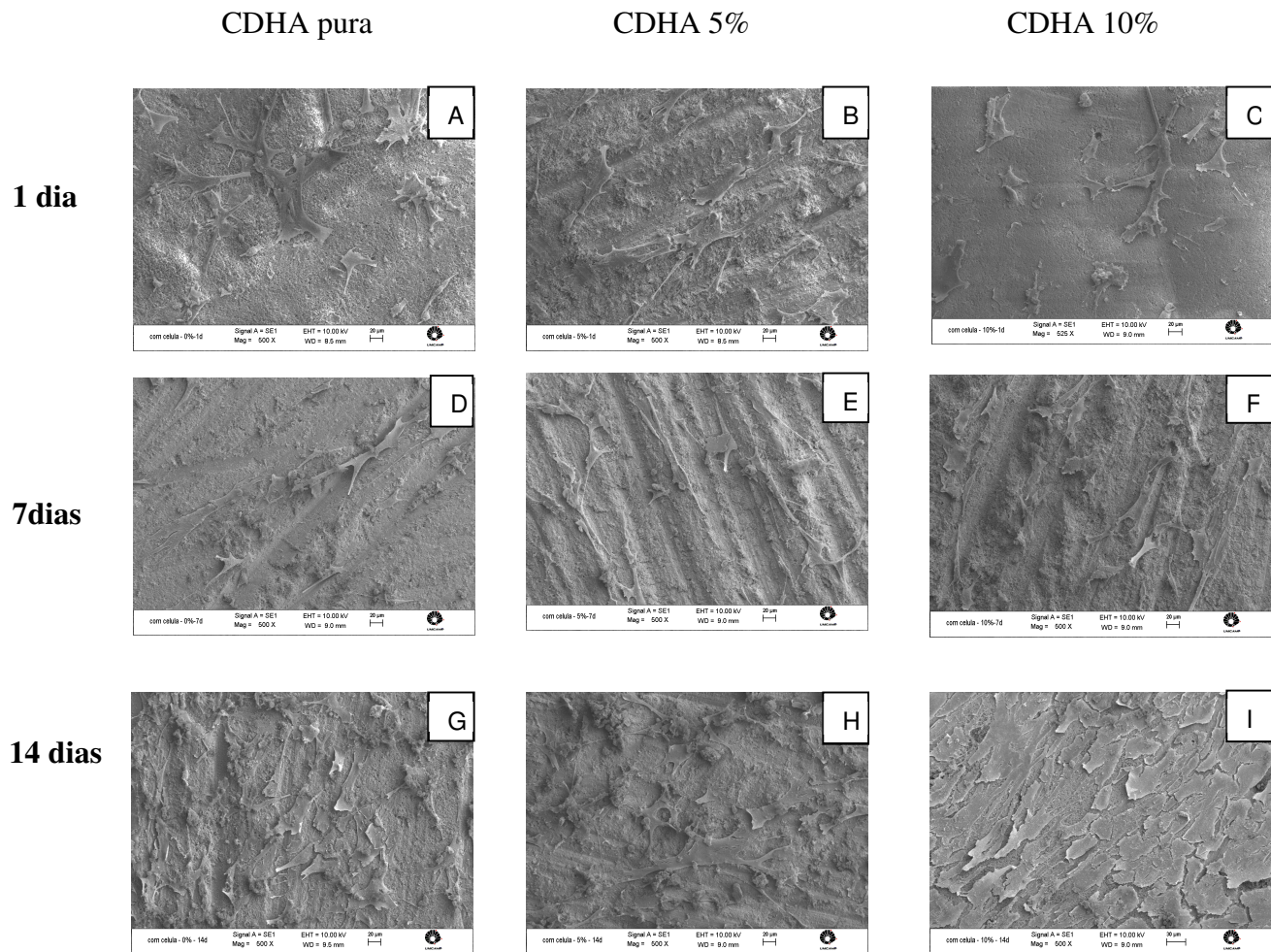


Figura 10. Micrografia eletrônica de varredura das amostras de CDHA, sem “whiskers” de wollastonita (A, D e G), com 5% de “whiskers” de wollastonita (B, E e H) e com 10% “whiskers” de wollastonita (C, F e I), após 1, 7 e 14 dias de cultivo celular.

5.3 Atividade da fosfatase alcalina

O ensaio da atividade da fosfatase alcalina foi realizado após 7, 10 e 14 dias de cultivo celular nos discos de CDHA pura e contendo 5 e 10% de “whiskers” de Wollastonita, a placa de poliestireno foi usada como controle. A atividade da fosfatase alcalina aumentou ao longo tempo em todos os tratamentos, sendo significativamente maior nas CDHAs contendo 5% ($p < 0,05$) e 10% de “whiskers” de Wollastonita ($p < 0,01$) após 14 dias de cultivo celular quando comparado a CDHA pura como mostra a fig. 11.

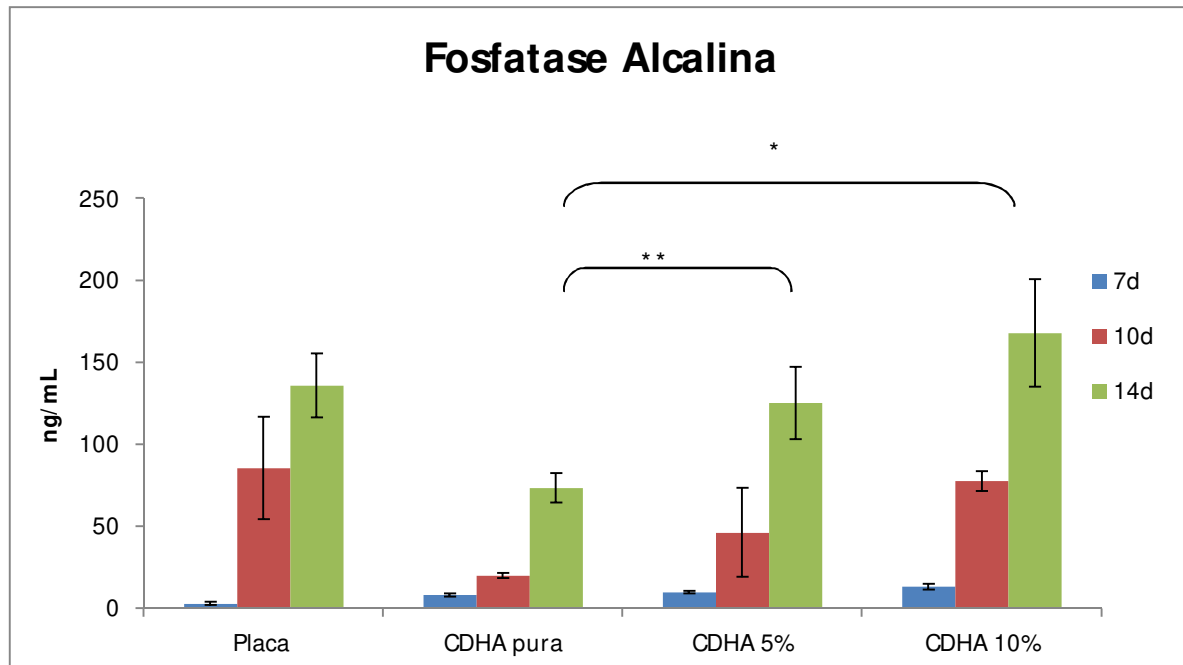


Figura 11. Representação gráfica da concentração de fosfatase alcalina ativa, após 7, 10 e 14 dias de cultivo celular. Resultados expressos em média com desvio padrão. ** $p < 0,05$ e * $p < 0,01$.

5.4 Produção de matriz mineralizada

A quantificação de cálcio foi realizada através do ensaio de Alizarin red S. Como não se pode descontar o Ca^{2+} presente no cimento a placa de poliestireno não foi utilizada como controle. É possível notar na Fig. 12 que após 14 dias de cultura a CDHA com 10% de “whiskers” de wollastonita estimulou o processo de mineralização quando comparadas com os outros cimentos.

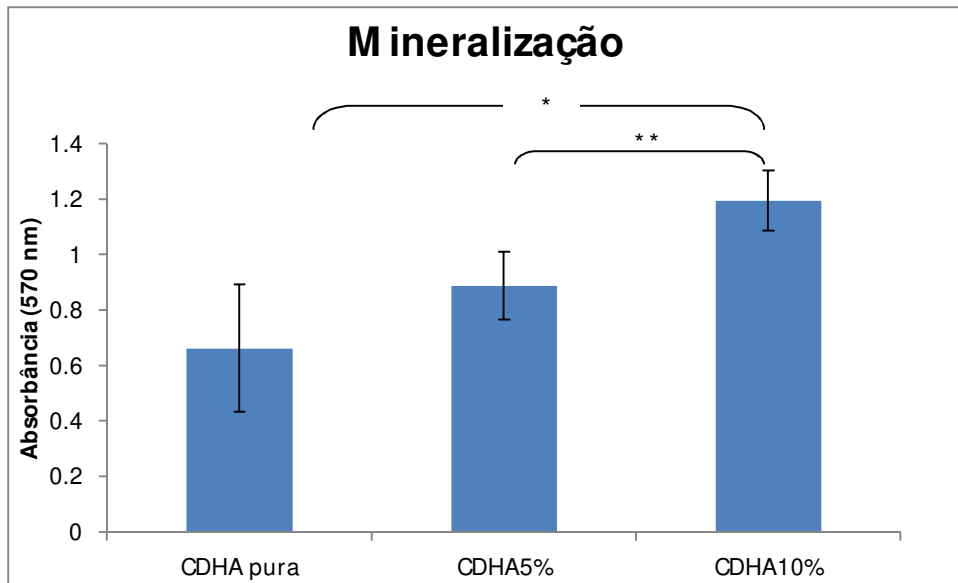


Fig. 12. Quantificação de cálcio através do ensaio de Alizarin Red S após 14 dias de cultivo celular nos cimentos. Resultados expressos em média com desvio padrão. ** $p < 0,05$ e * $p < 0,01$.

5.5 Expressão de osteocalcina

A quantificação da expressão de osteocalcina, foi realizada utilizando o sobrenadante da cultura celular após 7, 10 e 14 dias de cultivo nos discos de α TCP puro e contendo 5 e 10% de “whiskers” de Wollastonita, a placa de poliestireno foi usada como controle. Não foi observado diferença na expressão das proteínas entre os diferentes materiais nem ao longo do tempo. Fig. 13.

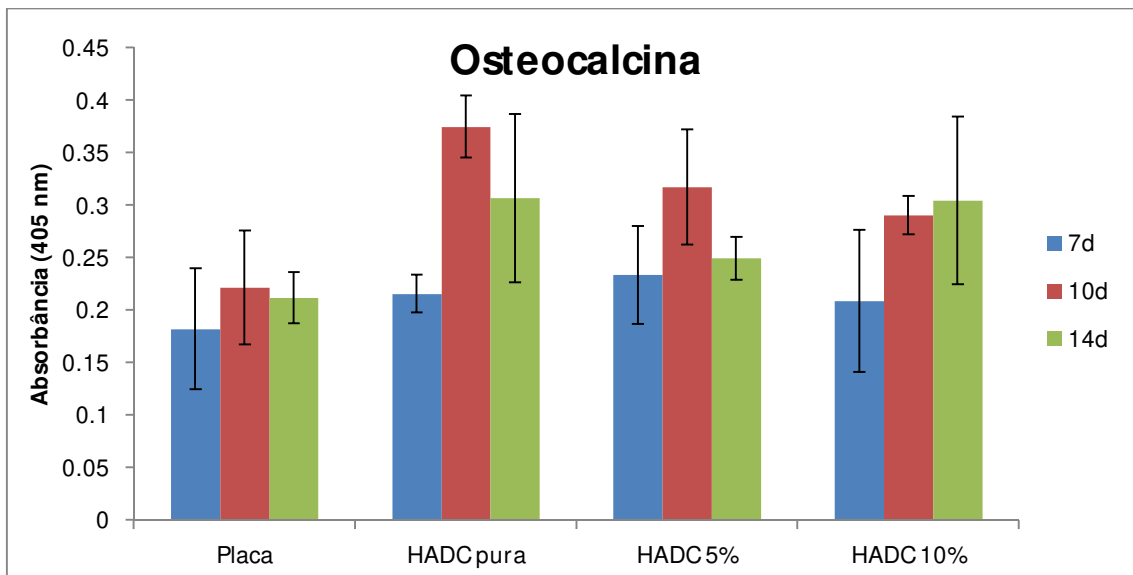


Figura 13. Representação gráfica da concentração de osteocalcina, após 7, 10 e 14 dias de cultivo celular. Resultados expressos em média com desvio padrão.

DISCUSSÃO

Os cimentos de fosfato de cálcio são muito utilizados no reparo de tecidos ósseos, apresentando excelente bioatividade e biocompatibilidade. Porém, são materiais frágeis e com baixa resistência a tensão e flexão. Isso restringe sua utilização apenas em regiões que não demandam carga. O reforço dos cimentos de fosfato de cálcio (CFCs) com fibras têm sido uma importante estratégia para melhorar suas propriedades mecânicas (Kruger & Groll, 2012). Portanto, nesse trabalho foi utilizado um CFC reforçado com “whiskers” de Wollastonita, o qual devido seu formato acicular natural compete com outros materiais fibrosos como reforço aos CFCs.

A análise dos biomateriais através do cultivo de células é uma valiosa ferramenta para se conhecer os mecanismos pelos quais esses materiais podem produzir reações adversas em nível celular (Boyan *et al.*, 2003). Em comparação com os ensaios *in vivo*, os estudos *in vitro* são mais facilmente controlados e apresentam melhor reprodutibilidade, além de permitir a redução no número de animais utilizados na avaliação da biocompatibilidade de um biomaterial.

A principal função dos testes *in vitro* de novos biomateriais é a determinação de sua citotoxicidade, porém atualmente é esperado dos materiais que além de permitirem a adesão, espraiamento e crescimento celular, também mantenham o fenótipo diferenciado e estimulem a diferenciação celular, pois o biomaterial pode não ser tóxico suficiente para matar as células, mas pode induzir a desdiferenciação e alterar a resposta de cura dos tecidos (Hench & Thompson, 2010).

O cultivo de células em cimentos de fosfato de cálcio é dificultado pela transformação química sofrida por eles quando imersos em meio de cultura ou fluido corpóreo simulado. Os cimentos passam por um processo de dissolução e reprecipitação iônica para formação de uma camada de apatita em sua superfície (Bertazzo *et al.*, 2010).

Durante esse processo de dissolução-reprecipitação ocorre a liberação de fósforo e utilização de Ca^{2+} do meio de cultura, porém a concentração desses íons no meio de cultura

varia entre os diferentes fosfatos de cálcio, devido à solubilidade dos mesmos, a qual se encontra na seguinte ordem: α -TCP > β -TCP >> HAp (Ducheyne *et al.*, 1993). Portanto, dos três fosfatos de cálcio representados é esperado que o α -TCP, seja o mais instável quando em solução aquosa e libere maior quantidade de íons.

A solubilidade do α -TCP é importante, pois esse material quando implantado pode ser substituído por osso neoformado mais rapidamente que os outros fosfatos de cálcio, porém a liberação iônica é mais intensa que a dos outros cimentos, o que dificulta o cultivo celular, pois o fósforo liberado do cimento forma ácido e promove a queda do pH do meio de cultura, causando uma diminuição na adsorção de proteínas e consequentemente na adesão e proliferação celular (Sharpe, *et al.*, 1997; Chai *et al.*; 2006).

Link, *et al.* (2006) ao realizar um estudo da citocompatibilidade do cimento de fosfato de cálcio a base de α -TCP, concluíram que o cimento não era apropriado como *scaffold* para células nas estratégias de engenharia tecidual, pois esse material mostrou-se citotóxico nos ensaios *in vitro*. Os autores atribuíram essa citotoxicidade a liberação iônica causada pelo cimento resultando na queda do pH.

Em outro trabalho comparando a reatividade da superfície dos fosfatos de cálcio HA e β -TCP realizado por John *et al.*, (2003), os autores observaram morte celular em torno do β -TCP, a qual acreditam ter sido causada pelo processo de dissolução e recristalização de apatita em sua superfície, que teria alterado a concentração iônica do meio promovendo altos níveis de fosforo e baixos níveis de cálcio. Já as células em torno da HA encontraram-se viáveis e confluentes, não sendo observadas mudanças na superfície desse material nos tempos iniciais de cultura.

Além da alteração no pH causadas pelo CFC, as baixas concentração de cálcio e alta concentração de fósforo também foram encontradas por resultar em necrose dos osteoblastos (Hempel *et al.*, 2004). É aceito que elevados níveis de cálcio favorece a diferenciação dos osteoblastos (Moeno *et al.*; 2005), enquanto que altas concentrações de fósforo resultam na morte dos osteoblastos (Meleti *et al.*; 2000).

No presente estudo, foram utilizadas amostras de cimentos após a cura dos mesmos, que consiste na conversão total de α -TCP em hidroxiapatita deficiente em cálcio ($\text{Ca}_9(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5(\text{OH})$, CDHA), para isso o cimento foi imerso por uma semana em solução de Ringer, pois a formação dessa CDHA ocorre quando o α -TCP está imerso em solução com pH e temperatura próximos do fisiológico (Cicek *et al.*, 2011). Quando os discos de CDHA foram imersos em meio de cultura após aproximadamente 2 horas, observou-se mudança de cor do meio, sendo mais acentuada para a CDHA pura, na qual a coloração do meio passou de vermelho (devido ao indicador fenol *red*) para amarelo, indicando que o meio ficou ácido. O meio de cultura contendo a CDHA com 5% de “whiskers” de wollastonita e CDHA com 10% de “whiskers” de wollastonita apresentam uma ligeira mudança na cor do meio, sendo mais acentuada para a CDHA com 5% de “whiskers” de wollastonita. Acreditamos que esse fenômeno possa ser explicado pelo fato da formação da camada de apatita na wollastonita envolver a elevação do pH que pode chegar a 10,5 quando em contato com solução fisiológica em um pH igual a 7,25 (de Aza *et al.* 1996) o que poderia ter neutralizado a acidez provocada pelo TCP.

Gustavsson *et al.*, (2011) mostraram que a CDHA quando imersa em meio de cultura está sujeita a um processo de equilíbrio iônico através da liberação e absorção de íons formando uma superfície de apatita carbonatada na CDHA, nesse estudo os autores compararam o comportamento da CDHA em dois tipos de meio de cultura com composições químicas diferentes, o DMEM e MacCoy. Eles encontraram diferenças na reatividade iônica da CDHA quando imersas nesses meios de cultura e acidificação de ambos meios após 48 h, os autores concluíram que a reatividade iônica da CDHA em solução aquosa está relacionada com a composição química dessa solução e com o tempo de exposição.

Partindo do pressuposto levantado por Gustavsson *et al.*, (2011), e de nossas constatações com relação a mudança de pH do meio de cultura, acreditamos também que quando o cimento é imerso em soluções iônicas, ele tende a entrar em equilíbrio iônico com essa solução. Dessa forma, o equilíbrio foi atingido após três dias de imersão com troca diária do DMEM, quando não se observa mais a mudança de cor do meio de cultura. Inicialmente em nosso estudo piloto observamos morte das células nos cimentos após 48h,

mesmo com a ambientação do material por 24 h em DMEM puro. Porém, somente após a ambientação das amostras de CFCs em DMEM puro com as referidas trocas diárias por três dias do meio antes do cultivo celular, foi possível, então, manter as células vivas por mais de 48h. Knabe *et al.* (1997), relataram que a citotoxicidade causada pelos CFCs poderia ser evitada com a troca diária do meio de cultura, em vez de cada dois ou três dias como geralmente ocorre. Dessa forma poderia ser mantida a proliferação e diferenciação celular. Portanto, optamos pela troca diária do meio de cultura. Essas informações são importantes, pois a viabilidade celular pode ser mantida ao longo do tempo, se esses cuidados no processo de lavagem forem seguidos.

É provável que a CDHA continue a absorver Ca^{2+} do meio de cultura e libere fósforo ao longo do tempo, acarretando na mudança do pH, porém é esperado que esse processo seja menos intenso após o terceiro dia de lavagem, com menor absorção de Ca^{2+} e menor liberação de fósforo. Sendo essas condições propícias ao crescimento celular. Essas informações permitem o estudo do comportamento celular frente às CDHAs por mais de 24h *in vitro*. Assim, é possível estudar a proliferação, morfologia e expressão de proteínas envolvidas no processo de diferenciação celular e mineralização ao longo do tempo, o que é importante, pois a expressão e o aumento na expressão de determinadas proteínas e o processo de mineralização ocorrem geralmente após 12 dias de cultivo celular (Webster, 2007).

Para os ensaios de MEV e viabilidade celular não se utilizou meio osteogênico, pois esse meio ao induzir a diferenciação celular promove a morte de muitas células e mudança no fenótipo celular. No entanto, para os ensaios de FAC, osteocalcina e mineralização, o meio osteogênico foi utilizado, já que se esperava quantificar a produção de proteínas que indicam a diferenciação celular.

Através do ensaio de viabilidade celular após a estabilização da CDHA com as lavagens com DMEM, foi possível notar crescimento celular ao longo do tempo em todas as amostras. Esses resultados contradizem o encontrado por outros pesquisadores, que observaram atraso na proliferação de células cultivadas direta ou indiretamente na CDHA quando comparados com a placa de poliestireno (Mestres, *et al.*, 2012; Engel, *et al.*, 2008;

Knabe, *et al.*, 2000). Além disso, na CDHA com 5% de “whiskers” de wollastonita houve aumento significativo ($p < 0,01$) no número de células quando comparada com a placa de poliestireno e com a CDHA pura, sugerindo que essa amostra foi capaz de estimular a proliferação celular. A capacidade de estimular o crescimento celular é atribuída ao silício existente na amostra, embora ainda não se conheça o mecanismo de ação (Ni, *et al.*; 2007). Segundo Shiea, *et al.*; (2011) uma apropriada concentração de silício, tal como 4 mM, promove a proliferação de osteoblastos pois estimula a entrada dessas células na fase S e G2 do ciclo celular e não induz a célula a morte.

A adesão da célula na superfície do biomaterial é a primeira fase de interação entre a célula e o biomaterial a qual influencia a capacidade da célula em proliferar e diferenciar quando em contato com o implante (Khadra, *et al.*, 2005). Além da composição química do material, a sua superfície também influencia na proliferação celular. Como demonstrado pelo MEV às células foram capazes de aderir, espriar e proliferar nas CDHAs, demonstrando um fenótipo osteoblástico normal, isso pode estar associado com as características desses materiais que apresentam uma apatita semelhante à biológica. Essa camada de apatita é uma característica comum dos materiais bioativos que os tornam capazes de se ligar ao tecido ósseo, promovendo um papel essencial na formação, crescimento e manutenção da interface tecido-biomaterial, além de ser apropriada para proliferação e função das células osteoblásticas (Chou, *et al.*; 2005). Na CDHA contendo 10% de “whiskers” de wollastonita após 14 dias de cultura as células foram capazes de formar uma densa camada celular, cobrindo toda superfície da cerâmica. Esse ensaio corrobora com o MTT, no qual a amostra contendo silício apresentou maior proliferação celular.

Christodoulou, *et al.* (2005) mostrou em seu trabalho que soluções contendo silício além de estimular a proliferação celular também foram capazes de modular a expressão gênica de células osteoblásticas, induzindo a diferenciação dessas células. Em nosso estudo as CDHAs contendo silicato de cálcio também exibiram efeitos positivos no metabolismo das células osteoblásticas. Diferenças estatísticas significativas foram encontradas nos ensaios da fosfatase alcalina, no qual as CDHAs contendo “whiskers” de wollastonita foram capazes de estimular a produção dessa enzima, sendo esse aumento proporcional a

concentração de “whiskers”. Essa constatação é importante, pois a diferenciação osteogênica de células osteoblásticas é um dos passos fundamentais para determinar o sucesso dos biomateriais na engenharia tecidual óssea, além de permitir inferir que os “whiskers” de wollastonita influenciaram positivamente nessa resposta celular.

O ensaio de mineralização corrobora com o ensaio de fosfatase alcalina, indicando aumento na produção de matriz mineralizada para as CDHAs contendo “whiskers” de wollastonita. Com relação ao ensaio de osteocalcina não se observou aumento ao longo do tempo investigado nem diferença estatística entre as amostras testadas, isso pode ser devido ao fato da concentração dessa proteína aumentar apenas após a deposição de cristais de hidróxiapatita, não sendo possível, portanto, observar aumento na produção dessa proteína nos tempos de cultura testado.

Os resultados obtidos nesse estudo demonstraram a capacidade das CDHAs contendo “whiskers” de wollastonita em estimular a proliferação, diferenciação e mineralização de células osteoblásticas, sendo considerado um biomaterial adequado para aplicação no campo da engenharia tecidual óssea.

CONCLUSÃO

Acredita-se que as CDHAs tendem a entrar em equilíbrio iônico com a solução a qual estão imersas. Apenas após atingido esse equilíbrio, constatado quando não se verifica mais mudança de pH do meio de cultura, é que se consegue cultivar e manter as células vivas, fato que permite o estudo desses materiais em sistemas *in vitro* por mais de 48 hs.

Todas as CDHAs testadas não se apresentaram citotóxicas, pois as células foram capazes de aderir, espalhar e proliferar ao longo do tempo. Sugerindo, portanto, que todas possuem potencial para serem utilizadas como *scaffold* para células em estratégias de engenharia tecidual óssea.

Os materiais reforçados com “whiskers” de wallostonita melhoram significativamente a proliferação celular e expressão de proteínas envolvidas no processo de mineralização, estimulando esse processo, demonstrando a bioatividade desses materiais, e portanto o grande potencial de serem utilizados na engenharia tecidual óssea.

REFERÊNCIAS

ANDERSON, H. C. Molecular biology of matrix vesicles. *Clin Orthop Rel Res*, v. 314, p 266-280. 1995.

BALASUNDARAM, G.; Sato, M.; Webster, T. J. Using hydroxyapatite nanoparticles and decreased crystallinity to promote osteoblastic adhesion similar to functionalizing with RGD. *Biomaterials*, v. 27, p. 2798-2805. 2006.

BALCERZAK, M.; HAMADE, E.; ZHANG, L.; PIKULA, S.; AZZAR, G.; RADISSON, J.; BANDOROWICZ-PIKULA, J.; BUCHET, R. The roles of annexins and alkaline phosphatase in mineralization process. *Acta Biochim. Pol.*, v. 50, p. 1019–1038, 2003.

BARRÈRE, F.; VAN BLITTERSWIJK, C. A.; DE GROOT, KLAAS. Bone regeneration: molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics. *International Journal of Nanomedicine*, v. 1, p. 317–332, 2006.

BAUER, T.W.; MUSCHLER, G.F. SECTION EDITOR(S): STEVENSON, S.; GROSS, A, E. Bone Graft Materials: An Overview of the Basic Science. **Clinical Orthopaedics & Related Research**, vol 371, p. 10-27, 2000.

BENS-NISSAN, B.; PEZZOTTI, G. Bioceramics: Processing Routes and Mechanical Evaluation. *Journal of the Ceramic of Japan*, v. 110, n. 7, p. 601-608, 2002.

BERTAZZO, S.; ZAMBUZZIB, W. F.; CAMPOS, D. D. P.; OGEDA, T. L. FERREIRAB, C. V.; BERTRAN, C. A. Hydroxyapatite surface solubility and effect on cell adhesion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 78, p. 177–184. 2010.

BOHNER M. Calcium phosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements. *Injury Int J Care Injured*, v. 31, p. 37–47, 2000.

BOHNER, M. Resorbable biomaterials as bone graft substitutes. *Materialstoday*, vol. 13, p. 24-30, 2010.

BOYAN, B. D. *et al.* Osteoblasts generate an osteogenic microenvironment when grown on surfaces with rough microtopographies. *Eur. Cell Mater.*, v.6, p. 22-27, 2003.

BOYAN, B. D.; HUMMERT, T. W.; DEAN, D. D.; SCHWARTZ, Z. Role of material surfaces in regulation bone and cartilage cell response. *Biomaterials*, v. 17, p. 137-146. 1996.

BOYDE A, CORSI A, QUARTO R, CANCEDDA R, BIANCO P. Osteoconduction on large macroporous hydroxyapatite ceramic implants: evidence for a complementary integration and disintegration mechanism. *Bone*, v.24, p. 579–89, 1999.

BOYLE WJ, SIMONET WS, LACEY DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, vol. 423, p. 337–42, 2003.

BROWN, W.E; CHOW, L. C. A new calcium phosphate, water-setting cement. In: Brown PW. *Cements Research Progress*. Westerville: American Ceramic Society; p. 351-79, 1986.

BURG, K.J.L.; PORTER, S.; KELLAM, J.F. Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials*, vol. 21, p.2347- 2359, 2000.

CALLISTER, W.D, RETHWISCH, D. G. *Materials science and engineering: an introduction*. Hoboken: John Wiley Sons Inc; 2009.

CARLISLE, EM. Biochemical and morphological changes associated with long bone abnormalities in silicon deficiency. *J Nutr*. vol. 110, p. 1046–55, 1980.

CARRODEGUAS, R. G.; DE AZA, S. α -Tricalcium phosphate: Synthesis, properties and biomedical applications. *Acta Biomaterialia*, vol 7, p. 3536–3546, 2011.

CHAI, F., BLANCHEMAIN, N., LEFEVRE, A., AND HILDEBRAND, H.F. In vitro studies on the influence of precultural conditioning method on osteoblast reactions of a new type of injectable calcium cement material. *J Biomed Mater Res B Appl Bio-mater*77,104, 2006.

CHOU, L.; FIRTH, J.D.; UITTO, V.J.; BRUNETTE, D.M. Substratum surface topography alters cell shape and regulates fibronectin mRNA level, mRNA stability, secretion and assembly in human fibroblasts. *J Cell Sci*, vol. 108, p. 1563-1573, 1995.

CHOU, Y. F.; HUANG, W.; DUNN, J. C.; MILLER, T. A.; WU, B. M. The Effect of Biomimetic Apatite Structure on Osteoblast Viability, Proliferation, and Gene Expression. *Biomaterials*, v. 26, p. 285–295, 2005.

CHRISTODOULOU, I.; BUTTERY LEE, D. K.; SARAVANAPAVAN, P.; TAI, G.; HENCH, L. L.; POLAK, J. M. Dose- and Time-Dependent Effect of Bioactive Gel–Glass Ionic-Dissolution Products on Human Fetal Osteoblast-Specific Gene Expression. *J. Biomed. Mater. Res. B*, v. 74, p. 529–537, 2005.

CICEK, G.; AKSOY, E. A.; DURUCAN, C.; HASIRCI, NESRIN. FACha-tricalcium phosphate (α -TCP): solid state synthesis from different calcium precursors and the hydraulic reactivity. *J Mater Sci: Mater Med*, v. 22, p. 809–817, 2011.

CLARKE, B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, v. 3, p. 5131–5139, 2008.

CORTÉS D.A; MEDINA A; ESCOBEDO J.C; ESCOBEDO S; LÓPEZ M.A. Effect of wollastonite ceramics and bioactive glass on the formation of a bonelike apatite layer on a cobalt base alloy. *J Biomed Mater Res A*. 2004; 70(2):341–346

DAGANG, G.; HAOLIANG, S.; KEWEI, X.; YONG, H. Long-Term Variations in Mechanical Properties and In Vivo Degradability of CPC/PLGA Composite. *Journal of Biomedical Material Research Part B: Applied Biomaterials*, vol. 82B, p. 533-544, 2007.

DE AZA, P. N.; *et al.* Bioceramics-simulated body fluid interfaces: pH and its influence of hydroxiapatite formation. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. vol. 7, 1996.

DUCHEYNE, P.; RADIN, S.; KING, L. The effect of calcium phosphate ceramic composition and structure on in vitro behavior. I-Dissolution. *J. Biomed. Mater. Res.*, v.27, p.25-34, 1993.

DVORAK, M.M.; SIDDIQUA, A.; WARD, D.T; CARTER, D.H; DALLAS, S.L.; NEMETH, E.F; *et al.* Physiological changes in extracellular calcium concentration directly control osteoblast function in the absence of calciotropic hormones. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 101, p. 5140–5145, 2004.

EHARA, A.; OGATA, K.; IMAZATO, S.; EBISU, S.; NAKANO, T.; UMAKOSHI, Y. Effects of α -TCP and TetCP on MC3T3-E1 proliferation, differentiation and mineralization. *Biomaterials*, v.24, p. 831–836, 2003.

ENGEL E, DEL VALLE S, APARICIO C, ALTANKOV G, ASIN L, PLANELL JA, *et al.* Discerning the role of topography and ion exchange in cell response of bioactive tissue engineering scaffolds. *Tissue Eng A*, v. 14, p. 1341–51, 2008.

FERNANDEZ, E.; PLANELL, J. A. Synthesis of dahhlite through a cement setting reaction. *J Mater Sci Mater Med*, v. 9, p. 789–792, 1998.

FINKEMEIER, C.G. Bone-grafting and bone-graft substitutes. *J Bone Joint Surg Am*, v.84, p.454–464, 2002.

GARTENER, L. P.; HIATT, J. L. *Tratado de Histologia*. Guanabara Koogan, 1997.

GUSTAVSSON, J.; GINEBRA, M. P.; PLANELL, J.; ENGEL, E. Osteoblast-like cellular response to dynamic changes in the ionic extracellular environment produced by calcium-deficient hydroxyapatite. *J Mater Sci: Mater Med*, v. 23, p. 2509–2520, 2012.

GUSTAVSSON, J.; GINEBRA, M. P.; ENGEL, E.; PLANELL, J. Ion reactivity of calcium-deficient hydroxyapatite in standard cell culture media. *Acta Biomaterialia*, v. 7, p. 4242-52, 2011.

HAUSCHKA, P V., and REID, M. L. Timed Appearance of a Calcium-Binding Protein Containing γ - Carboxyglutamic Acid in Developing Chick Bone. *DEVELOPMENTAL BIOLOGY*, v. 65, n. 12, p. 426-434, 1978.

HEMPEL, U.; REINSTORF, A.; POPPE, M.; FISCHER, U.; GELINSKY, M.; POMPE, W.; WENZEL, K.W. Proliferation and differentiation of osteoblasts on Biocement D modified with collagen type I and citric acid. *J Biomed Mater Res* , v. 71, n.1, p.130–143, 2004.

HENCH LL. Bioceramics: from concept to clinic. J Am Ceram Soc, v.74, p. 1487-1510, 1991.

HENCH, L. L. & THOMPSON, I. Twenty-first century challenges for biomaterials. J. R. Soc. Interface, v. 7, p. 379–391, 2010.

HENCH, L. L.; WILSON, J. An Introduction to Bioceramics. Singapore: World Scientific Publish Co. Ptde. Ltde, 1999.

HENCH, L. L.; WILSON, J. Introduction to Bioceramics. 1° ed., Singapore: Word Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., 1993.

HENCH, L.L.; POLAK, J.M. Third-Generation Biomedical Materials. **Science**, vol. 295, p. 1014-1017, 2002.

HOCKIN, H.K.X., JANET, B. Q. Whisker-reinforced bioactive composites containing calcium phosphate cement fillers: Effects of filler ratio and surface treatments on mechanical properties. Journal of Biomedical Material Research, Vol. 57, 2001.

HUNT, J.A; MCLAUGHLIN, P.J.; FLANAGAN, B.F. Techniques to investigate cellular and molecular interactions in the host response to implanted biomaterials. Biomaterials, vol. 18, p. 1449-1459, 1997.

JAYAKUMAR, P.; DI SILVIO, L. Osteoblasts in bone tissue engineering Proc. IMechE. Part H: J. Engineering in Medicine. Vol. 224, p. 1415 – 1440, 2010.

JOHN,A.;VARMA, H.K.; KUMARI, T.V. Surface Reactivity of Calcium Phosphate Based Ceramics in a Cell Culture System. JOURNAL OF BIOMATERIALS APPLICATIONS, v. 18, p. 63-78, 2003.

JUNQUEIRA, L.C. CARNEIRO, J. Histologia básica. Guanabara Kogan, v. 11, 2008.

KAMITAKAHARA, M., OHTSUKI, C., MIYAZAKI, T. Review Paper: Behavior of Ceramic Biomaterials Derived from Tricalcium Phosphate in Physiological Condition. Journal of Biomaterials Applications, vol. 23, p. 197-212, 2008.

KHADRA, M.; LYGSTADAAS, S. P.; HAANASE, H. R.; MUSTAFA, K. Effect of Laser Therapy on Attachment, Proliferation and Differentiation of Human Osteoblast-Like Cells Cultured on Titanium Implant Material. *Biomaterials*, v. 26, p. 3503–3509, 2005.

KIM, G.S. Mineralization of bone and osteocalcin gene expression. *J. Oral Biol.*, v. 17, p. 101–106, 1993.

KIM, H. M; MIYAJI, F.; KOKUBO, T.; OHTSUKI, C.; NAKAMURA, T. Bioactivity of Na₂O–CaO–SiO₂ glasses, *Journal of the American Ceramic Society*, v. 78, p.2405–2411, 1995.

KIM, H.J.; KIM, S.H.; KIM, M.S.; LEE, E.J.; OH, H.G.; OH, W.M.; PARK, S.W.; KIM, W.J.; LEE, G.J.; CHOI, N.G.; KOH, J.T.; DINH, D.B.; HARDIN, R.R.; JOHNSON, K.; SYLVIA, V.L.; SCHMITZ, J.P.; DEAN, D.D. Varying Ti-6Al-4V surface roughness induces different early morphologic and molecular responses in MG63 osteoblast-like cells. *J Biomed Mater Res A*, v.74, p.366–373, 2005.

KNABE, C.; DRIESSENS, F. C. M.; PLANELL, J. A.; GILDENHAAR, R.; BERGER, G.; REIF, D, *et al.* Evaluation of calcium phosphates and experimental calcium phosphate bone cements using osteogenic cultures. *J Biomed Mater Res*, v. 52, p. 498–508, 2000.

KNABE, C.; GILDENHAAR, R.; BERGER, G.; OSTAPOWICZ, W.; FITZNER, R.; RADLANSKI, R.J.; GROSS, U. Morphological evaluation of osteoblasts cultured on different calcium phosphate ceramics. *Biomaterials*, v. 18, n. 20, p.1339–1347, 1997.

KRÜGER, R.; GROLL, J. Fiber reinforced calcium phosphate cements - On the way to degradable load bearing bone substitutes? *Biomaterials*, v. xxx, p. 1-14, 2012.

LIAN J, STEIN G. Concepts of osteoblast growth and differentiation: Basis for modulation of bone cell development and tissue formation. *Crit Rev Oral Biol Med*, v.3, p. 269 – 305, 1992.

LIAN, J.B.; STEIN, G.S. Development of the osteoblast phenotype: molecular mechanisms mediating osteoblast growth and differentiation. *The Iowa Orthopaedic Journal*, v.15, p. 118–140, 1995.

LINK, D.P.; VAN DEN DOLDER, J.; WOLKE, J.G.C.; JANSEN, J.A. The Cytocompatibility and Early Osteogenic Characteristics of an Injectable Calcium Phosphate Cement, *TISSUE ENGINEERING*, v. 13, p. 493-500, 2007.

LIU, C. Z.; CZERNUSZKA, J. T. Development of biodegradable scaffolds for tissue engineering: a perspective on emerging technology. Source: *Materials Science and Technology*, vol. 23, p. 379-391, 2007.

MAENO, S.; NIKI, Y.; MATSUMOTO, H.; MORIOKA, H.; YATABE, T.; FUNAYAMA, A.; TOYAMA, Y.; TAGUCHI, T.; TANAKA, J. The effect of calcium ion concentration on osteoblast viability, proliferation and differentiation in monolayer and 3D culture. *Biomaterials*, v. 26, n. 23, p.4847-4855.

MANKIN, H.J.; HORNICEK, F.J.; RASKIN, K.A. Infection in massive bone allografts. *Clin Orthop Relat Res*, vol. 432, p. 210–216, 2005.

MANZANOVA, M.; VALLET-REGÍ, M. Revisiting bioceramics: Bone regenerative and local drug delivery systems. *Progress in Solid State Chemistry*, v. 40, p. 17-30, 2012.

MARTÍNEZ, I.M.; VELÁSQUEZ, P.; MESEGUER-OLMO, L.; BERNABEU-ESCLAPEZ, A.; DE AZA, P.N. Preparation and characterization of novel bioactive α -Tricalcium Phosphate doped with Dicalcium Silicate ceramics. *Materials Science and Engineering C*, v. 32, p. 878–886, 2012.

MATHEWS, S.; GUPTA, P.K.; BHONDE, R.; TOTEYT, S. Chitosan enhances mineralization during osteoblast differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells, by upregulating the associated genes. *Cell Prolif.*, v. 44, p. 537–549, 2011.

MELETI, Z.; SHAPIRO, I. M.; ADAMS, C.S. Inorganic Phosphate Induces Apoptosis of Osteoblast-like Cells in Culture. *Bone*, v. 27, n. 3, p. 359-366, 2000.

MESTRES, G.; LE VAN, C.; GINEBRA, M-P. Silicon-stabilized a-tricalcium phosphate and its use in a calcium phosphate cement: Characterization and cell response. *Acta Biomaterialia*, v. 8, p. 1169–1179, 2012.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, v.65, p. 55-63, 1983.

MOTISUKE, M. Cimentos de Fosfatos de Cálcio Reforçados com “Whiskers”, um Biomaterial Promissor: Síntese, Caracterização e Avaliação “In Vitro”. IQ, Unicamp. Campinas: 2010. Projeto de Pós Doutorado.

NI, S.; CHANG, J.; CHOU, L. A novel bioactive porous CaSiO₃ scaffold for bone tissue engineering, *Journal of Biomedical Materials Research A*, v. 76, 196–205, 2006.

NI, S.; CHANG, J.; CHOU, L.; ZHAI, W. Comparison of Osteoblast-Like Cell Responses to Calcium Silicate and Tricalcium Phosphate Ceramics In Vitro. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, v. 80B, n. 1, p. 174–183, 2007.

OOMS E.M., WOLKE J.G., VAN DER WAERDEN J.P., JANSEN J.A. Trabecular bone response to injectable calcium phosphate (Ca-P) cement. *J Biomed Mater Res* v. 61, p. 9–18, 2002.

ORIMO, H. The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. *J Nippon Med Sch*, v77, p.4e12, 2010.

ORIMO, H.; SHIMADA, T. The role of tissue-nonspecific alkaline phosphatase in the phosphate-induced activation of alkaline phosphatase and mineralization in SaOS-2 human osteoblast-like cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 315, p. 51–60, 2008.

PADMANABHAN, S. K.; GERVASO, F.; CARROZZO, M.; SCALERA, F.; SANNINO, A.; LICCIULLI, A. Wollastonite/hydroxyapatite scaffolds with improved mechanical,

bioactive and biodegradable properties for bone tissue engineering. *Ceramics International*, p. 1-9, 2012.

POUNDARIK; A. A.; DIAB, T.; SROGA, G. E.; URAL, A.; BOSKEY, A. L.; GUNDBERG, C. M.; VASHISHTH, D. Dilatational band formation in bone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 109 , pp. 19178-19183, 2012.

RATNER, B.; HOFFMAN, A., S.; SCHOEN, F., J.; LEMONS, J., E. *Biomaterials Science: An introduction to materials in medicine*. 3rd ed. Oxford: Elsevier Academic Press, 2013.

RHO, J. Y.; J. Y.; KUHN-SPEARING, L.; ZIOUPOS, P. Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. *Medical Engineering & Physics*, v. 20, p. 92–102, 1998.

RHO, J. Y.; J. Y.; KUHN-SPEARING, L.; ZIOUPOS, P. Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. *Medical Engineering & Physics*, v. 20, p. 92–102, 1998.

ROSSA, C.; MARCANTONIO, E.; SANTOS, L.A.; BOSCHI, A.O.; RADDI, M.G. Cytotoxicity of Two Novel Formulations of Calcium Phosphate Cements: A Comparative In Vitro Study. *Artificial Organs*, v. 29, p.114–121, 2005.

SANTOS L.A. Desenvolvimento de cimento de fosfato de cálcio reforçado por fibras para uso na área médico-odontológica. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2002.

SANTOS, L.A.; CARRODEGUAS, R.G.; ROGERO, S.O.; HIGA, O.Z.; BOSCHI, A.O.; ARRUDA, A.C.F. α -Tricalcium phosphate cement: “in vitro” cytotoxicity. *Biomaterials*, v. 23, p. 2035–2042, 2002.

SARMENTO, C.; LUKLINSKA, Z. B.; BROWN, L.; ANSEAU, M.; DE AZA, P. N.; DE AZA, S. ‘In Vitro Behavior of Osteoblastic Cells Cultured in the Presence of Pseudowollastonite Ceramic. *J. Biomed. Mater. Res.*, v. 69, p. 351–358, 2004.

SHARPE, J.R.; SAMMONS, R.L; MARQUIS, P.M. Effect of pH on protein adsorption to hydroxyapatite and tricalcium phosphate ceramics. *Biomater*; v.18, p. 471–476, 1997.

SHEPHERD, J.H.; BEST, S.M. Calcium Phosphate scaffolds for bone repair. *Biomaterials for regenerative medicine*, vol. 63, p.83-92, 2011.

SHIE, M.Y.; DING, S.J.; CHANG, H. C. The role of silicon in osteoblast-like cell proliferation and apoptosis. *Acta Biomaterialia*, v.7, p. 2604–2614, 2011.

SIEBERS, M.C.; TER BRUGGE, P.J.; WALBOOMERS, X. F.; JANSEN, J.A. Integrins as linker proteins between osteoblast and bone replacing materials. A critical review. *Biomaterials*, v. 26, p. 137-146, 2005.

SILA-ASNA M, BUNYARATVEJ A, MAEDA S, KITAGUCHI H, BUNYARATAVE, J. N. Osteoblast differentiation and bone formation gene expression in strontium-inducing bone marrow mesenchymal stem cell. *Kobe J. Med. Sci*, v. 53, p. 25–35, 2007.

SILBER, J. S.; ANDERSON, D.G.; DAFFNER, S.D.; BRISLIN, B.T.; LELAND, J.M.; HILIBRAND, A.S.; VACCARO, A. R.; ALBERT, T.J. Donor Site Morbidity After Anterior Iliac Crest Bone Harvest for Single-Level Anterior Cervical Discectomy and Fusion. *Spine*, vol. 28, p. 134-139, 2003.

SIRIPHANNON, P.; KAMESHIMA, Y.; YASUMORI, A.; OKADA, K.; HAYASHI, S. Influence of Preparation Conditions on the Microstructure and Bioactivity of α -CaSiO₃ Ceramics: Formation of Hydroxyapatite in Simulated Body Fluid. *J. Biomed. Mater. Res.*, v. 52, p. 30–39, 2000.

STEVENS, M.M. Biomaterials for bone tissue engineering. *Materials today*, v.11, n.5, p. 18-25, 2008.

TAMAI M, NAKAOKA R, TSUCHIYA T. Cytotoxicity of various calcium phosphate ceramics. *Key Eng Mater*, v. 309, p. 263–6, 2006.

TAS, A.C. Molten Salt Synthesis of Calcium Hydroxyapatite Whiskers. *Journal of the American Ceramic Society*. v. 84, 2001.

TAY BK, PATEL VV, BRADFORD DS. Calcium sulfate- and calcium phosphate-based bone substitutes. Mimicry of the mineral phase of bone. *Orthop Clin North Am*, v.30, p.615–623, 1999.

TIEDEMAN JJ, GARVIN KL, KILE TA, CONNOLLY JF. The role of a composite, demineralized bone matrix and bone marrow in the treatment of osseous defects. *Orthopaedics*, 18:1153-1158, 1995.

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

VANDEVORD, P. J.; NASSER, S.; WOOLEY, P. H. Immunological responses to bone soluble proteins in recipients of bone allografts. *Journal of Orthopaedic Research*, vol. 23, p. 1059-1064, 2005.

WEBSTER, T.J. *Nanotechnology for the Regeneration of Hard and Soft Tissues*. Singapore. World Scientific Publishing Company Incorporated, 2007.

WEI, J.; WU, X.; LIU, C.; JIA, J.; HEO, S-J.; KIM, S-E.; HYUN, Y-T.; SHIN, J-W. Fabrication of Bioactive Scaffold of Poly(ϵ -Caprolactone) and Nanofiber Wollastonite Composite. *J. Am. Ceram. Soc.*,v. 92, p. 1017–1023, 2009.

WILLIAMS, D.F. Definitions in biomaterials. *Progress in Biomedical Engineering*, v.4, 1987.

WILTFANG, J; MERTEN, H.A.; SCHLEGEL, K.A.; SCHULTZE-MOSGAU, S.; KLOSS, F.R.; RUPPRECHT, S. KESSLER, P. Degradation characteristics of FACh and beta tri-calcium-phosphate (TCP) in minipigs. *J Biomed Mater Res*, v. 63, p. 115–121, 2002.

XIANG, Y.; WANG,Y.; LUO, Y.; ZHANG, B.; XIN, J.; ZHENG, D. Molecular biocompatibility evaluation of poly(d,l-lactic acid)-modified biomaterials based on long serial analysis of gene expression *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol.85, p. 248–261, 2011.

XU, S. F.; LIN, K. L.; HU, Y. Y.; WANG, Z.; CHANG, J.; WANG, L.; LU, J. X.; NING, C. Q. Reconstruction of Calvarial Defect of Rabbits Using Porous Calcium Silicate Bioactive. *Ceramics. Biomaterials*, v. 29, p. 2588–2596, 2008.

XYNOS, I. D.; EDGAR, A. J.; BUTTERY, L. D.; HENCH, L. L.; POLAK, J. M. “Ionic Products of Bioactive Glass Dissolution Increase Proliferation of Human Osteoblasts and Induce Insulin-Like Growth Factor II mRNA Expression and Protein Synthesis,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.* v. 276, p. 461–465, 2000.

YAMADA M, SHIOTA M, YAMASHITA Y, KASUGAI S. Histological and histomorphometrical comparative study of the degradation and osteoconductive characteristics of α - and β -tricalcium phosphate in block grafts. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, v. 82B, p.139–48, 2006.

YAMAMOTO, H.; NIWA, S.; HORI, M.; HATTORI, T.; SAWAI, K.; AOKI, S.; HIRANO, M.; H. TAKEUCHI. Mechanical strength of calcium phosphate cement in vivo and in vitro. *Biomaterials*, vol. 19, p. 1587 – 1591, 1998.

YANG, F.; ZHANG, R.; HE, F.; WANG, X.; ZHAO, S.; YANG G. Osteoblast response to puerarin-loaded porous titanium surfaces: An in vitro study. *J Biomed Mater Res Part A*, v. 100A, p.1419–1426, 2012.

YOUNG, M.F. Bone matrix proteins: their function, regulation, and relationship to osteoporosis. *Osteoporos Int.*, v.14, p. 35-42, 2003.

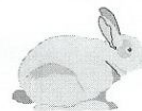
YUAN H, LI Y, BRUJIN JD, GROOT K, ZHANG X. Tissue responses of calcium phosphate cement: a study in dogs. *Biomaterials*, v.21, p. 1283-90, 2000.

ZAPANTA LEGEROS R. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clin Orthop Relat*, v. 395, p.81–98, 2002.

ZUR NIEDEN, N.I; KEMPKA, G.; AHR, H.J. In vitro differentiation of embryonic stem cells into mineralized osteoblasts. *Differentiation*, v. 71, p. 18–27, 2003.



UNICAMP



CEUA/Unicamp

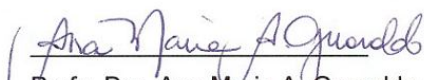
Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

CERTIFICADO,

Certificamos que o projeto "Estudo *in vitro* do Cimento de Fosfato de Cálcio Reforçado com "Whiskers" de Wolastonita" (protocolo nº 2606-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. José Angelo Camilli / Juliana Almeida Domingues, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 13 de fevereiro de 2012.

Campinas, 13 de fevereiro de 2012.



Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>