MARIA ADELINA COELHO RIBEIRO COSTA

MODULAÇÃO DA OSTEOGÉNESE EM CULTURAS DE OSSO ALVEOLAR HUMANO

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS DE ABEL SALAZAR

Universidade do Porto

2000

MARIA ADELINA COELHO RIBEIRO COSTA

Assistente Além do Quadro do Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar

MODULAÇÃO DA OSTEOGÉNESE EM CULTURAS DE OSSO ALVEOLAR HUMANO

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS DE ABEL SALAZAR

Universidade do Porto

2000

Modulação da Osteogénese em Culturas de Osso Alveolar Humano

Dissertação de Candidatura ao Grau de Doutor Apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto

ORIENTADORA

Professora Doutora M.ª Helena R. Fernandes - Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto

CO-ORIENTADORAS

Prof. Doutora M.ª Armanda R. Henriques - Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto

Professora Doutora Graça S. Carvalho - Instituto de Estudos da Criança da Universidade de Braga

Ao Abel e ao Luís Miguel,

a quem devo esta tese

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro da Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica através do programa PRODEP.

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

Comunicações

- Afonso, A., Carvalho, B., Morais, S., **Costa, M.A.**, Silva, P.R., Sousa, J.P., Fernandes, M.H. e Carvalho, G.S.: Estudos *in vitro* da biocompatibilidade de materiais usados em implantologia, Resumos das *V Jornadas de Medicina Dentária do Porto*, Espinho, 24-27 de Fevereiro de 1994; 8.

- **Costa, M.A.**, Afonso, A., Carvalho, B., Carvalho, G.S. e Fernandes, M.H.: Preliminary Studies on the *In Vitro* Osteogenesis of Human Alveolar Bone Derived Cells. Effects of cyclosporin A, Proceedings of the *11th European Conference on Biomaterials*, Pisa, Itália, 10-14 de Setembro de 1994; 23-24.

- **Costa, M.A.**, Afonso, A., Carvalho, G.S. e Fernandes, M.H.: Osteogénese em culturas celulares de osso alveolar humano, Resumos do *XIV Congresso da Sociedade Portuguesa de Estomatologia e Medicina Dentária*, Porto, 18-22 de Outubro de 1994.

- Afonso A., **Costa, M.A.**, Carvalho, G.S. e Fernandes, M.H.: Efeito da ciclosporina A em culturas osteogénicas de osso alveolar humano, Resumos do *XIV Congresso da Sociedade Portuguesa de Estomatologia e Medicina Dentária*, Porto, 18-22 de Outubro de 1994.

- Fernandes, M.H., **Costa M.A.**, Carvalho, G.S.,: *In vitro* osteogenesis by human alveolar bone cells in the presence of dexamethasone, Proceedings of the *I European Congress of Pharmacology*, Milão, Itália, 16-19 de Junho de 1995.

- Fernandes, M.H., **Costa M.A.**, Carvalho, G.S.,: Mineralization in serially passaged human alveolar bone cells, Proceedings of the *12th European Conference on Biomaterials*. Proceedings, Porto, 10-13 de Setembro de 1995; 9.

- **Costa, M.A.**, Martins, P., Tracana, RB., Coelho, M.J., Dias, N., Fernandes, M.H. Carvalho, G.S.: Human bone cell cultures for biocompatibility evaluation of biomaterials:

Hormonal modulation of serially passaged cells and cytoskeleton organization, Proceedings of the *VII Mediterranean Conference on Medical & Biological Engineering*, Jerusalém, Israel, 17-21 de Setembro de 1995; 13.

- **Costa, M.A.**, Fernandes, M.H. e Carvalho, G.S.: Caracterização fenotípica de culturas osteogénicas obtidas de osso alveolar humano, Resumos da *XXX Reunião Anual da Sociedade Portuguesa de Microscopia Electrónica e Biologia Celular*, Porto, 14-15 de Dezembro de 1995; 33C.

- **Costa, M.A.**, Fernandes, M.H. e Carvalho, G.S.: Osteogénese em culturas celulares de osso alveolar humano. Histoquímica e microscopia electrónica de varrimento, Resumos do *4º Congresso Português de Engenharia Biomédica, BIOENG' 96*, Aveiro, 18-19 de Abril de 1996; IX 3.1-3.4.

- Coelho, M.J., Dias, N., **Costa, M.A.**, Fernandes, M.H. e Carvalho, G.S.: Adesão celular analisada pelo estudo do citoesqueleto e por microscopia electrónica de varrimento, Resumos do *4º Congresso Português de Engenharia Biomédica, BIOENG' 96*, Aveiro, 18-19 de Abril de 1996; IX.2.1-2.5

- **Costa, M.A.**, Carvalho G.S., Fernandes, M.H.: Scanning electronic microscopy of serially passaged human alveolar bone cell cultures, Proceedings of the *XI European Congress on Microscopy*, Dublin, Irlanda, 26-30 de Agosto de 1996; 45-46.

- Ribeiro da Silva, P., **Costa, M.A.**, Fernandes, M.H., Cavalheiro, J.T., Gameiro dos Santos, A.: Osteogenic cells culture and osteoapatite®, Proceedings of the *XVI Word Congress of ORL Head and Neck Surgery*, Sidney, Austrália, 2-7 de Março de 1997.

- Gameiro dos Santos, A., Ribeiro da Silva, P., **Costa, M.A.**, Fernandes, M.H., Carvalho, G.S. e Cavalheiro, J. T.: *In vitro human* bone tissue organization on osteoapatite®, Proceedings of Third Extraordinary Symposium on Recent Advances in Otitis Media, Copenhagen, 1-5 de Junho de 1997; 78-79.

- Ribeiro da Silva, J.P., **Costa, M.A.**, Vasconcelos, M., Fernandes, M.H., Cavalheiro, J.T. e Gameiro dos Santos, A.: The Biointegration of Osteoapatite® in Middle Ear Bone: an *in vitro*, *in vivo* and surgical study, XXI Annual Meeting of Politzer Society and Mediterranean Society of Audiology and Otology, Antalia, Turquia, 7-11 de Junho de 1998. Comunicação seleccionada para o prémio Politzer.

- Ribeiro da Silva, J.P., **Costa, M.A.**, Vasconcelos, M., Fernandes, M.H., Cavalheiro, J.T. e Gameiro dos Santos, A.: Investigação em Biomateriais (Osteoapatite®) em Cirurgia do Ouvido Médio, XVIII Jornadas de ORL do HGSA, Patologia do Ouvido Médio, Porto, 11-13 de Março de 1999.

- **Costa, M.A.** e Fernandes, M.H.: Comparison of the effect of parathyroid hormone, 1,25-dihydroxyvitamin D_3 and dexamethasone on the osteoblastic behaviour of human alveolar bone cell cultures, Proceedings of the *2nd European Congress of Pharmacology*, Hungria, 3-7 de Julho de 1999.

- Ribeiro da Silva, J.P., **Costa, M.A.**, Vasconcelos, M., Fernandes, M.H., Cavalheiro, J.T. e Gameiro dos Santos, A.: Osteoapatite® - A new Bone-Like Biomaterial for the Reconstruction of the Middle Ear, X British Academic Conference in Otolaringology, Cambridge, Inglaterra, 4-9 de Julho de 1999.

Publicações - Resumos

- Afonso A., **Costa, M.A.**, Carvalho, G.S. e Fernandes, M.H.: Efeito da ciclosporina A em culturas osteogénicas de osso alveolar humano, ***Revista Portuguesa de Estomatologia e Cirurgia. Maxilofacial*** 1994; vol. XXXV (4): 162-163

- **Costa, M.A.**, Afonso, A., Carvalho, G.S. e Fernandes, M.H.: Osteogénese em culturas celulares de osso alveolar humano, ***Revista Portuguesa de Estomatologia e Cirurgia. Maxilofacial*** 1994; vol. XXXV (4): 166-167.

- Fernandes, M.H., **Costa M.A.**, Carvalho, G.S.,: *In vitro* osteogenesis by human alveolar bone cells in the presence of dexamethasone, ***Pharmacoogical Research*** 1995; 31 (suppl 1): 88.

- Ribeiro da Silva, P., **Costa, M.A.**, Fernandes, M.H., Cavalheiro, J.T., Gameiro dos Santos, A.: Osteogenic cells culture and osteoapatite®, Abstract Book of *XVI World Congress of Otorhinolaringology, Head and Neck Surgery*, IFOS, Sidney Convention Centre, Austrália, 1997; 269. 1997; 269.

- Ribeiro da Silva, J.P., **Costa, M.A.**, Vasconcelos, M., Fernandes, M.H., Cavalheiro, J.T. e Gameiro dos Santos, A.: The Biointegration of Osteoapatite® in Middle Ear Bone: an *in vitro*, *in vivo* and surgical study, ***Otology and Otoneurology Toward's 2000: Horizons of Investigation and Treatment***, Abstract Book, Ozgirgin, O. (Edt.), Bayndin Medical Center, Antalya, Turquey, 1998.

- Ribeiro da Silva, J.P., **Costa, M.A.**, Vasconcelos, M., Fernandes, M.H., Cavalheiro, J.T. e Gameiro dos Santos, A.: Osteoapatite® - A new Bone-Like Biomaterial for the Reconstruction of the Middle Ear, ***The Journal of Laringology and Otology***: Abstracts of the Tenth British Academic Conference in Otolaringology 1999; Suppl. 23: 35.

- **Costa, M.A.** e Fernandes, M.H.: Comparison of the effect of parathyroid hormone, 1,25-dihydroxyvitamin D_3 and dexamethasone on the osteoblastic behaviour of human alveolar bone cell cultures, ***Fundam. Clin. Pharmacol.*** 1999; 13 (Suppl 1): 321s.

Publicações - Artigos

- Fernandes, M.H., **Costa, M.A.** e Carvalho, G.S.: Mineralization in serially passaged human alveolar bone cells, *J. Mat. Sci.: Mat. Med.* 1997; 8: 61-65.

- Gameiro dos Santos, A., Ribeiro da Silva, P., **Costa, M.A.**, Fernandes, M.H., Carvalho, G.S. e Cavalheiro, J. T.: *In vitro human* bone tissue organization on osteoapatite®, ***Otitis Media Today***, Tos, M. e Thomsen, J. (Edt.), 1999; 639-646.

- **Costa, M.A.** e Fernandes, M.H.: Proliferation/differentiation of osteoblastic human alveolar bone cell cultures in the presence of stainless steel corrosion products, *J. Mat. Sci.: Mat. Med.* 2000; 11: 141-153.

- Ribeiro da Silva, P., **Costa, M.A.**, Fernandes, M.H., Cavalheiro, T.J. e Gameiro dos Santos, A.: Osteogenic differentiation of human bone marrow cells on osteoapatite®, *The J. Laryngol. And Otol.*, em publicação.

- **Costa, M.A.** e Fernandes, M.H.: Long-term effects of Parathyroid hormone, 1,25-dihydroxuvitamin D_3, and Dexamethasone on the cell growth and functional activity of human osteogenic alveolar bone cell cultures, *Pharmacol. Res.*, em publicação.

Prémio

Best Poster Award, "poster" apresentado no "I European Congress of Pharmacology", Milão, Itália, 16-19 Junho 1995 (um dos doze "posters" seleccionados de um total de mil e duzentos); (Fernandes, M.H., Costa, M.A. e Carvalho, G.S.: *In vitro* osteogenesis by human alveolar bone cells in the presence of dexamethasone, *Pharmacol. Res.* 1995; 31 (suppl): 88.

AGRADECIMENTOS

A concretização deste trabalho de investigação resultou do esforço e do trabalho de um grupo de pessoas que directa ou indirectamente contribuíram para a sua efectivação. Tendo sido um trabalho que passou, inevitavelmente, por períodos de maior ou menor sucesso, e sendo impossível enumerá-las a todas, não posso deixar de expressar o meu mais sincero agradecimento a todas aquelas pessoas com quem contactei e que me auxiliaram, quer directamente na execução deste trabalho, quer de modo indirecto transmitindo-me palavras de ânimo e encorajamento.

À Professora Doutora M.ª Helena R. Fernandes da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto, supervisora desta tese, gostaria, antes de mais, de agradecer o ter, há alguns anos atrás, acreditado em mim e, ainda, de agradecer a inestimável orientação científica, os contínuos ensinamentos, o apoio, o incentivo e a amizade demonstradas durante estes anos de trabalho em conjunto. Fico, também, reconhecida por me ter posto à disposição o Laboratório de Farmacologia, do qual é responsável, sem o que não seria possível a realização da quase totalidade do trabalho desenvolvido no âmbito desta tese.

À Professora Doutora Graça S. Carvalho da Universidade do Minho, co-orientadora desta tese, agradeço, igualmente, o ter acreditado em mim. Fico, também, reconhecida por me ter posto à disposição o Laboratório de Biocompatibilidade do INEB, na altura a funcionar no Laboratório de Anatomia da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto, e pelo seu apoio, nomeadamente financeiro, durante a fase inicial desta dissertação.

À Prof. Doutora M.ª Armanda R. Henriques, do Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto, co-orientadora desta tese, agradeço a sua disponibilidade e prontidão sempre que necessário.

Ao Conselho Directivo do Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, na pessoa da sua Presidente Profª. Doutora Corália Vicente, o ter autorizado a realização desta tese na Faculdade de Medicina Dentária e o apoio incondicional e facilidades concedidas para a sua realização.

Ao Conselho Directivo da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto, na pessoa do seu Presidente Prof. Dr. Fernando Peres, a autorização para realizar o trabalho de investigação no Laboratório de Farmacologia e, também, o apoio e facilidades concedidas.

Aos Professores do Departamento de Química do Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar o seu imprescindível apoio e permissão para realizar o trabalho, desenvolvido no âmbito desta tese, noutra instituição e, sobretudo, noutra área de investigação.

Ao Professor Doutor Anake Kijjoa do Departamento de Química do Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar pelo seu apoio e conselhos dados no decurso desta tese, com particular ênfase na sua fase inicial, período de grande indefinição.

À Dr. M.ª Augusta Fialho do Departamento de Química do Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar agradeço o seu imprescindível apoio técnico, nas determinações espectrofotométricas realizadas no Laboratório de Química, e sobremaneira a amizade e energia contagiante que é sempre um incentivo para com quem ela trabalha.

Ao colega e amigo, Prof. Doutor Luís Vieira, pelo interesse com que acompanhou todo o meu trabalho, pela sua disponibilidade sempre que necessário e, principalmente, pelo seu apoio incondicional, amizade e incentivo.

Ao Serviço de Estomatologia e Cirurgia Maxilofacial do Hospital Geral de Santo António, na pessoa do seu Director Dr. Bettencourt de Sousa, pela obtenção de grande parte do material biológico.

Aos Professores da Faculdade de Medicina Dentária que contribuíram com material biológico.

Ao Sr. Emanuel Monteiro do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar a maneira empenhada e disponibilidade manifestada na preparação das amostras para microscopia electrónica de varrimento e, também, na preparação e observação das amostras para microscopia electrónica de transmissão.

Ao Departamento de Bioquímica do Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, nas pessoas do Professor Doutor Moradas Ferreira e Professora Doutora M.ª João Saraiva, pelo seu apoio técnico e científico na determinação do ADN.

Ao Professor Doutor Carlos Azevedo e ao Prof. Doutor Alexandre Cunha, do Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, respectivamente pela utilização dos microscópios e pela preciosa ajuda na análise das fotografias de microscopia electrónica de transmissão.

Ao Departamento de Química – Física da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, nas pessoas do Professor Doutor Costa Lima e Prof. Doutora M.ª Conceição Branco, pelas facilidades concedidas na utilização do fluorimetro.

Ao Prof. Doutor João Luís Santos do Departamento de Química – Física da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto agradeço a sua disponibilidade e o imprescindível apoio técnico - científico prestado na obtenção dos resultados de ADN.

À Dr. M.ª João Coelho e à Claudia Martins do Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Medicina Dentária que me acompanharam, principalmente, nos últimos anos de investigação, quero agradecer o seu companheirismo, amizade, estímulo e apoio.

À Ana Mota do Laboratório de Anatomia da Faculdade de Medicina Dentária que me acompanhou ao longo de todo o período de investigação quero exprimir o meu profundo reconhecimento pela sua amizade e apoio, principalmente, nos períodos difíceis decorridos nas antigas instalações da mesma Faculdade.

A todas as Pessoas da Faculdade de Medicina Dentária que me acolheram com muito carinho, fazendo com que eu me sentisse em "casa", quero expressar a minha gratidão.

Ao Dr. Abel Roldão do Serviço de Iconografia do Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar agradeço, particularmente, a sua participação na realização das fotografias macroscópicas e os seus conselhos na "arte de fotografar".

Aos colegas do Departamento de Química do Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar que me auxiliaram ao longo destes anos com a sua amizade, apoio, incentivo e auxílio, o meu muito obrigado. Não posso deixar, no entanto, de expressar o meu especial agradecimento à Júlia Bessa pela sua amizade, disponibilidade e apoio logístico.

Ao "Tozé" pela ajuda e conselhos em relação ao tratamento das imagens.

Finalmente, quero exprimir de um modo muito especial o meu reconhecimento pela colaboração que o meu marido me dispensou durante todo este longo período, bem como pelo seu imprescindível apoio e compreensão em todos os obstáculos e dificuldades que tive de enfrentar para concretizar esta dissertação.

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E FÓRMULAS

AA	Ácido Ascórbico
ADN	Ácido DesoxiRibonucleico
AFNOR	"Association Française de Normalisation"
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina (Adenosine MonoPhosphate ciclic)
Arg	Arginina
ARN	Ácido RiboNucleico
ARNm	Ácido RiboNucleico mensageiro
Asp	Asparagina
ASTM	"American Society for Testing and Materials"
AV	Alizarina Vermelha
BMP	"Bone Morphogenetic Proteins"
BMU	"Basic Multicellular Unit" (unidade de remodelação óssea)
BS	"British Standard"
Ca	Cálcio
$CaHPO_4.2H_2O$	"Brushite"; Hidrogenofosfato de cálcio diidratado
$Ca_3(PO_4)_2.3H_2O$	Fosfato de cálcio triidratado
Cai	Cálcio ionizado
Cap.	Capítulo
Ca/P	Razão entre o cálcio e o fósforo
Célula/cm^2	Número de células por centímetro quadrado
CFU	"Colony - Forming Unit - Fibroblastic"
cm^2	centímetro quadrado
CO_2	Dióxido de carbono
CSF	"Colony-Stimulating Factor"
CT	Calcitonina
d	dia
Dex	Dexametasona
DMSO	Dimetilsulfóxido
Ed.	Edição
Edt.	Editores

EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético (EthyleneDiamineTetraacetic Acid)
et al	e outros
eg	por exemplo (*exempli gratia*)
F^-	Ião fluoreto
FA	Fosfatase Alcalina
F. Ácida	Fosfatase Ácida
F. Ác. Res. Ác. Tartárico	Fosfatase Ácida Resistente ao Ácido Tartárico
FDA	"Food and Drug Administration"
FG	"Fibroblastic Growth Factor"
FGF	"Fibroblastic Growth Factor"
Fig.	Figura
Figs.	Figuras
FSH	Hormona estimuladora do folículo
°C	Grau centígrado
GF	Glicerofosfato (legenda dos gráficos)
GF	β-Glicerofosfato de sódio (legenda dos gráficos)
β-GC	β-Glicerofosfato de sódio
GHI	Hormona de inibição da hormona do crescimento; somatostatina
GHR	Hormona de libertação da hormona do crescimento
Gly	Glicina
GM-CSF	"Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Unit"
HAP	Hidroxiapatite
HC	Hormona do Crescimento; H. somatotrópica (STH) ou somatotropina
HCl	Àcido clorídrico
IGFs	"Insulin-like Growth Factors"
IL	Interleucina
IU/mL	Unidade Internacional por mililitro (Internacional Unit)
KH_2PO_4	Diidrogenofosfato de potássio
L	Litro
mL	mililitro

μL	microlitro
μL/poço	microlitro por poço (placas de 96 poços)
LEC	Liquído ExtraCelular
LH	Hormona luteinizante
M	Molar
μM	Micromolar
μm	micrometro
α-MEM	"α-Minimal Essential Medium"
M-CSF	"Macrophage Colony-Stimulating Factor"
MFF	Monofluorfosfato
mg/mL	miligrama por mililitro
mM	milimolar
mmol	milimole
mmol/L	milimole por litro
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NaCl	Cloreto de sódio
NaF	Fluoreto de sódio
Na_2HPO_4	Hidrogenofosfato de sódio
NaH_2PO_4	Diidrogenofosfato de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
ng	nanograma
ng/mL	nanograma por mililitro
μg	micrograma
$\mu g/cm^2$	micrograma por centímetro quadrado
μg/mL	micrograma por mililitro
NH_4OH	Hidróxido de amónio
nm	nanómetro
nM	nanomolar
nmol	nanomole
$nmol/min.cm^2$	nanomole por minuto e por centímetro quadrado
nmol/min.μg	nanomole por minuto e por micrograma
OB	Osteoblasto(s)

OC	Osteoclasto(s)
25-OH-D_3	Calcifediol; 25-hidroxicolecalciferol
1,25-$(OH)_2$-D_3	Calcitriol; 1,25-diidroxicolecalciferol
P	Fósforo
p.	página
PBS	"Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline"
PDGF	"Platelet-Derived Growth Factor"
PGE_2	Prostaglandina E_2
Pi	Fósforo ionizado
ppm	partes por milhão
PRT	Proteína total
PTH	Paratormona; hormona da paratiróide
PTHrP	Péptidio relacionado com a PTH
RER	Retículo Endoplasmático Rugoso
Sc	Subcultura(s)
SBF	Soro Bovino Fetal
SIDA	Síndrome de ImunoDificiência Adquirida
TGF	"Transforming Growth Factor"
Ti	Titânio
TNF	"Tumor Necrosis Factor"
UV	Ultravioleta
VK	von Kossa
VNR	Receptor da vitronectina (VitroNectin Receptor)
vol.	volume
vs	versus
v/v	volume por volume
λ	comprimento de onda
1ª; 1ªs	primeira; primeiras
2ª	segunda
3ª	terceira
4ª	quarta
5ª	quinta

ÍNDICE GERAL

CONTEXTO E OBJECTIVOS 1

Capítulo I: INTRODUÇÃO GERAL 5

1. ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO DO TECIDO ÓSSEO 7
1.1. CÉLULAS ÓSSEAS 8
1.2. MATRIZ ÓSSEA 12
2. REMODELAÇÃO ÓSSEA 16
3. METABOLISMO DO CÁLCIO E DO FÓSFORO 19
3.1. CÁLCIO 19
3.2. FÓSFORO 21
4. REGULAÇÃO DO METABOLISMO ÓSSEO 21
4.1. FACTORES SISTÉMICOS 22
4.1.1. HORMONA DA PARATIRÓIDE 22
4.1.2. VITAMINA D 24
4.1.3. CALCITONINA 26
4.1.4. HORMONAS SEXUAIS: ESTROGÉNIOS 27
4.1.5. HORMONA DO CRESCIMENTO 29
4.1.6. GLUCOCORTICÓIDES 31
4.2. FACTORES LOCAIS 32
5. MÉTODOS *IN VITRO* DE ESTUDO DO METABOLISMO ÓSSEO 34

Capítulo III: MATERIAIS E MÉTODOS 41

1. CULTURAS CELULARES 43
2. CARACTERIZAÇÃO DAS CULTURAS CELULARES 44
2.1. MÉTODOS QUALITATIVOS 45
2.1.1. Fosfatase alcalina 46
2.1.2. Depósitos de cálcio: Método da alizarina vermelha (AV) 46
2.1.3. Depósitos de fosfato de cálcio: Método de von Kossa (VK) 46
2.1.4. Microscopia electrónica de varrimento e Microanálise de raios X 47
2.1.5. Microscopia electrónica de transmissão 47
2.2. MÉTODOS QUANTITATIVOS 47
2.2.1. Proliferação Celular 48
Ensaio do MTT 48
Proteína Total 49
ADN 49
2.2.2. Actividades de fosfatase alcalina, fosfatase ácida e fosfatase ácida resistente ao ácido tartárico 50
2.2.3. Fósforo ionizado e cálcio ionizado no meio de cultura 51

3. CULTURAS DE FIBROBLASTOS 52

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA 52

Capítulo III: **Obtenção e Caracterização de Culturas de Células Osteoblásticas a Partir de Osso Alveolar Humano** 53

1. INTRODUÇÃO 55

2. OBTENÇÃO DA CULTURA PRIMÁRIA 56

2.1. ENSAIO PRELIMINAR: CULTURAS CELULARES DE OSSO ALVEOLAR DE COELHO E DE RATO 56

2.1.1. MATERIAIS E MÉTODOS 56

2.1.2. RESULTADOS 57

2.2. CULTURAS CELULARES DE OSSO ALVEOLAR HUMANO 58

2.2.1. MATERIAIS E MÉTODOS 58

2.2.2. RESULTADOS 60

2.3. CONCLUSÃO 63

3. CARACTERIZAÇÃO DE SUBCULTURAS SUCESSIVAS 64

3.1. MATERIAIS E MÉTODOS 64

3.2. ESTUDO DA ADESÃO CELULAR 66

3.2.1. RESULTADOS 67

3.2.2. CONCLUSÃO 67

3.3. CARACTERIZAÇÃO DE SUBCULTURAS SUCESSIVAS 69

3.3.1. RESULTADOS 69

PROLIFERAÇÃO CELULAR 69

ACTIVIDADES DE FOSFATASE ALCALINA, FOSFATASE ÁCIDA E FOSFATASE ÁCIDA RESISTENTE AO ÁCIDO TARTÁRICO 70

IDENTIFICAÇÃO HISTOQUÍMICA DE FA E DE DEPÓSITOS DE FOSFATO DE CÁLCIO 72

OBSERVAÇÃO DAS CULTURAS POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE VARRIMENTO 76

OBSERVAÇÃO DAS CULTURAS POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISSÃO 78

CONTEÚDO EM Pi E Cai NO MEIO DE CULTURA 80

3.4. CULTURAS DE FIBROBLASTOS 82

3.4.1. MATERIAIS E MÉTODOS 82

3.4.2. RESULTADOS 82

3.5. CONCLUSÃO 84

4. CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO DO ÁCIDO ASCÓRBICO, β-GLICERO-FOSFATO DE SÓDIO E DEXAMETASONA 85

4.1. ÁCIDO ASCÓRBICO 85

4.1.1. MATERIAIS E MÉTODOS 86

4.1.2. RESULTADOS 87

PROLIFERAÇÃO CELULAR 87

ACTIVIDADE DE FOSFATASE ALCALINA 88

IDENTIFICAÇÃO HISTOQUÍMICA DE FA E DE DEPÓSITOS DE FOSFATO DE CÁLCIO 89

CONTEÚDO EM Pi E Cai NO MEIO DE CULTURA 89

4.1.3. CONCLUSÃO 90

4.2. β-GLICEROFOSFATO DE SÓDIO 91
4.2.1. MATERIAIS E MÉTODOS 91
4.2.2. RESULTADOS 92
PROLIFERAÇÃO CELULAR 92
ACTIVIDADE DE FOSFATASE ALCALINA 93
IDENTIFICAÇÃO HISTOQUÍMICA DE FA E DE DEPÓSITOS DE FOSFATO DE CÁLCIO 94
CONTEÚDO EM Pi E Cai NO MEIO DE CULTURA 95
4.2.3. CONCLUSÃO 97
4.3. COMBINAÇÕES DE ÁCIDO ASCÓRBICO, β-GLICERO-FOSFATO DE SÓDIO E DEXAMETASONA 97
4.3.1. MATERIAIS E MÉTODOS 97
4.3.2. RESULTADOS 98
PROLIFERAÇÃO CELULAR 98
ACTIVIDADE DE FOSFATASE ALCALINA 100
IDENTIFICAÇÃO HISTOQUÍMICA DE FA E DE DEPÓSITOS DE FOSFATO DE CÁLCIO 102
CONTEÚDO EM Pi E Cai NO MEIO DE CULTURA 102
4.3.3. CONCLUSÃO 104
5. DISCUSSÃO GERAL DO CAPÍTULO 105
6. CONCLUSÃO DO CAPÍTULO 112

Capítulo IV: Proliferação e Diferenciação Osteoblástica de Culturas Celulares de Osso o Alveolar Humano na Presença de Hormona da Paratiróide, 1,25-Diidroxivitamina D_3 e Dexametasona 115

1. INTRODUÇÃO 117
2. COMPORTAMENTO DAS CULTURAS CELULARES EXPOSTAS À PTH, 1,25-$(OH)_2D_3$ E Dex DURANTE TODO O PERÍODO DE INCUBAÇÃO 118
2.1. MATERIAIS E MÉTODOS 118
2.2. RESULTADOS 119
PROLIFERAÇÃO CELULAR 119
Ensaio do MTT 120
Conteúdo em ADN 120
ACTIVIDADES DE FOSFATASE ALCALINA, FOSFATASE ÁCIDA E FOSFATASE ÁCIDA RESISTENTE AO ÁCIDO TARTÁRICO 122
IDENTIFICAÇÃO HISTOQUÍMICA DE FA E DE DEPÓSITOS DE FOSFATO DE CÁLCIO 125
2.3. CONCLUSÃO 129
3. COMPORTAMENTO DAS CULTURAS CELULARES EXPOSTAS À DEXA-METASONA EM DIFERENTES FASES DO PERÍODO DE INCUBAÇÃO 131
3.1. MATERIAIS E MÉTODOS 131
3.2. RESULTADOS 132
PROLIFERAÇÃO CELULAR 132
ACTIVIDADE DE FOSFATASE ALCALINA 135
IDENTIFICAÇÃO HISTOQUÍMICA DE FA E DE DEPÓSITOS DE FOSFATO DE CÁLCIO 137
CONTEÚDO EM Pi E EM Cai NO MEIO DE CULTURA 137

3.3. CONCLUSÃO 140

4. COMPORTAMENTO DAS CULTURAS CELULARES EXPOSTAS À PTH, EM DIFERENTES FASES DO PERÍODO DE INCUBAÇÃO 143

4.1. MATERIAIS E MÉTODOS 143

4.2. RESULTADOS 144

4.2.1. CULTURAS EFECTUADAS NA PRESENÇA DE AA E β-GF 144

PROLIFERAÇÃO CELULAR 144

ACTIVIDADE DE FOSFATASE ALCALINA 147

IDENTIFICAÇÃO HISTOQUÍMICA DE FA E DE DEPÓSITOS DE FOSFATO DE CÁLCIO 148

CONTEÚDO EM Pi E Cai NO MEIO DE CULTURA 149

4.2.2. CULTURAS EFECTUADAS NA PRESENÇA DE AA, β-GF E Dex 151

PROLIFERAÇÃO CELULAR 151

ACTIVIDADE DE FOSFATASE ALCALINA 156

IDENTIFICAÇÃO HISTOQUÍMICA DE FA E DE DEPÓSITOS DE FOSFATO DE CÁLCIO 157

CONTEÚDO EM Pi E Cai NO MEIO DE CULTURA 160

CONPORTAMENTO DAS CULTURAS CELULARES APÓS O INÍCIO DO PROCESSO DE MINERALIZAÇÃO 163

4.3. CONCLUSÃO 165

5. DISCUSSÃO GERAL DO CAPÍTULO 167

6. CONCLUSÃO DO CAPÍTULO 173

Capítulo V: Efeito do Ião Fluoreto no Comportamento Osteoblástico de Culturas Celulares de Osso Alveolar Humano 175

1. IMPORTÂNCIA DO IÃO FLUORETO NA PREVENÇÃO DA CÁRIE DENTÁRIA E NO TRATAMENTO DA OSTEOPOROSE 177

UTILIZAÇÃO DO IÃO FLUORETO NA PREVENÇÃO DA CÁRIE DENTÁRIA 177

UTILIZAÇÃO DO IÃO FLUORETO NO TRATAMENTO DA OSTEOPOROSE 179

EFEITO DO IÃO FLUORETO NA SUBSTÂNCIA MINERAL ÓSSEA. 180

2. ESTUDO DO EFEITO DO IÃO FLUORETO NO COMPORTAMENTO OSTEOBLÁSTICO DE CULTURAS CELULARES DE OSSO ALVEOLAR HUMANO 182

2.1. MATERIAIS E MÉTODOS 183

2.2. RESULTADOS 183

PROLIFERAÇÃO CELULAR 183

ACTIVIDADE DE FOSFATASE ALCALINA 185

IDENTIFICAÇÃO HISTOQUÍMICA DE FA E DE DEPÓSITOS DE FOSFATO DE CÁLCIO 187

CONTEÚDO DE Pi E Cai NO MEIO DE CULTURA 189

2.3 DISCUSSÃO 191

Capítulo VI: Comportamento Osteoblástico de Culturas Celulares de Osso Alveolar Humano na Presença de Biomateriais 193

1. BIOMATERIAIS PARA UTILIZAÇÃO NO TECIDO ÓSSEO 195

2. ESTUDO DO COMPORTAMENTO OSTEOBLÁSTICO DE CULTURAS DE OSSO ALVEOLAR NA PRESENÇA DE PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO DO AÇO AISI 316L 198

2.1. INTRODUÇÃO 198

PREPARAÇÃO DO EXTRACTO CONTENDO OS PRODUTOS DA CORROSÃO DO AÇO AISI 316L 201

2.2. ESTUDO PRELIMINAR DO EFEITO DE PRODUTOS DE COR-ROSÃO DO AÇO AISI 316L NO COMPORTAMENTO DAS CULTURAS CELULARES 201

2.2.1. MATERIAIS E MÉTODOS 201

2.2.2. RESULTADOS 202

PROLIFERAÇÃO CELULAR E ACTIVIDADE DE FOSFATASE ALCALINA 202

IDENTIFICAÇÃO HISTOQUÍMICA DE FA E DE DEPÓSITOS DE FOSFATO DE CÁLCIO 203

OBSERVAÇÃO DAS CULTURAS POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE VARRIMENTO 203

2.2.3. CONCLUSÃO 206

2.3. EFEITO DE NÍVEIS SUBLETAIS DE PRODUTOS DE CORROSÃO DO AÇO AISI 316L NO COMPORTAMENTO DAS CULTURAS CELULARES 206

2.3.1. MATERIAIS E MÉTODOS 206

2.3.2. RESULTADOS 207

PROLIFERAÇÃO CELULAR 207

ACTIVIDADE DE FOSFATASE ALCALINA 209

IDENTIFICAÇÃO HISTOQUÍMICA DE FA E DE DEPÓSITOS DE FOSFATO DE CÁLCIO 213

CONTEÚDO DE Pi E DE Cai NO MEIO DE CULTURA 214

2.3.3. DISCUSSÃO 217

2.3.4. CONCLUSÃO 222

3. ESTUDO DA BIOCOMPATIBILIDADE DA OSTEOAPATITE® EM CULTURAS CELULARES DE OSSO ALVEOLAR 223

3.1. INTRODUÇÃO 223

3.2. MATERIAIS E MÉTODOS 224

3.3. RESULTADOS 225

COMPORTAMENTO DA OSTEOPATITE®NA AUSÊNCIA DE CÉLULAS 225

COMPORTAMENTO DAS CÉLULAS DE OSSO ALVEOLAR HUMANO NA SUPERFÍCIE DA OSTEOPATITE® 226

3.4. DISCUSSÃO 227

3.5. CONCLUSÃO 229

RESUMO 231

SUMMARY 237

RÉSUMÉ 243

BIBLIOGRAFIA 249

CONTEXTO E OBJECTIVOS

CONTEXTO E OBJECTIVOS

O osso alveolar faz parte duma estrutura - o **periodonto** - que tem como função unir os dentes ao osso maxilar através de uma articulação fibrosa. Esta articulação constituí um sistema de suspensão elástico e resistente às forças que normalmente sobre ela actuam, permitindo ajustes mínimos na posição dos dentes. O periodonto é constituído, para além do **osso alveolar**, pela **gengiva**, pelo **ligamento periodontal** e pelo **cimento dentário** (Fig. 1). A gengiva e o ligamento periodontal são tecidos moles; o cimento e o osso alveolar são tecidos mineralizados [1]. O estudo da fisiopatologia do osso alveolar assume particular importância devido aos diversos distúrbios metabólicos associados a perda óssea alveolar (doença periodontal) e à crescente utilização de biomateriais quer em substituição óssea quer em implantologia [2-7].

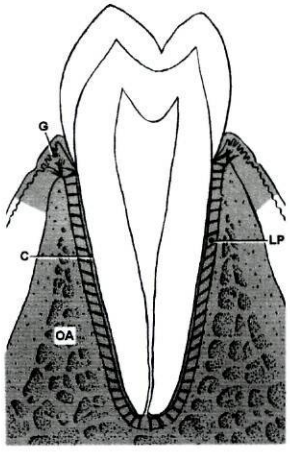


Fig. 1- **Representação esquemática dos componentes do periodonto (área sombreada):**
G, gengiva;
LP, ligamento periodontal;
C, cimento;
OA, osso alveolar.

Da pesquisa bibliográfica efectuada concluiu-se que, na maior parte das situações, as culturas celulares do tipo osteoblástico obtêm-se a partir de medula óssea e de osso trabecular com origem em diversos locais do organismo. Contudo, informações relativas a culturas celulares obtidas a partir de osso alveolar eram na altura do início deste trabalho inexistentes. No entanto, é importante referir que há uma considerável quantidade de informação que mostra diferenças significativas de comportamento entre células osteoblásticas de diferente localização anatómica, relativamente a parâmetros como proliferação celular, expressão de marcadores osteoblásticos e resposta a hormonas e factores de crescimento [8-10]. Existem, também, vários estudos que mostram que as diferenças observadas *in vitro* se correlacionam com a actividade celular *in vivo* [9-11]. Relativamente a este aspecto deve referir-se que as células do osso alveolar parecem apresentar diferenças fisiológicas quando comparadas com as células ósseas de outras localizações anatómicas, pois a existência do osso alveolar está sempre relacionada com a presença dos dentes. Além disso, o osso alveolar possui uma taxa de remodelação ("turnover") muito elevada devido à constante

aplicação de forças de oclusão variáveis. Assim, as culturas celulares obtidas do osso alveolar constituem, em princípio, um modelo potencial para o estudo da fisiologia e farmacologia óssea.

A obtenção de culturas de células osteoblásticas depende do material biológico utilizado, da sua manipulação e das condições de cultura, nomeadamente, meio de cultura, tempo de cultura e presença de substâncias que afectam a proliferação e a diferenciação celular. Há, assim, uma grande variedade de metodologias para a obtenção destas culturas [12-17], aspecto muitas vezes relacionado com o objectivo subjacente à sua utilização em diversos tipos de estudos.

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

- Obtenção e caracterização de culturas de células osteoblásticas a partir de osso alveolar humano com um comportamento de proliferação e diferenciação bem definido e reprodutível que possam ser utilizadas como modelo em estudos relativos à caracterização dos efeitos de substâncias que afectam o metabolismo ósseo, como por exemplo hormonas e fármacos e, também, de aspectos de biocompatibilidade de materiais utilizados para substituição óssea e em implantologia. Foi efectuado um trabalho exaustivo no sentido de seleccionar as condições experimentais mais apropriadas de modo a obter culturas celulares que apresentassem a expressão completa do fenótipo osteoblástico, nomeadamente a formação de uma matriz extracelular mineralizada. Estes resultados são apresentados no capítulo III.

- Estudo do comportamento de proliferação e diferenciação osteoblástica de culturas celulares de osso alveolar humano na presença da hormona da paratiróide, 1,25-diidroxivitamina D_3 e dexametasona, hormonas que têm um papel relevante nos mecanismos de regulação do metabolismo ósseo. Os resultados deste estudo são apresentados no capítulo IV.

- Estudo do comportamento osteoblástico de culturas celulares de osso alveolar humano na presença do ião fluoreto, fármaco que afecta o metabolismo ósseo de modo dependente da dose e da duração do tratamento. Estes resultados estão descritos no capítulo V.

- Estudo do comportamento osteoblástico de culturas celulares de osso alveolar humano na presença de biomateriais. Avaliou-se a proliferação e diferenciação celular destas culturas quando efectuadas na presença de produtos de corrosão do aço AISI 316L. Estudou-se, também, ainda que de modo sumário, a biocompatibilidade da osteopatite® utilizando o mesmo sistema de cultura. Estes resultados são apresentados no capítulo VI.

Capítulo I:

INTRODUÇÃO GERAL

1. ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO DO TECIDO ÓSSEO

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo especializado dos mais resistentes e rígidos do corpo humano. Este tecido juntamente com o tecido cartilaginoso formam o esqueleto, característico dos animais vertebrados [18-20]. O esqueleto desempenha funções importantes e básicas, nomeadamente:

- Suporte dos tecido moles do organismo;
- Protecção de órgãos vitais;
- Local de inserção dos músculos esqueléticos;
- Alojamento e protecção da medula óssea vermelha;
- Reservatório complexo e dinâmico de sais minerais, especialmente de cálcio e de fósforo, armazenando-os ou libertando-os de maneira controlada, contribuindo para a manutenção da sua concentração nos fluídos biológicos (sangue, linfa e líquido intersticial). Serve, igualmente, de reservatório de inúmeras moléculas orgânicas [18-20].

O tecido ósseo possuiu propriedades físicas importantes, nomeadamente, uma elevada resistência às forças de tracção, tensão e compressão, e, simultaneamente, uma certa elasticidade. Tem, ainda, a vantagem de ser um material relativamente leve [18-20]. O tecido ósseo tem capacidade para responder a estímulos mecânicos e a influências metabólicas, nutricionais e endócrinas [18-21].

Este tecido sofre modificações profundas durante o crescimento, maturação e envelhecimento, quer a nível estrutural quer a nível do próprio tecido [21]. Ao longo da vida a massa óssea é continuamente remodelada através de dois processos acoplados e perfeitamente regulados: a reabsorção e a formação ósseas. Durante o crescimento, a taxa de formação excede a taxa de reabsorção e a massa óssea corporal aumenta progressivamente, até se atingir um pico máximo. Uma vez atingido este valor, entre os 20 e os 30 anos, a taxa de formação passa a ser idêntica à de reabsorção; no entanto, depois dos 40 a 50 anos, a taxa de reabsorção excede a de formação e a massa óssea corporal começa a diminuir (processo que é particularmente evidente nas mulheres após a menopausa). O balanço entre estes dois processos determina a massa do esqueleto e a sua forma em qualquer fase da vida do indivíduo [20-22].

O tecido ósseo é constituído fundamentalmente por *células ósseas* (osteoblastos, osteócitos e osteoclastos) e por uma *matriz extracelular orgânica mineralizada*. O que diferencia este tecido dos outros é a presença de sais minerais na substância intercelular, principalmente fosfato de cálcio, sendo estes responsáveis pela dureza do osso. Na substância intercelular encontram-se, igualmente, fibras de colagénio que lhe proporcionam um reforço adicional [18,19].

Apesar da sua aparência macroscópica, o osso não é uma substância sólida homogénea. Na realidade, todos os ossos são porosos. Os poros contêm células vivas e vasos sanguíneos que fornecem os nutrientes às células. Dependendo do grau de porosidade, as regiões dos ossos podem designar-se como esponjosas ou compactas. O *tecido ósseo esponjoso* (cerca de 20% do esqueleto) é constituído por um retículo tridimensional de espículas ósseas ramificadas ou *trabéculas* que delimitam um sistema labiríntico de cavidades intercomunicantes, ocupadas pela *medula óssea vermelha*; forma a maior parte do tecido ósseo dos ossos pequenos, planos e irregulares e as epífises dos ossos longos. O *tecido ósseo cortical ou compacto* não possui cavidades visíveis a olho nu; encontra-se sob a forma de uma fina camada a recobrir o osso esponjoso e constitui a maior parte do tecido ósseo da diáfise dos ossos longos. Apesar da existência dos dois tipos de osso, não é possível observar-se uma separação nítida, verificando-se uma transição progressiva entre as duas formas. Esta classificação é macroscópica e não histológica, pois o tecido compacto e as espículas ou trabéculas que separam as cavidades do tecido esponjoso têm a mesma estrutura histológica básica [18-20,23,24].

1.1. CÉLULAS ÓSSEAS

No tecido ósseo distinguem-se, fundamentalmente, os osteoblastos, os osteócitos e os osteoclastos [3,20]. A actividade destas células é regulada por várias hormonas e uma multiplicidade de factores de crescimento produzidos pelas células ósseas e por outros tipos celulares existentes no microambiente ósseo (por exemplo, células hematopoiéticas, células endoteliais e macrófagos). A abundância de cada tipo de célula e a sua actividade funcional variam significativamente com a idade, tipo de osso (endocondral *vs.* intramembranoso) e localização anatómica [23-29].

CÉLULAS DE LINHAGEM OSTEOBLÁSTICA

As células da linhagem osteoblástica são as responsáveis pela formação do tecido ósseo que se observa durante o desenvolvimento embrionário, crescimento, remodelação, reparação de fracturas e outros defeitos ósseos ou quando induzido experimentalmente [26,30].

Os resultados de estudos morfológicos e histológicos mostram que as células osteoblásticas constituem várias subpopulações com diferentes características bioquímicas e respostas únicas a estímulos fisiológicos. Classificam-se, por ordem crescente de diferenciação em osteoprogenitores, pré-osteoblastos, osteoblastos e osteócitos. De referir, no entanto, que cada um destes tipos celulares inclui ainda células em vários estados de maturação [20,26,28,29].

As células de linhagem osteoblástica têm origem em *células pluripotentes indiferenciadas do mesênquima*, também designadas por *células pluripotentes do estroma fibroblástico da medula óssea*. As células pluripotentes possuem uma grande capacidade de diferenciação e podem originar diferentes tipos celulares, nomeadamente osteoblastos, condroblastos, fibroblastos e adipócitos [26-35]. Quando devidamente estimuladas e através de mecanismos de diferenciação próprios dão origem a uma população celular de potencial mais limitado, a qual pode proliferar e diferenciar-se em células da linhagem osteoblástica [20,32,33].

As **células osteoprogenitoras** persistem durante a vida pós-natal e encontram-se em todas ou quase todas as superfícies ósseas, nomeadamente no endóstio, na camada interna do periósteo e nas trabéculas da cartilagem calcificada das metáfises [20,29]. São mais activas durante a fase de crescimento dos ossos e, também, em situações que envolvem a reparação de fracturas ou outras lesões ósseas [20,29]. Os vários estudos efectuados sugerem que estas células não diferem nas suas características morfológicas dos fibroblastos da camada fibrosa do periósteo ou do estroma da medula óssea [20,26,28].

Os **pré-osteoblastos** são considerados os percursores imediatos dos osteoblastos e são identificados mais pela sua localização, no lado oposto ao da superfície do osso em formação, do que pela sua estrutura [28,29,36]. Estas células diferem dos osteoblastos activos pelo facto de possuírem capacidade de divisão celular [29,36]. Morfologicamente estes dois tipos celulares são semelhantes (células cubóides) e apresentam alguns marcadores comuns, particularmente uma reacção histoquímica intensa para a fosfatase alcalina (FA) [26,28,36].

Os **Osteoblastos (OB)** são as células responsáveis pela síntese da matriz orgânica (osteóide) e têm um papel importante na sua mineralização [20,24,36]. Estes possuem receptores para várias hormonas e para factores de crescimento sintetizados pelos próprios OB e outras células presentes no microambiente ósseo [22,24,26,28,35,36]. Estas substâncias têm efeitos autocrínicos e paracrínicos. Assim, os OB desempenham um papel central num sistema de comunicação célula - célula que é essencial nos mecanismos de regulação da remodelação óssea [20,22,35,36].

Os OB possuem uma ultra-estrutura que reflecte a sua elevada actividade de síntese, nomeadamente um retículo endoplasmático rugoso (RER) e um aparelho de Golgi muito desenvolvidos [18,20,22,24,36]. No citoplasma encontram-se numerosas mitocôndrias e a membrana plasmática é rica em fosfatase alcalina [22,36]. O núcleo do OB activo é grande e claro, apresenta um ou dois nucléolos e situa-se na extremidade da célula mais afastada da matriz óssea [20,24]. Quando em intensa actividade biossintética apresentam uma forma cubóide com um citoplasma muito basófilo, indicando a presença de grandes quantidades de ARNm, bem como uma reacção histoquímica muito intensa para a FA [20,24,26,28,29,36]. Nas superfícies ósseas, estas células dispõem-se sempre lado a lado e apresentam prolongamentos citoplasmáticos que permitem o contacto mútuo [18,20].

Os OB existentes nas superfícies ósseas podem transformar-se em **células de revestimento**. Estas células apresentam uma forma plana mais alongada e encontram-se dispostas paralelamente à superfície óssea [24,26-28]. Possuem muito pouco citoplasma, menor quantidade de RER e um aparelho de Golgi menos desenvolvido que os OB, indicativos de uma actividade biossintética baixa [20,24,37]. A basofilia citoplasmática e a reacção histoquímica para a localização da FA estão diminuídas. As células de revestimento não participam na formação nem na reabsorção óssea. No entanto, parecem constituir uma barreira selectiva entre o osso e os outros fluídos extracelulares, desempenhando um papel importante na homeostasia mineral e no controlo do crescimento dos cristais da matriz [22,24,33,37]. Por outro lado, o revestimento das superfícies ósseas é importante na manutenção do tecido, pois existem evidencias de aparecimento de áreas de reabsorção óssea nos locais em que esta camada celular desapareceu [20,37].

Uma pequena proporção de OB (cerca de 10-20%) fica incorporada na matriz por eles sintetizada, encerrados em pequenos espaços – as *lacunas* [18-20,28,36]. Estas células, designadas por **osteócitos**, correspondem ao estádio de diferenciação mais avançado da linhagem

osteoblástica e perderam praticamente capacidade de formação óssea [26,28,36]. Cada lacuna contém apenas um osteócito e os seus prolongamentos citoplasmáticos ocupam os canalículos, que irradiam das lacunas. Os prolongamentos citoplasmáticos dos diversos osteócitos estabelecem contacto entre si através de junções comunicantes de hiato [38], as quais permitem a passagem de pequenas moléculas e iões [18,20,22,24,28]. Por conseguinte, os canalículos estabelecem vias de comunicação entre diversos osteócitos e destes com os OB e com os vasos sanguíneos, através dos quais se efectua o transporte de nutrientes e de metabolitos necessários à manutenção do tecido ósseo [18,20,22,24,26,28].

Os osteócitos diferem dos OB não só na sua relação com o microambiente ósseo mas, também, na sua estrutura e função [29]. Os osteócitos são células achatadas de forma ovóide, cujo tamanho vai diminuindo à medida que vão ficando progressivamente mais mergulhados na matriz mineralizada [24,28,29]. As suas características ultra-estruturais, nomeadamente a quantidade de RER e o tamanho do aparelho de Golgi, vão-se alterando igualmente: os osteócitos mais próximos da superfície óssea apresentam uma ultra-estrutura idêntica à dos OB, mas esta vai regredindo progressivamente à medida que eles vão ficando mais imersos na matriz mineralizada, o que indica uma diminuição da sua actividade biossintética [20,24,29]. A actividade da FA e a basofilia do citoplasma diminuem da mesma forma [24]. Os osteócitos não são metabolicamente inertes, já que são essenciais para a manutenção da matriz orgânica mineralizada, sendo a sua morte seguida de reabsorção óssea [18,20]. Há vários estudos que sugerem que os osteócitos podem funcionar como sensores da integridade da matriz óssea, regulando a sua remodelação por mecanismos ainda mal esclarecidos [35,39].

Os OB, osteócitos e células de revestimento são células que apresentam características distintas. No entanto, em determinadas circunstâncias pode observar-se a conversão de um tipo celular no outro. Neste contexto, há vários autores que sugerem considerá-los como estados funcionais diversos de um mesmo tipo celular. Esta transformação reversível dos diferentes tipos celulares é considerada como um exemplo de *modulação celular*, muito diferente da *diferenciação celular*, processo este que corresponde a uma especialização da estrutura ou da função, apresentando um carácter progressivo e, provavelmente, irreversível [20,26,28,32].

OSTEOCLASTOS

Os **osteoclastos (OC)** são células gigantes multinucleadas e móveis, responsáveis pela reabsorção óssea [22,24,33,40-42]. Os OC, e também os monócitos e os macrófagos, têm origem nas células hematopoiéticas da medula óssea e partilham um precursor comum, a *célula progenitora de granulócitos e macrófagos* ("granulocyte-macrophage colony-formimg unit": GM-CFU) [20,40-44]. Da diferenciação da célula pluripotente podem surgir *células progenitoras* que têm capacidade de divisão e se encontram num estado inicial de diferenciação [33,45]. A célula progenitora pode dar origem a *células precursoras iniciais de OC* [44,46]; estas células expressam um dos marcadores dos OC que é o receptor da vitronectina (VNR) [46]. Os *precursores tardios* ou pré-osteoclastos são células que já não têm capacidade de divisão e que expressam a maioria dos marcadores atribuídos aos OC: receptor da VNR, receptor da calcitonina (CT), anidrase carbónica, bomba H^+-ATPase do tipo vacuolar e lisossomas ricos em fosfatase ácida resistente ao ácido tartárico [33,40,42,44,46]. Os pré-osteoclastos podem migrar para o tecido ósseo onde aderem, podendo exibir capacidade de reabsorção óssea mesmo antes de se fundirem e originarem OC multinucleados [20,40,45,46].

O processo de diferenciação dos OC é regulado por várias hormonas, principalmente a vitamina D_3 [42], e por várias citocinas e/ou factores de crescimento, como o CSF-1 ("colony-stimulating factor-1") ou M-CSF ("macrophage colony-stimulating factor") [20,33,40,43,47]. Este factor parece ser indispensável à proliferação e diferenciação dos progenitores dos OC, bem como à sobrevivência dos OC multinucleados e pode ser produzido por vários tipos celulares incluindo as células osteoblásticas [20,33,40,43,47].

1.2. MATRIZ ÓSSEA

A matriz óssea é constituída por componentes orgânicos e inorgânicos perfazendo cerca de 90% do peso total do osso compacto [20,22,48]. A matriz orgânica não mineralizada (30%), também chamada de osteóide, é constituída predominantemente por *fibras de colagénio do tipo I* (cerca de 27%) e por um meio homogéneo denominado *substância fundamental amorfa*. O componente inorgânico da matriz é constituído por fosfatos de cálcio microcristalinos, semelhantes à hidroxiapatite (70%) [20,22,36,49].

MATRIZ ORGÂNICA

O **colagénio** do tecido ósseo representa cerca de metade do colagénio total do organismo e é predominantemente do tipo I (cerca de 97% do tipo I e o restante do tipo V e III) [20,48-51]. Os colagénios são um conjunto de proteínas extracelulares fibrosas que desempenham funções estruturais, sendo uma parte apreciável das suas moléculas constituída por uma hélice tripla, que lhes confere uma resistência considerável às forças de tensão [51-54]. A presença de hidroxiprolina é essencial para estabilizar a hélice tripla, constituindo uma característica única das moléculas de colagénio [48-55].

As etapas mais importantes na biossíntese dos colagénios consistem na síntese das cadeias α, hidroxilação e glicosilação de alguns aminoácidos, formação da tripla hélice, condensação das moléculas de *procolagénio* assim formadas em vacúolos e subsequente secreção, clivagem extracelular dos propéptidos dando origem às moléculas de *colagénio* ou *tropocolagénio*, polimerização ordenada destas moléculas sob a forma de *fibrilas* e estabilização das fibrilas por ligações covalentes intermoleculares [48,53-56]. Os espaços no interior desta estrutura tridimensional, frequentemente denominados *zonas de orifício*, são o local inicial de deposição mineral [48-50, 53,55].

Os outros tipos de colagénio, nomeadamente do tipo V e III, estão presentes em quantidades vestigiais e parecem desempenhar um papel importante na regulação do diâmetro das fibrilas [49,57].

As fibras de colagénio do tipo I estendem-se em todas as direcções do osso, mas a sua densidade é maior ao longo das linhas de tensão e de tracção que actuam sobre o osso [50,53,54]. O colagénio tipo I serve de suporte, local de ligação e orientação das outras proteínas da matriz [40].

A **substância fundamental amorfa** (cerca de 3% da matriz) é formada fundamentalmente por complexos de glicosaminoglicanos e proteínas, os quais são designados por proteoglicanos, associados a glicoproteínas estruturais [20,49,53,58, 57].

Entre os *glicosaminoglicanos* do tecido ósseo encontra-se o *sulfato de condroitina A* ou 4-sulfato de condroitina, *sulfato de condroitina C* ou 6-sulfato de condroitina, *queratossulfato* e o *ácido hialurónico* [20,49,55,56]. Os glicosaminoglicanos são extremamente hidrofílicos, de modo que quase toda a água presente na substância fundamental amorfa se encontra na

camada de solvatação destas moléculas. A ligação destes compostos a um componente proteico dá origem à formação de macromoléculas denominadas proteoglicanos [18,20,49,53,57]. Os proteoglicanos da matriz mineralizada possuem proteínas ricas em resíduos de leucina (*decorina* [49,57,58], *biglicano* [49,57,59], *fibromodulina* [49,57,60], *osteoaderina* [57]), enquanto que nas fases mais precoces da osteogénese predominam as formas ligadas ao hialuronano (em particular, *versicano* [57,61]). Os proteoglicanos participam na formação da matriz e na regulação da actividade dos factores de crescimento [57].

As glicoproteínas, como a *fosfatase alcalina*, a *osteocalcina* [48,49,62-64], a *osteonectina* [48,49,51,59,65], as proteínas com resíduos de Arg-Gly-Asp ("RGD-containing proteins": *trombospondina* [49,66], *fibronectina* [49,67], *vitronectina* [49,68], *osteopontina* [48,49,57,62,63,69], *sialoproteína óssea* [49,56,57,69,70]), a *fibrilina* e a *tetranectina*, são produzidas em diferentes fases da diferenciação osteoblástica [48,49,57]. A expressão das diferentes proteínas presentes na matriz observa-se numa sequência temporal perfeitamente coordenada [49,71-76]. Estas substâncias exibem um leque alargado de funções, incluindo o controlo da proliferação celular, interacções célula-matriz e mediação da deposição dos sais de cálcio entre as fibras de colagénio [48,49,55,59].

A substância fundamental amorfa tem um papel importante no controlo do conteúdo de água nos ossos, parece estar também envolvida na regulação da formação e orientação apropriada das fibrilas de colagénio para a subsequente mineralização da matriz e, ainda, na regulação da mineralização [48,49,55,57,59,77-80].

MINERALIZAÇÃO DA MATRIZ

A **parte inorgânica da matriz** representa cerca de 70% do peso seco da matriz óssea. É constituída essencialmente por iões cálcio e fosfato. O fósforo e o cálcio formam cristais, que estudos de difracção de raios X mostraram ter a estrutura da hidroxiapatite (HAP) com a fórmula elementar: $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ [18,20,36,81]. Estes cristais dispõem-se ao longo das fibras de colagénio, envolvidos por substância fundamental amorfa. Todavia, não se encontram dispostos ao acaso, aparecendo regularmente ao longo das fibrilas, numa distribuição que reflecte a geometria subjacente da trama molecular do colagénio [20, 36,81]. Esta organização da estrutura óssea extracelular em que fibras de colagénio da matriz orgânica, com uma elevada resistência às forças de tensão e tracção, estão embebidas e intimamente ligadas aos cristais de HAP, que

possuem uma enorme resistência às forças de compressão, conferem ao osso e ao esqueleto em geral as suas características únicas de robustez, resistência e funcionalidade [18-20,22,48].

Os primeiros sais de cálcio a serem depositados na matriz orgânica são compostos amorfos, uma mistura provável de sais como $CaHPO_4.2H_2O$ ("brushite"), $Ca_3(PO_4)_2.3H_2O$ e outros. A "brushite" é instável a pH fisiológico pode dissolver-se ou ser convertida em cristais de HAP; no entanto, pode ser estabilizada por um microambiente ácido, por várias proteínas não colagénicas e pelo pirofosfato, processo que inibe a sua conversão em hidroxiapatite [81,82].

O mecanismo pelo qual ocorre a deposição dos sais de cálcio no osteóide permanece por esclarecer. No entanto, os OB parecem desempenhar um papel importante ao sintetizar e secretar para o osteóide a FA. A concentração dos iões cálcio e fosfato no líquido ósseo é superior à necessária para a deposição espontânea de sais de cálcio, existindo uma variedade de inibidores, incluindo o pirofosfato, que desempenham um papel decisivo no controlo da mineralização óssea. O processo de mineralização parece estar associado a vesículas envoltas por membrana, derivadas da membrana plasmática do OB, denominadas *vesículas da matriz*; estas contêm fosfatase alcalina e outras fosfatases que podem participar na neutralização do efeito inibitório do pirofosfato. A concentração do fosfato libertado aumenta até ao ponto em que o produto de solubilidade é ultrapassado e há precipitação de fosfato de cálcio [83]. Contudo, a própria estrutura e organização do colagénio tipo I e a presença de outras proteínas não colagénicas da matriz, como a osteocalcina, a osteonectina e a osteopontina, podem também influenciar a mineralização [81-88].

O ião predominante da matriz óssea é o cálcio e a relação Ca/P está compreendida entre 1,3 e 2,0, dependendo, entre outras, das condições nutricionais. A maturação dos cristais é acompanhada, geralmente, por uma alteração na sua composição mineral. Assim, a matriz recém mineralizada apresenta cristais muito pequenos, uma razão Ca/P e um teor em carbonato baixos, bem como um conteúdo em hidrogenofosfato e em água de ligação elevados. Com a maturação aumentam a razão Ca/P (aproximando-se da razão apresentada pela HAP) e o teor em carbonato, enquanto diminuiu o conteúdo em água e o teor em hidrogenofosfato, originando cristais maiores e mais perfeitos [20,48,81].

Sendo os cristais, na sua totalidade, muito pequenos possuem uma enorme área superficial [22,81]. Os iões da superfície da hidroxiapatite são hidratados, existindo uma camada de água e iões à

volta do cristal - *camada de hidratação* – que facilita a troca de iões entre o cristal e o fluído intersticial [18,81]. Devido a estes factores, certos iões podem ser incorporadas na sua estrutura, quer durante a sua formação quer por troca iónica nos já existentes; deste processo podem resultar alguns defeitos na forma dos cristais, sem contudo afectar a estrutura global [20]. Assim, podem estar presentes no osso pequenas quantidades de outros iões, como o potássio, magnésio, sódio, carbonato, cloreto, entre outros. Os cristais de HAP possuem, igualmente, afinidade para certos metais pesados e poluentes ambientais radioactivos, como o chumbo, plutónio, estrôncio e urânio, conduzindo a sua fixação no osso a situações patológicas bem definidas. A capacidade da HAP para se ligar a certos iões explica, também, a fixação no osso de substâncias terapêuticas, como o flúor e os bifosfonatos. No entanto, os estudos efectuados por difracção de raios X sugerem que estes iões são adsorvidos à superfície dos cristais de hidroxiapatite e não organizados em cristais próprios e diferenciados [20,22,48,81].

O esqueleto funciona como um local de armazenamento para a maioria dos iões referidos. Relativamente ao organismo considerado como um todo, o esqueleto contém cerca de 99 % do cálcio, 35% do sódio, 80% do carbonato, 80% do citrato e 60% do Mg [22].

2. REMODELAÇÃO ÓSSEA

A remodelação óssea é o processo pelo qual os efeitos catabólicos dos OC (reabsorção óssea) estão em equilíbrio com os efeitos anabólicos dos OB (formação óssea). Verifica-se num ciclo extremamente bem regulado no qual os OC aderem ao tecido ósseo e o removem por acidificação e digestão proteolítica e os OB sintetizam, no mesmo local, uma matriz orgânica que é posteriormente calcificada. Esta sequência de acções requer comunicação entre os OC e os OB, o que sugere a produção, pelas células ósseas, de factores reguladores com efeitos autocrínicos e paracrínicos [81,89-91]. A remodelação óssea é a base celular do metabolismo ósseo [21]. O "turnover" ósseo anual é de cerca de 4% no osso cortical e de 20% no osso trabecular [81]. A contínua remodelação do osso traduz-se por funções fisiológicas importantes, nomeadamente, a regulação da homeostasia iónica e a manutenção das propriedades mecânicas do osso .

A remodelação óssea é um processo local que se observa em pequenas áreas designadas por unidades multicelulares básicas ("BMU") ou *unidades de remodelação óssea*, que correspondem

a uma fracção de cerca de 10-20% da superfície óssea do esqueleto adulto [21,37,81,89-91]. A restante superfície óssea é considerada inactiva em termos de remodelação óssea, sendo, no entanto, fisiologicamente funcional [37]. A taxa de renovação da massa óssea é determinada pelo número e frequência de activação das unidades de remodelação no esqueleto; a sua manutenção requer um equilíbrio da remodelação em cada uma destas unidades [21,81,89-91]. Embora, os mecanismos celulares envolvidos neste processo sejam idênticos no osso cortical e trabecular a arquitectura final é diferente. A remodelação óssea normal decorre num ciclo altamente regulado, o qual, de acordo com as principais actividades celulares observadas, pode ser dividido em quatro fases: activação, reabsorção, reversa e formação [21].

No inicio de cada ciclo de remodelação, *fase de activação*, as células que revestem as superfícies ósseas retraem-se, expondo a superfície óssea no local a ser remodelado [21,37]. Nesta fase observa-se o recrutamento dos precursores mononucleados dos OC a partir dos tecidos hematopoiéticos e a sua diferenciação celular e/ou a activação dos OC que já se encontram no local. A fusão das células mononucleares ocorre perto ou na superfície óssea. A activação dos OC existentes ocorre quando substâncias indutoras da reabsorção óssea, como a hormona da paratiróide (PTH), a IL-1 ou o TNF, estimulam os OC para secretar uma série de citocinas específicas, algumas das quais com efeito autocrínico que se traduz num aumento da actividade funcional dos OC [21,40,89,90].

A *fase de reabsorção* inicia-se com a adesão dos OC activos ao local a ser reabsorvido. Os OC são células morfológica e funcionalmente polarizadas, com um pólo em contacto directo com a matriz mineralizada, onde ocorre a adesão e para onde são lançados os principais produtos de secreção (pólo apical), e um outro pólo, que nunca está em contacto com a matriz mineralizada, onde se verifica a maioria das funções reguladoras (pólo basolateral) [40]. Assim, a membrana plasmática dos OC é bastante especializada, considerando-se pelo menos três zonas funcionais diferentes: a membrana basolateral, a zona de selagem ("sealing zone") e o bordo pregueado ("ruffled border") [20,22,40,92]. O OC adere à matriz óssea mineralizada pela zona de selagem, estabelecendo-se ligações específicas receptor-substrato [40,92,93]. A função da zona de selagem é não só ligar a célula à matriz óssea como também criar um espaço isolado entre elas - *compartimento de reabsorção* [92,94]. A ligação que se estabelece é do tipo anelar e a parte da membrana plasmática que fica rodeada pela zona de selagem não adere à matriz, sendo especializada na reabsorção propriamente dita. Essa região da membrana designa-se por *bordo pregueado*. A sua função é criar um microambiente ácido que vai solubilizar os

cristais de hidroxiapatite, libertando os iões cálcio e fosfato. Esta acidificação pode ser efectuada de duas maneiras: (1) fusão de vacúolos ácidos intracelulares com a membrana celular no interior da zona de selagem e libertação do seu conteúdo para a lacuna de reabsorção; (2) existência de bombas de protões (H^+-ATPase) do tipo vacuolar na zona pregueada da membrana. Após solubilização dos sais cristalinos, os OC libertam enzimas proteolíticas, como a colagenase, que digerem a matriz orgânica descalcificada. Como resultado deste processo, forma-se uma cavidade no osso denominada *lacuna de Howship* ou *de reabsorção* [40,84,93]. Por isso, a adesão dos OC ao tecido ósseo deve ser suficientemente estanque para impedir a saída de protões e de enzimas da lacuna de reabsorção para o espaço extracelular. A remoção dos produtos de degradação da matriz óssea é efectuada essencialmente por transcitose [21,41,94].

A *fase reversa* é um período crítico que ocorre após o processo de reabsorção e antes do processo de formação e parece ser um elemento de acoplamento importante entre os dois. Após a fase de reabsorção os OC abandonam o local, observando-se de imediato o aparecimento de células mononucleares (células do tipo dos macrófagos, osteócitos e pré-osteoblastos) na lacuna de reabsorção. Estas células têm como principal função preparar esta área para a formação de novo tecido ósseo. Secretam uma substância tipo cimento que parece desempenhar um papel importante na orientação dos OB durante a fase de formação [21,41].

A *fase de formação* tem início com a activação dos pré-osteoblastos, a sua migração para a lacuna de reabsorção e a sua diferenciação em OB activos. Os OB são também células polarizadas que sintetizam e secretam moléculas de colagénio e as diversas proteínas que constituem a substância fundamental amorfa da matriz orgânica. Posteriormente, os monómeros de colagénio sofrem polimerização para formar as fibras de colagénio. O tecido resultante, denominado de osteóide, vai preencher a cavidade formada pelos OC. Seguidamente observa-se a mineralização do osteóide que se inicia com a deposição de compostos amorfos de cálcio e fosfato nas fibras de colagénio. Estes focos de mineralização expandem-se e coalescem em cristais de hidroxiapatite através de remodelação posterior; todavia, uma pequena quantidade (0,5-1%) deste componente mineral permanece amorfo, constituindo um sistema tampão facilmente mobilizável que desempenha um papel importante na manutenção da homeostasia do cálcio [21,41,48]. Completa-se assim o ciclo da remodelação óssea [21].

Este processo verifica-se durante toda a vida, mas varia com o local do esqueleto e a idade do indivíduo e não causaria uma alteração visível na massa óssea se a substituição do osso reabsorvido fosse igual à quantidade removida. Todavia, imediatamente após a paragem do crescimento, persistem pequenas falhas no osso no final de cada ciclo, o que reflecte alguma ineficácia na dinâmica de remodelação. Como consequência, a acumulação vitalícia destas falhas dá origem a perda óssea progressiva até à velhice. Por exemplo, a variação dos níveis circulantes de algumas hormonas calciotrópicas, que são próprias do processo de envelhecimento (hormona do crescimento, vitamina D_3, estrogénios na mulher após a menopausa), podem afectar directamente as células ósseas e também a produção de factores de crescimento no microambiente ósseo, resultando numa alteração dos mecanismos de regulação local da remodelação óssea. Estas alterações representam as vias finais pelas quais diversos estímulos, como a insuficiência dietética, desequilíbrios hormonais, determinados fármacos e o processo de envelhecimento afectam o metabolismo ósseo e podem ser devidas a um aumento da actividade dos OC, os quais produzem lacunas de reabsorção invulgarmente grandes, diminuição da função dos OB, os quais não preenchem completamente o espaço reabsorvido ou a uma combinação dos dois efeitos [85,86,89-91].

3. METABOLISMO DO CÁLCIO E DO FÓSFORO

3.1. CÁLCIO

O cálcio é um dos iões mais abundantes do organismo, desempenhando funções fisiológicas importantes. Além de ser vital para o tecido ósseo, é também importante para o funcionamento de diversos sistemas enzimáticos, incluindo os responsáveis pela contracção muscular, coagulação sanguínea e transmissão dos impulsos nervosos [86,95,96].

No Homem adulto cerca de 99% do cálcio (de um total de cerca de 1250 g) está armazenado nos ossos, numa forma cristalina que se assemelha estruturalmente à hidroxiapatite. A parte restante está presente no líquido extracelular (LEC) e, em menor concentração, dentro das células [96]. Pela distribuição do cálcio é possível compreender a importância da remodelação óssea e do metabolismo ósseo, em geral, no processo de homeostasia deste ião [86,95,96]. Contudo, o mecanismo homeostático que regula a concentração plasmática do cálcio não

depende exclusivamente da actividade de remodelação óssea. A regulação da concentração do cálcio no sangue é mantida em parte pelas taxas de absorção intestinal [97,98] e reabsorção nos túbulos renais [98,99] e, principalmente, pelo equilíbrio dinâmico que ocorre entre o plasma e o fluído ósseo [98]. Assim, o tecido ósseo participa com todas as suas células no metabolismo do cálcio no organismo [82].

A concentração plasmática do cálcio, dada a sua intervenção em processos biológicos vitais, deve ser mantida dentro de limites muito estreitos e compreende três formas: cálcio ionizado (cerca de 50%), cálcio ligado às proteínas plasmáticas (cerca de 40%), principalmente albumina, e cálcio sob a forma de complexos difusíveis através da membrana capilar (cerca de 10%) combinados com outras substâncias do plasma e dos líquidos intersticiais, como o citrato, o fosfato, o lactato, etc. De notar que a fracção que desempenha funções fisiológicas, cálcio ionizado, representa apenas 50% do cálcio total plasmático [81,82,86,95,96]. A concentração de cálcio no plasma e no líquido extracelular (LEC) é mantida constante pela intervenção de processos que permanentemente introduzem ou retiram cálcio do compartimento extracelular. O cálcio entra para este compartimento por absorção intestinal e por reabsorção da fase mineral do osso, deixando o LEC e o plasma por deposição no esqueleto, excreção urinária, secreção para o intestino e vias menos importantes, como o leite e o suor [81,86,95,98,100].

Os OB, as células de revestimento e os osteócitos parecem desempenhar um papel importante na regulação da homeostasia mineral, independentemente de qualquer papel na remodelação óssea [37,82]. Assim, no seu conjunto formam um sistema de células interligadas que se espalha por todo o osso e sobre todas as superfícies ósseas, com excepção das pequenas áreas da superfície adjacentes aos OC. Estas células contactam através de um extenso sistema de canalículos, nos quais os prolongamentos citoplasmáticos dos diversos osteócitos estabelecem contacto entre si e com os OB através de junções de hiato. Este extenso sistema é designado de *sistema osteocítico da membrana,* formando uma barreira entre o osso e o LEC. Entre a membrana osteocítica e o osso há uma pequena quantidade de líquido, designado por *fluído ósseo* [37,82]. Neste sistema existem bombas de cálcio que têm como função bombear o cálcio do fluído ósseo para o LEC, criando assim um gradiente de concentração (no líquido ósseo a concentração do cálcio corresponde a cerca de 1/3 da que existe no LEC). Quando esta bomba está sobreactiva a concentração do cálcio no líquido ósseo diminui ainda mais e os sais de fosfato de cálcio são dissolvidos a partir do osso – *osteólise*. Quando a bomba está quase

inactiva, a concentração de cálcio sobe a um nível mais elevado e os sais de fosfato de cálcio são redepositados na matriz [82,86,95,101].

O metabolismo do cálcio e a manutenção da sua concentração plasmática dentro de certos limites estreitos está dependente da sua ingestão na dieta alimentar e de controlo endócrino rigoroso, pois este afecta a sua entrada no intestino e a sua saída no rim, regulando também o reservatório no tecido ósseo, do qual o ião é removido quando necessário. Há três hormonas que estão basicamente envolvidas na regulação do metabolismo do cálcio: a paratormona (PTH) e a vitamina D [1,25-$(OH)_2$D] que aumentam a calcemia, e a calcitonina que em oposição provoca hipocalcemia. Por sua vez, os níveis do cálcio influenciam a síntese e secreção da PTH e da calcitonina, bem como a formação dos metabolitos activos da vitamina D [86,96,98,101]. Os glucocorticóides, a hormona do crescimento, os estrogénios e factores de crescimento também afectam o metabolismo do cálcio [101].

3.2. FÓSFORO

Além da sua participação como componente dinâmico do metabolismo intermediário e energético, o ião fosfato modifica as concentrações do cálcio nos tecidos e tem participação importante na excreção renal de protões [86]. Apesar de ser encontrado em compostos vitais para o organismo, o seu metabolismo não é tão finamente regulado como o do cálcio [86,95,101].

O fosfato está presente no plasma e no LEC, nas membranas da célula, no líquido intracelular, no colagénio e no tecido ósseo (cerca de 85%) [96]. No LEC, grande parte do fosfato está na forma inorgânica em dois componentes: Na_2HPO_4 e NaH_2PO_4 numa razão de 4:1 a um pH de 7,40 [96]. A concentração do fosfato no LEC é regulada pelo rim, que altera a sua taxa de excreção de acordo com a concentração plasmática [99]. A PTH aumenta a sua excreção urinária e os metabolitos activos da vitamina D estimulam directamente a sua reabsorção [86,95-101].

4. REGULAÇÃO DO METABOLISMO ÓSSEO

A regulação do metabolismo ósseo normal envolve a interacção complexa de factores sistémicos e locais com os OB e os OC [91,98,102].

O metabolismo ósseo é regulado por várias hormonas e factores de crescimento. Entre as hormonas sistémicas encontram-se, principalmente, a PTH, o peptídeo activo desta (HPTrP) e a 1,25-$(OH)_2D_3$. No entanto, várias outras hormonas têm um papel importante na regulação da remodelação óssea (*eg*, calcitonina, hormona do crescimento, hormonas sexuais, glucocorticóides, etc.). As citocinas produzidas localmente também influenciam a formação e reabsorção ósseas (*eg*, IL-1, IL-3, IL-6, TGF-β, EGF, IGF-1 e IGF-2). Alguns destes factores de crescimento têm de facto uma mistura de efeitos locais e sistémicos (*eg*, IGF-1), sobrepondo-se aos efeitos de algumas hormonas sistémicas (hormona do crescimento e insulina) [102-103].

4.1. FACTORES SISTÉMICOS

4.1.1. HORMONA DA PARATIRÓIDE

A hormona da paratiróide, paratormona ou PTH é um polipeptídeo com 84 resíduos de aminoácidos produzido pelas glândulas paratiróideas [86,101,104]. Foram, igualmente, isolados compostos menores de até 34 aminoácidos adjacentes ao fragmento N-terminal da molécula (por *eg*, peptídeo activo, PTH 1-34), os quais estão associados à fixação da hormona aos receptores e à actividade fisiológica [86,101,105]. Estes fragmentos desempenham um papel fisiológico muito importante, já que a sua eliminação renal é mais lenta e, consequentemente, podem exercer a sua acção por períodos de tempo mais alargados [95,101,105].

A secreção da PTH é regulada pelos níveis do cálcio plasmático, sendo importante neste mecanismo apenas a fracção do cálcio iónico. Concentrações elevadas de cálcio diminuem a secreção de PTH enquanto que concentrações baixas aumentam a sua libertação [86,95,105].

A principal função da PTH é regular a concentração extracelular do cálcio através dos seus efeitos no osso, no rim e, indirectamente, no intestino [86,101,104,105]. Presume-se que a acção da PTH no osso compreenda duas fases: uma primeira de actuação rápida, que se desencadeia em minutos e aumenta progressivamente por várias horas (mobilização do cálcio permutável) e uma fase mais lenta e tardia, que necessita de vários dias ou semanas para se desenvolver (estimulação da reabsorção óssea). A PTH ao nível do rim promove a reabsorção do cálcio e, simultaneamente, diminui a reabsorção dos fosfatos e estimula a conversão do calcifediol

(25-OH-D3) em calcitriol (1,25-$(OH)_2D_3$) - metabolito activo da vitamina D e um poderoso estimulante da absorção intestinal do cálcio e do fosfato [98,100,101,104,106].

Ao nível do osso pensa-se que a fase rápida resulta da activação das células ósseas já existentes (OB, células de revestimento e sobretudo osteócitos) para promover a dissolução do cálcio e do fosfato. A ligação da PTH a receptores existentes nos OB e nos osteócitos leva à activação da bomba de cálcio existente no sistema osteocítico da membrana, aumentando a sua permeabilidade a este ião, do lado do fluído ósseo, de que resulta a entrada do cálcio nessas células. Subsequentemente, a bomba de cálcio do outro lado da membrana celular transfere os iões para o LEC [95,101]. A bomba é estimulada pelo 1,25-$(OH)_2D_3$ que facilita a acção da PTH [95]. Desta forma, os OB, as células de revestimento e os osteócitos podem desempenhar um papel importante na regulação da homeostasia mineral, independentemente de qualquer papel na remodelação óssea [37].

A segunda fase da acção da PTH resulta da proliferação dos OC, seguida de um aumento da reabsorção óssea e não apenas da dissolução dos sais de fosfato de cálcio permutável [95,106]. A estimulação dos OC pela PTH verifica-se por um mecanismo indirecto, já que os OC não possuem receptores para esta hormona [102,106]. Todavia, os OB possuem receptores específicos na membrana e a sua activação conduz à libertação de várias citocinas (IGF-1, IL-1 e TNF, entre outras) que, por sua vez, vão actuar directamente nos OC, estimulando a sua capacidade de reabsorção óssea e aumentando o seu número. Se a estimulação pela PTH persistir durante vários meses, a reabsorção óssea pode levar ao enfraquecimento dos ossos e à estimulação secundária dos OB, que tentam corrigir o estado de fraqueza. Assim, o efeito tardio consiste num aumento das actividades osteoblástica e osteoclástica, observando-se, no entanto, uma preponderância da reabsorção [95,102,106].

Vários estudos efectuados *in vivo* mostram que a PTH, quando administrada intermitentemente, possui efeitos anabólicos tanto no osso cortical como no osso trabecular. Contudo, o mecanismo envolvido nesta acção permanece por esclarecer [102,106,107].

Grande parte do efeito da PTH sobre as células-alvo é mediado pelo mecanismo do segundo mensageiro do monofosfato cíclico de adenosina (AMPc). A ligação da hormona a um receptor da superfície da membrana leva à activação do sistema adenilcíclase, com o consequente

aumento da concentração do AMPc nos OB e noutras células. Há também evidência de uma participação do cálcio intracelular na mediação das actividades da PTH no osso [86,95].

4.1.2. VITAMINA D

O termo "vitamina D" compreende um conjunto de compostos esteróides lipossolúveis estreitamente relacionados, produzidos pela acção da luz ultravioleta sobre certas provitaminas [86,95,101,108]. Os principais componentes desta família são a vitamina D_2 e a vitamina D_3. A vitamina D_2, também denominada calciferol ou ergocalciferol, deriva do ergosterol e encontra-se nos alimentos vegetais, sendo a dieta alimentar a sua fonte de fornecimento. A vitamina D_3, ou colecalciferol, também pode ser fornecida por alguns alimentos, mas a maior parte é sintetizada na pele dos mamíferos como resultado da irradiação do 7-diidrocolesterol. As duas vitaminas são metabolizadas da mesma maneira e possuem efeitos biológicos análogos, desempenhando um papel importante na regulação do metabolismo ósseo [86,95,101,108].

A vitamina D, proveniente quer da dieta quer sintetizada no organismo, necessita de ser modificada para se tornar biologicamente activa. O principal metabólito activo, *calcitriol ou 1,25-diidroxicolecalciferol* [1,25-$(OH)_2D_3$], é o produto de duas hidroxilações sucessivas da vitamina D. A vitamina D entra na circulação onde se liga a uma proteína específica (globulina-α1), sendo então conduzida ao fígado. Aqui sofre a primeira hidroxilação na posição 25 por acção da 25-hidroxílase e converte-se em calcifediol ou 25-hidroxicolecalciferol (25-OH-D_3), que é biologicamente inactivo. O calcifediol recém-formado controla a actividade da 25-hidroxílase por um mecanismo de retroacção negativo. Desta forma, a sua concentração no plasma é mantida dentro de certos limites, independentemente da concentração de vitamina D, permitindo que esta se mantenha armazenada no fígado para uso futuro. Depois de produzido no fígado, o calcifediol entra na circulação e é transportado até ao rim pela mesma proteína. A segunda hidroxilação tem lugar principalmente no rim (também ocorre na placenta, nos queratinócitos da pele e nos macrófagos) e é efectuada por uma enzima específica - *1α-hidroxilase* – que o converte finalmente em calcitriol. Esta conversão requer a presença da PTH, já que na sua ausência a 1,25-$(OH)_2D_3$ praticamente não se forma [86,95,101,106,108,109].

Dada a importância do calcitriol, forma activa da vitamina D, na regulação da homeostasia do cálcio, o último passo na sua síntese é estreitamente controlado por vários mecanismos de retroacção. Assim, a actividade da 1α-hidroxilase aumenta na deficiência dietética da vitamina D, cálcio e fosfato; é estimulada pela PTH e, provavelmente, pelos estrogénios. Por outro lado, a sua actividade está diminuída quando há ingestão acentuada de fosfato, cálcio e vitamina D. A hipocalcemia pode activar directamente a 1α-hidroxilase e indirectamente, pelo incremento da secreção da PTH. A hipercalcemia reduz a secreção da PTH e o 25-OH-D_3 é convertido a um metabolito diferente, 24,25-$(OH)_2D_3$, que é praticamente inactivo. No entanto, este pode ser convertido pelo organismo em 1,24,25-$(OH)_3D_3$ que actua como o calcitriol, apesar de ser muito menos activo. A hipofosfatemia aumenta muito a actividade da 1α-hidroxilase. O calcitriol exerce um controlo de retroacção negativo directo na 1α-hidroxilase, que se traduz por uma acção directa no rim, bem como por inibição da produção da PTH[86,95,101,108,109].

A vitamina D tem um papel importante na homeostasia do cálcio e, paralelamente, do fosfato, pois o calcitriol aumenta a absorção intestinal do cálcio, fosfato e magnésio e interactua com a PTH, potenciando a mobilização do cálcio a partir do osso e diminuindo a excreção renal de ambos[86,95,97,98101,109].

O mecanismo de acção do calcitriol é semelhante ao das hormonas da tiróide e dos estrogénios. O calcitriol liga-se a receptores citoplasmáticos na célula-alvo e o complexo receptor-hormona interactua com o ADN para regular a biossíntese de uma ou mais proteínas. No intestino, o complexo calcitriol-receptor activa a transcrição de genes, resultando na síntese de uma proteína fixadora do cálcio, a calbindina ("CaBP-calcium binding protein"), que o transporta através da célula e o liberta no polo seroso em direcção à corrente sanguínea. Embora o calcitriol tenha outros efeitos nas células do intestino, esta acção na síntese da proteína fixadora do cálcio é a mais importante[86,95,101,108,109].

O calcitriol actua também ao nível da calcificação e da reabsorção óssea. Em doses elevadas estimula a reabsorção óssea, à semelhança do que se verifica com a administração da PTH. Esta vitamina tem uma acção directa e indirecta nas células envolvidas na remodelação óssea. Assim, o calcitriol liga-se a receptores existentes nos OB, induzindo a produção e secreção de citocinas que estimulam a actividade dos OC maturos ou promovem o recrutamento e maturação das suas

células precursoras, aumentando o seu número nos locais de reabsorção [33,86,95,101,102,109]. Em doses mais baixas, o calcitriol induz a mineralização do osteóide, provavelmente por um mecanismo indirecto devido ao aumento da absorção intestinal de cálcio e fosfato [86,95,101,102,108].

A deficiência em vitamina D resulta na absorção inadequada de cálcio e fosfato [96]. A hipocalcemia resultante estimula a secreção da PTH que actua ao nível do osso, aumentando a reabsorção do cálcio e do fosfato para normalizar a calcemia. No entanto, as concentrações plasmáticas do fosfato continuam subnormais devido ao efeito fosfatúrico da PTH. Assim, a falta de vitamina D conduz a uma deficiente mineralização óssea que durante o crescimento provoca o raquitismo e no adulto leva à osteomalacia [86,95,101,108].

A hipervitaminose D conduz a um aumento da absorção do cálcio e do fosfato no intestino e à sua remoção a partir do osso [97]. O resultado destes efeitos traduz-se imediatamente por hipercalcemia e hiperfosfatemia e, consequentemente, calciúria e fosfatúria. Finalmente, pode ocorrer deposição de sais de cálcio em vários tecidos, principalmente nos rins e nos grandes vasos sanguíneos [108].

4.1.3. CALCITONINA

A calcitonina (CT), que é produzida e secretada pelas células parafoliculares da tiróide [104], é um peptídeo de cadeia única contendo 32 resíduos de aminoácidos [86,95,101]. Os resíduos 1 a 8 são invariáveis com a espécie animal, sugerindo que são essenciais para a actividade biológica da hormona. Os resíduos do segmento médio da molécula, de 10 a 27, são variáveis e parecem influenciar a eficácia e/ou duração da acção [86,110].

A biossíntese e a secreção da CT são reguladas directamente pela concentração plasmática do ião cálcio. Deste modo a sua secreção aumenta na hipercalcemia e, inversamente, diminui na hipocalcemia, tornando-se praticamente indetectável. As concentrações médias da CT na mulher são inferiores às do homem, diferença que se acentua com a idade [86,95,101,110]. O tempo de semivida da CT é de 10 minutos [86,95,101].

A actividade hipocalcemiante da CT resulta, essencialmente, de efeitos no osso e no rim. Esta hormona reduz a concentração plasmática do cálcio pelo menos de duas maneiras: o

seu efeito imediato consiste na inibição directa da actividade dos OC, já que estas células possuem receptores específicos para a hormona, produzindo uma queda rápida e acentuada da área superficial da zona pregueada e, consequentemente, diminuição da actividade de reabsorção [33,40,98,110,111], simultaneamente, reduz a acção osteolítica dos osteócitos, deslocando assim o equilíbrio a favor da deposição do cálcio permutável no compartimento ósseo. Tal efeito é particularmente evidente nas crianças e em certas doenças ósseas, em que a taxa de remodelação óssea é elevada e, por isso, as taxas de dissolução e deposição do cálcio são altas. O segundo efeito da CT é mais prolongado, consistindo na diminuição da formação de novos OC, provavelmente mediado por citocinas presentes na matriz óssea. No seu conjunto estes efeitos promovem a diminuição da actividade osteoclástica e osteocítica, que são opostos aos da PTH, provocam uma retenção de cálcio no osso e contribuem para o efeito hipocalcemiante da CT [33,86,95,101,111]. Além disso, esta hormona aumenta a excreção renal de cálcio, fosfato e sódio, ao inibir a reabsorção destes iões no tubo proximal. Estes efeitos no rim são, igualmente, opostos aos da PTH. [86,110].

O facto da CT apresentar efeitos opostos aos da PTH não significa que esta hormona funcione como antagonista da PTH ao nível dos seus receptores. Por outro lado, as secreções das duas hormonas não se influenciam mutuamente por mecanismos directos, embora estejam ambas dependentes da concentração plasmática do cálcio. A CT comporta-se, portanto, como um antagonista fisiológico da PTH [86,95], actuando apenas como regulador a curto prazo da concentração plasmática do cálcio, já que o seu efeito é mais rápido do que o da PTH. No entanto, no excesso ou na deficiência prolongados de cálcio apenas o mecanismo hormonal da PTH parece ser realmente importante para a manutenção da concentração plasmática normal do ião cálcio [86,95].

4.1.4. HORMONAS SEXUAIS: ESTROGÉNIOS

As hormonas sexuais, tanto masculinas (testosterona) como femininas (estrogénios), têm um efeito complexo sobre o esqueleto, sendo de um modo geral estimuladoras da formação do tecido ósseo. Na puberdade, influenciam o aparecimento e desenvolvimento dos centros de ossificação e daí, o crescimento ser mais rápido nesta fase. A maturação sexual precoce ou a administração de hormonas sexuais interrompem o crescimento corporal, indiciando um outro efeito, igualmente importante, no crescimento do esqueleto. Nestas situações, verifica-se que

a cartilagem epifisária é substituída precocemente por tecido ósseo, pelo que o indivíduo não atinge a sua estatura normal. Estes efeitos são mais intensos na mulher e, em consequência, o seu crescimento, embora seja mais precoce, cessa primeiro que no homem [89]. No entanto, contrariamente ao homem, no qual a massa óssea diminui linearmente com a idade, na mulher existe, no momento da menopausa, uma aceleração da perda da massa óssea associada a uma activação da remodelação óssea com preponderância da actividade de reabsorção sobre a da formação [91,112].

Os estrogénios são hormonas sexuais femininas produzidas principalmente pelos ovários e pela placenta, em quantidades apreciáveis [104]. A secreção dos estrogénios é regulada pela acção de duas hormonas da hipófise anterior: a hormona estimuladora do folículo (FSH) e a hormona luteinizante (LH). No plasma feminino apenas três estrogénios são encontrados em quantidades significativas, nomeadamente o β- estradiol, que é de longe o mais importante, a estrona e o estriol [113].

Os estrogénios desempenham um papel importante na manutenção da massa óssea na mulher adulta, ao modular a remodelação óssea e mantendo um equilíbrio entre a actividade dos OB e OC [89]. Quando os níveis de estrogénios são muito baixos verifica-se um aumento na frequência de novas unidades de remodelação e um desequilíbrio entre a actividade osteoclástica e osteoblástica [102]. Os OC formam lacunas de reabsorção mais profundas e a capacidade dos OB para preencher estas lacunas parece estar, também, enfraquecida. Estes efeitos são mais pronunciados no osso esponjoso, devido à sua maior taxa de remodelação, resultando na perda de elementos arquitecturais, o que conduz a um enfraquecimento do esqueleto nas regiões em que o osso trabecular predomina: vértebras e partes distais dos membros (antebraço e anca) [89,91]. Durante a sua vida uma mulher perde cerca de 50% do osso esponjoso e cerca de 35% do osso cortical. Com base em dados actuais, estima-se que a perda de 25% do osso esponjoso e 15% do osso cortical é devida à deficiência em estrogénios, sendo esta uma das principais causas da osteoporose na mulher. Este problema traduz-se, geralmente, por um enfraquecimento dos ossos e conduz à fractura dos mesmos. A terapêutica de substituição de estrogénios parece reduzir em cerca de 50% a taxa de fracturas das vértebras e das partes distais dos membros [89,91].

No citoplasma dos OB existem receptores específicos para os estrogénios. Assim, estes difundem-se para o interior das células, onde se ligam a receptores específicos existentes em

complexos multiproteicos. De seguida, o receptor dimeriza e interactua com genes específicos do ADN, aumentando os níveis de transcrição, ou seja, de ARNm e, consequentemente, de proteínas. A presença destes receptores sugere que os estrogénios são capazes de actuar directamente nos OB e, assim, de regular a reabsorção e/ou a formação óssea [112]. A ligação hormona-receptor pode mediar a regulação dos OC, pelo menos em parte, através de um mecanismo indirecto. No entanto, há estudos que sugerem a existência de receptores para os estrogénios nos OC, parecendo que estas hormonas podem actuar directamente nestas células. Com excepção da calcitonina, a maioria dos factores que regulam a reabsorção óssea parece actuar indirectamente através de substâncias secretadas pelos OB. A ligação das citocinas aos seus receptores nos OB resulta na libertação de factores solúveis, os quais podem actuar directamente nos OC para modular o seu recrutamento ou actividade [90,91].

4.1.5. HORMONA DO CRESCIMENTO

A hormona do crescimento (HC), também chamada de hormona somatotrópica (STH) ou somatotropina, é uma pequena proteína produzida, armazenada e segregada pela hipófise anterior, mais especificamente pelas células acidófilas designadas por somatotrópicas [104,114-116]. A sua secreção é controlada pelo hipotálamo, através da hormona de libertação da hormona do crescimento (GHR) e hormona de inibição da hormona do crescimento (GHI) ou somatostatina [116].

A HC é metabolizada no fígado, pelo menos parcialmente, e tem um tempo de semivida plasmática inferior a 20 minutos [116]. O seu receptor é uma proteína de elevado peso molecular que apresenta uma grande porção extracelular, uma região transmembrana e uma grande porção citoplasmática. A HC apresenta dois lugares de ligação para o receptor, verificando-se que a ligação do receptor a um dos locais favorece a ligação do receptor no outro local, formando-se um homodímero e ocorrendo, simultaneamente, a activação do receptor. O mecanismo pelo qual a sua activação desencadeia alterações na função celular ainda não é conhecido [116,117].

Os efeitos da HC sobre o crescimento, a cartilagem e o metabolismo das proteínas são geralmente mediados pelas *somatomedinas*, que são factores de crescimento polipeptídicos secretados pelo fígado e outros tecidos em resposta à estimulação pela HC. As somatomedinas partilham alguns dos efeitos produzidos pela insulina, sendo por isso chamadas de factores de

crescimento semelhantes à insulina (IGFs -"Insulin-like Growth Factors") [114,116]. Embora existam várias somatomedinas, a principal e que se encontra em circulação é designada como *somatomedina C ou IGF-1*. A concentração plasmática desta segue de perto a taxa de secreção da HC, verificando-se um atraso no crescimento de certos indivíduos que não possuem capacidade de sintetizar estes peptídeos, mesmo apresentando níveis elevados da HC. Assim, pensa-se que uma grande parte dos efeitos da HC resulta da acção da IGF-1 e de outras somatomedinas e não da sua acção directa sobre os ossos e outros tecidos periféricos [116]. À semelhança da HC, estas somatomedinas também se ligam a uma proteína plasmática produzida em resposta à HC, apresentando um tempo de semivida mais alargado (cerca de 20 horas) [116]. A secreção da HC é regulada por um mecanismo de retroacção. A HC aumenta o IGF-1 circulante e este, por sua vez, exerce uma acção inibitória directa sobre a secreção daquela pela hipófise e estimula a secreção de somatostatina pelo hipotálamo [114].

A HC causa o crescimento de quase todos os tecidos do corpo, aumentando a síntese e deposição de proteínas e promovendo a multiplicação e diferenciação celular, principalmente das células do tecido ósseo [116]. Esta hormona desempenha um papel importante na definição da estatura de um indivíduo e a sua falta durante o crescimento produz o nanismo hipofisário. Pelo contrário, se a sua produção é excessiva, como ocorre em alguns tumores da hipófise, causa o gigantismo quando se verifica na criança e a acromegalia quando aparece no adulto. No gigantismo origina um desenvolvimento exacerbado do comprimento dos ossos longos. No adulto, como o excesso da HC actua quando já não existem as cartilagens de conjugação, os ossos não podem crescer em comprimento, mas crescem em espessura (crescimento perióstico) [114,116]. Todavia, o crescimento é um fenómeno complexo que é afectado não só pela HC e pelas somatomedinas mas também pelas hormonas da tiróide, androgénios, estrogénios, glucocorticóides e insulina, bem como, por factores genéticos e nutricionais. Normalmente, é acompanhado por uma sequência ordenada de alterações, envolvendo a deposição de proteínas e o aumento em extensão e tamanho do indivíduo [116].

Apesar da HC e das somatomedinas afectarem quase todos os tecidos do corpo, o seu efeito é mais evidente ao nível do esqueleto, pois estimulam simultaneamente o crescimento da cartilagem e do osso. Os seus efeitos ao nível do tecido ósseo incluem: (1) aumento da deposição de proteínas pelos condrócitos e células osteogénicas responsáveis pelo crescimento do osso; (2) aumento da proliferação das células previamente referidas; e (3) conversão dos condrócitos em células osteogénicas, originando a deposição de novo

osso [103,114,117]. Nas membranas dos OB existem receptores específicos para a HC, IGF-1 e IGF-2, permitindo a sua acção directa. Estes produzem efeitos mitogénicos consideráveis nos pré-osteoblastos em cultura e influenciam a diferenciação dos OB: estimulação da síntese e actividade da FA e da síntese da osteocalcina [117]. O IGF-1 está também envolvido no processo de reabsorção óssea, estimulando a produção de IL-6 e a libertação do cálcio [117].

A HC estimula a absorção intestinal do cálcio e aumenta a concentração da 1,25-$(OH)_2D_3$ ao incrementar a actividade da enzima renal (1α-hidroxilase), que converte a 25-OH-D_3 em 1,25-$(OH)_2D_3$. Por outro lado, a PTH parece não ser afectada por esta hormona [103,117]. A síntese local dos IGFs pelas células ósseas é regulada não só pela HC, mas também por outras hormonas sistémicas com efeitos anabólicos ao nível do osso, como a PTH, a 1,25-$(OH)_2D_3$ e os estrogénios. Outras hormonas (androgénios e calcitonina) podem influenciar a concentração das proteínas de ligação ou dos receptores para a IGF-1 e, por isso, mediar o seu efeito na renovação óssea [103].

Os níveis plasmáticos da HC e, por conseguinte da IGF-1, diminuem lentamente a partir da adolescência, podendo contribuir para a diminuição da massa óssea e muscular observada nos idosos, principalmente em indivíduos com osteoporose [103,116].

4.1.6. GLUCOCORTICÓIDES

Os glucocorticóides (GC), entre os quais o cortisol que é o mais importante, são produzidos no córtex das glândulas supra-renais. Estas hormonas são sintetizadas a partir do colesterol e têm fórmulas químicas semelhantes. A sua principal função consiste no aumento da concentração da glicose sanguínea; possuem efeitos adicionais sobre o metabolismo proteico e dos lípidos [118].

A formação e a remodelação óssea são fortemente afectadas pelos glucocorticóides. No entanto, os efeitos destes esteróides *in vivo* são muito complexos. Em administrações curtas os glucocorticóides, como a dexametasona (GC sintético, 30 vezes mais potente que o cortisol [118]), podem estimular a diferenciação das células ósseas e a formação da matriz óssea. O tratamento prolongado *in vivo* com doses farmacológicas de GC frequentemente conduz à osteopenia, sendo a perda óssea mais intensa nas regiões do

esqueleto com uma percentagem maior de osso trabecular e/ou com taxas de remodelação óssea mais elevadas [119-123]. O efeito osteopénico, observado *in vivo* a longo prazo, é possivelmente devido ao esgotamento dos precursores osteoblásticos e/ou diminuição da capacidade proliferativa dos pré-osteoblastos [102,120].

Os GC alteram indirectamente o metabolismo ósseo através da redução da absorção intestinal e reabsorção renal de cálcio e consequente aumento dos níveis plasmáticos de PTH e de 1,25-$(OH)_2$D; o hipertiroidismo secundário resultante pode aumentar a taxa de reabsorção óssea [40,102,120,123]. Ainda não foi estabelecido um efeito directo dos GC na reabsorção óssea, dado que não foi detectada a presença de receptores específicos para estas hormonas nos osteoclastos (a estimulação destas células é indirecta) e os resultados obtidos nos diferentes estudos têm sido contraditórios [120,124]. Os osteoblastos possuem receptores citoplasmáticos para os GC, fazendo prever para estes compostos um papel directo importante no metabolismo ósseo [119,125]. Em concentrações fisiológicas modulam a actividade de outras hormonas, factores de crescimento e vitaminas que afectam o metabolismo do tecido ósseo, aumentam a diferenciação das células osteoblásticas e a formação do tecido ósseo [102,119,123,125,126]. Pelo contrário, as doses suprafisiológicas observadas em certas patologias (*eg* síndroma de Cushing) e na terapia anti-inflamatória provocam nas células ósseas uma diminuição da síntese das proteínas, ARN e ADN, isto é, uma diminuição da formação óssea [119,123,125].

4.2. FACTORES LOCAIS

Os factores de crescimento e as citocinas são polipeptídeos que regulam localmente o crescimento e a diferenciação celular. O termo citocinas foi inicialmente utilizado para designar os que são produzidos pelas células hematopoiéticas. Certos factores de crescimento e citocinas estão presentes na circulação, podendo actuar como agentes sistémicos (*eg*, IGF-1); no entanto, são frequentemente sintetizados por tecidos específicos nos quais actuam como agentes reguladores locais. Estes factores podem afectar as células que os produziram e/ou outros tipos de células, sendo designados respectivamente por factores autocrínicos e/ou paracrínicos [127-129].

Como já foi referido, o tecido ósseo está exposto a factores de regulação sistémicos e locais, os quais em conjunto regulam a remodelação óssea. As hormonas sistémicas podem modular

localmente, pelo menos em parte, a remodelação óssea através da síntese e libertação de factores de crescimento. Desta forma, os agentes sistémicos podem actuar nas células ósseas directa ou indirectamente, modificando a síntese, a libertação, ou ligação ao receptor dos factores produzidos localmente. Assim, a PTH não actua directamente nos OC mas actua nos OB conduzindo à libertação de factores solúveis que induzem a actividade osteoclástica. Uma vez que um dado factor de crescimento não é característico de um determinado tecido, pensa-se que o principal papel das hormonas sistémicas é conferir ao tecido especificidade para o factor de crescimento, modificando a síntese ou efeitos dos factores presentes no tecido que apresentam receptores para a hormona. Por exemplo, o IGF-1 é sintetizado por múltiplos tecidos, mas a sua síntese é primariamente regulada pelos estrogénios nas células uterinas, pela HC nos condrócitos e pela PTH nas células ósseas. Os factores autocrínicos e paracrínicos interactuam com agentes sistémicos, proteínas específicas de ligação e outros factores de crescimento locais. As proteínas de ligação servem como meio de transporte até aos receptores específicos das células, bem como local de armazenamento dos factores de crescimento, prolongando o seu tempo de semivida [127-128].

Dada a proximidade entre o tecido ósseo e a medula óssea, as células progenitoras presentes nesta são os alvos principais dos factores de crescimento e das citocinas. Em particular, os precursores hematopoiéticos dos OC são profundamente influenciados pelas citocinas durante a sua diferenciação até OC maturos que são, igualmente, alvo de regulação por parte de certas citocinas. A proliferação e diferenciação dos OB, fonte de muitos factores de crescimento e citocinas, podem ser modulados pela acção de alguns destes factores que actuam via mecanismos autocrínicos e/ou paracrínicos, podendo os efeitos observados ser diferentes, dependendo do estádio de maturação celular [130].

Durante a formação óssea, alguns dos factores produzidos pelos OB (eg, IGFs e TGF-β) e outras células podem ser incorporados na matriz orgânica, sendo posteriormente libertados quando da reabsorção da matriz. Estes factores da matriz podem apresentar diferentes actividades biológicas, incluindo actividade mitogénica, de diferenciação, quimiotáctica e osteolítica, podendo ser armazenados e libertados mais tarde, de modo a actuarem quer ao nível dos OB quer ao nível dos OC como factores paracrínicos [36,91,127-132].

Inúmeros estudos, efectuados *in vivo* e *in vitro*, mostram que a remodelação óssea é influenciada por vários factores de crescimento. Assim, a actividade osteoblástica pode ser

estimulada por: IGF-1 e IGF-2, TGF-β ("Transforming Growth Factor"), FGF ácido e básico ("Fibroblastic Growth Factor"), PDGF ("Platelet-Derived Growth Factor") e BMP ("Bone Morphogenetic Proteins"). Um certo número de citocinas, aparentemente produzidas pelos OB (TGF-β e IL-4) e que podem actuar como reguladores autocrínicos dos OB ou como reguladores paracrínicos dos OC, diminuem a reabsorção óssea [90,91,127-131]. Os factores de crescimento ósseo e as citocinas desempenham um papel importante na modulação da reabsorção óssea. As citocinas que aumentam a actividade osteoclástica incluem: GM-CSF ("Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulatory Factor), M-CSF ("Macrophage Colony-Stimulatory Factor), TNF-α ("Tumor Necrosis Factor"), IL-1 e IL-6 [127].

Pelo exposto se verifica que os factores de crescimento e as citocinas são claramente importantes na fisiologia e patologia do tecido ósseo, representado o nível local da regulação por parte das hormonas endócrinas e a etapa final de várias cascatas de eventos que envolvem as células ósseas, a matriz óssea e o microambiente ósseo. No entanto, não foi encontrado um factor de crescimento ou citocina específico do tecido ósseo [127-131]. Este aspecto é importante e deve ser considerado nas possíveis utilizações destas substâncias na terapêutica de patologias ósseas [127-131].

5. MÉTODOS *IN VITRO* DE ESTUDO DO METABOLISMO ÓSSEO

Os estudos que envolvem culturas de células ósseas têm contribuído para o rápido avanço de numerosos aspectos da fisiologia e farmacologia do tecido ósseo, mostrando que o tecido ósseo constitui um modelo apropriado para se analisar as interacções celulares envolvidas na resposta tecidular aos estímulos anabólicos e catabólicos [133].

As culturas celulares de tipo osteoblástico são estabelecidas a partir de diferentes materiais biológicos, fundamentalmente, medula óssea e osso trabecular, utilizando várias espécies (roedores, homem) e tecidos de diferentes idades, localizações anatómicas e estados fisiopatológicos [134,135]. Apesar da inerente diversidade, a maior parte destes sistemas partilha muitas características, como por exemplo, as condições básicas de cultura e os métodos de manutenção de rotina que são muito semelhantes [134].

A maior parte dos sistemas de cultura de células osteoblásticas segue uma de duas metodologias distintas e complementares. As células são estudadas imediatamente a seguir ou após um período curto da sua remoção do tecido - *culturas primárias e subculturas iniciais* ou, então, após as culturas terem sido estabelecidas como *linhas celulares permanentes* [133].

As **culturas primárias** e **subculturas iniciais** contêm uma população celular heterogénea mas os inúmeros estudos efectuados com estes sistemas mostram que estas culturas exibem uma gama considerável de parâmetros osteoblásticos. Além disso, uma das vantagens deste tipo de metodologia consiste na facilidade de utilização de células provenientes de diferentes dadores o que permite estudar o efeito do sexo, idade e patologias no comportamento de células osteoblásticas e, por outro lado, os resultados obtidos são mais facilmente relacionados com a actividade *in vivo* e com a formação óssea [136]. O uso de culturas primárias limita a probabilidade de ocorrência de alterações no fenótipo osteoblástico, envelhecimento celular ou crescimento exacerbado das células mais proliferativas. Por outro lado, todas os tipos de células constituintes do tecido ósseo podem, potencialmente, estar presentes nestas culturas e desta forma, em princípio, as culturas primárias são mais representativas dos tecidos originais. Outra das vantagens das culturas primárias reside no facto dos estudos serem efectuados em células normais e, por isso, com uma relação de proliferação-diferenciação celular mais próxima da situação *in vivo* [133,134].

A quantidade de material biológico disponível para efectuar as culturas é frequentemente escassa e, consequentemente, uma das desvantagens deste sistema de cultura é a dificuldade de obtenção de um número suficiente de células para a realização dos estudos pretendidos. Outra desvantagem importante é que a subcultura sucessiva resulta normalmente numa perda progressiva das características osteoblásticas e, a partir de determinada altura, a população celular pode já não ser representativa de uma população osteoblástica.

As **linhas celulares permanentes** são estabelecidas a partir de osteosarcomas de origem animal (por exemplo, as séries ROS 17/2, ROS 17/2.8 e UMR-106, obtidas a partir de rato) ou humana (por exemplo, as linhas celulares SaOs, TE-85 e MG-63) [137-142]. As linhas celulares permanentes podem ainda ser obtidas a partir de células normais por um processo de imortalização *in vitro* utilizando, por exemplo, um oncogene sensível à temperatura ("SV40 large T antigen") [137,138].

As linhas celulares permanentes constituem populações celulares homogéneas, fenotipicamente estáveis, fáceis de propagar e manter em cultura e apresentam algumas das características do fenótipo osteoblástico [137-142]. Por outro lado, estas células são transformadas, têm uma relação proliferação-diferenciação celular desacoplada e podem não reflectir o fenótipo de uma população celular normal [133-135].

A **obtenção de culturas primárias** de células osteoblásticas é possível devido à existência de células pluripotentes no estroma fibroblástico da medula óssea, no endóstio e no periósteo. Estas células pluripotentes, quando devidamente estimuladas, são capazes de originar *in vitro* vários tipos celulares, incluindo as células osteogénicas [8,27,30,132-134,143], sendo possível observar-se em cultura a formação de colónias fibroblásticas que aumentam de tamanho com o tempo de incubação, embora o seu número permaneça estável. Esta evidência suporta a teoria de que cada colónia deriva de uma simples célula inicial, designada por CFU-F ("Colony-Forming Unit-Fibroblastic") [27,30,132,144]. As colónias formadas *in vitro* apresentam uma considerável variação no tamanho, morfologia e nos níveis histoquímicos da fosfatase alcalina; a heterogeneidade das colónias reflecte a sua origem, ou seja, de um sistema pluripotencial [27,30,144]. Existem vários estudos que mostram que há muitos factores que influenciam a proliferação e diferenciação das CFU-F, nomeadamente, hormonas e factores de crescimento [27,30,31].

Os métodos utilizados na obtenção de culturas primárias de células ósseas a partir do tecido ósseo baseiam-se em duas técnicas clássicas de iniciação de cultura, a técnica do explante e a técnica da digestão proteolítica [8,133,134,143].

Na **técnica do explante** a cultura primária é obtida por migração das células a partir de fragmentos de osso, sendo particularmente útil quando se dispõe duma pequena quantidade de tecido, como no caso do osso alveolar, e/ou quando o crescimento celular é lento, como no caso do tecido ósseo adulto. A desvantagem desta técnica advém, em parte, da fraca aderência de certos tecidos ao substrato plástico dos recipientes de cultura e à selecção das células durante a sua migração para fora do explante. A selecção é função das células com maior capacidade proliferativa e, sendo um fenómeno local, pode privilegiar as células dos fragmentos que se encontram em contacto directo com o substrato [8,133,134,145].

A **técnica de digestão proteolítica** é uma técnica de desagregação enzimática que evita os problemas de selecção observados no método do explante e fornece um maior número de células, mais representativas do tecido global, num menor intervalo de tempo. No entanto, esta técnica de desagregação selecciona as células em função da sua resistência à acção da(s) enzima(s) utilizada(s) e, ainda, da sua capacidade de adesão ao substrato. As proteases utilizadas na digestão enzimática da matriz (tripsina, colagenase, entre outras, ou várias combinações destas) podem apresentar efeitos de toxicidade nas células e podem remover certas proteínas da superfície celular, impedindo a realização de estudos que envolvem, por exemplo, a quantificação e caracterização dos receptores hormonais [133,143,145,146].

Uma vez iniciada a cultura, a selecção celular continua a observar-se ao longo do tempo. As células com maior capacidade proliferativa aumentam; alguns tipos de células mantêm-se viáveis, apesar de o seu número permanecer constante; e, outras, desaparecem nas condições de cultura usadas. Assim, nas culturas em monocamada a distribuição dos tipos celulares continua a alterar-se até toda a superfície estar ocupada. Após confluência celular, a proporção de células menos sensíveis à limitação da densidade celular continua a proliferar, observando-se a formação de multicamadas [143,145,147]. Quando a cultura se torna confluente alguns aspectos de funções especializadas são expressos mais fortemente, já que nesta fase a cultura apresenta características morfológicas mais próximas das do respectivo tecido [135,143,145].

Quando toda a superfície de cultura é ocupada ou quando a concentração celular excede a capacidade nutritiva do meio de cultura, o crescimento celular cessa ou é intensamente diminuído. Nesta situação, as células podem ser dispersas por tratamento enzimático, diluídas e subcultivadas em novos frascos de cultura. Este procedimento constitui uma **passagem** e a **subcultura** resultante dá origem a uma linha celular que pode ser subcultivada várias vezes; no entanto, a partir de um determinado número de passagens estas linhas celulares morrem ou originam linhas celulares contínuas – transformação *in vitro* [145,147].

As culturas celulares devem apresentar um comportamento de proliferação-diferenciação representativo da população osteoblástica *in vivo*, nomeadamente, a produção de níveis elevados de FA, colagénio tipo I, proteínas não colagenosas (osteopontina, osteonectina, osteocalcina, ...) e expressá-las numa sequência temporal semelhante ao observado *in vivo*. As culturas devem apresentar também capacidade de formação de uma matriz extracelular mineralizada, parâmetro que reflecte a expressão completa do fenótipo osteoblástico [71-76]. A

caracterização das culturas de célula osteoblásticas é, assim, baseadas na avaliação de parâmetros morfológicos e funcionais exibidos por estas células.

A FA está presente nos pré-osteoblastos e OB e ausente nos osteócitos, sendo considerada como um marcador da diferenciação das células da linhagem osteoblástica e está, também, envolvida no processo da mineralização [28,35]. A actividade da FA das células osteogénicas em cultura aumenta à medida que aumenta a diferenciação celular, constituindo a sua determinação um índice da diferenciação osteoblástica [26,35,73,75,148,1549]. A determinação deste parâmetro é relativamente simples e o seu padrão de expressão nas culturas de células osteogénicas encontra-se largamente documentado na literatura. Todavia, este marcador não é específico dos OB, já que outros tecidos (rins, fígado e placenta) e tipos de células, nomeadamente os condrócitos e adipócitos presentes no tecido ósseo e na medula, podem apresentar esta enzima. No entanto, se a cartilagem e a medula forem convenientemente retirados do tecido ósseo inicial, os níveis de actividade da FA das células em cultura constituem um indicador relativamente específico das células osteoblásticas, já que os fibroblastos que eventualmente se encontrem na cultura não exibem níveis elevados de FA [133,134].

O colagénio tipo I está associado principalmente aos pré-osteoblastos e OB e a osteopontina e osteocalcina surgem numa fase mais avançada do processo de diferenciação destes, nomeadamente, por altura do processo de mineralização [26,35,73,75].

A expressão da FA e do colagénio tipo I constituem marcadores precoces do processo de diferenciação osteoblástica enquanto que a osteopontina e a osteocalcina são marcadores tardios deste processo. Estes marcadores são exibidos por células num estado relativamente avançado do desenvolvimento do fenótipo osteoblástico. A identificação dos osteoprogenitores é relativamente difícil devido à ausência de marcadores específicos. Todavia, tem havido alguns progressos nesta área, como por exemplo, a produção de anticorpos monoclonais contra antigénios existentes na superfície dos osteoprogenitores por Bruder *et al* [150] (anticorpo monoclonal SB10) e Joyner *et al* [151] (anticorpo monoclonal HOP-26) que parecem permitir o isolamento de subpopulações específicas de osteoprogenitores.

A caracterização das culturas celulares envolve a utilização de uma variedade de metodologias que incluem a observação das culturas por microscopia óptica, electrónica, de

varrimento e de transmissão, técnicas histoquímicas e bioquímicas (ensaios enzimáticos, rádio-imunoensaios, ensaios de ligação ao receptor, imunocitoquímica) e, ainda, estudos de biologia molecular (hibridização *in situ*, entre outros).

Os estudos extensivos efectuados *in vitro* e descritos na literatura contribuíram largamente para a compreensão e desenvolvimento dos fenómenos da modulação e delineação da linhagem osteogénica e do controlo da proliferação e diferenciação das células ósseas. Desse trabalho, ficou demonstrada a pluripotencialidade das células do estroma da medula óssea e a sua capacidade de diferenciação em células de diferentes linhagens, como fibroblastos, osteoblastos, adipócitos e reticulócitos, com um certo grau de plasticidade ou interconversão [24-32]. Além disso, ficou claro que a diferenciação osteogénica é perfeitamente coordenada e regulada numa sequência temporal [71-76]. Uma vantagem importante dos métodos *in vitro* é a de providenciarem informação a nível celular e molecular num meio controlado o que possibilita a selecção de condições experimentais apropriadas para atingir um determinado objectivo, portanto com as células livres de variações sistémicas [12-17].

Os ensaios *in vitro* possuem, no entanto, certas limitações, nomeadamente a utilização de modelos celulares obtidos a partir de material biológico proveniente de diversas espécies animais e, ainda, de células fetais e neonatais. Com o decorrer do tempo pode observar-se a perda do fenótipo osteoblástico das células em cultura, da organização tridimensional da matriz extracelular e, consequentemente, de algumas das interacções específicas das células, nomeadamente as interacções célula-célula e célula-matriz. É de notar também que estão ausentes os componentes sistémicos envolvidos na regulação da homeostasia, principalmente os do sistemas nervoso e endócrino, e das forças mecânicas observados *in vivo*. Assim, as observações efectuadas *in vitro* poderão não ser directamente extrapoláveis para situações *in vivo* [135,139144].

Capítulo III:

MATERIAIS E MÉTODOS

1. CULTURAS CELULARES

As culturas de células osteoblásticas foram efectuadas essencialmente a partir de osso alveolar humano, proveniente de indivíduos de ambos os sexos, com idades compreendidas entre os 20 e os 50 anos e que não apresentavam sinais de patologia óssea metabólica nem estavam a ser submetidos a qualquer tipo de terapêutica medicamentosa. O material biológico foi obtido em cirurgias orais extractivas ou correctivas efectuadas no Hospital Geral de Santo António, após as respectivas autorizações do Director do Serviço de Estomatologia e Cirurgia Maxilo-facial e da Direcção do Hospital, e na Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto. Os dadores, sempre que possível, foram submetidos a testes de rastreio para certas doenças infecto-contagiosas, como hepatites e SIDA. Apesar desta precaução, foram seguidos os procedimentos recomendados para a manipulação de tecidos biológicos.

O osso alveolar foi colhido para um meio de cultura adequado, α-Minimal Essential Medium (α-MEM, Gibco BRL, 12000-097), contendo uma elevada concentração de substâncias antimicrobianas, nomeadamente 25 μg/mL de anfotericina B (Fungizona a 250 μg/mL, Gibco BRL, 15290-026), 500 μg/mL de gentamicina (Gentamicina a 10 mg/mL, Gibco BRL, 15710-049), 1000 IU/mL de penicilina e 1000 μg/mL de estreptomicina (Solução Penicilina - estreptomicina a 10000 IU/mL - 10000 μg/mL, Gibco BRL, 15140-114); as amostras foram conservadas a 4° C até à realização da cultura primária. Os agentes antimicrobianos têm como objectivo eliminar a vasta flora microbiana proveniente da cavidade oral e que é susceptível de contaminar o osso alveolar, quando este é exposto ao ambiente oral no acto cirúrgico e, deste modo, contaminar as culturas. O material biológico, uma vez no laboratório, continuou a ser exaustivamente lavado com o referido meio, para cumprir o mesmo objectivo e, também, para eliminar a maioria das células hematopoiéticas.

A **cultura primária** foi obtida pela técnica do explante [143]. O osso alveolar foi cortado em pequenos fragmentos que foram cultivados em frascos de 25 cm^2 (Costar, 3055) com α-MEM, contendo 10% de soro bovino fetal (SBF, Gibco, 10108-165), 50 μg/mL de gentamicina e 2,5 μg/mL de anfotericina B - **meio base**. As culturas foram incubadas a 37° C em atmosfera húmida contendo 95% de ar e 5% de CO_2 (estufa de incubação em atmosfera controlada de CO_2: LEEC, modelo Biosafe 2). O meio de cultura foi mudado semanalmente até ao aparecimento das

primeiras células e, depois, duas vezes por semana. As culturas foram examinadas periodicamente com um microscópio de contraste de fase (NIKON, modelo TMS) [152].

A migração celular a partir dos fragmentos ósseos foi observada 10 a 20 dias após o início das culturas primárias, sendo estas mantidas até próximo da confluência (20 a 30 dias). Nesta fase, os explantes foram removidos e as células aderentes foram libertadas enzimaticamente [solução de tripsina a 0,04% (Sigma, T-4799) em PBS, pH 7,5, e colagenase a 0,025% (Sigma, C-9407) em PBS], durante 15 a 20 minutos [152]; as células em suspensão foram contadas num hemocitómetro ("Improved Neubauer") e/ou num contador electrónico de partículas (NIHON KOHEDEN, Celltac modelo MEK-5103K) [153], diluídas com meio de cultura e subcultivadas a uma densidade de 10^4 células/cm^2, em diferentes placas de cultura de acordo com o fim a que se destinavam - **primeira subcultura ou passagem**.

As células em subcultura foram cultivadas em condições experimentais análogas às utilizadas na cultura primária e, ainda, na presença de substâncias que, de acordo com o descrito na literatura [71,136,155-162], favorecem o desenvolvimento de células com características osteoblásticas, nomeadamente, ácido ascórbico a 50 μg/mL (Sigma A-4034), β-glicerofosfato de sódio a 10 mM (Sigma G-9891) e na presença ou ausência de dexametasona a 10 nM (Sigma D-8893), por períodos de tempo variáveis de 1 a 42 dias. O meio de cultura foi mudado duas vezes por semana.

2. CARACTERIZAÇÃO DAS CULTURAS CELULARES

A caracterização das culturas é, usualmente, baseada na avaliação de parâmetros funcionais específicos das células em cultura. O método de cultura utilizado conduz, em geral, a uma população celular rica em osteoblastos, os quais são caracterizados por possuírem:

- Actividade elevada de **fosfatase alcalina**,
- Secreção de proteínas da matriz extracelular:
  - **colagénio tipo I**,
  - proteínas não colagenosas, como a **osteonectina**, **osteopontina** e **osteocalcina**.
- Resposta a hormonas calciotrópicas como, por exemplo, **aumento intracelular do AMPc** em resposta à **PTH** ou à **PGE_2** (prostaglandina E_2),
- Formação de **uma matriz extracelular mineralizada** [26,133,134].

Nenhum destes marcadores é exclusivo do fenótipo osteoblástico; no entanto, em certas condições de cultura (meio e tempo de cultura, presença de substâncias que afectam a proliferação e a diferenciação celular) e dependendo da origem e manipulação do tecido biológico, podem ser considerados como representativos deste fenótipo [26,133,134]. Dos parâmetros referidos dedicamos especial atenção à determinação da fosfatase alcalina e à localização e quantificação de áreas mineralizadas na matriz extracelular.

A caracterização das culturas celulares envolve a utilização de diferentes métodos, os quais podem ser classificados em dois grupos: métodos qualitativos e métodos quantitativos.

2.1. MÉTODOS QUALITATIVOS

Os métodos qualitativos são utilizados para o estudo da morfologia celular e da matriz e para a localização de substâncias químicas conhecidas e específicas das células ou tecido em cultura, utilizando técnicas de microscopia, histoquímicas e imuno-histoquímicas.

A caracterização morfológica das culturas celulares foi efectuada por microscopia óptica, microscopia electrónica de varrimento e microscopia electrónica de transmissão. A caracterização histoquímica incluiu a identificação e a localização de FA, depósitos de cálcio (método da alizarina vermelha; AV) e depósitos de fosfatos (método de Von Kossa; VK).

As células foram cultivadas em caixas de petri de 35 mm (Costar, 3035) e incubadas durante períodos de tempo pré-definidos, de acordo com o objectivo do estudo realizado. Nas situações em que não se efectuaram técnicas de caracterização morfológica, a histoquímica foi efectuada em placas de 96 poços (Costar, 3596), em duplicado. No fim de cada período de incubação o meio de cultura foi removido e a camada celular foi lavada com PBS ("Dulbecco's Phosphate Buffered Saline", Sigma, D-1408), pH 7,4 e fixada. A fixação foi efectuada com uma solução de glutaraldeído a 1,5% (Merck, 1.04239) em tampão cacodilato de sódio a 0,14 M (TAAB, 5007), durante 10 minutos, seguida de lavagem com água destilada.

2.1.1. Fosfatase alcalina [163]

Após fixação, as culturas foram incubadas no escuro durante 1 hora com uma solução preparada em tampão Tris a 0,1 M, pH 10 (Sigma, 8534) contendo α-naftil fosfato de sódio a 2 mg/mL (Sigma, N-7255) e "fast blue RR salt" (sal de diazónio) a 2 mg/mL (Sigma, F-0500). No fim do tempo de incubação a reacção foi interrompida por lavagem das amostras com água destilada.

A fosfatase alcalina promove a hidrólise de ésteres fosfóricos, com a consequente libertação de iões fosfato que se ligam ao sal de diazónio dando origem à formação de um precipitado corado. A reacção é positiva quando se observa uma coloração que oscila de amarelo acastanhado a preto, de acordo com a actividade da enzima.

2.1.2. Depósitos de cálcio: Método da alizarina vermelha (AV) [164]

As culturas celulares, após fixação, foram cobertas com uma solução de alizarina vermelha S a 1% (alizarina sulfonato de sódio; Sigma, A-3757) em NH_4OH a 0,028% (Sigma, A-6899), pH 6,4, durante 2 minutos, sendo depois lavadas com água destilada e etanol ácido (etanol a 95%, HCl a 0,01%, v/v).

Em solução aquosa, a alizarina vermelha combina-se com o cálcio, originando um precipitado vermelho denso e birrefringente. A reacção é positiva quando se verifica o aparecimento de depósitos avermelhados na matriz.

2.1.3. Depósitos de fosfato de cálcio: Método de von Kossa (VK) [164]

As culturas fixadas foram cobertas com uma solução de nitrato de prata a 1% (Sigma, S-6506) e mantidas sob luz UV (VILBER LOURMAT, modelo VL 4L), durante uma hora. Após lavagem com água destilada foram recobertas com uma solução de tiossulfato de sódio a 5% (Sigma, T-8503), durante 2 minutos, sendo novamente lavadas com água destilada.

Os fosfatos de cálcio, componentes da matriz óssea mineralizada, na presença do nitrato de prata dão origem a fosfato de prata. De seguida, o ião prata do sal formado é reduzido a prata metálica pela radiação UV. A reacção é positiva quando se verifica o aparecimento de depósitos negros na matriz.

2.1.4. Microscopia electrónica de varrimento e Microanálise por raios X [165]

As culturas celulares depois de fixadas foram desidratadas com álcool etílico de graduação crescente (70, 80, 90 e 100%), lavadas com tetróxido de ósmio, submetidas a desidratação total utilizando o sistema do ponto crítico de CO_2 e montadas em suportes adequados. De seguida, foram cobertas com um filme de ouro ou de carbono e observadas num microscópio electrónico de varrimento (JEOL JSM 6301F).

A microscopia electrónica de varrimento é utilizada para estudar a superfície de cultura, durante os diferentes períodos de incubação, nomeadamente a morfologia das células ósseas, o aspecto da matriz extracelular e a capacidade de formação de áreas mineralizadas. As zonas mineralizadas foram, ainda, analisadas por espectroscopia de raios X de dispersão de energias (NORAN Instruments, modelo Voyager XRMA System) que permitiu verificar a composição dos depósitos minerais [166].

2.1.5. Microscopia electrónica de transmissão

As culturas celulares, depois de fixadas, foram submetidas a um tratamento complexo, que incluiu desidratação, contrastação e inclusão em Epon. Nas amostras assim obtidas efectuaram-se cortes com cerca de 60-80 nm de espessura (ultramicrótomo LKV), os quais foram montados em redes de cobre, corados com acetato de uranilo e citrato de chumbo e observados e fotografados no microscópio electrónico de transmissão (JEOL 100C).

2.2. MÉTODOS QUANTITATIVOS

Os métodos quantitativos aplicados às culturas celulares analisam o crescimento ou proliferação celular e fornecem informação sobre o metabolismo celular [153]. Os métodos que avaliam o crescimento ou proliferação celular baseiam-se na medição do número de células existentes na população, podendo este ser determinado directa ou indirectamente; o primeiro processo envolve a contagem directa das células (*eg.* hemacitómetro ou contador electrónico de partículas) e, o segundo, a medição do volume celular, do seu peso seco ou de algum constituinte celular (conteúdo em proteína total e ADN). Os métodos que fornecem

informação sobre o metabolismo celular baseiam-se na determinação de parâmetros metabólicos, como no ensaio do MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] que permite avaliar a viabilidade/proliferação celular e a determinação da actividade de enzimas características do tipo celular em estudo, como a FA nos OB, a fosfatase ácida resistente ao ácido tartárico nos OC e a fosfatase ácida nos fibroblastos.

Os OB *in vivo* são facilmente identificados pelas suas características morfológicas e pelas suas relações espaciais com as outras células e com a matriz. Quando o tecido ósseo é desagregado para se efectuar as culturas celulares, verifica-se que algumas das características morfológicas apresentadas pelos OB ficam alteradas e, por outro lado, perdem-se as relações espaciais dos OB com as outras células e com a matriz. Por esta razão, o uso de marcadores bioquímicos na caracterização das células em cultura é muito útil e encontra-se muito divulgado [133,134]. No entanto, convém salientar que os ensaios bioquímicos fornecem apenas valores médios para toda a população em cultura. Este facto constitui uma limitação para os sistemas que contêm populações celulares heterogéneas, uma vez que a expressão do fenótipo pode não ocorrer uniformemente por toda a cultura, mas localmente, como acontece durante a formação de nódulos. Assim, os estudos morfológicos qualitativos são importantes porque fornecem informação adicional. A localização histoquímica da F.A. é frequentemente utilizada como uma técnica de rastreio para localizar e distinguir as células osteoblásticas [134].

Neste trabalho, as culturas celulares foram analisadas bioquimicamente ao longo do tempo de cultura para avaliação da proliferação celular, actividades da FA e, também, em alguns ensaios, de fosfatase ácida e fosfatase ácida resistente ao ácido tartárico. Para a realização destes ensaios as células foram cultivadas em placas de 96 poços (Costar, 3596). Determinou-se, também, a concentração de fósforo e de cálcio ionizados presentes no meio de cultura.

2.2.1. Proliferação Celular

Ensaio do MTT

A viabilidade/proliferação celular foi avaliada pelo ensaio do MTT (Sigma, M-5655) [154,167-168a], que se baseia nas propriedades redutoras das células viáveis.

No fim de cada tempo de cultura, adicionou-se 10 μL do sal de tetrazólio (0,5 mg/mL) a cada um dos poços contendo células destinadas à realização deste teste e as placas foram incubadas durante 4 horas nas condições de cultura referidas previamente (37° C, 5% CO_2). Durante este período, as células viáveis, ou seja, as células metabolicamente activas, incluem o MTT e promovem a sua redução, originando cristais de formazan de cor púrpura que se acumulam no seu interior [154,167-168a]. No fim do tempo de incubação, o meio de cultura foi removido cuidadosamente, o produto corado formado foi dissolvido e homogeneizado com 100 μL/poço de DMSO (Merck, 102931) e avaliado por espectrofotometria em leitor de ELISA (DENLEY, modelo Wellscan WS 050) a 600 nm.

Proteína Total

O conteúdo em proteína total foi avaliado pelo método de Lowry [170]. Após a remoção do meio de cultura, a camada celular foi lavada duas vezes com tampão PBS, tratada com 100 μL/poço de NaOH a 0,1 M e incubada a 37° C, durante 1 hora. No fim do período de incubação, o material celular foi recolhido e dissolvido por aquecimento a 100° C, durante 15 minutos. A 0,2-0,3 mL da amostra, adicionaram-se 2 mL de uma solução alcalina de cobre e, após 10 minutos, 200 μL de reagente de Folin-Ciocalteau (diluído com água destilada numa proporção de 1:1); as amostras foram mantidas no escuro durante 1 hora.

O reagente de Folin - Ciocalteau (Merck, 109001), após tratamento com a solução alcalina de cobre, reage com os aminoácidos aromáticos existentes nas proteínas originando um produto azul que é doseado espectrofotometricamente a 750 nm (espectrofotómetro KONTRON, modelo UVIKON 922), utilizando uma recta de calibração (padrão de albumina sérica bovina a 0,05%, Sigma, A-9306, em NaOH a 0,1M). Os resultados obtidos foram expressos em μg de proteína total existente na amostra por centímetro quadrado ($\mu g/cm^2$).

ADN

A quantidade de ADN presente nas camadas celulares foi determinada fluorimetricamente usando uma técnica baseada no método descrito por West *et al* [171]. O meio de cultura foi aspirado dos poços e a camada celular foi lavada 2 vezes com PBS. Para solubilizar o ADN, a camada celular foi tratada com EDTA a 10 mM (Sigma, ED2SS), pH 12,3 e incubada a 37°

C durante 20 minutos. De seguida, as placas foram mantidas em gelo e o pH foi ajustado a 7,0 com KH_2PO_4 a 1 M (Merck, 104873). Adicionou-se a cada uma das amostras uma solução de Hoescht 33258 a 200 ng/mL (Sigma, T-8534) preparada em NaCl a 100 mM (Merck, 106404) + Tris a 10 mM (Sigma, T-8534), pH 7. A fluorescência foi lida imediatamente (Perkin Elmer, Luminescence Spectrometer LS 30) utilizando uma recta de calibração (0 - 100 μg ADN/mL) preparada com ADN de salmão a 1 mg/mL (Sigma, D-1626) em tampão TE (Tris a 10 mM + EDTA a 1mM, pH 8,0). Os resultados obtidos foram expressos em μg de ADN existente na amostra por centímetro quadrado ($\mu g/cm^2$).

Na ausência de ADN, o espectro do Hoechst 33258 apresenta um pico de excitação a 350 nm e um pico de emissão a 492 nm. Quando o corante se liga ao ADN o pico de excitação surge, igualmente, a 350 nm mas o pico de emissão observa-se a 455 nm, permitindo desta forma o doseamento do ADN.

2.2.2. Actividades de fosfatase alcalina, fosfatase ácida e fosfatase ácida resistente ao ácido tartárico [163]

No fim de cada período de incubação e após remoção do meio de cultura, as camadas celulares foram lavadas 2 vezes com PBS e submetidas a lise com 100 μL/poço de triton X-100 a 0,1% (Sigma, T-8787). De seguida, adicionou-se a cada poço 80 μL de substrato (solução de *p*-nitrofenilfosfato a 25 mM para determinação da FA e a 12,5 mM para determinação da fosfatase ácida e fosfatase ácida resistente ao ácido tartárico) num tampão apropriado e as culturas foram incubadas a 37° C, durante 30 minutos. No final, a reacção foi interrompida pela adição de 20 μL de NaOH a 5 M (Merck, 106498). A FA foi determinada a pH alcalino (Solução tampão alcalino, Sigma, N° 221, pH 10,3), a fosfatase ácida a pH ácido (Solução tampão citrato, Sigma, N° 104-4; pH 4,8) e a fosfatase ácida resistente ao ácido tartárico a pH igualmente ácido, mas na presença do tartarato (Solução tampão tartarato, Sigma, N° 104-12; pH 4,8).

O método utilizado na determinação das fosfatases baseia-se na capacidade destas enzimas para hidrolizarem o *p*-nitrofenilfosfato (*p*-nitrofenilfosfato dissódico, Sigma 104®, N° 104-0), com libertação do grupo fosfato e de *p*-nitrofenol (PNP). Este produto de cor amarela foi,

então, doseado espetrofotometricamente a 405 nm, em leitor de ELISA (DENLEY, modelo Wellscan WS 050), utilizando uma recta de calibração (padrão PNP a 10 μmol/mL, Sigma, N° 104-1). A actividade da FA foi expressa em nanomole de PNP formado por minuto e por centímetro quadrado (nmol/min.cm^2), em nanomole de PNP formado por minuto e por μg de proteína total ou por μg de ADN (nmol/min. μg proteína total ou nmol/min. μg ADN).

2.2.3. Fósforo ionizado e cálcio ionizado no meio de cultura

A quantificação do fósforo ionizado (Pi) e do cálcio ionizado (Cai) no meio de cultura foi feita durante o tempo de cultura, procedendo-se à sua recolha 2 vezes por semana. Os meios de cultura foram tratados com ácido tricloroacético a 20 % (Merck, 100807) para precipitar o fósforo e o cálcio ligados às proteínas e aos lípidos.

O Pi foi doseado colorimetricamente segundo o método de Fiske e Subbarow adaptado pela Sigma (Kit Sigma Diagnostics, procedimento N° 670). Para a sua determinação, o sobrenadante das amostras tratadas foi adicionado de molibdato de amónio, em meio ácido, para formar fosfomolibdato. Este produto foi reduzido, na presença de uma mistura de bissulfito de sódio, sulfito de sódio e ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfónico, a um complexo azul de fosfomolibdénio. A intensidade da coloração é proporcional à concentração do Pi e foi determinada a 660 nm num espectrofotómetro (KONTRON, modelo UVIKON 922), utilizando uma recta de calibração (Padrões combinados cálcio/fósforo, Sigma, N° 360-11). Os resultados obtidos foram expressos em mmol de Pi por litro de meio (mmol/L).

O Cai foi determinado colorimetricamente por um procedimento adoptado pela Sigma (Kit Sigma Diagnostics, procedimento N° 587) que se baseia na interacção do catião com um agente cromogénico ("*o*-cresolphthalein complexone"). O cálcio inorgânico foi complexado com a o-cresolftaleína, em meio alcalino (pH 10-12), formando-se um complexo de cor púrpura. A intensidade da coloração é directamente proporcional à concentração de Cai e é determinada a 575 nm num espectrofotómetro (KONTRON, modelo UVIKON 922), utilizando uma recta de calibração (Padrões combinados cálcio/fósforo, Sigma, N° 360-11). Os resultados obtidos foram expressos em mmol de Cai por litro de meio (mmol/L).

As concentrações de Pi e Cai no meio de cultura recolhido das culturas efectuadas nas diferentes situações experimentais ao longo do período de incubação não são cumulativas, dado que o meio de cultura foi completamente removido de três em três dias; estes valores reflectem as alterações ocorridas em intervalos de três dias ao longo do tempo de cultura.

3. CULTURAS DE FIBROBLASTOS

As culturas celulares de fibroblastos foram obtidas a partir de gengiva humana, efectuadas em condições experimentais semelhantes às utilizadas na obtenção das culturas celulares de osso alveolar e caracterizadas pela avaliação dos mesmos parâmetros. Estas culturas funcionaram como um controlo negativo das culturas de células ósseas permitindo confirmar a especificidade dos parâmetros avaliados.

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Em cada experiência, nos estudos bioquímicos (ensaio do MTT, conteúdos em proteína total e ADN, actividades da F.A., fosfatase ácida e fosfatase ácida resistente ao ácido tartárico) os valores correspondem à média ± desvio padrão de 6 a 8 réplicas da mesma amostra e nas determinações de Cai e Pi à média ± desvio padrão de 2 réplicas (cada réplica foi analisada em triplicado).

Os dados apresentados são o resultado de três ou quatro experiências separadas, realizadas em culturas celulares obtidas de dadores diferentes de osso alveolar. As médias obtidas nas várias experiências foram comparadas por uma análise de variância (ANOVA), tendo-se verificado a não existência de diferenças significativas entre as experiências realizadas. Em cada estudo, as diferenças estatísticas observadas entre as culturas em estudo e a cultura controlo respectiva foram determinadas pelo método de Bonferroni, em que os valores de $P \leq 0,05$ foram considerados significativos.

CAPÍTULO III:

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CULTURAS DE CÉLULAS OSTEOBLÁSTICAS A PARTIR DE OSSO ALVEOLAR HUMANO

1. INTRODUÇÃO

O trabalho apresentado na primeira parte deste capítulo diz respeito ao estabelecimento, manutenção e caracterização das culturas celulares de osso alveolar - cultura primária e subculturas. Estas culturas devem apresentar um comportamento de proliferação e diferenciação representativo da população osteoblástica *in vivo*, nomeadamente uma actividade de FA elevada e capacidade de formação de uma matriz extracelular mineralizada. Apesar das várias vantagens apresentadas por este tipo de sistema de cultura é de salientar que não é possível utilizar a mesma linha celular nos vários estudos a realizar, já que as células diplóides possuem *in vitro* um tempo de vida limitado e que a realização de subculturas sucessivas resulta numa perda progressiva do fenótipo osteoblástico [172]. Assim, foi conveniente seleccionar as condições experimentais mais adequadas para a obtenção de culturas de células de osso alveolar com um comportamento perfeitamente definido e reprodutível.

As culturas de osso alveolar humano foram realizadas em condições experimentais que, de acordo com o descrito na literatura [71,136,155-162,173], favorecem o desenvolvimento do fenótipo osteoblástico, nomeadamente na presença de um meio selectivo (α-MEM) enriquecido com 10% de soro bovino fetal, 50 μg/mL de gentamicina e 2,5 μg/mL de anfotericina B - **meio base** - e suplementado com ácido ascórbico - **AA** - (50 μg/mL), β-glicerofosfato de sódio a 10 mM - **β-GF** - e dexametasona a 10 nM - **Dex**, sendo incubadas a 37° C em atmosfera húmida contendo 95% de ar e 5% de CO_2.

A adição de soro (5 a 20%) é importante já que é muito difícil de observar o crescimento, diferenciação e principalmente a formação de uma matriz extracelular mineralizada na presença de meios totalmente sintéticos [147,174]. Os suplementos adicionados favorecem o processo da mineralização *in vitro* [155-159,162,173]. O AA é necessário para a síntese e maturação do colagénio e, consequentemente, é vital para a formação da matriz extracelular [136,157-159]; o β-GF é uma fonte de fosfato necessário ao processo de mineralização [136,157-159]; a Dex parece induzir a proliferação e diferenciação das células osteoblásticas [71,157,160-162,175,176].

Com o objectivo de caracterizar melhor o comportamento destas culturas avaliou-se o efeito isolado e combinado do AA, β-GF e Dex na proliferação e diferenciação das células provenientes do osso alveolar humano; estes resultados são apresentados na segunda parte deste capítulo.

2. OBTENÇÃO DA CULTURA PRIMÁRIA

Após uma cuidada pesquisa bibliográfica verificou-se que, na maior parte das situações, as culturas de células do tipo osteoblástico são obtidas a partir de medula óssea ou de osso trabecular proveniente de diversos locais do organismo; no entanto, as referências bibliográficas relativas a culturas efectuadas a partir de osso alveolar eram muito escassas. Verificou-se, igualmente, a existência de uma grande variedade de técnicas para a obtenção destas culturas a partir dos diferentes materiais biológicos.

A primeira fase deste trabalho teve como principais objectivos o estabelecimento e caracterização de culturas de células do tipo osteoblástico obtidas a partir de osso alveolar, proveniente quer de animais quer do Homem.

2.1. ENSAIO PRELIMINAR: CULTURAS CELULARES DE OSSO ALVEOLAR DE COELHO E DE RATO

Devido aos condicionalismos associados à obtenção de material biológico humano, foi efectuado um estudo preliminar que visou o estabelecimento das condições experimentais para a obtenção e caracterização de culturas de células osteoblásticas a partir de osso alveolar de coelho e de rato.

2.1.1. MATERIAIS E MÉTODOS

O osso alveolar foi obtido a partir de coelhos adultos de ambos os sexos de raça Nova Zelândia e de ratos Wistar com 2-3 meses de idade e do sexo masculino. Os fragmentos de osso alveolar foram cultivados em **meio base**, suplementado com AA, β-GF e Dex. A incubação e manutenção das culturas foram efectuadas de acordo com o descrito no capítulo II. A sua caracterização foi efectuada histoquimicamente para avaliação de parâmetros morfológicos e funcionais característicos do fenótipo osteoblástico, nomeadamente, a actividade da FA e a capacidade de formação de depósitos de fosfato de cálcio na matriz extracelular. Os métodos histoquímicos utilizados encontram-se descritos no capítulo II.

2.1.2. RESULTADOS

Verificou-se que a migração celular a partir dos pequenos fragmentos de osso alveolar ocorreu 10-20 dias após o início da cultura. As células foram proliferando gradualmente em torno dos fragmentos, dando origem a agrupamentos celulares isolados ou interligados que aumentaram de tamanho com o tempo de incubação, originando estruturas nodulares tridimensionais, visíveis macroscopicamente nas culturas provenientes de rato. A Fig. 3.1 mostra o crescimento celular em torno de um fragmento ósseo.

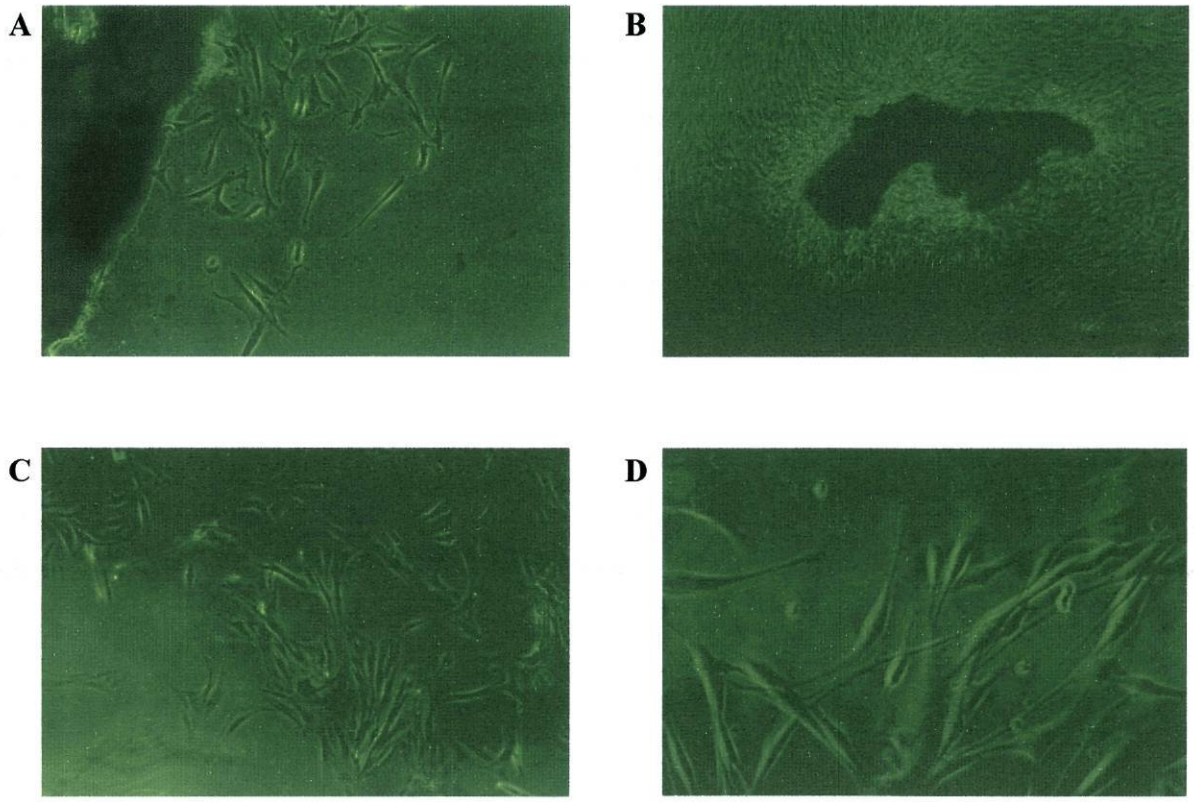


Fig. 3.1- **Microfotografias de contraste de fase de uma cultura primária de osso alveolar de rato. Crescimento celular a partir do fragmento ósseo: A- cultura primária com 15 dias de incubação (100x); B- cultura primária com 30 dias de incubação (40x). Aspecto morfológico das células ósseas em cultura: C (100x) e D (200x).**

Após algum trabalho desenvolvido nesta área verificou-se que as culturas de osso alveolar de rato efectuadas nas condições descritas permitiam a obtenção de culturas primárias ricas em células com características osteoblásticas, observando-se a presença de uma percentagem elevada de células produtoras de FA e a formação de áreas mineralizadas. Verificou-se, igualmente, que os nódulos se tornaram mais densos e opacos com o decorrer do tempo de cultura, possivelmente devido ao aumento da deposição mineral, e que as áreas mineralizadas coincidiram com as estruturas nodulares. Assim, foi possível observar-se colorações muito intensas para as reacções que permitiram visualizar a localização da FA e dos depósitos de cálcio e de fosfatos (Fig. 3.2 AI, BI, CI).

As culturas de osso alveolar de coelho, obtidas nas mesmas condições experimentais, apresentaram reacções histoquímicas positivas para a localização da FA e negativas para os depósitos de cálcio e de fosfato (Fig. 3.2 AII, BII, CII). Estas culturas revelaram ser relativamente pobres em células com características osteoblásticas, observando-se a presença de uma percentagem baixa de células produtoras de FA.

2.2. CULTURAS CELULARES DE OSSO ALVEOLAR HUMANO

Esta fase consistiu no estabelecimento de culturas de células do tipo osteoblástico a partir de osso alveolar humano, utilizando a metodologia desenvolvida em 2.1.

2.2.1. MATERIAIS E MÉTODOS

O osso alveolar foi obtido de pacientes submetidos a intervenções cirúrgicas na cavidade oral, como referido no capítulo II. O material obtido foi cultivado em três meios de cultura diferentes: (1) meio base; (2) meio base suplementado apenas com AA e β-GF; (3) meio base suplementado com AA, β-GF e Dex.

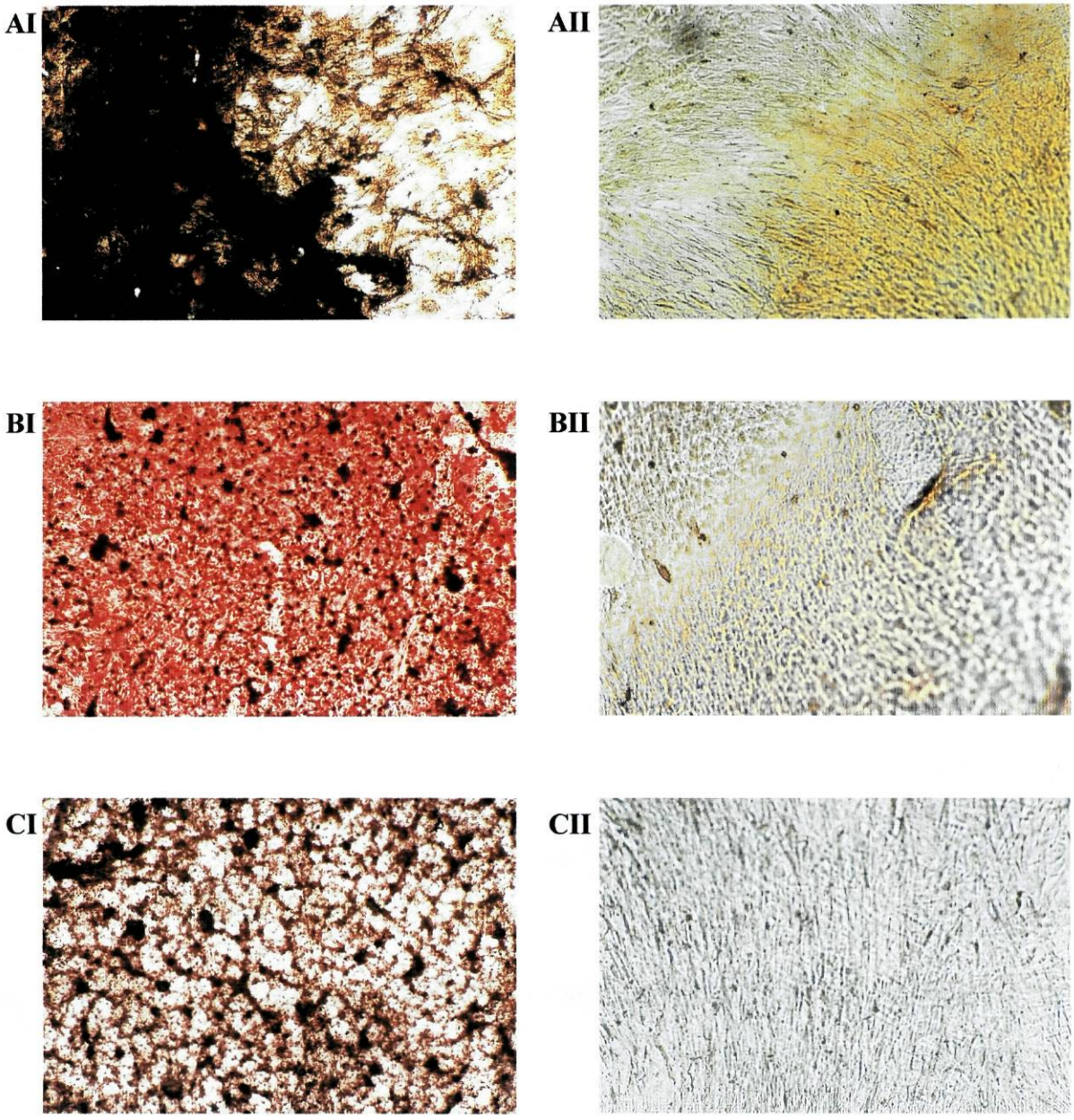


Fig. 3.2- **Microfotografias de culturas primárias de osso alveolar de rato (I) e de coelho (II) com 45 dias coradas histoquimicamente para visualização da fosfatase alcalina (A) e dos depósitos de cálcio (B) e de fosfatos (C); (100x).**

As culturas foram caracterizadas histoquimicamente para avaliação da actividade da FA e da capacidade de formação de depósitos de fosfato de cálcio na matriz extracelular, tendo sido ainda sujeitas a observação num microscópio electrónico de varrimento equipado com microanálise por raios X.

2.2.2. RESULTADOS

Nas três situações experimentais estudadas verificou-se que a migração celular a partir dos fragmentos ósseos ocorreu 10-20 dias após o início da cultura e que as células apresentavam uma morfologia celular semelhante (Fig. 3.3).

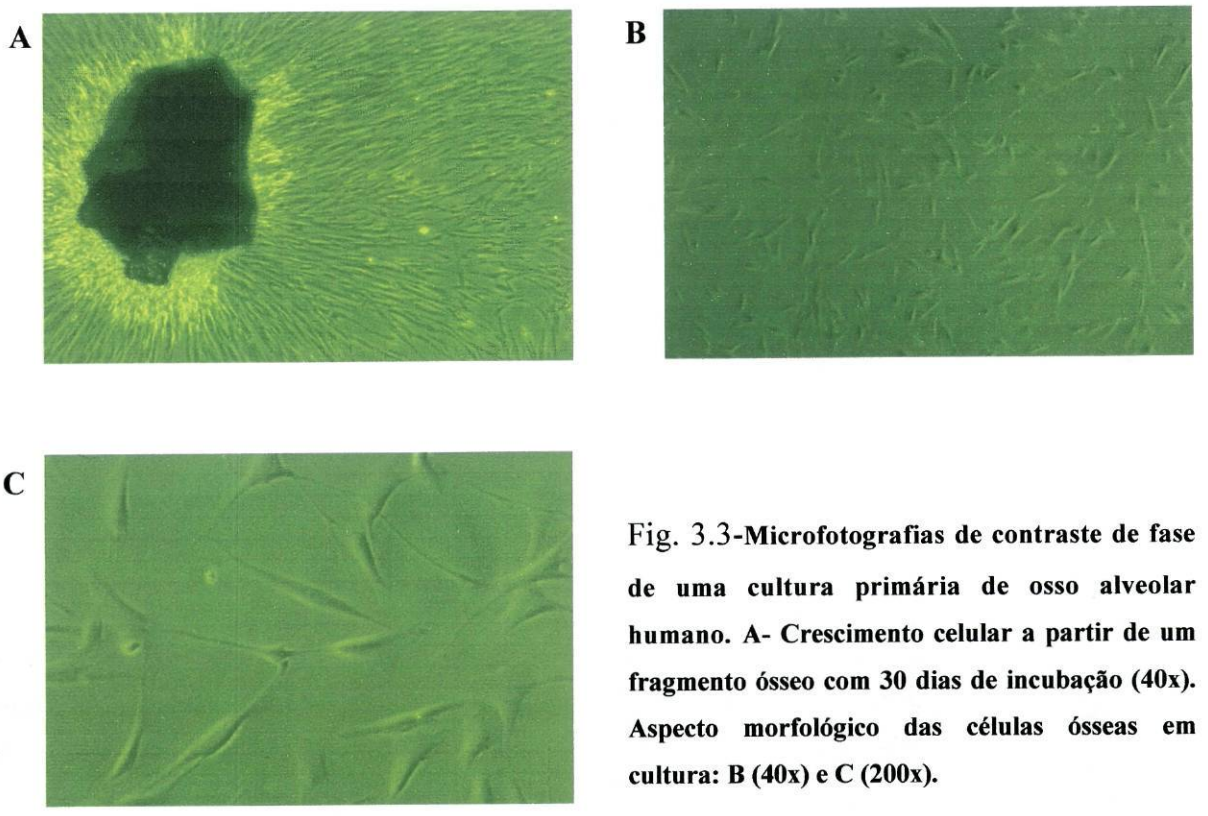


Fig. 3.3-**Microfotografias de contraste de fase de uma cultura primária de osso alveolar humano. A- Crescimento celular a partir de um fragmento ósseo com 30 dias de incubação (40x). Aspecto morfológico das células ósseas em cultura: B (40x) e C (200x).**

As células foram proliferando gradualmente em torno dos fragmentos de osso dando origem a agrupamentos de células, isolados ou interligados, que foram aumentando de tamanho com o tempo de incubação, originando estruturas nodulares. Estas estruturas foram aumentando em número e intensidade da primeira para a terceira situação experimental, respectivamente, culturas efectuadas em meio base, culturas tratadas com AA e β-GF e culturas tratadas com AA, β-GF e Dex (Fig. 3.4).

A identificação histoquímica da presença de FA e de áreas mineralizadas (depósitos de cálcio e de fosfato) revelou um comportamento diferente nas três situações experimentais.

Assim, verificou-se em todas as situações experimentais que as células obtidas apresentavam características osteoblásticas, pois em todos os casos a reacção para a FA foi positiva e aumentou com o tempo de incubação; no entanto, a intensidade de coloração, que foi particularmente visível nos nódulos tridimensionais, foi aumentando da primeira para a terceira situação experimental (Figs. 3.4 e 3.5).

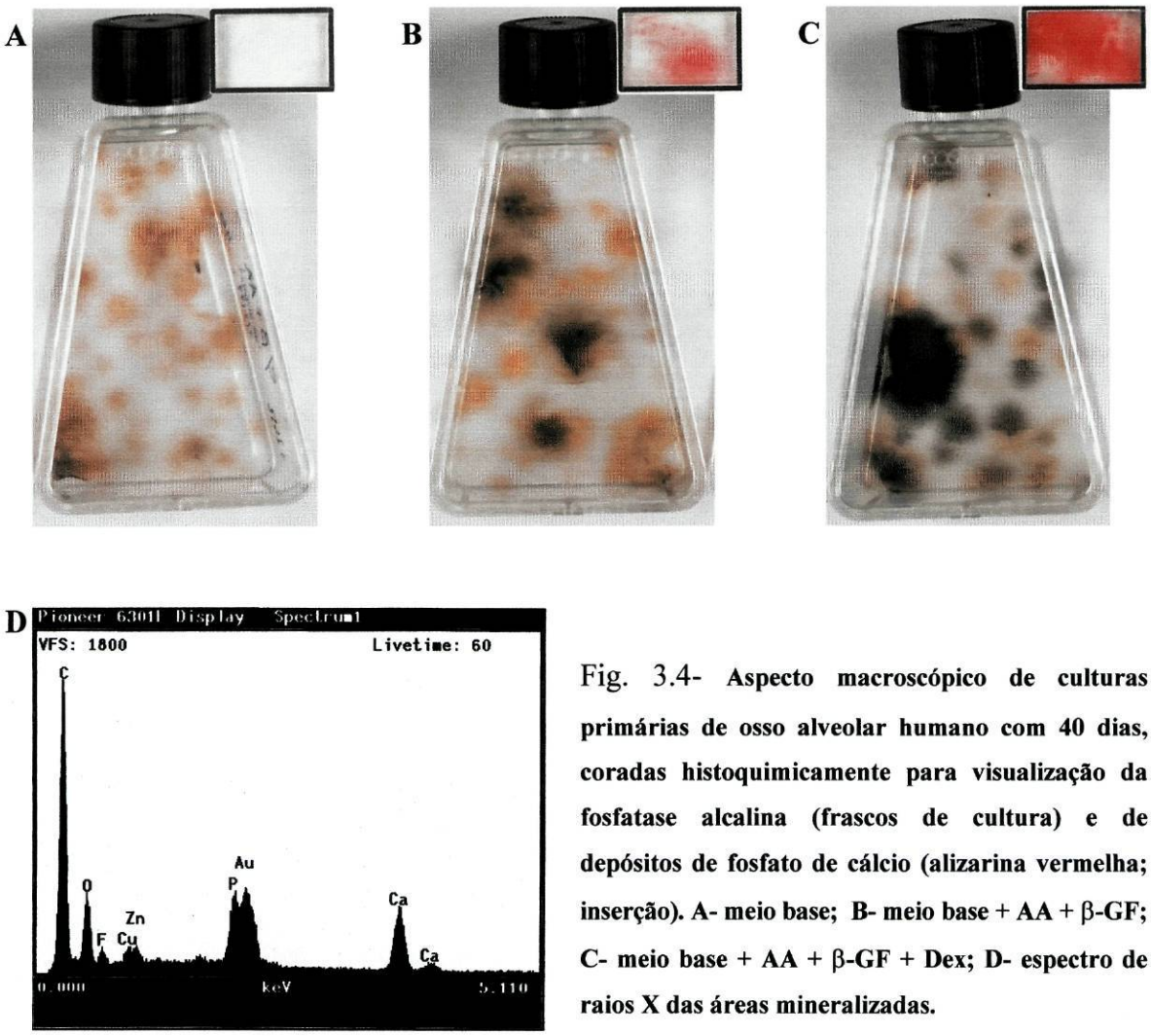


Fig. 3.4- **Aspecto macroscópico de culturas primárias de osso alveolar humano com 40 dias, coradas histoquimicamente para visualização da fosfatase alcalina (frascos de cultura) e de depósitos de fosfato de cálcio (alizarina vermelha; inserção). A- meio base; B- meio base + AA + β-GF; C- meio base + AA + β-GF + Dex; D- espectro de raios X das áreas mineralizadas.**

As culturas efectuadas na ausência de AA e de β-GF (meio base) apresentaram reacções negativas para a localização de depósitos de cálcio e de fosfato, evidenciando a ausência de áreas mineralizadas. Nas culturas efectuadas na presença destes suplementos verificou-se a existência de áreas mineralizadas, no entanto, a intensidade de coloração destas reacções foi maior nas culturas tratadas com Dex (Figs. 3.4 e 3.5). A intensidade de coloração destas reacções histoquímicas foi, igualmente, mais intensa nas regiões nodulares.

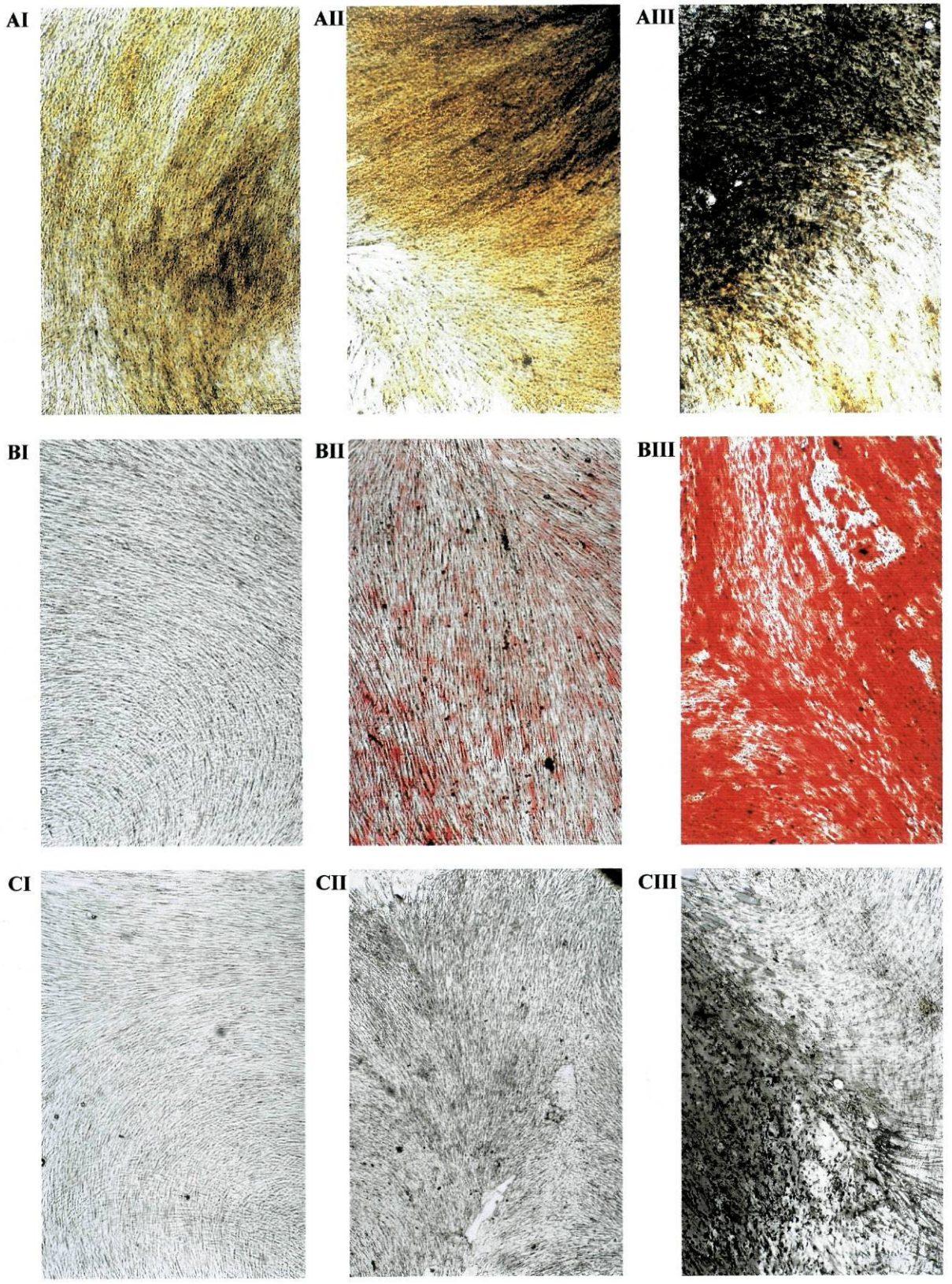


Fig. 3.5- **Microfotografias de culturas primárias de osso alveolar humano com 40 dias, coradas histoquimicamente para visualização da FA (A) e dos depósitos de cálcio (B) e de fosfatos (C); (40x). I- meio base; II- meio base + AA + β-GF; III- meio base + AA + β-GF + Dex.**

2.3. CONCLUSÃO

As culturas celulares obtidas de osso alveolar de rato nas condições experimentais descritas apresentaram características osteoblásticas, nomeadamente, a presença de uma percentagem elevada de células produtoras de FA e a capacidade de formação de áreas mineralizadas. No entanto, as culturas celulares obtidas a partir de osso alveolar de coelho nas mesmas condições experimentais mostraram ser pobres em células com características osteoblásticas. A diferença de comportamento observada nestes dois sistemas de cultura (rato *vs* coelho) pode ser atribuída, pelo menos em grande parte, às diferenças existentes entre as várias espécies na estrutura e composição do tecido ósseo. Este facto veio realçar a necessidade do estabelecimento de culturas celulares a partir de osso alveolar humano.

As culturas celulares de osso alveolar humano apresentaram um comportamento idêntico ao observado nas culturas de osso alveolar de rato, quando efectuadas nas mesmas condições experimentais. Contudo, a formação da estrutura nodular foi menos exuberante, aspecto evidenciado pela observação de uma coloração menos intensa nas reacções histoquímicas para identificação da presença de FA e de depósitos de cálcio e de fosfatos.

A obtenção de culturas primárias em várias condições experimentais, nomeadamente, utilizando apenas meio base, meio base suplementado com AA e β-GF e meio base suplementado com AA, β-GF e Dex, permitiu uma avaliação preliminar do papel destes suplementos neste sistema de cultura, relativamente à expressão do fenótipo osteoblástico. Assim, verificou-se que a presença de AA e de β-GF pareciam ser fundamentais para que se observasse a mineralização da matriz extracelular, uma das principais características do fenótipo osteoblástico. A presença adicional de Dex pareceu induzir a diferenciação osteoblástica.

3. CARACTERIZAÇÃO DE SUBCULTURAS SUCESSIVAS

A realização de estudos que envolvem métodos de cultura de células pressupõe a existência de uma população celular fenotipicamente homogénea e de um número muito elevado de células. Frequentemente, o número de células existente na cultura primária é insuficiente, principalmente quando o material biológico é escasso, como no caso do material humano. Assim, surgiu a necessidade de se efectuar subculturas sucessivas a partir da cultura primária para se obter um número de células em quantidade suficiente para se realizar os estudos pretendidos. A caracterização osteoblástica das subculturas sucessivas é essencial para a selecção da população celular mais apropriada (subcultura) a ser usada como modelo *in vitro* [136,177].

Esta fase do trabalho teve, então, como objectivo a caracterização de subculturas sucessivas obtidas a partir de osso alveolar humano relativamente a parâmetros de crescimento celular e actividade funcional, quando mantidas por um tempo prolongado. As condições de cultura foram semelhantes às descritas em 2.1 (meio base suplementado com 50 μg/mL de AA, β-GF a 10 mM e Dex a 10 nM; 37° C, 95% ar e 5% de CO_2). As células foram, também, cultivadas na ausência de Dex de modo a estudar o papel desta hormona na diferenciação osteoblástica das células de osso alveolar. Em simultâneo, e em condições experimentais semelhantes, foram efectuadas culturas de fibroblastos a partir de gengiva humana. Estas culturas foram utilizadas como controlo negativo das culturas de células osteoblásticas obtidas do osso alveolar.

3.1. MATERIAIS E MÉTODOS

As culturas primárias de osso alveolar humano e gengiva humana foram efectuadas nas condições referidas em 2.1., utilizando duas condições experimentais: (1) α-MEM enriquecido com 10% de soro bovino fetal, 50 μg/mL de gentamicina e 2,5 μg/mL de anfotericina B - meio base - e suplementado com de 50 μg/mL de AA e β-GF a 10 mM; (2) meio base suplementado com 50 μg/mL de AA, β-GF a 10 mM e Dex a 10 nM. A migração celular ocorreu aproximadamente 15 a 20 dias após o inicio das culturas, sendo estas mantidas por mais uma a duas semanas de modo a obter-se um número suficiente de células para se efectuar a primeira subcultura (até próximo da confluência).

Nesta fase as células aderentes foram libertadas enzimaticamente (0,04% de tripsina e 0,025% de colagenase), contadas num hemocitómetro e subcultivadas a uma densidade de 10^4 células/cm^2 em condições experimentais semelhantes às usadas nas culturas primárias. Parte das células obtidas foram subcultivadas sucessivamente da primeira (1ª Sc) à quinta (5ª Sc) subcultura na presença de AA, β-GF e Dex. A parte restante das células foi subcultivada da primeira à segunda (2ª Sc) subcultura na ausência de Dex, mas mantendo os outros dois suplementos. As células em subcultura foram cultivadas por períodos de 30 minutos a 28 dias e a sua caracterização foi efectuada no início da cultura (estudo da adesão celular) e durante os 28 dias de cultura (parâmetros relacionados com a proliferação celular e a actividade funcional).

A caracterização das culturas foi efectuada por métodos bioquímicos (ensaios realizados após 1, 3, 7, 14, 21 e 28 dias de cultura), histoquímicos e por microscopia electrónica de varrimento (ensaios realizados após 30 minutos, 1, 2 e 24 horas, 7, 21 e 28 dias de cultura). Na primeira e segunda subculturas, os meios de cultura foram recolhidos ao longo dos 28 dias de incubação e analisados para determinação das concentrações de cálcio e fósforo ionizados; a determinação destas espécies foi também efectuada nos meios de cultura incubados na ausência de células e nas mesmas condições experimentais que as utilizadas nas culturas celulares.

Os métodos bioquímicos consistiram na avaliação da proliferação celular (ensaio do MTT e conteúdo em proteína total) e actividades da FA, fosfatase ácida e fosfatase ácida resistente ao ácido tartárico. Os métodos utilizados foram descritos no capítulo II.

No fim de cada tempo de cultura as células destinadas à caracterização histoquímica foram fixadas (glutaraldeído 1,5% em cacodilato de sódio 0,14 M; 10 minutos) e submetidas a reacções de coloração que permitiam a detecção de células produtoras de FA e de áreas mineralizadas.

Todas as subculturas, após fixação e tratamento adequado, foram analisadas num microscópio electrónico de varrimento equipado com microanálise por raios X. No fim do período de incubação (28 dias) as células da primeira subcultura, cultivadas quer na ausência quer na presença de Dex, foram também analisadas por microscopia electrónica de transmissão.

3.2. ESTUDO DA ADESÃO CELULAR

O desenvolvimento das células *in vitro* depende não só da natureza do meio de cultura mas, também, das interacções observadas nas diferentes interfaces (célula-substrato, célula-célula, célula-matriz). Assim, a adesão das células ósseas normais a um substrato de cultura constitui um pré-requisito necessário ao normal desenvolvimento do fenótipo osteoblástico [178,179].

O processo de adesão celular é mediado por proteínas intramembranares que se podem ligar a locais específicos existentes na matriz extracelular, a receptores localizados na membrana citoplasmática de células do mesmo ou diferente tipo e a proteínas do soro. Estas moléculas, de acordo com a sua estrutura básica, encontram-se agrupadas em três grandes famílias: imunoglobulinas, integrinas e caderinas [180-182]. No tecido ósseo os OB encontram-se em contacto directo com a matriz extracelular por eles sintetizada e segregada, desempenhando a família das integrinas um papel importante na manutenção dessa adesão; este tipo de interacção pode mediar a transmissão de informações entre os meios extracelular e intracelular e não representar simplesmente um mecanismo pelo qual as células aderem a substratos. A adesão intercelular é mediada fundamentalmente por moléculas da família das caderinas e, provavelmente por certas integrinas [179].

A adesão celular pode ser avaliada pela observação das alterações morfológicas sofridas pelas células durante a sua adesão ao substrato [183]. Estas alterações correspondem a rearranjos do citoesqueleto que é a estrutura responsável pela organização do citoplasma, posição dos organelos, tradução e estabilidade do ARNm (indirectamente, a síntese proteica), movimento da célula e de componentes subcelulares, modelação da forma da célula (factor fundamental nos processos da morfogénese), divisão celular e diferenciação [184,185].

Este estudo teve como objectivo a avaliação da morfologia das células osteoblásticas provenientes de osso alveolar humano durante o processo de adesão a um substrato artificial (placas de cultura), após tripsinização da cultura primária. A morfologia dos OB em cultura foi observada histoquimicamente para identificação e localização da FA e por microscopia electrónica de varrimento. Os estudos foram efectuados para os seguintes tempos de cultura: 30 minutos, 1, 2 e 24 horas.

3.2.1. RESULTADOS

A observação das culturas celulares por microscopia electrónica de varrimento (Fig. 3.6 A) e óptica (ensaios histoquímicos, Fig. 3.6 B) mostrou que ao fim de trinta minutos de incubação os OB apresentavam uma morfologia esférica e superfície rugosa. Após uma hora, as células começaram a apresentar extensões citoplasmáticas; a configuração de "ovo estrelado" foi mais visível neste tempo de cultura. Ao fim de duas horas, o citoplasma estava quase totalmente "expandido" sobre o substrato e o núcleo tornou-se visível. Ao fim de 24 horas as células apresentaram uma forma fibroblástica e encontravam-se dispersas sobre o substrato plástico. No entanto, observou-se para cada tempo de cultura a coexistência de células em diferentes estados de desenvolvimento, embora um desses estados fosse sempre predominante. Os estudos histoquímicos mostraram que as células apresentaram uma reacção positiva para a FA em todos os tempos de cultura.

3.2.2. CONCLUSÃO

O processo de adesão celular a um substrato envolve quatro passos principais: adsorção das proteínas séricas, presentes no meio de cultura, ao substrato; contacto das células arredondadas com o substrato; adesão das células ao substrato, mediada por proteínas; e expansão citoplasmática das células [183].

Com base nos estudos de microscopia, observou-se que nas culturas celulares de osso alveolar a fase de expansão citoplasmática foi dividida em três etapas: (1) as células em suspensão eram essencialmente esféricas (10-15 μm de diâmetro) e num intervalo de poucos minutos contactaram com o substrato; (2) as células começaram a achatar e a estenderem-se radialmente, aumentando de tamanho e mantendo o núcleo indistinto; (3) as células dispersaram-se gradualmente ao longo de duas horas, até aparentarem a forma de discos com pequenas expansões e o núcleo se tornar visível. O tempo necessário para que se observasse aproximadamente metade da adesão máxima dos OB foi de cerca de 60 minutos. Ao fim do primeiro dia as células apresentavam uma morfologia fibroblástica característica. As alterações morfológicas observadas durante o processo de adesão são semelhantes às descritas na literatura para outros sistemas de cultura [183].

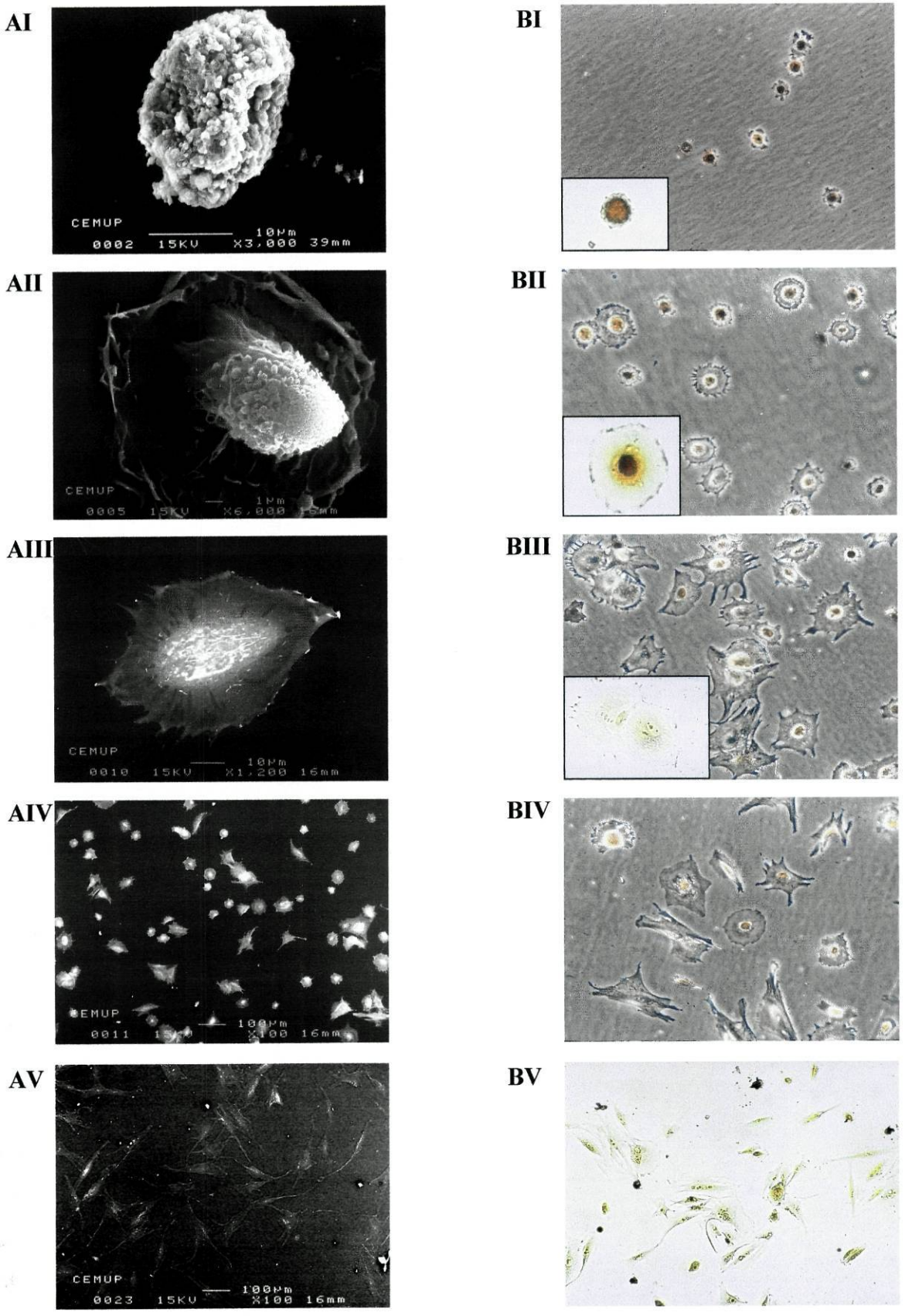


Fig. 3.6- **Fotografias de microscopia electrónica de varrimento (A) e de microscopia óptica (B; células coradas histoquimicamente para visualização da FA; I, II, III e IV: 400x; V: 100x) de culturas de osteoblastos; primeira subcultura. I- 30 minutos; II- 1 hora; III- 2 horas; IV- 2 horas, aspecto geral; e V- 24 horas.**

3.3. CARACTERIZAÇÃO DAS SUBCULTURAS SUCESSIVAS

3.3.1. RESULTADOS

PROLIFERAÇÃO CELULAR

As células de osso alveolar subcultivadas na presença de Dex, à semelhança do que foi observado nas culturas primárias, formaram grupos de células, isolados ou interligados, que aumentaram de tamanho com o decorrer do tempo de incubação, originando uma estrutura nodular (visível macroscopicamente a partir dos 15-20 dias de cultura). No entanto, verificou-se que o número e intensidade dos nódulos tridimensionais diminuiu da primeira para a quinta subcultura: na primeira subcultura as células encontravam-se organizadas formando nódulos numerosos e densos, enquanto que na quinta subcultura estas estruturas eram praticamente inexistentes. Na ausência de Dex observou-se a formação de multicamadas contínuas de células, embora para tempos de incubação mais prolongados (21-28 dias) fosse evidente a formação de pequenos nódulos dispersos pela cultura.

A proliferação celular foi avaliada pelo ensaio do MTT (redução do sal de MTT pelas células viáveis e determinação espectrofotométrica do produto formado a 600 nm) e pela determinação do conteúdo em proteína total. O ensaio do MTT fornece, igualmente, informação sobre a viabilidade celular, uma vez que em princípio apenas as células viáveis são capazes de transportar o sal de tetrazólio do meio extracelular para o meio intracelular e de o reduzir, originando um produto corado que precipita no interior das células (Fig. 3.7); o produto formado, após lise celular e dissolução num solvente adequado, é doseado espectrofotometricamente a 600 nm.

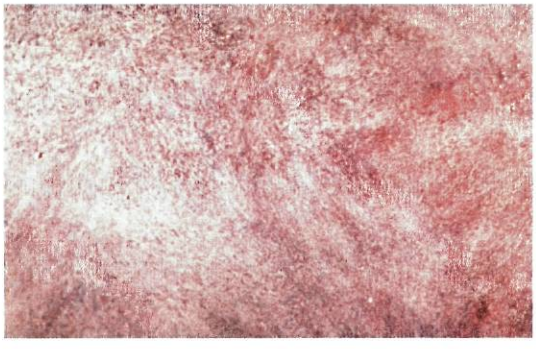


Fig. 3.7-**Aspecto microscópico de uma cultura celular de osso alveolar humano com 35 dias após redução do sal MTT; (40x).**

Os resultados obtidos no ensaio do MTT mostraram que as células da primeira à terceira subcultura, quer na presença quer na ausência de Dex, proliferaram gradualmente a partir do 3°-4° dia até ao 21° dia de cultura. A proliferação celular aos 28 dias de incubação foi semelhante ou inferior à apresentada aos 21 dias, indicando que a cultura se encontrava em fase de degradação. Este padrão foi diferente na quarta e quinta subculturas efectuadas na presença de dexametasona, já que a proliferação aumentou gradualmente até ao fim do tempo de cultura. No entanto, não se observaram diferenças estatisticamente significativas nos valores obtidos para a proliferação celular nas várias subculturas (Fig. 3.8 A).

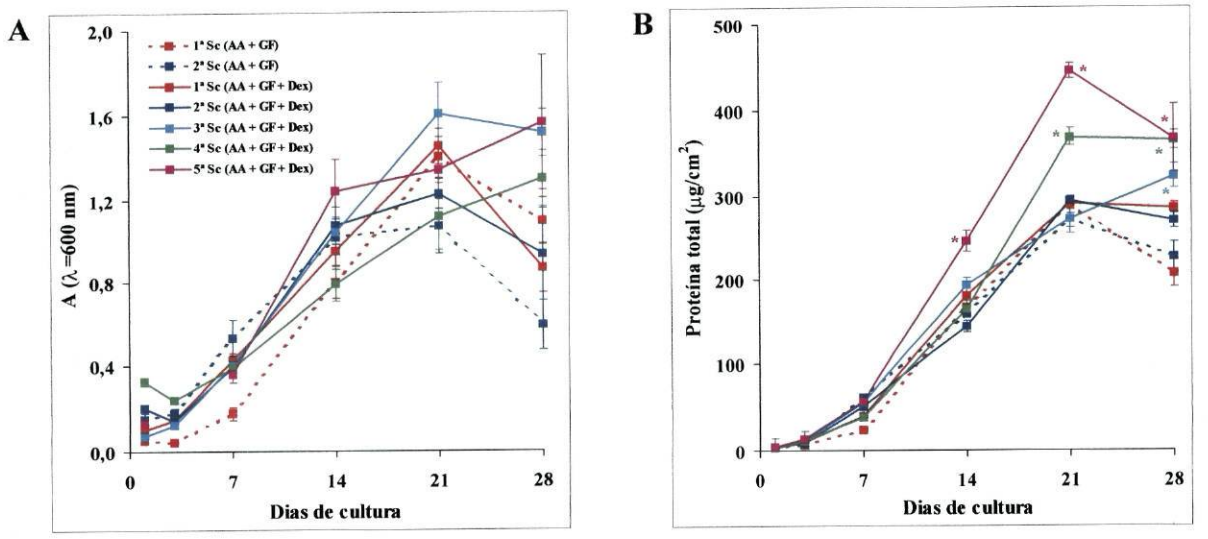


Fig. 3.8- **Proliferação celular de culturas de células de osso alveolar humano efectuadas na ausência (1ª e 2ª Sc; linhas a tracejado) e na presença (1ª à 5ª Sc; linhas a cheio) de Dex e mantidas por um período de 28 dias. A- Ensaio do MTT; B- Proteína total. * Significativamente diferente da respectiva situação controlo (1ªs Sc).**

O conteúdo em proteína total aumentou com o tempo de incubação de modo análogo ao observado no ensaio de redução do MTT. No entanto, na terceira subcultura verificou-se um aumento significativo do conteúdo em proteína total ao 28° dia de cultura. Este efeito foi antecipado em uma e duas semanas respectivamente na quarta e quinta subculturas (Fig. 3.8 B).

ACTIVIDADES DE FOSFATASE ALCALINA, FOSFATASE ÁCIDA E FOSFATASE ÁCIDA RESISTENTE AO ÁCIDO TARTÁRICO

Além da FA, enzima característica das células osteoblásticas, determinou-se a fosfatase ácida e a fosfatase ácida resistente ao ácido tartárico. Esta metodologia destinou-se a avaliar o grau de enriquecimento das várias subculturas relativamente a células osteoblásticas, pois a presença de

osteoclastos e, sobretudo, de fibroblastos observa-se com alguma frequência nestes sistemas de cultura. A determinação da fosfatase ácida dá indicação respeitante à presença de fibroblastos e macrófagos e a determinação da fosfatase ácida resistente ao ácido tartárico providencia informação relativamente à presença de osteoclastos.

A determinação bioquímica da actividade enzimática da FA nas várias subculturas revelou que os seus níveis eram influenciados pela passagem sucessiva e também pelas condições experimentais, ou seja, presença ou ausência de Dex (Fig. 3.9).

Nas culturas efectuadas na presença de Dex, já era perceptível a actividade da FA no 7º dia de cultura. Na primeira e segunda subculturas a actividade da FA aumentou significativamente durante a segunda semana de cultura, atingindo um valor máximo por volta do 14º dia e, de seguida, diminuiu acentuadamente. Os níveis da FA diminuíram bruscamente da primeira para a segunda subcultura. Nas restantes subculturas continuou a observar-se uma diminuição progressiva da actividade da enzima, embora este efeito fosse menos acentuado (Fig. 3.9).

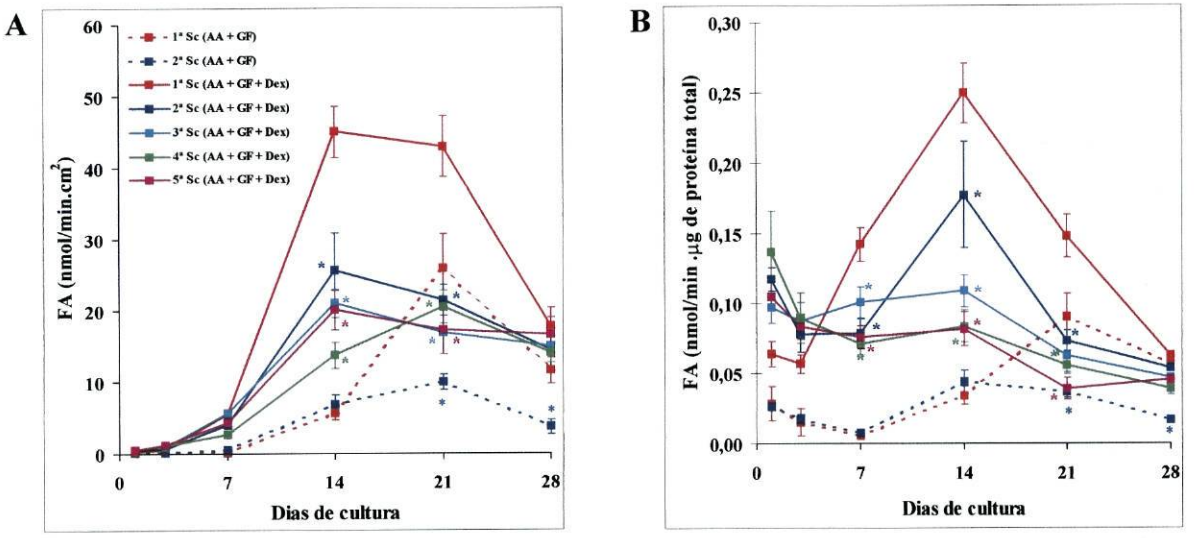


Fig. 3.9- **Actividade da FA de culturas de células de osso alveolar humano efectuadas na ausência (1ª e 2ª Sc; linhas a tracejado) e na presença (1ª à 5ª Sc; linhas a cheio) de Dex e mantidas por um período de 28 dias. A- nmol/min. cm²; B- nmol/min. µg de proteína total. * Significativamente diferente da respectiva situação controlo (1ªs Sc).**

Nas culturas efectuadas na ausência de Dex, observaram-se níveis de FA significativamente inferiores aos observados nas culturas efectuadas na presença da hormona. Os níveis

enzimáticos detectados no 7º dia de cultura foram muito baixos. Na primeira subcultura os níveis da FA aumentaram até ao 21º dia e, depois, diminuíram ligeiramente. Na segunda subcultura os níveis de FA foram baixos ao longo de todo o tempo de cultura (Fig. 3.9).

Os níveis de fosfatase ácida e de fosfatase ácida resistente ao ácido tartárico foram muito baixos em todas as subculturas (Fig. 3.10 A e B), quando comparados com os observados para a actividade da FA.

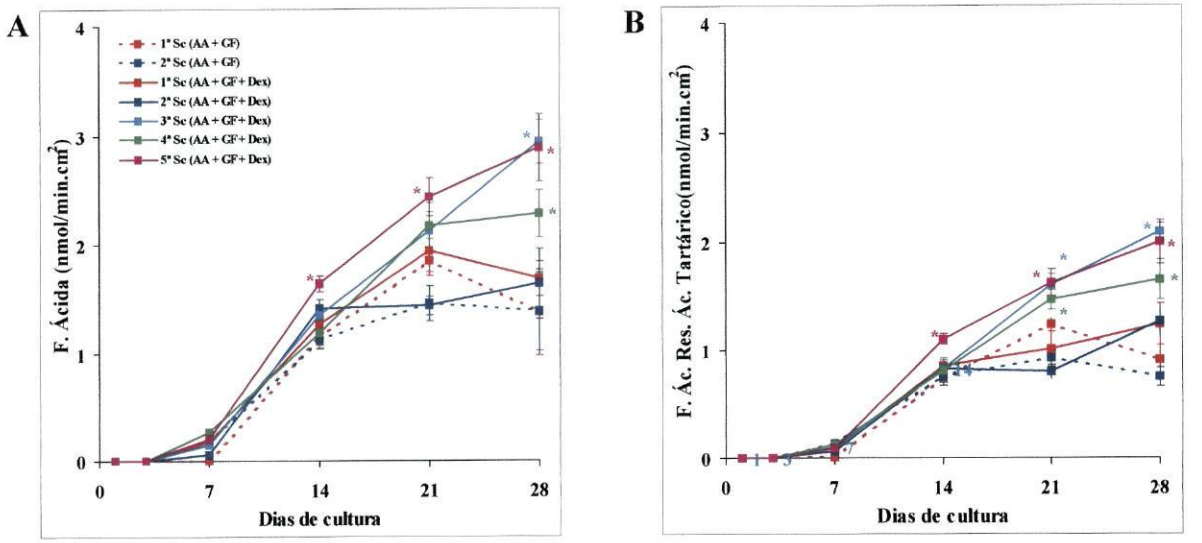


Fig. 3.10- **Actividade da fosfatase ácida (A) e da fosfatase ácida resistente ao ácido tartárico (B) de culturas de osso alveolar humano efectuadas na ausência (1ª e 2ª Sc; linhas a tracejado) e na presença (1ª à 5ª Sc; linhas a cheio) de Dex e mantidas por um período de 28 dias. * Significativamente diferente da respectiva situação controlo (1ªs Sc).**

IDENTIFICAÇÃO HISTOQUÍMICA DE FA E DE DEPÓSITOS DE FOSFATO DE CÁLCIO

Os ensaios histoquímicos efectuados confirmaram as observações anteriormente descritas. As culturas com 7 dias apresentaram uma reacção histoquímica positiva, embora fraca, para a FA. As culturas tratadas com Dex apresentaram aos 14 dias uma reacção histoquímica muito intensa para a FA. Estas reacções estavam predominantemente associadas aos nódulos tridimensionais observando-se, no entanto, um decréscimo gradual na intensidade das reacções histoquímicas com a subcultura sucessiva (Figs. 3.11 e 3.13). Na ausência de Dex, as culturas apresentaram reacções histoquímicas positivas para a FA; a intensidade da coloração

aumentou com o tempo de incubação e foi mais forte na primeira subcultura, contudo menor do que a observada nas respectivas culturas tratadas com Dex (Figs. 3.11 e 3.13).

FA	7d	14d	21d	28d
Ausência de Dex				
1ª Sc	+	++	+++	++
2ª Sc	+	+	++	+
Presença de Dex				
1ª Sc	+	+++++	++++	++
2ª Sc	+	++++	+++	++
3ª Sc	+	+++	++	++
4ª Sc	+	++	++	++
5ª Sc	+	++	++	++

Fig. 3.11- **Aspecto macroscópico de culturas de osso alveolar humano efectuadas na ausência (1ª e 2ª Sc) e na presença (1ª à 5ª Sc) de Dex, coradas histoquimicamente para visualização da FA aos 7, 14, 21 e 28 dias de cultura. A intensidade da coloração foi classificada da seguinte maneira: +, positiva de fraca intrensidade; ++, moderadamente positiva; +++, positiva pouco intensa; ++++, positiva intensa; +++++, positiva muito intensa.**

As reacções de alizarina vermelha (depósitos de cálcio; reacção positiva: coloração vermelha) e de von Kossa (depósitos de fosfato; reacção positiva: coloração preta) foram negativas aos 7 e 14 dias de cultura, indicando a ausência de áreas mineralizadas (Fig. 3.12).

AV	14d		21d		28d	
Ausência de Dex						
1ª Sc		–		–		++
2ª Sc		–		–		–
Presença de Dex						
1ª Sc		–		++++		++++
2ª Sc		–		+++		+++
3ª Sc		–		++		++
4ª Sc		–		+		+
5ª Sc		–		–		+/-

Fig. 3.12- **Aspecto macroscópico de culturas de osso alveolar humano, efectuadas na ausência (1ª e 2ª Sc) e na presença (1ª à 5ª Sc) de Dex, coradas histoquimicamente para visualização de depósitos de cálcio (alizarina vermelha; AV) e de fosfato (von Kossa; VK) aos 7, 21 e 28 dias de cultura. A intensidade da coloração foi classificada da seguinte maneira: -, negativa; +/-, fraca a indetectável; +, positiva de fraca intensidade; ++, moderadamente positiva; +++, positiva pouco intensa; ++++, positiva intensa.**

As culturas tratadas com Dex apresentaram aos 21 dias reacções positivas para os depósitos de cálcio e de fosfato. Estas colorações, à semelhança do observado para a presença de FA, estavam predominantemente associadas aos nódulos tridimensionais, observando-se um decréscimo gradual na intensidade das reacções histoquímicas com a subcultura sucessiva (Figs. 3.12 e 3.13).

Nas culturas efectuadas na ausência de Dex as reacções de alizarina vermelha e de von Kossa foram negativas aos 21 dias de incubação, indicando a ausência de áreas mineralizadas. No entanto, no 28° dia estas culturas apresentaram reacções positivas fracas, indicando a existência de mineralização (Figs. 3.12 e 3.13).

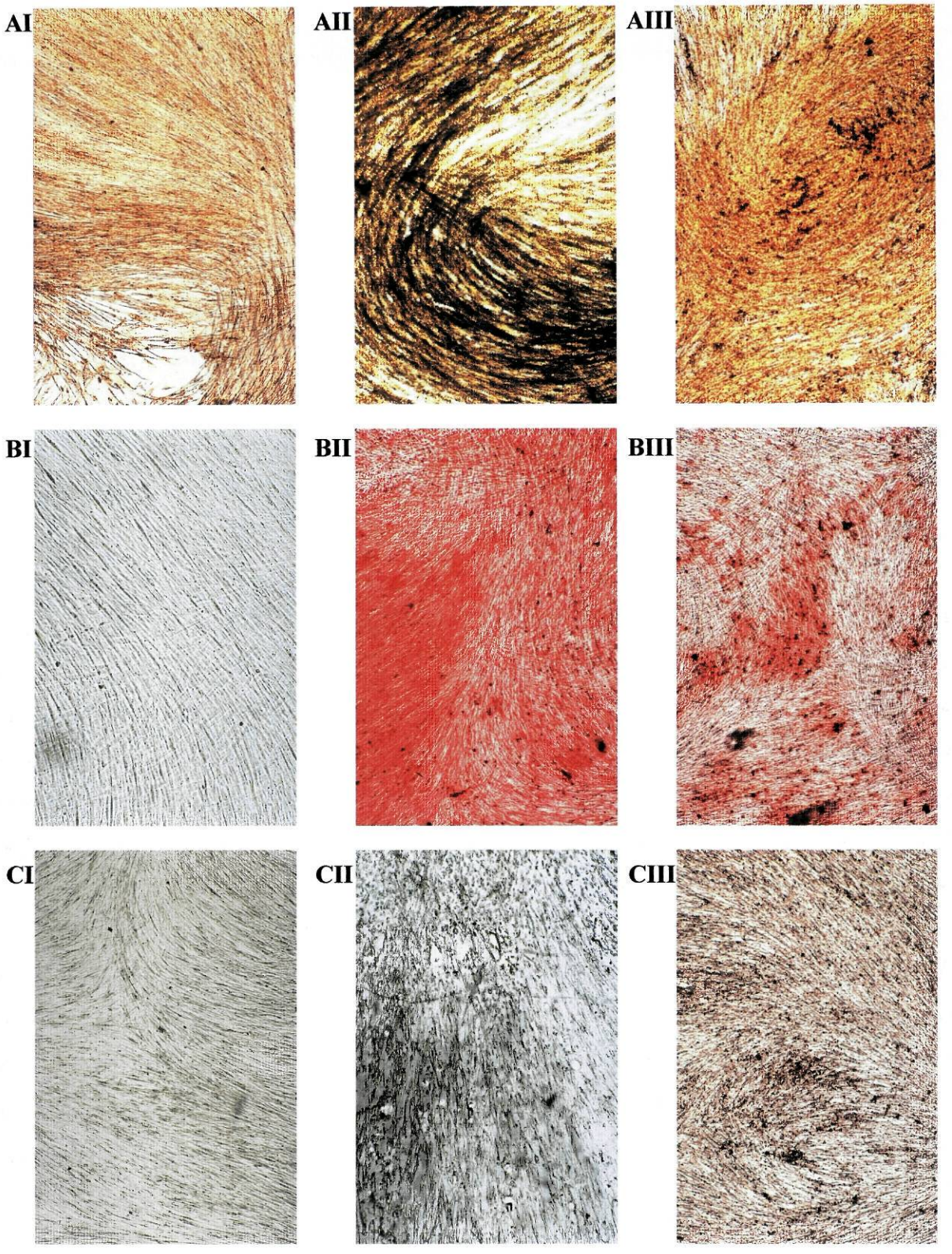


Fig. 3.13- **Microfotografias de culturas de osso alveolar humano efectuadas na ausência (1ª Sc) e na presença (1ª e 3ª Sc) de Dex e coradas histoquimicamente para visualização da FA (A) e de depósitos de cálcio (B, alizarina vermelha; AV) e de fosfato (C, von Kossa; VK), mantidas por um período de 21 dias. I- 1ª Sc sem Dex; II- 1ª Sc com Dex; III- 3ª Sc com Dex; (40x).**

OBSERVAÇÃO DAS CULTURAS POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE VARRIMENTO

Como se observou no estudo de adesão das células ósseas ao substrato de cultura, após um dia de incubação a maioria das células apresentava uma morfologia característica com prolongamentos citoplasmáticos e núcleo bem visível. Após 3 e 7 dias de cultura as células não sofreram alterações significativas, a não ser o aumento em tamanho e em número; contudo, foi visível a existência de uma matriz extracelular (Fig. 3.14 A).

Na primeira subcultura efectuada na presença de Dex observou-se, aos 21 dias de incubação, a presença de uma matriz densa e rugosa e osteoblastos contendo numerosos prolongamentos associados com formações globulares na extremidade e preenchidas com um depósito mineral (Fig. 3.14 B). A análise destas formações globulares por espectroscopia de microanálise por raios X revelou a presença de picos de cálcio e de fósforo (Fig. 3.15 A). A abundância destas estruturas globulares diminuiu progressivamente a partir da segunda subcultura à medida que as células foram subcultivadas. Nas segunda, terceira e quarta subculturas estas estruturas continham um material mineral, evidenciado pela presença de picos de cálcio e de fósforo no espectro de raios X. Na quinta subcultura não se observou a presença de qualquer depósito mineral. Todas as subculturas apresentavam ao 28° dia um aspecto semelhante ao observado no 21° dia, embora, a abundância e o tamanho das estruturas globulares fosse maior.

A primeira subcultura efectuada na ausência de Dex apresentou aos 21 dias de incubação uma matriz muito homogénea e contínua e não revelou a presença das estruturas globulares (Fig. 3.14 H). Por espectroscopia de raios X verificou-se a ausência de picos para o cálcio e para o fósforo (Fig. 3.15 B). No entanto, ao 28° dia foi possível observar-se a presença de uma mineralização fraca (Fig. 3.14 I). A segunda subcultura não mostrou a presença de qualquer material mineral.

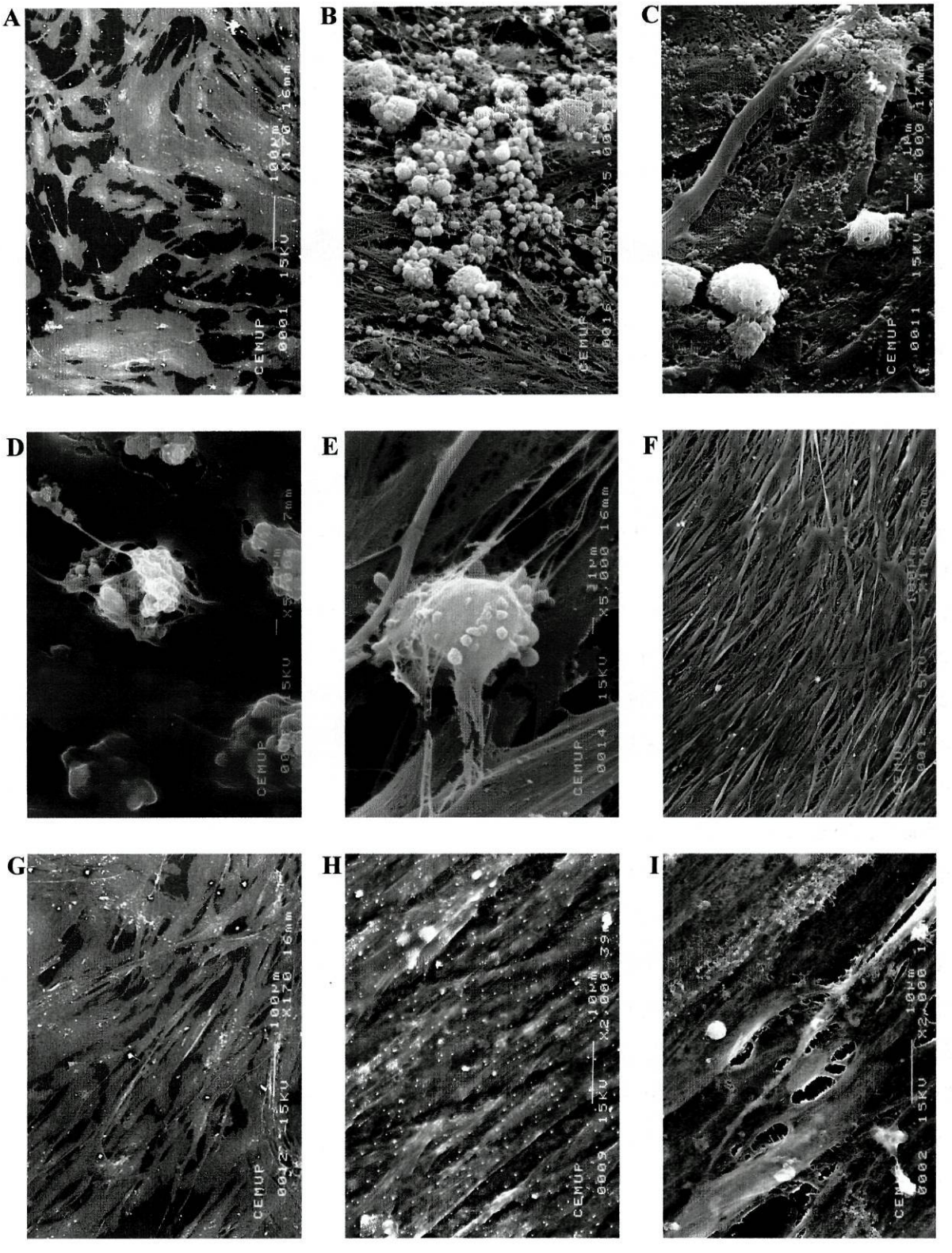


Fig. 3.14- **Fotografias de microscopia electrónica de varrimento de culturas celulares de osso alveolar humano. Culturas efectuadas na presença de Dex: A- 1ª subcultura, 7 dias; B- 1ª subcultura, 21 dias; C- 2ª subcultura, 21 dias; D- 3ª subcultura, 21 dias; E- 4ª subcultura, 21 dias; F- 5ª subcultura, 21 dias. Culturas efectuadas na ausência de Dex: G- 1ª subcultura, 7 dias; H- 1ª subcultura, 21 dias; I- 1ª subcultura, 28 dias.**

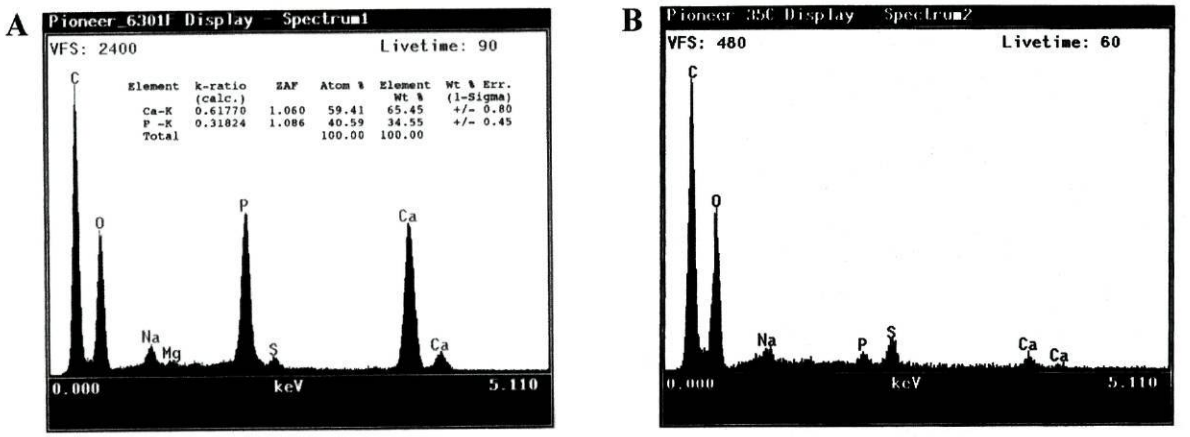


Fig. 3.15- **Espectro de raios X das estruturas globulares presentes na primeira subcultura com 21 dias efectuada na presença (A) e na ausência (B) de Dex.**

OBSERVAÇÃO DAS CULTURAS POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISSÃO

A observação de culturas com 28 dias, efectuadas quer na ausência quer na presença de Dex, por microscopia electrónica de transmissão, mostrou a presença de células com características morfológicas semelhantes às apresentadas pelos osteócitos, nomeadamente com uma pequena quantidade de citoplasma pobre em retículo endoplasmático rugoso e aparelhos de Golgi (estruturas relacionadas com a síntese proteica), algumas mitocôndrias e inclusões lipídicas; o núcleo com o seu nucléolo passou a ser o organelo mais proeminente da estrutura celular (Fig. 3.16 A-C). A matriz extracelular era rica em fibras de colagénio que se encontravam dispersas sem qualquer orientação específica (Fig. 3.16 D) e apresentavam uma estriação característica (Fig. 3.16 G). Nesta fase as culturas encontravam-se num estado de degenerescência, pois foi possível observar a existência de várias células em lise.

As culturas efectuadas na ausência de Dex apresentaram uma matriz extracelular orgânica muito pouco mineralizada (Fig. 3.16 E) em contraste com o observado nas culturas efectuadas na presença do glucocorticóide (Fig. 3.16 F); nestas culturas, observou-se a presença de numerosos cristais em forma de agulha, aspecto semelhante aos da hidroxiapatite. A Fig. 3.16 G mostra um corte de uma célula rodeada por osteóide que se encontra em fase de mineralização e a Fig. 3.16 H uma frente de mineralização, onde se pode observar a existência de vestígios de vesículas de mineralização.

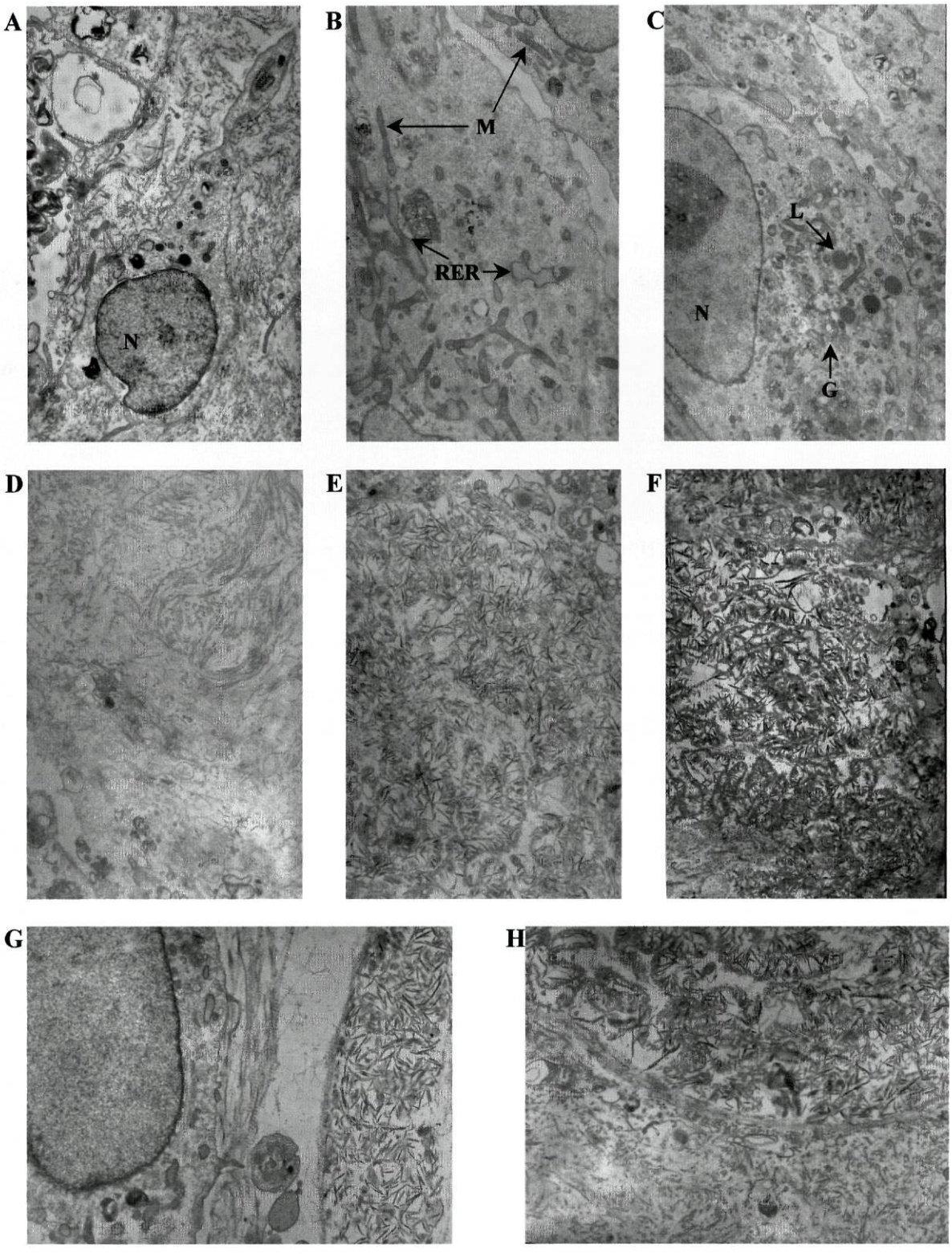


Fig. 3.16- **Fotografias de microscopia electrónica de transmissão de culturas de osso alveolar humano efectuadas na ausência e na presença de Dex e mantidas por um período de 28 dias; 1ª Sc. A (N- núcleo), B (M- mitocôndria, RER- retículo endoplasmático rugoso) e C (L- inclusão lípida, G- aparelho de Golgi) - aspecto geral das células em cultura (respectivamente, 5300x, 4000x e 5300x); D- matriz extracelular orgânica não mineralizada (5300x); E e F- matriz extracelular orgânica mineralizada de culturas efectuadas respectivamente na ausência e na presença de Dex (5300x); G e H- frente de mineralização (5300x).**

CONTEÚDO EM Pi E Cai NO MEIO DE CULTURA

O fósforo e o cálcio ionizados (respectivamente Pi e Cai) existentes no meio de cultura têm a sua origem nos compostos de fosfato e de cálcio presentes no α-MEM e, também, no soro bovino fetal.

A determinação dos níveis de Pi e de Cai no meio de cultura incubado na ausência de células mostrou que a concentração destes iões não se alterou significativamente ao longo do tempo de incubação (Fig. 3.17 AI e BI).

Na primeira subcultura efectuada na presença de Dex verificou-se um aumento dos níveis de Pi, aproximadamente a partir do 10° dia de cultura, atingindo um valor máximo por volta do 14° dia. O aumento do Pi resulta da hidrólise do β-GF adicionado ao meio de cultura (10 mM) pela acção hidrolítica da FA [35,175,186]. Uma vez que os níveis medidos não são cumulativos, os resultados obtidos sugerem que a capacidade hidrolítica das células ósseas aumentou ao longo do período de incubação. Estes resultados estão de acordo com os obtidos para a actividade da FA que revelaram um aumento muito significativo de actividade enzimática durante a segunda semana de cultura (Fig. 3.10). A partir desta altura os níveis de Pi começaram a diminuir (Fig. 3.17 AII). Durante as duas primeiras semanas de cultura, os níveis de Cai mantiveram-se relativamente estáveis, começando a diminuir por volta do 14° dia; atingiram um valor mínimo entre os 18°-21° dias e começaram a aumentar de novo (Fig. 3.17 BII). O consumo destes iões sugere deposição de fosfato de cálcio a partir do 14° dia e os resultados mostram que a partir 25° dia a cultura já se encontra numa fase degenerativa. Na segunda subcultura, os níveis do Pi começaram também a aumentar gradualmente por volta do 10° dia e a diminuir a partir do 18°; os níveis de Cai começaram a diminuir por volta dos 14°-18° dias. Estes resultados sugerem um atraso de alguns dias no início da formação de depósitos de fosfato de cálcio.

Na primeira subcultura efectuada na ausência de Dex, o valor máximo do Pi foi observado no 21° dia e os valores do Cai começaram a diminuir a partir do 18°, atingindo um valor mínimo próximo do 25° dia. Estes resultados sugerem que a deposição de fosfato de cálcio começou a observar-se próximo do 21° dia (Fig. 3.17 AII e BII). Na segunda subcultura o valor máximo do Pi foi alcançado por volta do 25° dia e os níveis do Cai começaram a diminuir apenas a partir do 21°, indicando um início da mineralização ainda mais tardio (Fig. 3.17 AII e BII).

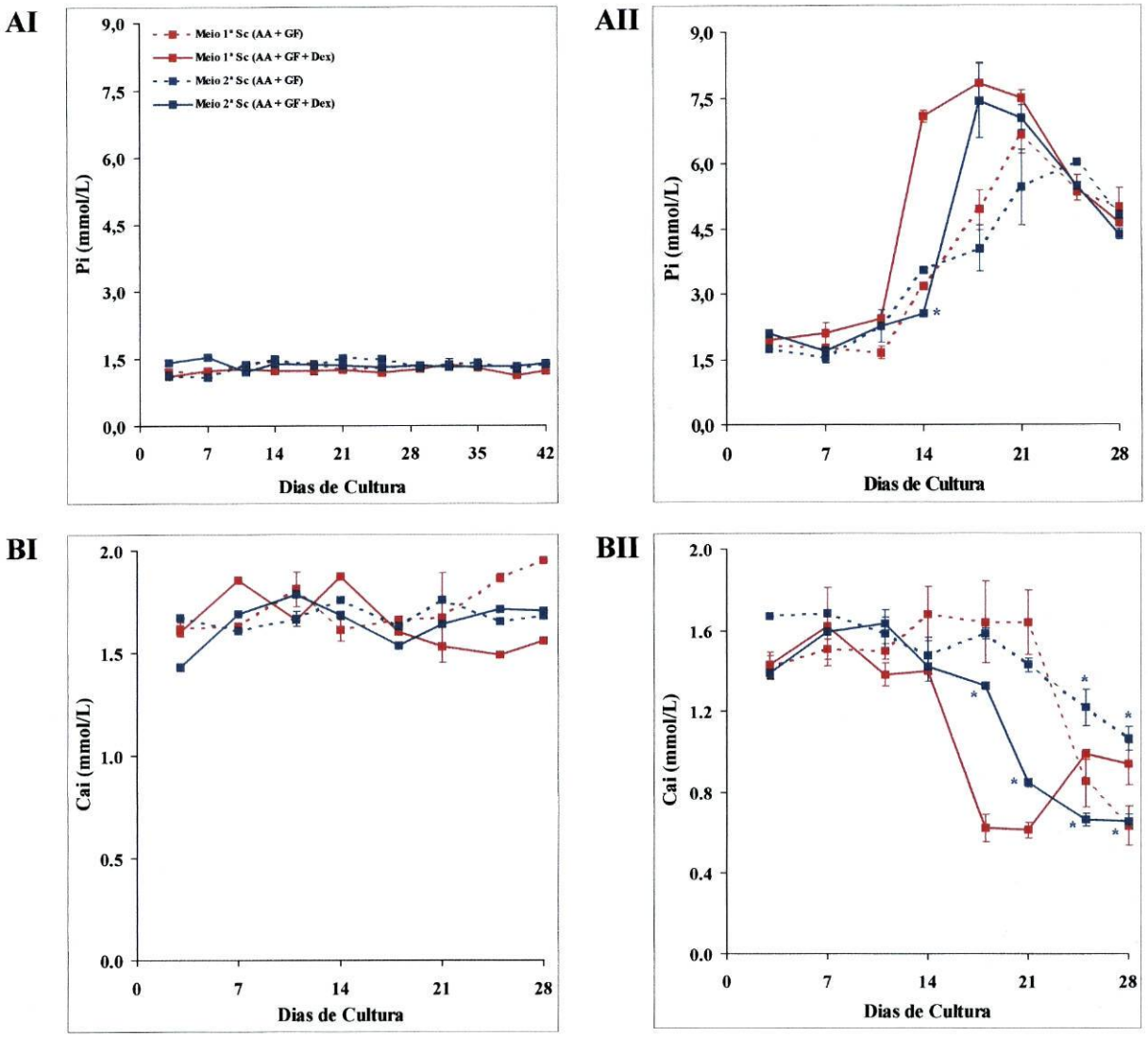


Fig. 3.17- **Conteúdo em Pi (A) e em Cai (B) do meio de cultura incubado na ausência (I) e na presença (II) de células de osso alveolar humano durante um período de 28 dias. As culturas foram efectuadas na ausência (linhas a tracejado) e na presença (linhas contínuas) de Dex. *Significativamente diferente da respectiva situação controlo (1as Sc).**

Os resultados relativos aos níveis de Cai e de Pi no meio de cultura sugeriram que todas as subculturas apresentam capacidade de mineralização, embora se observem diferenças de comportamento nas várias culturas. As efectuadas na presença de Dex apresentam uma mineralização mais precoce e mais intensa que as efectuadas na ausência do glucocorticóide. Em ambas as situações, a primeira subcultura apresentou maior capacidade de formação de áreas mineralizadas do que a segunda subcultura.

3.4. CULTURAS DE FIBROBLASTOS

3.4.1. MATERIAIS E MÉTODOS

As culturas primárias de gengiva humana foram efectuadas e manipuladas nas condições referidas no ponto 3.3.1. As células da primeira subcultura foram cultivadas em duas situações experimentais: (1) α-MEM enriquecido com 10 % de soro bovino fetal, 50 μg/mL de gentamicina e 2,5 μg/mL de anfotericina B - meio base – e suplementado com 50 μg/mL de AA e β-GF a 10 mM; (2) meio base suplementado com 50 μg/mL de AA, β-GF a 10 mM e Dex a 10 nM.

A caracterização das culturas foi efectuada por métodos bioquímicos (ensaios realizados após 3, 7, 14, 21 e 28 dias de cultura) e histoquímicos (7, 14, 21 e 28 dias de cultura). Os meios de cultura foram recolhidos ao longo dos 28 dias de incubação e analisados para determinação das concentrações de cálcio e fósforo ionizados. Os métodos bioquímicos consistiram na avaliação da proliferação celular (ensaio do MTT e conteúdo em proteína total) e actividades da fosfatase alcalina, fosfatase ácida e fosfatase ácida resistente ao ácido tartárico. Os métodos histoquímicos consistiram na detecção de células produtoras de fosfatase alcalina e de áreas mineralizadas.

3.4.2. RESULTADOS

As células em cultura tanto na ausência como na presença de Dex proliferaram gradualmente ao longo do período de incubação originando multicamadas contínuas de células. A proliferação celular (ensaio do MTT, Fig. 3.18 A, e conteúdo em proteína total, resultados não apresentados) foi idêntica à observada nas culturas de osso alveolar humano; no entanto, notou-se um crescimento celular mais activo durante a primeira semana de cultura e, depois, mais lento até ao fim do período de incubação.

Nas culturas efectuadas na ausência de Dex os níveis de FA (Fig. 3.18 B) e de fosfatase ácida resistente ao ácido tartárico (resultados não apresentados) foram desprezáveis e os níveis de fosfatase ácida (Fig.3.18 B) foram elevados. A presença do glucocorticóide conduziu a um

pequeno aumento da actividade de FA, contudo os níveis observados foram significativamente mais baixos do que os encontrados nas culturas de osso alveolar humano.

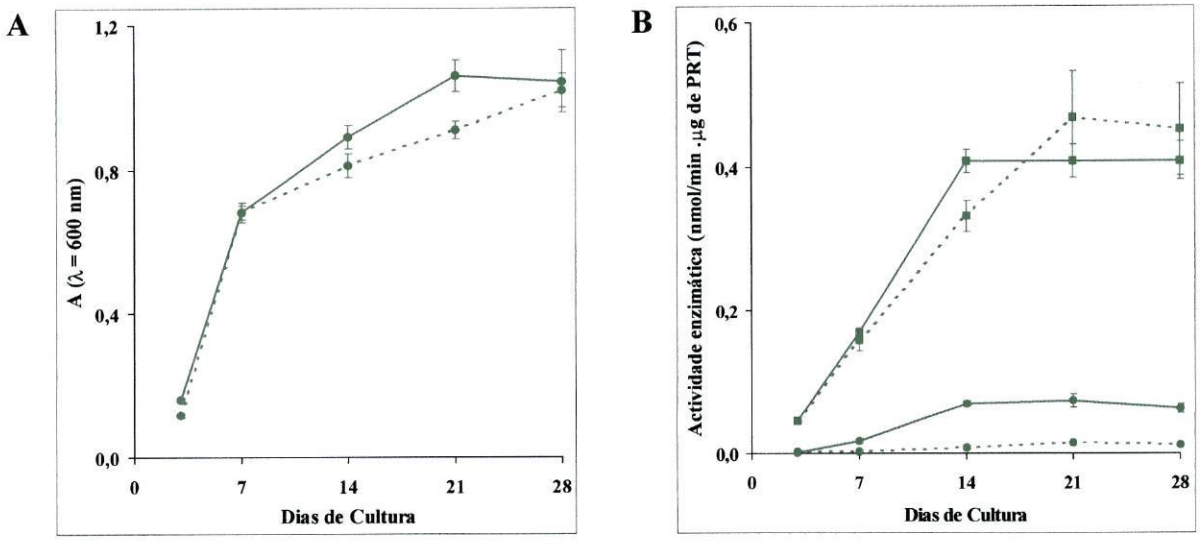


Fig. 3.18- **Comportamento de culturas de células de gengiva humana efectuadas na ausência (linha a tracejado) e na presença (linha a cheio) de dexametasona e mantidas por um período de 28 dias. A- ensaio do MTT; B- actividade da fosfatase alcalina (●) e da fosfatase ácida (■).**

Os ensaios histoquímicos efectuados confirmaram as observações anteriormente descritas. Assim, estas culturas apresentaram ao longo de todo o período de incubação reacções histoquímicas muito fracas para a FA (Fig. 3.19 B); as reacções para a fosfatase ácida aumentaram de intensidade até ao 14°-21° dias e mantiveram-se estáveis até ao fim do tempo de cultura (Fig. 3.19 A); as reacções de alizarina vermelha (Fig.3.19 C) e de von Kossa (Fig. 3.19 D) foram negativas em todos os dias de teste indicando ausência de depósitos minerais na matriz extracelular.

A determinação do Pi e do Cai no meio de cultura revelou uma constância de valores ao longo de todo o período de incubação (semelhante ao observado no meio de cultura incubado na ausência de células) sugerindo, igualmente, ausência de mineralização na matriz extracelular (resultados não apresentados).

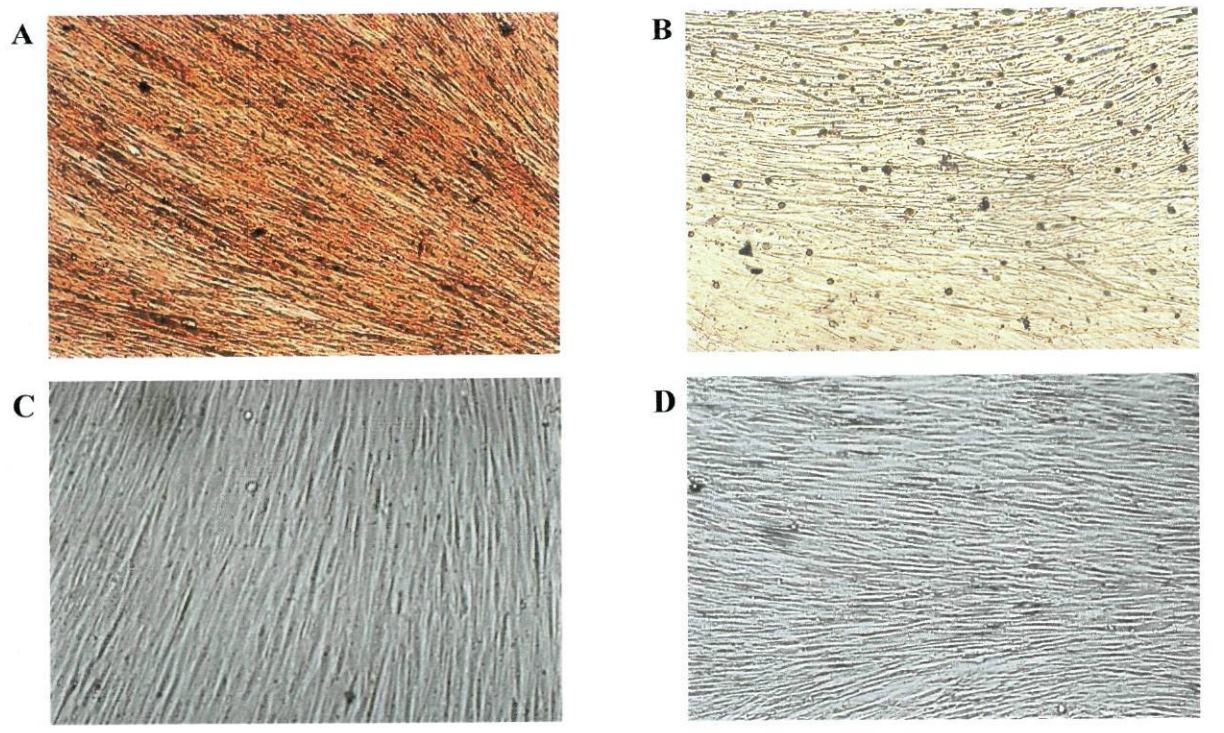


Fig. 3.19- **Microfotografias de culturas celulares de gengiva humana (primeira subcultura) efectuadas na ausência e na presença de dexametasona e coradas histoquimicamente para visualização da fosfatase ácida (A), FA (B), depósitos de cálcio (C, alizarina vermelha; AV) e de fosfato (D, von Kossa; VK), mantidas por um período de 28 dias; (40x).**

3.5. CONCLUSÃO

As culturas celulares de osso alveolar humano, obtidas em condições experimentais apropriadas, apresentam capacidade de proliferação e diferenciação osteoblástica, evidenciadas por uma actividade elevada de FA e formação de uma matriz extracelular mineralizada. A actividade da FA e a capacidade de mineralização são influenciadas pelas condições experimentais, nomeadamente, ausência ou presença de Dex e, também, AA e β-GF. A subcultura sucessiva das células de osso alveolar resulta numa diminuição progressiva das características osteoblásticas.

Os resultados apresentados sugerem que estas culturas constituem um modelo potencial para o estudo *in vitro* da fisiologia e farmacologia do osso alveolar. A primeira subcultura parece constituir a população celular mais apropriada para a realização destes estudos, pois é a que apresenta a expressão mais significativa dos parâmetros osteoblásticos estudados.

4. CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO DO ÁCIDO ASCÓRBICO, β-GLICEROFOSFATO DE SÓDIO E DEXAMETASONA

A expressão do fenótipo osteoblástico em cultura depende de vários parâmetros como, por exemplo, o meio de cultura, o tempo de cultura e a presença de compostos que influenciam a proliferação e a diferenciação celular [12-17]. De acordo com dados recolhidos na literatura, o desenvolvimento do fenótipo osteoblástico em cultura é favorecido pelo uso de um meio de cultura selectivo, como o α-MEM, enriquecido com soro bovino fetal e suplementado com AA, β-GF e Dex [7,136,155-162,173]. Os três suplementos favorecem o desenvolvimento do fenótipo osteoblástico *in vitro* e, por este motivo, é conveniente seleccionar as condições experimentais mais apropriadas de modo a obter culturas com características osteoblásticas bem definidas e com um comportamento reprodutível.

No estudo anterior (ponto 3) avaliou-se o efeito da subcultura sucessiva de células de osso alveolar humano na expressão do fenótipo osteoblástico. Neste estudo, as culturas foram efectuadas na ausência e na presença de Dex a 10 nM, mas sempre na presença dos outros dois suplementos (AA e β-GF). Nestas condições, a primeira subcultura parece constituir a população celular mais representativa das células osteoblásticas *in vivo*. Assim, com o objectivo de melhor caracterizar a primeira subcultura, estudou-se o efeito isolado de várias concentrações de AA e β-GF e, ainda, o efeito de diferentes combinações do AA, β-GF e Dex no comportamento de proliferação celular e diferenciação osteoblástica das células em cultura.

4.1. ÁCIDO ASCÓRBICO

O ácido ascórbico (AA, vitamina C) é um redutor potente que toma parte nos sistemas intracelulares de oxidação-redução e desempenha funções fisiológicas importantes [187-190]. Uma destas funções está relacionada com a síntese do colagénio, proteoglicanos e outros constituintes orgânicos da matriz intercelular em diversos tecidos, como o osso e os dentes [188]. O AA funciona como um cofactor em diversas reacções de hidroxilação e, dessa maneira, é necessário ou facilita a conversão de certos resíduos de lisina e prolina do pró-colagénio em

hidroxilisina e hidroxiprolina durante a síntese do colagénio, promovendo a formação da cadeia tripla que se deposita sob a forma de feixes com estriações características [188,189].

Existem vários estudos [35,72,75,147,174,190] que mostram que a presença de AA no meio de cultura favorece a síntese de colagénio e que a quantidade produzida é dependente da dose adicionada; os resultados destes estudos sugerem também que o aumento da deposição extracelular da matriz está associado com uma actividade de FA elevada e com uma maior capacidade de mineralização da matriz. Nestes estudos, a quantidade de AA adicionado ao meio de cultura é da ordem de 50 a 200 μg/mL. Na ausência de AA a matriz é drasticamente reduzida e constituída predominantemente por uma rede de fibrilas finas e desorganizadas [189].

Com base nestes dados procurou-se caracterizar o efeito do AA nas culturas de osso alveolar humano, em diferentes concentrações (25, 50 e 100 μg/mL), numa tentativa de avaliar o seu papel no crescimento e diferenciação celular.

4.1.1. MATERIAIS E MÉTODOS

As células da 1ª subcultura foram cultivadas durante 42 dias em α-MEM contendo 10% de soro bovino fetal, 0,25 mg/mL de anfotericina B e 10 mg/mL de gentamicina - meio base (situação controlo) - e, ainda, em meio base suplementado com 3 diferentes concentrações de AA: 25, 50 e 100 μg/mL.

As células foram caracterizadas bioquimicamente para avaliação da proliferação celular (ensaio do MTT, conteúdo em proteína total e ADN) e actividade da FA (aos 4, 7, 14, 18, 21, 28, 35 e 42 dias de cultura) e histoquimicamente para identificação da presença de FA e de depósitos minerais (aos 14, 18, 21, 28, 35 e 42 dias de cultura). Foram, ainda, determinados os conteúdos em Cai e em Pi dos meios de cultura recolhidos ao longo dos 42 dias de incubação. O tempo de incubação foi prolongado até aos 42 dias de cultura, pois os resultados do ensaio anterior (ponto 3.3.3) sugeriram que a ausência de Dex no meio de cultura atrasava o início do processo de mineralização da matriz.

4.1.2. RESULTADOS

PROLIFERAÇÃO CELULAR

As células em cultura, mantidas quer na ausência (situação controlo) quer na presença de AA, cresceram gradualmente dando origem a multicamadas de células, não sendo observada a existência de estruturas nodulares. Na Fig. 3.20 apresentam-se os resultados relativos ao ensaio do MTT (A), conteúdos em proteína total (B) e ADN (C).

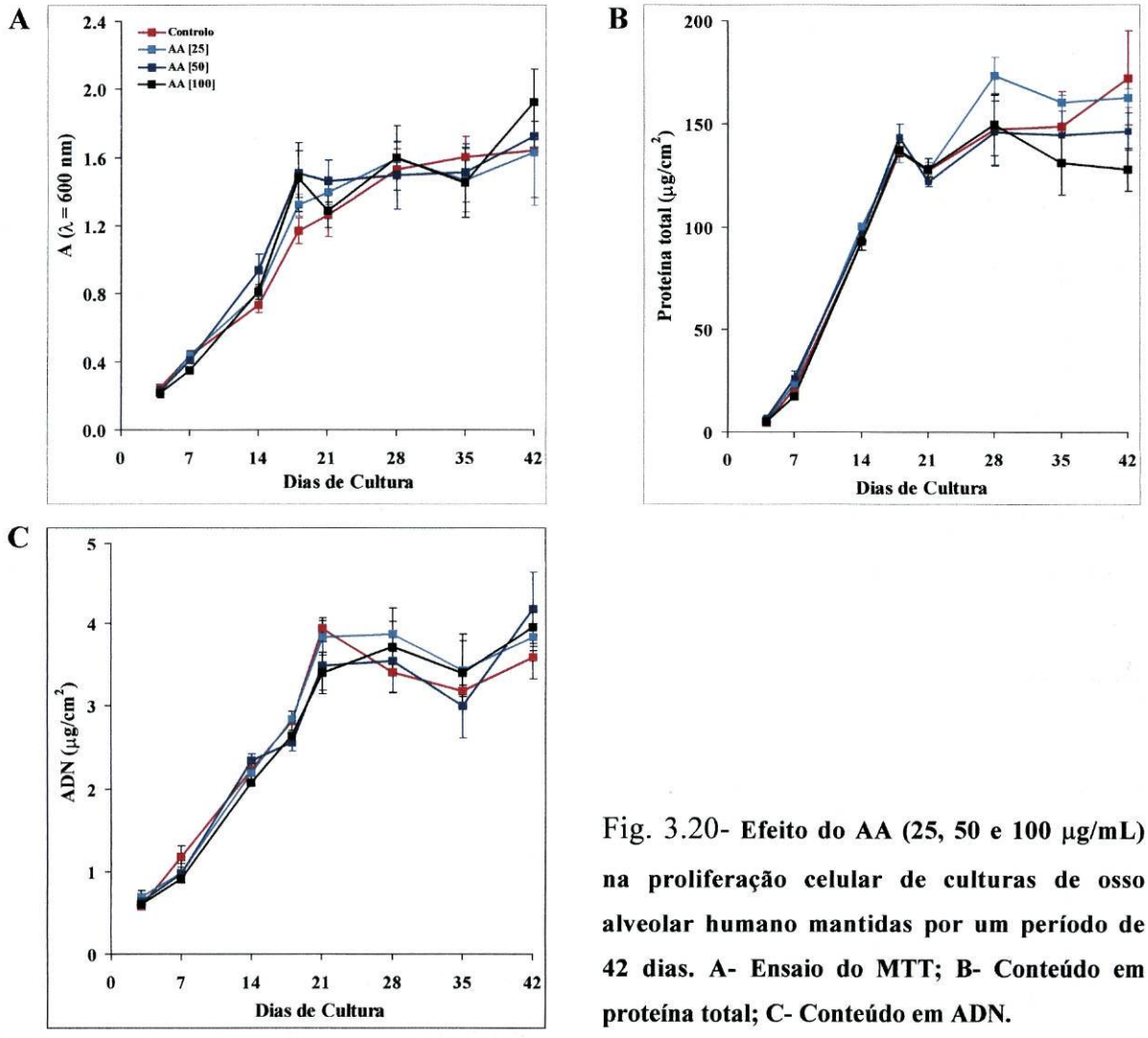


Fig. 3.20- **Efeito do AA (25, 50 e 100 μg/mL) na proliferação celular de culturas de osso alveolar humano mantidas por um período de 42 dias. A- Ensaio do MTT; B- Conteúdo em proteína total; C- Conteúdo em ADN.**

O ensaio do MTT permitiu verificar que na situação controlo (ausência de AA) as células proliferaram gradualmente até ao 21° dia, atingindo depois uma fase estacionária que se prolongou até ao fim do período de incubação. Este padrão foi semelhante em todas as situações experimentais, efectuadas na presença do AA, não se verificando diferenças

significativas na proliferação/viabilidade celular. A determinação do conteúdo em proteína total e em ADN forneceu o mesmo tipo de informação.

ACTIVIDADE DE FOSFATASE ALCALINA

A actividade da FA determinada nas culturas celulares efectuadas nas quatro situações experimentais aumentou entre o 7º e o 21º dias e, depois, atingiu uma fase estacionária que se manteve até ao final do tempo de cultura; não foram observadas diferenças significativas entre os diversos grupos (Fig. 3.21).

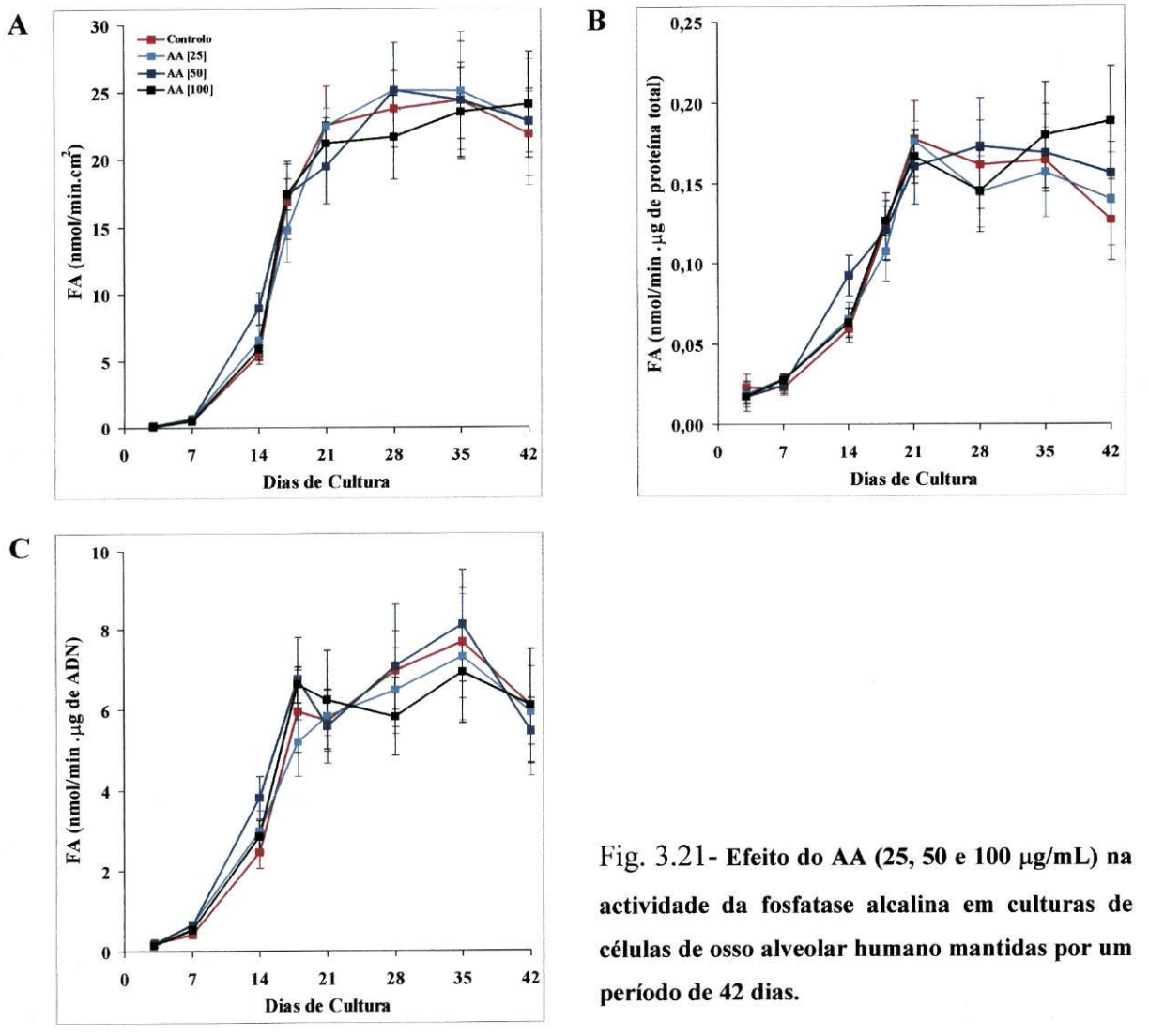


Fig. 3.21- **Efeito do AA (25, 50 e 100 µg/mL) na actividade da fosfatase alcalina em culturas de células de osso alveolar humano mantidas por um período de 42 dias.**

IDENTIFICAÇÃO HISTOQUÍMICA DE FA E DE DEPÓSITOS DE FOSFATO DE CÁLCIO

Os resultados obtidos para a identificação de FA nas várias culturas mostraram um aumento gradual da intensidade da coloração ao longo do período de incubação, não se observando diferenças significativas entre as várias situações experimentais (Fig. 3.22).

As reacções histoquímicas para localização dos depósitos de cálcio e de fosfatos foram sempre negativas, indicando ausência de mineralização (Fig. 3.22).

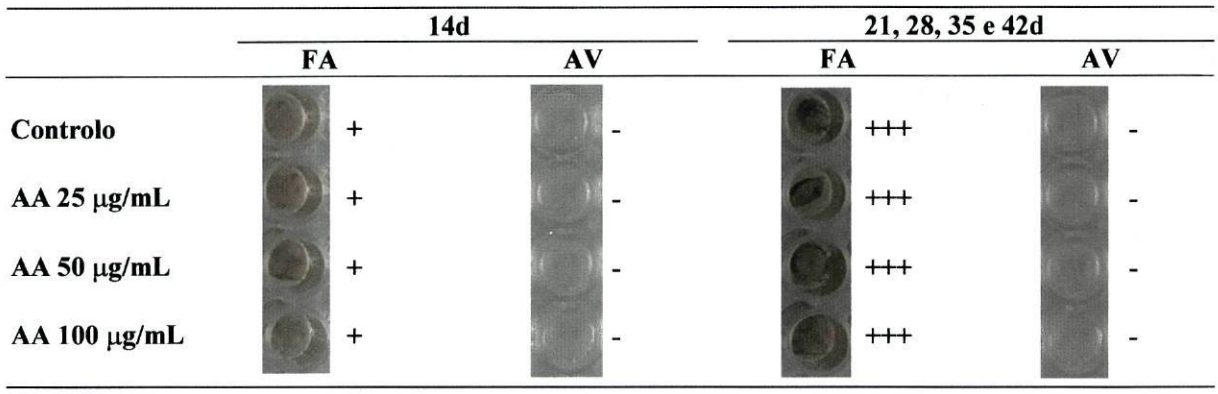


Fig. 3.22- **Efeito do AA (25, 50 e 100 μg/mL) no aspecto macroscópico de culturas de osso alveolar humano coradas histoquimicamente para visualização da FA e de depósitos de cálcio (alizarina vermelha; AV) aos 14 e 21-42 dias de cultura. A intensidade da coloração foi classificada da seguinte maneira: -, negativa; +, positiva; +++, positiva intensa.**

CONTEÚDO EM Pi E Cai NO MEIO DE CULTURA

Os níveis de Pi e de Cai nos meios de cultura incubados na ausência de células mantiveram-se constantes ao longo de todo o período de incubação, indicando ausência de deposição mineral nas condições experimentais em que o ensaio foi realizado (Fig. 3.23 AI e BI). Idênticos valores foram encontrados para os teores de Pi e Cai nos meios de cultura recolhidos das culturas celulares sugerindo ausência de formação de depósitos de fosfato de cálcio (Fig. 3.23 AII e BII).

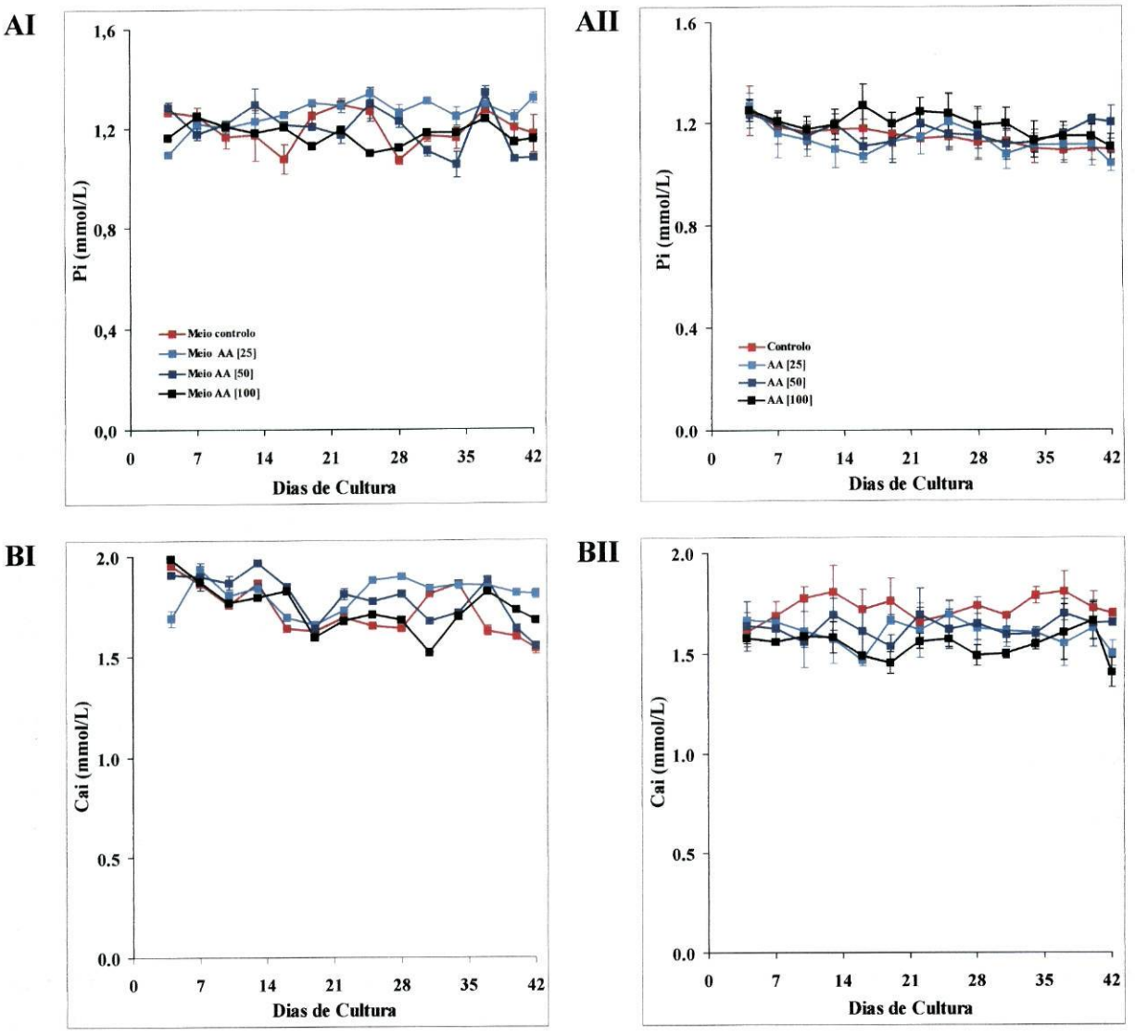


Fig. 3.23- **Efeito do AA (25, 50 e 100 μg/mL) no conteúdo em Pi (A) e em Cai (B) nos meios de cultura incubados na ausência (I) e na presença (II) de células de osso alveolar humano durante um período de 42 dias.**

4.1.3. CONCLUSÃO

Esta experiência permitiu concluir que as culturas celulares de osso alveolar humano efectuadas na presença de AA, mas na ausência de β-GF e Dex, não apresentam capacidade de formação de uma matriz extracelular mineralizada. Os resultados obtidos mostram também que a presença de AA nas concentrações utilizadas parece não afectar a proliferação celular e a actividade de FA destas culturas.

4.2. β-GLICEROFOSFATO DE SÓDIO

Estudos realizados por diversos grupos de investigadores sugerem que a deposição mineral observada *in vitro* depende de dois factores: da densidade celular e formação de nódulos tridimensionais e da presença de uma fonte de fosfato, como o β-GF [155,157-159,186,189,191-193].

De acordo com a literatura, o mecanismo pelo qual o β-GF induz a mineralização está relacionado com a elevada actividade da FA apresentada pelas culturas de células ósseas [155,157-159,191]. A função da FA, de acordo com este modelo, consiste na hidrólise do fosfato orgânico, aumentando a concentração local de Pi e desenvolvendo o potencial químico para a deposição mineral. Em concordância com esta observação, os resultados apresentados no ponto 3.3. mostraram que o β-GF é quase completamente degradado a fosfato inorgânico durante as duas ou três primeiras semanas de cultura (resultando Pi na concentração de 9-10 mM), isto é, durante a fase de proliferação activa das células e produção da matriz extracelular [194]. Assim, uma concentração elevada de Pi parece constituir um pré-requisito para iniciar o processo de mineralização [155,156,194].

O objectivo deste trabalho foi caracterizar o efeito do β-GF no comportamento osteoblástico de culturas de osso alveolar humano efectuadas apenas na presença deste suplemento em diferentes concentrações.

4.2.1. MATERIAIS E MÉTODOS

As células da 1ª subcultura foram cultivadas durante 42 dias em α-MEM contendo 10% de soro bovino fetal, 0,25 mg/mL de anfotericina B e 10 mg/mL de gentamicina -meio base (situação controlo). As células foram, igualmente, cultivadas em meio base suplementado com 3 diferentes concentrações de β-GF: 2,5, 5 e 10 mM.

As culturas foram caracterizadas bioquimicamente (aos 4, 7, 14, 18, 21, 28, 35 e 42 dias de cultura) e histoquimicamente (aos 14, 18, 21, 28, 35 e 42 dias de cultura), para avaliação da proliferação celular, actividade de FA e capacidade de formação de áreas mineralizadas.

4.2.2. RESULTADOS

PROLIFERAÇÃO CELULAR

As células em cultura, tanto na ausência como na presença de β-GF, proliferaram gradualmente ao longo do tempo de incubação dando origem a estruturas nodulares de baixa intensidade.

O ensaio do MTT mostrou que nas culturas controlo a proliferação celular se manteve estável durante a primeira semana de incubação, sugerindo uma fase de adaptação das células às condições de cultura. A partir desta fase as células proliferaram gradualmente do 7º ao 28º dias (fase de crescimento exponencial), atingindo depois uma fase estacionária (Fig. 3.24 A).

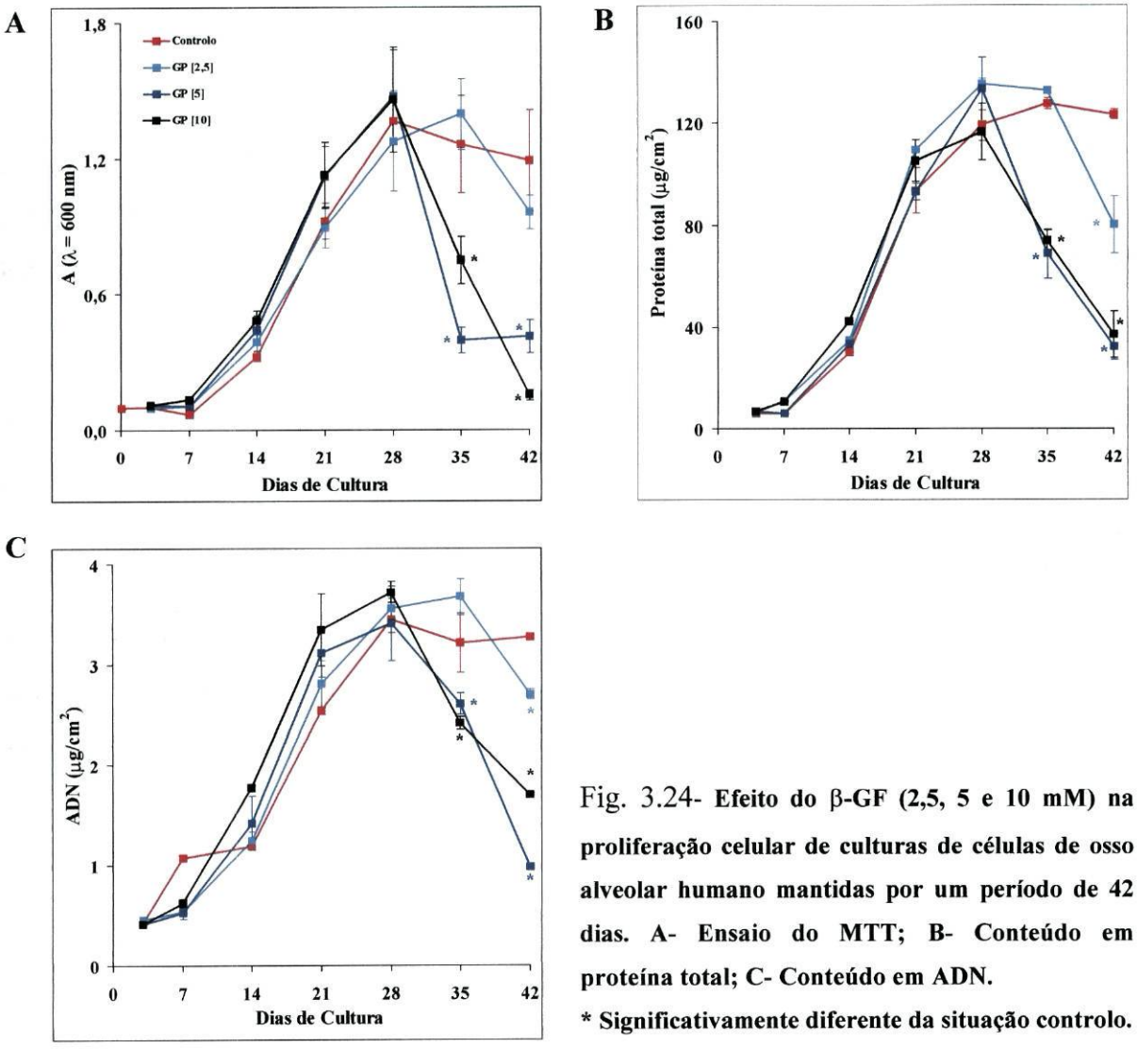


Fig. 3.24- **Efeito do β-GF (2,5, 5 e 10 mM) na proliferação celular de culturas de células de osso alveolar humano mantidas por um período de 42 dias. A- Ensaio do MTT; B- Conteúdo em proteína total; C- Conteúdo em ADN.**

*** Significativamente diferente da situação controlo.**

Nas culturas efectuadas na presença de β-GF a proliferação celular seguiu um padrão semelhante ao observado na situação controlo até ao 28° dia de cultura. Na presença de β-GF a 2,5 mM a fase proliferativa foi observada até aos 28°-35° dias, seguindo-se uma diminuição dos valores observados para a redução do MTT até ao fim do período de incubação. Nas restantes situações experimentais observou-se uma diminuição muito acentuada do crescimento celular a partir do 28° dia sugerindo uma degradação intensa da cultura. Estas culturas (efectuadas na presença de 5 e 10 mM de β-GF) apresentaram diferenças estatisticamente significativas nos valores de redução do MTT aos 35 e 42 dias de cultura relativamente à situação controlo (Fig. 3.24 A).

A variação do conteúdo em proteína total e em ADN seguiu um padrão semelhante ao observado para a redução do MTT (Fig. 3.24 B e C).

ACTIVIDADE DE FOSFATASE ALCALINA

Nas culturas controlo observou-se um aumento muito acentuado da actividade da FA entre os 7° e 28° dias, após uma fase de actividade muito baixa e estável na primeira semana. Durante a quinta e sexta semanas de cultura a actividade da enzima manteve-se relativamente estável (Fig. 3.25).

As culturas efectuadas na presença de β-GF a 2,5 mM apresentaram até ao 35° dia uma actividade de FA semelhante à observada na situação controlo; no entanto, durante a última semana observou-se uma descida muito acentuada dos níveis da enzima (Fig. 3.25).

Nas culturas efectuadas na presença de β-GF a 5 e a 10 mM verificou-se um aumento muito significativo da actividade da FA até ao 28° dia, seguido de uma diminuição muito acentuada até ao fim do período de incubação (Fig. 3.25). Nos 35° e 42° dias, os níveis da enzima foram significativamente inferiores aos observados nas culturas controlo.

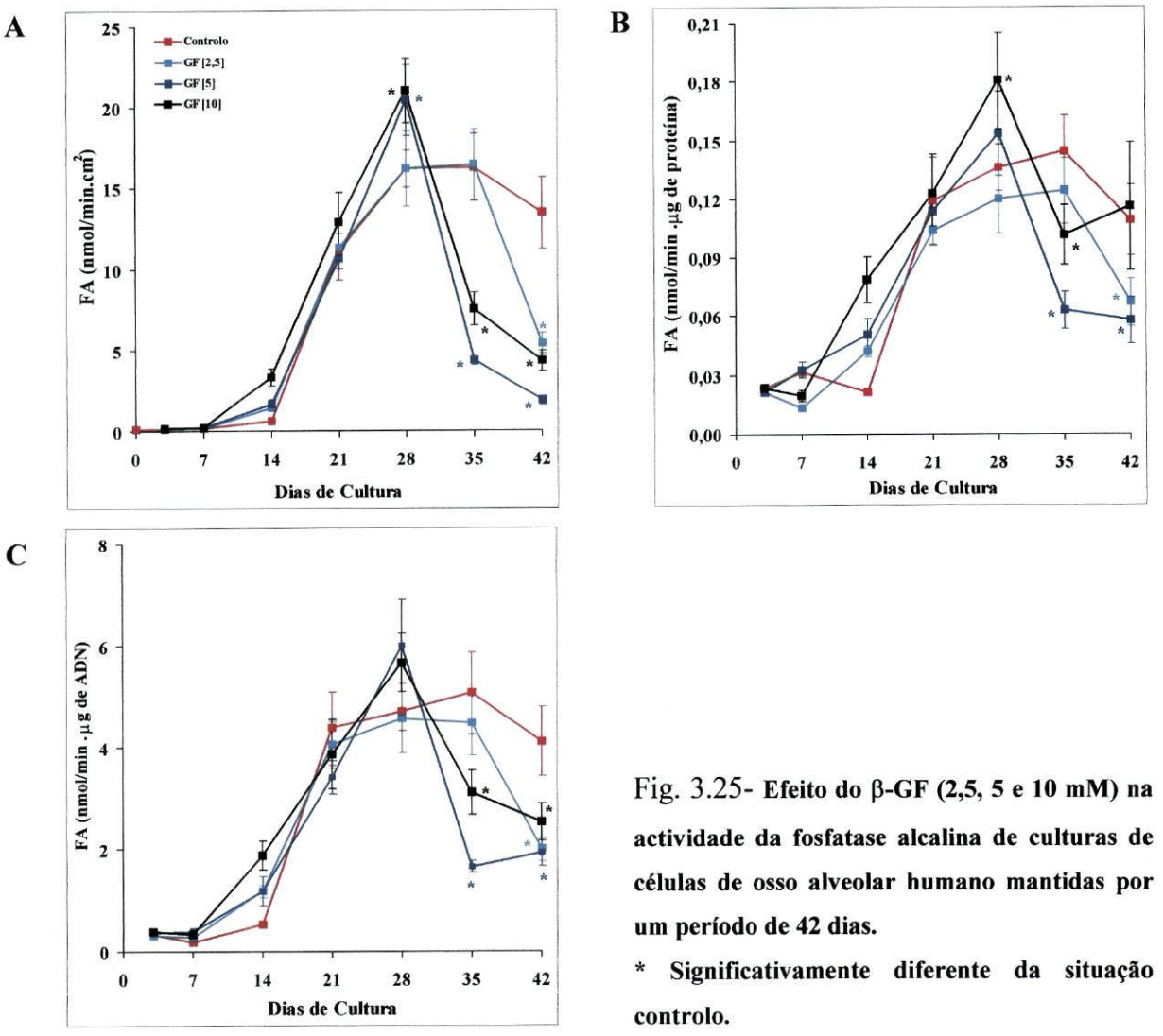


Fig. 3.25- **Efeito do β-GF (2,5, 5 e 10 mM) na actividade da fosfatase alcalina de culturas de células de osso alveolar humano mantidas por um período de 42 dias.**

*** Significativamente diferente da situação controlo.**

IDENTIFICAÇÃO HISTOQUÍMICA DE FA E DE DEPÓSITOS DE FOSFATO DE CÁLCIO

As culturas apresentaram reacções histoquímicas positivas para a FA ao longo de todo o tempo de incubação. Nas culturas controlo e nas culturas efectuadas na presença de β-GF a 2,5 mM verificou-se um aumento gradual da intensidade de coloração até próximo do 35º dia, enquanto que nas restantes situações esse efeito foi observado até próximo do 28º dia, seguindo-se uma diminuição da intensidade das reacções. Aos 21 dias de cultura observou-se que a intensidade da reacção de coloração foi semelhante nas culturas controlo e nas culturas efectuadas na presença de β-GF a 2,5 e 5 mM; as culturas efectuadas na presença de β-GF 10 mM apresentaram maior intensidade de coloração. Aos 28 dias de cultura a intensidade da reacção foi idêntica nas quatro situações experimentais, mas no 35º dia foi notória a diferença de intensidade de coloração entre as duas primeiras situações (culturas controlo e tratadas com

2,5 mM de β-GF, reacções fortemente positivas) e as restantes (culturas tratadas com 5 e 10 mM de β-GF, reacções positivas), indicando que as culturas efectuadas nestas condições já se encontravam em fase de degeneração (Fig. 3.26).

As reacções histoquímicas para a localização dos depósitos de fosfato e de cálcio foram negativas nas culturas controlo ao longo dos 42 dias de incubação, indicando ausência de mineralização (Fig. 3.26). As culturas efectuadas na presença de β-GF apresentaram reacções positivas aproximadamente a partir do 35° dia. A intensidade de coloração aumentou com o tempo de incubação (coloração mais intensa no 42° dia) e com a quantidade de β-GF adicionado ao meio.

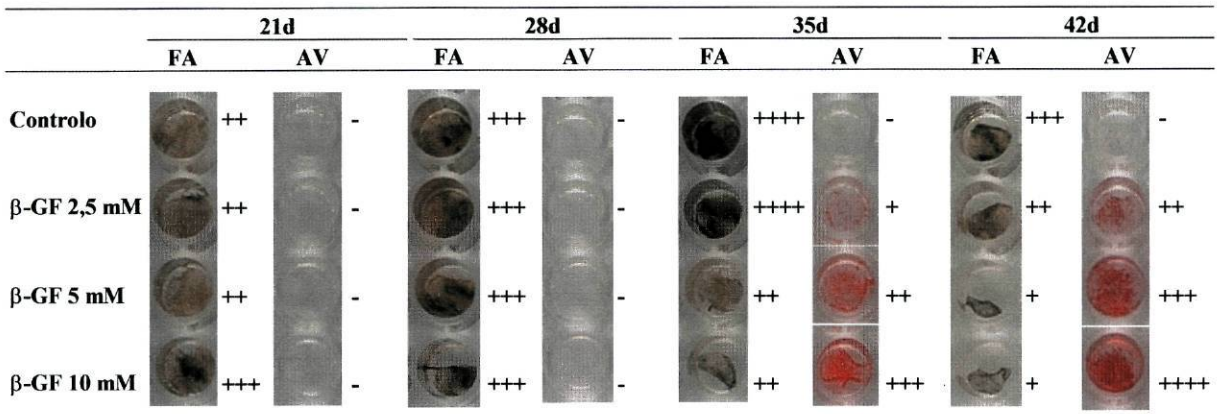


Fig. 3.26- **Efeito do β-GF (2,5, 5 e 10 mM) no aspecto macroscópico de culturas de osso alveolar humano, coradas histoquimicamente para visualização da FA e dos depósitos de fosfato de cálcio (AV) aos 21, 28, 35 e 42 dias de cultura. A intensidade de coloração foi classificada da seguinte maneira: -, negativa; +, positiva de fraca intensidade; ++, moderadamente positiva; +++, positiva pouco intensa; ++++, positiva intensa.**

CONTEÚDO EM Pi E Cai NO MEIO DE CULTURA

A determinação da concentração de Pi e Cai no meio de cultura incubado na ausência de células (meio controlo) revelou uma constância dos valores ao longo do tempo de incubação, indicando que não se verificou deposição de fosfato de cálcio (Fig. 3.27 AI e BI). A determinação destes iões no meio recolhido das culturas controlo mostrou o mesmo tipo de comportamento (Fig. 3.27 AII e BII).

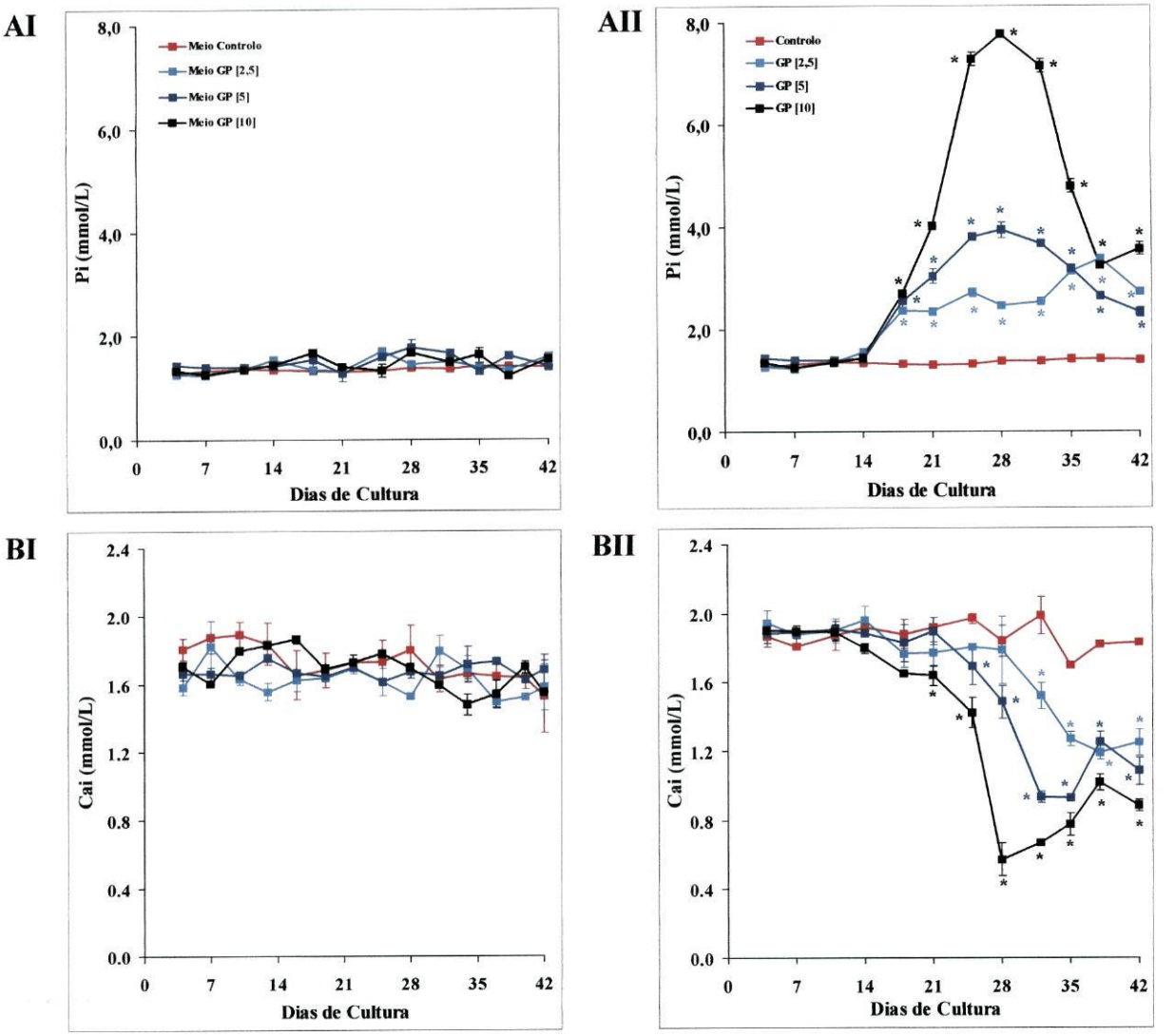


Fig. 3.27- **Efeito do β-GF (2,5, 5 e 10 mM) no conteúdo em Pi (A) e em Cai (B) dos meios de cultura incubados na ausência (I) e na presença (II) de células de osso alveolar humano durante um período de 42 dias. * Significativamente diferente da situação controlo.**

Nas culturas efectuadas na presença de β-GF verificou-se que a concentração do Pi no meio começou a aumentar aproximadamente a partir do 14° dia, atingindo um valor máximo próximo dos 25°-28° dias nas culturas tratadas com β-GF a 5 e 10 mM, e do 35° dia nas culturas tratadas com β-GF a 2,5 mM, fases em que se observaram os níveis mais altos de FA nas respectivas culturas. A partir dos dias referidos observou-se uma diminuição dos teores em Pi. O valor máximo atingido na presença de β-GF a 10 mM foi aproximadamente o dobro e o triplo do valor encontrado na presença de β-GF a 5 e a 2,5 mM respectivamente, aspecto que está relacionado com a quantidade de β-GF adicionada pois que a actividade máxima de FA foi semelhante nas várias culturas (Fig. 3.27 AII).

Relativamente aos níveis de Cai, observou-se uma diminuição gradual a partir aproximadamente do 21° dia nas culturas tratadas com β-GF a 5 e 10 mM e do 28° dia nas culturas tratadas com β-GF a 2,5 mM. Verificou-se, igualmente, que quanto mais elevada a concentração de β-GF adicionada ao meio maior era o consumo de Cai, sugerindo uma mineralização progressivamente mais intensa das culturas (Fig. 3.27 BII).

4.2.3. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados mostram que a presença do β-GF nas culturas celulares de osso alveolar permite a formação de uma matriz extracelular mineralizada. Este composto é uma fonte potencial de iões fosfato necessários para a deposição de fosfato de cálcio na matriz.

4.3. COMBINAÇÕES DE ÁCIDO ASCÓRBICO, β-GLICERO-FOSFATO DE SÓDIO E DEXAMETASONA

Do trabalho realizado, observou-se a necessidade de adição de β-GF ao meio de base para que as culturas expressassem uma das principais características do fenótipo osteoblástico, ou seja, a sua capacidade para formar áreas mineralizadas. No entanto, verificou-se também que as culturas nem sempre mineralizavam na ausência da Dex. Esta etapa do trabalho teve como objectivo caracterizar o efeito de diferentes combinações dos três suplementos (AA, β-GF e Dex), habitualmente adicionados ao meio de cultura base.

4.3.1. MATERIAIS E MÉTODOS

As células da 1ª subcultura foram cultivadas nas seguintes condições experimentais: (1) meio base; (2) meio base + AA (50 μg/ml); (3) meio base + β-GF (10 mM); (4) meio base + AA + β-GF; (5) meio base + Dex (10 nM); (6) meio base + Dex + AA; (7) meio base + Dex + β-GF; e (8) meio base + Dex + AA + β-GF. Algumas destas situações experimentais foram já

estudadas anteriormente, mas são agora repetidas para permitir uma melhor visão de conjunto do efeito do AA, β-GF e Dex.

As culturas foram mantidas por períodos de 42 dias e caracterizadas bioquimicamente (aos 4, 7, 14, 18, 21, 28, 35 e 42 dias de cultura) e histoquimicamente (aos 14, 18, 21, 28, 35 e 42 dias de cultura), utilizando a metodologia referida no subcapítulo 3.3.

4.3.2. RESULTADOS

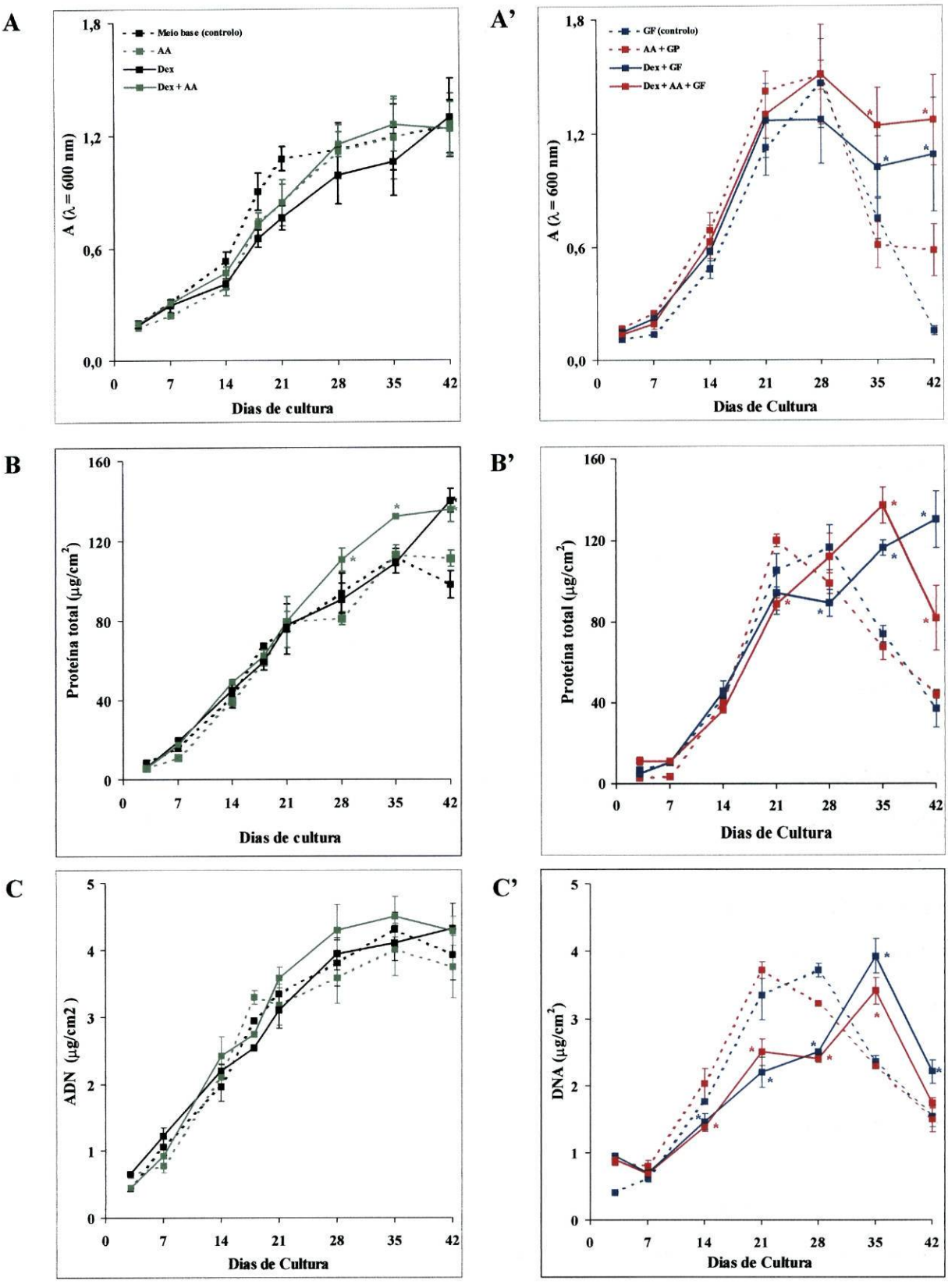
Devido ao elevado número de situações experimentais, separaram-se os resultados relativos às culturas efectuadas na ausência de β-GF (culturas que não apresentam capacidade de mineralização) dos observados nas culturas efectuadas na presença de β-GF (culturas com capacidade de mineralização). Esta apresentação dos resultados permite uma mais fácil avaliação do efeito isolado e combinado dos três suplementos na expressão dos parâmetros estudados.

Nas culturas efectuadas na ausência de β-GF verificou-se que as células cresceram gradualmente originando multicamadas celulares, enquanto que nas culturas efectuadas na presença deste suplemento as células cresceram originando estruturas nodulares que foram aumentando de tamanho com o tempo de incubação. No 18° dia de incubação já era visível a presença de nódulos nas culturas tratadas com Dex; no entanto, na ausência do glucocorticóide estes só foram observados para tempos mais prolongados de incubação.

PROLIFERAÇÃO CELULAR

O ensaio do MTT mostrou que nas culturas efectuadas em meio base e na ausência de β-GF as células proliferaram gradualmente a partir do 3° dia de incubação, atingindo uma fase estacionária a partir do 28° dia (Fig. 3.28 A).

Nas culturas efectuadas na presença do β-GF (Fig. 3.28 A') verificou-se um aumento gradual da proliferação celular entre o 3° e 21°-28° dias de cultura, seguido de uma diminuição deste parâmetro.



3.28- **Efeito isolado e combinado do AA, β-GF e Dex na redução do MTT (A e A') e no conteúdo em proteína total (B e B') e ADN (C e C') de culturas de células de osso alveolar humano mantidas por um período de 42 dias. * Significativamente diferente da situação controlo: A, B e C- culturas efectuadas na ausência de suplementos; A', B' e C'- culturas efectuadas na presença de β-GF.**

Os conteúdos em proteína total e em ADN determinados nas culturas efectuadas na ausência de β-GF (Fig. 3.28 B e C) e nas efectuadas na presença de β-GF mas na ausência de Dex (Fig. 3.28 B' e C') seguiram um padrão semelhante ao observado no ensaio do MTT. Nas culturas efectuadas na presença da Dex (Dex + β-GF ; Dex + AA + β-GF) observou-se que os conteúdos em proteína total e ADN aumentaram até ao 35° dia de cultura (Fig. 3.28 B' e C').

ACTIVIDADE DE FOSFATASE ALCALINA

No que diz respeito às culturas efectuadas na ausência de β-GF, verificou-se que as culturas controlo e as efectuadas na presença de AA apresentaram uma actividade da FA que aumentou gradualmente ao longo do tempo de incubação (Fig. 3.29 A-C). Nas culturas tratadas com Dex e Dex + AA a actividade da FA aumentou gradualmente até ao 18°-21° dia, depois, desceu ligeiramente e a partir do 28° dia manteve-se estável até ao final do período de incubação (Fig. 3.29 B-C). Os resultados obtidos nestas culturas mostraram que a presença de Dex resultou num aumento da actividade de FA durante a terceira semana de cultura.

Nas culturas efectuadas na presença de β-GF, a actividade da FA aumentou gradual e moderadamente até ao 14° dia e, depois, acentuadamente até ao 21° dia de cultura. Posteriormente, a actividade da FA diminuiu rapidamente até ao fim do tempo de incubação (Fig. 3.29 A'). De salientar que nas culturas tratadas com Dex os níveis da FA no 21° dia foram significativamente superiores aos apresentados pelas restantes culturas efectuadas na ausência de Dex (Fig. 3.29 B' e C').

Quando os valores de actividade de FA são expressos em nmol/min.cm^2 não se observa uma diferença na actividade de FA entre as culturas tratadas com Dex e as efectuadas na ausência do glucocorticóide. Isto deve-se ao facto de os teores em proteína total e em ADN no 21° dia serem mais elevados nas culturas efectuadas na ausência de Dex. Assim, quando se determinaram as actividades enzimáticas em função dos conteúdos em proteína total ou ADN, o que nos dá informação sobre a quantidade de enzima por célula, verifica-se que nesse dia a actividade da enzima foi sempre mais elevada nas culturas tratadas com Dex (Fig. 3.29 B' e C').

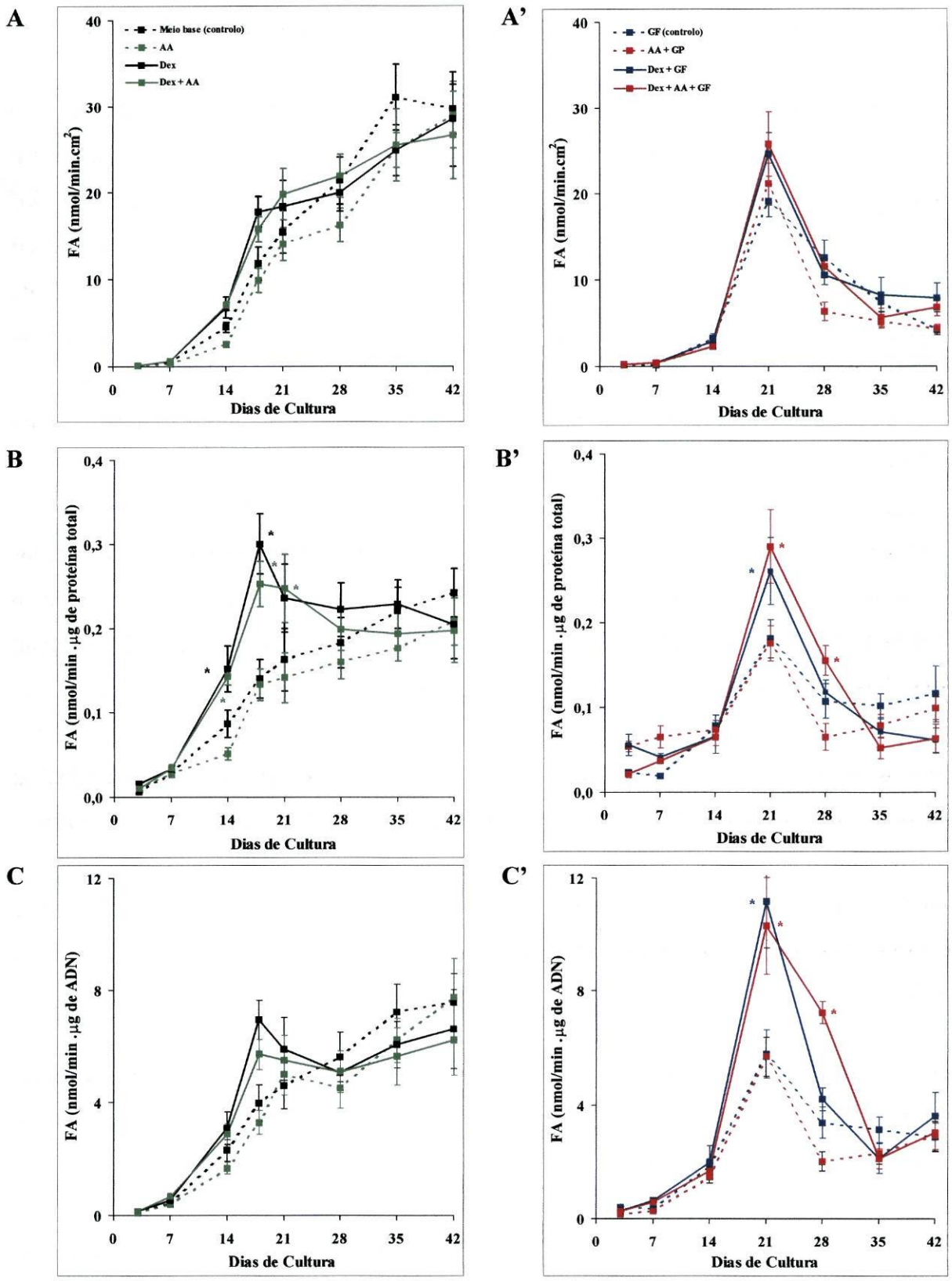


Fig. 3.29- **Efeito isolado e combinado do AA, β-GF e Dex na actividade da FA de culturas de células de osso alveolar humano mantidas por um período de 42 dias. * Significativamente diferente da situação controlo: A, B e C- culturas efectuadas na ausência de suplementos; A', B' e C'- culturas efectuadas na presença de β-GF.**

IDENTIFICAÇÃO HISTOQUÍMICA DE FA E DE DEPÓSITOS DE FOSFATO DE CÁLCIO

Todas as culturas apresentaram reacções histoquímicas positivas para a FA tendo-se verificado que a sua intensidade foi aumentando ao longo do tempo de incubação. No 14° dia a intensidade desta reacção foi idêntica em todas as situações experimentais, mas no 21° dia as culturas efectuadas na presença de Dex apresentaram reacções ligeiramente mais intensas. Entre o 21° e o 35° dias de incubação verificou-se que estas reacções foram progressivamente mais intensas nas culturas tratadas com Dex e Dex + AA; a coloração histoquímica estava principalmente associada com as estruturas nodulares presentes nestas culturas. Nas restantes culturas a intensidade de coloração para a FA manteve-se ou começou a diminuir (Fig. 3.30).

As reacções histoquímicas que permitem a localização dos depósitos de cálcio e de fosfatos foram negativas nas situações efectuadas na ausência de β-GF, independentemente do tempo de incubação das culturas. Na presença de β-GF, as reacções da alizarina vermelha e de von Kossa foram negativas aos 21 dias de culturas, mas positivas a partir do 28° dia; estas reacções foram aumentando de intensidade até ao final do período de incubação, revelando a presença de depósitos de cálcio e de fosfatos. De salientar que nas culturas efectuadas na ausência de Dex as reacções apresentaram uma intensidade de coloração menor (Fig. 3.30).

CONTEÚDO EM Pi E Cai NO MEIO DE CULTURA

A determinação destes iões nos meios de cultura correspondentes às várias situações experimentais e incubados na ausência de células revelaram uma constância dos valores ao longo do tempo de incubação à semelhança do observado nos estudos anteriormente descritos (Fig. 3.31 AI e BI).

Também os teores em Pi e Cai determinados nos meios recolhidos das culturas efectuadas na ausência de β-GF se mantiveram estáveis ao longo de todo o tempo de cultura (Fig. 3.31 AII e BII).

Nas culturas efectuadas na presença de β-GF, nomeadamente, β-GF, AA + β-GF, Dex + β-GF e Dex + AA + β-GF, verificou-se que os níveis de Pi começaram a aumentar entre o 7° e o 14° dia

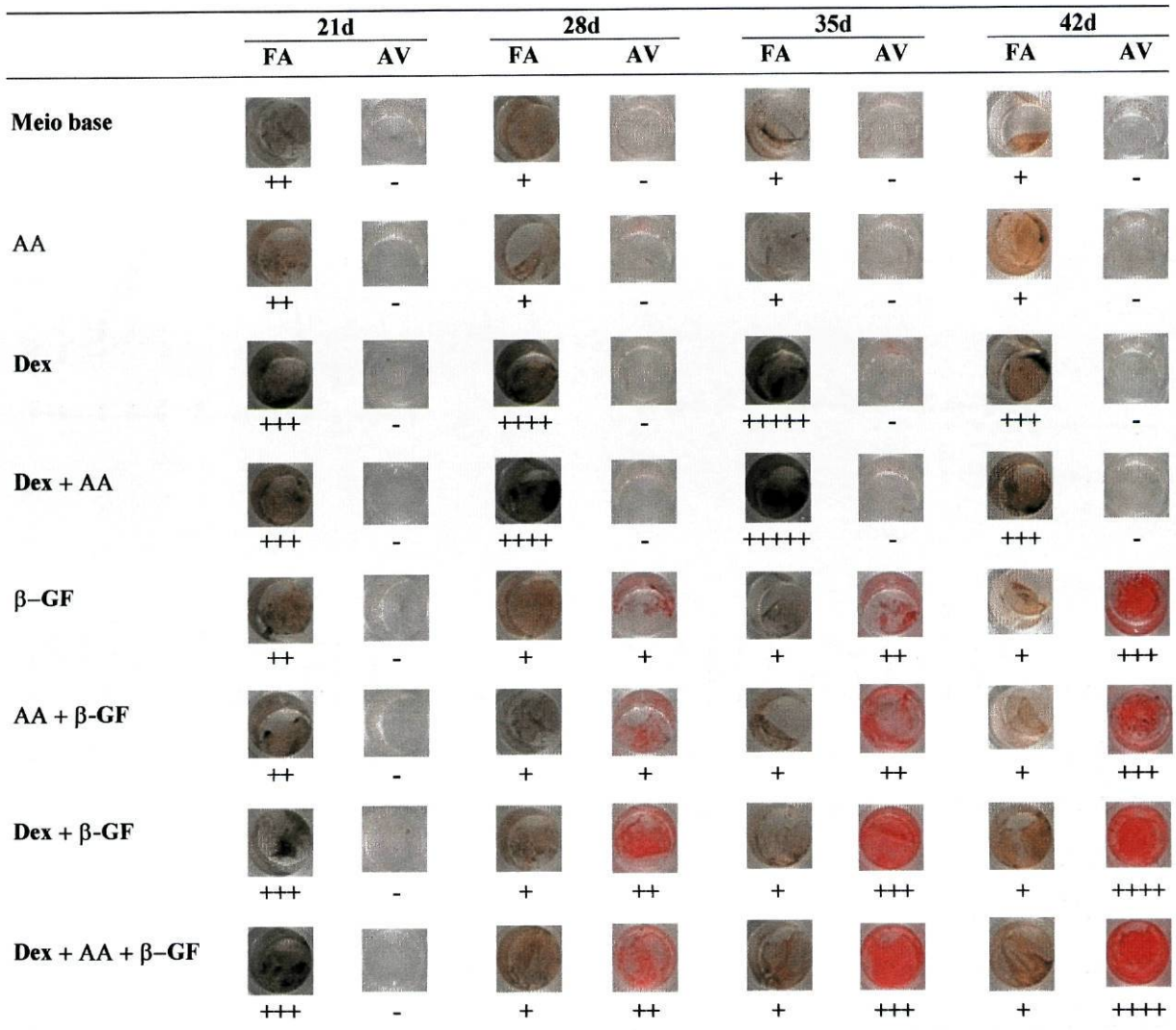


Fig. 3.30- **Efeito isolado e combinado do AA, β-GF e Dex no aspecto macroscópico de culturas de osso alveolar humano aos 21, 28, 35 e 42 dias de incubação, coradas histoquimicamente para visualização da FA e dos depósitos de cálcio (reacção da alizarina vermelha; AV) e de fosfatos (reacção de von Kossa; VK). A intensidade da coloração foi classificada da seguinte maneira: -, negativa; +, positiva de fraca intensidade; ++, moderadamente positiva; +++, positiva pouco intensa; ++++, positiva intensa; +++++, positiva muito intensa.**

e atingiram valores máximos próximo do 21°-25° dias, começando então a diminuir. Por outro lado, observou-se uma diminuição gradual dos níveis de Cai a partir do 18°-21° dia, atingindo-se valores mínimos próximo do dia 28. No entanto, verificou-se que nas culturas efectuadas na ausência de Dex (β-GF e β-GF + AA), os níveis de Pi e Cai começaram a diminuir ligeiramente mais tarde do que nas tratadas com o glucocorticóide; também, os valores mínimos observados foram mais elevados. Estes resultados sugerem que na presença de Dex a mineralização ocorreu mais precocemente e com maior intensidade (Fig. 3.31 AII e BII).

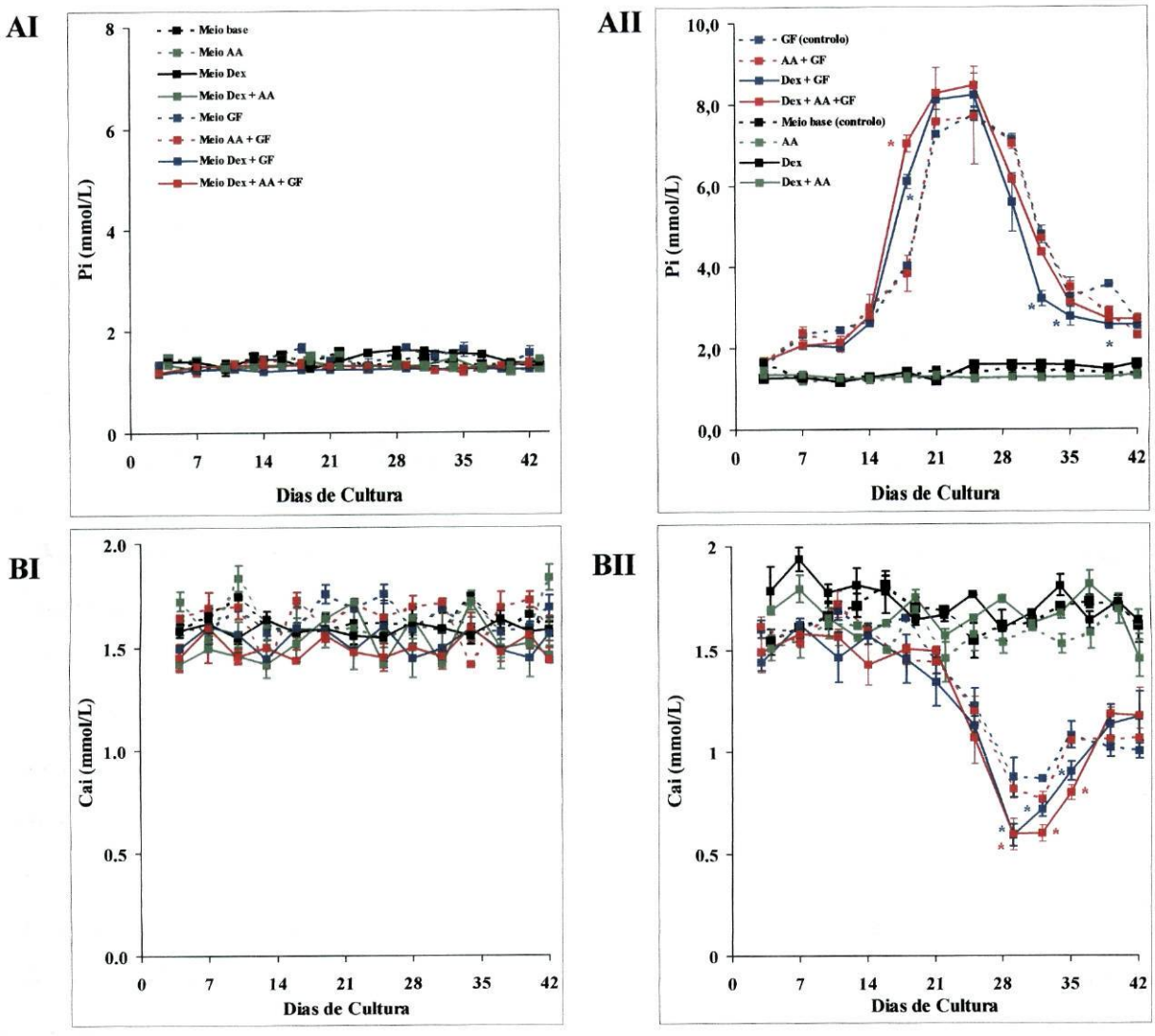


Fig. 3.31- **Efeito isolado e combinado do AA, β-GF e Dex no conteúdo em Pi (A) e em Cai (B) dos meios de cultura incubados na ausência (I) e na presença (II) de células de osso alveolar humano durante um período de 42 dias. * Significativamente diferente da situação controlo: culturas efectuadas na ausência de suplementos (para as culturas AA, Dex e AA + Dex) e culturas efectuadas na presença de β-GF (para as culturas AA + β-GF, Dex + β-GF e Dex + AA + β-GF).**

4.3.3. CONCLUSÃO

Em todas as situações experimentais testadas observou-se que as culturas apresentaram níveis elevados de FA; contudo, apenas as que foram efectuadas na presença de uma fonte de iões fosfato apresentaram capacidade de mineralização da matriz extracelular. A presença adicional de Dex resultou numa indução significativa de dois marcadores osteoblásticos, nomeadamente num aumento da actividade da FA e da capacidade de mineralização.

5. DISCUSSÃO GERAL DO CAPÍTULO

A expressão do fenótipo osteoblástico em cultura depende da composição do meio de cultura, nomeadamente da presença de substâncias que influenciam a proliferação e a diferenciação celular, e do tempo de cultura [12-17]. Neste capítulo, foram estudadas diferentes condições de cultura com o objectivo de optimizar as mais apropriadas para a obtenção da expressão completa do fenótipo osteoblástico em culturas de células ósseas provenientes do osso alveolar humano.

O desenvolvimento do fenótipo osteoblástico, de acordo com vários estudos descritos na literatura, parece compreender três fases, nomeadamente: um período de proliferação celular activa que é acompanhado pela produção da matriz extracelular orgânica; maturação e organização da matriz extracelular (fase em que já não se observa proliferação celular); e mineralização da matriz extracelular [35,71-76,175]. Neste modelo verifica-se uma relação estreita e recíproca entre a proliferação e a diferenciação celular. Assim, na fase inicial das culturas a população celular é muito proliferativa e pouco diferenciada enquanto que na fase final (quando se inicia a mineralização da matriz) está muito diferenciada mas já não tem capacidade proliferativa [72,74,75,175]. A avaliação da relação proliferação-diferenciação celular durante o desenvolvimento progressivo do fenótipo osteoblástico reveste-se de particular importância já que o comportamento funcional e as respostas a alterações das condições locais, nomeadamente, presença de fármacos, hormonas e factores de crescimento, são função do estado de desenvolvimento das células osteoblásticas [35,75,195,196]

Nos estudos iniciais, as culturas celulares de osso alveolar humano foram efectuadas na presença de AA, β-GF e na presença ou na ausência de Dex. Estas substâncias favorecem o desenvolvimento do fenótipo osteoblástico em vários sistemas de cultura de células ósseas [72,136,155-162,173]. A avaliação de parâmetros de crescimento celular e actividade funcional mostraram que estas culturas apresentaram uma relação proliferação-diferenciação celular que envolveu três fases distintas: uma fase inicial ("lag-phase"), de 3-4 dias, que correspondeu ao período de adaptação das células às condições de cultura; uma fase de proliferação activa, observada durante as duas-três primeiras semanas de incubação e associada com a síntese da matriz extracelular orgânica; e, na terceira-quarta semanas de incubação, uma fase em que o crescimento celular se manteve relativamente estável ou diminuiu e se observou a

mineralização da matriz extracelular (processo que reflecte a expressão completa do fenótipo osteoblástico). Este padrão de comportamento sugere uma progressão sequencial do desenvolvimento do fenótipo osteoblástico, já que a população celular evoluiu de um estado mais proliferativo e menos diferenciado (fase de crescimento exponencial) para um estado menos proliferativo e mais diferenciado (início da mineralização); nesta fase da cultura os OB encontravam-se embebidos na matriz extracelular e incapazes de proliferar. Os resultados obtidos mostraram que o comportamento das culturas celulares de osso alveolar humano efectuadas nas condições experimentais descritas parece estar de acordo com o modelo proposto na literatura para o desenvolvimento do fenótipo osteoblástico [35,72,75,175,186].

As células de osso alveolar cultivadas na presença de AA e β-GF proliferaram em camada contínua, observando-se por vezes a formação de pequenos agrupamentos de células para tempos de incubação mais prolongados. Estas culturas apresentaram níveis de FA razoáveis. Na primeira subcultura observou-se uma diminuição dos níveis de Pi e Cai por volta dos 21°-25° dias de cultura. O consumo destes iões a partir do meio sugere a formação de depósitos minerais de fosfato de cálcio durante a quarta semana de cultura. Estes resultados estão de acordo com os observados nos ensaios histoquímicos em que as reacções de alizarina vermelha e von Kossa foram negativos aos 21 dias de cultura e positivas aos 28 dias. Na segunda subcultura a actividade de FA foi significativamente mais baixa. Os níveis de Pi e Cai começaram a diminuir mais tarde (por volta do 25° dia), sugerindo um atraso no processo de mineralização e as reacções histoquímicas para a localização de depósitos de fosfato de cálcio foram negativas no 28° dia.

As culturas efectuadas na presença de AA, β-GF e Dex mostraram a formação de nódulos tridimensionais que aumentaram de tamanho com o tempo de incubação. Estas culturas revelaram uma indução evidente da diferenciação osteoblástica, como demonstrado pelo aumento significativo da actividade da FA e também pela antecipação da mineralização da matriz extracelular. Nestas culturas, o consumo de Pi e de Cai foi observado, em geral, a partir do 14° dia de incubação, sugerindo o início de deposição de fosfato de cálcio durante a terceira semana de incubação. De acordo com estes resultados, as culturas de 21 dias apresentaram reacções histoquímicas fortemente positivas para a presença de depósitos minerais.

A subcultura sucessiva das células ósseas traduziu-se por uma diminuição gradual na intensidade e número de nódulos tridimensionais presentes: na primeira subcultura observou-se a presença de numerosos e densos nódulos e na quinta estas estruturas eram praticamente inexistentes; este efeito foi acompanhado por uma diminuição progressiva dos parâmetros osteoblásticos estudados, nomeadamente, a actividade da FA e a capacidade de formação de depósitos minerais. A formação dos nódulos tridimensionais parece ser necessária para a mineralização *in vitro*, pois as reacções da alizarina vermelha e von Kossa estavam associadas com estas estruturas. Aos 21 dias de cultura, as reacções histoquímicas para identificação da presença de depósitos de fosfato e de cálcio foram francamente positivas na primeira subcultura, mas negativas na quinta subcultura.

A realização de subculturas sucessivas resultou numa diminuição significativa da FA, principalmente da primeira para a segunda subcultura, quer na presença quer na ausência de Dex, e também da capacidade de formação de depósitos minerais. De salientar que na ausência da hormona se observou uma perda muito rápida do fenótipo osteoblástico; nas condições experimentais utilizadas (culturas mantidas por 28 dias), apenas a cultura primária e a primeira subcultura apresentaram reacções histoquímicas positivas de fraca intensidade para a formação de depósitos minerais, enquanto que na presença da hormona se observou mineralização até à quarta subcultura. Considerando que a proliferação celular não foi significativamente afectada pela subcultura sucessiva, os resultados sugerem que a passagem sucessiva das células em cultura resultou numa população celular progressivamente menos diferenciada no que diz respeito ao fenótipo osteoblástico. Este facto deve-se, provavelmente, à selecção progressiva da população celular mais proliferativa que se encontra em subcultura e, consequentemente num estado mais precoce de diferenciação [35,75,145,175]. Esta observação é sugerida pelos resultados obtidos para o conteúdo em proteína total nas várias subculturas que mostram que a partir da terceira subcultura se observa um aumento deste parâmetro durante a terceira e quarta semanas de cultura.

Os níveis de fosfatase ácida e de fosfatase ácida resistente ao ácido tartárico foram muito baixos em todas as subculturas, permitindo concluir que as culturas de osso alveolar humano obtidas nas condições experimentais descritas eram predominantemente osteoblásticas; no entanto, foi possível observar-se um aumento gradual destes parâmetros a partir da terceira subcultura, sugerindo um empobrecimento gradual destas em células com características osteoblásticas.

Para confirmar a especificidade dos parâmetros avaliados, efectuou-se, em simultâneo, um estudo controlo com fibroblastos obtidos de gengiva humana. As culturas foram obtidas em condições experimentais semelhantes às utilizadas na obtenção das culturas de células ósseas e caracterizadas pela avaliação dos mesmos parâmetros. As culturas de fibroblastos apresentaram uma proliferação celular idêntica à observada nas culturas de osso alveolar humano, níveis desprezáveis de fosfatase alcalina, níveis elevados de fosfatase ácida e ausência de formação de áreas mineralizadas. Este estudo permitiu concluir que os resultados obtidos na avaliação histoquímica e bioquímica das culturas de osso alveolar não constituíram nenhum artifício dos métodos utilizados.

Os resultados obtidos nestes estudos sugerem que estas culturas constituem um modelo potencial para o estudo *in vitro* da fisiologia e farmacologia do osso alveolar e de aspectos biológicos envolvidos na interacção osso alveolar/biomateriais. Os resultados permitiram também concluir que a primeira subcultura constitui a população celular que expressa com maior intensidade os parâmetros osteoblásticos estudados, sendo por isso mais representativa da situação *in vivo*.

Na segunda parte do trabalho apresentado neste capítulo estudou-se o efeito isolado de diferentes concentrações de AA e β-GF no comportamento osteoblástico de culturas celulares de osso alveolar humano e, também, o efeito de diferentes combinações de AA, β-GF e Dex. A caracterização do efeito isolado e combinado destes suplementos foi efectuada apenas em células da primeira subcultura, devido às razões previamente apontadas. As células foram cultivadas em (1) meio base e na presença de: (2) AA (25, 50 e 100 μg/mL), cofactor enzimático que estimula a síntese e maturação do colagénio; (3) β-GF (2,5, 5 e 10 mM), fonte potencial de fosfato inorgânico para o processo de mineralização; (4) Dex (10 nM), glucocorticóide que induz o fenótipo osteoblástico; (5) AA (50 μg/mL) + Dex; (6) AA (50 μg/mL) + β-GF (10 mM); (7) Dex + β-GF (10 mM); e (8) Dex + β-GF (10 mM) + AA (50 μg/mL).

As células cultivadas nas várias situações experimentais proliferaram gradualmente ao longo do tempo de cultura e apresentaram uma actividade de FA elevada, um marcador do fenótipo osteoblástico.

Os resultados obtidos neste estudo revelaram que nas culturas efectuadas na ausência de β-GF, os parâmetros associados com o crescimento celular aumentaram gradualmente com o tempo de incubação e permaneceram elevados até ao fim do tempo de cultura (42 dias). Pelo contrário, nas culturas efectuadas na presença de β-GF, adicionado isolado ou em combinação, a proliferação celular aumentou gradualmente com o tempo de incubação mas cessou num dado momento do tempo de cultura (21°-28° dias). A proliferação celular, como referido, está funcionalmente associada com a síntese da matriz extracelular e a sua acumulação e maturação, essencial ao fenómeno da mineralização, contribuiu para a diminuição da proliferação celular. Na presença de uma fonte de iões fosfato, a mineralização ocorreu quando se verificou uma relação apropriada entre a quantidade de matriz extracelular e a sua maturação; como consequência, a proliferação celular foi interrompida e os OB acabaram por ficar embebidos na matriz extracelular em mineralização. De acordo com este modelo verificou-se uma relação recíproca e funcional entre a proliferação e a diferenciação celular [72,175].

Os níveis da FA nas várias culturas aumentaram com o tempo de incubação seguindo um padrão semelhante ao observado na proliferação celular. Nas culturas efectuadas na ausência de β-GF (culturas com AA, Dex e Dex + AA) a actividade de FA seguiu um padrão semelhante ao observado na cultura controlo (sem suplementos, meio base), isto é, aumentou gradualmente com o tempo de incubação e permaneceu elevada até ao fim do período de incubação, muito provavelmente devido ao facto de, nestas culturas, não se ter observado mineralização.

Nas culturas efectuadas na presença de Dex + β-GF (Dex + β-GF e Dex + β-GF + AA) observou-se uma indução significativa da actividade de FA durante a terceira semana de incubação em relação às efectuadas na presença de β-GF e na ausência de Dex.

Nas culturas efectuadas na ausência de β-GF os níveis de Cai e de Pi no meio de cultura permaneceram constantes ao longo do tempo de incubação, indicando que não ocorreu deposição de fosfato de cálcio. Por outro lado, a adição de β-GF (isolado ou em combinação com os outros suplementos), resultou num aumento dos níveis de Pi no meio de cultura até próximo do 21°-25° dias de incubação (proporcional à concentração de β-GF adicionado), seguido de uma diminuição muito acentuada até ao fim do período de incubação; a

concentração de Cai presente no meio de cultura começou a diminuir por volta do 21° dia e atingiu um valor mínimo próximo do 28° dia. Estes dados sugerem que a mineralização ocorreu durante a quarta semana de incubação, observando-se uma ligeira antecipação do processo de mineralização nas culturas efectuadas na presença de Dex (de cerca de 3 dias). Os resultados histoquímicos providenciam o mesmo tipo de informação, ou seja, apenas as culturas suplementadas com β-GF apresentam capacidade de formação de uma matriz mineralizada e, também, que a intensidade de mineralização foi proporcional à sua concentração.

A FA está associada ao processo de mineralização e nas culturas efectuadas na presença de β-GF a formação de depósitos de fosfato de cálcio observou-se a seguir ao valor máximo da FA, à semelhança do observado noutros sistemas de cultura [35,75,186]. O mecanismo pelo qual o β-GF induz a mineralização está ligado à elevada actividade hidrolítica da FA apresentada pelas culturas de células ósseas; este composto é rapidamente hidrolisado nos locais de mineralização, aumentando a concentração dos iões fosfato que juntamente com o Ca^{2+}, presente em elevada concentração, pode regular e promover a concentração adequada de ambos os iões para iniciar a mineralização [35,157-159,175,186]. Os resultados relativos aos níveis de Pi determinados no meio recolhido de culturas celulares durante o período de incubação mostraram que o β-GF era quase completamente degradado a fosfato inorgânico durante as primeiras duas a três semanas de incubação. Alguns estudos [194-196] efectuados em culturas de medula óssea humana, em condições experimentais semelhantes às utilizadas no sistema de cultura em estudo, mostraram o mesmo tipo de resultados. A importância da FA no processo de mineralização é suportada por vários estudos [158,186] em que se demonstrou que a deposição mineral é bloqueada na presença de inibidores da FA (ex. levamisole) [158,186]. Nas culturas celulares de osso alveolar efectuadas em condições que permitiram o processo de mineralização observou-se que a intensidade das reacções histoquímicas para a localização dos depósitos de cálcio e de fosfatos aumentou com o tempo de incubação, mas os níveis de FA diminuíram significativamente. Este facto está de acordo com vários estudos [158,186] que mostram que a FA parece ter um papel importante na fase inicial da mineralização (providenciando níveis apropriados de Pi) e, também, que em culturas muito mineralizadas a actividade da enzima é baixa. Assim, a mineralização parece ocorrer em duas fases distintas: a fase de iniciação, na qual pouco mineral é depositado e é dependente da actividade da FA; e a fase de progressão em que a mineralização ocorre a uma velocidade que aumenta

proporcionalmente, evoluindo independentemente da referida enzima [158]. Além desta função, a FA parece estar também envolvida na destruição dos inibidores locais da mineralização, como o pirofosfato, e funcionar como uma proteína de ligação para o cálcio e o fosfato promovendo a mineralização [155,157,194].

Estão descritos vários estudos sobre o efeito do β-GF nas culturas de células ósseas, no entanto, os resultados obtidos nem sempre são consistentes, provavelmente devido a diferenças observadas nos sistemas de cultura e/ou nas condições utilizadas. Assim, alguns estudos [35,155-160,192] mostram que a adição de β-GF às culturas de células ósseas induz a osteogénese mas, também, afecta o crescimento celular e/ou a actividade da F.A. Outros sugerem que não é necessário adicionar uma fonte de fosfato ao meio de cultura, já que no soro bovino fetal existe uma quantidade de fosfato suficiente (os níveis de Pi são da ordem de 1,0-1,5 mM e os de fosfato orgânico da ordem de 3 mM) para induzir a mineralização nos sistemas utilizados [198-200], ou que a concentração de β-GF utilizada é excessiva e pode conduzir à formação não fisiológica de depósitos minerais e, consequentemente, mascarar a sua produção pelos OB em cultura [159,201]. Nas culturas de osso alveolar verificou-se a necessidade da presença de β-GF para se observar a mineralização da matriz, sendo esta proporcional à quantidade de β-GF adicionado.

O AA desempenha um papel importante na produção da matriz extracelular óssea e vários estudos mostram que a presença deste suplemento no meio de cultura resulta num aumento da produção de colagénio dependente da dose adicionada e sugerem que o aumento da acumulação da matriz extracelular está associada com uma actividade mais elevada de FA e com a capacidade de formação de áreas mineralizadas [17,35,72,75,190]. No trabalho apresentado, a presença de AA no meio de cultura, nas condições experimentais descritas, não afectou significativamente a proliferação celular e a actividade da FA, tanto nas culturas sem capacidade de mineralização (culturas tratadas com AA em diferentes concentrações e com AA + Dex) como nas culturas com capacidade de mineralização (culturas tratadas AA +β-GF e Dex + β-GF + AA).

A presença de Dex nas culturas celulares resultou num aumento significativo da actividade de FA e da capacidade de formação de áreas mineralizadas na matriz extracelular. Os resultados foram semelhantes aos observados em outros sistemas de cultura (culturas de medula óssea,

culturas de células ósseas obtidas de osso trabecular com outra origem) em que a presença de Dex no meio pareceu induzir a proliferação e diferenciação de células ósseas com características osteoblásticas [136,155-157,159,162,173].

Os resultados apresentados neste capítulo evidenciaram a importância da definição das condições experimentais em estudos que envolvem culturas de células ósseas. De referir, que a capacidade de mineralização *in vitro* é um parâmetro considerado requisito fundamental para a utilização deste tipo de cultura como modelo no estudo dos mecanismos envolvidos nos processos de formação óssea. Além disso, contribuiu ainda para a caracterização de culturas celulares obtidas a partir de osso alveolar, permitindo estabelecer critérios para a escolha das condições experimentais mais apropriadas e da população celular a utilizar em estudos que envolvam este tipo de metodologia *in vitro*. Este aspecto é particularmente importante quando se considera a diversidade e a multiplicidade de metodologias descritas na literatura, facto que dificulta a interpretação e a comparação de resultados.

6. CONCLUSÃO GERAL DO CAPÍTULO

As culturas celulares de osso alveolar humano, obtidas em condições experimentais apropriadas, apresentaram capacidade de proliferação e diferenciação osteoblástica, evidenciada por uma actividade elevada de FA e formação de uma matriz extracelular mineralizada. Os resultados apresentados mostraram também que estas culturas apresentam um comportamento bem definido e reprodutível.

A subcultura sucessiva das células de osso alveolar resultou numa redução significativa da actividade da FA e da capacidade de mineralização; este efeito foi sobretudo evidente da primeira para a segunda subcultura.

Apenas as culturas efectuadas na presença do β-GF apresentaram capacidade de formação de áreas mineralizadas.

A presença adicional de Dex resultou numa indução significativa da FA e da capacidade de mineralização das culturas.

Em função dos resultados apresentados, a primeira subcultura efectuada na ausência ou na presença da Dex, mas sempre na presença dos outros dois suplementos (AA e β-GF), foi seleccionada para a realização dos estudos que se apresentam nos capítulos IV, V e VI.

Os resultados observados sugerem que estas culturas constituem um modelo potencial para o estudo *in vitro* da fisiologia e farmacologia do osso alveolar e de aspectos biológicos envolvidos na interacção do osso alveolar com biomateriais utilizados para substituição óssea e em implantologia.

A título de exemplo mostra-se o aspecto de um fragmento de osso trabecular do ilíaco (proveniente de um indivíduo adulto do sexo masculino) (Fig. 3.32 A) e de culturas celulares de osso alveolar humano com 25 dias de incubação, efectuadas na presença de Dex + AA + β-GF (1ª subcultura) (Fig. 3.32 B), sendo evidentes as semelhanças de aspecto da matriz óssea mineralizada.

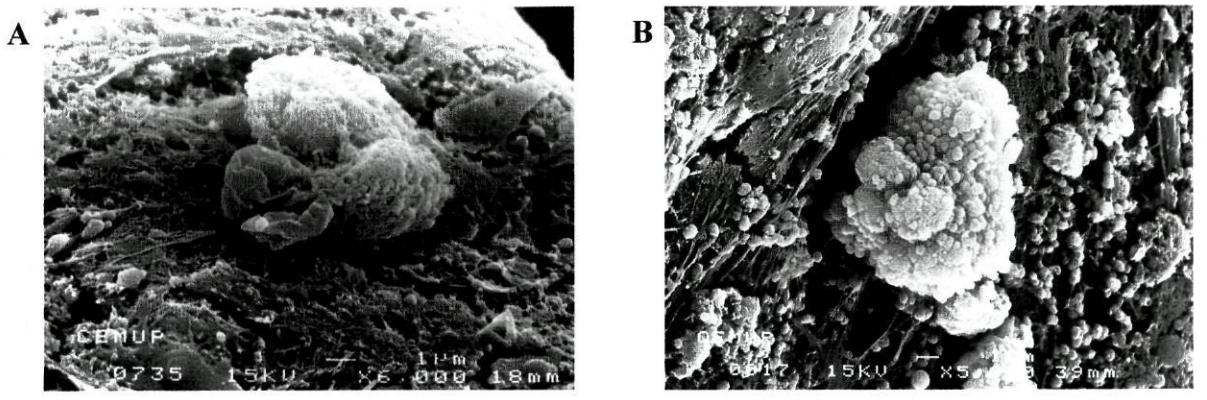


Fig. 3.32- **Fotografias de microscopia electrónica de varrimento de um fragmento de osso trabecular do ilíaco (A; fotografia amavelmente cedida pelo Dr. André Gomes do Serviço de Ortopedia do Hospital Geral de Santo António) e de culturas celulares de osso alveolar humano (B).**

CAPÍTULO IV:

PROLIFERAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO OSTEOBLÁSTICA DE CULTURAS CELULARES DE OSSO ALVEOLAR HUMANO NA PRESENÇA DE HORMONA DA PARATIRÓIDE, 1,25-DIIDROXIVITAMINA D_3 E DEXAMETASONA

1. INTRODUÇÃO

O processo da osteogénese e da sua regulação têm sido objecto de um estudo exaustivo ao longo dos últimos anos, mas o actual estado do conhecimento sobre o assunto continua incompleto, devido ao facto deste processo ser muito complexo. Na realidade, a formação do tecido ósseo é o resultado de uma longa sequência de eventos que pode ser afectada por qualquer interferência. Como referido, a regulação da osteogénese implica não só a modulação da proliferação celular, mas também a osteodiferenciação, a síntese da matriz e a sua mineralização. Cada uma destas etapas é afectada ou regulada por várias hormonas e factores de crescimento. Frequentemente, a mesma hormona ou factor actua em mais do que uma etapa, por vezes com diferenças profundas ou mesmo com efeitos opostos durante o desenvolvimento do fenótipo osteoblástico [134].

A hormona da paratiróide (PTH), 1,25-diidroxivitamina D_3 [1,25-$(OH)_2D_3$] e dexametasona (Dex) desempenham um papel muito importante nos mecanismos de regulação do metabolismo ósseo [35,175]. As hormonas e os factores de crescimento ao actuarem em várias etapas da sequência de diferenciação celular influenciam as células osteoblásticas de várias maneiras. Alguns destes factores influenciam principalmente o recrutamento das células indiferenciadas, outros afectam a diferenciação dos osteoprogenitores, alguns deles são potentes mitogénicos e outros influenciam a expressão de marcadores característicos do fenótipo osteoblástico, sugerindo que as interacções das diversas hormonas e factores de crescimento são importantes na determinação da função celular [35,75,175,202].

Os estudos efectuados em culturas celulares de tipo osteoblástico têm contribuído significativamente para a compreensão do efeito de substâncias que influenciam o metabolismo ósseo. O efeito da PTH, 1,25-$(OH)_2D_3$ e Dex na proliferação e diferenciação das células osteoblásticas tem sido objecto de uma grande variedade de estudos *in vitro*; contudo, os resultados obtidos nem sempre são consistentes devido a factores relacionados com as condições experimentais utilizadas, como o sistema de cultura, a concentração da hormona, o tempo de exposição, o estado de diferenciação das células osteoblásticas e a presença de outros compostos que também afectam o crescimento celular e a actividade funcional destas células [35,75,175].

Neste capítulo apresentam-se os resultados relativos ao efeito da PTH, 1,25-$(OH)_2D_3$ e Dex (utilizadas isoladamente ou em combinação) na proliferação celular e actividade funcional de culturas celulares de osso alveolar humano. O efeito das hormonas foi estudado em dois tipos de situações: (1) presença das hormonas durante todo o período de incubação e (2) presença das hormonas apenas em diferentes fases do período de cultura (representativas de populações celulares em diferentes estados de diferenciação osteoblástica).

2. COMPORTAMENTO DAS CULTURAS CELULARES EXPOSTAS À PTH, 1,25-$(OH)_2D_3$ E Dex DURANTE TODO O PERÍODO DE INCUBAÇÃO

2.1. MATERIAIS E MÉTODOS

As culturas primárias foram obtidas em condições experimentais idênticas às descritas no capítulo II. Os fragmentos de osso alveolar foram cultivados em meio base (α-MEM enriquecido com 10% de soro bovino fetal, 50 μg/mL de gentamicina e 2,5 μg/mL de anfotericina B) e as culturas foram mantidas até próximo da confluência. Após a tripsinização da cultura primária, as células foram cultivadas durante 32 dias (10^4 células/cm^2; primeira subcultura) na ausência e na presença das hormonas em duas situações experimentais:

(1) Condições que não permitem a formação de uma matriz mineralizada (ausência de AA e β-GF): meio base (situação controlo), meio base + PTH, meio base + 1,25-$(OH)_2D_3$ e meio base + Dex;
(2) Condições que permitem a formação de uma matriz mineralizada (presença de AA e β-GF): meio base + AA + β-GF (situação controlo), meio base + AA + β-GF + PTH, meio base + AA + β-GF + 1,25-$(OH)_2D_3$ e meio base + AA + β-GF + Dex. Foi ainda estudado o efeito das seguintes combinações de hormonas: meio base + AA + β-GF + Dex + PTH e meio base + AA + β-GF + Dex + 1,25-$(OH)_2D_3$.

As hormonas, na concentração de 10 nM, foram adicionadas ao meio de cultura no quarto dia e mantidas até ao final do período de incubação.

As culturas foram caracterizadas bioquimicamente (aos 1, 4, 5, 7, 11, 18, 25 e 32 dias de cultura) para avaliação da proliferação celular (ensaio do MTT, conteúdo em proteína total e em ADN) e das actividades da FA, fosfatase ácida e fosfatase ácida resistente ao ácido tartárico, histoquimicamente (aos 18, 25 e 32 dias de cultura) para permitir a detecção de células produtoras de fosfatase alcalina e a identificação da presença de depósitos minerais na matriz extracelular e observadas por microscopia electrónica de varrimento. Devido ao grande número de situações experimentais, os resultados relativos aos vários parâmetros bioquímicos são apresentados separadamente, nomeadamente:

- I, culturas efectuadas em meio base na ausência e presença de PTH, 1,25-$(OH)_2D_3$ ou Dex.
- II, culturas efectuadas na presença de AA + β-GF na ausência e presença de PTH, 1,25-$(OH)_2D_3$ ou Dex.
- III, culturas efectuadas na presença de AA + β-GF e tratadas com uma combinação de hormonas (Dex + PTH e Dex + 1,25-$(OH)_2D_3$).

2.2. RESULTADOS

PROLIFERAÇÃO CELULAR

As células em subcultura proliferaram gradualmente ao longo do período de incubação. A proliferação celular foi acompanhada pela síntese de matriz extracelular abundante, claramente visível nas culturas quando observadas por microscopia de fase invertida e microscopia electrónica de varrimento, principalmente nas culturas efectuadas na presença de AA e β-GF.

As culturas efectuadas em meio base e em meio base adicionado das hormonas proliferaram gradualmente, originando multicamadas contínuas de células. As culturas efectuadas na presença de AA e β-GF apresentaram a formação de estruturas nodulares que aumentaram de tamanho com o tempo de incubação, sendo visíveis macroscopicamente a partir da segunda e terceira semanas de incubação, dependendo das condições experimentais. A adição de hormonas a estas culturas resultou num aumento do número e tamanho dos referidos nódulos,

tendo este efeito sido mais significativo nas culturas efectuadas na presença de Dex, quer quando adicionada isoladamente quer em combinação.

Ensaio do MTT

As culturas efectuadas na ausência de AA e β-GF (culturas controlo e culturas tratadas com PTH, 1,25-$(OH)_2D_3$ ou Dex) apresentaram valores de redução do MTT que aumentaram gradualmente com o tempo de incubação, não se observando diferenças significativas entre as várias situações experimentais (Fig. 4.1 AI).

As culturas efectuadas na presença de AA e β-GF mas na ausência de Dex proliferaram gradualmente atingindo um valor máximo próximo do 25° dia de incubação, seguindo-se uma diminuição deste parâmetro. As que foram tratadas com 1,25-$(OH)_2D_3$ apresentaram uma proliferação celular semelhante à observada nas culturas controlo mas, as culturas tratadas com PTH mostraram, no 25° e 32° dias, valores de redução de MTT significativamente menores. As culturas efectuadas na presença de AA + β-GF + Dex apresentaram desde muito cedo uma proliferação celular significativamente maior que a observada na situação controlo (AA + β-GF), excepto no 25° dia de cultura em que este parâmetro foi significativamente menor (Fig. 4.1 AII).

As culturas efectuadas na presença de Dex e de uma combinação de Dex e de outras hormonas (Dex; Dex + PTH; Dex + 1,25$(OH)_2D_3$) apresentaram um comportamento de crescimento celular semelhante até aproximadamente ao 18° dia, fase em que atingiram valores máximos para este parâmetro. Observou-se depois uma diminuição entre os 18° e 25° dias; esta diminuição foi muito acentuada nas culturas tratadas com Dex, intermédia nas tratadas com Dex + PTH e relativamente pequena nas tratadas com Dex + 1,25-$(OH)_2D_3$. Após o 25° dia, os valores de redução do MTT aumentaram até ao fim do período de incubação (Fig. 4.1 AIII).

Conteúdo em ADN

Nas culturas efectuadas em meio base, após um período de fase "lag" de cerca de 3 dias, o conteúdo em ADN aumentou gradualmente ao longo do tempo de incubação. A presença de

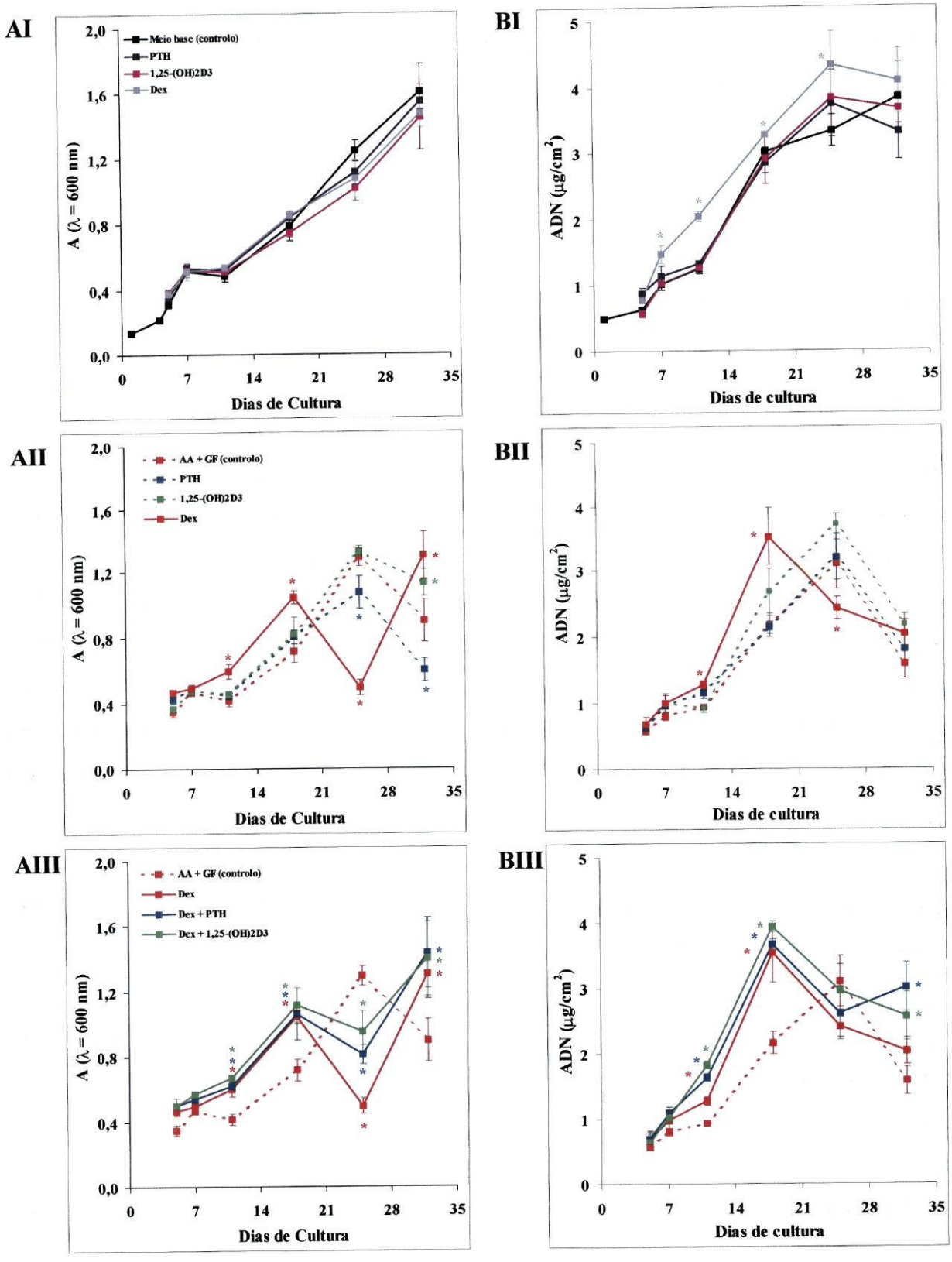


Fig.4.1- **Efeito isolado ou combinado da PTH, 1,25$(OH)_2D_3$ e Dex na redução do MTT (A) e no conteúdo em ADN (B) de culturas de células de osso alveolar humano mantidas por um período de 32 dias. I- Culturas efectuadas em meio base. II e III- culturas efectuadas na presença de AA + β-GF; III- culturas efectuadas na presença de combinações de Dex e outras hormonas. * Significativamente diferente da respectiva situação controlo: I, culturas efectuadas em meio base; II e III, culturas efectuadas na presença de AA + β-GF.**

PTH ou de 1,25-$(OH)_2D_3$ não afectou significativamente o conteúdo em ADN; contudo, a presença de Dex conduziu a um aumento significativo deste parâmetro, sobretudo durante as duas primeiras semanas de incubação (69% e 30% de aumento, respectivamente no 11° e 25° dias). Durante a última semana de incubação verificou-se que o conteúdo em ADN se manteve relativamente estável (Fig. 4.1 BI).

Nas culturas realizadas na presença de AA + β-GF (situação controlo) e nas tratadas com PTH ou 1,25-$(OH)_2D_3$ o conteúdo em ADN aumentou com o tempo de incubação, principalmente a partir do 10° dia de cultura, atingindo um valor máximo próximo do 25°. A presença de PTH não afectou significativamente o crescimento celular, mas a presença de 1,25-$(OH)_2D_3$ resultou num pequeno aumento (cerca de 20%) do conteúdo em ADN. As culturas tratadas com Dex apresentaram um conteúdo em ADN mais elevado desde o início do período de incubação: o valor máximo foi observado próximo do 18° dia e, depois, diminuiu significativamente até ao 25°; o conteúdo em ADN no 11° e 18° dias de cultura foi significativamente mais elevado (respectivamente, 45 e 60%) que o observado na respectiva situação controlo. Nas culturas tratadas com Dex o valor mais elevado do conteúdo em ADN, observado no 18° dia, foi superior ao valor máximo obtido nas culturas controlo e semelhante ao observado, no 25° dia, nas culturas efectuadas na presença de 1,25-$(OH)_2D_3$ (Fig. 4.1 BII).

As culturas efectuadas na presença de AA + β-GF + Dex, AA + β-GF + Dex + PTH e AA + β-GF + Dex + 1,25-$(OH)_2D_3$ apresentaram para o conteúdo em ADN um padrão semelhante ao longo do período de incubação (Fig. 4.1 BIII).

O conteúdo em proteína total, seguiu em todas as situações experimentais, um padrão idêntico ao observado para o conteúdo em ADN (resultados não apresentados).

ACTIVIDADES DE FOSFATASE ALCALINA, FOSFATASE ÁCIDA E FOSFATASE ÁCIDA RESISTENTE AO ÁCIDO TARTÁRICO

A determinação da actividade de FA mostrou, mais uma vez, que estes sistemas celulares são influenciados pelas condições experimentais, nomeadamente pela presença de substâncias que afectam o metabolismo ósseo. Nas culturas efectuadas em meio base, quer na ausência quer

na presença das hormonas, verificou-se que a actividade de FA aumentou ao longo de todo o tempo de incubação. A presença de PTH e/ou 1,25-$(OH)_2D_3$ resultou num aumento significativo da actividade da enzima na fase inicial do período de incubação, enquanto que a presença de Dex se traduziu por um aumento da actividade de FA durante todo o tempo de cultura (Fig. 4.2 AI e BI).

Nas culturas efectuadas na presença de AA + β-GF verificou-se que a actividade de FA seguiu um padrão semelhante ao observado no ensaio do MTT, isto é, aumentou gradualmente até ao 25° dia e, depois, diminuiu lentamente (Fig. 4.2 AII e BII). A presença de PTH, 1,25-$(OH)_2D_3$ e Dex, adicionadas isoladamente ou em combinação, resultou num aumento da actividade de FA. Os valores máximos foram observados próximo do 18° dia de cultura e, de seguida, diminuíram significativamente. Nas culturas tratadas com 1,25-$(OH)_2D_3$, o aumento mais significativo da actividade de FA ocorreu durante as duas primeiras semanas de incubação (cerca de 145 % no 11° dia) e, de seguida, os níveis enzimáticos aproximaram-se dos observados na situação controlo. As culturas efectuadas na presença de PTH apresentaram um aumento da actividade de FA a partir do 7° dia de incubação (cerca de 88 e 80 %, respectivamente no 11° e 18° dias). Na presença de Dex verificou-se uma indução muito significativa da actividade de FA a partir do início da cultura e o aumento mais elevado foi observado, igualmente, durante as duas primeiras semanas de incubação; a actividade de FA quadruplicou e duplicou respectivamente no 11° e 18° dias de cultura (Fig. 4.2 AII e BII). As culturas efectuadas nestas condições experimentais (AA + β-GF + Dex) foram as que apresentaram os níveis mais elevados de FA.

As culturas tratadas com uma combinação de Dex e outras hormonas apresentaram um padrão de actividade de FA semelhante ao observado nas culturas tratadas apenas com Dex até próximo do 11° dia de cultura. No entanto, relativamente às culturas expostas apenas ao glucocorticóide, observou-se uma diminuição dos níveis de FA nas culturas tratadas com uma combinação de hormonas. Esta diminuição foi particularmente evidente no 18° dia (17% e 25%, respectivamente, nas culturas efectuadas na presença de Dex + 1,25-$(OH)_2D_3$ e Dex + PTH), fase em que as culturas atingiram um valor máximo para a actividade de FA (Fig. 4.2 AIII e BIII).

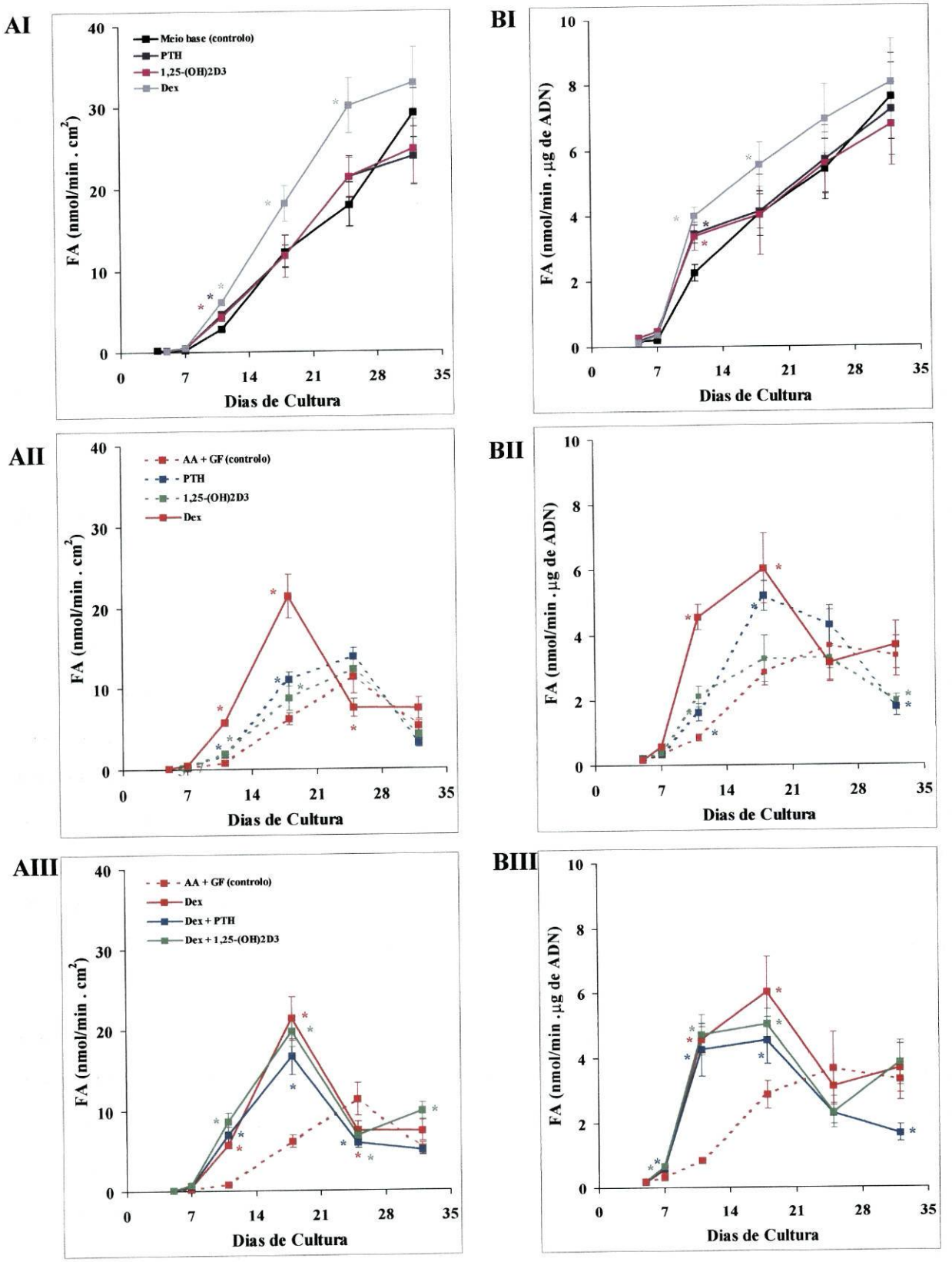


Fig.4.2- **Efeito isolado ou combinado da PTH, 1,25(OH)$_2$D$_3$ e Dex na actividade de FA de culturas de células de osso alveolar humano mantidas por um período de 32 dias. I- Culturas efectuadas em meio base. II e III- culturas efectuadas na presença de AA + β-GF; III- culturas efectuadas na presença de combinações de Dex e outras hormonas. * Significativamente diferente da respectiva situação controlo: I, culturas efectuadas em meio base; II e III, culturas efectuadas na presença de AA + β-GF.**

A presença de Dex, PTH e 1,25-$(OH)_2D_3$ não afectou significativamente a actividade da fosfatase ácida e fosfatase ácida resistente ao ácido tartárico (Fig. 4.3 A e B). Assim, em todas as situações experimentais estudadas, os níveis determinados para estas duas enzimas ao longo dos 32 dias de incubação foram insignificantes quando comparados com os respectivos teores em FA, indicando que a possível contaminação das culturas com fibroblastos e/ou osteoclastos era negligenciável, à semelhança do observado previamente (capítulo III) neste sistema de cultura.

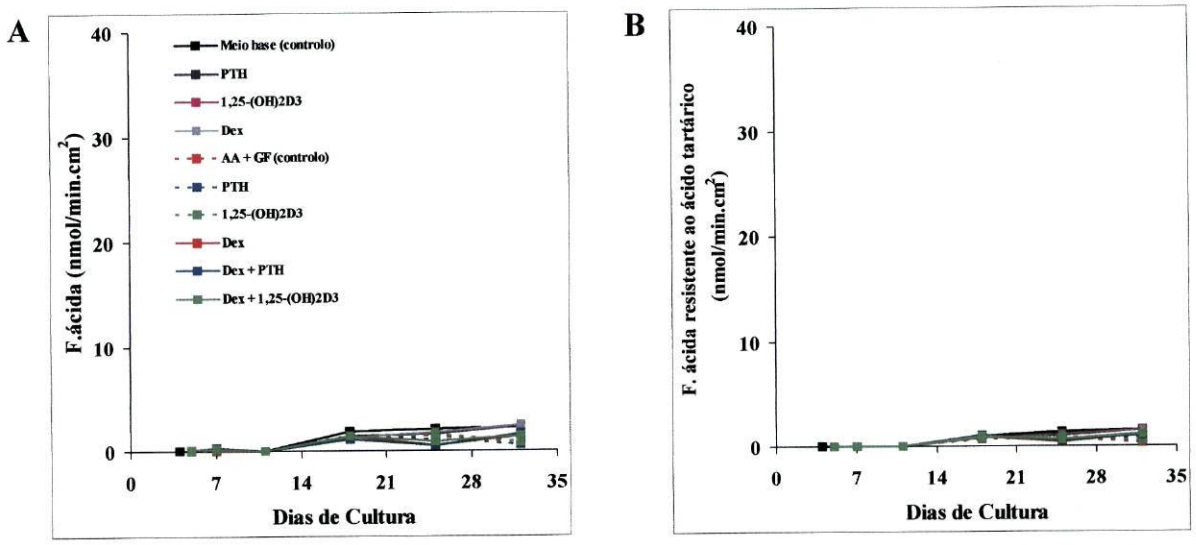


Fig.4.3- **Efeito isolado ou combinado da PTH, 1,25-$(OH)_2D_3$ e Dex na actividade de fosfatase ácida (A) e de fosfatase ácida resistente ao ácido tartárico (B) de culturas de células de osso alveolar humano mantidas por um período de 32 dias.**

IDENTIFICAÇÃO HISTOQUÍMICA DE FA E DE DEPÓSITOS DE FOSFATO DE CÁLCIO

A reacção para a localização da FA foi positiva em todas as culturas. Nas culturas efectuadas em meio base, tanto na ausência como na presença de hormonas, a intensidade desta reacção aumentou ao longo de todo o período de incubação. Nas culturas efectuadas na presença de AA e β-GF verificou-se que a intensidade desta reacção aumentou gradualmente até próximo do 18° ou 25° dias de incubação, respectivamente quando as culturas foram efectuadas na presença ou na ausência de hormonas, tendo depois começado a diminuir (resultados não apresentados).

A formação de depósitos de fosfato de cálcio nas culturas foi avaliada por métodos histoquímicos (reacção de alizarina vermelha e de von Kossa, respectivamente para os

depósitos de cálcio e de fosfato; Fig. 4.4) e pela observação das culturas em microscopia electrónica de varrimento (Fig. 4.5).

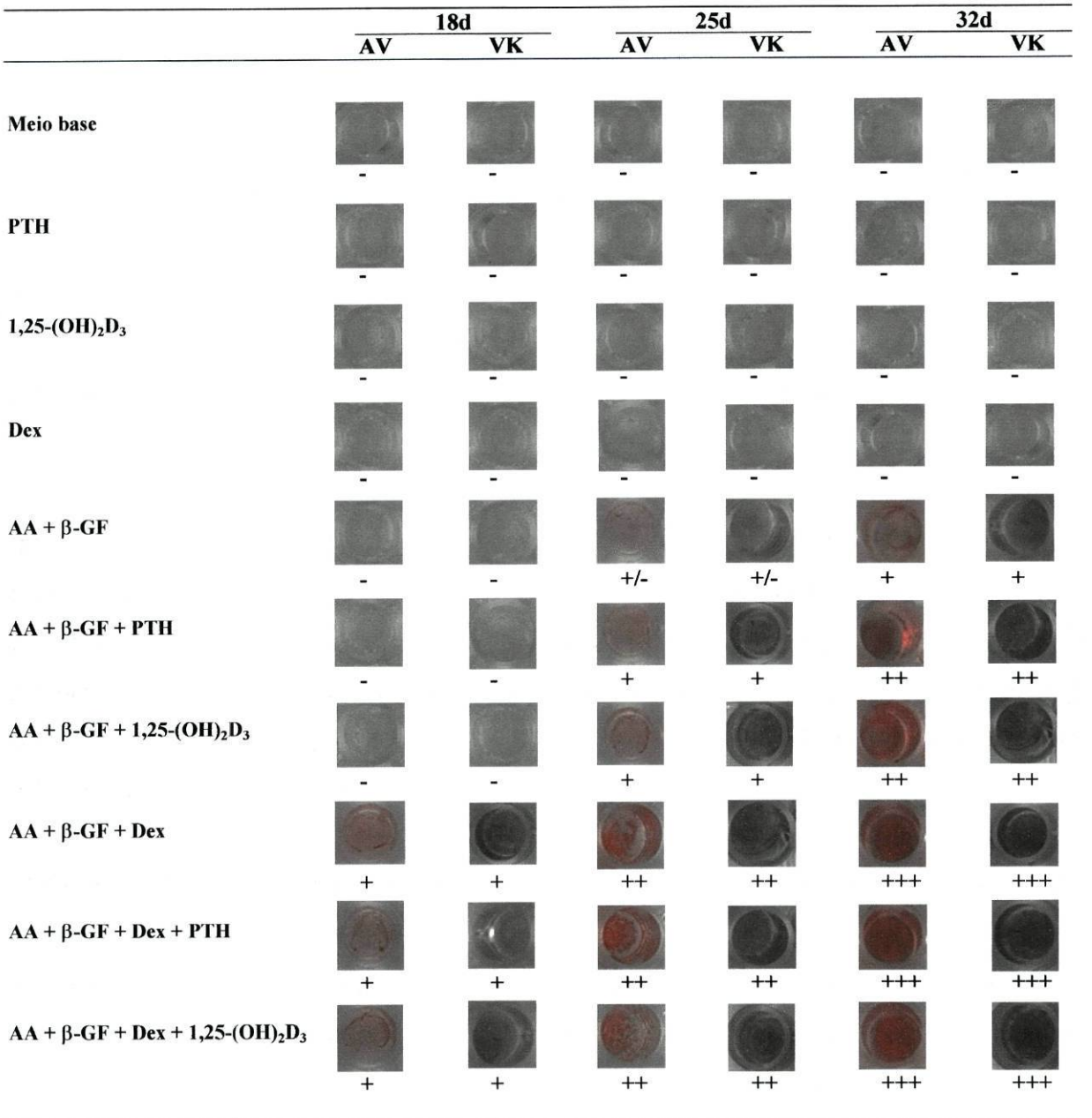


Fig. 4.4- **Efeito isolado ou combinado da PTH, 1,25-$(OH)_2D_3$ e Dex na formação de depósitos de cálcio (reacção de alizarina vermelha; AV) e de fosfato (reacção de von Kossa; VK) em culturas de osso alveolar humano (1ª subcultura) aos 18, 25 e 32 dias de incubação. A intensidade da coloração foi classificada da seguinte maneira: -, negativa; +/-, negativa a indetectável; +, positiva; ++, moderadamente positiva; +++, intensamente positiva.**

As culturas efectuadas em meio base, tanto na ausência como na presença de hormonas, apresentaram sempre reacções histoquímicas negativas para os depósitos de fosfato de cálcio (Fig. 4.4). A observação destas culturas por microscopia electrónica de varrimento mostrou a presença de multicamadas contínuas de células e uma matriz extracelular fibrosa sem qualquer evidência da presença de depósitos minerais, como exemplificado na Fig. 4.5 A para as efectuadas em meio base + Dex , 32 dias de incubação.

As culturas efectuadas na presença de AA e β-GF, quer na presença quer na ausência de hormonas, apresentaram reacções positivas para a formação de depósitos de fosfato de cálcio (Fig. 4.4). Contudo, na ausência de hormonas estas começaram a mineralizar mais tarde, apenas durante a última semana de incubação. As culturas tratadas com Dex isolada ou combinada com outras hormonas mineralizaram mais cedo e a intensidade de coloração foi maior do que a observada nas culturas tratadas com PTH ou 1,25-$(OH)_2D_3$ (Fig. 4.4).

Todas as culturas efectuadas com AA e β-GF apresentaram depósitos minerais nas observações efectuadas por microscopia electrónica de varrimento, o que está de acordo com os resultados histoquímicos. Na ausência de hormonas os depósitos minerais foram visualizados aos 32 dias de incubação, mas nas culturas tratadas com hormonas a presença dessas estruturas foi evidente logo aos 25 dias de cultura. Na Fig. 4.5 pode observar-se o aspecto de culturas com 25 dias de incubação efectuadas na presença de PTH (B) e Dex (C e D). A abundância dos depósitos minerais foi mais elevada nas culturas tratadas com Dex e, nas zonas de maior densidade, as estruturas globulares tenderam a fundir-se formando depósitos minerais de grandes dimensões (Fig. 4.5 D). O estudo dos depósitos minerais por microanálise de raios X, revelou a presença de picos para o cálcio (Ca) e o fósforo (P); a razão Ca/P foi próxima de 1,7, o que está de acordo com a razão Ca/P observada na hidroxiapatite (1,3 - 2,0) (Fig. 4.5 E, para as culturas efectuadas na presença de Dex).

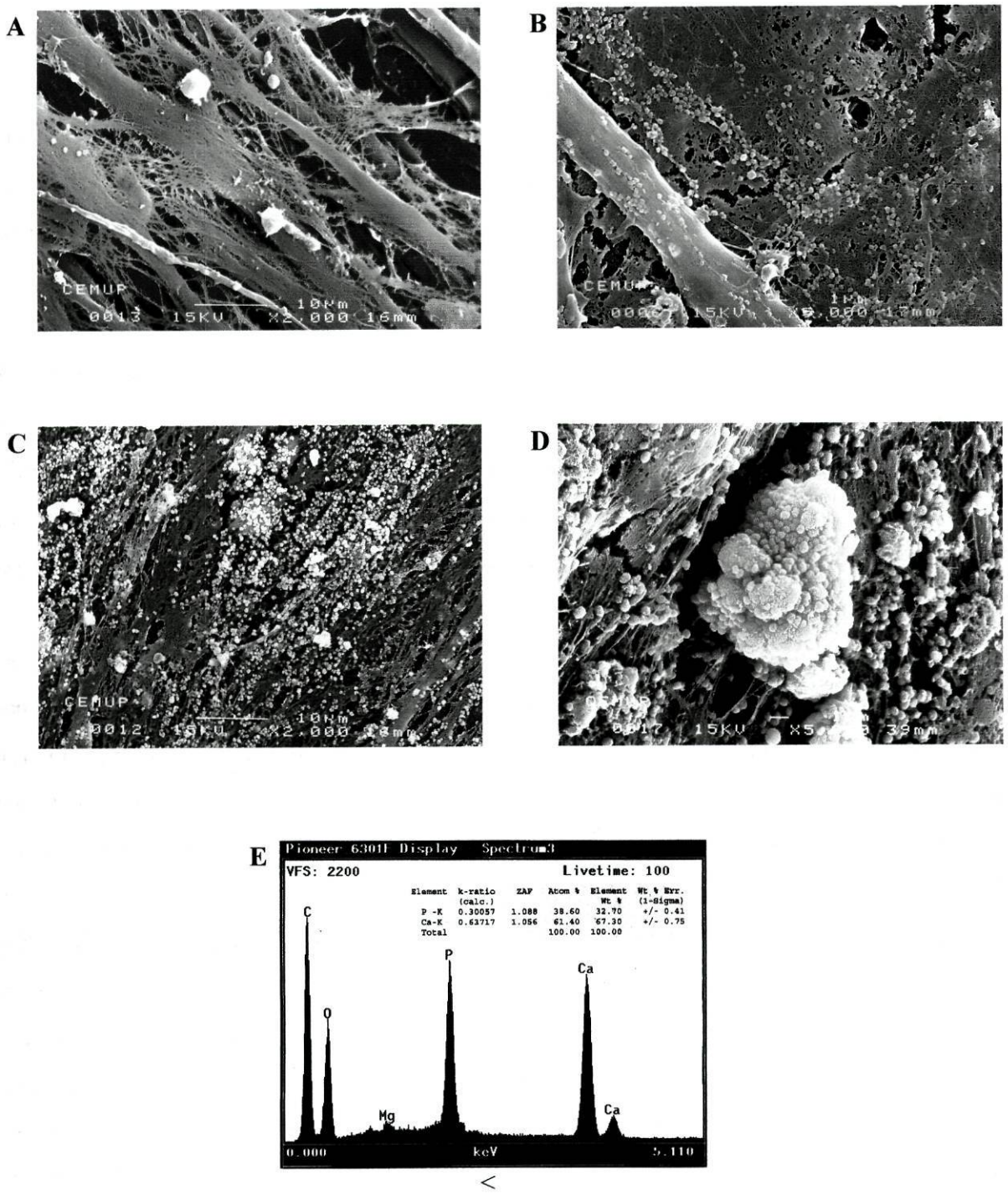


Fig. 4.5- **Fotografias de microscopia electrónica de varrimento de culturas celulares de osso alveolar humano (1ª subcultura). A- Culturas efectuadas em meio base + Dex, 32 dias; B- culturas efectuadas em meio base + AA + β-GF + PTH, 25 dias; C e D- culturas efectuadas em meio base + AA + β-GF + Dex, 25 dias; E- espectro de microanálise de raios X dos depósitos minerais presentes nas culturas tratadas com Dex.**

2.3. CONCLUSÃO

A presença de PTH, 1,25-$(OH)_2D_3$ ou Dex em culturas de osso alveolar efectuadas em condições experimentais que favorecem o processo de mineralização (meio base + AA + β-GF) influencia a proliferação celular (Fig. 4.1), a actividade de FA (Fig. 4.2) e o processo de mineralização (Figs. 4.4 e 4.5 B - D).

Os resultados relativos à proliferação celular (Fig. 4.1) mostraram a existência de diferenças significativas entre as culturas efectuadas na ausência e na presença de Dex, independentemente da presença de outras hormonas. Nas culturas efectuadas na presença de AA + β-GF mas na ausência de Dex os valores máximos foram observados ao 25° dia de cultura, enquanto que na presença do glucocorticóide as culturas apresentaram conteúdos em ADN mais elevados e os valores máximos foram observados ao 18° dia. A presença de Dex resultou também num aumento do crescimento celular nas culturas efectuadas em meio base. Estes efeitos estão provavelmente relacionados com a capacidade dos glucocorticóides de estimular a proliferação das células osteoprogenitoras [35,71,75,162,175]. A presença de 1,25-$(OH)_2D_3$ resultou também num aumento do crescimento celular, relativamente às culturas controlo (AA + β-GF), (Fig. 4.1).

A adição de PTH, 1,25-$(OH)_2D_3$ ou Dex às culturas efectuadas na presença de AA e β-GF resultou num aumento da actividade de FA ao longo de todo o período de incubação e a actividade máxima da enzima foi observada mais precocemente. A PTH e, especialmente, a Dex induziram um aumento significativo da actividade de FA. A presença de Dex também contribuiu para um aumento da actividade enzimática nas culturas efectuadas em meio base (Fig. 4.2).

Nas culturas tratadas com uma combinação de Dex e outras hormonas verificou-se, ao 18° dia, uma diminuição significativa dos valores máximos observados na actividade desta enzima relativamente às culturas expostas apenas à Dex; a diminuição observada seguiu a seguinte ordem: AA + β-GF + Dex > AA + β-GF + Dex + 1,25$(OH)_2D_3$ > AA + β-GF + Dex + PTH. De salientar que a diminuição mais pronunciada registou-se nas culturas contendo PTH, condição experimental que motivou um aumento mais significativo da actividade de FA quando as culturas foram realizadas na ausência de Dex; neste caso, a actividade máxima

observada nas várias culturas verificou-se pela seguinte ordem: AA + β-GF < AA + β-GF + 1,25-$(OH)_2D_3$ < AA + β-GF + PTH, (Fig. 4.2).

As culturas de osso alveolar humano efectuadas em meio base (sem AA e β-GF), na ausência ou na presença de hormonas, não apresentaram capacidade de formação de depósitos minerais (Figs. 4.4 e 4.5 A). Estes resultados estão de acordo com os estudos descritos na literatura que mostram que as culturas de células osteoblásticas efectuadas na ausência de β-GF não apresentam mineralização da matriz extracelular[35,159,175,186].

Todas as culturas efectuadas na presença de AA e β-GF apresentaram capacidade de formação de áreas mineralizadas na matriz extracelular. Os resultados relativos às reacções histoquímicas e às observações efectuadas por microscopia electrónica de varrimento (Figs. 4.4 e 4.5) permitiram verificar que as culturas efectuadas na presença de Dex (adicionada isolada ou combinada com outras hormonas) possuíam maior capacidade para formar depósitos de fosfato de cálcio na matriz extracelular, do que as culturas efectuadas na ausência da referida hormona (culturas tratadas com PTH e 1,25-$(OH)_2D_3$).

Os níveis de fosfatase ácida e fosfatase ácida resistente ao ácido tartárico foram insignificantes nas culturas efectuadas nas várias condições experimentais, sugerindo uma contaminação desprezável por fibroblastos e/ou osteoclastos.

Nas culturas celulares de osso alveolar a presença de Dex resultou numa maior indução do fenótipo osteoblástico, do que a observada nas culturas expostas à acção das outras hormonas. Estudos efectuados com células osteoblásticas de rato e humanas mostraram que o tratamento das culturas com Dex promovia o crescimento e diferenciação das células osteoprogenitoras, abreviando o período de proliferação celular observado no modelo sequencial de expressão do fenótipo osteoblástico [17,35,71,75,155,162,173,175,176]. Os resultados apresentados neste trabalho estão de acordo com o descrito na literatura, isto é, as culturas tratadas com Dex apresentaram um conteúdo em ADN mais elevado e a proliferação celular foi interrompida mais precocemente, sendo seguida pela mineralização da matriz orgânica.

3. COMPORTAMENTO DAS CULTURAS CELULARES EXPOSTAS À DEXAMETASONA EM DIFERENTES FASES DO PERÍODO DE INCUBAÇÃO

Nos ensaios anteriores verificou-se que das três hormonas estudadas (Dex, PTH e 1,25-$(OH)_2D_3$), a Dex era aquela que apresentava um maior efeito na indução do fenótipo osteoblástico nas culturas de celulares de osso alveolar humano. Efectuou-se então um estudo que teve como objectivo avaliar se a presença de Dex era necessária durante todo o período de cultura ou apenas durante determinada fase do processo de proliferação-diferenciação. Para isso, realizou-se um estudo comparativo do efeito desta hormona quando adicionada ao meio de cultura de uma forma contínua ou apenas em períodos pré-definidos, durante o tempo de incubação.

3.1. MATERIAIS E MÉTODOS

As culturas primárias foram obtidas em condições experimentais idênticas às descritas no capítulo II. Após tripsinização da cultura primária, as células foram cultivadas (10^4 células/cm^2) durante 35 dias em meio base suplementado com AA (50 μg/mL) e β-GF a 10 mM na ausência (situação controlo) e na presença de Dex a 10 nM. As células foram cultivadas em duas situações experimentais. A Dex foi adicionada ao meio de cultura (1) durante todo o período de cultura e (2) em diferentes fases do período de cultura, nomeadamente, durante a primeira (1d-7d), a segunda (7d-14d), a terceira (14d-21d), a quarta (21d-28d) e a quinta (28d-35d) semanas de cultura; no período anterior e posterior à adição da Dex as células foram cultivadas em meio base suplementado com AA e β-GF.

As culturas celulares foram caracterizadas bioquimicamente (aos 1, 4, 7, 14, 21, 28 e 35 dias) para avaliação da proliferação celular (ensaio do MTT, conteúdo em proteína total e em ADN) e da actividade de FA e histoquimicamente (aos 14, 21, 28 e 35 dias de cultura) para permitir a detecção de células produtoras de FA e a identificação da presença de depósitos minerais na matriz extracelular. O meio recolhido das culturas efectuadas nas diferentes situações experimentais foi analisado ao longo do período de incubação para quantificação dos conteúdos em cálcio e fósforo ionizados.

3.2. RESULTADOS

PROLIFERAÇÃO CELULAR

A observação das culturas por microscopia de fase invertida permitiu verificar que as células em subcultura proliferaram gradualmente ao longo do período de incubação. A proliferação celular foi acompanhada pela produção de uma matriz extracelular abundante. As culturas controlo apresentaram estruturas nodulares tridimensionais de pequenas dimensões que aumentaram de tamanho com o tempo de incubação, sendo visíveis macroscopicamente a partir da segunda - terceira semanas. A exposição contínua das culturas à acção da Dex e, também, durante a primeira e segunda semanas de cultura resultou num aumento significativo do número e tamanho das estruturas nodulares que começaram a ser visíveis alguns dias mais cedo. Nas culturas tratadas com a hormona durante a terceira, quarta e quinta semanas pouco ou nenhum efeito foi observado relativamente à situação controlo.

Culturas controlo

Nas culturas efectuadas na ausência de Dex (situação controlo) as células proliferaram gradualmente até ao 21º dia, observando-se, de seguida, uma diminuição lenta na redução do MTT (Fig. 4.6 A). O conteúdo em ADN aumentou, principalmente a partir do 7º dia de cultura, atingiu uma fase estacionária durante a quarta semana de incubação e, em seguida, diminuiu (Fig. 4.6 B).

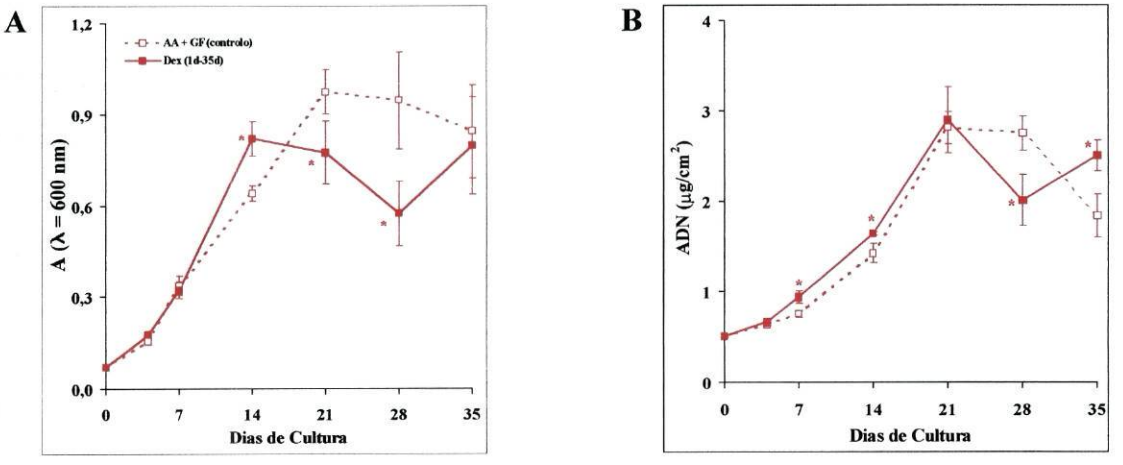


Fig. 4.6- **Ensaio do MTT (A) e conteúdo em ADN (B) de culturas de osso alveolar humano mantidas por um período de 35 dias e efectuadas na ausência (controlo) e na presença contínua de Dex. *Significativamente diferente da situação controlo.**

Culturas expostas à Dex durante os 35 dias de incubação

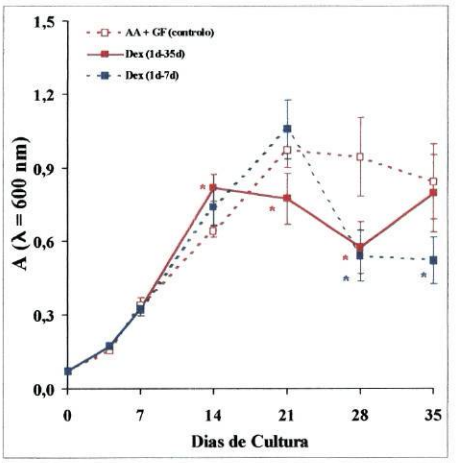
Os valores observados no ensaio do MTT mostraram que as células expostas à acção contínua da Dex proliferaram gradualmente até ao 14° dia, atingindo um valor significativamente superior ao observado na situação controlo; de seguida, verificou-se uma diminuição até ao 28° dia, observando-se durante este período valores significativamente inferiores aos da situação controlo; entre o 28° e o 35° dias notou-se um novo aumento na redução do MTT, e no 35° dia o valor registado foi semelhante ao observado nas culturas controlo (Fig. 4.6 A). As culturas expostas continuamente à Dex apresentaram a partir do 3° dia de cultura um pequeno aumento nos conteúdos em ADN, relativamente à situação controlo, e, depois, uma diminuição; os valores máximos foram observados próximo do 21° dia de cultura (Fig. 4.6 B).

Culturas expostas à Dex em diferentes fases do período de incubação

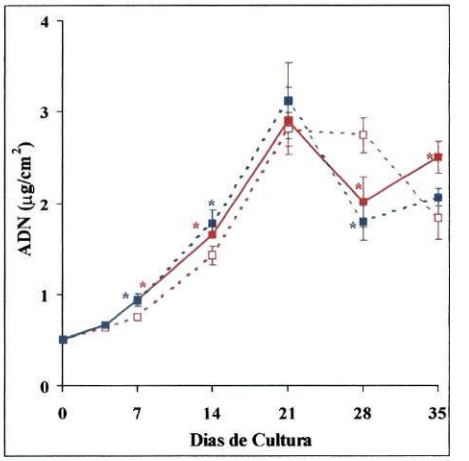
- ***Primeira semana (1d-7d)***: Nas culturas expostas à Dex durante a primeira semana, os valores observados no ensaio do MTT foram semelhantes aos da situação controlo até ao 21° dia, fase em que se atingiram os valores máximos. Em seguida, diminuíram bruscamente até ao 28° dia e mantiveram-se constantes até ao fim do período de incubação; nos 28° e 35° dias os valores foram significativamente inferiores aos observados na situação controlo (Fig. 4.7 AI). O conteúdo em ADN seguiu um padrão semelhante ao observado nas culturas tratadas continuamente com Dex (Fig. 4.7 BI).
- ***Segunda (7d-14d) e terceira (14d-21d) semanas***: O ensaio do MTT mostrou resultados idênticos aos observados nas culturas tratadas com Dex durante a primeira semana (Fig. 4.7 AII e AIII). A exposição das culturas à acção da Dex durante a segunda (Fig. 4.7 BII) e terceira (Fig. 4.7 BIII) semanas resultou num aumento do conteúdo em ADN, relativamente à situação controlo bem como à situação em que as culturas foram tratadas continuamente com Dex. Os valores máximos foram observados ao 21° dia de cultura, seguindo-se uma diminuição no conteúdo em ADN.
- ***Quarta semana (21d-28d)***: A adição de Dex conduziu a um pequeno aumento da proliferação celular relativamente à situação controlo (Fig. 4.7 AIV e BIV).
- ***Quinta semana (28d-35d)***: A adição da hormona durante a quinta semana de cultura, isto é, após a fase de proliferação activa das células em cultura, não resultou em efeitos significativos na proliferação celular (resultados não apresentados).

O conteúdo em proteína total nas diferentes situações experimentais seguiu um padrão semelhante ao observado no conteúdo em ADN (resultados não apresentados).

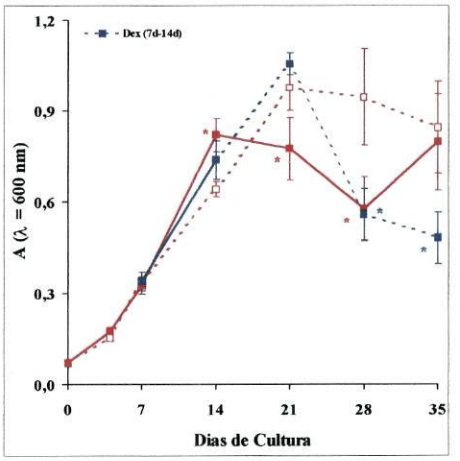
AI



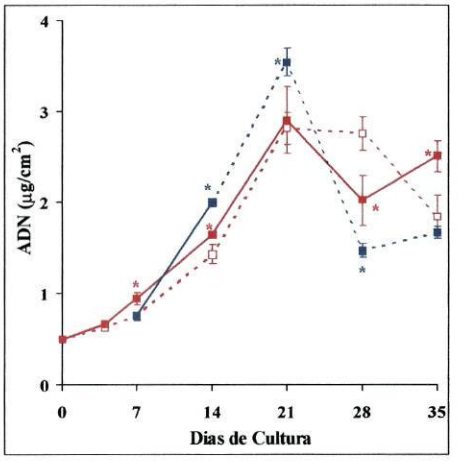
BI



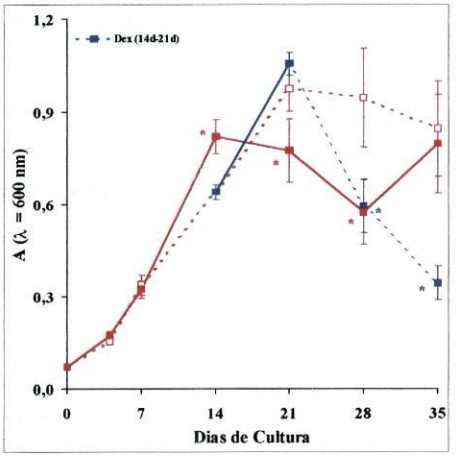
AII



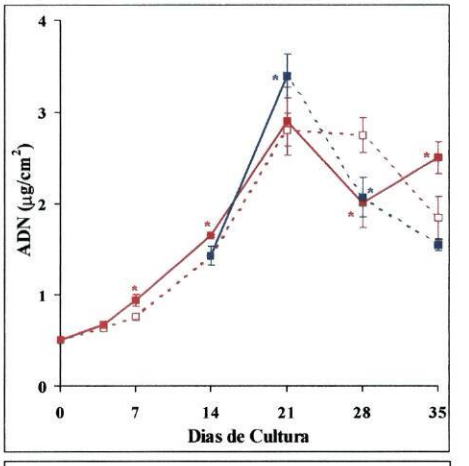
BII



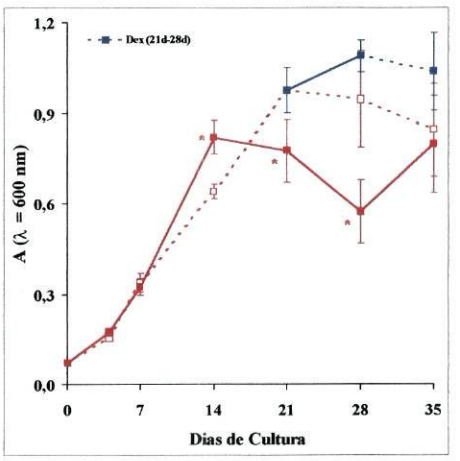
AIII



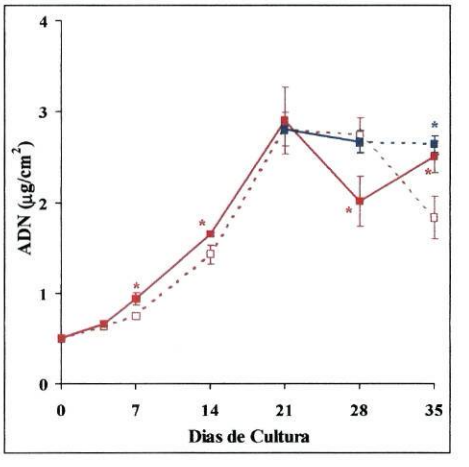
BIII



AIV



BIV



← Fig.4.7- **Ensaio do MTT (A) e conteúdo em ADN (B) de culturas de osso alveolar humano mantidas por um período de 35 dias e efectuadas na ausência (controlo) e na presença de Dex. Culturas controlo: linha a tracejado; culturas expostas continuamente à Dex: linha contínua. Culturas expostas à Dex durante a primeira (I), segunda (II), terceira (III) e quarta (IV) semanas de cultura: o período de exposição está marcado com uma linha contínua. * Significativamente diferente do controlo.**

ACTIVIDADE DE FOSFATASE ALCALINA

Culturas controlo

Nas culturas controlo (efectuadas na presença de AA e β-GF) a actividade de FA aumentou a partir do 7° dia de cultura, atingiu valores máximos próximo do 21° dia e diminuiu lentamente durante as duas últimas semanas de cultura (Fig. 4.8 A).

Culturas expostas à Dex durante os 35 dias de incubação

A presença contínua de Dex nas culturas resultou num aumento significativo da actividade desta enzima e os níveis máximos foram alcançados mais cedo, próximo do 14° dia, após o que se observou uma diminuição muito acentuada da actividade de FA (Fig. 4.8 A).

Culturas expostas à Dex em diferentes fases do período de incubação

- ***Primeira semana (1d-7d)***: As culturas tratadas com Dex durante a primeira semana de incubação apresentaram um padrão de actividade de FA semelhante ao observado nas culturas expostas à acção contínua da referida hormona (Fig. 4.8 B).
- ***Segunda (7d-14d) e terceira (14d-21d) semanas***: a presença de Dex durante a segunda (Fig. 4.8 C) e terceira (Fig. 4.8 D) semanas de incubação também resultou num aumento da actividade de FA, relativamente à situação controlo; contudo, o aumento foi menos pronunciado do que o verificado na situação em que as células foram tratadas com a hormona durante a primeira semana. Os valores máximos foram observados próximo do 14° e 21° dias, respectivamente nas culturas expostas durante a segunda e terceira semana.
- ***Quarta semana (21d-28d)***: nas culturas expostas durante a quarta semana verificou-se um pequeno aumento da actividade enzimática durante o período de exposição (Fig. 4.8 E)
- ***Quinta semana (28d-35d)***: a adição da hormona durante a quinta semana de cultura não afectou significativamente a actividade de FA, relativamente à situação controlo (Fig. 4.8 F).

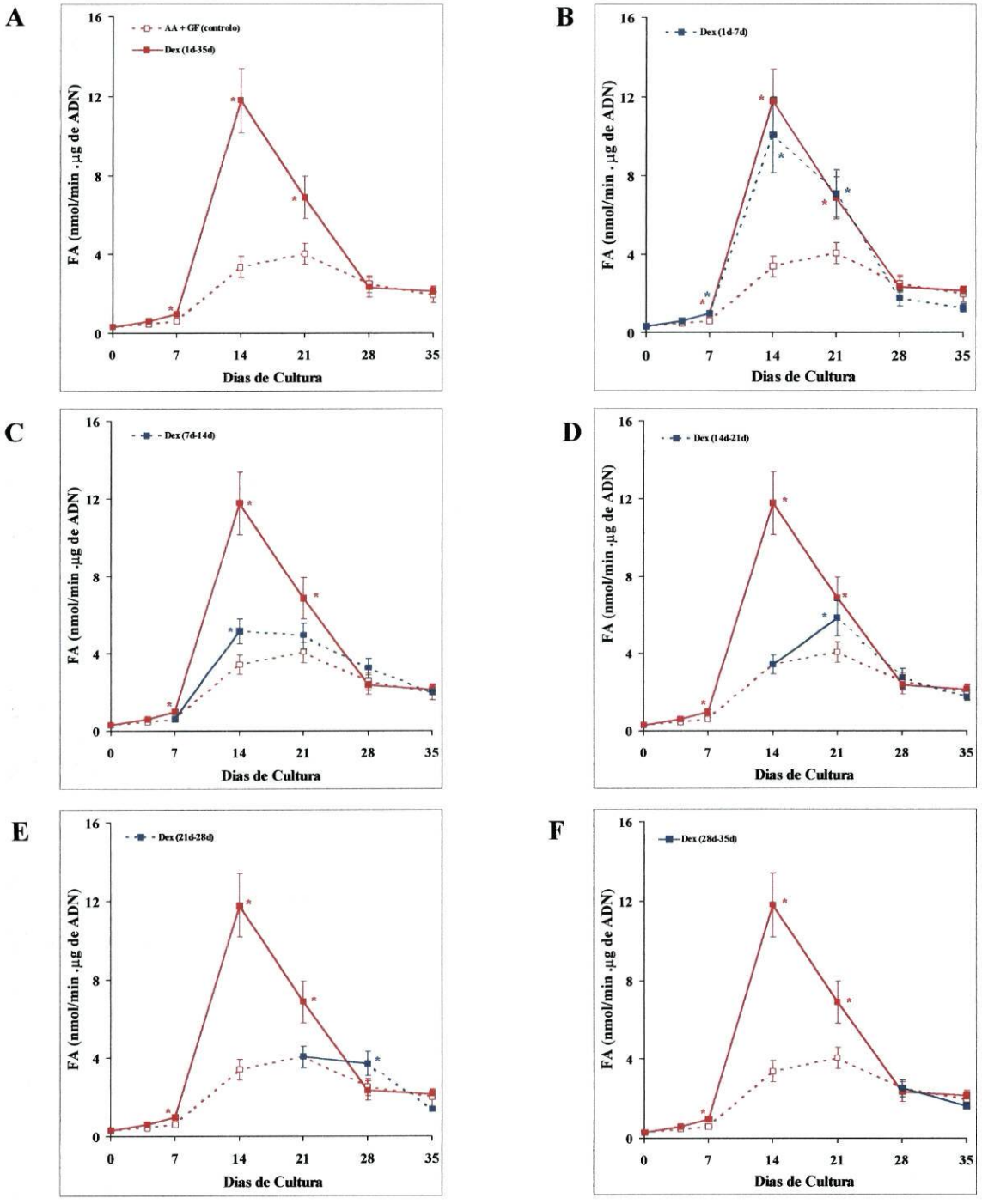


Fig. 4.8- **Actividade de FA de culturas de osso alveolar humano mantidas por um período de 35 dias e efectuadas na ausência (controlo) e na presença de Dex. A- Culturas controlo: linha a tracejado; culturas expostas continuamente à Dex: linha contínua. Culturas expostas à Dex durante a primeira (B), segunda (C), terceira (D), quarta (E) e quinta (F) semanas de cultura: o período de exposição está marcado com uma linha contínua. * Significativamente diferente do controlo.**

Tanto nas culturas controlo como nas expostas à acção da Dex, a actividade de FA diminuiu significativamente após os níveis máximos terem sido atingidos.

IDENTIFICAÇÃO HISTOQUÍMICA DE FA E DE DEPÓSITOS DE FOSFATO DE CÁLCIO

Na totalidade das situações experimentais estudadas, a reacção de coloração para a FA foi positiva em todos os dias de teste e os resultados obtidos foram concordantes com os observados na determinação bioquímica desta enzima. A intensidade de coloração foi significativamente maior nas culturas tratadas com Dex, sendo esta diferença perfeitamente evidente ao 14° dia de cultura (resultados não apresentados).

As reacções de alizarina vermelha e de von Kossa foram negativas aos 14 dias de incubação, indicando que estas culturas ainda não apresentavam áreas mineralizadas. Nas culturas controlo, estas reacções foram positivas apenas ao 28° dia, sugerindo que a formação de depósitos minerais ocorreu a partir da terceira semana de incubação. Nas culturas expostas continuamente à acção da Dex ou apenas durante a primeira e segunda semanas, a formação de depósitos minerais foi observada mais cedo, já que estas reacções foram positivas no 21° dia; as reacções foram ligeiramente mais intensas nas culturas expostas à hormona durante a segunda semana. As culturas tratadas com Dex durante a terceira, quarta e quinta semanas começaram a mineralizar ligeiramente mais tarde, apresentando um comportamento semelhante ao observado nas culturas controlo; no entanto, nas culturas expostas à Dex durante a terceira semana ainda se observou um ligeiro efeito da hormona, dado que estas reacções ao 28° e 35° dias de cultura foram mais intensas do que as observadas nas culturas controlo (Fig. 4.9).

CONTEÚDO EM Pi E EM Cai NO MEIO DE CULTURA

A determinação dos teores em Pi e Cai nos meios de cultura incubados na ausência de células revelou uma constância de valores ao longo do tempo de incubação, indicando ausência de deposição mineral nas condições físico-químicas em que o ensaio foi realizado (fig. 4.10 AI e BI).

Culturas controlo

Os meios recolhidos das culturas controlo mostraram um aumento nas concentrações do Pi até ao 15°-18° dias de cultura (de cerca de 2,2 mmol/L para 7,7 mmol/L), (Fig. 4.10 AII). Dado que os valores medidos não são cumulativos, os resultados apresentados para o Pi sugerem que a capacidade das células para hidrolizar o β-GF aumentou com o tempo de incubação.

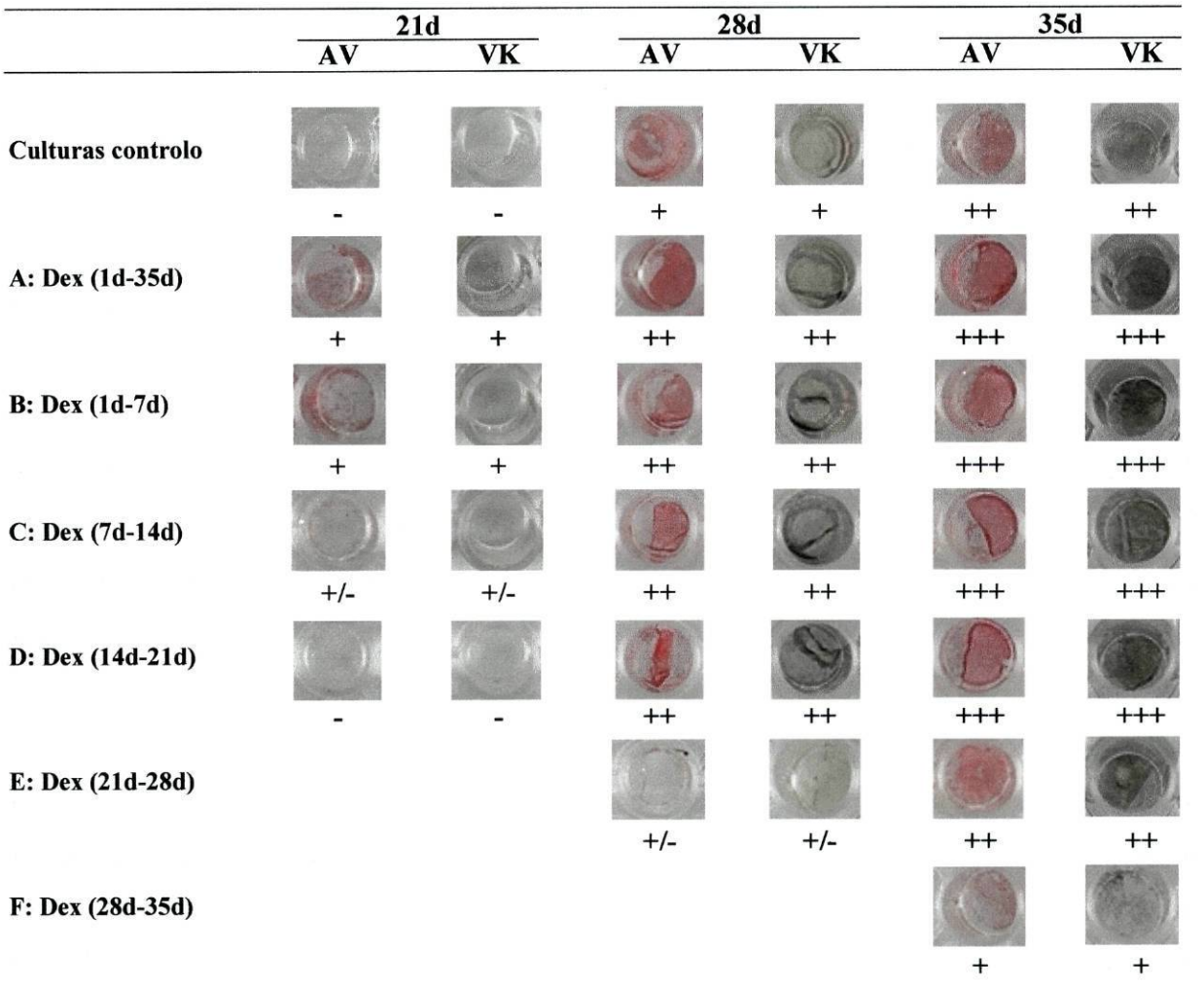


Fig. 4.9- **Identificação da presença de depósitos de cálcio (reacção de alizarina vermelha, AV) e de fosfato (reacção de von Kossa, VK) em culturas celulares de osso alveolar humano aos 21, 28 e 35 dias e efectuadas na ausência (controlo) e na presença de Dex, adicionada durante todo o tempo de incubação (A) ou durante a primeira (B), segunda (C), terceira (D), quarta (E) e quinta (F) semanas de cultura. A intensidade da coloração foi classificada da seguinte maneira: -, negativa; +/-, positiva a indetectável; +, positiva; ++, moderadamente positiva; +++, intensamente positiva.**

Estes resultados foram concordantes com o padrão de variação observado para a actividade de FA, segundo o qual os níveis da enzima aumentaram significativamente durante a segunda semana de cultura (Fig. 4.8 A). Durante este período, os níveis de Cai não se alteraram significativamente (Fig. 4.10 BII). A partir do 21° dia de cultura observou-se uma diminuição significativa nos níveis do Pi e do Cai (Fig. 4.10 AII e BII). O consumo destas espécies a partir do meio de cultura reflecte a formação de depósitos de fosfato de cálcio. Estes resultados estão de acordo com os estudos previamente descritos no capítulo III e também com outros efectuados em culturas celulares de medula óssea de rato e humana em condições

experimentais semelhantes às descritas neste trabalho, os quais mostraram que a quantificação do Pi e do Cai no meio de cultura, ao longo do período de incubação, fornecia informações importantes relativamente ao processo de mineralização [194-196].

Culturas expostas à Dex durante os 35 dias de incubação

As culturas expostas continuamente à acção da Dex apresentaram, apesar de algumas diferenças evidentes, um padrão de comportamento semelhante ao observado nas culturas controlo. Os níveis do Pi começaram a aumentar mais cedo e o valor máximo (8,4 mmol/L) foi registado próximo do 15º dia (Fig. 4.10 AII), o que está de acordo com o padrão de comportamento observado para a actividade de FA nas culturas tratadas com a hormona (Fig. 4.8 A). Os níveis do Pi e do Cai também começaram a diminuir alguns dias mais cedo (a partir do 15º dia) do que na situação controlo (Fig. 4.10 AII e BII).

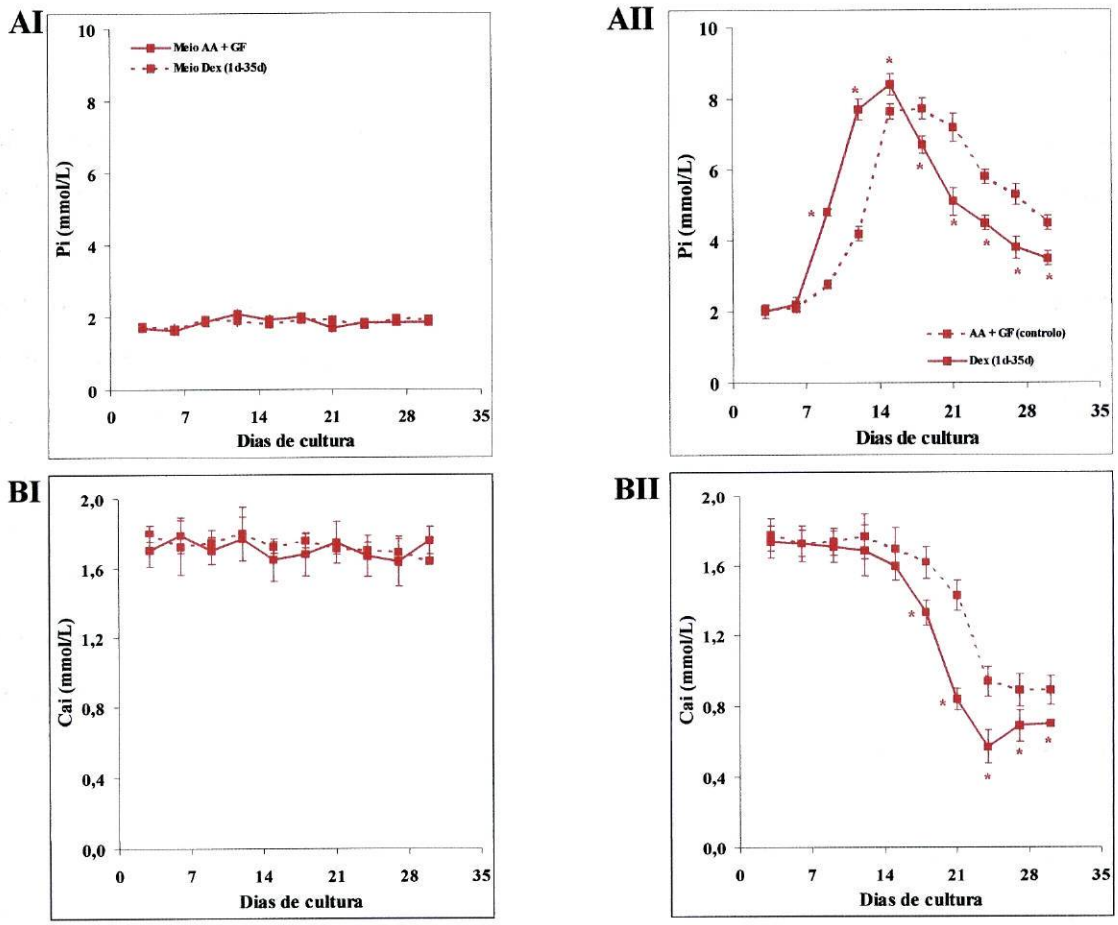


Fig. 4.10- **Conteúdo em Pi (A) e em Cai (B) nos meios de cultura incubados na ausência (I) e na presença (II) de células de osso alveolar humano, cultivadas por um período de 35 dias na ausência (controlo) e na presença de Dex. Culturas controlo: linha a tracejado; culturas expostas continuamente à Dex: linha contínua. * Significativamente diferente do controlo.**

Culturas expostas à Dex em diferentes fases do período de incubação

- ***Primeira semana (1d-7d)***: Os níveis de Pi e Cai no meio recolhido de culturas tratadas com Dex durante a primeira semana seguiram um padrão idêntico ao observado nas culturas tratadas continuamente com esta hormona (Fig. 4.11 AI e BI).
- ***Segunda semana (7d-14d)***: os níveis de Pi e de Cai no meio das culturas tratadas com Dex durante a segunda semana foram intermédios entre os observados para as situações efectuadas na ausência e na presença contínua da hormona (Fig. 4.11 AII e BII).
- ***Terceira (14d-21d), quarta (21d-28d) e quinta (28d-35d) semanas***: a presença de Dex durante a terceira (Fig. 4.11 AIII e BIII), quarta e quinta semanas de incubação (resultados não apresentados) não resultou em diferenças significativas relativamente à situação controlo.

3.3. CONCLUSÃO

As culturas de osso alveolar humano tratadas com Dex durante todo o período de incubação apresentaram um pequeno aumento da proliferação celular, especialmente durante as duas primeiras semanas e o crescimento celular tendeu a cessar mais cedo do que nas culturas efectuadas na ausência do glucocorticóide. Por outro lado, as culturas tratadas com Dex mostraram uma evidente indução da diferenciação das células osteoblásticas, como demonstrado pelo aumento significativo da actividade de FA e também pela mineralização mais precoce da matriz. Nestas culturas, o consumo do Pi e do Cai ocorreu a partir do 15° dia de cultura e no 21° dia as reacções histoquímicas que permitiam detectar a presença de depósitos minerais foram positivas. Estes resultados estão de acordo com os observados em estudos prévios que mostraram que as culturas efectuadas na presença de Dex apresentavam uma actividade de FA e capacidade de formação de áreas mineralizadas mais elevadas, relativamente às culturas efectuadas na ausência do glucocorticóide.

As culturas expostas à acção da Dex durante a primeira semana de cultura apresentaram um comportamento semelhante ao observado nas culturas expostas continuamente à hormona, isto é, verificou-se uma indução do fenótipo osteoblástico. Este efeito também foi verificado nas culturas expostas durante a segunda semana, contudo em menor extensão, como demonstrado pelo pequeno aumento na actividade de FA e uma certa diminuição na intensidade de mineralização da matriz. A exposição à Dex durante a terceira e quarta

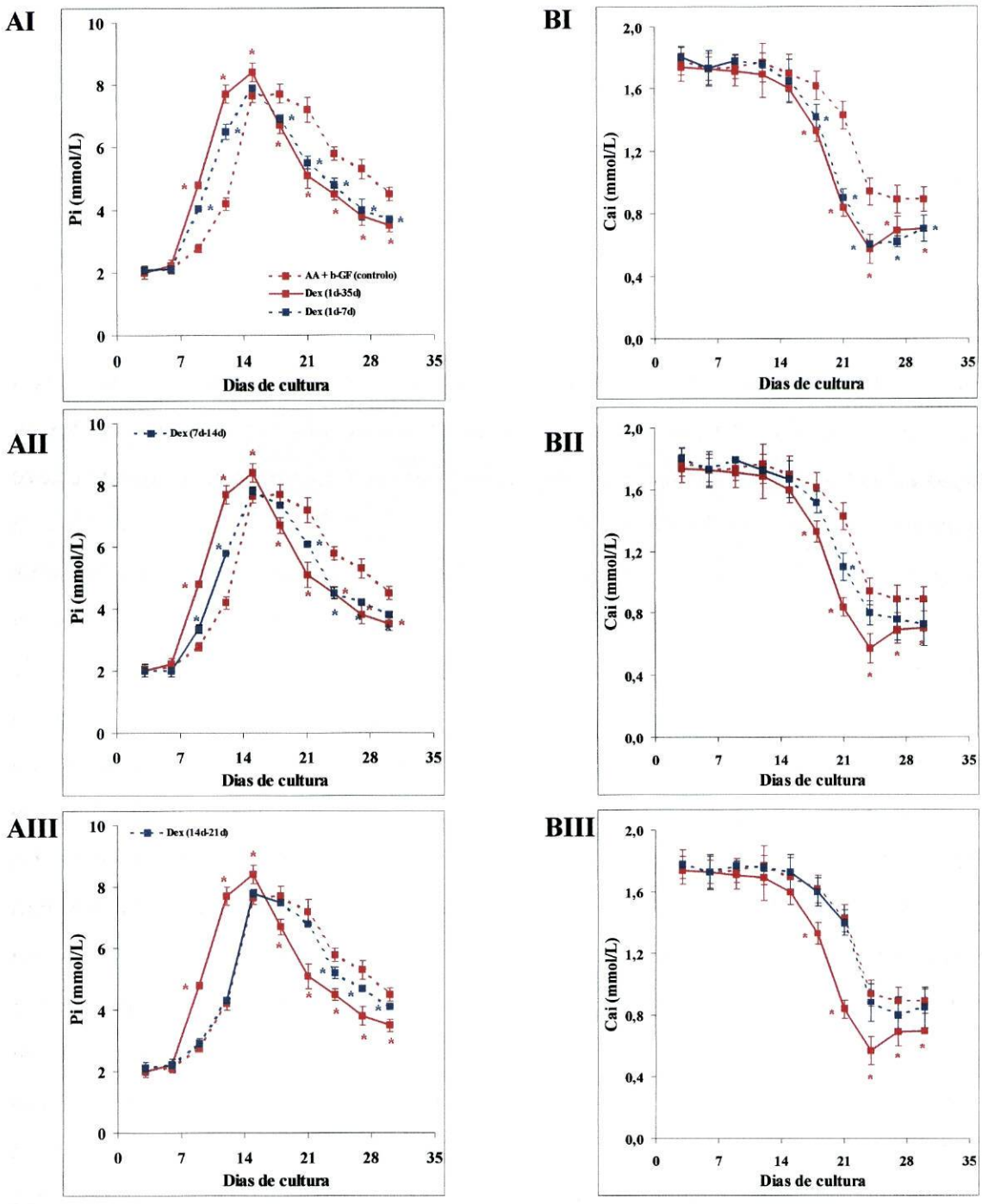


Fig. 4.11- **Conteúdo em Pi (A) e em Cai (B) no meio recolhido de culturas de osso alveolar humano mantidas por um período de 35 dias e efectuadas na ausência (controlo) e na presença de Dex. Culturas controlo: linha a tracejado; culturas expostas continuamente à Dex: linha contínua. Culturas expostas à Dex durante a primeira (I), segunda (II) e terceira (III) semanas de cultura: o período de exposição está marcado com uma linha contínua. * Significativamente diferente do controlo.**

semanas resultou num pequeno efeito na proliferação celular e na actividade de FA. Nas culturas expostas durante a terceira semana, ainda se observou uma pequena indução no

processo de mineralização. Na quinta semana de exposição não foram observadas diferenças relativamente à situação controlo.

A presença de Dex nas culturas celulares de osso alveolar durante as diferentes fases do tempo de cultura resultou sempre num aumento da proliferação celular e da actividade de FA, sugerindo que este glucocorticóide influencia as células da linhagem osteoblástica em diferentes estados de diferenciação, como demonstrado em outros sistemas de cultura [204,205]. Contudo, o tratamento com a Dex produziu diferentes efeitos, dependentes da fase ("lag", proliferativa ou pós-proliferativa) em que esta foi adicionada às culturas. O efeito da Dex na proliferação celular foi particularmente evidente nas culturas em que o glucocorticóide esteve presente durante a fase proliferativa (segunda e terceira semanas de cultura). Pelo contrário, a indução da actividade de FA e a capacidade de formação de áreas mineralizadas, dois marcadores osteoblásticos, foram mais pronunciadas nas culturas expostas à Dex durante a primeira semana de incubação. A adição do glucocorticóide durante as fases mais tardias de evolução do fenótipo osteoblástico (quarta e quinta semanas) resultou num pequeno ou nenhum efeito nos parâmetros medidos. Estas observações sugerem, como observado para a maioria dos compostos que afectam o metabolismo ósseo, que os efeitos da Dex no crescimento celular e na actividade funcional dependem do estado de diferenciação das células osteoblásticas. Nas culturas celulares de osso alveolar, a indução do fenótipo osteoblástico pela Dex parece resultar principalmente da acção desta hormona nas células que se encontram nos estados mais precoces de diferenciação. Esta afirmação parece ser corroborada pelo facto das culturas expostas à acção da Dex continuamente ou apenas durante a primeira semana de incubação apresentarem um comportamento celular (relação proliferação-diferenciação) semelhante, pois em ambas as situações foi observada uma aceleração da diferenciação osteoblástica. A diminuição do efeito da Dex quando presente nas fases mais tardias do tempo de cultura era esperada, já que nestas fases as células se encontravam altamente diferenciadas.

Os resultados deste estudo mostraram que os efeitos da Dex nas culturas celulares de osso alveolar dependeram do estado de diferenciação das células em cultura e os tratamentos precoces resultaram numa indução mais significativa dos marcadores osteoblásticos como a actividade de FA e a capacidade de formação de áreas mineralizadas na matriz. Estas observações sugerem que a exposição curta e/ou local da hormona pode não resultar em efeitos deletérios no tecido ósseo.

4. COMPORTAMENTO DAS CULTURAS CELULARES EXPOSTAS À PTH EM DIFERENTES FASES DO PERÍODO DE INCUBAÇÃO

No estudo descrito no ponto 4.2 verificou-se que a PTH produzia um efeito indutor no desenvolvimento do fenótipo osteoblástico nas culturas celulares de osso alveolar humano. Apresentam-se seguidamente os resultados de um estudo que teve como objectivo uma melhor caracterização do efeito da PTH na sequência de proliferação-diferenciação destas culturas. Neste estudo avaliou-se o comportamento das culturas celulares de osso alveolar humano quando tratadas com PTH de forma contínua ou apenas durante determinadas fases do período de cultura. O efeito da PTH foi ainda estudado em culturas mantidas na ausência e na presença de Dex, substância que afecta significativamente o comportamento osteoblástico destas culturas, como demonstrado nos estudos descritos anteriormente.

4.1. MATERIAIS E MÉTODOS

As culturas primárias foram obtidas em condições experimentais idênticas às descritas no capítulo II. Após tripsinização da cultura primária, as células foram cultivadas (10^4 células/cm^2) durante 42 dias. O efeito da PTH foi estudado em culturas de osso alveolar (primeira subcultura) mantidas em duas situações experimentais: (1) meio base + AA (50 μg/mL) + β-GF (10 mM) e (2)) meio base + AA (50 μg/mL) + β-GF (10 mM) + Dex (10 nM). A PTH, na concentração de 10 nM, foi adicionada ao meio de cultura (i) durante todo o período de incubação e (ii) em diferentes fases do período de incubação, nomeadamente, durante a primeira (1d-7d), a segunda (7d-14d), a terceira (14d-21d), a quarta (21d-28d), a quinta (28d-35d) e a sexta (35d-42d) semanas de cultura.

As culturas celulares foram caracterizadas bioquimicamente (aos 1, 3, 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias de cultura) para avaliação da proliferação celular (ensaio do MTT, conteúdo em proteína total e em ADN) e da actividade de FA e histoquimicamente (aos 14, 18, 21, 25, 28, 35 e 42 dias de cultura) para permitir a detecção de células produtoras de fosfatase alcalina e a identificação da presença de depósitos minerais na matriz extracelular. O meio de cultura

recolhido das diferentes situações experimentais foi analisado ao longo do período de incubação para quantificação dos conteúdos em cálcio (Cai) e fósforo (Pi) ionizados.

4.2. RESULTADOS

4.2.1. CULTURAS EFECTUADAS NA PRESENÇA DE AA E β-GF

PROLIFERAÇÃO CELULAR

A observação das culturas por microscopia de fase invertida permitiu verificar que as células em subcultura, nas várias situações experimentais, proliferaram gradualmente ao longo do período de incubação, originando estruturas nodulares tridimensionais que foram visíveis macroscopicamente a partir da terceira semana de incubação.

Cultura controlo

Nas culturas efectuadas na presença de AA e β-GF (situação controlo) verificou-se que as células proliferaram gradualmente até ao 21º dia, observando-se, de seguida, uma fase em que a redução do sal MTT diminuiu suavemente até ao 42º dia de cultura (Fig. 4.12 A). Os conteúdos em ADN (Fig. 4.12 B) e proteína total (resultados não apresentados) seguiram um padrão semelhante ao observado no ensaio do MTT.

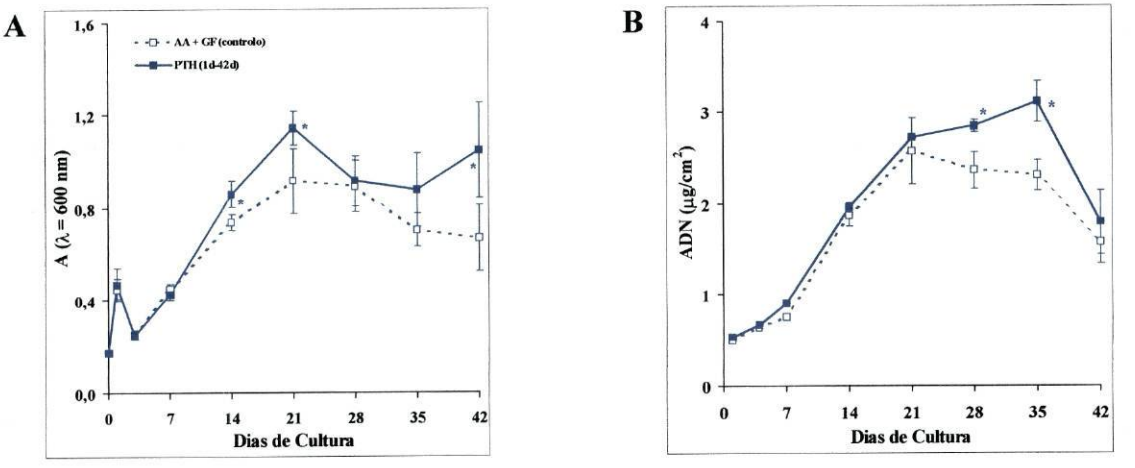


Fig. 4.12- **Efeito da PTH na redução do MTT (A) e conteúdo em ADN (B) de culturas de osso alveolar humano efectuadas na presença de AA e β-GF (controlo) e mantidas por um período de 42 dias. A PTH esteve presente durante todo o tempo de cultura. Linhas a contínuo: presença da PTH; linha a tracejado: ausência de PTH. * Significativamente diferente da situação controlo.**

Culturas expostas à PTH durante os 42 dias de incubação

Nas culturas tratadas continuamente com a PTH verificou-se que as células proliferaram gradualmente até ao 21° dia; de seguida, este parâmetro diminuiu até ao 28°-35° dias e começou a aumentar novamente. A presença da PTH resultou num aumento significativo da proliferação celular durante a segunda e terceira semanas de cultura (Fig. 4.12 A). A adição contínua de PTH levou a um aumento do conteúdo em ADN; este aumento foi significativo nos 28° e 35° dias de cultura (Fig. 4.12 B).

Culturas expostas à PTH em diferentes fases do período de incubação

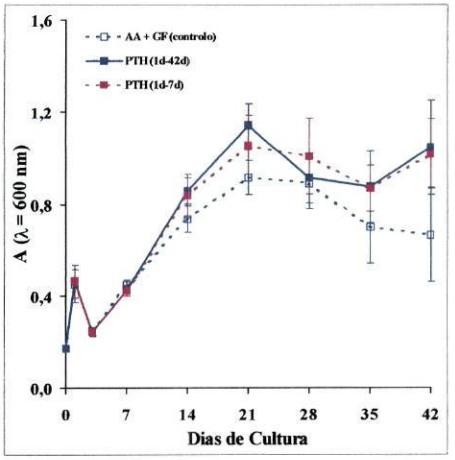
- ***Primeira semana (1d-7d)***: Nas culturas efectuadas na presença de AA + β-GF a adição de PTH durante a primeira semana de cultura resultou num pequeno aumento da proliferação celular (ensaio do MTT) relativamente à situação controlo (Fig. 4.13 AI). A presença de PTH resultou num aumento significativo do conteúdo em ADN a partir da segunda semana de cultura; de salientar que os conteúdos em ADN nos 21° e 28° dias de cultura foram significativamente superiores aos observados quer na situação controlo quer na situação em que a PTH foi adicionada continuamente ao meio de cultura (Fig.4.13 BI).

- ***Segunda (7d-14d) e terceira (14d-21d) semanas***: A proliferação celular [ensaio do MTT (Fig. 4.13 AII e AIII) e conteúdos em ADN (Fig. 4.13 BII e BIII) e proteína total (resultados não apresentados)] de culturas expostas à PTH durante a segunda e terceira semanas seguiu um padrão idêntico ao observado quando a PTH foi adicionada apenas na primeira semana.

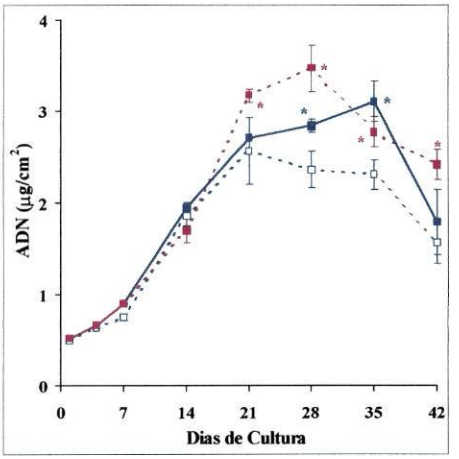
- ***Quarta (21d-28d), quinta (28d-35d) e sexta (35d-42d) semanas***: A adição de PTH nas restantes semanas do período de cultura não afectou de forma significativa a proliferação celular, relativamente à situação controlo. Na Fig. 4.13 AIV e BIV mostram-se os resultados observados nas culturas tratadas durante a quarta semana; nesta situação, observou-se um aumento do conteúdo em ADN desde o início da exposição até ao final do período de incubação.

Os conteúdos em proteína total seguiram um padrão semelhante ao observado para os conteúdos em ADN, em todas as situações experimentais estudadas (resultados não apresentados).

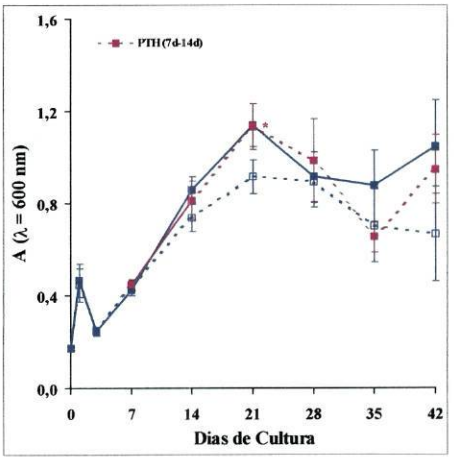
AI



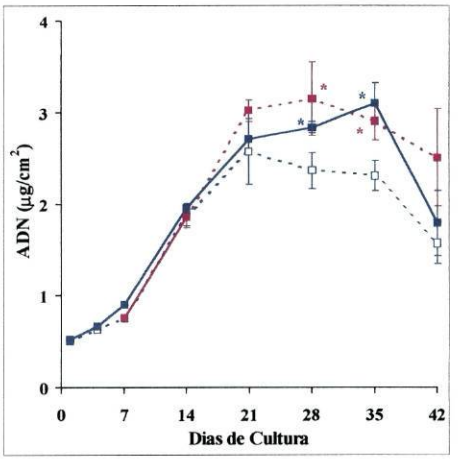
BI



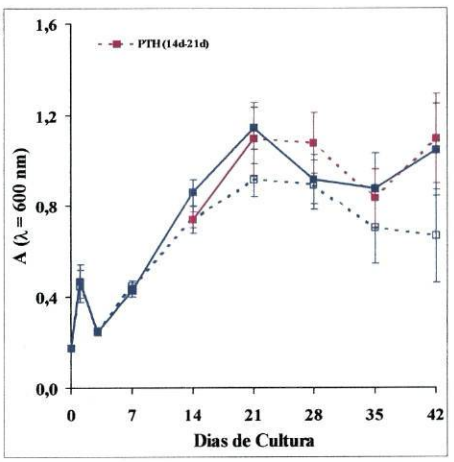
AII



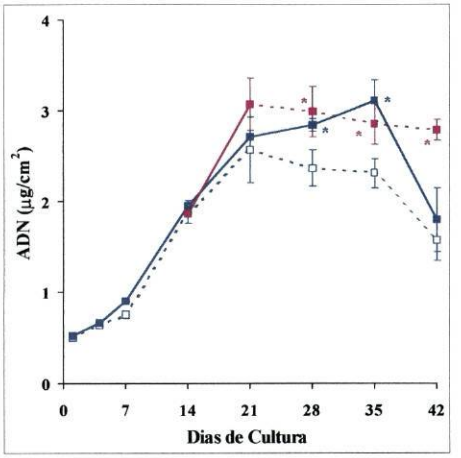
BII



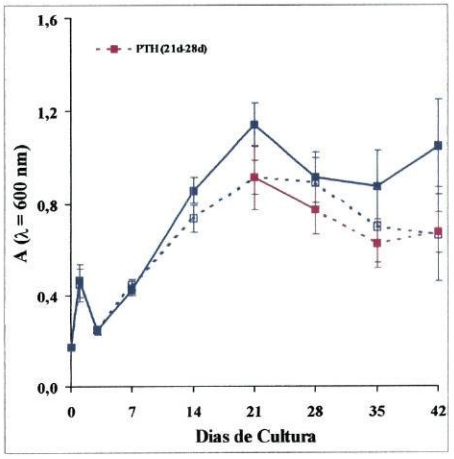
AIII



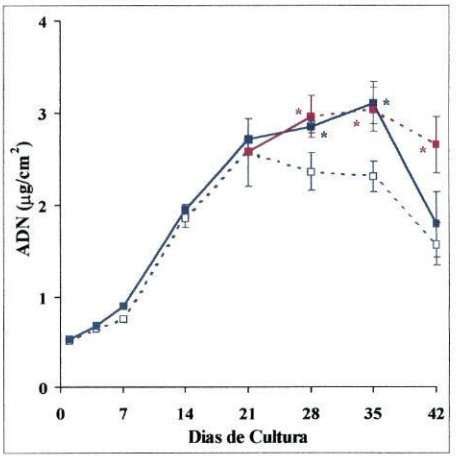
BIII



AIV



BIV



← Fig.4.13- **Ensaio do MTT (A) e conteúdo em ADN (B) de culturas de osso alveolar humano efectuadas na presença de AA e β-GF (controlo) e mantidas por um período de 42 dias. Culturas expostas à acção da PTH durante a primeira (I), a segunda (II), a terceira (III) e a quarta (IV) semanas de incubação; o período de exposição está marcado com uma linha contínua.**
*** Significativamente diferente da situação controlo.**

ACTIVIDADE DE FOSFATASE ALCALINA

Culturas controlo

Nas culturas controlo verificou-se que a actividade de FA aumentou gradualmente até ao 21° dia de cultura e, depois, diminuiu aproximadamente até ao fim do período de incubação (Fig. 4.14).

Culturas expostas à PTH durante os 42 dias de incubação

Nas culturas tratadas continuamente com a PTH observou-se um aumento significativo da actividade de FA durante a segunda semana de cultura, atingindo no 14° dia o seu valor máximo (aproximadamente o dobro do observado na situação controlo); de seguida, a actividade enzimática diminuiu até ao 28° dia de cultura e voltou a aumentar suavemente até ao fim do período de incubação (Fig. 4.14).

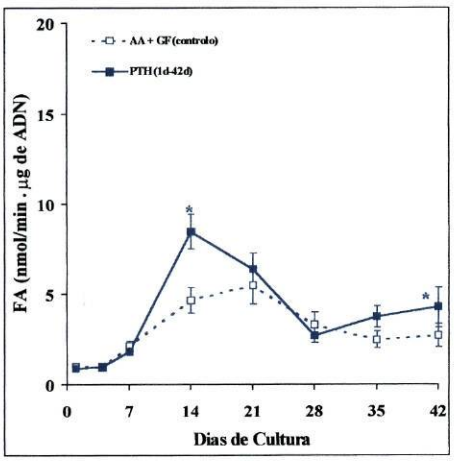


Fig. 4.14- **Efeito da PTH na actividade de FA de culturas de osso alveolar humano efectuadas na presença de AA e β-GF (controlo) e mantidas por um período de 42 dias. A PTH esteve presente durante todo o tempo de cultura. Linha a contínuo: presença da PTH; linha a tracejado: ausência de PTH. * Significativamente diferente da situação controlo.**

Culturas expostas à PTH em diferentes fases do período de incubação

- ***Primeira (1d-7d) e segunda (7d-14d) semanas***: A adição de PTH durante a primeira e a segunda semanas de incubação conduziu a um aumento da actividade de FA idêntico ao observado no ensaio em que a hormona foi adicionada durante os 42 dias de cultura (Fig. 4.15 I, II e III).

- ***Terceira (14d-21d), quarta (21d-28d), quinta (28d-35d) e sexta (35d-42d) semanas:*** não foram observadas diferenças significativas relativamente à situação controlo (Fig. 4.15 III e IV, para as culturas expostas durante a terceira e quarta semanas).

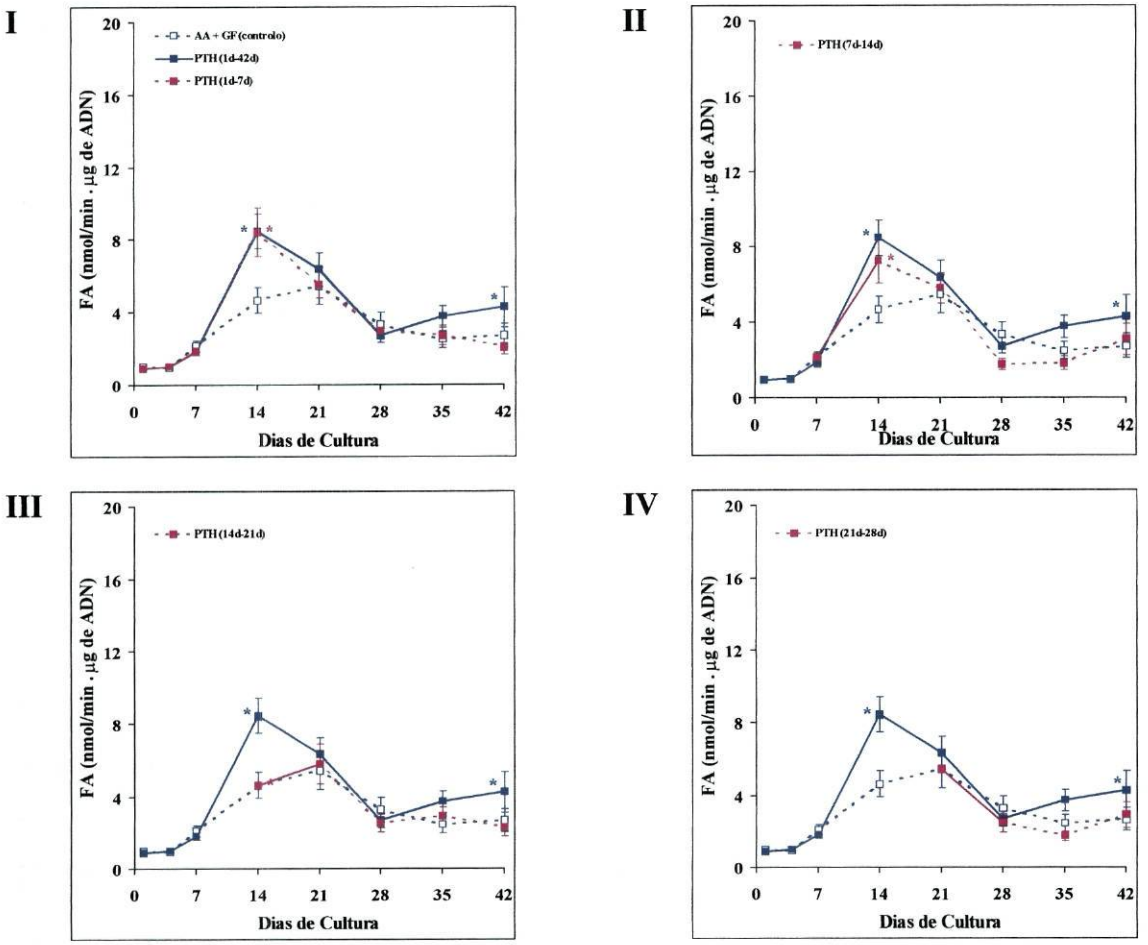


Fig.4.15- **Actividade de FA de culturas de osso alveolar humano efectuadas na presença de AA e β-GF (controlo) e mantidas por um período de 42 dias. Culturas expostas à acção da PTH durante a primeira (I), a segunda (II), a terceira (III) e a quarta (IV) semanas de incubação: o período de exposição está marcado com uma linha contínua. * Significativamente diferente da situação controlo.**

IDENTIFICAÇÃO HISTOQUÍMICA DE FA E DE DEPÓSITOS DE FOSFATO DE CÁLCIO

A reacção de coloração que permite a identificação da presença de FA foi positiva em todos os dias testados e em todas as culturas (Fig. 4.22; p. 158). Nas culturas efectuadas na presença de AA + β-GF (culturas controlo) e AA + β-GF + PTH (hormona adicionada durante todo o

tempo ou apenas em determinadas fase do período de incubação) verificou-se que a intensidade desta reacção aumentou até ao 21° dia de cultura, diminuiu até ao 28° e permaneceu mais ou menos estável até ao fim do período de incubação.

Nas culturas controlo (AA + β-GF) as reacções de alizarina vermelha (Fig. 4.23; p. 159) e de von Kossa (resultados não apresentados) foram negativas até ao 18° dia de incubação, indicando que estas culturas ainda não se encontravam em fase de mineralização, mas no 21° dia estas reacções foram positivas, indicando a existência de depósitos de cálcio e de fosfatos. A intensidade destas reacções histoquímicas durante o período de tempo que decorreu entre o início da mineralização e o fim do tempo de incubação foi aumentando progressivamente.

Nas culturas efectuadas na presença contínua de PTH estas reacções seguiram um padrão de comportamento semelhante ao observado nas culturas controlo; no entanto, relativamente a estas culturas, a intensidade de coloração foi superior no 21° dia, mas idêntica a partir do 28° dia de incubação (Fig. 4.23; p. 159).

As culturas tratadas com PTH durante a primeira, a segunda ou a terceira semana de incubação apresentaram um comportamento semelhante ao observado nas culturas expostas continuamente à hormona. De salientar que no 21° dia de cultura se observou uma ligeira diminuição na intensidade das reacções histoquímicas à medida que o período de exposição das culturas à PTH se tornava mais tardio; assim, nas culturas tratadas com a PTH durante a quarta semana de incubação a intensidade destas reacções foi idêntica à observada nas culturas controlo. Nas culturas tratadas com PTH nas restantes fases do período de incubação (quinta ou sexta semanas de incubação) não foram observadas diferenças macroscopicamente visíveis no processo de mineralização, nos vários dias testados, relativamente às culturas controlo (Fig. 4.23; p. 159).

CONTEÚDO EM Pi E Cai NO MEIO DE CULTURA

A determinação dos teores em Pi e Cai nos meios de cultura incubados na ausência de células revelou uma constância de valores ao longo do tempo de incubação, indicando ausência de deposição mineral nas condições fisico-químicas em que o ensaio foi realizado (fig. 4.16 AI e BI).

Culturas controlo

Nas culturas efectuadas na presença de AA e β-GF observou-se um aumento do conteúdo em Pi a partir do 6° dia de cultura, atingindo um valor máximo próximo do 18° dia (cerca de 8 mmol/L), (Fig. 4.16 AII). Durante este período os níveis do Cai não se alteraram significativamente (Fig. 4.16 BII). Em seguida, observou-se uma diminuição significativa destes dois parâmetros; o conteúdo em Cai começou a diminuir a partir do 18° dia, atingindo um valor mínimo próximo do 25° dia (cerca de metade do Cai existente no18° dia) e voltou a aumentar até cerca do 38° dia, apresentando, de seguida, uma tendência para diminuir.

Culturas expostas à PTH durante os 42 dias de incubação

A adição contínua de PTH ao meio de cultura conduziu a um ligeiro aumento na hidrólise do β-GF que se traduziu por valores de Pi significativamente superiores, entre o 12° e o 18° dias, aos observados na respectiva situação controlo; o valor máximo foi atingido igualmente ao 18° dia de incubação. Verificou-se, também, uma ligeira antecipação no consumo de Pi e de Cai a partir do meio de cultura. No 24° dia o teor em Cai foi significativamente inferior ao observado na situação controlo, seguindo-se um aumento até próximo do 35° dia e uma posterior diminuição até ao fim do tempo de incubação (significativa entre os 36° e 42° dias de cultura), (Fig. 4.16 BII).

Culturas expostas à PTH em diferentes fases do período de incubação

- ***Primeira (1d-7d) e segunda (7d-14d) semanas*** : Os teores em Pi (Fig. 4.17 AI e AII) e em Cai (Fig. 4.17 BI e BII) nas culturas efectuadas na presença AA e β-GF e expostas à acção da PTH apenas durante a primeira ou a segunda semanas de incubação seguiram um padrão semelhante ao observado nas culturas tratadas continuamente com a PTH.

- ***Terceira (14d-21d), quarta (21d-28d), quinta (28d-35d) e sexta (35d-42d) semanas:*** A adição de PTH às culturas efectuadas na presença de AA e β-GF durante a terceira, a quarta, a quinta ou a sexta semana do período de incubação não conduziu a diferenças significativas dos teores em Pi e em Cai, relativamente à respectiva situação controlo. Esta observação é exemplificada na Fig. 4.17 AIII-AIV e Fig. 4.17 BIII-BIV com as culturas tratadas durante a terceira ou a quarta semana de incubação.

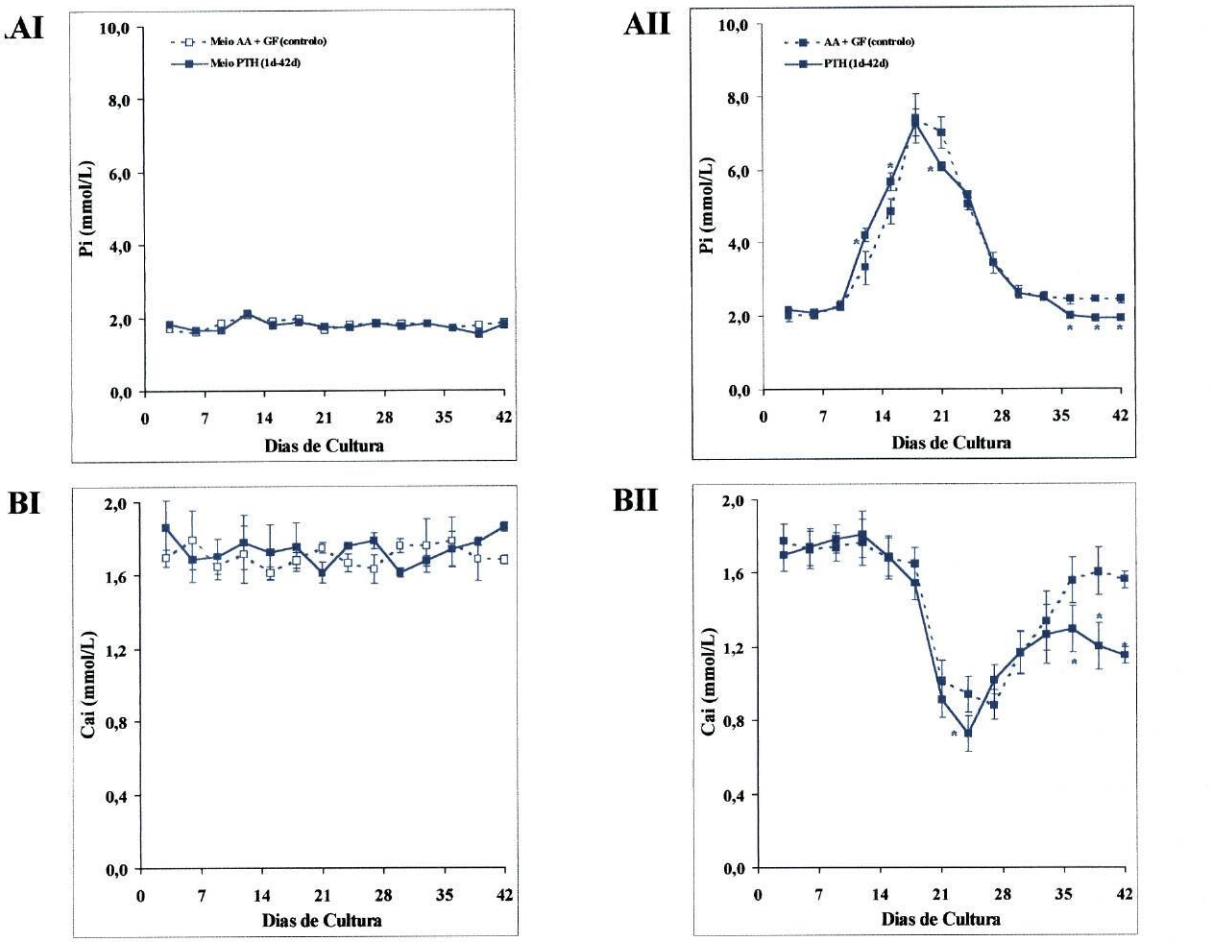


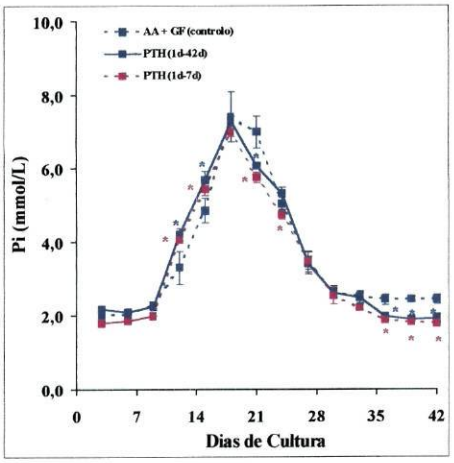
Fig. 4.16- **Efeito da PTH no conteúdo em Pi (A) e em Cai (B) nos meios de cultura incubados na ausência (I) e na presença (II) de células de osso alveolar humano cultivadas na presença de AA e β-GF (controlo) e mantidas por um período de 42 dias. Linhas a contínuo: presença da PTH; linhas a tracejado: ausência de PTH. * Significativamente diferente da situação controlo.**

4.2.2. CULTURAS EFECTUADAS NA PRESENÇA DE AA, β-GF E DEX

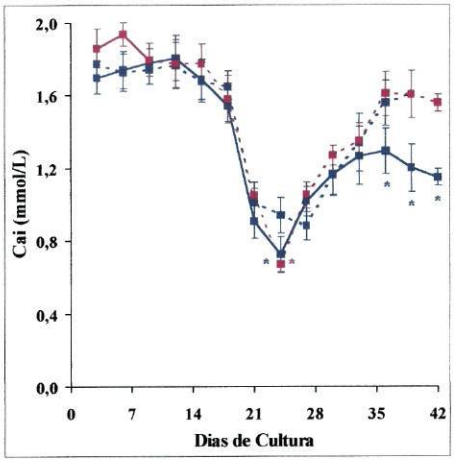
PROLIFERAÇÃO CELULAR

A observação das culturas por microscopia de fase invertida permitiu verificar que as células em subcultura, nas várias situações experimentais, proliferaram gradualmente ao longo do período de incubação, originando estruturas nodulares tridimensionais visíveis a partir da segunda semana de cultura. A presença adicional de PTH, adicionada ao meio de cultura durante todo o tempo de cultura ou em determinados intervalos de tempo, não se traduziu por qualquer efeito macro ou microscopicamente visível.

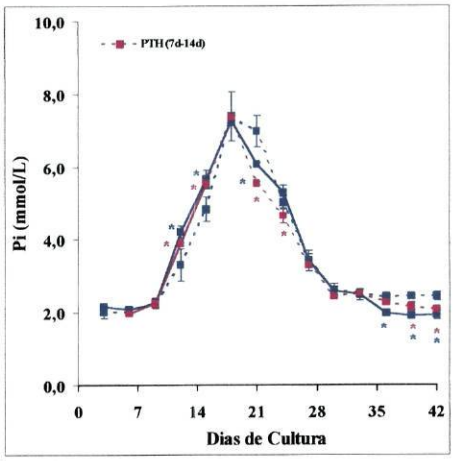
AI



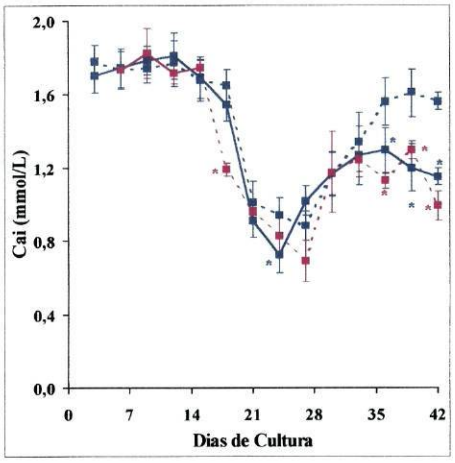
BI



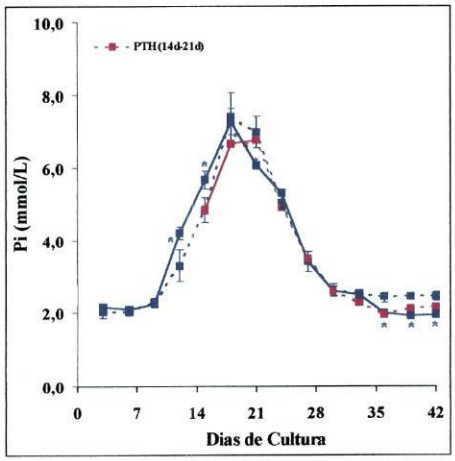
AII



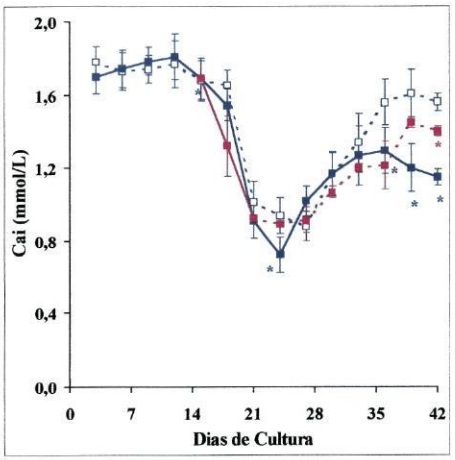
BII



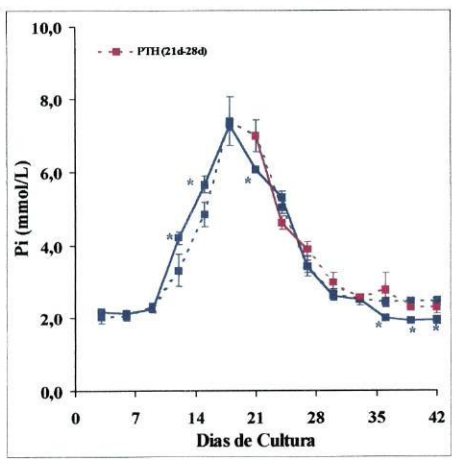
AIII



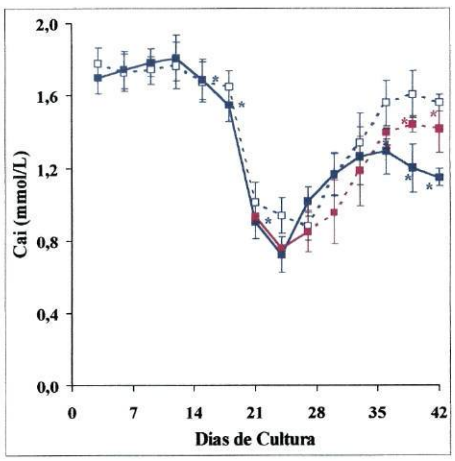
BIII



AIV



BIV



← Fig.4.17- **Conteúdo em Pi (A) e em Cai (B) no meio recolhido de culturas de osso alveolar humano efectuadas na presença de AA + β-GF (controlo) e mantidas por um período de 42 dias. Culturas expostas à acção da PTH durante a primeira (I), a segunda (II), a terceira (III) e a quarta (IV) semanas de incubação: o período de exposição está marcado com uma linha contínua. * Significativamente diferente da situação controlo.**

Cultura controlo

Nas culturas efectuadas na presença de AA + β-GF + Dex (ausência de PTH; situação controlo) verificou-se, à semelhança do observado nas culturas efectuadas na ausência do glucocorticóide, que as células proliferaram gradualmente até aos 14°-21° dias de incubação, seguindo-se uma diminuição na redução do MTT até ao 42° dia; na presença de Dex observou-se um aumento significativo da proliferação celular durante a segunda semana de cultura (Fig. 4.18 A). Os conteúdos em ADN e proteína total seguiram um padrão semelhante ao observado no ensaio do MTT (Fig. 4.18 B).

Culturas expostas à PTH durante os 42 dias de incubação

Nas culturas tratadas continuamente com PTH (AA + β-GF + Dex + PTH) verificou-se que proliferação celular seguiu um padrão idêntico ao observado na situação controlo até ao 28° dia de incubação, embora, se observasse uma tendência para uma diminuição dos valores da redução do MTT. A partir da quarta semana de cultura a presença da PTH resultou num aumento significativo da proliferação celular (Fig. 4.18 A).

A adição contínua de PTH a culturas tratadas com AA + β-GF levou a um aumento significativo do conteúdo em ADN (Fig. 4.18B) e proteína total (dados não mostrados) a partir da segunda semana de incubação; nas culturas tratadas com AA + β-GF + Dex esse efeito foi observado mais precocemente e prolongou-se até ao 35° dia.

Culturas expostas à PTH em diferentes fases do período de incubação

- ***Primeira (1d-7d), segunda (7d-14d) e terceira (14d-21d) semanas***: Nas culturas tratadas com PTH durante a primeira, a segunda ou a terceira semana de incubação verificou-se que o conteúdo em ADN seguiu um padrão idêntico ao observado nas culturas tratadas continuamente com a hormona (PTH, 1d-42d), (Fig. 4.19 BI, BII e BIII). A adição da hormona durante estes períodos de incubação conduziu sempre a um aumento do conteúdo em ADN a partir do 14° dia de cultura em relação à situação controlo e os

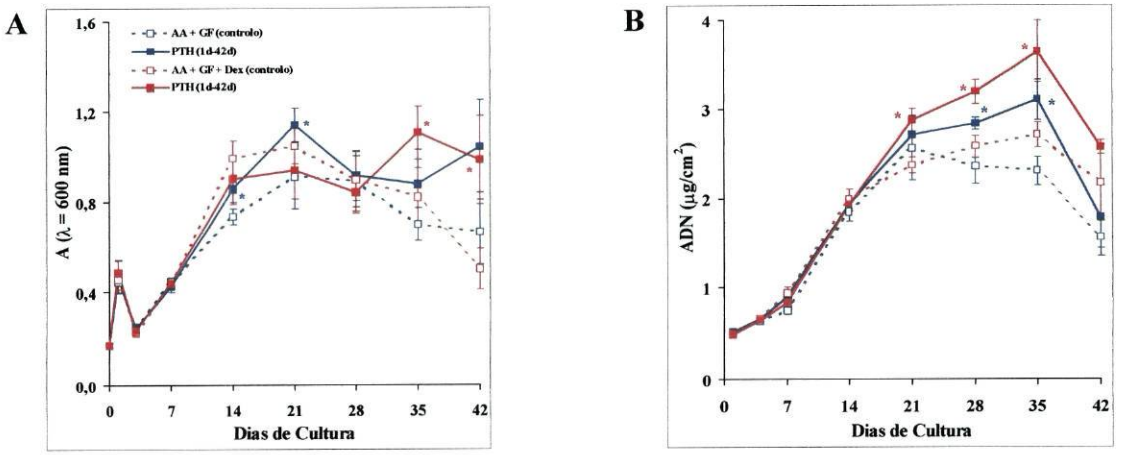


Fig. 4.18- **Efeito da PTH no ensaio do MTT (A) e conteúdo em ADN (B) de culturas de osso alveolar humano efectuadas na presença de AA + β-GF + Dex (controlo) e mantidas por um período de 42 dias. A PTH esteve presente durante todo o tempo de cultura. Para efeitos de comparação mostram-se os resultados obtidos nas culturas efectuadas na presença de AA + β-GF. Linhas a contínuo: presença da PTH; linhas a tracejado: ausência de PTH. * Significativamente diferente da respectiva situação controlo.**

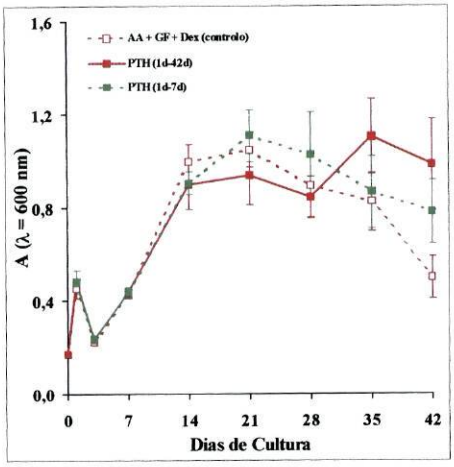
valores foram significativamente superiores nos 21°, 28° e 35° dias. Os valores observados no ensaio do MTT não mostraram diferenças significativas entre as culturas controlo e as tratadas com PTH (Fig. 4.19 AI, AII e AIII).

- ***Quarta (21d-28d), quinta (28d-35d) e sexta (35d-42d) semanas***: A adição de PTH nas restantes semanas do período de cultura não afectou de forma significativa a proliferação celular (ensaio do MTT e conteúdo em ADN), relativamente à situação controlo, observação exemplificada na Fig. 4.19 AIV e BIV para as culturas expostas durante a quarta semana.

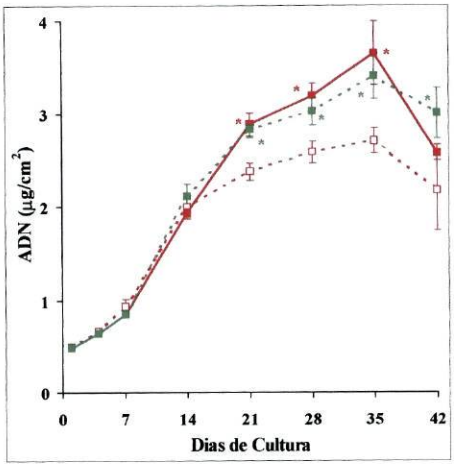
Os conteúdos em proteína total seguiram um padrão semelhante ao observado para os conteúdos em ADN, em todas as situações experimentais (resultados não apresentados).

Fig.4.19- **Ensaio do MTT (A) e conteúdo em ADN (B) de culturas de osso alveolar humano efectuadas na presença de AA + β-GF + Dex (controlo) e mantidas por um período de 42 dias. Culturas expostas à acção da PTH durante a primeira (I), a segunda (II), a terceira (III) e a quarta (IV) semanas de incubação: o período de exposição está marcado com uma linha contínua. * Significativamente diferente da situação controlo. →**

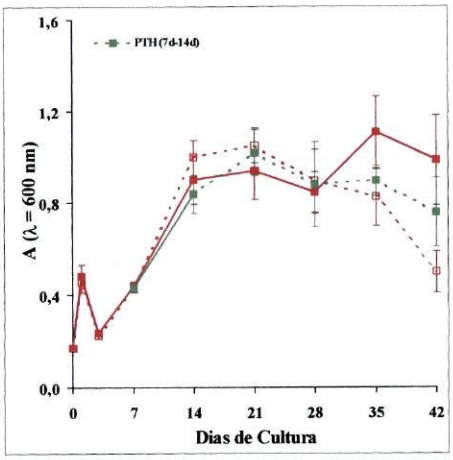
AI



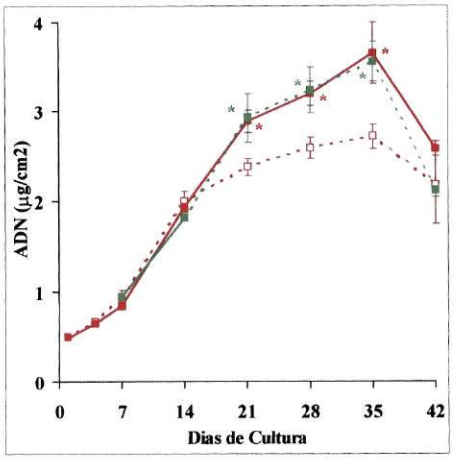
BI



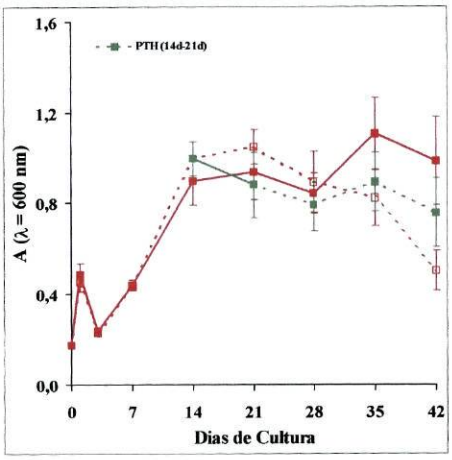
AII



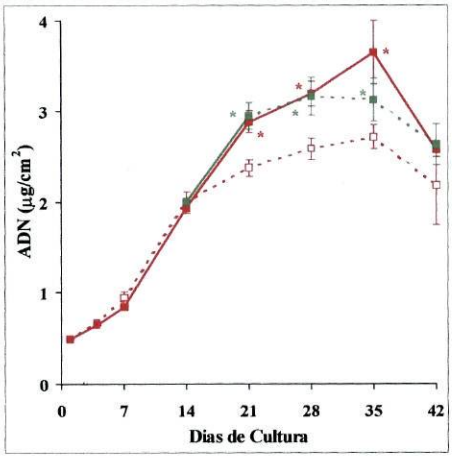
BII



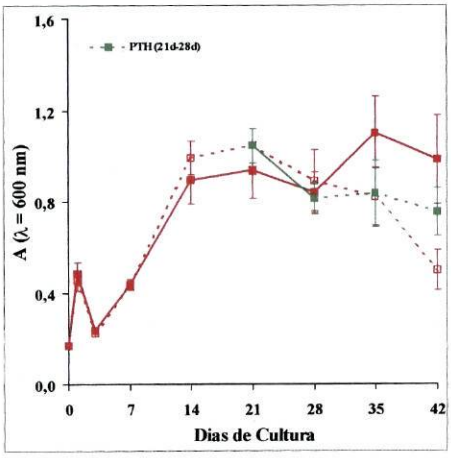
AIII



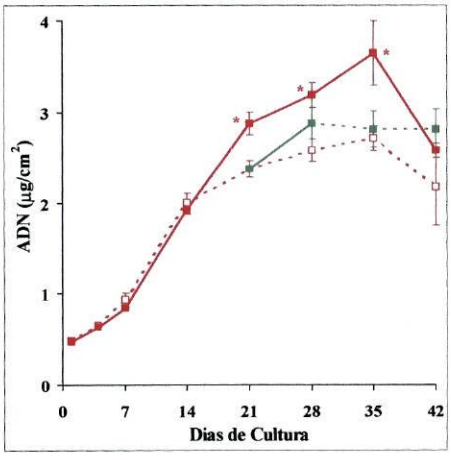
BIII



AIV



BIV



ACTIVIDADE DE FOSFATASE ALCALINA

Culturas controlo

Nas culturas efectuadas na presença de AA + β-GF + Dex observou-se um aumento muito significativo da actividade de FA, relativamente às que foram realizadas na ausência do glucocorticóide (AA + β-GF). A actividade da enzima aumentou bruscamente do 7º para o 14º dia de cultura, atingindo o seu valor máximo e, de seguida, desceu até ao 28º dia (para um valor idêntico ao observado no 7º dia de cultura). A partir do 28º dia observou-se novamente um aumento suave da actividade da enzima (Fig. 4.20).

Culturas expostas à PTH durante os 42 dias de incubação

A adição contínua de PTH às culturas controlo (AA + β-GF + Dex) resultou numa diminuição da actividade de FA durante a segunda e terceira semanas de incubação; a actividade da enzima foi significativamente inferior no 21º dia de cultura. Nas restantes semanas de incubação, verificou-se um aumento da actividade de FA relativamente à observada na situação controlo; no entanto o padrão seguido foi semelhante (Fig. 4.20).

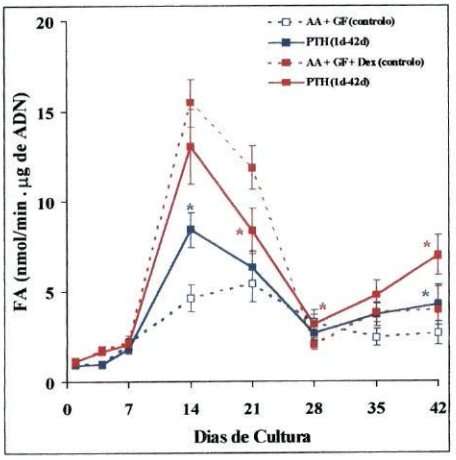


Fig. 4.20- **Efeito da PTH na actividade de FA de culturas de osso alveolar humano efectuadas na presença de AA + β-GF + Dex (controlo) e mantidas por um período de 42 dias. A PTH esteve presente durante todo o tempo de cultura. Para efeitos de comparação mostram-se os resultados obtidos nas culturas efectuadas na presença de AA + β-GF. Linhas a contínuo: presença da PTH; linhas a tracejado: ausência de PTH. * Significativamente diferente da respectiva situação controlo.**

Culturas expostas à PTH em diferentes fases do período de incubação

- ***Primeira (1d-7d), segunda (7d-14d) e terceira (14d-21d semanas***: Nas culturas efectuadas na presença de AA + β-GF + Dex verificou-se que a adição de PTH durante as três primeiras semanas de incubação conduziu sempre a uma diminuição da actividade de FA (Fig. 4.21 I, II e III).

- ***Quarta (21d-28d), quinta (28d-35d) e sexta (35d-42d) semanas:*** A presença de PTH nas restantes semanas do período de cultura não afectou de forma significativa a actividade de FA, relativamente à situação controlo (culturas efectuadas na presença de AA + β-GF + Dex), resultados exemplificados na Fig. 4.21 IV para as culturas tratadas com PTH durante a quarta semana.

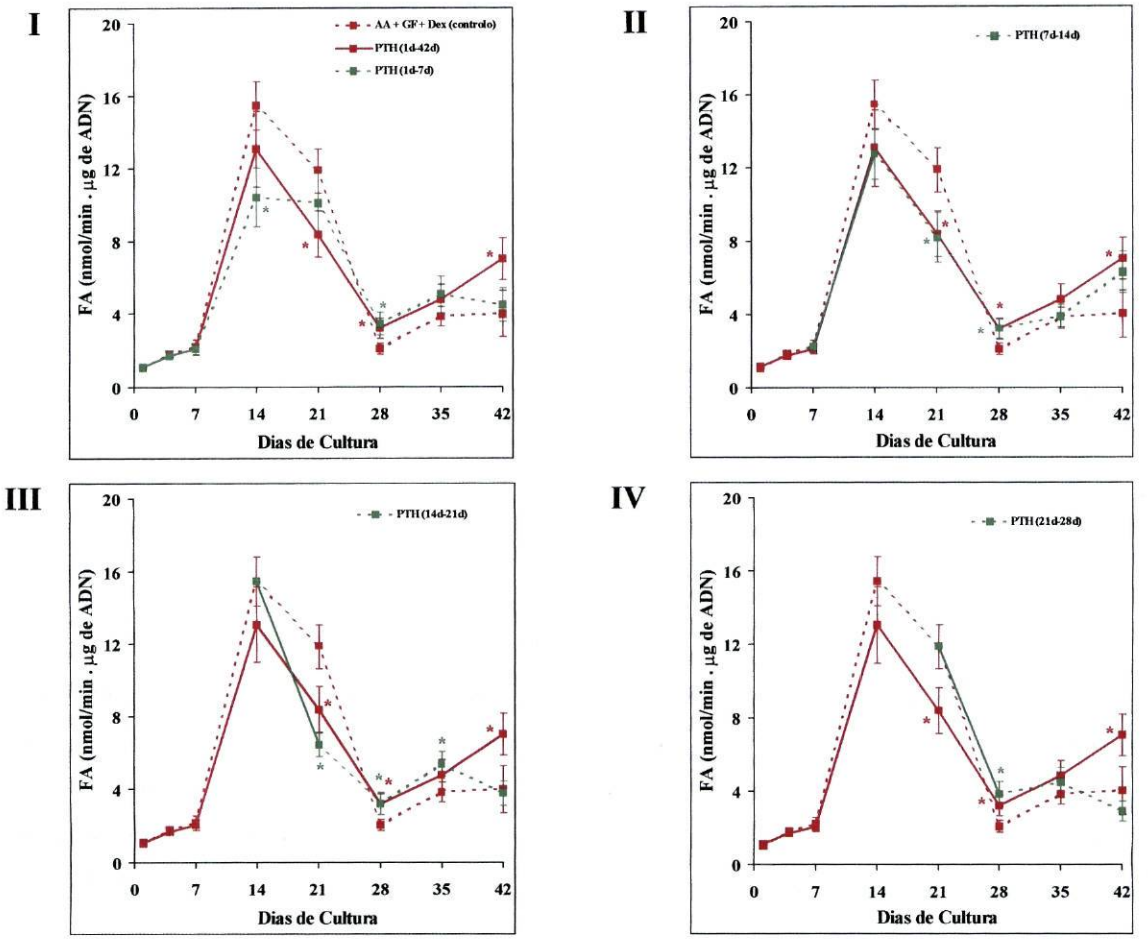


Fig.4.21- **Actividade de FA de culturas de osso alveolar humano efectuadas na presença de AA + β-GF + Dex (controlo) e mantidas por um período de 42 dias. Culturas expostas à acção da PTH durante a primeira (I), a segunda (II), a terceira (III) e a quarta (IV) semanas de incubação: o período de exposição está marcado com uma linha contínua. * Significativamente diferente da situação controlo.**

IDENTIFICAÇÃO HISTOQUÍMICA DA FA E DE DEPÓSITOS DE FOSFATO DE CÁLCIO

Nas culturas efectuadas na presença de AA + β-GF + Dex (controlo) verificou-se que a reacção de coloração que permite a identificação da presença de FA foi positiva nos dias testados e a sua intensidade aumentou até ao 18º dia de cultura, depois, diminuiu até ao 28º

dia e permaneceu mais ou menos estável até ao fim do período de incubação. A adição contínua ou intercalada de PTH a este sistema de cultura não se traduziu por um efeito macroscopicamente visível na intensidade desta reacção (Fig. 4.22). De realçar que nestas culturas (tratadas com Dex) a intensidade de coloração nos 14º e 18º dias foi maior que a observada nas culturas contendo apenas AA + β-GF.

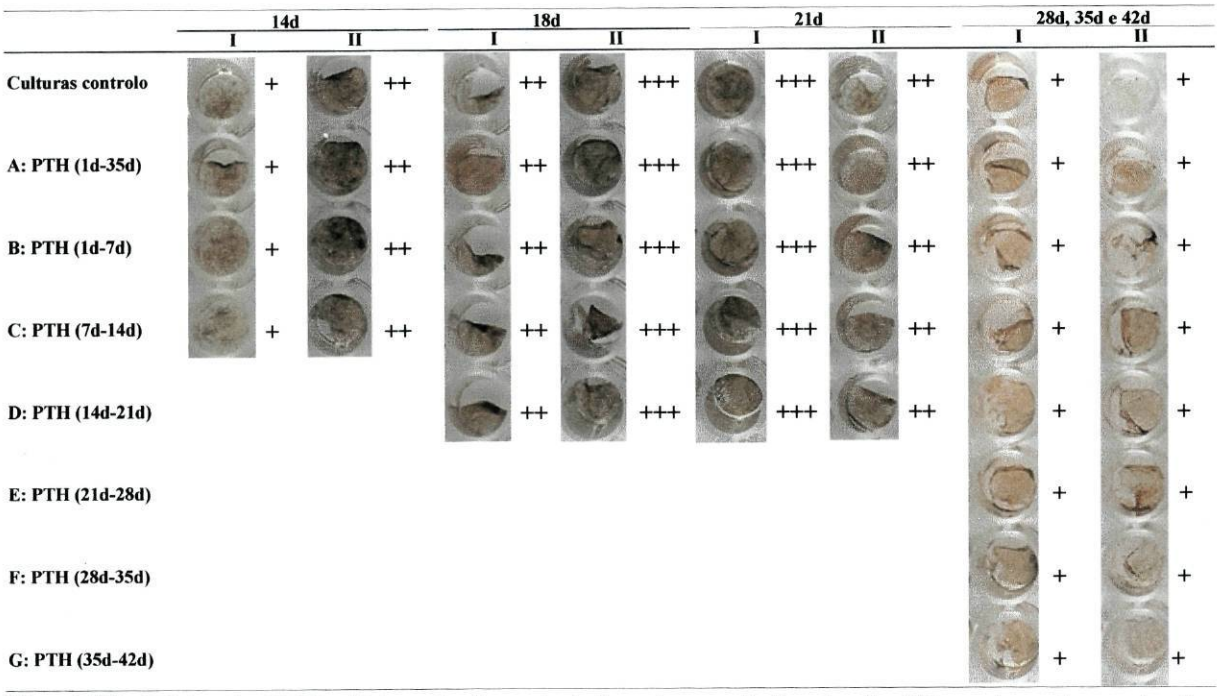


Fig. 4.22- **Efeito da PTH adicionada durante todo o tempo de incubação (A) ou durante a primeira (B), segunda (C), terceira (D), quarta (E), quinta (F) e sexta (G) semanas de cultura na reacção histoquímica da FA em culturas celulares de osso alveolar efectuadas na ausência (I) e na presença (II) de Dex, aos 14, 18, 21 e 28-42 dias de incubação. A intensidade da coloração foi classificada da seguinte maneira: +, positiva; ++, moderadamente positiva; +++, intensamente positiva.**

Nas culturas efectuadas na presença de AA + β-GF + Dex (controlo), as reacções de alizarina vermelha (Fig. 4.23) e de von Kossa (resultados não mostrados) foram negativas até ao 14º dia de incubação, indicando que estas ainda não se encontravam em fase de mineralização; contudo, no 18º dia estas reacções foram positivas, indicando a existência de depósitos de fosfato de cálcio. Após o início da mineralização a intensidade das reacções histoquímicas foi aumentando progressivamente.

Nas culturas efectuadas na presença de PTH durante todo o tempo de incubação estas reacções seguiram um padrão de comportamento semelhante ao observado nas culturas controlo;

contudo, no 18º dia a sua intensidade foi inferior à observada nestas culturas, mas idêntica a partir do 21º dia de incubação (Fig. 4.23).

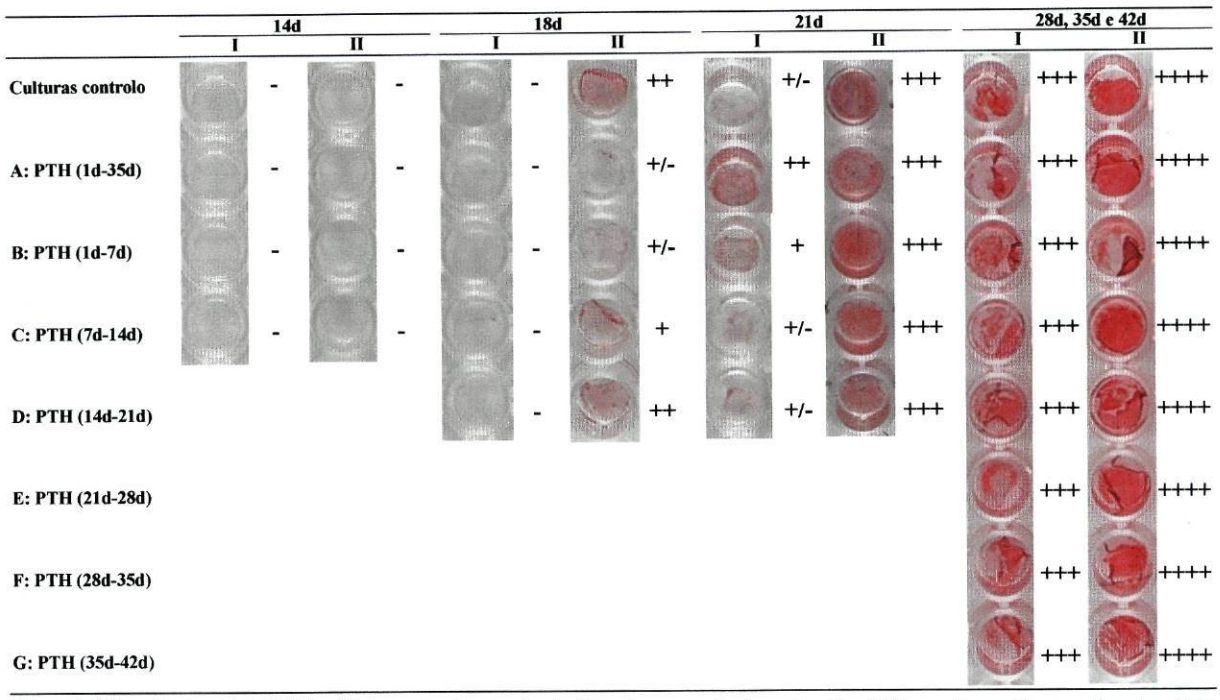


Fig. 4.23- **Efeito da PTH adicionada durante todo o tempo de incubação (A) ou durante a primeira (B), segunda (C), terceira (D), quarta (E), quinta (F) e sexta (G) semanas de cultura na reacção histoquímica de depósitos de fosfato de cálcio (reacção de alizarina vermelha; AV) em culturas celulares de osso alveolar efectuadas na ausência (I) e na presença (II) de Dex, aos 14, 18, 21 e 28-42 dias de incubação. A intensidade da coloração foi classificada da seguinte maneira: -, negativa; +/-, fraca a indetectável; +, fracamente positiva ; ++, moderadamente positiva; +++, positiva; ++++, intensamente positiva.**

As culturas tratadas com PTH durante a primeira, a segunda ou a terceira semana de incubação apresentaram um comportamento semelhante ao observado nas culturas expostas continuamente à hormona. De salientar que no 18º dia de cultura se observou um ligeiro aumento na intensidade destas reacções à medida que o período de exposição das culturas à hormona se tornava mais tardio (nas culturas expostas durante a terceira semana de incubação estas reacções apresentaram uma intensidade de coloração semelhante à observada nas culturas controlo). Quando a PTH foi adicionada apenas nas restantes fases do período de incubação (quarta, quinta ou sexta semana de incubação) não foram observadas diferenças macroscopicamente visíveis no processo de mineralização, nos vários dias testados (Fig. 4.23).

De notar que neste sistema (culturas tratadas com Dex) a mineralização foi observada mais precocemente (cerca de 4 dias) e que a intensidade destas reacções, nos dias testados, foi sempre superior à observada nas culturas efectuadas na ausência do glucocorticóide. (Fig. 4.23).

CONTEÚDO EM Pi E Cai NO MEIO DE CULTURA

A determinação dos teores em Pi e Cai nos meios incubados na ausência de células revelou uma constância de valores ao longo do tempo de incubação, indicando ausência de deposição mineral nas condições físico-químicas em que o ensaio foi realizado (fig. 4.24 AI e BI).

Culturas controlo

Nas culturas efectuadas na presença de AA + β-GF + Dex (situação controlo) observou-se um aumento do teor em Pi até ao 14° dia (cerca de 8 mmol/L), seguido de uma descida acentuada até ao 33° dia (1,7 mmol/L). A partir deste dia observou-se um novo aumento do teor em Pi (5,6 mmol/L), seguido de uma diminuição até ao fim do período de incubação (Fig. 4.24 AII). Os níveis do Cai desceram acentuadamente a partir do 12° dia de cultura, atingindo um valor mínimo próximo do 21° dia (cerca de ¼ do valor observado no 12° dia); de seguida, subiram até ao 33° dia (valor idêntico ao do 12° dia), voltaram a diminuir até próximo do 35° dia (valor idêntico ao observado no 21° dia) e aumentaram ligeiramente até ao fim do período de incubação (Fig. 4.24 BII).

Culturas expostas à PTH durante os 42 dias de incubação

Nas culturas tratadas continuamente com a PTH, na presença de Dex, observou-se um ligeiro atraso na hidrólise do β-GF, nomeadamente entre o 7° e o 18° dia de cultura. Devido a este atraso os teores em Pi nos 9° e 12° dias de cultura foram significativamente inferiores aos observados na situação controlo, contudo, esta diferença foi superada e no 18° dia os valores foram idênticos. A partir desta fase, a cultura seguiu um padrão de comportamento semelhante ao observado na situação controlo (Fig. 4.24 AII). Nestas culturas, o conteúdo em Cai seguiu um padrão de comportamento parecido com o observado na situação controlo; no entanto, na presença de PTH observou-se um ligeiro atraso no consumo do Cai, significativo entre os dias 12° e 21° (Fig. 4.17 BII).

Culturas expostas à PTH em diferentes fases do período de incubação

- ***Primeira (1d-7d) e segunda (7d-14d) semanas*** : Os teores em Pi (Fig. 4.25 AI e AII) e em Cai (Fig. 4.25 BI e BII) nas culturas efectuadas na presença de AA + β-GF + Dex e expostas à acção da PTH apenas durante a primeira ou a segunda semana de incubação seguiram um padrão semelhante ao observado nas culturas tratadas continuamente com a referida hormona.

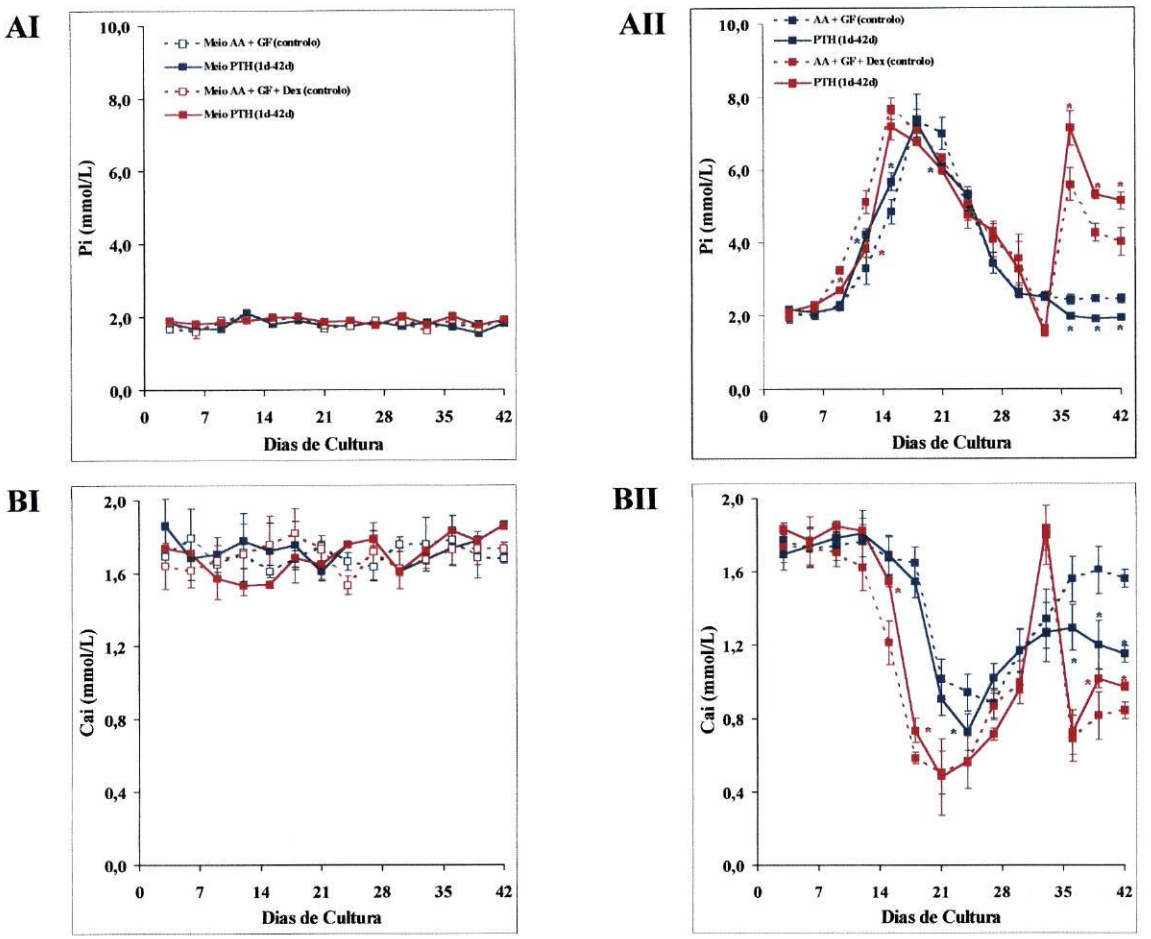
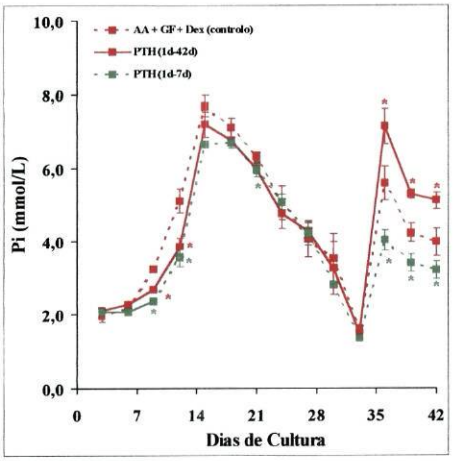


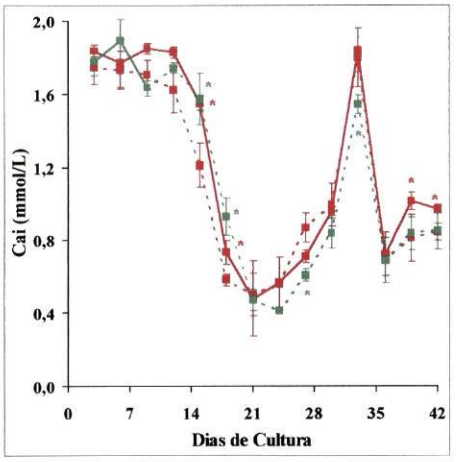
Fig. 4.24- **Efeito da PTH no conteúdo em Pi (A) e em Cai (B) nos meios de cultura incubados na ausência (I) e na presença (II) de células de osso alveolar humano cultivadas na presença de AA + β-GF + Dex (controlo) e mantidas por um período de 42 dias. A PTH esteve presente durante todo o tempo de cultura. Para efeitos de comparação mostram-se os resultados obtidos nas culturas efectuadas na presença de AA + β-GF. Linhas a contínuo: presença da PTH; linhas a tracejado: ausência de PTH. * Significativamente diferente da respectiva situação controlo.**

- ***Terceira (14d-21d), quarta (21d-28d), quinta (28d-35d) e sexta (35d-42d) semanas:*** A adição de PTH nas restantes quatro semanas de cultura não conduziu a diferenças significativas nos teores em Pi e em Cai, relativamente à respectiva situação controlo. Resultados exemplificados na Fig. 4.25 AIII – AIV e BIII - BIV para as culturas expostas à PTH durante a terceira e quarta semanas.

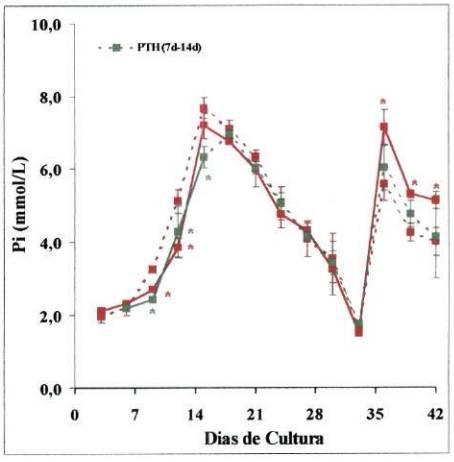
AI



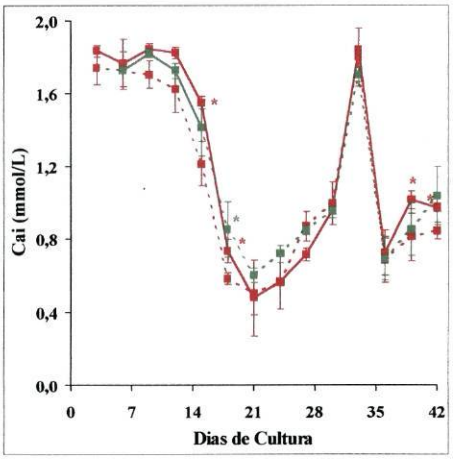
BI



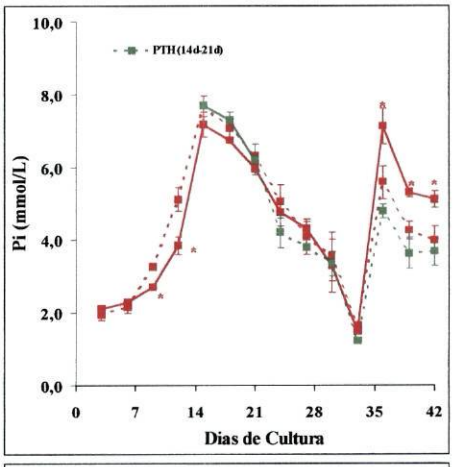
AII



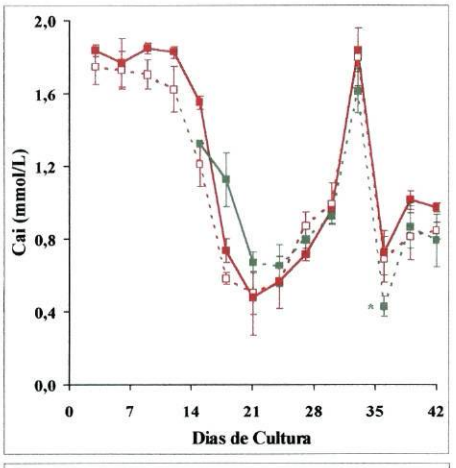
BII



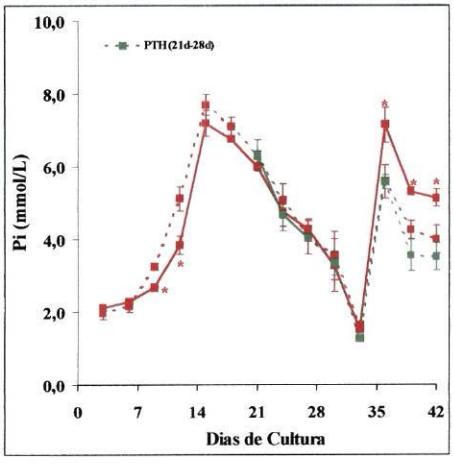
AIII



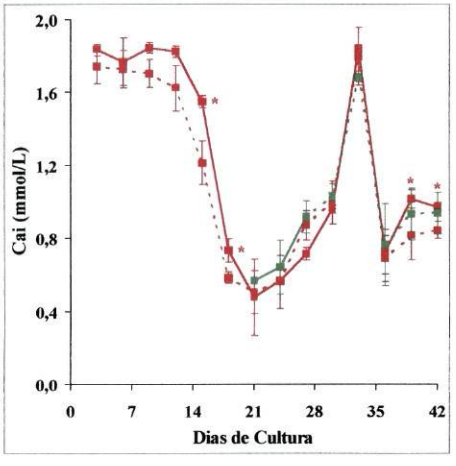
BIII



AIV



BIV



← Fig.4.25- **Conteúdo em Pi (A) e em Cai (B) no meio recolhido de culturas de osso alveolar humano mantidas por um período de 42 dias e efectuadas na presença de AA + β-GF + Dex (controlo). Culturas expostas à acção da PTH durante a primeira (I), a segunda (II), a terceira (III) e a quarta (IV) semanas de incubação: o período de exposição está marcado com uma linha contínua. * Significativamente diferente da situação controlo.**

COMPORTAMENTO DAS CULTURAS CELULARES APÓS O ÍNICIO DO PROCESSO DE MINERALIZAÇÃO

Os resultados apresentados mostram que na maior parte das situações o processo de mineralização ocorre durante a terceira-quarta semana de cultura, fase em que, geralmente, se observa uma diminuição acentuada da proliferação celular e da actividade de FA. Para tempos de incubação superiores a 21-28 dias e nas culturas muito mineralizadas as películas celulares começam a descolar da superfície dos frascos de cultura e a enrolar-se sobre si próprias formando, por vezes, uma "bola" de material biológico mineralizado. Nesta situação, observa-se migração celular a partir da película enrolada (à semelhança do observado a partir dos fragmentos de osso na cultura primária) e um novo ciclo de proliferação e diferenciação celular que, para tempos de incubação suficientes, podem culminar com a mineralização da nova matriz recém-formada (Fig. 4.26). Este padrão de comportamento justifica o aumento observado nos valores relativos à proliferação celular e actividade de FA das culturas para tempos de incubação superiores a 21-28 dias. Este facto é também evidente nos resultados correspondentes ao conteúdo em Pi no meio de cultura que se observaram aproximadamente a partir dos dias 28-35 (fase em que também se verifica o aumento da proliferação celular e da actividade de FA). Para tempos mais prolongados (35-42 dias) observa-se mesmo uma nova diminuição dos conteúdos em Pi e em Cai, sugerindo um novo ciclo de deposição mineral. Este tipo de comportamento é mais evidente nas culturas que apresentam uma mineralização mais precoce e mais acentuada, nomeadamente nas culturas efectuadas na presença de dexametasona (exemplificado na Fig. 4.27: proliferação celular (A), actividade de FA (B) e conteúdos em Pi (C) e em Cai (D).

Durante as operações de manutenção destas culturas (mudança de meios, lavagem das películas celulares, entre outras) é também frequente ver-se a fragmentação ou o desprendimento completo das películas celulares, seguidos pela sua perda. Por esta razão, os erros experimentais, observados nas determinações bioquímicas, podem ser muito elevados nas fases terminais do tempo de cultura.

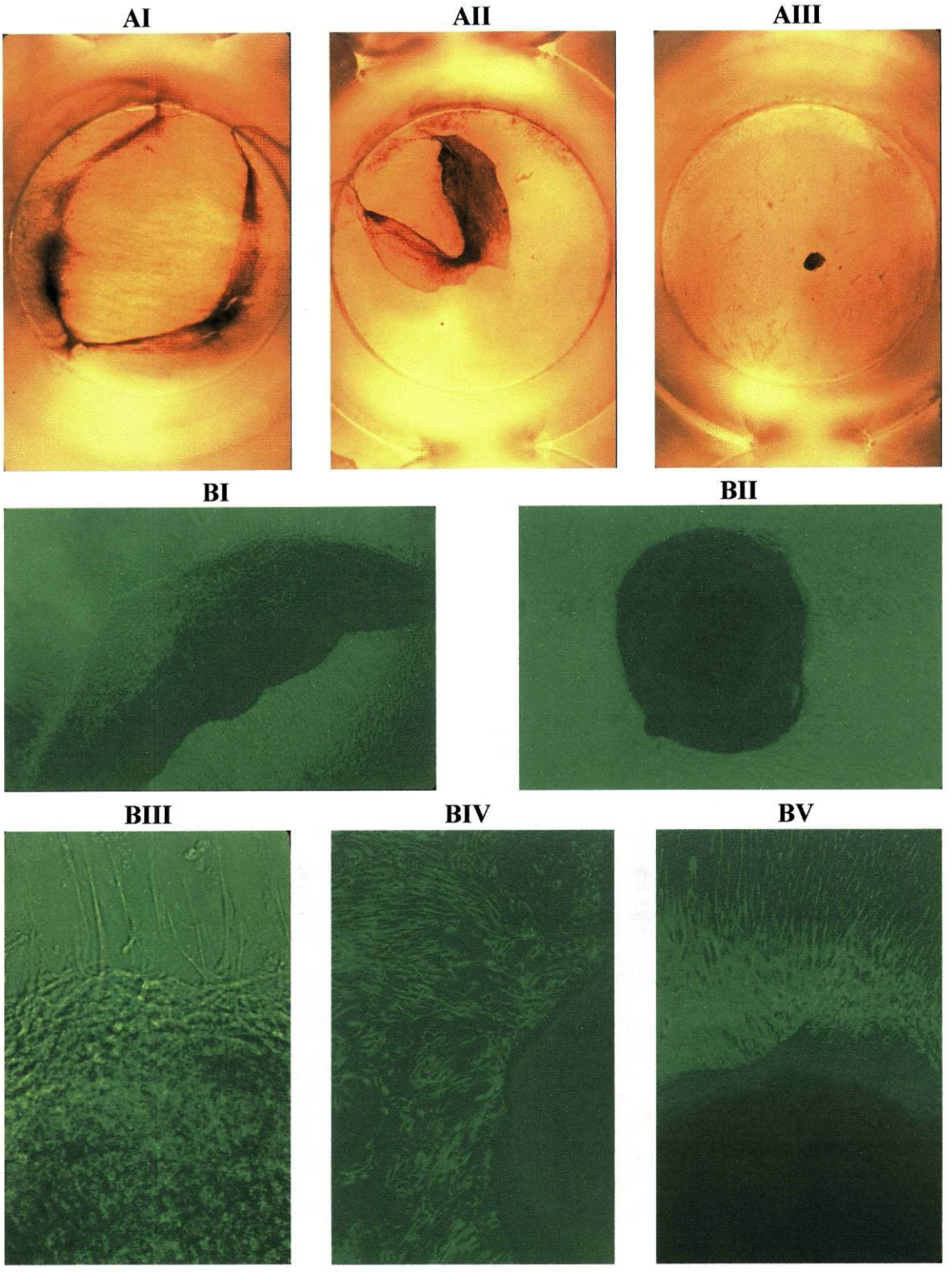


Fig. 4.26- **Comportamento das culturas celulares de osso alveolar efectuadas na presença de AA + β-GF + Dex. A- Microfotografias de culturas coradas histoquimicamente para visualização da FA (8,5x): I- início do enrolamento da película celular, aos 21dias (40x); II- película celular enrolada, aos 28 dias; III- "bola" de material biológico mineralizado, aos 35 dias. B- Microfotografias de contraste de fase: I- inicio do enrolamento da película celular, aos 21dias (40x); II- "bola" de material biológico mineralizado, aos 35 dias (40x); III, IV e V - migração celular a partir da película enrolada, aos 21 (100x), 28 (40x) e 35 (40x) dias de cultura.**

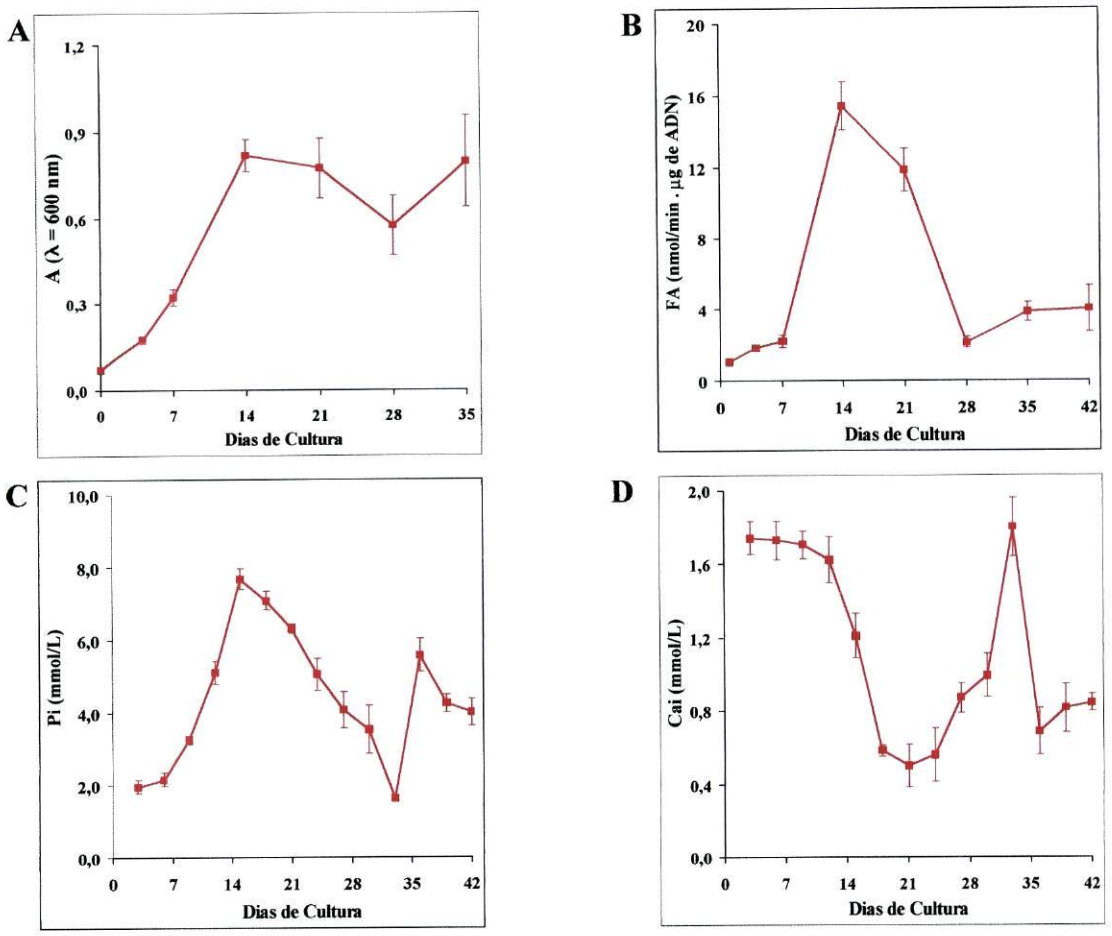


Fig. 4.27- - **Comportamento das culturas celulares de osso alveolar humano efectuadas na presença de AA + β-GF + Dex. A- Ensaio do MTT; B- actividade de FA; C- conteúdo em Pi; D- conteúdo em Cai (resultados retirados rrespectivamente das Figs. 4.19 AI, 4.20 e 4.25 AI e BI).**

4.3. CONCLUSÃO

A adição de PTH durante todo o período de incubação às culturas efectuadas na presença de AA + β-GF conduziu a um aumento significativo da proliferação celular, visível na redução do MTT (segunda e terceira semanas de cultura) e nos conteúdos em ADN e proteína total (quarta e quinta semanas de cultura). Observou-se também um aumento significativo dos níveis de FA (segunda e sexta semanas de cultura) e a actividade máxima foi observada mais precocemente (cerca de 7 dias), relativamente às culturas controlo (AA + β-GF). O aumento da actividade da enzima traduziu-se por um ligeiro aumento da hidrólise do β-GF, significativo entre o 11º e 18º dias de cultura. A diminuição dos conteúdos em Pi e em Cai no meio de cultura foi observada ligeiramente mais cedo, sugerindo que a deposição mineral

nestas culturas teve início mais precocemente do que nas respectivas culturas controlo. Estes resultados foram corroborados pelas reacções histoquímicas que permitem detectar a presença de depósitos de fosfato de cálcio na matriz, dado que no 18° dia de incubação estas reacções apresentaram uma coloração de maior intensidade nas culturas tratadas com a PTH.

As culturas efectuadas em AA + β-GF e expostas à acção da PTH durante a primeira ou a segunda semana de incubação apresentaram um comportamento semelhante ao observado nas culturas submetidas continuamente à acção da referida hormona; contudo, verificou-se que o comportamento destas culturas foi-se alterando gradualmente da primeira para a terceira semana do período de exposição, aproximando-se progressivamente do comportamento observado nas culturas controlo. Nas culturas expostas à acção da PTH nas restantes semanas do período de incubação (quarta, quinta ou sexta semana) não foram observadas diferenças significativas relativamente às culturas controlo (AA + β-GF).

Nas culturas efectuadas na presença de AA + β-GF + Dex e tratadas continuamente com a PTH a proliferação celular seguiu um padrão de comportamento semelhante ao observado nas culturas controlo (AA + β-GF + Dex) até aproximadamente ao 21° e 28° dias de incubação, respectivamente nos conteúdos em ADN e proteína total e na redução do MTT. No entanto, a partir dessa fase as culturas expostas à PTH apresentaram um aumento significativo da proliferação celular, nomeadamente a partir da terceira (conteúdos em ADN e proteína total) e quarta semana (ensaio do MTT) de incubação. As culturas contendo AA + β-GF + Dex + PTH mostraram, relativamente às culturas controlo, uma diminuição na actividade de FA durante a segunda e terceira semanas de incubação e um aumento significativo da sua actividade na fase terminal deste mesmo período (quinta e sexta semanas). O atraso inicial observado na actividade de FA conduziu a uma ligeira diminuição da hidrólise do β-GF no meio de cultura, significativa nos 11° e 14° dias de incubação. Por outro lado, a diminuição dos conteúdos em Pi e em Cai no meio de cultura sofreu um ligeiro atraso relativamente ao observado nas culturas controlo. Assim, apesar das reacções histoquímicas para os depósitos de fosfato de cálcio serem positivas no 18° dia de incubação, para ambos os sistemas de cultura (AA + β-GF + Dex e AA + β-GF + Dex + PTH), verificou-se uma ligeira diminuição na intensidade destas reacções nas culturas tratadas com a PTH.

As culturas efectuadas tanto na ausência como na presença Dex (AA + β-GF; AA + β-GF + Dex) e expostas à acção da PTH durante a primeira ou a segunda semana de incubação seguiram um padrão de comportamento semelhante ao observado nas culturas tratadas continuamente com a hormona. A exposição à PTH nas restantes semanas de ensaio não conduziu a diferenças significativas relativamente às respectivas situações controlo. Estes resultados mostraram que o comportamento das culturas foi-se alterando gradualmente à medida que o período de exposição à hormona era mais tardio, aproximando-se do comportamento observado nas culturas controlo.

De salientar que as culturas tratadas com PTH, adicionada continuamente e durante a primeira ou a segunda semana de exposição, revelaram uma diferença significativa de comportamento quando efectuadas na ausência ou na presença de Dex: observou-se um aumento ou uma diminuição da actividade de FA, respectivamente na ausência ou na presença do glucocorticóide. Por outro lado, os resultados relativos às reacções histoquímicas e à determinação dos teores em Pi e em Cai no meio de cultura mostraram que as culturas efectuadas na presença de Dex (isolada ou combinada com a PTH) possuíam capacidade para formar depósitos de fosfato de cálcio mais precocemente do que as culturas efectuadas na ausência da referida hormona Assim, observou-se um consumo mais precoce (cerca de três dias) de Pi e de Cai nas culturas efectuadas na presença de Dex e no 18° dia de cultura as reacções histoquímicas que permitem identificar os depósitos minerais já eram positivas (positivas apenas no 21° dia nas culturas efectuadas na ausência do glucocorticóide).

5. DISCUSSÃO GERAL DO CAPÍTULO

As culturas de osso alveolar efectuadas em condições experimentais que não favorecem o processo de mineralização (meio base) apresentaram uma proliferação celular (Fig. 4.1 I) e uma actividade de fosfatase alcalina (Fig. 4.2 I) que aumentou gradualmente ao longo de todo o período de incubação, sugerindo incapacidade de se observar uma diferenciação celular completa. A presença adicional de PTH ou de 1,25-$(OH)_2D_3$ não afectou de forma significativa os parâmetros analisados. No entanto, a adição de dexametasona a este sistema de cultura conduziu a um aumento significativo do crescimento celular (conteúdos em proteína total e ADN significativamente superiores aos observados nas culturas efectuadas em

meio base) e da actividade de FA. As culturas efectuadas tanto na ausência como na presença destas hormonas não apresentaram capacidade de formação de depósitos minerais. Estes resultados estão de acordo com os observados no capítulo III (ponto 4.) e com vários estudos descritos na literatura que mostram que as culturas de células osteoblásticas efectuadas na ausência de β-GF não apresentam mineralização da matriz extracelular [35,157-159,175,186].

As culturas celulares de osso alveolar em que as condições experimentais favorecem o processo de mineralização (meio base + AA + β-GF) mostraram que a presença de dexametasona, PTH ou 1,25-$(OH)_2D_3$ (adicionadas isoladamente ou em combinação) influenciavam a proliferação celular, a actividade de FA e o processo de mineralização. No entanto, o tratamento destas culturas com dexametasona resultou numa maior indução do fenótipo osteoblástico (expressão da FA e formação de uma matriz mineralizada), quando comparadas com as culturas expostas à acção das outras hormonas.

Os níveis de fosfatase ácida e fosfatase 0ácida resistente ao ácido tartárico foram insignificantes nas culturas efectuadas nas várias condições experimentais, sugerindo uma contaminação desprezável por fibroblastos e/ou osteoclastos.

Nas culturas efectuadas em meio base + AA + β-GF + 1,25-$(OH)_2D_3$ verificou-se, pelo ensaio de MTT (Fig. 4.1 AII), que a proliferação/viabilidade celular não diferiu significativamente da observada nas culturas controlo; no entanto, notou-se uma tendência de aumento, embora não significativa, nos conteúdos em ADN (Fig. 4.1 BII) e em proteína total (resultados não apresentados). A indução da actividade de FA neste sistema de cultura apenas foi observada no 11° dia de cultura e a actividade máxima da enzima foi observada próximo dos 18° - 25° dias de cultura (Fig. 4.2 II). De salientar, que das três hormonas estudadas a 1,25-$(OH)_2D_3$ foi aquela que menos influenciou a proliferação celular, a actividade de FA e o processo de mineralização.

O efeito da 1,25-$(OH)_2D_3$ na proliferação celular e na actividade da FA das células ósseas tem sido objecto de estudo por parte de vários grupos de investigadores, mas os resultados obtidos nem sempre são concordantes. Verifica-se que o efeito desta hormona nas actividades metabólicas das células ósseas é dependente do estado de diferenciação celular, das condições de cultura, nomeadamente da dose de hormona adicionada, e da espécie a partir da qual se

obtiveram as células [35,175,206]. Alguns estudos apontam para uma inibição da proliferação celular [206-210], diminuição [211,212] ou aumento [209,210, 213-216] da actividade de FA e inibição do processo de mineralização.

A presença de PTH nas culturas efectuadas em meio base + AA + β-GF resultou, também, numa indução da actividade da FA (significativamente superior à observada nas culturas controlo nos 11° e 18° dias de incubação) e os níveis máximos da enzima foram observados mais precocemente (18° dia de cultura; Fig. 4.2 II); os conteúdos em ADN (Fig. 4.1 BII) e em proteína total (resultados não apresentados) não evidenciaram diferenças significativas relativamente aos valores observados nas culturas controlo (Fig. 4.1 AII).

A presença de PTH durante as diferentes fases do tempo de cultura revelou que a acção desta hormona dependia de vários factores, nomeadamente do período de exposição e do estado de diferenciação celular. Assim, as culturas expostas à acção da PTH durante a primeira e a segunda semanas de cultura apresentaram um comportamento semelhante ao observado nas culturas expostas continuamente à acção da referida hormona, tanto na presença como na ausência de dexametasona. A exposição à PTH nas restantes semanas de ensaio não conduziu a diferenças significativas relativamente às situações controlo. De salientar, que as culturas tratadas com PTH apresentaram um comportamento distinto consoante foram efectuadas na ausência ou na presença de dexametasona. O tratamento contínuo ou durante a primeira ou segunda semanas de incubação com PTH nas culturas efectuadas na ausência ou na presença de dexametasona conduziu respectivamente a um aumento ou uma diminuição da actividade da FA, sugerindo que a acção desta hormona era influenciada pelo estado de diferenciação das células em cultura. Por outro lado, observou-se um aumento dos conteúdos em ADN (Fig. 4.13 B) e em proteína total (resultados não apresentados), sugerindo um aumento da proliferação celular e da síntese da matriz extracelular.

O efeito da PTH na proliferação celular e na actividade da FA das células ósseas tem sido objecto de estudo por parte de vários grupos de investigadores, mas os resultados obtidos nem sempre são concordantes. Vários estudos mostram que a PTH pode apresentar efeitos proliferativos ou antiproliferativos nas células osteoblásticas [217-226], estimuladores [227-229] ou inibidores [211,212,225,230-232] na actividade de FA e na diferenciação osteoblástica.

Os efeitos da PTH nas células ósseas são muito complexos. O modo como a PTH afecta o esqueleto depende do modo como a hormona é secretada ou administrada. A exposição contínua do tecido ósseo a níveis elevados de PTH resulta num aumento da taxa de remodelação e perda óssea, enquanto que a administração intermitente da hormona aumenta a formação óssea [233-235]. O aumento de massa óssea deve-se primariamente ao aumento do número de osteoblastos, originados provavelmente a partir das células de revestimento e não das células osteoprogenitoras, e do aumento da síntese da matriz extracelular orgânica (aumento dos níveis de ARNm para a osteocalcina, osteonectina e colagénio tipo I) e da sua mineralização [233].

Na maioria dos estudos efectuados *in vitro* as células foram expostas à acção da PTH durante todo o período de cultura, condição que parece ser inadequada para elucidar o seu efeito anabólico na formação óssea, já que nestas condições a hormona inibe a diferenciação das células osteoblásticas e a síntese do colagénio. Por outro lado, quando as células são tratadas intermitentemente com a PTH verifica-se um efeito anabólico na diferenciação osteoblástica, dependendo do tempo e do período de exposição [234]. Assim, os efeitos observados *in vitro* permitem explicar, pelo menos em parte, o facto da acção desta hormona *in vivo* depender da forma como é administrada.

Vários estudos efectuados com células osteoblásticas de rato e humanas mostram que o tratamento das culturas com Dex (10 nM) promove o crescimento e diferenciação das células osteoprogenitoras, abreviando o período de proliferação celular observado no modelo sequencial de expressão do fenótipo osteoblástico [17,35,72,75,155,162,173,175,176,205]. Deste modo, nestas culturas é visível uma indução da expressão de alguns marcadores osteoblásticos, como a actividade de FA [160,235,236], a produção de AMPc em resposta à PTH [237] e de osteocalcina em resposta à 1,25-$(OH)_2D_3$ [238] e, finalmente, a mineralização da matriz [160,239]. Estas observações, juntamente com outras [205,240-244], sugerem que os glucocorticóides desempenham um papel importante na proliferação e diferenciação das células osteoprogenitoras em células da linhagem osteoblástica [160,239]. Os resultados apresentados neste trabalho estão de acordo com o descrito na literatura, isto é, as culturas tratadas com Dex apresentaram um conteúdo em ADN (Fig. 4.1 BII) e em proteína total (resultados não apresentados) mais elevados, a proliferação celular (Fig. 4. 1 AII) foi interrompida mais precocemente (cerca de 7 dias), observou-se uma forte indução da actividade da FA (Fig. 4.2 II) e os níveis máximos da enzima foram observados mais precocemente (18° dia de cultura); a mineralização da matriz

orgânica tornou-se visível imediatamente a seguir à interrupção da proliferação celular e ao valor máximo da actividade de FA (18° dia de cultura). Contudo, existem estudos que mostram efeitos inibitórios na proliferação das culturas de células osteoblásticas após um tratamento prolongado com Dex [161,211] e, também, após uma curta exposição ao glucocorticóide [236].

Os efeitos da dexametasona nas células osteoblásticas são também afectados pela presença de outros compostos que influenciam os mecanismos de regulação ósseos, já que as interacções das várias hormonas e factores de crescimento são importantes na determinação da proliferação e função celular [35,175]. Nas culturas tratadas com uma combinação de dexametasona e outras hormonas (PTH e 1,25$(OH)_2D_3$) verificou-se, ao 18° dia de cultura, uma diminuição significativa dos valores máximos observados na actividade de FA relativamente às culturas expostas apenas à dexametasona (a diminuição observada seguiu a seguinte ordem: AA + β-GF + Dex > AA + β-GF + Dex + 1,25$(OH)_2D_3$ > AA + β-GF + Dex + PTH). De salientar que a diminuição mais pronunciada foi observada nas culturas tratadas com PTH, situação experimental que provocou um aumento mais significativo da actividade de FA quando as culturas foram realizadas na ausência de Dex; neste caso, a actividade máxima de FA observada nas várias culturas verificou-se pela seguinte ordem: AA + β-GF < AA + β-GF + 1,25-$(OH)_2D_3$ < AA + β-GF + PTH, (Fig. 4.2).

A presença de Dex nas culturas celulares de osso alveolar durante as diferentes fases do tempo de cultura resultou sempre num aumento da proliferação celular e da actividade de FA, sugerindo que este glucocorticóide influencia as células da linhagem osteoblástica em diferentes estados de diferenciação, como demonstrado em outros sistemas de cultura [204,205]. Contudo, o tratamento com a Dex produziu diferentes efeitos, dependentes da fase ("lag", proliferativa ou pós-proliferativa) em que esta foi adicionada às culturas. Constatou-se, deste modo, que o efeito da Dex na proliferação celular foi especialmente evidente quando o glucocorticóide estava presente durante a fase proliferativa (segunda e terceira semanas de cultura). Pelo contrário, a indução da actividade de FA e a capacidade de formação de áreas mineralizadas foram mais pronunciadas nas culturas expostas à Dex durante a primeira semana de incubação. A exposição durante as fases mais tardias de evolução do fenótipo osteoblástico (quarta e quinta semanas) resultou num pequeno ou nenhum efeito nos parâmetros medidos. Estas observações sugerem, como se verifica para a maioria dos compostos que afectam o metabolismo ósseo, que os efeitos da dexametasona no crescimento celular e na actividade funcional dependem do estado de diferenciação das células

osteoblásticas. Neste tipo de culturas, a indução do fenótipo osteoblástico pela Dex parece resultar principalmente do efeito desta hormona nas células que se encontram nos estados mais precoces de diferenciação. Esta afirmação parece ser corroborada pelo facto das culturas expostas à acção da Dex, continuamente ou apenas durante a primeira semana de incubação, apresentarem um comportamento celular (relação proliferação-diferenciação) semelhante. Em ambas as situações observou-se uma aceleração da diferenciação osteoblástica. A diminuição do efeito da Dex nas fases mais tardias do tempo de cultura era esperada, já que nestas fases as células se encontravam muito diferenciadas. Os resultados referidos neste trabalho são concordantes com vários estudos efectuados em culturas de medula óssea (de rato e humana) e de osso trabecular que mostraram que os tratamentos prolongados com doses baixas de dexametasona promoviam a diferenciação das células osteoblásticas [155,161,162,176] e, ainda, com outros estudos que mostraram que o tratamento precoce de culturas enriquecidas em células osteoblásticas levava a um aumento da diferenciação celular e à formação óssea [160].

Vários estudos sugerem que a dexametasona, ao actuar ao nível das células osteoprogenitoras em diferentes fases de diferenciação, promove a proliferação e diferenciação de células mais imaturas e aumenta a capacidade proliferativa de células mais maduras, possibilitando um número suficiente de divisões celulares de modo a formar um nódulo visível. No entanto, verifica-se que o efeito da dexametasona parece ser bifásico: em doses baixas (0,5-100 nM) aumenta a área ocupada pelos nódulos formados bem como o seu tamanho e número (resposta máxima a 10 nM) [17,139,155,160-162,173,176,211], enquanto que em doses farmacológicas (1 μM) é menos efectiva ou mesmo não estimuladora [160].

Num estudo recente [245] realizado em culturas de medula óssea, em condições experimentais semelhantes às descritas neste trabalho, a Dex (10 nM) foi adicionada após as células em cultura terem atingido a confluência e por um período de quatro semanas; os resultados mostraram um aumento da actividade de FA mas nenhum efeito no cálcio total depositado na matriz extracelular. Estas observações parecem ser consistentes com o observado nas culturas celulares de osso alveolar tratadas com dexametasona durante a quarta e quinta semanas de exposição (fase pós-proliferativa), nas quais nenhum efeito foi observado na mineralização da matriz.

Os estudos descritos na literatura mostram que os efeitos dos glucocorticóides na formação óssea *in vitro* (efeitos anabólicos ou catabólicos) nem sempre são consistentes com os

observados *in vivo* (efeitos normalmente catabólicos). Estes estudos revelaram que essas hormonas possuem efeitos muito diversos e complexos no tecido ósseo e podem modificar nas células osteoblásticas a expressão de uma grande variedade de genes, incluindo os relacionados com as proteínas estruturais, factores de crescimento, receptores e enzimas [119]. A dexametasona pode influenciar as células osteoblásticas de várias maneiras: directamente, ao actuar em várias etapas na sequência proliferação-diferenciação osteoblástica, e/ou indirectamente ao afectar a síntese e a função dos factores de crescimento [35,175,239]. Verifica-se, igualmente, que os efeitos dos glucocorticóides dependem do modelo experimental, da concentração, do tempo e duração de exposição à acção da hormona, da presença de outras substâncias que influenciam o metabolismo ósseo e do estado de diferenciação das células [16,35,160,175,119,204,236,245,246].

6. CONCLUSÃO DO CAPÍTULO

A relação proliferação-diferenciação das culturas celulares de osso alveolar humano, efectuadas em condições que favorecem a mineralização da matriz extracelular (AA + β-GF), pode ser modulada pela acção da PTH, 1,25-$(OH)_2D_3$ e Dex.

A PTH e, em especial, a dexametasona induzem significativamente a diferenciação das células osteoblásticas. As culturas tratadas com estas hormonas continuamente ou apenas durante a primeira ou a segunda semana de cultura apresentam uma expressão mais precoce e mais elevada da actividade de FA e uma maior capacidade de formação de depósitos minerais. Já a adição destas hormonas a partir da terceira semana de incubação não conduz a alterações significativas relativamente às culturas efectuadas em condições controlo (ausência da hormona).

As culturas tratadas com uma combinação de dexametasona e outras hormonas (Dex + PTH; Dex + 1,25-$(OH)_2D_3$) apresentam uma diminuição significativa dos valores máximos observados para a actividade de FA, relativamente às culturas que apenas continham Dex; contudo, o processo de mineralização parece não ser afectado.

CAPÍTULO V:

EFEITO DO IÃO FLUORETO NO COMPORTAMENTO OSTEOBLÁSTICO DE CULTURAS CELULARES DE OSSO ALVEOLAR HUMANO

1. IMPORTÂNCIA DO IÃO FLUORETO NA PREVENÇÃO DA CÁRIE DENTÁRIA E NO TRATAMENTO DA OSTEOPOROSE

UTILIZAÇÃO DO IÃO FLUORETO NA PREVENÇÃO DA CÁRIE DENTÁRIA

O flúor tem efeitos muito importantes nos tecidos mineralizados do organismo, nomeadamente nos dentes e nos ossos [86,95]. O seu efeito foi observado pela primeira vez *in vivo* há cerca de um século quando um jovem dentista foi exercer a sua actividade em Colorado Springs (Colorado, 1901) [248]. Fred McKay constatou que os dentes da população residente nessa área apresentavam uma pigmentação intensa, que por vezes consistia apenas em pequenas manchas opacas brancas, perfeitamente visíveis na superfície translúcida dos dentes ("mottling"). Contudo, noutras situações os dentes apresentavam uma pigmentação castanha escura e o esmalte estava frequentemente danificado. Não encontrando nos seus livros uma explicação para este fenómeno designou-o por "Colorado Brown Stain". Posteriormente, McKay observou a ocorrência deste fenómeno noutras partes do país e concluiu que este era devido a uma substância existente na água e que a sua acção era mais eficaz nas primeiras fases do desenvolvimento dos dentes permanentes das crianças. Por outro lado, verificou que a prevalência de cárie dentária nas pessoas que sofriam deste síndroma era menor. Em 1931 estudos independentes efectuados em três laboratórios diferentes permitiram concluir que essa substância era o ião fluoreto (F^-) e, em 1942, foi estabelecido que a presença deste ião na água de consumo na concentração de 1 ppm reduzia a incidência de cárie dentária na população sem se verificar os efeitos adversos da pigmentação (tabela 5.1) [86,248].

Fluoreto (ppm)	Efeitos
< 0,5	Alta incidência de cárie dentária; pigmentação ausente.
1	Baixa incidência de cárie dentária; pigmentação ligeira ou ausente.
> 2,5	Pigmentação intensa.
10 a 20	Pigmentação muito intensa

Tabela 5.1- **Níveis de fluoreto na água de consumo.**

A quantidade de F^- no organismo depende da quantidade ingerida (água, ar e fármacos fluoretados), biodisponibilidade após absorção através do tracto gastrointestinal, distribuição

nos fluídos corporais, excreção renal e, principalmente, da sua retenção. Num adulto normal, entre os 18 e os 80 anos de idade, os níveis de fluoreto no plasma situam-se entre 0,5-2,3 μM (8,5-45 ng/mL) [249-252]. Os tecidos mineralizados (osso e dentes) constituem quase que exclusivamente os locais de retenção deste anião e a sua fixação no osso depende do nível de cálcio depositado durante a formação ou remodelação óssea. Assim, as alterações ósseas induzidas pelo F^- podem depender não só da dose administrada e da duração do tratamento, mas também da taxa de remodelação óssea [86,252]. Com a possível excepção de seus efeitos no tecido ósseo e nos dentes, as acções farmacológicas do flúor podem ser classificadas como tóxicas, pois este inibe vários sistemas enzimáticos e diminui a respiração tecidual e a glicólise anaeróbia [86].

A cárie dentária resulta da acção de bactérias que utilizam os hidratos de carbono não só como fonte de energia, mas também para a produção de placa dentária, uma película de produtos precipitados da saliva e dos alimentos sobre os dentes. Esta película constitui o primeiro evento no desenvolvimento da cárie, pois é habitada por inúmeras bactérias, as quais produzem ácidos e enzimas proteolíticas. Os ácidos são os maiores responsáveis pela formação de cárie porque os sais de cálcio dos dentes dissolvem-se lentamente num meio altamente ácido. A matriz orgânica remanescente, uma vez absorvidos os sais, é rapidamente digerida pelas enzimas proteolíticas [95,248].

O ião fluoreto ajuda a reduzir a cárie dentária de diversas maneiras. A administração de fluoreto às crianças, quando da formação dos dentes, leva à deposição deste anião no esmalte dos dentes sob a forma de um composto de cálcio, **fluorapatite**. Este estabiliza a estrutura do esmalte e torna-o mais resistente aos ácidos produzidos pelas bactérias da boca. O fluoreto promove, igualmente, uma diminuição da placa dentária, pois parece que as bactérias são sensíveis à sua acção, sendo este facto perceptível pela redução do número destas em presença do anião. Níveis baixos de fluoreto parecem não provocar efeitos adversos no Homem, mas na presença de concentrações muito elevadas observa-se deposição do anião, não só no esmalte dos dentes, mas também nos ossos. Quando o período de exposição é muito prolongado este processo pode levar à formação de ossos de maiores dimensões e anormais [86,95,248,249].

O reconhecimento de que a presença do flúor torna o esqueleto mais intensamente mineralizado levou alguns investigadores a iniciar o estudo do seu efeito em doentes com osteoporose [249,253]. No entanto, os sucessos mais significativos foram obtidos na área da

medicina dentária, em que a utilização de fluoreto possibilitou, em muitas partes do mundo, a redução drástica da prevalência e severidade da cárie dentária. A nível do tecido ósseo o sucesso foi mais difícil de alcançar [248,249].

UTILIZAÇÃO DO IÃO FLUORETO NO TRATAMENTO DA OSTEOPOROSE

Considerada, no passado, como parte inevitável do processo de envelhecimento, reconhece-se actualmente que a osteoporose é um problema crescente de saúde pública em todo o mundo, que afecta pelo menos 30% das mulheres pós-menopáusicas. A Conferência para o Desenvolvimento de Consenso (Consensus Development Conference) definiu a osteoporose como uma "doença sistémica caracterizada por uma baixa massa óssea e por deterioração da micro-arquitectura do tecido ósseo, com o consequente aumento da fragilidade óssea e da susceptibilidade para fracturas" [254,255]. Estudos epidemiológicos estabeleceram uma relação entre a osteoporose e uma redução da densidade mineral óssea, a qual tem sido correlacionada directamente com o risco de fractura. As fracturas osteoporóticas provocam considerável morbilidade e mortalidade e comprometem seriamente a qualidade de vida. São despendidos anualmente biliões de dólares a nível mundial no tratamento das consequências da osteoporose, o que justifica a intensa investigação nesta área para se instituir um tratamento apropriado nos doentes em que o risco de sofrer fracturas osteoporóticas é mais elevado - as mulheres pós-menopáusicas -, minimizando os efeitos secundários [256].

A maioria das terapêuticas usadas no tratamento da osteoporose (substituição estrogénica, bifosfonatos, calcitonina) tem como efeito a inibição da reabsorção óssea. Estes tratamentos são eficazes na prevenção adicional de perda da massa óssea, mas não contribuem para a substituição do osso previamente perdido. Os fármacos osteogénicos, tais como os androgénios, a hormona da paratiróide e o flúor apresentam vantagens já que ao estimularem a formação óssea originam um ganho na massa óssea [249,250]. No entanto, os fármacos destinados a estimular a formação óssea não existem uniformemente à disposição em todos os países e carece-se de dados suficientes sobre a respectiva eficácia e tolerabilidade. Destes agentes osteogénicos apenas o ião fluoreto está largamente disponível, mas apesar da sua acção osteogénica intensa e do seu uso clínico alargado (sob a forma de fluoreto de sódio - NaF ou de monofluorfosfato - MFF), continua a verificar-se uma grande controvérsia acerca do seu uso no tratamento da osteoporose [86,249,255,256]. Alguns estudos parecem mostrar que o

ião fluoreto diminui o número de fracturas vertebrais e conduz a um aumento linear da massa óssea trabecular [250,252,257-259]. Contudo, sabe-se igualmente que o F^- provoca alguns efeitos secundários indesejáveis, tais como: intolerância gastrointestinal, síndroma de dor periférica e defeitos na mineralização, quando administrado em doses elevadas durante longos períodos de tempo [250,251,255].

Com base em vários estudos verificou-se que a janela terapêutica se situa entre 5-10 μM (95-195 ng/mL) [249,250]. Em estudos nos quais se relacionou a dose de NaF diária com a taxa de aumento anual de massa óssea, verificou-se que a dose mínima necessária de NaF para que fossem observados efeitos na massa óssea se situava em 30 mg/dia, com um rápido aumento de eficácia entre os 30 e os 50 mg/dia e uma estabilização de efeitos a partir desta dose [249,260]. Actualmente, o NaF é usado no tratamento da osteoporose em doses de 50-75 mg/dia (23-35 mg F^-/dia) o que conduz a um aumento de cerca de 8%/ano da massa óssea vertebral, sendo esse aumento dependente da dose [249,251,252].

EFEITO DO IÃO FLUORETO NA SUBSTÂNCIA MINERAL ÓSSEA.

Estudos histológicos efectuados em doentes com fluorose e com osteoporose tratados com fluoreto sugerem que este ião actua a dois níveis: nos osteoblastos e na substância mineral existente no tecido ósseo. O fluoreto fixa-se aos cristais de hidroxiapatite, ou por adsorção à superfície dos cristais já formados ou, alternativamente, por troca iónica com os grupos hidroxilo existentes na matriz do cristal quando da sua formação - **fluorapatite** [$3(Ca_3(PO_4)_2.Ca(F)_2$] [261,262]. O comprimento da ligação química entre os iões cálcio e fluoreto é menor do que o existente entre os iões cálcio e hidroxilo, o que resulta numa ligação mais forte. Além disso, o ambiente iónico em torno dos iões fosfato é regulado com maior eficiência, aumentando a coesão do cristal. Na matriz do cristal, estes efeitos conduzem a alterações a nível da substância mineral óssea que se traduzem por um aumento da cristalinidade e tamanho do cristal, redução da solubilidade ou da taxa de dissolução (o que provoca uma diminuição na reabsorção óssea) e uma diminuição da área da superfície específica do cristal, conduzindo a um maior empacotamento do osso [263-265]. O fluoreto vai-se acumulando progressivamente no tecido ósseo (cerca de 99% do F^- corporal está associado aos tecidos mineralizados), estando a velocidade de fixação relacionada com a taxa de

remodelação óssea [263,264,266]. Por outro lado, em doentes tratados com sais de flúor verificou-se que a quantidade de fluoreto acumulada depende das características do tratamento: natureza do sal de F^- (NaF ou MFF), da sua biodisponibilidade, do tipo de preparado farmacêutico (os preparados de libertação lenta são mais eficazes no controlo dos efeitos secundários), da dose usada e da duração do tratamento [266]. Em certas condições o conteúdo em fluoreto nos ossos pode atingir níveis de toxicidade, observando-se defeitos difusos ou localizados na calcificação, os quais podem comprometer as propriedades biomecânicas do tecido ósseo. Estes defeitos podem ser explicados pelo facto dos cristais de fluorapatite requererem um maior período de tempo para a sua deposição e maturação relativamente aos cristais de hidroxiapatite [263].

O efeito do ião fluoreto na qualidade do osso tem sido largamente investigado, mas é extremamente difícil de tirar conclusões consistentes em muito do trabalho efectuado devido à diversidade das experiências realizadas. O que se pode dizer com certeza é que os efeitos dependem da dose e do tempo de exposição ao anião; da espécie estudada (existe informação para o homem, porco, ovinos, aves e roedores); e do tipo de osso, trabecular ou cortical. Há, também, alguma evidência de que os efeitos podem ser bifásicos (benéficos em doses baixas e prejudiciais em doses altas) para o Homem [267] e para o rato [268]. A estabilidade dos cristais de fluorapatite e a resistência à reabsorção é aceite por todos os investigadores [249].

A capacidade deste anião para aumentar a massa dos ossos trabeculares, sobretudo axiais, está perfeitamente estabelecida, sendo imperativo que se aprenda a utilizar o seu potencial, minimizando os efeitos secundários prejudiciais [249,266]. Neste sentido, começam a surgir estudos em que se analisa o efeito mitogénico do flúor em combinação com outros agentes, quer sejam osteogénicos (ex. fenitoína, dexametasona) ou não (ex. estrogénios). Num estudo efectuado por Otha *et al* (1995) observou-se que a acção combinada da fenitoína com doses baixas de F^- conduzia a um aumento na estimulação da formação óssea e do volume do osso trabecular sem causar defeitos na mineralização *in vivo*, apresentando esta terapêutica de combinação um grande potencial no tratamento da osteoporose [250]. Foi, igualmente, demonstrado em culturas de células tumorais (osteosarcoma TE85) que a dexametasona e o F^- quando conjugados *in vitro*, em doses baixas, conduzem a aumentos da proliferação celular, da actividade da FA e da síntese de colagénio, sendo o efeito potenciador da dexametasona confirmado *in vivo*. Assim, uma terapêutica de combinação destes dois agentes osteogénicos

pode ser útil no tratamento da osteoporose [228]. Um dos grandes problemas no tratamento desta doença com o F^- reside no facto de esta terapêutica não reduzir a taxa de fracturas dos membros. Assim, a combinação do fluoreto com estrogénios tem levado à obtenção de bons resultados, já que os estrogénios não interferem com o aumento da massa óssea axial produzida pelo F^- e, simultaneamente, reduzem a taxa de fracturas dos membros [255,266].

Como conclusão, pode dizer-se que o fluoreto pode ser usado no tratamento da osteoporose desde que o conteúdo acumulado no tecido ósseo seja mantido abaixo dos níveis de toxicidade, de modo a garantir um aumento da massa óssea sem o inconveniente de ocorrerem defeitos na calcificação e na qualidade do osso. Para que tal se verifique é necessário efectuar um controlo muito rigoroso dos níveis de fluoreto, quer plasmáticos quer ósseos.

2. ESTUDO DO EFEITO DO IÃO FLUORETO NO COMPORTAMENTO OSTEOBLÁSTICO DE CULTURAS CELULARES DE OSSO ALVEOLAR HUMANO

Parece estar bem estabelecido que o fluoreto estimula directamente a formação óssea e que esse fenómeno é devido ao efeito anabólico deste ião, mediado pela sua acção mitogénica nas células de linhagem osteoblástica [249,261]. No entanto, permanece pouco claro o mecanismo pelo qual este fenómeno ocorre. Assim, pensa-se que se pode ficar a dever ao recrutamento e activação de novos osteoblastos ou, simplesmente, à activação ou não bloqueamento dos já existentes com um aumento da função por osteoblasto. A maior parte dos estudos parece, contudo, favorecer a primeira hipótese [249,269]. Os efeitos mitogénicos do ião fluoreto foram documentados *in vitro* em diferentes tipos de cultura de células osteoblásticas [261,270-273], embora tenham sido encontrados, igualmente, efeitos inibitórios em culturas de células ósseas humanas maturas, o que pode sugerir que apenas as células osteoprogenitoras indiferenciadas sejam sensíveis à acção mitogénica do fluoreto [252,274-277]. Por outro lado, os diferentes métodos usados no isolamento das células e as diferentes condições de cultura podem contribuir para muitas das diferenças encontradas [274-276]. Além dos efeitos positivos observados na proliferação celular, alguns estudos mostraram que o fluoreto aumenta a actividade da

fosfatase alcalina, sugerindo uma estimulação deste anião na diferenciação celular das células da linhagem osteoblástica [261].

Os resultados previamente apresentados (capítulos III e IV) mostram que as culturas celulares de osso alveolar humano cultivadas na presença de AA, β-GP e Dex apresentam características osteoblásticas, nomeadamente uma actividade de fosfatase alcalina elevada e capacidade de formação de uma matriz extracelular mineralizada. No trabalho que a seguir se apresenta, estas culturas foram utilizadas como modelo para estudar o efeito do ião fluoreto na proliferação celular e actividade funcional das células osteoblásticas.

2.1. MATERIAIS E MÉTODOS

As células da primeira subcultura foram cultivadas durante 35 dias em α-MEM contendo 10% de soro bovino fetal, 0,25 μg/mL de anfotericina B, 10 μg/mL de gentamicina e suplementado com 50 μg/mL de AA, β-GP 10 mM e Dex 10 nM, na ausência (situação controlo) e na presença de várias concentrações de NaF, nomeadamente: 0,5, 1, 5, 10, 25 e 50 ppm. O ião fluoreto foi adicionado às culturas 24 horas após o início da incubação.

As culturas foram analisadas após 1, 4, 7, 14, 21, 28 e 35 dias para avaliação da proliferação celular (ensaio do MTT, conteúdos em proteína total e ADN) e parâmetros funcionais (actividade da FA e capacidade de formação de depósitos de fosfato de cálcio na matriz extracelular). Também foram determinados, ao longo do tempo de incubação, os níveis de Cai e Pi no meio de cultura.

2.2. RESULTADOS

PROLIFERAÇÃO CELULAR

A observação das culturas por microscopia de contraste de fase mostrou que as células de osso alveolar cultivadas na ausência do ião fluoreto (situação controlo) cresceram gradualmente ao longo do período de incubação, apresentando no 14º dia estruturas nodulares características que foram aumentando de tamanho com o tempo de cultura. A presença de

NaF em concentrações baixas pareceu não afectar as culturas celulares, pelo menos durante as duas primeiras semanas de incubação. No entanto, a presença deste composto em concentração elevada (50 ppm) resultou num atraso no crescimento celular; assim, a cultura deixou de exibir aos 14 dias de incubação os nódulos característicos, apresentando-os mais tarde, por volta do 28º dia.

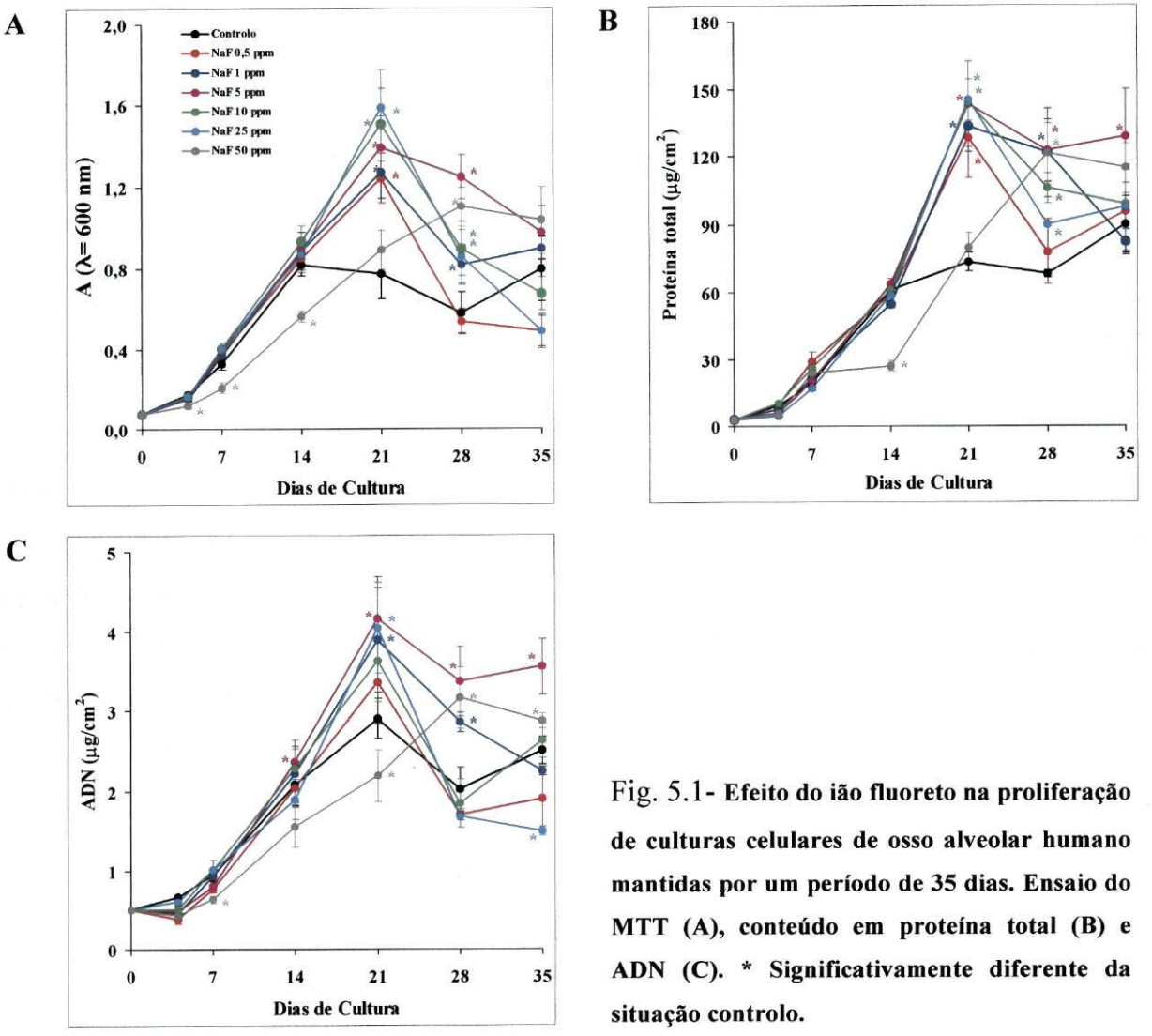


Fig. 5.1- **Efeito do ião fluoreto na proliferação de culturas celulares de osso alveolar humano mantidas por um período de 35 dias. Ensaio do MTT (A), conteúdo em proteína total (B) e ADN (C). * Significativamente diferente da situação controlo.**

O ensaio do MTT mostrou que nas culturas controlo as células proliferaram gradualmente até aos 14º-21º dias , atingindo nesta fase o seu valor máximo. De seguida, os valores da redução do MTT mantiveram-se relativamente estáveis até ao fim do tempo de incubação (Fig. 5.1 A). Os conteúdos em proteína total (Fig. 5.1 B) e em ADN (Fig. 5.1 C) seguiram um padrão semelhante.

A presença de NaF em concentrações de 0,5 a 25 ppm conduziu a um aumento significativo da redução do MTT e do conteúdo em proteína total no 21º dia, em relação à situação

controlo; de salientar que os valores sofreram um aumento de cerca de 50 a 100% e que esse aumento pareceu ser proporcional à dose de fluoreto adicionada ao meio de cultura. No entanto, este efeito não foi tão evidente quando se procedeu à determinação do conteúdo em ADN; no 21° dia, apenas as situações com 1, 5 e 25 ppm de NaF apresentaram valores de ADN significativamente superiores ao da situação controlo (Fig. 5.1 C). Durante a quarta semana observou-se uma diminuição nos valores determinados para estes três parâmetros. No 28° dia os valores de redução do MTT e do conteúdo em proteína total nas culturas tratadas com 0,5% de NaF foram semelhantes aos observados na situação controlo, mas nas restantes situações os valores determinados para estes parâmetros continuaram a ser significativamente superiores. A determinação do conteúdo em ADN revelou que apenas as culturas tratadas com 1, 5 e 25 ppm de NaF apresentaram valores significativamente superiores aos da situação controlo (Fig. 5.1).

Na presença de 50 ppm de NaF verificou-se um atraso na proliferação celular desde o início da cultura, sendo os valores da redução do MTT nos 3°, 7° e 14° dias significativamente inferiores aos da situação controlo. No 21° dia o valor da redução do MTT foi idêntico ao da situação controlo e continuou a aumentar até ao 28° dia, quando o valor atingido foi máximo e significativamente superior ao da situação controlo. A partir do 28° dia observou-se uma fase estacionária no crescimento celular. Os conteúdos em proteína total e em ADN seguiram um padrão semelhante ao observado no ensaio do MTT (Fig. 5.1).

ACTIVIDADE DE FOSFATASE ALCALINA

Nas culturas controlo verificou-se que a actividade da FA expressa em nmol/cm^2 aumentou desde o início da cultura até ao 14°-21° dia, mas principalmente do 7° para o 14°; do 21° para o 28° dia sofreu uma diminuição muito brusca e, depois, manteve-se estacionária até ao fim da cultura. Quando se procedeu ao estudo da actividade da FA em função dos conteúdos em proteína total e ADN verificou-se que a actividade da enzima atingiu um valor máximo aos 14 dias de cultura. Do 14° para o 21° dia verificou-se uma descida relativamente suave da actividade enzimática, seguida de uma descida brusca até ao 28° dia (atingido cerca de 1/3 do valor do 21° dia) (Fig. 5.2).

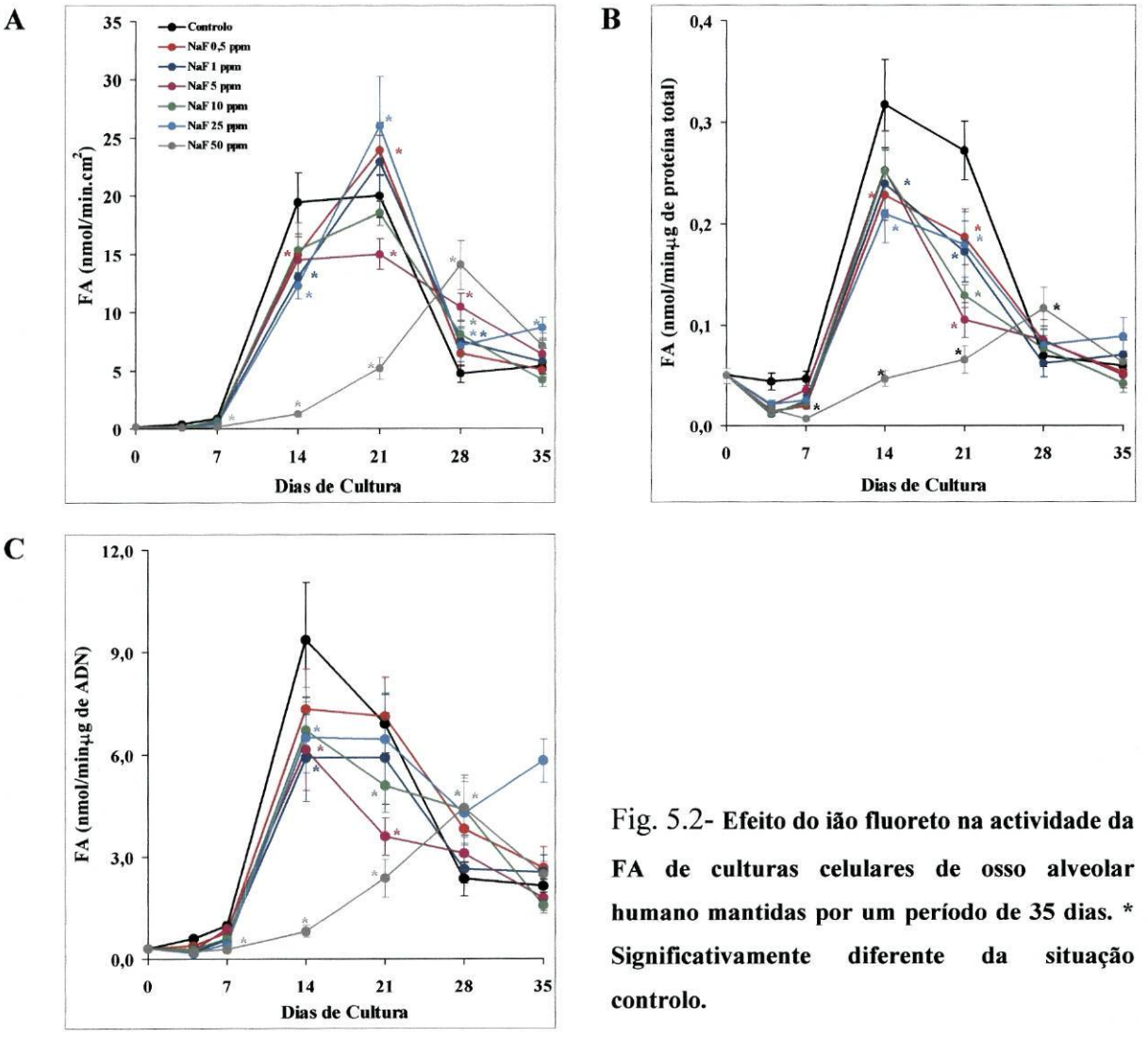


Fig. 5.2- **Efeito do ião fluoreto na actividade da FA de culturas celulares de osso alveolar humano mantidas por um período de 35 dias. * Significativamente diferente da situação controlo.**

Quando o NaF foi adicionado ao meio de cultura em concentrações de 0,5, 1 e 25 ppm verificou-se que a actividade da FA expressa em nmol/cm^2 aumentou significativamente até ao 21° dia e, de seguida, diminuiu bruscamente até ao 28° dia. No entanto, este aumento da actividade enzimática não foi real, já que os conteúdos em proteína total e ADN também aumentaram significativamente e, assim, quando se procedeu à determinação da actividade da FA em função destes parâmetros verificou-se que esta foi sempre inferior à apresentada pela situação controlo. Nestas três situações (culturas tratadas com 0,5, 1 e 25 ppm de NaF) a actividade máxima da FA ocorreu por volta do 14°-21° dia e, depois, diminuiu até ao 28° dia, atingindo valores de actividade próximos do da situação controlo (Fig. 5.2).

Nas culturas em que o ião fluoreto foi adicionado em concentrações de 5 e 10 ppm, a actividade de FA seguiu um padrão idêntico ao da situação controlo, ou seja, aumentou até ao 14° dia, atingindo aí o seu valor máximo; contudo, foi sempre inferior à observada na situação

controlo. A partir do 14° dia a actividade da enzima diminuiu até ao fim do tempo de incubação.

Na presença de 50 ppm de NaF verificou-se que a actividade da FA aumentou suavemente até ao 28° dia e, só então começou a descer. Houve um atraso muito acentuado na diferenciação celular e, assim, os teores em FA nos 7°, 14° e 21° dias foram significativamente inferiores aos da situação controlo. No entanto, no 28° dia a actividade da enzima foi significativamente superior ao da situação controlo, observando-se uma diminuição a partir deste dia de cultura (Fig. 5.2).

IDENTIFICAÇÃO HISTOQUÍMICA DE FA E DE DEPÓSITOS DE FOSFATO DE CÁLCIO

A reacção de coloração para a FA foi positiva em todas as situações, qualquer que fosse o tempo de incubação. Na situação controlo verificou-se que a intensidade da coloração foi máxima aos 14 dias, seguindo-se uma fase de diminuição progressiva até ao fim deste período (Fig. 5.3).

As culturas tratadas com as cinco concentrações mais baixas de NaF, apresentaram, no 14° dia, uma intensidade de coloração idêntica à observada na situação controlo. No entanto, aos 21 dias de cultura, a reacção foi superior à da situação controlo. A partir deste dia verificou-se uma diminuição progressiva da intensidade de coloração, indicando que as culturas se encontravam em fase de degradação. Na presença de 50 ppm de NaF as culturas apresentaram uma coloração muito fraca aos 14 dias de incubação; a partir daí, verificou-se um aumento progressivo da intensidade de coloração para a FA (Fig. 5.3).

Observou-se a formação de áreas mineralizadas em todas as situações experimentais, no entanto, o seu aparecimento teve temporizações diferentes. Na situação controlo, as reacções de AV e de VK foram negativas aos 14 e 21 dias de incubação, indicando que esta cultura ainda não apresentava áreas mineralizadas. Todavia, no 28° dia a cultura apresentou reacções positivas, embora fracas, sugerindo a existência de depósitos de cálcio e de fosfatos. Aos 35 dias de incubação verificou-se um aumento da intensidade de coloração para ambas as reacções o que é indicador de que as culturas se encontravam francamente mineralizadas (Fig. 5.3).

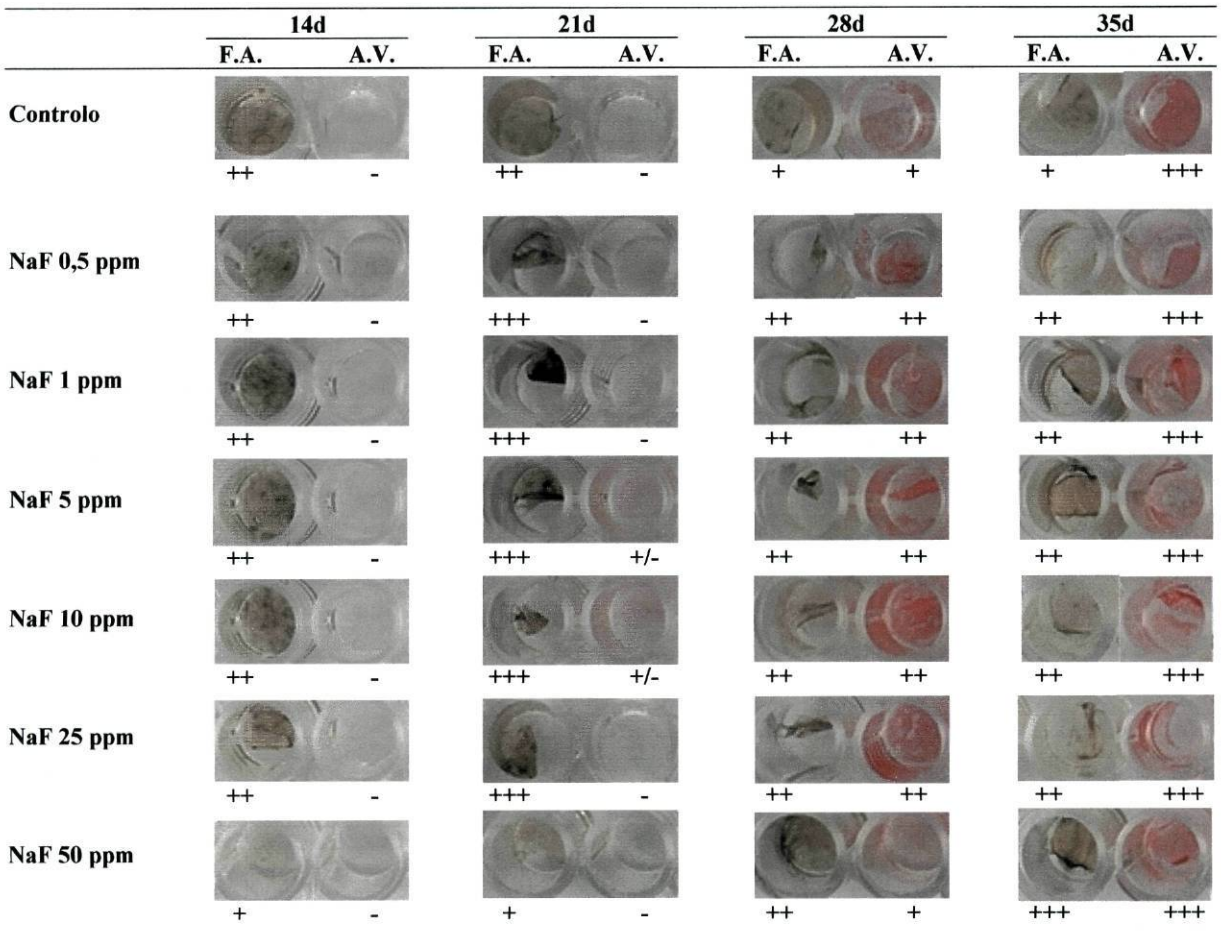


Fig. 5.3- **Fotografias macroscópicas de culturas de osso alveolar humano aos 14, 21, 28 e 35 dias de cultura e coradas histoquimicamente para localização da FA e de depósitos de fosfato e de cálcio (reacção da alizarina vermelha; A.V.). A intensidade da coloração foi classificada da seguinte maneira: -, negativa; +/-, fraca a indetectável; +, positiva de fraca intensidade; ++, moderadamente positiva; +++, intensamente positiva.**

Na presença do ião fluoreto verificou-se que as reacções indicadoras da presença de áreas mineralizadas foram negativas aos 14 dias de incubação. Aos 21 dias, no entanto, as culturas efectuadas na presença de 5 e 10 ppm de NaF apresentaram reacções fracamente positivas, indicando que se encontravam em fase de mineralização. Ao 28º dia todas as situações apresentaram reacções de A.V. e V.K. positivas, sendo a intensidade de coloração superior à da situação controlo com excepção da situação efectuada na presença de 50 ppm de NaF. Assim, no 35º dia todas as culturas estavam mineralizadas e a intensidade era idêntica em todas as situações (Fig. 5.3).

CONTEÚDO DE Pi E Cai NO MEIO DE CULTURA

A determinação dos níveis de Pi e de Cai nos meios de cultura utilizados e incubados na ausência de células revelou uma constância de valores (aproximadamente 2 mmol/L) ao longo de todo o tempo de incubação, indicando ausência de deposição mineral nas condições experimentais em que o ensaio foi realizado (Fig. 5.4 AI e BI).

Nas culturas controlo os teores em Pi começaram a aumentar a partir do sétimo dia de incubação, atingindo um valor máximo no 21° dia (aproximadamente 9 mmol/L) (Fig. 5.4 AII). De salientar que esse aumento foi muito intenso entre o 11° e o 14° dias (de 2 para 5 mmol/L) e entre o 14° e o 18° dias (de 5 para 8 mmol/L). A partir do 21° dia observou-se uma diminuição progressiva dos níveis de Pi até ao fim do período de incubação; no entanto, as descidas mais acentuadas verificaram-se entre o 21° e o 25° dias (de 9 para 5,5 mmol/L) e do 25° para o 28° dia (de 5,5 para 3 mmol/L). Por outro lado, observou-se uma descida suave do teor em Cai existente no meio de cultura a partir dos 14°-18° dias até ao 21° dia (aproximadamente, de 1,8 para 1,2 mmol/L); entre os dias 21° e 25° a descida foi mais acentuada (aproximadamente, de 1,2 para 0,5 mmol/L) e continuou a descer, embora ligeiramente, até ao 28° dia (Fig. 5.4 BII). A partir daí verificou-se que o teor em Cai começou a aumentar.

As culturas tratadas com 0,5, 1 e 25 ppm de NaF seguiram um padrão semelhante ao da situação controlo. Porém, os valores do Pi nos 14°, 18° e 21° dias foram significativamente inferiores. Assim, estas três situações experimentais atingiram um valor máximo aos 21 dias de cultura (aproximadamente 8 mmol/L) e a partir daí verificou-se uma diminuição progressiva dos teores em Pi (Fig. 5.4 AII). Por sua vez, os teores de Cai no meio de cultura foram significativamente superiores (0,5 e 1 ppm de NaF) e inferiores (25 ppm de NaF) entre os dias 25° e 35° em relação aos valores da situação controlo (Fig. 5.4 BII).

Na presença de 5 e 10 ppm de NaF verificou-se que as culturas atingiram um valor máximo em Pi no 18° dia (aproximadamente 8 mmol/L), sendo os valores dos dias 14° e 21° significativamente inferiores aos da situação controlo. No 18° dia o valor encontrado não diferiu do da situação controlo e a partir daí verificou-se uma diminuição dos teores em Pi (Fig. 5.4 AII). Estas culturas apresentaram uma descida dos valores de Cai a partir do 14° dia e até ao 25° (aproximadamente, de 1,6 para 0,3 mmol/L). É de salientar que os valores dos

dias 18º e 21º foram significativamente inferiores aos da situação controlo. A partir do 25º dia verificou-se que os teores em Cai apresentaram uma tendência para aumentar, até ao fim do período de incubação (Fig. 5.4 BII).

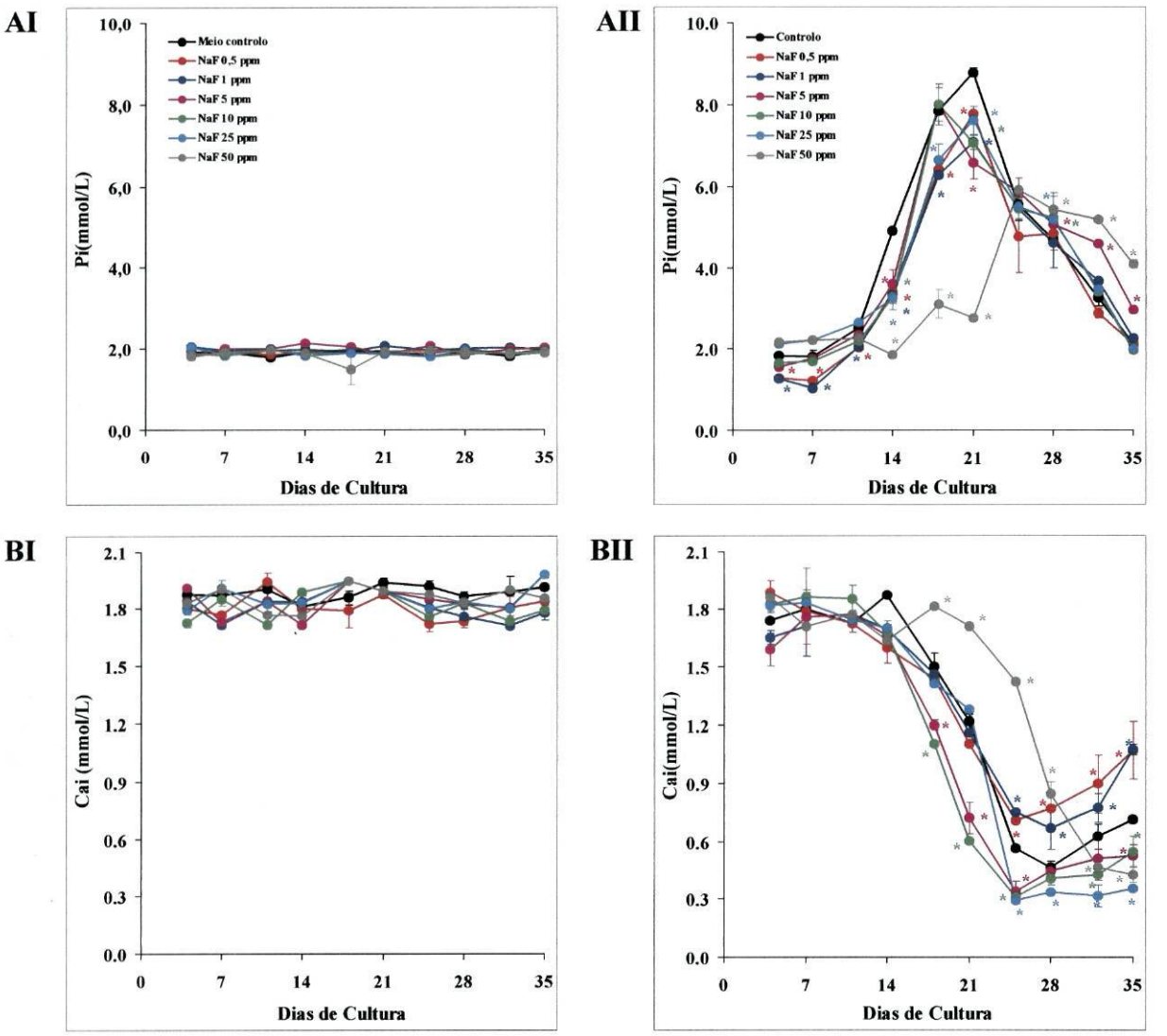


Fig. 5.4- **Níveis de Pi (A) e de Cai (B) determinados nos meios de cultura incubados na ausência (I) e na presença (II) de células provenientes de culturas de osso alveolar humano efectuadas na ausência e na presença do ião fluoreto. * Significativamente diferente da situação controlo.**

As culturas tratadas com 50 ppm de NaF apresentaram um atraso no aumento do teor em Pi, o que está de acordo com os teores de FA encontrados. Assim, verificou-se que o conteúdo em Pi aumentou lentamente até ao 21º dia (aproximadamente 2,5 mmol/L) e mais bruscamente até ao 25º (aproximadamente 6 mmol/L), atingindo o seu valor máximo. Aos 14º, 18º e 21º dias os valores encontrados foram significativamente inferiores aos da situação controlo. A partir do 25º dia verificou-se uma diminuição lenta do teor em Pi até ao 32º (aproximadamente 5,5

mmol/L) e mais acentuada até ao 35° (aproximadamente 4 mmol/L), (Fig. 5.4 AII). Esta situação apresentou também um atraso significativo no consumo do Cai existente no meio de cultura. Assim, a descida dos teores em Cai apenas se verificou a partir do 21° dia, sendo a descida muito lenta até ao 25° (aproximadamente, de 1,6 para 1,4 mmol/L), mais acentuada deste até ao 28° (aproximadamente, de 1,4 para 0,8 mmol/L) e relativamente lenta até ao fim do período de incubação (aproximadamente, de 0,8 para 0,4 mmol/L) (Fig. 5.4 BII).

2.3 DISCUSSÃO

Neste ensaio verificou-se que a adição ao meio de cultura de NaF até uma concentração de 25 ppm contribuiu para um aumento da viabilidade/proliferação celular, o qual se reflectiu num incremento dos conteúdos em proteína total e em ADN. Estes resultados reflectem o efeito mitogénico do ião fluoreto observado em vários trabalhos realizados por outros grupos de investigadores. Bellows *et al* [278] mostraram haver um aumento da expressão celular, em culturas de células fetais de calvaria de rato, em resposta a doses crescentes de NaF (10 e 500 μM); doses superiores a 500 μM revelaram ser citotóxicas. O fluoreto numa concentração de 10 μM conduziu a um aumento da taxa de incorporação da timidina e do número de células em culturas de células embrionárias de pintainho [270] mas não provocou o mesmo tipo de resposta em culturas de células ósseas humanas [249]. As diferenças encontradas em resposta ao fluoreto, em função da espécie e da idade (pintainho vs humano e embrionário vs adulto), não foram observadas em todos os estudos realizados.

Marie *et al* [279] realizaram um estudo do comportamento de células osteoblásticas isoladas a partir de doentes com osteoporose tratados com NaF durante dois anos. Neste trabalho, os doentes foram divididos em dois grupos, nomeadamente, doentes com resposta histológica ao tratamento e doentes sem resposta histológica ao tratamento. Num estudo comparativo, os autores observaram que as células dos indivíduos que apresentavam resposta à terapêutica possuíam uma síntese máxima de ADN cerca de 2,5 vezes superior do que a observada nos indivíduos que não responderam ao tratamento e, também, da observada nos indivíduos controlo. Os estudos realizados por este grupo de investigadores sugeriram que o aumento da massa óssea nos indivíduos que responderam ao tratamento com fluoreto se deveu mais a um aumento da proliferação dos osteoblastos do que a um aumento da diferenciação dos osteoblastos já existentes [279,280].

Apesar de tudo, o mecanismo exacto pelo qual o fluoreto apresenta um potencial mitogénico contínua por esclarecer. Actualmente pensa-se que o mecanismo molecular envolvido na proliferação dos osteoblastos se manifesta da seguinte maneira: os factores de crescimento com características osteogénicas, tais como o IGF-1 ("Insulin Growth Factor-1), iniciam o seu sinal ao ligarem-se a receptores específicos existentes na membrana celular, sendo o sinal mediado por uma enzima (quinase da tirosina); o sinal subsequente envolve a fosforilação dos resíduos de tirosina existentes nas proteínas responsáveis pela propagação do sinal mitogénico (tais proteínas são activas apenas quando fosforiladas); algumas fosfatases ácidas, tais como a fosfotirosilfosfatase actuam neste sistema, a pH neutro, para desfosforilar estas proteínas ao nível dos resíduos de tirosina e, consequentemente, inactivar o sinal mitogénico. Pensa-se, actualmente, que o fluoreto interactua com os osteoblastos inibindo a actividade da enzima fosfotirosilfosfatase, o que conduz a um aumento da fosforilação dos referidos resíduos de tirosina. Em consequência desta inibição verifica-se um prolongamento do sinal mitogénico, o que conduz a um aumento da proliferação celular [228,266,281-283].

Em culturas de células fetais de calvaria de rato tratadas com ião fluoreto observou-se um aumento do número de nódulos formados pelas células osteoprogenitoras [278,284]. Verificou-se, igualmente, que nas culturas de células do tipo osteoblástico o fluoreto foi capaz de acelerar a acumulação nos nódulos de depósitos de cálcio/fosfato. Estes efeitos podem estar relacionados com a estimulação por parte do fluoreto quer no transporte do fosfato quer na proliferação celular [261].

No trabalho apresentado verificou-se um aumento dos teores de FA quando expresso em $nmol/cm^2$ sugerindo, à primeira vista, que houve um aumento da diferenciação osteoblástica; no entanto, quando foram determinadas as actividades enzimáticas em função dos conteúdos em proteína total e em ADN, esse fenómeno desvaneceu-se, já que o referido aumento se deveu a um aumento do número de células existentes e não a um aumento da diferenciação das mesmas. Nas situações com 5 e 10 ppm de fluoreto verificou-se, contudo, uma ligeira antecipação da diferenciação dos osteoblastos, já que a mineralização ocorreu ligeiramente mais cedo (cerca de 3 dias). Pelo contrário, a adição de 50 ppm de NaF ao meio de cultura conduziu a um atraso significativo da proliferação celular, a qual se reflectiu em todos os restantes parâmetros e, consequentemente, num atraso da mineralização que apenas foi observada aos 28 dias de cultura.

CAPÍTULO VI:

COMPORTAMENTO OSTEOBLÁSTICO DE CULTURAS CELULARES DE OSSO ALVEOLAR HUMANO NA PRESENÇA DE BIOMATERIAIS

1. BIOMATERIAIS PARA UTILIZAÇÃO NO TECIDO ÓSSEO

Quando uma parte do organismo perde a sua função ou morfologia devido a dano traumático, a processo patológico ou mesmo o envelhecimento do indivíduo, o defeito pode ser tratado e/ou corrigido por duas vias: transplantação, na qual podem ser utilizados tecidos ou órgãos, e implantologia, que utiliza materiais artificiais para restaurar a função e/ou a morfologia [285]. O termo **implante** refere-se, portanto, a "dispositivos médicos colocados cirurgicamente no organismo, de forma temporária ou permanente, para fins de diagnóstico ou terapêuticos" [286,287]. Os materiais artificiais referidos são designados pelo termo **biomaterial**, o qual foi definido como sendo "um material destinado a contactar com sistemas biológicos para avaliar, tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do organismo" [288]. Considerando o tecido ósseo, os biomateriais utilizados podem ser classificados em função da sua composição química (propriedades intrínsecas do material) ou do seu comportamento biológico (relacionado com a resposta do hospedeiro).

Quanto à sua composição química os biomateriais podem ser classificados [285,286,289] em:

- metais (exemplo, Ti);
- ligas metálicas: aço inoxidável (exemplo, AISI 316L), ligas de crómio-cobalto (Co-Cr) e ligas de titânio-alumínio-vanádio (Ti6Al4V);
- materiais cerâmicos: óxidos de alumina, de zircónio e de magnésio; fosfatos de cálcio e apatites; vidros de sílica e vidros cerâmicos;
- polímeros: polietileno, polipropileno, poliuretano; e
- compósitos: combinações dos diferentes materiais.

A outra classificação de biomaterial baseada na resposta do hospedeiro foi sugerida por Osborne *et al* [290], que os classificam como biotoleráveis, bio-inertes e bioactivos, quando causam respectivamente (1) uma resposta local do hospedeiro negativa mas tolerável (situação em que o implante é geralmente envolvido por uma camada de tecido fibroso, como pode observar-se, por exemplo, com o aço inoxidável e as ligas de Co-Cr); (2) uma ausência de resposta local por parte do hospedeiro (os tecidos circundantes encontram-se em contacto próximo com o implante, sem encapsulamento fibroso; o Ti é um exemplo de um material inerte, estando descrito no entanto a possibilidade de se verificar metalose); e (3) uma resposta local positiva do hospedeiro (verifica-se uma ligação entre o material e o tecido

circundante; os materiais bioactivos disponíveis para substituição óssea possuem iões cálcio e grupos fosfato livres nas suas superfícies, os quais promovem uma ligação firme entre esta e os tecidos onde o material é implantado; são exemplos destes materiais, os fosfatos de cálcio, a hidroxiapatite, a osteoapatite e os vidros bioactivos)[289].

A perda precoce dos dentes ou o aparecimento de certas doenças conducentes ao aparecimento de defeitos ósseos e consequente perda da massa óssea levaram à introdução dos biomateriais na medicina dentária. Nesta área os biomateriais são utilizados na reconstrução ou preenchimento de defeitos ósseos, na prevenção da reabsorção de osso alveolar após extracção dentária [291-293] e na substituição isolada ou múltipla de dentes[285].

Actualmente encontram-se no mercado diferentes materiais para utilização em medicina dentária. Os mais utilizados são o osso (autógeno, alógeno, xenógeno, descalcificado ou desmineralizado), polímeros, metais e materiais cerâmicos[285]. As ligas metálicas mais utilizadas em cirurgia ortopédica e medicina dentária são os aços inoxidáveis (por exemplo, AISI 316L), as ligas de cobalto-crómio e as ligas de titânio-aluminio-vanádio (Ti6Al14V)[285,286,289]. O titânio puro é largamente utilizado em implantologia oral e outras aplicações médicas [285]. As propriedades destes materiais variam significativamente, tanto nas características mecânicas como na composição química. Os metais, devido à sua elevada elasticidade, plasticidade e ductilidade bem como à possibilidade técnica de modificar a sua superfície externa, constituem um excelente material de estudo para a obtenção de uma melhor biocompatibilidade[286,289,294,295].

O termo **biocompatibilidade** foi definido como sendo "a capacidade de um material desencadear uma resposta adequada do hospedeiro, numa aplicação específica" [296]. O conceito de biocompatibilidade baseia-se nas interacções entre o material e o meio biológico envolvente, ou seja, não é uma propriedade intrínseca do material [297]. Um dos aspectos mais importantes da biocompatibilidade, no que respeita às qualidades do material, é a resposta tecidular local, que normalmente permite obter uma indicação clínica sobre o sucesso do implante [298]. O controlo da biocompatibilidade é assim, sem dúvida, o factor mais importante no sucesso, a longo prazo, dos implantes [299]. Assim, um biomaterial antes de ser utilizado clinicamente deve ser testado exaustivamente para avaliar a sua segurança a nível biológico, no que diz respeito à sua toxicidade, carcinogenicidade e biocompatibilidade [286]. Este conjunto de estudos inclui, numa primeira fase, ensaios específicos *in vitro* (em meio

simulador do ambiente fisiológico e com culturas de células semelhantes às dos tecidos onde o material vai ser implantado [300]) e *in vivo* (no animal, em condições próximas da utilização final do biomaterial). A segunda fase consiste na realização de ensaios em seres humanos, em condições experimentais bem controladas, onde é avaliado o seu comportamento local e efeitos sistémicos [285,286,287]. Só após a obtenção de resultados válidos na multiplicidade dos estudos realizados é que o biomaterial pode ser utilizado clinicamente.

A padronização e utilização dos biomateriais para fins clínicos é regulada por diversos organismos internacionais (ISO, ASTM, BS, AFNOR, ADA, FDA, etc.) que determinam o recurso a ensaios em culturas de células antes da realização dos estudos *in vivo* [301-305]. De acordo com um documento da ISO [301], a toxicidade dos materiais pode ser determinada *in vitro* pela realização de ensaios com os seus extractos (para detectar efeitos de toxicidade ao nível dos produtos libertados pelos materiais), por contacto directo com o material (a suspensão celular é colocada directamente sobre o material) ou por testes indirectos (as células encontram-se separadas do material por meio de uma barreira difusora, a qual impede a deterioração física das células, por parte do material). Esta primeira fase tem como objectivo verificar se o material provoca alterações nas células, nomeadamente na morfologia, proliferação, viabilidade, integridade da membrana e sua degeneração ou lise. A toxicidade *in vitro* é, assim, traduzida por efeitos negativos ou deletérios ao nível das funções celulares normais. Estes fenómenos podem assumir um leque alargado de alterações, desde uma perda acentuada da viabilidade celular até alterações pouco perceptíveis da função celular, as quais só podem ser detectadas por meios bioquímicos [152]. Estes ensaios devem ser efectuados, de preferência, com o mesmo tipo de células do local onde o material vai ser implantado [305].

As principais limitações deste tipo de ensaio resultam, essencialmente, da dificuldade de reproduzir, *in vitro*, o ambiente fisiológico dos tecidos orgânicos. Deste modo, não englobam todas as interacções que existem entre os factores incluídos nos mecanismos de defesa e de reparação do organismo, após a implantação de um biomaterial [285,306]. A utilização de culturas celulares constitui uma metodologia válida para efectuar uma pré-selecção fácil de muitos materiais desenvolvidos para utilização médica mas, os resultados destes estudos não podem ser extrapolados directamente para as situações clínicas, sem ter em consideração as limitações e as condicionantes destes ensaios. É preciso salientar que os estudos *in vitro*, tanto genéricos como específicos, não podem substituir a subsequente experimentação *in vivo* [152,285,307].

Muitos dos estudos *in vitro* apresentados na literatura referem resultados obtidos com linhas celulares modificadas [285,308,309]. Este aspecto levanta a questão da sua validade, pois as células modificadas nunca estão envolvidas nas interacções que ocorrem *in vivo* entre os tecidos e os implantes [300,310].

A utilização de células humanas diferenciadas obtidas a partir do tecido onde, futuramente, se vão implantar os biomateriais revela-se um factor muito importante, porque é uma situação mais representativa da reacção tecidular que ocorre *in vivo* [285,311]. Todavia, nenhum modelo *in vitro* pode simular, concretamente, o meio fisiológico real em que se processam as interacções entre os tecidos e os biomateriais. Este tipo de estudos contribui fundamentalmente para a compreensão de fenómenos isolados entre as células e os biomateriais e constituem um complemento precoce dos estudos de biocompatibilidade [297,308,312-316].

2. ESTUDO DO COMPORTAMENTO OSTEOBLÁSTICO DE CULTURAS DE OSSO ALVEOLAR NA PRESENÇA DE PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO DO AÇO AISI 316L.

2.1. INTRODUÇÃO

Dos diferentes tipos de biomateriais disponíveis no mercado, os metais são os mais aplicados em medicina dentária e em cirurgia ortopédica como materiais estruturais e com funções biomecânicas. Os implantes metálicos podem ser permanentes, como os implantes dentários e as próteses da atroplastia da anca e do joelho, ou temporários, como por exemplo as placas e parafusos para fixação de fracturas ósseas internas e externas [317]. A implantação destes dispositivos no organismo origina problemas de biocompatibilidade relacionados com a degradação dos metais e, assim, o estudo da interacção dos metais e seus produtos de degradação com o sistema fisiológico torna-se altamente relevante.

A degradação dos metais pode ocorrer através da dissolução e corrosão electroquímica, bem como através da acção de forças mecânicas que resultam no desgaste e na fadiga do material [318]. O principal problema relacionado com a implantação destes dispositivos no organismo resulta

do contacto directo destes com os fluídos fisiológicos, altamente agressivos, ficando sujeitos a reacções de degradação com a consequente libertação gradual de compostos solúveis (iões, complexos organometálicos) e insolúveis (partículas) para o meio extracelular, os quais diferem do implante original em tamanho, forma e composição [319]. As partículas metálicas libertadas apresentam uma área elevada o que conduz a uma libertação mais acentuada de iões para o meio fisiológico, quer para os tecidos adjacentes aos materiais implantados, quer para outras partes do organismo [321-322]. A rapidez com que este fenómeno ocorre é um factor de grande importância, tendo em conta o envolvimento destes iões e/ou compostos em processos fisiológicos subsequentes [323]. Os resultados de vários estudos mostram que os iões e as partículas libertados dos implantes metálicos podem desempenhar um papel importante em várias situações patológicas do tecido ósseo e outros tecidos [324-330].

Os aços inoxidáveis são ligas que têm como base o ferro, podendo conter quantidades variadas de crómio, níquel e molibdénio, bem como quantidades vestigiais de outros elementos metálicos. A liga de aço mais correntemente usada em implantologia é a AISI 316L, sendo a sua composição química apresentada na tabela 6.1.

Tabela 6.1- **Composição química do aço AISI 316L (% peso; indicam-se os intervalos ou os valores máximos permitidos pelas normas da ASTM).**

Cr	Ni	Mo	Mn	Si	C	P	S	Fe
16-18	10-14	2-3	2,0 max	0,75 max	0,03 max	0,025 max	0,01 max	restante

Adaptado de "Annual Book of ASTM Standards, vol. 13 (Medical Devices), American Society for Testing and Materials, 1993.

O aço inoxidável é bem conhecido pela sua resistência relativamente elevada à corrosão, devido a um mecanismo de "self-passivating" e à formação de um filme estável de oxi-hidróxido de Cr na sua superfície [319,323]. A libertação de iões, especialmente de Cr e em menor quantidade de Fe e Ni, pode induzir uma resposta inflamatória crónica com reacção de corpo estranho [285]. Os iões metálicos libertados podem permanecer nos tecidos adjacentes, nomeadamente na cápsula fibrosa que se forma em torno do implante e o separa dos tecidos adjacentes, ou disseminarem-se através dos sistemas sanguíneo e linfático, sendo posteriormente eliminados e/ou acumulados em diversas partes do organismo [299]. Podem observar-se reacções tecidulares locais denominadas metalose, bem como reacções alérgicas que podem mesmo justificar a remoção do implante [319]. Os efeitos tóxicos e os mecanismos

carcinogénicos associados ao processo de corrosão têm sido largamente discutidos na literatura [317].

Como se pode observar na tabela 6.1 quase todos os constituintes deste aço são elementos essenciais (por exemplo, o Fe para as funções celulares e o Co para a síntese da vitamina B12). Nos tecidos normais e fluidos corporais estes elementos estão presentes apenas em quantidades vestigiais, não podendo ser tolerados em grandes quantidades pelo organismo [331]. Os implantes metálicos ao serem sujeitos ao efeito da corrosão contribuem com grandes quantidade dos referidos elementos, representando desta forma uma fonte de toxicidade [332-336].

Os estudos efectuados *in vivo* e *in vitro* têm revelado que os produtos de corrosão do aço AISI 316L apresentam efeitos adversos em vários órgãos e tecidos [322,327,337]. Os estudos in vitro sugerem que estes produtos alteram a actividade funcional das células do sistema imunitário [338] e dos fibroblastos da pele [339]. Estudos efectuados com culturas de células osteogénicas de roedores e humanas sugerem efeitos agudos e a longo prazo dos iões metálicos na proliferação e função das células osteoblásticas [195,196,340-345].

O trabalho previamente apresentado mostrou que as culturas celulares de osso alveolar humano obtidas na presença de β-GF, AA e Dex apresentam características osteogénicas, nomeadamente uma actividade de FA elevada e capacidade para formar nódulos mineralizados. À semelhança do que foi observado com outros sistemas de células ósseas, representam um modelo *in vitro* com potencialidades para estudar as interacções dos biomateriais e dos seus produtos de degradação com as células ósseas.

O objectivo deste trabalho foi, assim, estudar o efeito dos produtos de corrosão do aço AISI 316L, obtidos electroquimicamente, no comportamento osteoblástico de culturas celulares de osso alveolar humano. Foram efectuados dois ensaios. No primeiro, que constituiu um estudo preliminar, as culturas celulares foram expostas continuamente a uma concentração relativamente elevada de produtos de corrosão. Este ensaio permitiu definir as concentrações mais apropriadas a serem utilizadas num estudo mais aprofundado. No segundo ensaio, as culturas de osso alveolar foram expostas a três concentrações subletais de produtos de corrosão do aço e avaliou-se o efeito destes produtos presentes durante todo o tempo de incubação ou apenas em fases seleccionadas do período de cultura. Nos dois estudos, a

concentração dos principais iões presentes nos produtos de corrosão está na gama dos níveis de Fe, Cr e Ni encontrados nos tecidos adjacentes aos implantes de aço AISI 316L [318].

PREPARAÇÃO DO EXTRACTO CONTENDO OS PRODUTOS DA CORROSÃO DO AÇO AISI 316L

O aço AISI 316L (Fe 63,9%, Cr 18,0%, Ni 12,5%, Mo 2,8%, Si 1,2%, Mn 1,6%, P 0,45% e C 0,24%, peso/peso) foi dissolvido anodicamente em HBSS ("Hank's Balanced Salt Solution", Sigma). O extracto obtido foi analisado por espectrometria de absorção atómica para determinação da concentração das principais espécies existentes na solução: 490 μg/ml Fe ($8,77 \times 10^{-3}$ mol/L) + 224 μg/ml Cr ($4,31 \times 10^{-3}$ mol/L) + 150 μg/ml Ni ($2,55 \times 10^{-3}$ mol/L) + 26 μg/ml Mo ($0,27 \times 10^{-3}$ mol/L). Após ajuste do pH da solução a 7,4 e da sua esterilização em autoclave foram preparadas, por diluição, diversas soluções de concentração conhecida.

2.2. ESTUDO PRELIMINAR DO EFEITO DE PRODUTOS DE CORROSÃO DO AÇO AISI 316L NO COMPORTAMENTO DAS CULTURAS CELULARES

2.2.1. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste estudo, as culturas celulares (2ª subcultura) foram efectuadas em α-MEM contendo 10% de soro bovino fetal, 0,25 μg/mL de anfotericina B, 10 μg/mL de gentamicina e suplementado com 50 μg/mL de AA, β-GP a 10 mM e dexametasona a 10 nM, na ausência (situação controlo) e na presença de 1% do extracto preparado como descrito na secção anterior (correspondente a 4,90 μg/ml Fe + 2,24 μg/ml Cr + 1,50 μg/ml Ni + 0,26 μg/ml Mo). As culturas foram mantidas por um período de 37 dias, caracterizadas bioquimicamente, nos 2°, 3°, 5°, 9°, 16°, 23°, 30° e 37° dias de incubação, histoquimicamente (9° e 23° dias) e observadas por microscopia electrónica de varrimento nos 9° e 23° dias de cultura.

2.2.2. RESULTADOS

PROLIFERAÇÃO CELULAR E ACTIVIDADE DE FOSFATASE ALCALINA

Nas culturas controlo verificou-se um aumento gradual da proliferação celular até ao 23° dia, seguindo-se uma fase de diminuição gradual até ao final do período de incubação (Fig. 6.1 A e B). A actividade de fosfatase alcalina seguiu um padrão semelhante ao observado na viabilidade/proliferação celular; os aumentos mais significativos ocorreram do 5° para o 9° dia (de cerca de 0,049 para 0,109 nmol/min.µg de proteína) e do 9° para o 16° dia (de cerca de 0,109 para 0,276 nmol/min.µg de proteína). De seguida, observou-se uma diminuição muito acentuada da actividade de FA do 23° para o 30° dia (de cerca de 0,276 para 0,141 nmol/min.µg de proteína), sugerindo que a mineralização teve início durante a terceira semana de cultura (Fig. 6.1 C).

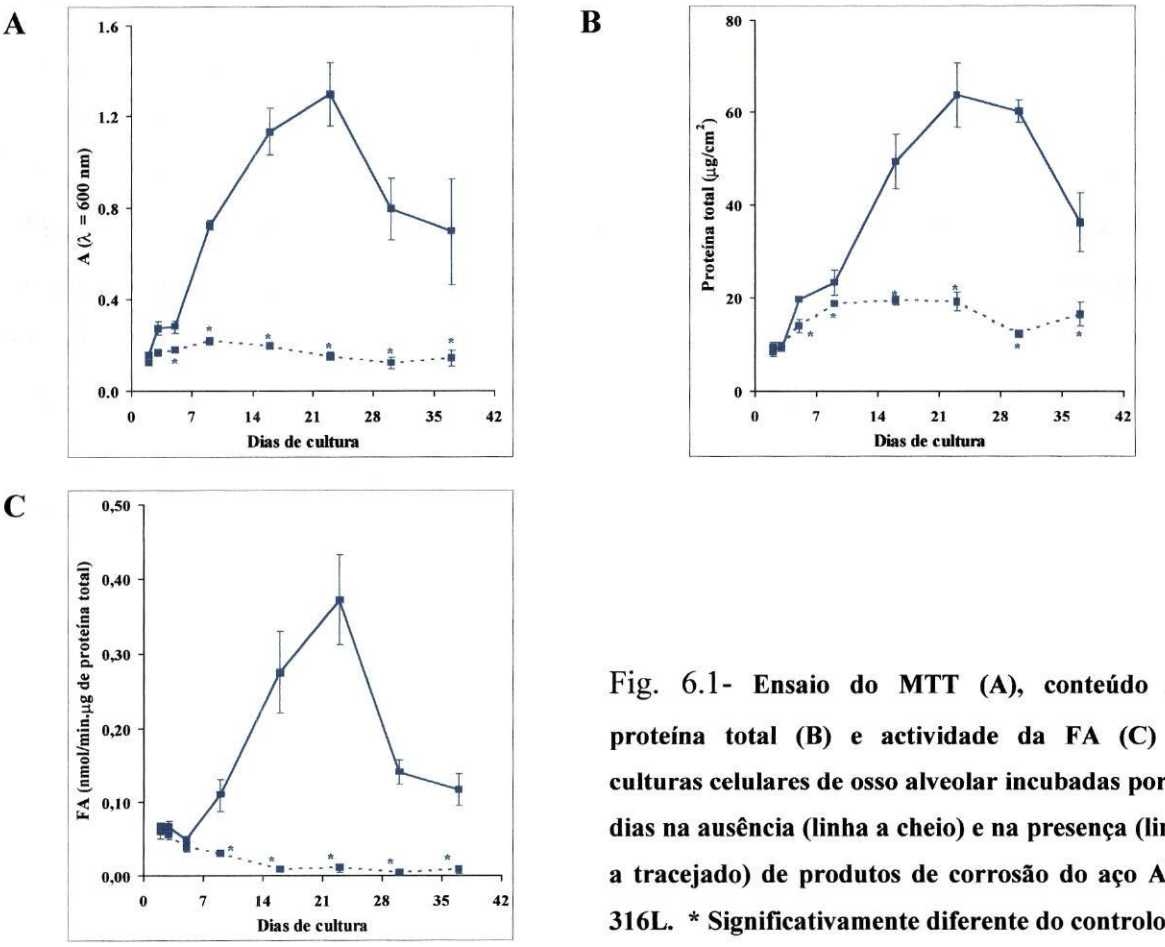


Fig. 6.1- **Ensaio do MTT (A), conteúdo em proteína total (B) e actividade da FA (C) de culturas celulares de osso alveolar incubadas por 37 dias na ausência (linha a cheio) e na presença (linha a tracejado) de produtos de corrosão do aço AISI 316L. * Significativamente diferente do controlo.**

Nas culturas expostas ao aço AISI 316L a 1% verificou-se que a proliferação celular e a actividade de fosfatase alcalina se mantiveram praticamente inalteráveis durante todo o período de exposição, indicando ausência de crescimento e diferenciação celular; os valores

encontrados para estes três parâmetros foram muito baixos e estatisticamente inferiores ao do respectivo controlo desde a primeira semana de exposição (Fig. 6.1).

IDENTIFICAÇÃO HISTOQUÍMICA DE FA E DE DEPÓSITOS DE FOSFATO DE CÁLCIO

Nas culturas controlo verificou-se a partir do 9º dia de incubação um crescimento celular muito exuberante, observando-se no 23º dia a existência de numerosos nódulos de grandes dimensões. Nas culturas efectuadas na presença dos produtos de corrosão do aço AISI 316L a 1% verificou-se uma estagnação do crescimento celular a partir do nono dia de cultura. Por outro lado, verificou-se que as células em cultura apresentavam uma morfologia atípica, ou seja, as células apresentavam granulações e inúmeras partículas e resíduos aderentes à sua membrana. Assim, as culturas celulares aos 23 dias apresentavam um aspecto semelhante ao das culturas com 9 dias de incubação, no que diz respeito ao número aparente de células, mas o grau de "sujidade" e de deterioração era mais acentuado.

As reacções de coloração para identificação da FA, efectuadas nos dias 9º e 23º, foram positivas para ambas as situações. Na situação controlo observou-se um aumento muito significativo da coloração do primeiro para o segundo dia de teste (Fig. 6.2 A e B). Nas culturas efectuadas na presença do aço AISI 316L observou-se que, embora as reacções fossem sempre positivas, a intensidade das colorações foi semelhante nos dois dias de teste (Fig. 6.2 E e F) e significativamente inferior à observada nas culturas controlo.

Aos 9 dias de cultura verificou-se que as reacções de alizarina vermelha e de von Kossa foram negativas para todas as situações experimentais, indicando ausência de mineralização. Estas reacções foram positivas apenas na situação controlo aos 23 dias de cultura, indicando a presença de mineralização (Fig. 6.2 C-D e G-H).

OBSERVAÇÃO DAS CULTURAS POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE VARRIMENTO

A observação das culturas por microscopia electrónica de varrimento confirmou os resultados observados nos ensaios histoquímicos. Assim, aos 9 dias as culturas controlo mostraram a presença de inúmeras células com uma morfologia típica semelhante entre si (Fig. 6.3 A). Aos

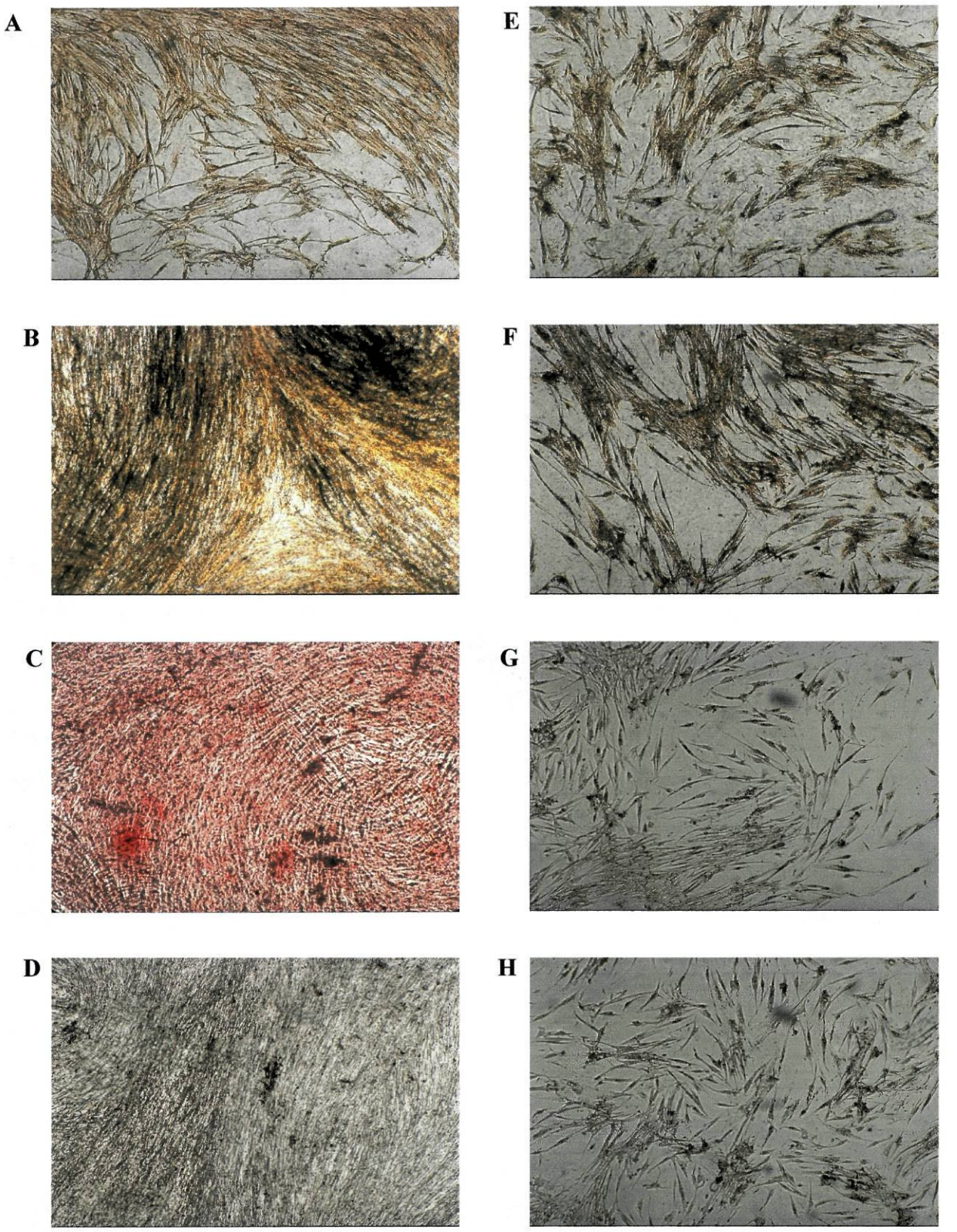


Fig. 6.2- **Microfotografias (40x) de culturas celulares de osso alveolar humano efectuadas na ausência (controlo) e na presença de produtos de corrosão do aço e coradas histoquimicamente para visualização da FA, depósitos de cálcio (reacção da alizarina vermelha; AV) e de fosfato (reacção de von Kossa, VK). Culturas controlo: (A) FA, 9d; (B) FA, 23d; (C) AV, 23 dias; (D) VK, 23 dias.**
Culturas tratadas com aço AISI 316L: (E) FA, 9d; (F) FA, 23d; (G) AV, 23 dias; (H) VK, 23 dias.

23 dias estas culturas apresentaram uma camada celular exuberante onde se destacavam alguns depósitos globulares de alta densidade, os quais correspondiam, de acordo com a microanálise por raios X efectuada, a depósitos de Ca e de P (Fig. 6.3 B e C).

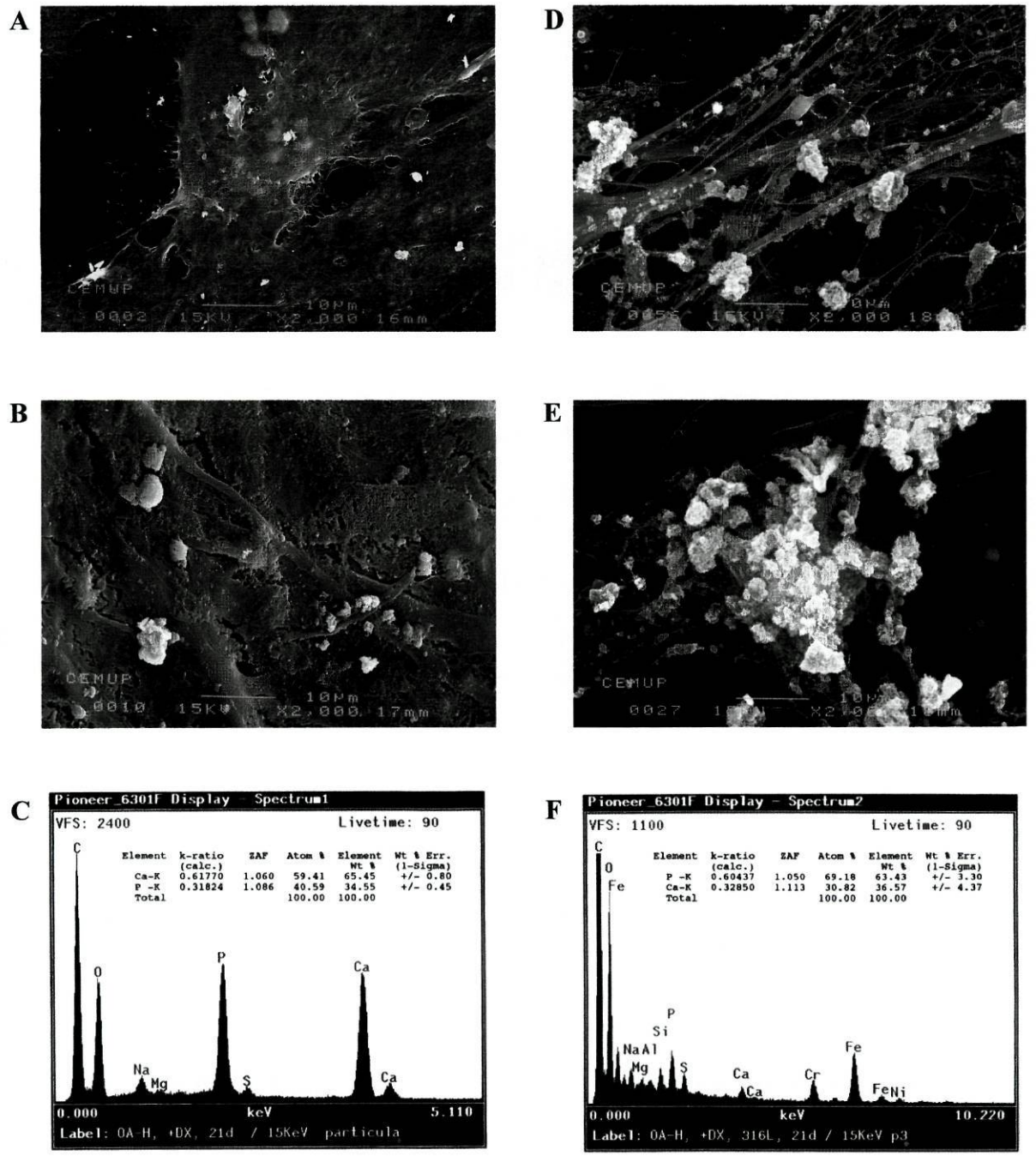


Fig. 6.3- **Fotografias de microscopia electrónica de varrimento (2000x) e espectros de microanálise por raios X de culturas celulares de osso alveolar humano cultivadas na ausência (controlo) e na presença de produtos de corrosão do aço. Culturas controlo: (A) 9 dias; (B) 23 dias; (C) 23 dias, espectro de microanálise por raios X. Culturas tratadas com aço AISI 316L a 1%: (D) 9 dias; (E) 23 dias; (F) 23 dias, espectro de microanálise por raios X.**

Nas situações experimentais efectuadas na presença de AISI 316L a 1% verificou-se, aos 9 dias de cultura, uma alteração da morfologia celular, sendo visível à superfície das membranas citoplasmáticas inúmeras partículas provenientes da solução do aço (Fig. 6.3 D). Aos 23 dias estas culturas apresentaram sinais evidentes de deterioração celular, quando comparadas com as da situação controlo e ausência de mineralização (Fig. 6.3 E e F).

2.2.3. CONCLUSÃO

Este estudo mostrou que os produtos provenientes da corrosão do aço AISI 316L a partir de certa concentração conduzem a distúrbios do normal funcionamento das culturas de osso alveolar humano, obtidas em condições experimentais que favorecem a proliferação e diferenciação das células osteoblásticas. A presença dos iões metálicos na concentração utilizada (1% do extracto preparado) impediu praticamente o crescimento celular.

2.3. EFEITO DE NÍVEIS SUBLETAIS DE PRODUTOS DE CORROSÃO DO AÇO AISI 316L NO COMPORTAMENTO DAS CULTURAS CELULARES

2.3.1. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste estudo, as culturas celulares (1ª subcultura) foram efectuadas em α-MEM contendo 10% de soro bovino fetal, 0,25 μg/mL de anfotericina B, 10 μg/mL de gentamicina e suplementado com AA (50 μg/mL), β-GP a 10 mM e dexametasona a 10 nM, na ausência (situação controlo) e na presença de três concentrações subletais do extracto preparado como indicado na secção anterior, nomeadamente, 0,01% (0,05 μg/mL Fe + 0,02 μg/mL Cr + 0,02 μg/mL Ni), 0,05% (0,25 μg/mL Fe + 0,11 μg/mL Cr + 0,08 μg/mL Ni) e 0,1% (0,49 μg/mL Fe + 0,22 μg/mL Cr + 0,15 μg/mL Ni).

As culturas foram mantidas por 28 dias e expostas às soluções metálicas em duas situações experimentais: (1) durante os 28 dias de incubação e (2) em diferentes períodos de incubação (durante a primeira, segunda, terceira e quarta semana). As culturas celulares efectuadas em

situação controlo ou tratadas com os produtos de corrosão do aço AISI 316L foram caracterizadas ao longo do período de cultura para avaliação de parâmetros relacionados com o crescimento celular e a actividade funcional. O meio de cultura foi recolhido ao longo do período de incubação e analisado para determinação das concentrações de Pi e Cai; estas espécies foram também quantificadas no meio de cultura incubado na ausência de células nas mesmas condições experimentais que as utilizadas nas culturas celulares.

2.3.2. RESULTADOS

PROLIFERAÇÃO CELULAR

Culturas controlo

Nas culturas controlo, após um período de 3-4 dias, verificou-se um aumento gradual da proliferação celular com o tempo de incubação; os valores máximos no ensaio do MTT foram observados aos 21-28 dias de cultura (A = 0,687 e 0,685, respectivamente). De salientar que o aumento mais significativo ocorreu na segunda semana de incubação (de A = 0,316 para 0,590) e que durante a terceira semana o aumento foi muito pequeno (Fig. 6.4).

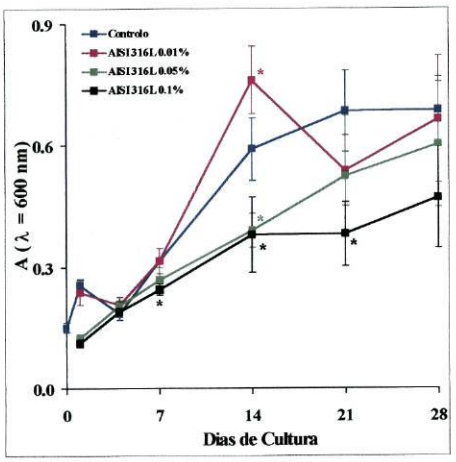


Fig. 6.4- **Ensaio do MTT de culturas de osso alveolar humano efectuadas na ausência (controlo) e na presença de produtos de corrosão do aço e mantidas por um período de 28 dias**
***Significativamente diferente do controlo.**

Culturas expostas aos produtos de corrosão do aço durante os 28 dias de incubação

Quando comparadas com a situação controlo, verificou-se que as culturas expostas ao AISI 316L a 0,01% apresentaram um aumento na redução do MTT durante a fase de crescimento exponencial e que as culturas expostas às concentrações mais elevadas dos produtos de corrosão do aço apresentaram uma redução do referido parâmetro; nestas duas situações, verificou-se um crescimento celular gradual durante todo o período de incubação, sem nunca

se atingir uma fase de crescimento estacionário; no entanto, as culturas expostas a 0,1% apresentaram valores mais baixos. De salientar que no 14° dia o valor observado para a redução do MTT nas culturas mantidas na presença de AISI 316L a 0,01% foi estatisticamente superior ao da situação controlo, enquanto que os valores obtidos nas duas outras situações foram inferiores (Fig. 6.4).

Culturas expostas aos produtos de corrosão em diferentes fases do período de incubação

- ***Primeira semana***. As células expostas aos produtos de corrosão do aço a 0,01% seguiram um padrão semelhante ao da situação controlo no que diz respeito à redução do MTT. Contudo, a partir do 7° dia os valores observados foram superiores, especialmente no dia 14 (aproximadamente 30%). Nas culturas expostas aos produtos de corrosão do aço a 0,05% o crescimento celular foi ligeiramente mais baixo durante a segunda semana de cultura, em relação à situação controlo, mas, depois deste período, verificou-se um aumento até ao 21° dia e seguiu-se uma fase estacionária até ao 28° dia; nos 21° e 28° dias os valores observados no ensaio do MTT foram semelhantes aos da situação controlo. As células expostas aos produtos de corrosão do aço a 0,1% proliferaram gradualmente durante os 28 dias de cultura sem atingirem uma fase estacionária. Durante a segunda e terceira semanas os valores obtidos foram inferiores aos da situação controlo (cerca de 20%), mas nos dias 21° e 28° foram semelhantes (Fig. 6.5 A).

- ***Segunda semana***. As culturas tratadas com os produtos de corrosão do aço apresentaram durante a fase de crescimento exponencial (que coincidiu com o período de exposição ao aço) um aumento da proliferação celular, em relação ao controlo, sendo este efeito estatisticamente significativo nas culturas tratadas com 0,01% e 0,05% de AISI 316L ao 14° dia de incubação (respectivamente, 0,875 e 0,711). Verificou-se em todas as situações que os valores mais elevados de redução do MTT foram observados no fim da segunda semana, diminuindo em seguida para atingir uma fase estacionária na quarta semana (Fig. 6.5 B).

- ***Terceira e quarta semanas***. Todas as culturas expostas aos produtos de corrosão do aço durante a terceira semana apresentaram uma tendência para aumento da proliferação celular durante o período de exposição, especialmente na presença dos produtos de corrosão do aço a 0,05% e 0,1%; os valores da redução do MTT foram máximos aos 21 dias de cultura e assim permaneceram até ao final da cultura. As células expostas durante a quarta semana apresentaram durante esse período, igualmente, uma tendência para

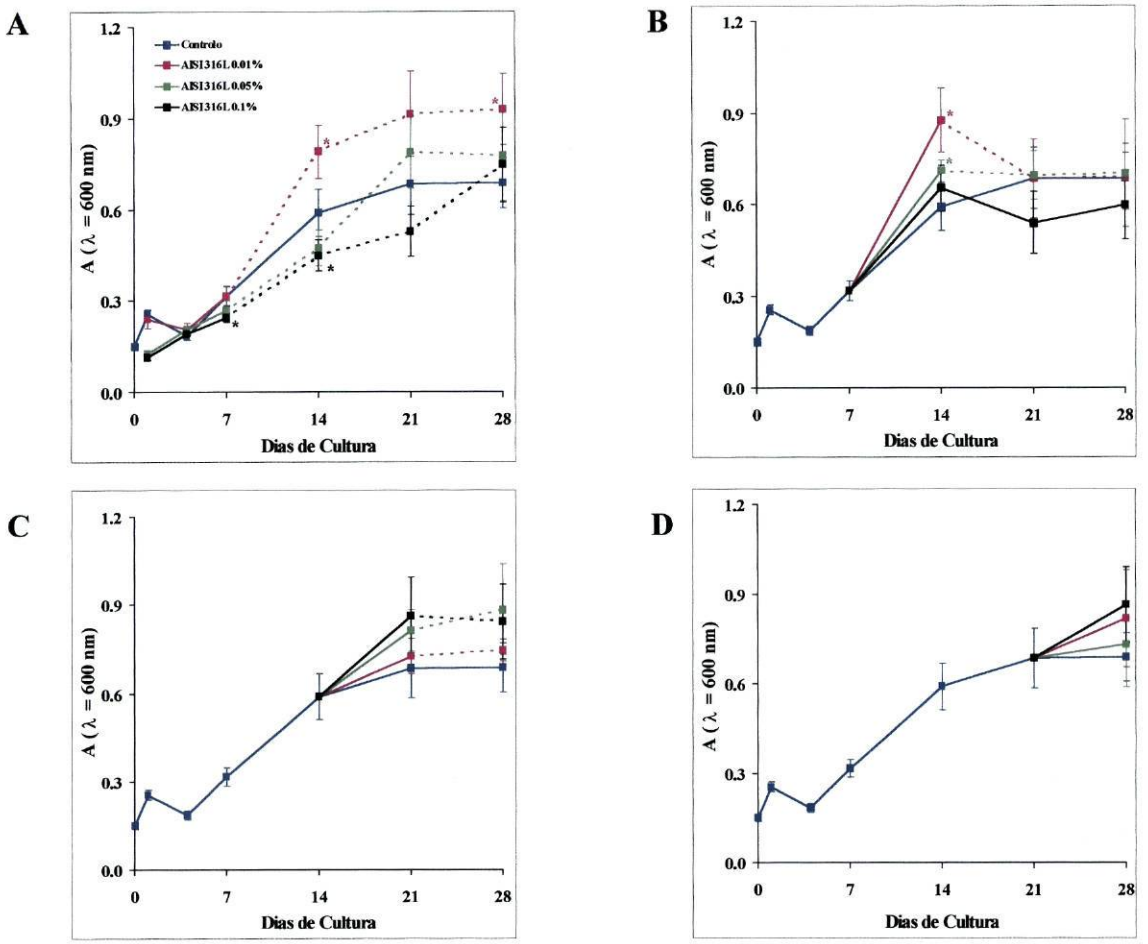


Fig.6.5 – **Ensaio do MTT de culturas de osso alveolar humano mantidas por um período de 28 dias e efectuadas na ausência (controlo) e na presença de produtos de corrosão do aço AISI 316L em diferentes períodos de incubação: (A) primeira semana; (B) segunda semana; (C) terceira semana; (D) quarta semana. Linha a cheio: presença dos produtos de corrosão do aço; linha a tracejado: ausência dos produtos de corrosão do aço. * Significativamente diferente do controlo.**

aumento da proliferação celular. Contudo, não foram observadas diferenças estatísticas significativas quando esses valores foram comparados com os da situação controlo (Fig. 6.5 C e D).

ACTIVIDADE DE FOSFATASE ALCALINA

Os resultados da actividade de fosfatase alcalina, obtidos nas culturas controlo e nas expostas aos produtos de corrosão do aço AISI 316L, estão representados nas figuras 6.5 e 6.6 expressos, respectivamente em: (I) nmol/min.cm^2 e (II) nmol/min.μg de proteína; neste caso, os resultados apenas são referidos a partir do 7º dia, pois os níveis da actividade da enzima foram insignificantes durante a primeira semana, em todas as situações estudadas.

Culturas controlo

A actividade de FA foi baixa durante a primeira semana de incubação; aumentou significativamente durante a segunda, atingindo o valor máximo próximo do 14º dia, e diminuiu lentamente a partir desta semana (Fig. 6.6).

Culturas expostas aos produtos de corrosão do aço durante os 28 dias de incubação

As culturas expostas aos produtos de corrosão do aço a 0,01% apresentaram um padrão de actividade de FA semelhante ao observado na situação controlo, ao longo de todo o período de incubação; o valor máximo ocorreu próximo do 14º dia, e apesar dos níveis enzimáticos serem ligeiramente mais baixos, não foram observadas diferenças significativas. Nas culturas expostas a concentrações dos produtos de corrosão do aço a 0,05% e 0,1% verificou-se que a actividade de FA foi significativamente mais baixa durante as duas primeiras semanas mas, depois, aumentou progressivamente até ao fim do tempo de cultura; nos dias 21º e 28º os níveis da FA foram semelhantes nas culturas controlo e com produtos de corrosão a 0,05 %, mas inferiores na presença de 0,1%. A actividade de FA expressa em nmol/min.µg de proteína (Fig. 6.6 B) permitiu verificar que as culturas expostas aos referidos produtos a 0,05% e 0,1% apresentavam uma diminuição significativa nos níveis da enzima próximo do 14º dia e níveis máximos por volta do 21º dia.

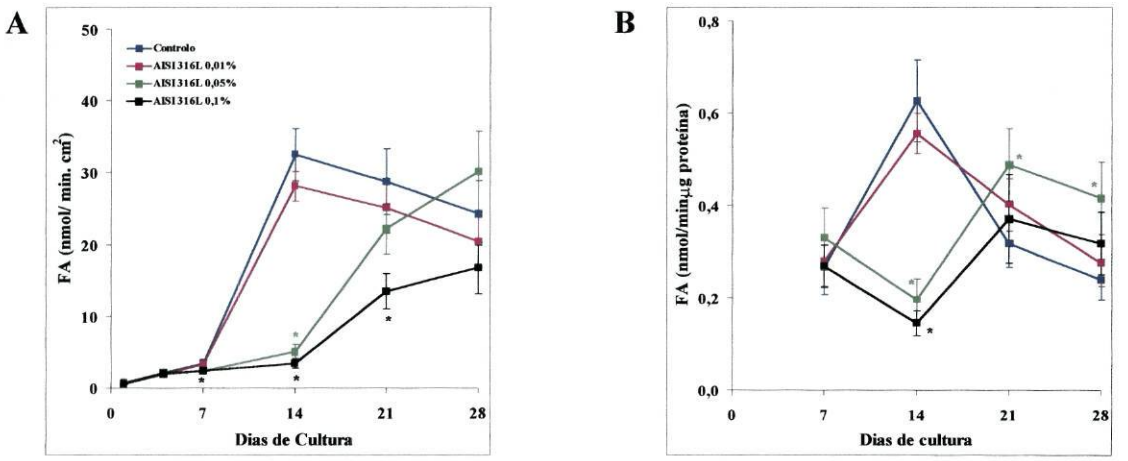


Fig. 6.6- **Actividade de FA de culturas de osso alveolar humano efectuadas na ausência (controlo) e na presença de produtos de corrosão do aço AISI 316L e mantidas por um período de 28 dias. (I) resultados expressos em nmol/min.cm^2; (II) resultados expressos em nmol/min.µg de proteína. * Significativamente diferente do controlo.**

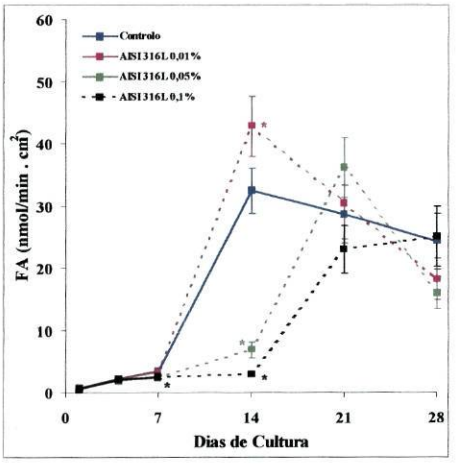
Culturas expostas aos produtos de corrosão em diferentes fases do período de incubação

- ***Primeira semana***. As culturas expostas aos produtos de corrosão do aço a 0,01% apresentaram um padrão de actividade enzimática semelhante ao observado na situação controlo; no entanto, no 14° dia o nível de FA foi estatisticamente superior (cerca de 30%) ao observado no controlo. Nas culturas expostas aos produtos de corrosão a 0,05% e 0,01% os níveis de FA foram muito baixos durante as duas primeiras semanas de cultura e, no 14° dia, os valores foram, respectivamente, 80% e 90% mais baixos do que o observado na situação controlo; contudo, a actividade de FA aumentou significativamente durante a terceira semana e os valores máximos foram alcançados próximo do 21° dia. Portanto, a actividade máxima da enzima foi observada no 14° dia para as culturas controlo e com produtos de corrosão a 0,01% e no 21° dia nas duas restantes situações (Fig. 6.7 AI e AII).

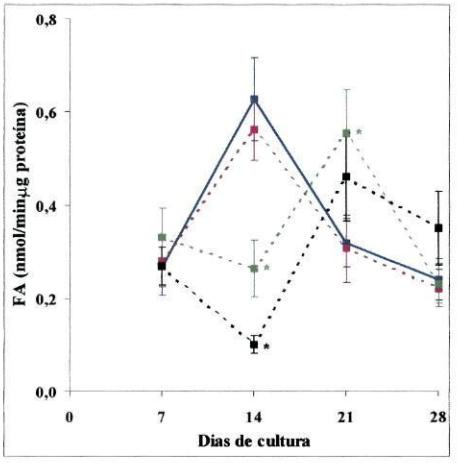
- ***Segunda semana***. As culturas expostas aos produtos de corrosão do aço a 0,01% e 0,05%, durante a segunda semana, apresentaram um padrão de actividade de FA semelhante ao observado nas culturas controlo; contudo, as culturas com 0,01% apresentaram um aumento e as com 0,05% uma diminuição dos níveis de FA ao longo de todo o período de incubação (diferenças estatisticamente significativas apenas no 14° dia). Porém, é interessante notar que em ambas as situações a actividade máxima de FA foi alcançado ao 14° dia, à semelhança do observado na situação controlo, contrastando com o observado nas culturas expostas a 0,05% durante a primeira semana de incubação. As culturas expostas aos produtos de corrosão a 0,1% apresentaram níveis de actividade de FA marcadamente inferiores aos da situação controlo ao longo de todo o período de incubação, sendo o valor máximo alcançado entre os 21°-28° dias (Fig. 6.7 BI e BII).

- ***Terceira e quarta semanas***. As culturas expostas aos produtos de corrosão do aço durante a terceira e quarta semanas de cultura apresentaram um padrão de actividade enzimática semelhante ao observado nas culturas controlo. As diferenças observadas nos níveis de FA nas culturas tratadas relativamente ao controlo não foram estatisticamente significativas (Fig. 6.7 C e D); contudo, nas culturas tratadas durante a terceira semana com 0,1%, a actividade de FA aumentou durante o período de exposição, atingindo um valor máximo no 21° dia e, depois, desceu (Fig. 6.7 CI).

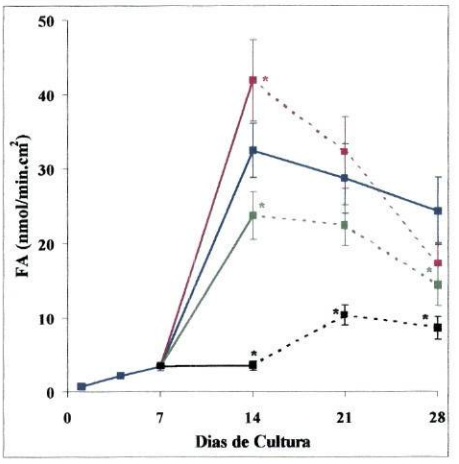
AI



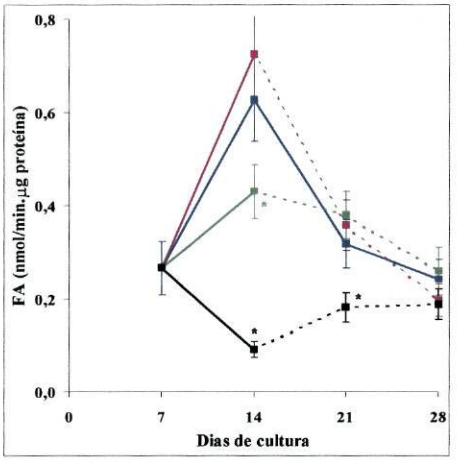
AII



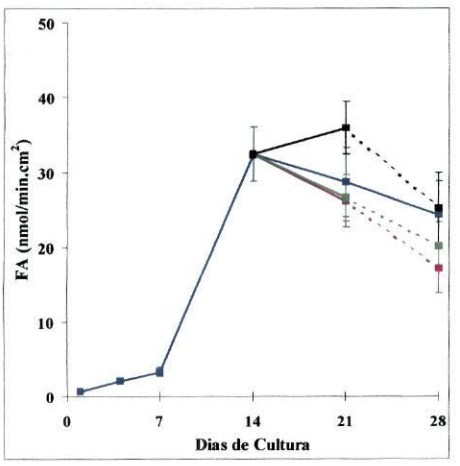
BI



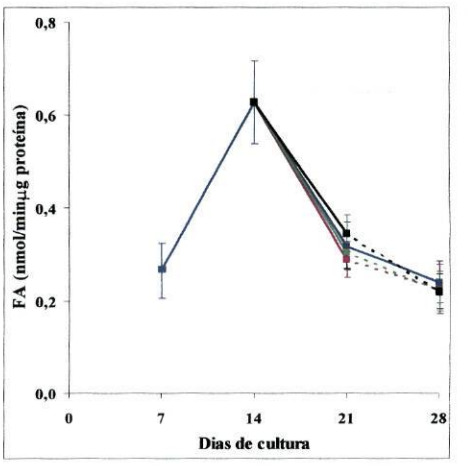
BII



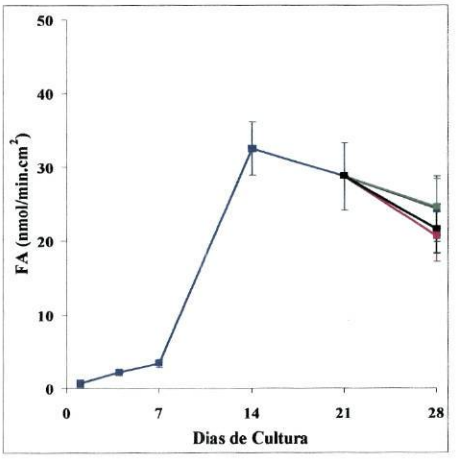
CI



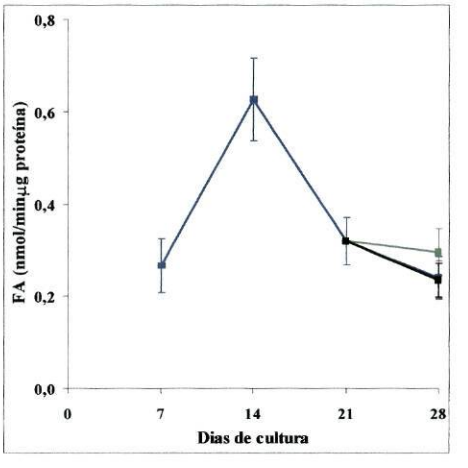
CII



DI



DII



← Fig. 6.7- **Actividade de FA de culturas de osso alveolar humano mantidas por um período de 28 dias e efectuadas na ausência (controlo) e na presença de produtos de corrosão do aço AISI 316L em diferentes períodos de incubação: (A) primeira semana; (B) segunda semana; (C) terceira semana; (D) quarta semana. (I) resultados expressos em nmol/min.cm^2; (II) resultados expressos em nmol/min.μg de proteína. Linha a cheio: presença dos produtos de corrosão do aço. * Significativamente diferente do controlo.**

IDENTIFICAÇÃO HISTOQUÍMICA DE FA E DE DEPÓSITOS DE FOSFATO DE CÁLCIO

As reacções de coloração para a FA foram positivas em todas as situações experimentais. Na cultura controlo verificou-se um aumento gradual da intensidade de coloração até ao 21° dia, seguido de uma diminuição ligeira até ao 28° (Fig. 6.8).

Quando as culturas foram expostas continuamente a estes produtos de corrosão verificou-se que a intensidade das reacções de coloração, embora fosse aumentando ligeiramente ao longo dos 28 dias de incubação, foi sempre inferior à observada no respectivo controlo. De igual modo, foi observado que a intensidade das reacções de coloração para a FA diminuiu à medida que aumentou a concentração dos produtos de corrosão no meio de cultura (Fig. 6.8).

AISI 316L	0,01%		0,05%		0,1%	
Dias	**21**	**28**	**21**	**28**	**21**	**28**
1-7	++	++	+	++	+/-	+
7-14	++	++	++	++	++	+
14-21	++	+++	+++	+++	++	+++
21-28		+++		+++		+++
1-28	++	++	+	++	+/-	+

Controlo	**21**	**28**
(S/ AISI 316 L)	+++	+++

Fig. 6.8- **Fotografias macroscópicas de culturas celulares de osso alveolar humano aos 21 e 28 dias de cultura efectuadas na ausência (controlo) e na presença de produtos de corrosão do aço AISI 316L, coradas para visualização da FA A intensidade da reacção de coloração foi classificada da seguinte maneira: +/-, fraca a indetectável; +, positiva de fraca intensidade; ++, moderadamente positiva; +++, intensamente positiva.**

Nas culturas expostas aos produtos de corrosão do aço a 0,01% em diferentes fases do período de incubação verificou-se que todas as culturas seguiram um padrão semelhante ao observado na cultura controlo, não sendo observadas diferenças significativas na intensidade de coloração. Nas culturas expostas aos produtos de corrosão nas restantes concentrações e em diferentes fases do período de incubação verificou-se sempre um aumento gradual da intensidade de coloração ao longo do tempo de cultura. No entanto, no dia 21°, a intensidade foi inferior à observada na situação controlo, tendo-se verificado, igualmente, que esta diferença diminuiu da primeira para a terceira semana de exposição aos produtos de corrosão referidos (Fig. 6.8).

As reacções de AV e de VK foram negativas aos 7 e 14 dias de incubação em todas as situações experimentais. Nas culturas controlo verificou-se que estas reacções foram positivas a partir do 21° dia, indicando a presença de depósitos minerais. A presença de produtos de corrosão do aço a 0,01 % não afectou a formação de depósitos minerais. Nas restantes culturas expostas aos produtos de corrosão do aço, em diferentes fases do período de incubação, observou-se que os efeitos negativos na formação dos depósitos minerais foram mais significativos quando o contacto com os produtos de corrosão ocorreu durante a primeira e, também, a segunda semanas de cultura; verificou-se que este efeito era dependente da dose e parecia ser mais pronunciado nas culturas expostas durante a primeira semana. Pelo contrário, a exposição durante a terceira e quarta semanas pareceu não afectar a formação dos depósitos minerais. Contudo, as culturas efectuadas na presença contínua de produtos de corrosão do aço a 0,05 % e 0,1 % apresentaram reacções negativas, indicando incapacidade de mineralização (Fig. 6.9).

CONTEÚDO DE Pi E DE Cai NO MEIO DE CULTURA

A determinação dos níveis de Pi e de Cai nos meios incubados na ausência de células revelou uma constância de valores (1,3-2,0 mmol/L e 1,5-2,0 mmol/L, respectivamente) ao longo do tempo de incubação, indicando ausência de formação de depósitos minerais nas condições experimentais em que o ensaio foi realizado (fig. 6.10 AI e BI).

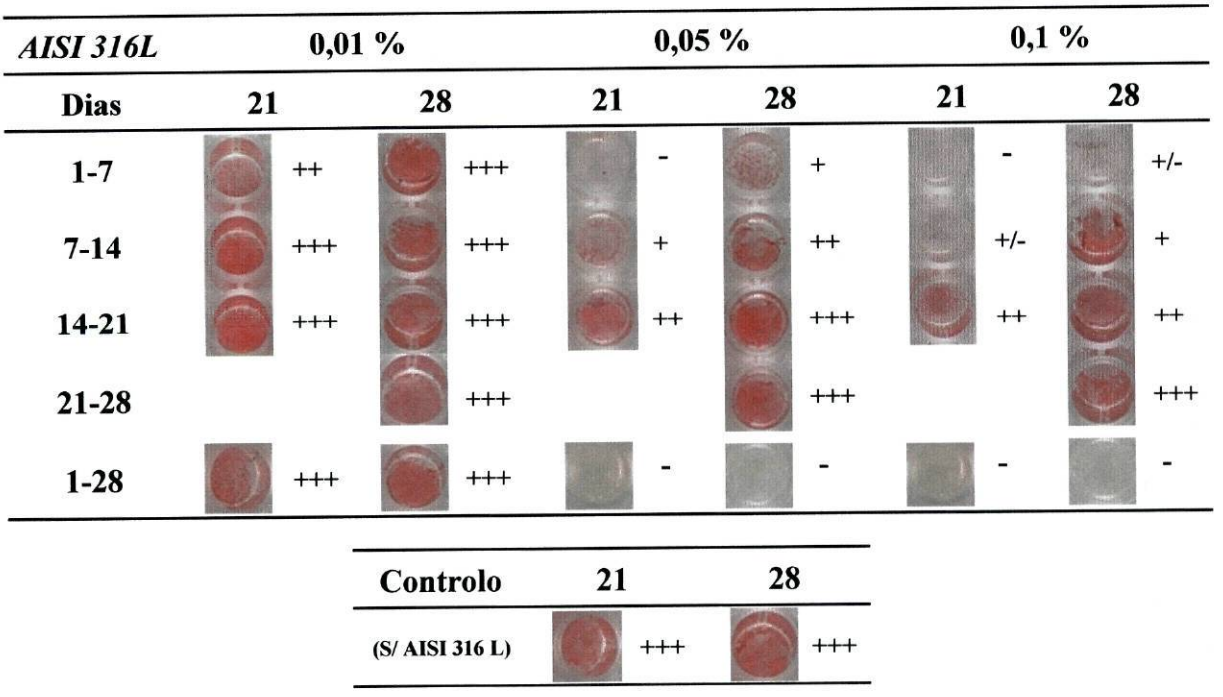


Fig. 6.9- **Fotografias macroscópicas de culturas celulares de osso alveolar humano aos 21 e 28 dias de cultura efectuadas na ausência (controlo) e na presença de produtos de corrosão do aço AISI 316L, coradas pela técnica de AV, para localização dos depósitos de fosfato de cálcio. A intensidade da reacção de coloração foi classificada da seguinte maneira: -, negativa; +/-, fraca a indetectável; +, positiva de fraca intensidade; ++, moderadamente positiva; +++, intensamente positiva.**

Culturas controlo

Os meios recolhidos das culturas controlo revelaram um aumento da concentração do Pi próximo do 18º dia (de cerca de 1,9 para 8,3 mmol/L). Durante este período, os níveis do Cai não sofreram alterações apreciáveis. Mas, a partir do dia 15º-18º verificou-se uma diminuição significativa dos níveis do Cai e do Pi, indicativa de que o processo de mineralização teve início, ou seja, começaram a formar-se depósitos de fosfato de cálcio nas culturas (Fig. 6.10 AII e BII).

Culturas expostas aos produtos de corrosão do aço durante os 28 dias de incubação

Os níveis de Pi e de Cai no meio recolhido das culturas tratadas com os produtos de corrosão do aço a 0,01% seguiram um padrão de variação semelhante ao observado na situação controlo; contudo, o aumento do Pi durante os primeiros 18 dias não foi tão elevado. As culturas expostas a 0,05% apresentaram níveis de Pi mais baixos durante os primeiros 16 dias de cultura. A partir daí os valores aumentaram gradualmente até ao fim do tempo de incubação, sendo, no entanto

significativamente inferiores aos observados na situação controlo. Em presença de produtos de corrosão a 0,1% os níveis do Pi, durante todo o período de incubação, foram semelhantes aos observados nos meios de cultura incubados na ausência de células, com um aumento muito ligeiro durante a quarta semana. Nas culturas expostas a 0,05% e 0,1% verificou-se que os níveis do Cai não se alteraram significativamente durante os primeiros 16 dias de cultura, apresentando a partir daí uma diminuição muito ligeira (Fig. 6.10 AII e BII).

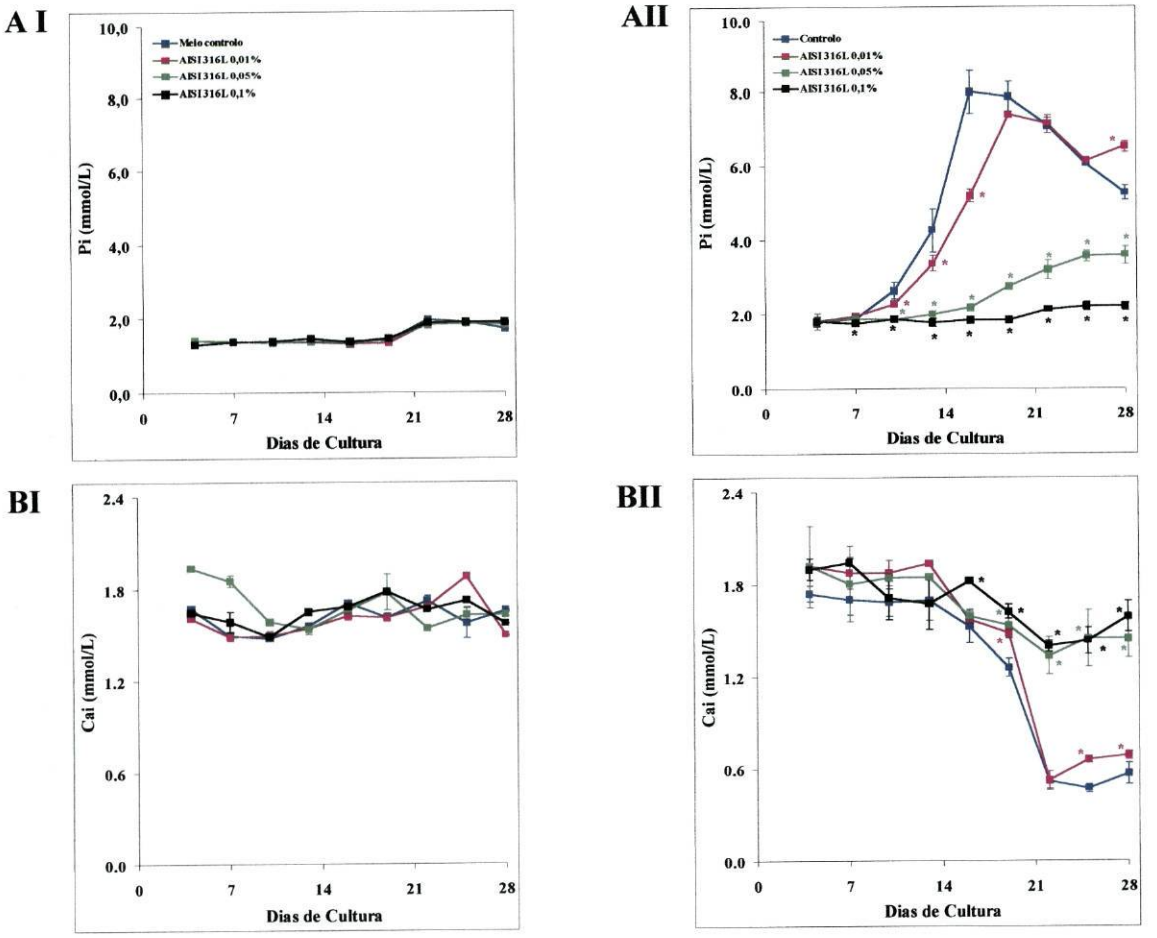


Fig.6.10- **Conteúdo em Pi (A) e Cai (B) nos meios de cultura incubados na ausência (I) e na presença (II) de culturas de osso alveolar humano. As culturas foram efectuadas na ausência (controlo) e na presença de produtos de corrosão do aço AISI 316L e mantidas por um período de 28 dias. *Significativamente diferente do controlo.**

Culturas expostas aos produtos de corrosão em diferentes fases do período de incubação

- ***Primeira semana.*** Nas culturas expostas aos produtos de corrosão do aço a 0,01 % os níveis do Pi e do Cai seguiram um padrão idêntico ao observado nas culturas controlo; no entanto, o aumento do Pi durante os primeiros 18 dias não foi tão elevado. As culturas

expostas a 0,05 % apresentaram um aumento do teor em Pi a partir da segunda semana de incubação, atingindo um valor máximo próximo dos dias 22°-25° e, de seguida, desceram ligeiramente; os níveis do Cai mantiveram-se aproximadamente constantes até ao dia 25, começando, então, a descer. Nas culturas expostas a 0,1 % os níveis do Pi e do Cai permaneceram praticamente constantes ao longo de todo o período de incubação e foram semelhantes aos observados nos meios incubados na ausência de células (Fig. 6.11 A e B).

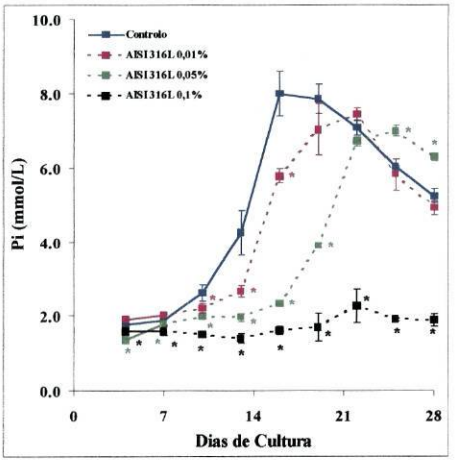
- ***Segunda semana***. As culturas expostas aos produtos de corrosão do aço a 0,01% e 0,05%, durante este período, seguiram um padrão semelhante ao observado na cultura controlo; porém, nas culturas expostas a 0,05% o Pi e o Cai começaram a diminuir ligeiramente mais tarde, por volta do 19° dia. As culturas tratadas com 0,1% dos produtos de corrosão apresentaram um aumento no teor em Pi quase até ao fim do período de incubação, com uma pequena descida nos últimos três dias; todavia, durante as primeiras três semanas os valores foram sempre inferiores aos observados para as outras três situações. Os níveis do Cai permaneceram relativamente constantes durante o tempo de incubação, diminuindo ligeiramente nos últimos dias (Fig. 6.11 C e D).

- ***Terceira e quarta semanas***. Os níveis do Pi e do Cai nos meios de cultura recolhidos das culturas expostas aos produtos de corrosão do aço durante a terceira semana seguiram um padrão idêntico ao observado na cultura controlo, notando-se, contudo, algumas diferenças evidentes: nas culturas expostas a 0,05% e 0,1% verificou-se um atraso no início da diminuição dos níveis do Cai e do Pi em relação às culturas controlo e com 0,01% dos produtos de corrosão do aço. Esse efeito pareceu ser dependente da dose e foi particularmente evidente para o Cai (Fig. 6.11 E-H).

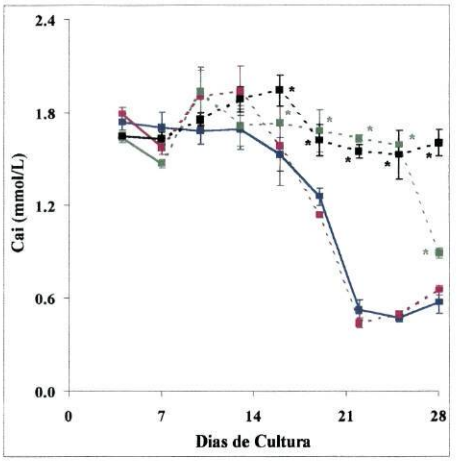
2.3.3. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos permitiram verificar que as células provenientes do osso alveolar humano cultivadas em condições controlo (na presença do AA, β–GF e Dex) apresentaram um comportamento de proliferação/diferenciação celular semelhante ao previamente descrito nos capítulos III e IV. Após uma fase de adaptação de cerca de 3-4 dias, as células ósseas entraram numa fase de proliferação activa, a qual está funcionalmente relacionada com a

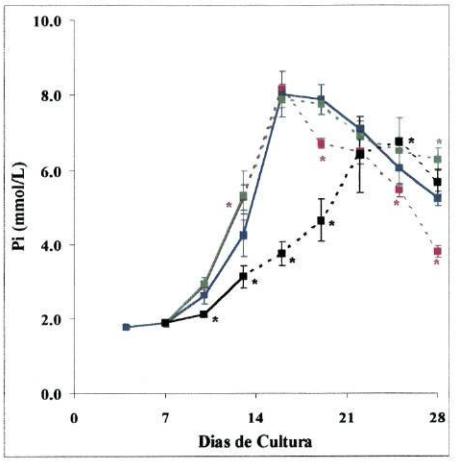
AI



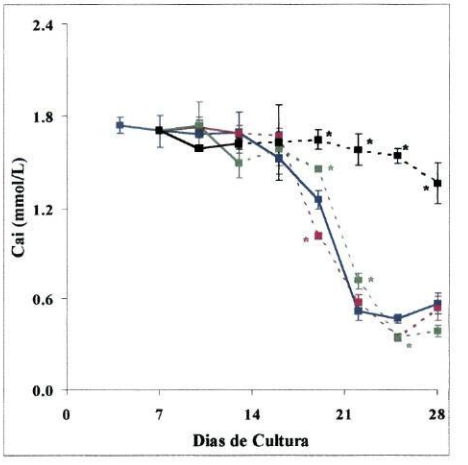
AII



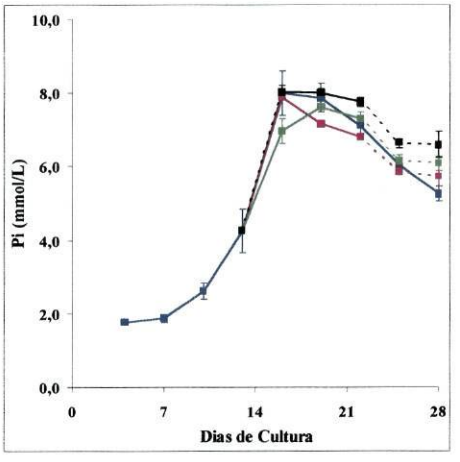
BI



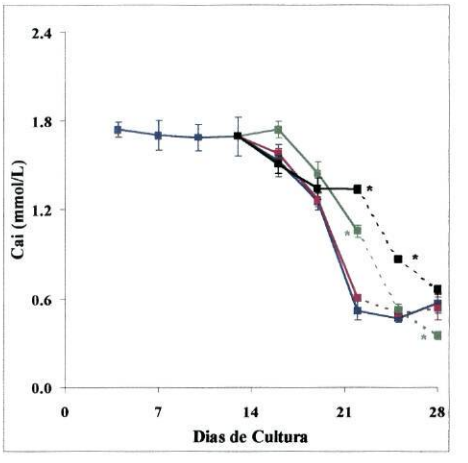
BII



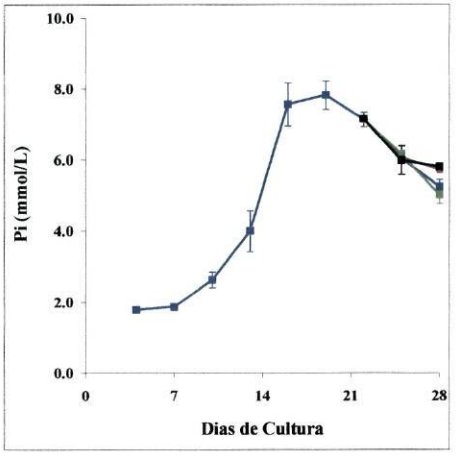
CI



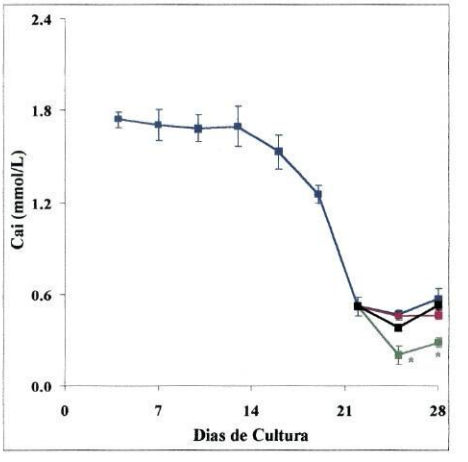
CII



DI



DII



← Fig. 6.11- **Conteúdo em Pi (A) e Cai (B) nos meios de cultura incubados na presença de culturas de osso alveolar humano mantidas por um período de 28 dias e efectuadas na ausência (controlo) e na presença de produtos de corrosão do aço AISI 316L em diferentes períodos de incubação: (A) primeira semana; (B) segunda semana; (C) terceira semana; (D) quarta semana. Linha a cheio: presença dos produtos de corrosão do aço. * Significativamente diferente do controlo.**

produção da matriz orgânica extracelular, observando-se por volta da terceira e quarta semanas uma tendência para estabilização do crescimento celular, provavelmente devida à acumulação e maturação da matriz extracelular [35,72,175]. A expressão da FA seguiu um padrão de variação semelhante e a actividade da FA, expressa em nmol/min.μg de proteína (parâmetro que fornece informação acerca do conteúdo médio de FA por célula), apresentou um valor máximo no 14° dia, decrescendo a partir daí. O aumento significativo dos níveis de actividade desta enzima durante a segunda semana de incubação sugere que as células se deslocaram para um estado de maior diferenciação [35,175]. O processo de mineralização, uma função específica dos osteoblastos, ocorreu durante a terceira semana, como demonstrado pelos resultados fortemente positivos das reacções de coloração efectuadas no 21° dia para os fosfatos de cálcio (Fig. 6.9) e, também, pelo consumo significativo de Cai e de Pi a partir do meio de cultura durante esta fase (Fig. 6.10). A avaliação da concentração de Cai e de Pi no meio de cultura ao longo do período de incubação providencia informação sobre o processo de mineralização que ocorre nestes sistemas de cultura, já que a deposição de fosfato de cálcio no espaço extracelular requer o consumo destes iões a partir do meio de cultura.

O comportamento das células provenientes do osso alveolar humano não foi significativamente afectado pela presença dos produtos de corrosão do aço a 0,01%, correspondendo a 0,05 μg/mL de Fe + 0,02 μg/mL de Cr + 0,01 μg/mL de Ni; a formação dos depósitos minerais ocorreu imediatamente a seguir à actividade da FA atingir o seu valor máximo (próximo do 14° dia), apresentando as culturas com 21 dias reacções de coloração positivas para os depósitos de fosfatos de cálcio (Fig. 6.9).

A proliferação celular nas culturas expostas aos produtos de corrosão a 0,05% e a 0,1%, durante as diferentes fases do período de incubação, não apresentou diferenças significativas quando comparada com as culturas controlo (Fig. 6.5). Contudo, nestas culturas foi observado um efeito importante nos níveis e padrão da actividade da FA, na concentração em Pi e em Cai e, também, na formação dos depósitos minerais, especificamente nas culturas expostas

durante a primeira e segunda semanas. Nas culturas expostas durante a primeira semana aos produtos de corrosão a 0,05% verificou-se que a actividade da FA foi muito baixa durante as duas primeiras semanas, aumentando de seguida até próximo do 21° dia (valor máximo), voltando, então, a diminuir (Fig. 6.7 A); os níveis de Pi aumentaram durante a terceira semana e os níveis de Cai e de Pi começaram a diminuir a partir do 25° dia (Fig. 6.11 A). Estes resultados estão de acordo com o observado nos ensaios histoquímicos (Fig. 6.9), mostrando que ocorreu alguma mineralização durante a quarta semana (reacções negativas no dia 21 e fracamente positivas no dia 28). Quando a exposição aos produtos de corrosão do aço AISI 316L se efectuou na segunda semana de cultura os efeitos observados nos parâmetros estudados foram menos pronunciados e o comportamento das culturas tratadas aproximou-se do das culturas controlo: a actividade máxima da FA surgiu por volta do 14° dia (Fig. 6.7 B), mas a diminuição dos níveis de Pi e de Cai ocorreu mais tarde do que nas culturas controlo (a partir do 19° dia) (Fig. 6.11 B). De acordo com estes resultados, as reacções de coloração para os depósitos de fosfato de cálcio foram ligeiramente positivas no 21° dia e positivas no 28° (Fig. 6.9), o que está de acordo com os resultados previamente apresentados.

Nas culturas expostas durante a primeira semana aos produtos de corrosão a 0,1% verificou-se um aumento da FA a partir do décimo quarto dia de incubação, sendo os níveis mais elevados obtidos por volta do 21° dia; contudo, foram inferiores aos observados nas culturas tratadas com produtos de corrosão a 0,05% (Fig. 6.7 A). O Pi e o Cai permaneceram praticamente constantes durante todo o período de incubação (Fig. 6.11 A) e as reacções histoquímicas para os depósitos de fosfato de cálcio foram negativas aos 21 e 28 dias de cultura (Fig. 6.9). A exposição durante a segunda semana resultou na apresentação de níveis de FA inferiores aos observados nas culturas tratadas com produtos de corrosão a 0,05 %, mas a actividade máxima foi, igualmente, atingida no 21° dia (Fig. 6.7 B). Os níveis do Pi aumentaram lentamente durante as três primeiras semanas, sendo a diminuição do Cai e do Pi mais evidente nos dois últimos dias de cultura (Fig. 6.11 B). As reacções histoquímicas para os depósitos minerais foram quase imperceptíveis, ou muito fracas, no 21° dia e fracamente positivas no 28° (Fig. 6.9).

As culturas expostas aos produtos de corrosão do aço a 0,05% e a 0,1% durante a terceira semana apresentaram um comportamento semelhante ao observado nas culturas controlo, exceptuando-se a diminuição dos níveis do Cai e do Pi, que ocorreu mais tarde, sendo este efeito dependente da dose. A exposição aos produtos de corrosão ao longo da quarta semana não afectou o comportamento das culturas de osso alveolar humano.

Os resultados acima descritos sugerem que a presença dos produtos de corrosão do aço AISI 316L nas concentrações estudadas não interfere significativamente com a proliferação das células de osso alveolar, cultivadas nas condições experimentais testadas, excepto no caso da concentração de 0,01%, em que se verificou uma tendência para um aumento do crescimento celular. Contudo, acima de certas concentrações (0,05% e 0,1%), a presença de tais produtos durante a primeira e segunda semanas de incubação provocou alterações significativas na diferenciação das células ósseas. O efeito mais significativo traduziu-se numa redução da actividade da FA por volta do dia 14 (a que corresponde a actividade máxima nas culturas controlo) e no seu aumento durante a terceira semana. Dado que a proliferação celular não foi significativamente afectada e considerando a FA como um marcador da diferenciação osteoblástica *in vitro* [35,71,75,175], estes resultados sugerem que a população celular exposta aos produtos de corrosão do aço AISI 316L durante a fase inicial da cultura (primeira semana) e também durante a fase de crescimento exponencial (segunda semana) se diferenciou mais tarde do que a população que cresceu nas condições controlo. Tal é também suportado pelos resultados observados no padrão de variação dos níveis de Pi e de Cai no meio de cultura e pelas colorações histoquímicas das culturas, as quais indicaram que a formação dos depósitos minerais ocorreu mais tarde nas culturas tratadas com os produtos de corrosão. Este efeito é dependente da dose e para uma dada concentração (0,05% ou 0,1%) parece ser mais pronunciado quando os produtos de corrosão estão presentes durante a primeira semana, ou seja, quando as células se estão a adaptar às condições de cultura.

Nas culturas controlo o processo de mineralização ocorreu durante a terceira semana de cultura e, neste contexto, pode ser antecipado que os produtos de corrosão do aço AISI 316L em níveis não letais podem não influenciar este sistema de cultura, quando adicionados após a ocorrência da diferenciação osteoblástica.

Os resultados relativos às culturas tratadas com produtos de corrosão a 0,05% durante os 28 dias de incubação revelaram uma proliferação celular mais lenta, mas gradual, sem qualquer tendência para atingir uma fase estacionária. A FA aumentou continuamente a partir da segunda semana (o Pi no meio seguiu um padrão semelhante). Estes resultados sugerem que, nestas condições de cultura, a população celular se diferencia muito lentamente e que, provavelmente, não apresenta capacidade de expressão completa do fenótipo osteoblástico mesmo para tempos de cultura mais prolongados. As culturas tratadas com produtos de corrosão a 0,1% durante os

28 dias de incubação apresentaram um padrão semelhante ao observado no caso anterior; contudo os efeitos na proliferação celular e na actividade da FA foram mais pronunciados.

Em trabalhos realizados anteriormente pelo grupo foi estudado o efeito dos produtos de corrosão do aço AISI 316L no comportamento de células osteoblásticas provenientes de medula óssea de rato e de coelho, efectuadas em condições experimentais semelhantes [194-196]. Os resultados obtidos neste estudo mostraram uma deposição do Cr e do Ni induzida biologicamente, processo provavelmente relacionado com a formação de complexos organometálicos de Cr e Ni. Relacionado com este aspecto, há vários estudos [332,346-348] que sugerem que pode ocorrer a libertação do Cr e do Ni dos seus complexos pelas células, por intervenção de um sistema de transporte, com as consequentes interferências no metabolismo celular. Merrit e col. [349] mostraram que o desgaste do aço AISI 316L em soro resultou numa solução de produtos de corrosão contendo iões Cr^{3+} e Cr^{6+}, os quais podem passar pela membrana celular. Esta hipótese pode ajudar a explicar a citotoxicidade do aço, quando em combinação com os resultados obtidos por Lucas e col. [350], que indicaram uma indução *in vitro* de destruição da ultra-estrutura celular pelo Ni e também pelos valores baixos de Cr encontrados no meio de cultura quando da sua exposição ao aço AISI 316L e às células osteogénicas.

Os estudos efectuados nesta área sugerem que o factor - chave na toxicidade do aço AISI 316L é a proporção relativa das várias espécies metálicas formadas durante os processos de degradação desta liga metálica e, também, que algumas dessas espécies podem coexistir em diversos estados de oxidação, os quais apresentam diferentes potenciais toxicológicos [348,350,351]. Para além disso, as espécies metálicas reagem nos sistemas biológicos e qualquer diferença que surja nas espécies que se vão formando pode resultar em alterações mais ou menos significativas da sua toxicidade. A compreensão destes processos permanecerá incompleta até que as proporções relativas e as diferentes espécies químicas (do mesmo elemento) formadas durante o processo de degradação deste tipo de implante estejam completamente caracterizadas.

2.3.4. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados neste trabalho sugerem que os produtos de corrosão da liga metálica AISI 316L, a partir de certas concentrações não letais, podem perturbar a relação

proliferação/diferenciação celular das culturas de células de osso alveolar humano, sendo o efeito dependente da dose e do estado de diferenciação das células osteoblásticas.

3. ESTUDO DA BIOCOMPATIBILIDADE DA OSTEOPATITE® EM CULTURAS CELULARES DE OSSO ALVEOLAR

3.1. INTRODUÇÃO

A hidroxiapatite é um biomaterial do grupo dos biocerâmicos bioactivos, cuja fórmula química é $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$. Este material faz parte das apatites, que se caracterizam pela fórmula $M_{10}(XO_4)_6Z_2$. As apatites formam um leque alargado de biomateriais sólidos, que podem apresentar variações consideráveis na sua composição química através da substituição iónica de todos ou alguns elementos nos grupos M, (XO_4) e Z [285,352]. A utilização destes materiais na substituição do tecido ósseo é relativamente corrente, devido à semelhança da sua composição química com a fase mineral do tecido ósseo (têm, normalmente, uma relação Ca/P de 1,67, que é idêntica à do tecido ósseo mineralizado), por apresentarem grande biocompatibilidade, não serem tóxicos e aderirem bem ao tecido ósseo [285,353,354].

A hidroxiapatite tem indicação clínica em reconstruções do ouvido médio [355-358], reconstrução ou aumento crânio-facial [353], prevenção da reabsorção alveolar após extracção dentária [291,292], aumento do rebordo alveolar [359], revestimento de implantes dentários [360-363] e de próteses ortopédicas [364,365], reconstrução de paredes da órbita, preenchimento de defeitos ósseos [366,367] e como veículo para a libertação de fármacos [285,368-370]. A forma física de aplicação depende do tipo de indicação clínica e pode variar entre as formas de grânulos, pasta, bloco e camada de revestimento de implantes metálicos [371]. A utilização clínica da hidroxiapatite está generalizada a vários campos da medicina, no entanto, o seu uso está restrito apenas às situações em que o material não seja submetido a forças de carga, excepto no revestimento de implantes metálicos [360-362,372-375].

A osteopatite® (BEM – Portugal) é uma hidroxiapatite modificada desenvolvida pelo Instituto de Engenharia Biomédica (INEB), em que iões de Na, K e Mg foram introduzidos

intersticialmente, neste material microporoso e denso [292,376-378]. A tabela 6.2 mostra a composição química da osteopatite®.

Tabela 6.2- **Composição química da osteopatite®**

P_2O_5	43,1 %
K_2O	1,0 %
Al_2O_3	0,21 %
CaO	Restante
MgO	0,7 %
Na_2O	3,1 %
Fe_2O_3	0,34 %

O objectivo deste trabalho foi avaliar os efeitos das culturas celulares de osso alveolar humano com características osteoblásticas na osteopatite®. Os materiais cultivados foram observados por microscopia electrónica de varrimento e microanálise por raios X.

3.2. MATERIAIS E MÉTODOS

A osteopatite® testada neste estudo apresentava-se como grânulos irregulares, com um tamanho de 20 a +100 mesh, os quais foram sinterizados, compactados em pequenos discos e polidos. Os discos foram submetidos a um processo de polimento com o objectivo de tornar lisa a sua superfície, contudo, devido a defeitos neste processo, verificou-se a existência alguns riscos e irregularidades em certas áreas. Os discos uma vez preparados foram devidamente acondicionados e esterilizados em autoclave.

A tabela 6.2 mostra que a osteopatite® apresenta na sua composição uma quantidade apreciável de catiões, principalmente sódio. Esta característica confere-lhe uma relativa instabilidade quando da sua imersão num fluído aquoso, processo que se traduz por uma libertação de iões intersticiais alcalinos e consequente aumento do valor do pH à superfície do material. Um estudo preliminar mostrou que a libertação destes iões e a subida de pH se observava no período inicial da imersão do material e que este processo se reflectia negativamente no crescimento celular. Com o objectivo de contornar este efeito, os discos de

material. Um estudo preliminar mostrou que a libertação destes iões e a subida de pH se observava no período inicial da imersão do material e que este processo se reflectia negativamente no crescimento celular. Com o objectivo de contornar este efeito, os discos de osteopatite® foram imersos num volume relativamente grande de meio de cultura (3 discos em 10 mL) durante 24 horas. Após este período, os discos foram retirados, colocados em placas de petri e semeados com células derivadas de osso alveolar (1ª subcultura, 10^4 células/cm^2) durante 28 dias em α-MEM contendo 10% de soro bovino fetal, 2,5 μg./ml de anfotericina B, 50 μg/ml de gentamicina e suplementado com AA a 0,25 mM, β-GP a 10 mM e Dex a 10 nM. O material foi ainda incubado na ausência de células nas mesmas condições experimentais - discos controlo. Os discos (material com e sem células) foram observados por microscopia electrónica de varrimento aos 14, 21 e 28 dias de cultura.

3.3. RESULTADOS

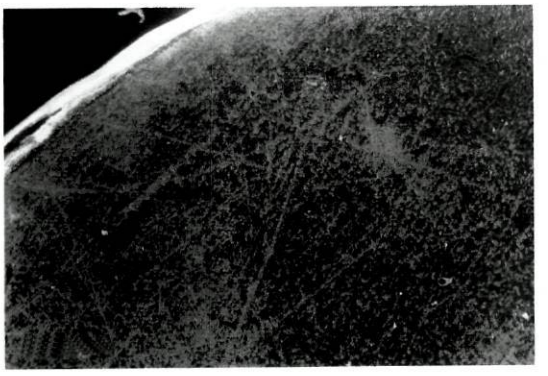
COMPORTAMENTO DA OSTEOPATITE® INCUBADA NA AUSÊNCIA DE CÉLULAS

A observação dos discos de osteopatite® por microscopia electrónica de varrimento revelou que estes apresentavam uma superfície irregular, nomeadamente áreas lisas e estriadas, resultante do processo de polimento (Fig. 6. 12 A e B). Estes espaços de erosão puseram em evidência a estrutura microporosa da osteopatite® e a interconexação existente entre os vários poros.

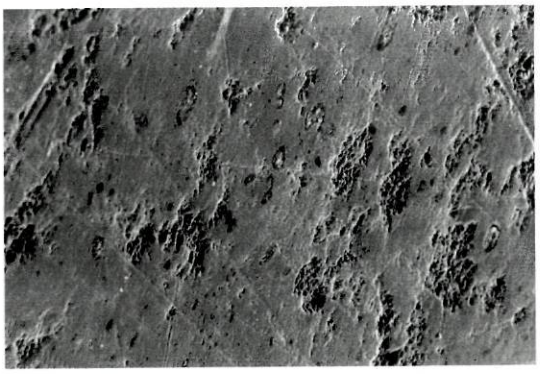
A composição característica da osteopatite®, constituída predominantemente por fosfato de cálcio, com os seus iões intersticiais de Na, K e Mg foi confirmada por microanálise por raios X; os iões de Al e de Si, presentes no espectro de raios X, têm origem no material abrasivo utilizado no polimento dos discos de osteopatite® (Fig. 6.12 C).

Os discos de osteopatite® que foram imersos em meio de cultura (discos controlo) não mostraram sinais significativos de degradação na forma dos grânulos do biomaterial, mesmo após 28 dias de incubação. Porém, observou-se uma adsorção progressiva de matéria orgânica aos discos, que foi preenchendo os poros microestruturais da osteopatite® (Fig. 6.13 I).

A



B



C

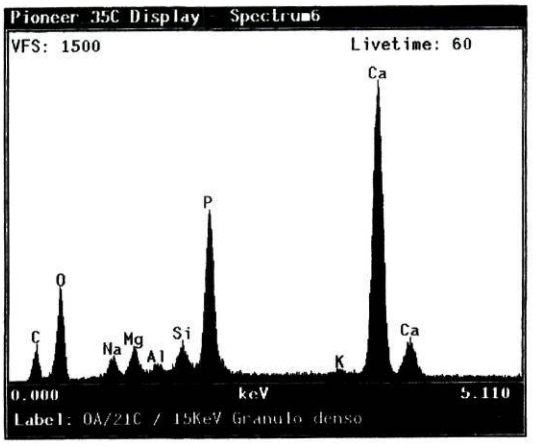


Fig. 6.12- **Fotografias de microscopia electrónica de varrimento (A- 170x; B- 500x) e espectro de microanálise por raios X de discos de osteopatite®.**

COMPORTAMENTO DAS CÉLULAS DE OSSO ALVEOLAR HUMANO NA SUPERFÍCIE DA OSTEOPATITE®

As células cultivadas na superfície da osteopatite® apresentaram, aos 14 dias de cultura, uma morfologia normal. As células aderiram preferencialmente às superfícies lisas e formaram uma espécie de ponte nas zonas irregulares, embora, fossem visíveis alguns filamentos citoplasmáticos à sua volta, garantindo uma melhor fixação celular (Fig. 6.13 AII). Aos 21 dias de cultura, verificou-se que as células ósseas se encontravam organizadas sobre o biomaterial e, também, a presença de estruturas globulares contendo depósitos minerais de fosfato de cálcio (Fig. 6.13 BII), aspecto ainda mais evidente nas culturas de 28 dias (Fig. 6.13 CII). A microanálise por raios X destas estruturas mostrou a existência de níveis elevados de fósforo, cálcio, carbono e oxigénio, característicos dos tecidos osteogénicos mineralizados (Fig. 6.13 D).

O comportamento das culturas celulares mantidas na superfície da osteopatite® foi semelhante ao observado em culturas efectuadas em placas de cultura, nomeadamente no que diz respeito à proliferação e organização celular e, também, ao processo de mineralização.

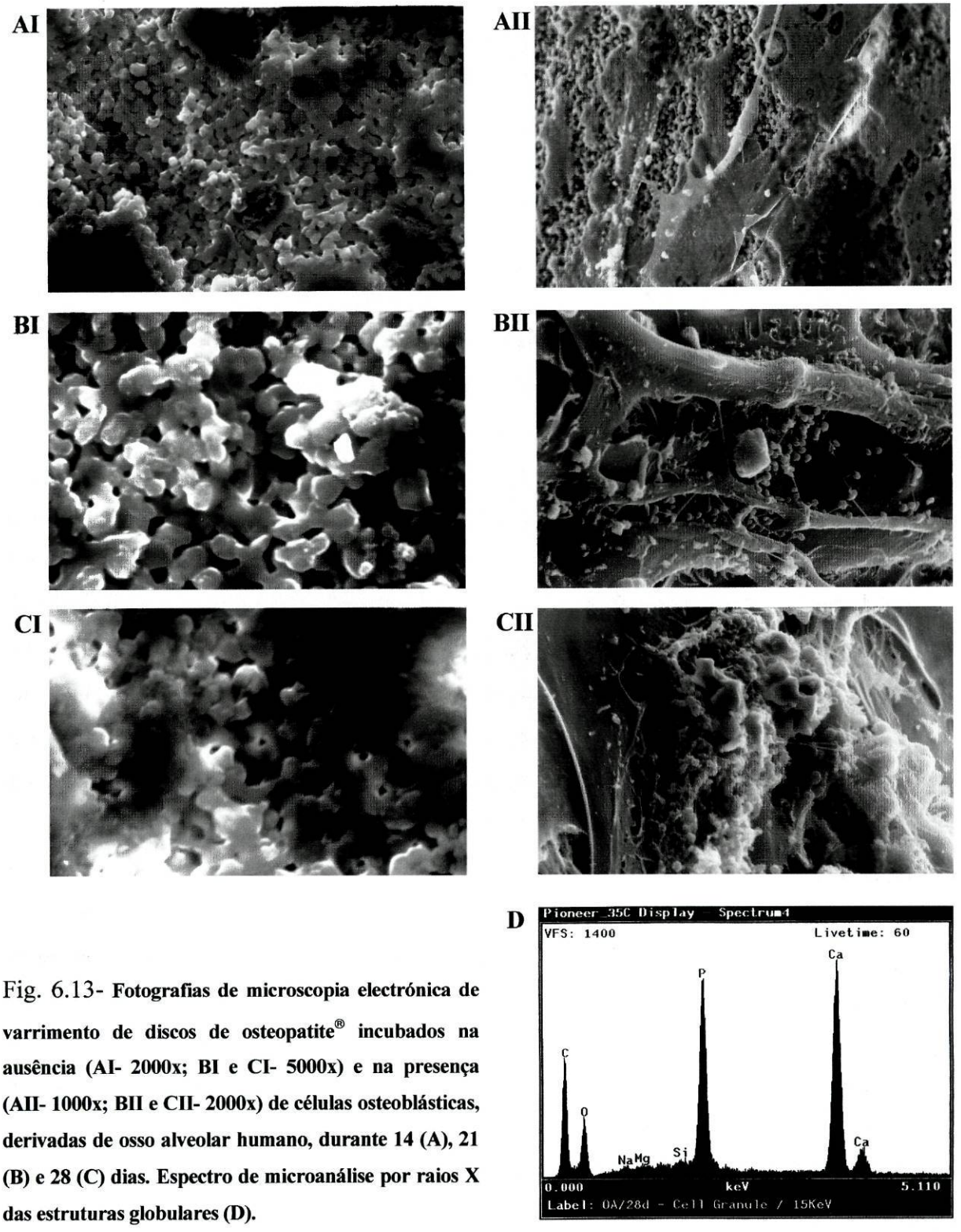


Fig. 6.13- **Fotografias de microscopia electrónica de varrimento de discos de osteopatite® incubados na ausência (AI- 2000x; BI e CI- 5000x) e na presença (AII- 1000x; BII e CII- 2000x) de células osteoblásticas, derivadas de osso alveolar humano, durante 14 (A), 21 (B) e 28 (C) dias. Espectro de microanálise por raios X das estruturas globulares (D).**

3.4. DISCUSSÃO

As respostas que surgem na interface biomaterial/cultura celular são importantes para a determinação da biocompatibilidade do implante.

Vários estudos [292,376-381] efectuados *in vivo* mostram que a presença na osteopatite® dos catiões Na, K e Mg conduz a trocas iónicas entre o biomaterial e o meio, conferindo-lhe um comportamento biológico mais bioactivo na sua interacção com o tecido ósseo do hospedeiro. Por outro lado, o fornecimento de grandes quantidades de iões ao meio nas primeiras horas de implantação é importante para a osteogénese e, ao determinar uma subida do pH do meio, funciona como catalisador do crescimento e maturação do tecido ósseo neoformado [285,377].

As trocas iónicas iniciais entre a osteopatite® e o meio são fundamentais para a formação de uma camada superficial de fosfatos de cálcio, que têm acção osteocondutora do tecido ósseo neoformado, a qual irá desenvolver-se e integrar o biomaterial [382-385]. Todavia, a osteopatite® não apresenta uma degradação significativa, não sendo reabsorvida, dado que a sua velocidade inicial de dissolução diminui drasticamente após 24 horas de contacto com os fluídos orgânicos, como verificado em testes de dissolução [377].

Porém, verificou-se *in vitro* que a elevação inicial de pH se traduzia por efeitos de toxicidade nas culturas celulares. Por este motivo, os discos de osteopatite® foram imersos no meio de cultura 24 horas antes de serem transferidos para as respectivas caixas de cultura. A imersão prévia dos discos, para além de minimizar a subida inicial de pH, promove a adsorção à sua superfície de moléculas orgânicas que são importantes para a posterior adesão, proliferação e diferenciação celular [386,387].

Os teste de biocompatibilidade *in vitro* são geralmente efectuados em placas de 96 ou 24 poços, com um volume relativamente pequeno de meio (respectivamente, 100 e 1000 μL). Como não existe uma renovação contínua do meio de cultura, os resíduos celulares e de degradação do biomaterial vão-se acumulando e, consequentemente, a toxicidade de um dado biomaterial pode ser sobrestimada. Afim de evitar este fenómeno e para mimetizar as condições de implantação dos tecidos *in vivo*, em que a constante renovação dos fluídos equilibra as trocas iónicas entre o material e o tecido hospedeiro, os discos foram cultivados num volume relativamente grande de meio de cultura (10 mL).

A análise dos discos de osteopatite® por microscopia electrónica de varrimento revelou a existência de uma superfície rugosa, resultante do processo de polimento, e uma microporosidade considerável nas zonas de erosão (Fig. 6.12). Estes efeitos têm sido objecto

de aturados estudos [285,378,388] por diversos investigadores, sabendo-se que esta estrutura microporosa representa uma vantagem em termos de implante, pois permite um maior contacto dos fluidos orgânicos com o interior do material, facilitando as trocas iónicas e a sua posterior integração nos tecidos vivos.

A observação dos discos por microscopia electrónica de varrimento revelou ainda que as células do tipo osteoblástico preferiram aderir, inicialmente, às superfícies mais polidas, fazendo ponte sobre as referidas erosões e sulcos. Contudo, verificou-se a projecção de filamentos citoplasmáticos das células para essas zonas irregulares (Fig. 6.13 AII). Este fenómeno foi referido igualmente por outros autores [388,389], e pensa-se que será demonstrativo da integração perfeita que se vai estabelecendo entre as células osteogénicas e o biomaterial. Aos 21 dias de incubação os discos de osteopatite® encontravam-se totalmente recobertos por um tecido perfeitamente organizado, sendo visível a presença de inúmeras vesículas de mineralização, aspecto ainda mais evidente nas culturas de 28 dias (Fig. 6.13 BII e CII).

A análise das vesículas de mineralização por microanálise por raios X evidenciou a sua composição química, rica em fosfatos de cálcio, bem como a presença de picos elevados para o carbono e o oxigénio, comprovativos da sua origem biológica.

3.5. CONCLUSÃO

Este estudo mostrou que a osteopatite® permite a proliferação de células osteoblásticas e o seu normal funcionamento, a nível qualitativo, observando-se mesmo a mineralização da matriz extracelular, etapa final da diferenciação osteoblástica.

RESUMO

RESUMO

Os resultados apresentados nesta dissertação sugerem que as culturas celulares obtidas de osso alveolar humano, em condições experimentais apropriadas, podem constituir um modelo adequado para o estudo da fisiopatologia e farmacologia deste tecido ósseo e, também, de aspectos biológicos envolvidos na interacção osso alveolar/biomateriais. Os resultados obtidos evidenciam, igualmente, a importância da definição das condições experimentais, aspecto particularmente importante quando se considera a diversidade e a multiplicidade de metodologias descritas na literatura, facto que dificulta a interpretação e a comparação de resultados obtidos em estudos análogos.

No capítulo III mostrou-se o comportamento morfológico e funcional de culturas celulares de osso alveolar humano efectuadas em condições experimentais definidas. As culturas primárias foram obtidas por cultura de fragmentos de osso alveolar, proveniente inicialmente de roedores e posteriormente humano, num meio de cultura apropriado (α-MEM) enriquecido com 10% de soro bovino fetal, 50 μg/mL de gentamicina e 2,5 μg/mL de anfotericina B – meio base – e na presença de substâncias que favorecem o desenvolvimento de culturas com características osteoblásticas, nomeadamente, AA (50 μg/mL), β-GF (10 mM) e, ainda, na ausência e na presença de Dex (10 nM); as culturas foram incubadas a 37° C em atmosfera húmida contendo 95% de ar e 5% de CO_2 e, as subculturas, obtidas após tripsinização das células em cultura, foram efectuadas nas mesmas condições experimentais. As culturas efectuadas nas diversas condições experimentais proliferaram gradualmente com o tempo de incubação e apresentaram uma actividade de FA elevada. Quando efectuadas apenas em meio base ou na presença de AA ou de Dex não se verificou a formação de depósitos minerais na matriz extracelular. Contudo, as culturas efectuadas na presença de uma fonte de iões fosfato (β-GF) apresentaram características osteoblásticas, nomeadamente, uma actividade elevada de fosfatase alcalina e capacidade de formação de áreas mineralizadas; a presença adicional de Dex resultou num aumento significativo destas duas características. A subcultura sucessiva das células ósseas resultou numa diminuição gradual do fenótipo osteoblástico. Os níveis de fosfatase ácida e de fosfatase ácida resistente ao ácido tartárico foram insignificantes em todas as culturas, sugerindo uma contaminação desprezável por fibroblastos e/ou osteoclastos. Os resultados obtidos sugerem que a primeira subcultura constitui a população celular mais apropriada a ser utilizada como modelo nos estudos *in vitro* e fisiologia e farmacologia do osso alveolar.

Além dos glucocorticóides várias outras hormonas interferem com a diferenciação osteoblástica. Por esta razão, efectuou-se o estudo do efeito de substâncias que têm um papel importante nos mecanismos de regulação do metabolismo ósseo (resultados apresentados no capítulo IV). Num estudo preliminar caracterizou-se a proliferação celular e a actividade funcional das culturas celulares de osso alveolar humano efectuadas na presença de PTH, 1,25-$(OH)_2D_3$, Dex e várias combinações destas hormonas. As hormonas, na concentração de 10^{-8} mol/L, foram adicionadas no terceiro dia de incubação e estiveram presentes durante todo o período de cultura. Os resultados obtidos mostraram que a relação proliferação/diferenciação das culturas efectuadas em condições que favoreciam a formação de uma matriz mineralizada podia ser modulada pelas hormonas atrás referidas. A PTH e, particularmente, a Dex induzem significativamente a diferenciação das células osteoblásticas; as culturas expostas a estas hormonas apresentaram uma expressão mais precoce e níveis mais elevados de FA e uma maior capacidade de formação de áreas mineralizadas. As culturas tratadas com combinações de Dex e outras hormonas (Dex + PTH; Dex + 1,25-$(OH)_2D_3$) apresentaram uma diminuição significativa dos valores máximos observados para a actividade de FA, quando comparados com os valores encontrados nas culturas expostas apenas à Dex; no entanto, o processo de mineralização pareceu não ser afectado.

Para a maior parte das substâncias que afectam o metabolismo ósseo, o seu efeito depende do estado de diferenciação das células osteoblásticas. Assim, a relação proliferação/diferenciação celular das culturas de osso alveolar foi também estudada na presença de Dex e PTH adicionadas durante períodos seleccionados do tempo de cultura, representativos de células osteoblásticas em diferentes estados de diferenciação.

A presença de Dex resultou num aumento da proliferação celular e numa indução da actividade de FA e da capacidade de formação de áreas mineralizadas. O efeito da Dex na proliferação celular foi particularmente evidente nas culturas tratadas com o glucocorticóide durante a fase proliferativa (segunda e terceira semanas). Pelo contrário, a indução da actividade de FA e da capacidade de formação de depósitos minerais foram significativamente mais elevados nas culturas expostas à acção da Dex durante a primeira semana de incubação. A exposição das culturas à acção da hormona nas fases mais tardias de diferenciação osteoblástica (a partir da quarta semana) não conduziu a alterações significativas relativamente às culturas controlo (ausência de hormona).

A presença de PTH durante todo o período de incubação ou apenas durante a primeira ou a segunda semanas conduziu a um aumento da proliferação celular e da actividade de FA nas culturas efectuadas na presença de AA + β-GF; a actividade máxima foi observada mais precocemente do que nas culturas controlo (ausência de PTH), bem como a formação de depósitos minerais na matriz extracelular. A adição de PTH, durante os mesmos períodos de tempo, a culturas efectuadas na presença do glucocorticóide (AA + β-GF + Dex) conduziu a uma diminuição da actividade de FA e a um ligeiro atraso na formação de depósitos minerais. A adição da PTH nas restantes semanas do período de incubação não conduziu a diferenças significativas nos parâmetros estudados relativamente às respectivas situações controlo. Todavia, as culturas efectuadas na presença de Dex (isolada ou combinada com a PTH) apresentaram capacidade para formar depósitos de fosfato de cálcio mais precocemente do que as culturas efectuadas na ausência do glucocorticóide.

No capítulo V apresentaram-se os resultados relativos ao efeito do ião fluoreto, em diferentes concentrações (0,5, 1, 5 10, 25 e 50 ppm), nas culturas celulares de osso alveolar humano. A presença deste ião no meio de cultura conduziu a um aumento da proliferação celular, sem contudo afectar a actividade de FA. Porém, nas culturas tratadas com 5 e 10 ppm de NaF observou-se uma ligeira antecipação (cerca de três dias) da deposição dos depósitos de fosfato de cálcio, o que sugere uma antecipação da diferenciação osteoblástica. Pelo contrário, a presença nas culturas de 50 ppm de NaF conduziu, ao longo de todo o tempo de incubação, a um atraso em todos os parâmetros determinados.

As culturas de células do tipo osteoblástico têm sido utilizadas como modelo *in vitro* para estudar a interacção entre o tecido ósseo e biomateriais ou os seus produtos de degradação. Assim, para cumprir este objectivo estudou-se o efeito dos produtos de corrosão do aço AISI 316L no comportamento das culturas celulares de osso alveolar humano (capítulo VI). Os resultados obtidos mostraram que os efeitos destes produtos na proliferação e diferenciação das células osteoblásticas dependem da dose adicionada e do estado de diferenciação destas células. Para níveis superiores a uma determinada concentração não letal os produtos de corrosão do aço AISI 316L podem afectar a relação proliferação/diferenciação celular e impedir a mineralização da matriz extracelular, processo que reflecte a expressão completa do fenótipo osteoblástico. Neste capítulo, apresentaram-se também os resultados relativos ao comportamento das culturas de osso alveolar quando cultivadas na superfície da

osteoapatite®, tendo-se verificado que este biomaterial permite o normal funcionamento das células osteoblásticas, culminando com a mineralização da matriz extracelular.

Este trabalho elaborado de modo a assegurar o cumprimento dos objectivos propostos, apresenta as seguintes contribuições:

- Obtenção e caracterização de um sistema de cultura de células osteoblásticas humanas a partir de osso alveolar com características definidas e reprodutíveis, o qual constitui um modelo apropriado para o estudo do processo de proliferação e diferenciação das células de linhagem osteoblástica em condições experimentais seleccionadas.

- Contribuição para uma melhor caracterização da farmacodinamia de substâncias que influenciam o metabolismo ósseo (hormonas: 1,25-$(OH)_2D_3$, PTH e Dex; fármacos: ião fluoreto).

- Contribuição para um conhecimento mais completo do efeito de produtos de corrosão de ligas metálicas, frequentemente utilizadas em implantologia óssea (nesta estudo, o AISI 316L), no comportamento de proliferação e expressão do fenótipo osteoblástico de células ósseas humanas.

- Estudo *in vitro* da biocompatibilidade da osteoapatite®, integrado num estudo mais amplo sobre este biomaterial que envolveu uma componente experimental (utilizando como modelo o coelho) e estudos clínicos.

SUMMARY

SUMMARY

The results presented in this work suggest that the cell cultures obtained from human alveolar bone in appropriate experimental conditions are a potential model for the study of the physiopathology and pharmacology of this bone tissue and, also, of biological aspects involved in the interactions alveolar bone/biomaterials. The results also point out the importance in the definition of the experimental conditions, aspect that is particularly important due to the diversity and multiplicity of the methodologies described in the literature, which difficult the interpretation and comparison of results obtained in similar studies.

In Chapter III, the morphological and functional behaviour of human alveolar bone cell cultures obtained in selected experimental conditions is presented. Primary cultures were obtained by incubation of alveolar bone fragments (rodent; human) in α-MEM supplemented with 10% of foetal bovine serum (FBS), 50 μg/mL gentamicin and 2,5 μg/mL amphotericin B – standard medium – and in the presence of compounds that favour the development of cultures with osteoblastic features, namely AA (50 μg/mL), β-GP (10 mM) and, also, in the absence and in the presence of Dex (10 nM); cultures were incubated at 37° C in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO_2 and, the subcultures, obtained after tripsinization of the cells in culture, were maintained in the same experimental conditions. The cultures grown in the various experimental conditions did proliferat gradually with the incubation time and presented a high alkaline phosphatase (ALP) activity. Cultures grown in standard medium or in the presence of AA or Dex did not show the formation of mineral deposits in the extracellular matrix. However, cultures grown in the presence of a source of phosphate ions (β-GP) presented osteoblastic features, namely, a high ALP activity and ability to form mineralised areas; the additional presence of Dex resulted in significant increased of these two parameters. Serial subculture of the bone cells resulted in a gradual decreased of the osteoblastic phenotype. Levels of acid phosphatase and tartaric acid resistance phosphatase were very low in all cultures suggesting an insignificant contamination by fibroblasts and/or osteoclasts. The results suggest that the first subculture contains the most appropriate cell populations to be used as a model in *in vitro* studies of the physiology and pharmacology of the alveolar bone.

In addition to the glucocorticoids, several other hormones influence the osteoblastic differentiation. For this reason, the effect of compounds that play an important role in the mechanisms of bone remodelation was studied (results showed in chapter IV). In a preliminary study the cell proliferation and the functional activity of these cultures were studied in the presence of parathyroid hormone (PTH), 1,25-dihydroxivitamin D_3 [1,25-$(OH)_2D_3$], dexamethasone (Dex) and a combination of these hormones. The hormones, at a concentration of 10^{-8} mol/L, were added at day 3 and were present throughout the entire incubation time. Results showed that the above-cited hormones could modulate the proliferation-differentiation behaviour of human alveolar bone cell cultures grown in conditions that favour the formation of mineralised matrix. PTH and, particularly, Dex significantly induced the differentiation of osteoblastic cells; cultures exposed to these hormones presented an earlier expression and higher levels of ALP, and higher ability to form mineral deposits. Cultures treated with a combination of Dex and other hormones (Dex + PTH; Dex + 1,25-$(OH)_2D_3$) presented a significant decreased in the maximal values observed for ALP activity, as compared to those found in cultures exposed only to Dex; however, the mineralization process appeared not to be affected.

For the majority of compounds that affect the bone metabolism, their effect is related with the different stages of osteoblastic cell differentiation. As such, the proliferation/differentiation behaviour of alveolar cell cultures was also studied in the presence of Dex and PTH added during selected periods of the culture time, representative of osteoblastic cells at different stages of differentiation.

The presence of Dex resulted in an increased cell proliferation and an induction of ALP activity and ability to form mineralised deposits. The effect of Dex in cell proliferation was especially evident in the cultures in which the glucocorticoid was present during the proliferative phase (second and third weeks). By contrast, induction of ALP activity and ability to form mineral deposits, were significantly higher in the cultures exposed to Dex during the first week of incubation. Exposure during later stages of the culture time (fourth week onwards) resulted in little or no detectable effects as compared to the control cultures (without hormone).

The presence of PTH either during the entire incubation time or during the first or second week of the culture time resulted in an increased cell proliferation and an induction of ALP

activity in the cultures treated with AA + β-GP; the maximal activity was observed earlier than that found in control cultures (without PTH), as well as the formation of mineral deposits in the extracellular matrix. Exposure to the PTH of cultures treated with the glucocorticoid (AA + β-GP + Dex), during the same periods of culture time, resulted in a decreasing of the ALP activity and a little delay in the formation of the mineral deposits. The addition of PTH in the remaining weeks of the culture time resulted in little or no detectable effects on the measured parameters, as compared to the respective control cultures. Nevertheless, the cultures treated with Dex (added isolated or combined with PTH) showed the ability to form calcium phosphate deposits earlier than those cultures treated in the absence of glucocorticoid.

The results related to the effect of the fluoride ion on human alveolar bone cell cultures, at different concentration (0.5, 1, 5, 10, 25 e 50 ppm), were presented in chapter V. The presence of this ion in the culture medium resulted in an increased cell proliferation; at the same time, it was also observed that the ALP activity was not affected. However, on those cultures exposed to concentrations of 5 and 10 ppm of NaF a slightly anticipation in the formation of calcium phosphate deposits was observed, which suggests an earlier osteoblastic differentiation. On the other hand, in the cultures exposed to 50 ppm of NaF a significant delay in the measured parameters was noticeable, during the entire incubation time.

Osteoblat-like cell cultures have been used as *in vitro* models to study the interactions of bone tissue with biomaterials and their degradation products. So, in order to pursue this path the effects of ASSI 316L stainless steel corrosion products on the osteoblastic behaviour of human alveolar cell cultures was studied (chapter VI). Results suggest that such products affect, in a dose-dependent manner, the proliferation and differenciation of osteoblastic cells; these effects depend on the developmental stage of the osteoblastic cells. Above certain nonlethal concentrations, the corrosion products may affect the cellular proliferation/differentiation behaviour and prevent the mineralization of the extracellular matrix, a process that reflects the complete expression of the osteoblastic phenotype. Also in this chapter, results connected with alveolar bone cells behaviour cultured on the surface of osteopatite® were presented. This biomaterial has shown to be compatible with a good bone tissue organization and achivement of osteoblastic cells normal function – the production of calcium phosphate granules – mineralization.

The work, carried out according to the initial objectives stated in the PhD submission phase (with minor adjustments), has led to following contributions:

- Definition and characterisation of a human osteoblastic cell culture system from alveolar bone, which presents well-defined characteristics and reproducible behaviour. Such system represents an appropriate model for the study of osteoblastic cell proliferation and differentiation in selected experimental conditions.

- Better characterisation of the pharmacodinamics of compounds affecting the bone metabolism (hormones: 1,25-$(OH)_2D_3$, PTH and Dex; compounds: fluoride ion).

- An in-depth knowledge of the effect of corrosion products of metallic alloys, often used in bone implantology (namely AISI 316L), in the proliferation behaviour and expression of the osteoblastic phenotype from human bone cells.

- *In vitro* studies regarding the osteopatite® biocompatibility, integrated in a larger study on this biomaterial, which involved an experimental part (using rabbit as the choice model) as well as clinical studies.

RÉSUMÉ

RÉSUMÉ

Les résultats pressés dans cette dissertation suggèrent que les cultures cellulaires obtenues d'os alvéolaire humain, en conditions expérimentales appropriées, puissent constituer un modèle convenable pour étudier la physiopathologie et la pharmacologie du tissu osseux, bien comme, les aspects biologiques engagés dans l'interaction entre l'os alvéolaire et les biomatériaux. Les résultats obtenus montrent aussi l'importance de la définition des conditions expérimentales, un aspect qui est particulièrement important quand on considère la diversité et la multiplicité de méthodologies décrites dans la littérature, fait qui rend difficile l'interprétation et la comparaison des résultats obtenus en études analogues.

Dans le chapitre III, le comportement morphologique et fonctionnel de cultures cellulaires d'os alvéolaire humain, effectuées en conditions expérimentales définies, a été montré. Les cultures primaires ont été obtenues par culture de fragments d'os alvéolaire, provenant de rongeurs et humain, dans un milieu de culture approprié (α-MEM) enrichi avec 10% de sérum bovin fœtale, 50 μg/mL de gentamicine et 2,5 μg/mL d'amphotéricine B – milieu base – et en présence de substances qui permettent le développement de cultures avec des caractéristiques ostéoblastiques, nommément, AA (50 μg/mL), β-GF (10 mM) et encore dans l'absence et la présence de Dex (10 nM). Les cultures ont été incubées a 37° C dans une atmosphère humide ayant 95% d'air et 5% de CO_2 et les subcultures, obtenues après tripsinization des cellules, ont été effectuées dans les mêmes conditions expérimentales. Les cultures effectuées dans les différentes conditions expérimentales ont prôliferé graduellement avec le temps d'incubation et ont présenté une haute activité de la phosphatase alcaline. Quand les cultures ont à peine été effectué en milieu base ou en présence de AA ou de Dex, la formation de dépôts minéraux dans la matrice extracellulaire n'a pas été observée. Toutefois, les cultures effectuées dans la présence d'une source d'ions phosphate (β-GF) ont présenté des caractéristiques osteoblástiques, nommément, une haute activité de la phosphatase alcaline et la capacité de formation de surfaces minéralisées ; la présence additionnelle de Dex a provoqué une augmentation significative de ces deux caractéristiques. La successive subculture des cellules osseuses a provoqué la diminution graduelle du phénotype ostéoblastique. Les niveaux de phosphatase acide e de phosphatase acide résistante à l'acide tartarique ont été insignifiantes dans toutes les cultures, ce qui suggère une contamination méprisable par des fibroblastes et/ou des ostéoclastes. Les expériences menées suggèrent que la première subculture forme la

population cellulaire plus appropriée pour être utilisée comme modèle, dans les études *in vitro* de la physiologie et la pharmacologie de l'os alvéolaire.

Outre les glucocorticoïdes, diverses hormones interférentes avec la différenciation ostéoblastique. Pour cette raison, l'étude de l'effet de substances qui jouent un rôle important dans les mécanismes de régulation du métabolisme osseux a été effectué (résultats présentés dans le chapitre IV). Une étude préliminaire a caractérisé la prolifération cellulaire et l'activité fonctionnelle des cultures cellulaires d'os alvéolaire humain effectué en présence de PTH, 1,25-$(OH)_2D_3$, Dex et de diverses combinaisons de ces hormones. Les hormones, a une concentration de 10^{-8} mol/L, ont été additionnées au troisième jour d'incubation et ont été présentes pendant tout le temps de culture. Les résultats obtenus ont montré que la relation prolifération/différenciation des cultures effectuées en conditions qui permettent la formation d'une matrice minéralisée, peut être modulée par les hormones sur-dénommées. La PTH et, particulièrement, la Dex induisent significativement la différenciation des cellules ostéoblastiques; les cultures exposées à ces hormones ont présenté une expression plus précoce et des niveaux plus élevés de phosphatase alcaline et une plus grande capacité de formation de surfaces minéralisées. Les cultures traitées avec les combinaisons de Dex et d'autres hormones (Dex + PTH, Dex + 1,25-$(OH)_2D_3$) ont présenté une diminution significative des values maximum observé pour l'activité de la FA, en comparaison des valeurs obtenues pour les cultures exposées à la Dex; cependant, le procès de minéralisation a paru ne pas être affecté.

Pour la plupart des substances qui affectent le métabolisme osseux, ses effets dépendent de l'état de différenciation des cellules ostéoblastiques. Ainsi, la relation de prolifération/différenciation cellulaire des cellules d'os alvéolaire a été étudiée en présence de la Dex et de la PTH, additionnées pendant des périodes sélectionnées du temps de culture, représentatifs des cellules ostéoblastiques en différant états de différenciation.

La présence de la Dex a provoqué une augmentation de la prolifération cellulaire et une induction de l'activité de la FA et de la capacité de formation de surfaces minéralisées. L'effet de la Dex sur la prolifération cellulaire a été particulièrement évident dans les culture exposée au glucocorticoïde pendant la phase de prolifération (deuxième et troisième semaines). Par contre, l'induction de l'activité de la FA et de la capacité de formation de dépôts minéraux a été significativement plus élevée dans les cultures exposées à l'action de la Dex pendant la

première semaine d'incubation. L'exposition des cultures à l'action de l'hormone dans les phases plus avancées de la différenciation ostéoblastique (est partir de la quatrième semaine) n'a apporté aucun changement significatif relativement aux cultures contrôle (absence de l'hormone).

La présence de la PTH pendant tout la période d'incubation ou à peine pendant la première ou la deuxième semaine a provoqué l'augmentation de la prolifération cellulaire et de l'activité de la FA dans les cultures effectuées en présence de AA + β-GF; l'activité maximum a été observée plutôt que dans les cultures contrôle (absence de PTH), bien comme la formation de dépôts minéraux dans la matrice extracellulaire. L'addition de la PTH, pendant les mêmes périodes de temps des cultures effectuées en présence du glucocorticoïde (AA + β-GF + Dex) ont provoqué une diminution de l'activité de la FA et un léger retardement da la formation des dépôts minéraux. L'addition de la PTH pendant les semaines restantes de la période d'incubation n'a causé aucune différence significative dans les paramètres étudiés relativement aux situations contrôle. Cependant, les cultures effectuées en présence de la Dex (isolée ou en combinaison avec la PTH) ont présenté leur capacité pour former des dépôts de phosphate de calcium plutôt que les cultures effectuées en absence du glucocorticoïde.

Dans le chapitre V, les résultats relatifs à l'étude de l'ion fluorure, a différentes concentrations (0,5, 1, 5, 10, 25 et 50 ppm), dans les cultures cellulaires d'os alvéolaire, ont été présentées. La présence de cet ion dans le milieu de culture a provoqué une augmentation de la prolifération cellulaire, sans, toutefois, affecter l'activité de la FA. Cependant, dans les cultures exposées à 5 et 10 ppm de NaF on a observé une légère anticipation (environ 3 jours) de la déposition de dépôts de phosphate de calcium, ce qui suggère une anticipation de la différenciation ostéoblastique. Par contre, la présence de 50 ppm de NaF dans les cultures a conduit, au cours du temps d'incubation, à en retard de tous les paramètres déterminés.

Les cultures de cellules du type ostéoblastique sont utilisées comme modèle in vitro pour étudier l'interaction entre le tissu osseux et les biomatériaux ou ses produits de dégradation. Finalement, pour accomplir cet objectif, l'effet des produits de corrosion de l'acier AISI 316L sur le comportement des cultures cellulaires d'os alvéolaire humain a été étudié (chapitre VI). Les résultats obtenus ont montré que les effets de ces produits sur la prolifération et la différenciation des cellules ostéoblastiques dépendent de la dose additionnée e de l'état de différenciation de ces cellules. Au-dessus d'une certaine concentration non-mortelle, les

produits de corrosion de l'acier AISI 316L peuvent affecter la relation prolifération/différenciation cellulaire et empêcher la minéralisation de la matrice extracellulaire, procès qui reflète l'expression complète du phénotype ostéoblastique. Dans ce chapitre, les résultats relatifs au comportement des cultures d'os alvéolaire développées à la surface de osteopatite® ont présenté. On a pu vérifier que ce biomatériau permet le fonctionnement normal des cellules ostéoblastiques, jusqu'à la minéralisation de la matrice extracellulaire.

Ce travail à été élaboré de façon à assurer l'accomplissement des objectifs proposés et présente les suivantes contributions :

- Obtention et caractérisation d'un système de culture de cellules ostéoblastiques humaines a partir d'os alvéolaire, avec des caractéristiques définies e reproductibles, qui établit un modèle approprié pour l'étude du procès de prolifération et de différenciation des cellules du lignage ostéoblastique en conditions expérimentales sélectionnée.

- Contribution pour une meilleure caractérisation de la pharmacodynamie de substances qui influencent le métabolisme osseux (hormones : PTH, 1,25-$(OH)_2D_3$, Dex ; médicament : ion fluorure).

- Contribution pour la connaissance plus complète de l'effet des produits de corrosion d'allers métalliques, souvent utilisées en implantologie osseuse (dans cette étude, l'acier AISI 316L), sur le comportement de prolifération e expression du phénotype ostéoblastique des cellules osseuses humains.

- Etude in vitro de la biocompatibilité de l'osteopatite®, intégrée dans une étude plus vaste sur ce biomatériau qui a engagé un composant expérimental (le lapin a été utilisé comme modèle) et des études cliniques.

BIBLIOGRAFIA

1. Furseth, R., Selvig, K.A. e Mjör, I.A.: El periodoncio, cap. 5 em: *Embriologia e Histologia Oral Humana*, Mjör, I.A. e Fejerskov, O. (Edt..), Salvat Editores S.A., 1989; 123-167.
2. Jeffcoat, M.K.: Bone Loss in the Oral Cavity, *J. Bone Min. Res.* 1993; 8: S467-S473.
3. Seymour, R.A., Heasman, P.A. e Macgregor, I.D.M.: The pathogenesis of periodontal disease, cap. 1 em: *Drugs, diseases, and the perioduntium*, Oxford Medical Publications 1992; 1-10.
4. Meffert, R.M., Langer, B. e Fritz, M.E.: Dental implants: a review, *J. Periodontol.* 1992; 63: 859-870.
5. Misch, C.E. e Dietsh, F.: Bone-grafting material in implant dentistry, *Implant Dent.* 1993; 2: 158-167.
6. Peppas, N.A. Langer, R.: New challenges in biomaterials, *Science* 1994; 263: 1715-1720.
7. Bagambisa, F.A., Kappert, H.F. e Schilli, W.: Interfacial reactions of osteoblasts to dental and implant materials, *J. Oral Maxillofac. Surg.* 1994; 52: 52-56.
8. Gundle, R. e Beresford, J.N.: The isolation and culture of cells from explants of human trabecular bone, *Calcif. Tissue Int.* 1995; 56: S8-S10.
9. Ninomiya, J.T., Tracy, R.P. e Calore. J.D.: Heterogeneity of Human Bone, *J. Bone Miner. Res.* 1990; 5: 933-938.
10. Denkonski, P., Tertineg I. e Heersche, J.N.M.: Heterogeneity between osteoblastic populations isolated from different adult rat skeletal sites, *Bone Miner.* 1994; 25: S8.
11. Kasperk, C., Wergedal, J., Strong, D. *et al*: Human Bone Cell Phenotypes Differ Depending on Their Skeletal Site of Origin, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1995; 80 (8): 2511-2517.
12. Chavassieux, P.M., Chenu, C., Valentin-Opran, A., Merle, B., Delmas, P.D., Hartmann, D.J., Saez, S. e Meunier, P.J.: Influence of Experimental Conditions on Osteoblast Activity in Human Primary Bone Cells Cultures, *J. Bone Miner. Res.*_1990; 5 (4): 337-343.
13. Marie, J.P. e De Vernejoul, M.C.: Proliferation of bone surface derived osteoblast cells and control of bone formation, *Bone* 1993; 14: 463-468.
14. Freshney, R.I.: The Culture Environment: Substract, Gas Phase, Medium and Temperature: Cell Lines. Cap. 7 em: *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, 3ª Ed., Freshney, R.I. (Edt.), Wiley-Liss, 1994; 71-103.
15. Rattner, A., Sabido, O., Massoubre, C., Rascle, F. e Frey, J.: Characterization of human osteoblastic cells: influence of the culture conditions, *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 1997; 33: 757-762.
16. Coelho, M.J., Trigo Cabral, A. e Fernandes, M.H.: Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part I: osteoblastic differentiation of serially passaged human bone marrow cells cultured in α-MEM and in D-MEM, *Biomaterials* 2000; 21: 1087-1094.

17. Coelho, M.J. e Fernandes, M.H.: Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part II: effect of ascorbic acid, b-glycerophosphate and dexamethasone on osteoblastic differentiation, *Biomaterials* 2000; 21: 1095-1102.

18. Junqueira, L.C. e Carneiro, J.: Tecido Ósseo, cap. 8 em: *Histologia Básica*, 9ª Ed., Guanabara Koogan, 1999; 111-128.

19. Tortora, G.J. e Anagnostakos, N.P.: Tejido esquelético: estrutura, fisiologia y desórdenes, cap. 7, em: *Principios De Anatomia y Fisiologia*, Harla, 1975; 102-114.

20. Fawcett, D.W.: Bone, cap. 8 em: *A textbook of Histology*, 12ª Ed., Chapman & HAll, 1995; 194-233.

21. Väänänen, H.K.: Mechanism of Bone Turnover, *Ann. Med.* 1993; 25: 353-359.

22. Green, J. e Kleeman, C.R.: Role of bone in regulation of systemic acid-base balance, *Kidney International* 1991; 39: 9-26.

23. Eriksen, E.F., Vesterby, A., Kassem, M., Melsen, F. e Mosekilde, L.: Bone Remodeling and Bone Structure, cap. 2 em: *Handbook of Experimental Pharmacology*, vol. 107, Mundy, G.R. e Martin, T.J. (Edt.), Springer-Verlag, 1993; 67-109.

24. Baron, R.: Anatomy and Ultrastructure of Bone, cap. 1 em: *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*, 2ª Ed., Favus, M.J. (Edt.), Raven Press, 1993; 3-9.

25. Hauschka, P.V.: Growth Factor Effects in Bone, cap. 4 em: *Bone: The Osteoblast and Osteocyte*, vol. 1, HAll, B.K. (Edt.), The Telford Press, 1990; 103-170.

26. Aubin, J.E., Turksen, K. e Heersche, N.M.: Osteoblast Cell Lineage, cap. 1 em : *Cellular and Molecular Biology of Bone*, Masaki Noda (Edt.), Academic Press, 1993; 2-45.

27. Owen, M.: Marrow stromal stem cells, *J.Cell Sci. Suppl.* 1988; 10: 63-76.

28. Aubin, J.E. e Liu, F.: The Osteoblast Lineage, cap. 5 em: *Principles of Bone Biology*, Bilezikian, J.P., Raizs, L.G. e Rodan, G.A.(Edt.), Academic Press, 1996; 51-67.

29. Holtrop, M.E.: Light and Electron Microscopic Struture of Bone-Forminng Cells, cap. 1 em: *Bone: The Osteoblast and Osteocyte*, vol. 1, HAll, B.K. (Edt.), The Telford Press, 1990; 1-39.

30. Beresford, J.N.: Osteogenic Stem Cells and the Stromal System of Bone and Marrow, *Clin. Orthop. Rel. Res.* 1989; 240: 270-280.

31. Triffitt, J.T.: Initiation and enhancement of bone formation, *Acta Orthop Scand.* 1987; 58: 673-684.

32. Triffitt, J.T.: The Stem Cell of the Osteoblast, cap. 4 em: *Principles of Bone Biology*, Bilezikian, J.P., Raizs, L.G. e Rodan, G.A. (Edt.), Academic Press, 1996; 39-50.

33. Nijweide, P.J., Burger, E.H. e Feyen J.H.M.: Cells of Bone: Proliferation, Differentiation, and Hormonal Regulation, *Physiol. Rev.* 1986; 66 (4): 855-885.

34. Tenenbaum, H.C.: Cellular Origins and Theories of Diffrentiation of Bone-Forming Cells, cap. 2 em: *Bone: The Osteoblast and Osteocyte*, vol. 1, Hall, B.K. (Edt.), The Telford Press, 1990; 41-69.

35. Martin, T.J., Findlay, D.M., Heath, J.K. e Ng K.W.: Osteoblasts: Differentiation and Function, cap.4 em: *Handbook of Experimental Pharmacology*, vol. 107, Mundy, G.R. e Martin, T.J. (Edt.), Springer-Verlag, 1993; 149-183.

36. Puzas, J.E.: The Osteoblast, cap. 3 em: *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*, 2ª Ed., Favus, M.J. (Edt.), Raven Press, 1993; 15-21.

37. Miller, S.C. e Jee, W.S.S.: Bone Lining Cells, cap. 1 em: *Bone: Bone Metabolism and Mineralization*, vol. 4, Hall, B.K. (Edt.), CRC Press, 1992; 1-19.

38. Magalhães, M.M.: Especialização da Membrana Celular, cap. 3 em: *Biologia Celular*, Azevedo, C. (Edt.), Lidel- Edições Técnicas, 1994; 53-57.

39. Robey, P.G.: Collagenase-treated trabecular bone fragments: a reproducible source of cells in the osteoblastic lineage, *Calcif. Tissue Int.* 1995; 56: S11-S12.

40. Mundy, G.R.: Bone Resorbing Cells, cap. 5 em: *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*, 2ª Ed., Favus, M.J. (Edt.), Raven Press, 1993; 25-32.

41. Baron, R., Ravesloot, J.-H., Neff, L., Chakraborty, M., Chatterjee, D., Lomri, A. e Horne, W.: Cellular and Molecular Biology of the Osteoclast, cap. 14 em: *Cellular and Molecular Biology of Bone*, Masaki Noda (Edt.), Academic Press, 1993; 445-495.

42. Baron, R., Chakraborty, M., Chatterjee, D., Horne, W., Lomri, A. e Ravesloot, J.-H.: Biology of the Osteoclast, cap. 3 em: *Handbook of Experimental Pharmacology*, vol. 107, Mundy, G.R. e Martin, T.J. (Edt.), Springer-Verlag, 1993; 111-147.

43. Udagawa, T.S., Nakamura, I., Miyaura, C. e Takahashi, N.: Modulation of Osteoclast Differentiation by Local Factors, *Bone* 1995; 17 (2): 87S-91S.

44. Roodman, G.D.: Application of Bone Marrow Cultures to the Study of Osteoclast Formation and Osteoclast Precursors in Man, *Calcif. Tissue Int.* 1995; 56 (Suppl 1): S22-S23.

45. Prallet, B.P., Male, P., Neff, L. e Baron, R.: Identification of a Funcional Mononuclear Precursor of the Osteoclast in Chicken Medullary Bone Marrow Cultures, *J. Bone Miner. Res.* 1992; 7 (4): 405-414.

46. Kurihara, N., Gluck, S. e Roodman, G.D.: Sequencial Expression of phenotype Markers for Osteoclasts During Differenciation of Precursors for Multinucleated Cells Formed in Long Term Human Marrow Cultures, *Endocrinology* 1990; 127 (6): 3215-3221.

47. Takahashi, N., Udagawa, N., Akatsu, T., Tanaka, H., Shionome, M. e Suda, T.: Role of Colony-Stimulating factors in Osteoclast Development, *J. Bone Min. Res.* 1991, 6 (9): 977-985.

48. Simmons, D.J. e Gryinpas, M.D.: Mechanisms of Bone Formation *In Vivo*, cap. 6 em: *Bone: The Osteoblast and Osteocyte*, vol. 1, HAll, B.K. (Edt.), The Telford Press, 1990; 193-302.

49. Delmas, P.D. e Malaval, L.: The Proteins of Bone, cap. 19 em: *Handbook of Experimental Pharmacology*, vol. 107, Mundy, G.R. e Martin, T.J. (Edt.), Springer-Verlag, 1993; 673-724.

50. Rossert, J. e Crombrugghe, B.: Type I Collagen: Structure, Synthesis, and Regulation, cap. 10 em: *Principles of Bone Biology*, Bilezikian, J.P., Raizs, L.G. e Rodan, G.A.(Edt.), Academic Press, 1996; 127-142.

51. Eyre, D.R.: Biochemical Basis of Collagen Metabolites as Bone Turnover Markers, cap. 11 em: *Principles of Bone Biology*, Bilezikian, J.P., Raizs, L.G. e Rodan, G.A.(Edt.), Academic Press, 1996; 143-153.

52. Olsen, R.B. e Ninomiya, Y.: Collagens, em: *Guidebook to the Extracellular Matrix and Adhesion Proteins*, Kreis, T. e Vale, R. (Edt.), Oxford University Press, 1993; 32-48.

53. Cidadão, A.: Matriz Extracelular, cap. 4 em: *Biologia Celular*, Azevedo, C. (Edt.), Lidel-Edições Técnicas, 1994; 63-67.

54. Lodish, H., Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P. e Darnell, J.: Multicellularity: Cell-Cell and Cell-Matrix Interactions, cap. 24 em: *Molecular Cell Biology*, 3ª Ed., Scientific American Books, 1995; 1123-1197.

55. Termine, J.D.: Bone Matrix Proteins and the Mineralization Process, cap 4 em: *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*, 2ª Ed., Favus, M.J. (Edt.), Raven Press, 1993; 21-25.

56. Junqueira, L.C. e Carneiro, J.: Tecidos Conjuntivos, cap. 5 em: *Histologia Básica*, 9ª Ed., Rio de Janeiro: Edt. Guanabara Koogan, 1999; 65-87.

57. Robey, P.G.: Bone Matrix Proteoglycans and Glycoproteins, cap. 12 em: *Principles of Bone Biology*, Bilezikian, J.P., Raizs, L.G. e Rodan, G.A.(Edt.), Academic Press, 1996; 155-165.

58. Fisher, L.W.: Decorin (DCN), em: *Guidebook to the Extracellular Matrix and Adhesion Proteins*, Kreis, T. e Vale, R. (Edt.), Oxford University Press, 1993; 48-49.

59. Fisher, L.W.: Biglycan (BGN), em: *Guidebook to the Extracellular Matrix and Adhesion Proteins*, Kreis, T. e Vale, R. (Edt.), Oxford University Press, 1993; 21-22.

60. Oldberg, A.: Fibromodulin, em: *Guidebook to the Extracellular Matrix and Adhesion Proteins*, Kreis, T. e Vale, R. (Edt.), Oxford University Press, 1993; 55-56.

61. Zimmermann, D.R.: Versican, em: *Guidebook to the Extracellular Matrix and Adhesion Proteins*, Kreis, T. e Vale, R. (Edt.), Oxford University Press, 1993; 100-101.

62. Young, M.F., Ibaraki, K., Kerr, J.M. e Heegaard, A.-M.: Molecular and Cellular Biology of the Major Noncollagenois Proteins in Bone, cap. 6 em: *Cellular and Molecular Biology of Bone*, Masaki Noda (Edt.), Academic Press, 1993; 191-234.

63. Ducy, P. e Karsenty, G.: Skeletal Gla Proteins: Gene, Structure, Regulation of Expression, and Function, cap. 14 em: *Principles of Bone Biology*, Bilezikian, J.P., Raizs, L.G. e Rodan, G.A.(Edt.), Academic Press, 1996; 183-195.

64. Pike, J.W., Sone, T., Kesterson, R.A. e Kerner, S.A.: The Osteocalcine Gene as a Molecular Model for Tissue-Specific Expression and 1,25-Dihydroxyvitamin D_3 Regulation, cap. 7 em: *Cellular and Molecular Biology of Bone*, Masaki Noda (Edt.), Academic Press, 1993; 235-256.

65. Sodek, J.: SPARK/osteonectin, em: *Guidebook to the Extracellular Matrix and Adhesion Proteins*, Kreis, T. e Vale, R. (Edt.), Oxford University Press, 1993; 89-91.

66. Lawler, J.: Thrombospondin em: *Guidebook to the Extracellular Matrix and Adhesion Proteins*, Kreis, T. e Vale, R. (Edt.), Oxford University Press, 1993; 95-96.

67. Hynes, R.: Fibronectins, em: *Guidebook to the Extracellular Matrix and Adhesion Proteins*, Kreis, T. e Vale, R. (Edt.), Oxford University Press, 1993; 56-58.

68. Mosher, D.F.: Vitronectin, em: *Guidebook to the Extracellular Matrix and Adhesion Proteins*, Kreis, T. e Vale, R. (Edt.), Oxford University Press, 1993; 101-102.

69. Butler, W.T., Ridall, A.L. e McKee, M.D.: Osteopontin, cap. 13 em: *Principles of Bone Biology*, Bilezikian, J.P., Raizs, L.G. e Rodan, G.A.(Edt.), Academic Press, 1996; 167-181.

70. Fisher, L.W.: Bone Sialoprotein (BSP), em: *Guidebook to the Extracellular Matrix and Adhesion Proteins*, Kreis, T. e Vale, R. (Edt.), Oxford University Press, 1993; 22-23.

71. Aronow, M.A., Gerstenfeld, L.C., Owen, T.A., Tassinari, M.S., Stein, G.S. e Lian, J.B.: Factors That Promote Progressive Development of the Osteoblast Phenotype in Cultured Fetal Rat Calvaria Cells, *J. Cell. Physiol.* 1990; 143: 213-221.

72. Owen, T.A., Aronow, M., Shalhoub, V., Barone, L.M., Wilming, L., Tassinari, M.S., Kennedy, M.B., Pockwinse, S., Lian, J.B. e Stein, G.S.: Progressive Development of the Rat Osteoblast Phenotype In Vitro: Reciprocal Relationships in expression of Genes

Associated With Osteoblast Proliferation and Differentiation During Formation of the Bone Extracelular Matrix, *J. Cell. Physiol.* 1990; 143: 420-430.

73. Lian, J.B. e Stein, J.B.: Concepts of Osteoblast Growth and Differentiation: Basis for Modulation of Bone Cell Development and Tissue Formation, *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 1992; 3: 269-305.
74. Malaval, L., Modrowski, D., Gupta, A.K. e Aubin, J.E.: ellular Expression of Bone-Related Proteins During In Vitro Osteogenesis in Rat Bone Marrow Stromal Cell Cultures, *J. Cell. Physiol.* 1994; 158: 555-572.
75. Stein, G.S. e Lian, J.B.: Molecular Mechanisms Mediated Proliferation-Diddeferentiation Interrelationships During Progressive Development od the Osteoblast Phenotype, Update 1995, *Endocrinol. Rev.* 1995; 4: 290-297.
76. Nefussi, J.R., Brami, G., Modrowski, D., Oboeuf, M. e Forest, N.: Sequential Expression of Bone Matrix Proteins During Rat Calvaria Osteoblast Differentiation and Bone Nodule Formation In Vitro, *The J. Histochem. & Cytochem.* 1997; 45 (4): 493-503.
77. Weiner, S. e Addadi, L.: Acidic Macromolecules of mineralized tissues; the controllers of cristal formation, *Trends in Biochem. Sci.* 1991; 252-256.
78. Nagata, T., Bellows, C.G., Kasugai, S., Butler, W.T. e Sodek, J.: Biosynthesis of bone proteins [SPP-1 (secreted phosphoprotein-1, osteopontin), BSP (bone sialoprotein) and SPARC (osteonectin)] in association with mineralized-tissue formation by fetal-rat calvarial cells in culture, *Biochem. J.* 1991; 274: 513-520.
79. Nefussi, J.R., Septier, D., Collin, M. Goldberg, M. e Forest, N.: A Comparative Ultrahistochemical Study of Glycosaminoglycans with Cuprolonic Blue in Bone *Formed In Vivo* and *In Vitro*, *Calcif. Tissue Int.* 1989; 44: 11-19.
80. Bouvier, M., Couble, M-L-, Hartmann, D.J., Gauthier, J.P. e Magloire, H.: Ultrastructure and immunocytochemical study of bone-derived cells cultured in three-dimensional matrices: Influence of chondroitin-4 sulfate on mineralization, *Differentiation* 1990; 45: 128-137.
81. Parfitt, A.M.: Calcium Homeostasis, cap. 1 em: *Handbook of Experimental Pharmacology*, vol. 107, Mundy, G.R. e Martin, T.J. (Edt.), Springer-Verlag, 1993; 1-65.
82. Bernard, B.: Calcium Metabolism and Bone Mineralization, cap. 4 em: *Bone: Bone Metabolism and Mineralization*, vol. 4, HAll, B.K. (Edt.), CRC Press, 1992; 73-98.
83. Bab, I.A., Muhlrad, A. e Sela, J.: Ultrastructural and Biochemical Study of Extracellular Matrix Vesicles in Normal Alveolar Bone of Rats, *Cell tissue Res.* 1979: 202: 1-7.

84. Sasaki, T., Debari, K. e Hasemi, M.: Measurement of Howship´s Resorption Lacunae by a Scanning Probe Microscope system, *J. Electron. Microsc* 1993; 42: 356-359.

85. Glowacki, J.: Influence of Age on Human Marrow, *Calcif. Tissue Int.* 1995; 56 (Suppl. 1): S50-S51.

86. Marcus, R.: Agents Affecting Calcification and Bone Renovação: Calcium, Phosphate, Parathyroid Hormone, Vitamin D, Calcitonin, and other Compounds, cap. 61 em: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9ª Ed., Goodman-Gilman, A., Rall, T.W., Nies, A.S. e Taylor, P. (Edt.), McGraw-Hill, 1996; 1519-1546.

87. Zimmermann, B., Wachtel, H.C. e Noppe, C.: Patterns of mineralization in vitro, *Cell tissue Res.* 1991; 263: 483-493.

88. Anderson, H.C.: Biology of Disease: Mechanism of Mineral Formation in Bone, *Lab. Invest.* 1989; 60 (3): 320-330.

89. Judd, J., Kremer, M. e Oursler, M.J.: Age Dependence of Estrogen Responsiveness, *Calcif. Tissue Int.* 1995; 56 (Suppl 1): S25-S26.

90. Horowitz, M.C.: Cytokines and Estrogen in Bone: Anti-osteoporotic Effects, *Science* 1993; 260: 626-627.

91. Oursler, M.J., Landers, J.P., Riggs, B.L. e Spelsberg, T.C.: Oostrogen Effects on Osteoblasts and Osteoclasts, *Ann. Med.* 1993; 25: 361-371.

92. Lakkakorpi, P.T., Horton, M.A., Helfrich, M.H., Karhukorpi, E.K. e Väänänen, H.K.: Vitronectin Receptor Has a Role in Bone Resorption but Does Not Mediate Tight Sealing Zone Attachment of Osteoclasts to the Bone Surface, *The J. Cell Biol.* 1991; 115 (4): 1179-1186.

93. Blair, H.C., Schlesinger, P.H., Ross, F.P. e Teitelbaum, S.L.: Recent Advances Toward Understanding Osteoclast Physiology, *Clin. Orthop. Related Res* 1993; 294: 7-22.

94. Salo, J., Lehenkari, P., Mulari, M., Metsikkö, K. e Väänänen, H.K.; Removal of Osteoclast Bone Resorption Products by Transcytosis, *Science* 1997; 276: 270-273.

95. Guyton, A.C.: Parathyroid Hormone, Calcitonin, Calcium and Phosphate Metabolism, Vitamin D, Bone, and Teeth, cap. 79 em: *Textbook of Medical Physiology*, 9ª Ed., W.B. Saunders Company 1996; 985-1002.

96. Broadus, A.E.: Physiologycal Functions of Calcium, Magnesium, and Phosphorus and Mineral Ion Balance, cap. 7 em: *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*, 2ª Ed., Favus, M.J. (Edt.), Raven Press, 1993; 41-46.

97. Lemann, J.L.: Intestinal Absorption of Calcium, Magnesium, and Phosphorus, cap. 8 em: *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*, 2ª Ed., Favus, M.J. (Edt.), Raven Press, 1993; 46-50.

98. Bikle, D.D.: Regulation of Bone Mineral Homeostasis: An Integrated View, cap. 15 em: *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*, 2ª Ed., Favus, M.J. (Edt.), Raven Press, 1993; 76-80.

99. Lemann, J.L.: Urinary Excretion of Calcium, Magnesium, and Phosphorus, cap. 9 em: *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*, 2ª Ed., Favus, M.J. (Edt.), Raven Press, 1993; 50-54.

100. Bronner, F.: Bone and Calcium Homeostasis, *Neuro Toxicol.* 1992; 13: 775-782.

101. Ganong, W.F.: Hormonal Control of Calcium Metabolism & the Physiology of Bone; cap. 21 em: *Review of Medical Physiology*, 18ª Ed. Appleton & Lange, 1997; 359-371.

102. Canalis, E.: Regulation of Bone Remodeling, cap. 6 em: *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*, 2ª Ed., Favus, M.J. (Edt.), Raven Press, 1993; 33-37.

103. Bouillon, R.: Growth Hormone and Bone, *Horm. Res.* 1991; 36 (Suppl 1): 49-55.

104. Guyton, A.C. e Hall, J.E.: Introduction to Endocrinology, cap. 74 em: *Textbook of Medical Physiology*, 9ª Ed., W.B. Saunders Company 1996; 925-932.

105. Segre, G.V.: Secretion, Metabolism and Circulating Heterogeneity of Parathyroid Hormone, cap. 10 em: *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*, 2ª Ed., Favus, M.J. (Edt.), Raven Press, 1993; 55-57.

106. Kronenberg, H.M.: Parathyroid Hormone: Mechanism of Action, cap. 11 em: *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*, 2ª Ed., Favus, M.J. (Edt.), Raven Press, 1993; 58-60.

107. Finkelstein, J.S.: Pharmacological Mechanisms of Therapeutics: Parathyroid Hormone, cap. 71 em: *Principles of Bone Biology*, Bilezikian, J.P., Raizs, L.G. e Rodan, G.A.(Edt.), Academic Press, 1996; 993-1005.

108. Narbaitz, R.: Effects of Vitamins A, C, D, and K on Bone Growth, Mineralization, and Resorption, cap. 6 em: *Bone: Bone Metabolism and Mineralization*, vol. 4, HAll, B.K. (Edt.), CRC Press, 1992; 141-169.

109. Norman, A.W. e Henry, H.L.: Vitamin D: Metabolism and Mechanism of Action, cap. 13 em: *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*, 2ª Ed., Favus, M.J. (Edt.), Raven Press, 1993; 63-70.

110. Deftos, L.J.: Calcitonin, cap. 14 em: *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*, 2ª Ed., Favus, M.J. (Edt.), Raven Press, 1993; 70-76.

111. Wallach, S., Carstens, J.B. e Avioli, L.V.: Calcitonin, Osteoclasts, and Bone Turnover, *Calcif. Tissue Int.* 1990; 47: 388-391.

112.Trémollières, F., Pouilles, J.M. e Ribot, C.: Perte osseuse post-ménopausique. Rôle des estrogènes, *La Presse Médicale* 1992; 21(19): 903-906.

113.Guyton, A.C. e Hall, J.E.: Female Physiology Before Pregnancy and the Female Hormones cap. 81 em: *Textbook of Medical Physiology*, 9ª Ed., W.B. Saunders Company 1996; 1017-1032.

114.Junqueira, L.C. e Carneiro, J.: Glândulas Endócrinas, cap. 20 em: *Histologia Básica*, 9ª Ed., Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 1999; 300-322.

115.Gannong, W.F.: The Pituitary Gland, cap.22 em: *Review of Medical Physiology*, 18ª Ed. Appleton & Lange, 1997; 372-385.

116.Guyton, A.C. e Hall, J.E.: The Pituitary Hormones and their Control by the Hypothalamus, cap. 75 em: *Textbook of Medical Physiology*, 9ª Ed., W.B. Saunders Company 1996; 933-944.

117.Slootweg, M.C.: Growth Hormone and Bone, *Horm. Metab. Res.* 1993; 25: 335-343.

118.Guyton, A.C. e Hall, J.E.: The Adrenocortical Hormones cap. 77 em: *Textbook of Medical Physiology*, 9ª Ed., W.B. Saunders Company 1996; 957-970.

119.Chen, J., Sodek, J., Thomas, H.F. e Ranly, D.M.: Dexamethasone Stimulates Luciferase Gene Expression Through the rat Bone Sialoprotein Gene Promoter in Transgenic Mice, *Connective Tissue Res.* 1996; 35 (1-4): 33-39 (87-93).

120.Gronowicz, G., McCarthy, M.B. e Raiz, L.G.: Glucocorticoids Stimulate Resorption in Fetal Rat Parietal Bones In Vitro, *J. Bone Min. Res.* 1990; 5 (12): 1223-1230.

121.Lukert, B.P. e Kream, B.E.: Clinical and Basic Aspects of Glucocorticoid Action in Bone, cap. 38 em: *Principles of Bone Biology*, Bilezikian, J.P., Raizs, L.G. e Rodan, G.A.(Edt.), Academic Press, 1996; 533-548.

122.Raisz, L.G. e Shoukri, K.C.: Pathogenesis of Osteoporose, cap. 9 em : *Handbook of Experimental Pharmacology*, vol. 107, Mundy, J.R., Martin, T.J. (Edt.), Springer-Verlag, 1993: 299-331.

123.Hahn, J.T.: Steroid and Drug-Induced Osteopenia, cap. 61 em: *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*, 2ª Ed., Favus, M.J. (Edt.), Raven Press, 1993; 250-255.

124.Boivin, G., Anthoine-Terrier, C. e Morel G.: Ultrastructural Localization of Endogenous Hormones and Receptors in Bone Tissue: An Immunocytological Approach in Frozen Samples, *Micron.* 1994; 25 (1): 15-27.

125. Hughes-Fulford, Appel, R., Kumegawa, M. e Schmidt, J.: Effect of Dexamethasone on Proliferating Osteoblasts: Inhibition of Prostaglandin E_2 Synthesis, DNA Synthesis, and Alterations in Actin Cytoskeleton, *Exp. Cell Res.* 1992; 203; 150-156.

126. Wong,,G.L.: Basal Activities and Hormonal Responsiveness of Osteoclast-like and Osteoblast-like Bone Cells Are Regulated by Glucocorticoids, *The J. Biol. Chem.* 1979; 254 (14): 6337-6340.

127. Canalis, E., McCarthy, T.L. e Centrella, M.: Growth Factors and Cytokines in Bone Cell Metabolism; *Annu. Rev. Med.* 1991; 42: 17-24.

128. Vernejoul, M.C., Cohen-Solal, M. e Orcel, P.O.: Bone cytokines, *Current Opin. Rheumatol.* 1993; 5: 332-338.

129. Centrella, M., McCarthy, T.L. e Canalis, E.: Growth Factors and Cytokines, cap. 3 em: *Bone: Bone Metabolism and Mineralization*, vol. 4, HAll, B.K. (Edt.), CRC Press, 1992; 47-72.

130. Yoneda, T.: Cytokines in Bone: Local Translaters in Cell-to Cell communications, cap.12 em: *Cellular and Molecular Biology of Bone*, Masaki Noda (Edt.), Academic Press, 1993; 375-412.

131. Mohan, S. e Baylink, D.J.: Bone Growth Factors, *Cli. Orthop. Rel. Res.* 1991; 263: 30-48.

132. Hughes, F.J. e McCulloch, C.A.G.: Stimulation of the Differentiatio of Osteogenic Rat Bone Marrow Stromal Cells by Osteoblast Cultures, *Lab. Invest.* 1991: 64 (5): 617-622.

133. Wong, G.: Isolation and Behavior of Isolated Bone-Forming Cells, cap. 5 em: *Bone: The Osteoblast and Osteocyte*, vol. 1, HAll, B.K. (Edt.), The Telford Press, 1990; 171-192.

134. Majeska, R.J.: Culture of Osteoblastic Cells, cap. 89 em: *Principles of Bone Biology*, Bilezikian, J.P., Raizs, L.G. e Rodan, G.A.(Edt.), Academic Press, 1996; 1229-1237.

135. Freshney, R.I.: Introduction, cap. 1 em: *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, 3ª Ed., Freshney, R.I. (Edt.), Wiley-Liss, 1994; 1-7.

136. Schmidt, R. e Kulbe, K.D.: Long-term cultivation of human osteoblasts, *Bone and Min.* 1993; 20: 211-221.

137. Spelsberg, T.C., Harris, S.A. e Riggs, B.L.: Immortalized Osteoblast Cell Systems (New Human Fetal Osteoblast Systems), *Calcif. Tissue Int.* 1995; 56 (Suppl 1): S18-S21.

138. Lajeunesse, D.: Effect of 17b-estradiol on human osteosarcoma cell line MG-63, *Bone and Min.* 1994; 24: 1-16.

139. Fried, A., Benayahu, D. e Wientroub, S.: Marrow stroma-derived osteogenic clonal cell lines: putative stages in osteoblast differentiation, *J. Cell Phy.* 1993; 155: 472-482.

140. Keeting, P.E., Scott, R.E., Colvard, D.S. *et al*: Development and characterisation of a rapid proliferating, well-differentiated cell line derived from adult human osteoblast.like cells transfected with SV 40 large T antigen, *J. Bone Min. Res.* 1992; 7: 27-132.

141.Harris, S.A., Enger, R.J., Riggs, B.L. *et al*: Development and characterization of a conditionally immortalized human fetal osteoblastic cell line, *J. Bone Min. Res.* 1995; 10: 178-186.

142.Farley, J.R., Hall, S.L., Herring, S., Tarbaux, N.M., Matsuyama, T. e Wergedal, J.E.: Skeletal Alkaline Phosphatase Activity Is an Index of the Osteoblastic Phenotype in Subpopulations of the Human Osteosarcoma Cell Line SaOS-2, *Metabolism* 1991; 40 (7): 664-671.

143.Freshney, R.I.: Disaggregation of the Tissue and Primary Culture, cap. 9 em: *Culture of Animal Cells: A manual of Basic Technique*, 3ª Ed., Freshney, R.I. (Edt.), Wiley-Liss, 1994; 127-147.

144.Friedenstein, J.A., Marrow stromal fibroblasts, *Calcif. Tissue Int.* 1995; 56: S17.

145.Freshney, R.I.: Biology of the Cultured Cell, cap. 2 em: *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, 3ª Ed., Freshney, R.I. (Edt.), Wiley-Liss, 1994; 9-16.

146.Robey, P.G.: Collagenase-treated trabecular bone fragments: a reproducible source of cells in the osteoblastic lineage, *Calcif. Tissue Int.* 1995; 56: S11-S12.

147.Freshney, R.I.: Introduction to Basic Principles, cap. 1 em: *Animal Cell Culture: A Practical Approach*, 2ª Ed., Freshney, R.I (Edt.), IRL Press, 1992; 1-14.

148.Farley, J.R, e Baylink, D.J.: Skeletal Alkaline Phosphatase Activity as a Bone Formation Index in vitro, *Metabolism* 1986; 35(6): 563-571.

149.Benayahu, D., Fried, A., Zipori, D. e Wientroub, S.: Subpopulations of Marrow Stromal Cells Share a Variety of Osteoblastique Markers, *Calcif. Tissue Int.* 1991; 49: 202-207.

150.Bruder, S.P., Horowitz, M.C., Mosca, J.D. e Haynesworth, S.E.: Monoclonal antibodies reactive with human osteogenic cell surface antigens, *Bone* 1997; 21: 225.

151.Joyner, C.J., Bennett, A. e Triffitt, J.T.: Identification and enrichment of human osteoprogenitor cells by using differentiation, *Bone* 1997; 21: 1.

152.Freshney, R.I.: Maintenance of the Culture: Cell Lines, cap. 10 em: *Culture of Animal Cells - A manual of Basic Technique*, 3ª Ed., Wiley-Liss, 1994; 149-159.

153.Freshney, R.I.: Quantification and Experimental Design, cap. 18 em: *Culture of Animal Cells - A manual of Basic Technique*, 3ª Ed., Wiley-Liss, 1994; 267-286.

154.Ciapetti, G., Cenni, E., stea, S. e Pizzoferrato, A.. In vitro evalueation of cell7biomaterial interaction by MTT assay, *Biomaterials* 1993; 14: 359-364.

155.Maniatopoulos, C., Sodek, J. e Melcher, A: Bone formation *in vitro* by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats., *Cell Tissue Res.* 1988; 254: 317-330.

156.Gotoh, Y., Hiraiwa, K. eNaygayama, M.: In vitro mineralization of osteoblastic cells derived from humam bone, *Bone and Min.* 1990; 8: 239-250.

157.Bellows, C.G., Aubin, J.E. e Heersche, J.N.M.: Initiation and progression of mineralization of bone nodules formed in vitro: the role of alkaline phosphatase and organic phosphate, *Bone and Min.* 1991; 14: 27-40.

158.Bellows, C.G., Heersche, J.N.M. e Aubin, J.E.: Inorganic phosphate added exogenously or released from β-glycerophosphate iniciates mineralization of osteoid in vitro, *Bone and Mineral* 1992; 17: 15-29.

159.Chung, C.H., Golub, E.E., Forbes, E., Tokuoka, T. e Shapiro, I.M.: Mechanism of Action of β-Glycerophosphate on Bone Cell Mineralization, *Calcif, Tissue Int.* 1992; 51: 305-311.

160.Bellows, C.G., Aubin, J.E. e Heersche, J.N.M.: Physiological Concentrations of Glucocorticoids Stimulate Formation of Bone Nodules from Isolated Rat Calvaria Cells *in Vitro*, *Endocrinology* 1987; 221: 1985-1992.

161.Wong, M., Rao, L.G., Ly, H., *et al*: Long-term effects of physiologic concentrations of dexamethasone on human bone derived cells, *J. Bone Min. Res.* 1990; 5: 803-813.

162.Cheng, S.L., Yang, J.W., Riffins, L. *et al*: Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells *in vitro*, *Endocrinology* 1994; 134: 277-286.

163.Lowry, O.H., Micromethods for the Assay of Enzymes. II. Specific procedures. Alkaline Phosphatase, *Methods Enzymol.* 1955; 4: 366-381.

164.McGee-Russell S.M.: Histochemical methods for calcium, *J. Histochem Cytochem* 1958; 6:22-42.

165.Lawes, G.: *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis*, James, A.M. (Edt.), John Wiley & Sons, 1987.

166.Panessa-Warren, B.J.: Basic Biological X-Ray Microanalysis, *Scanning Electron Microscopy* 1983; 11: 113-123.

167.Martin, A. e Clynes, M.: Comparison of 5 microplate colorimetric assays for *in vitro* cytotoxicity testing and cell proliferation assays, *Cytotechnology* 1993; 11: 49-58.

168.Berridge, M.V. e Tan, A.S.: Characterization of the Cellular Reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular Localization, Substracte Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron Transport in MTT Reduction, *Arch. Biochem. Biophysics* 1993; 303 (2): 474-482.

168a.Stowe, R.p., Koenig, D.W., Mishra, S.K. e Pierson, D.L.: Non-destrutive and continuos spectrometric measurement of cell respiration using a tetrazolium-formazan microemultion, *J. Microbiol. Methods* 1995, 22: 283-292.

169.Freshney, R.I.: Measurement of Viability and Cytotoxicity, cap. 19 em: *Culture of Animal Cells - A manual of Basic Technique*, 3ª Ed., Wiley-Liss, 1994; 287-307.

170.Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. e Randall, R.J.: Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent, *J. Biol. Chem.* 1951; 193: 265-275

171.West, D.C., Sattar, A. e Kumar, S.: A Simplified in Situ Solubilization Procedure for the Determination of DNA and Cell Nunber in Tissue Cultured Mammalian Cells, *Anal. Biochem* 1985; 147: 289-295.

172.Hayflick, L.: The Limited *In Vitro* Lifetime of Human Diploid Cell Strains, *Exp. Cell Res.* 1965; 37: 614-636.

173.Gundle, R., Joyner, C.J. e Triffitt, J.T.: Human Bone tissue Formation in Diffusion Chamber Culture *In Vivo* by Bone –Derived Cells and Marrow Stromal Fibroblastic Cells, *Bone* 1995; 16 (6): 597-601.

174.Nijweide, P.J.: Mechanisms of Bone Formation *In Vitro*, cap. 7 em: *Bone: The Osteoblast and Osteocyte*, vol. 1, HAll, B.K. (Ed.), The Telford Press, 1990; 303-326.

175.Stein, G.S. e Lian, J.B.: Molecular Mechanisms Mediating Developmental and Hormone-Regulated Expression of Genes in Osteoblasts: An Integrated Relationship of cell Growth and Differentiation, cap. 2 em: *Cellular and Molecular Biology of Bone*, Masaki Noda (Edt.), Academic Press Inc, 1993; 47-95.

176.Beresford, J.N., Joyner, C.J., Devlin, C., et al.: The Effects of Dexamethasone and 1,25-Diidroxyvitamin D3 on Osteogenic Differentiation of Human Stromal Cells In Vitro, *Arch. Oral Biol.* 1994; 39: 941-947.

177.Auf'mkolk, B., Hauschka, P.V. e Schwartz, E.R.: Characterization of Human Bone Cells in Culture, *Calcif. Tissue Int.* 1985; 37: 228-235.

178.Gwinn, I.A.P.: Cell Biology at Interfaces, *J. Mat. Sci.: Mat. Med.* 1994; 5: 357-360.

179.Horton, M.A., Townsend, P. e Nesbitt, S.: Cell Surface Attachment Molecules in Bone, cap. 17 em: *Principles of Bone Biology*, Bilezikian, J.P., Raizs, L.G. e Rodan, G.A. (Edt.), Academic Press, 1996; 217-230.

180.Öbrink, B.: Cell Adhesion and Cell-Cell Contact Proteins, em: *Guidebook to the Extracelular Matrix and Adhesion Proteins*, Kreis, T. e Vale, R. (Edt.), Oxford University Press, 1993; 109-113.

181.Hemler, M.E.: Integrins, em: *Guidebook to the Extracelular Matrix and Adhesion Proteins*, Kreis, T. e Vale, R. (Edt.), Oxford University Press, 1993; 143-145.

182.Takeichi, M.: Cadherins, em: *Guidebook to the Extracelular Matrix and Adhesion Proteins*, Kreis, T. e Vale, R. (Edt.), Oxford University Press, 1993; 116-118.

183.Malik, M.A., Puleo, D.A., Bizios, R. e Doremus, R.H.: Osteoblasts on hydroxyapatite, alumina and bone surfaces *in vitro*: morphology during the first 2h of attachment, *Biomaterials* 1992; 13 (2): 123-128.

184.David-Ferreira, J.F.: Citosqueleto: Composição, Organização e Significado Funcional, cap. 13 em : *Biologia Celular*, Azevedo, C. (Edt.), Lidel-Edições Técnicas, 1994; 189-202.

185.Coelho, M.J.: Análise do Citoesqueleto aplicada ao comportamento celular, Curso: Bone Cell Cultures for Biomedical Applications, Porto, 8-9 Maio 1995.

186.Anderson, H.C., Morris, D.C.: Mineralization, em: *Handbook of Experimental Pharmacology*, vol. 107, Mundy, J.R., Martin, T.J. (Edt.), Springer-Verlag, 1993: 267-298.

187.Garrett, J., Osswald, W. e Guimarães, S.: Vitaminas e Oligoelementos, cap. 56 em: *Terapêutica Medicamentosa e Suas Bases Farmacológicas*: Manual de Farmacologia, vol. II, 3ª Ed., Porto Editora,1997;850-851.

188.Marcus, R. e Coulston, A.M..: Vitaminas Hidrossolúveis: O complexo vitamínico B e o ácido ascórbico, cap. 62 em: *As Bses Farmacológicas da Terapêutica*, 9ª Ed., Hardman, J.G., Limbrid, L.E., Molinoff, P.B., Ruddon, R.W. e Goodman-Gilman, A. (Edt.), McGraw-Hill, 1996; 1161-1164.

189.Masquelier, D., Herbert, B., Hauser, N., Mermillod, P., Schonne, E. e Remacle, C.:: Morphologic Characterization of Osteoblast-like Cell Cultures Isolated from Newborn Rat Calvarial, *Calcif. Tissue Int.* 1990; 47: 92-104.

190.Franceschi, R.T.: The role os ascorbic acid in mesenchymal differentiation, *Nutr. Rev.* 1992; 50: 60-65.

191.Ecarot-Charrier, B., Shepard, N., Charette, G., Grynpas, M. e Glorieux, F.H.: Mineralization in Osteoblast Cultures: A Light and Electron Microscopic Study, *Bone* 1988; 147-154.

192.Nefussi, J.R., Boy-Lefevre, M.L., Bouleckbache, H. e Forest, N.: Mineralization in vitro of matrix formed by osteoblasts isolated by collagenase digestion, *Differentiation* 1985; 29: 160-168.

193.Boskey, A.L., Stiner, D., Doty, S.B., Binderman, I. e Leboy, P.: Studies of mineralization in tissue culture: optimal conditions for cartila calcification, *Bone and Min.* 1992; 16: 11-36.

194. Morais, S., Dias, N., Sousa, J.P., Fernandes, M.H. e Carvalho, G.S.: In vitro osteoblastic differentiation of human bone marrow cells in the presence of metal ions, *J. Biomed. Mat. Res.* 1999; 44: 176-190.

195.Morais, S., Sousa, J.P., Fernandes, M.H., Carvalho, G.S., Bruijn, J.D. e van Blittersswijk, C.A.: Decreased consumption of Ca and P during in vitro biomineralization and

biologically-induced deposition of Ni and Cr in the presence of stainless steel corrosion products, *J. Biomad. Mat. Res.* 1998; 42: 199-212.

196. Morais, S., Sousa, J.P., Fernandes, M.H., Carvalho, G.S., Bruijn, J.D. e van Blittersswijk, C.A.: Effects of AISI 316L corrosion products in *in vitro* bone formation, *Biomaterials* 1998; 19: 999-1007.

197. Lian, J.B. e Stein, G.S.: The development stages of osteoblast growth and differentiation exihibit selective responses of genes to growth factors (TGFb1) e hormones (vitamin D and glucocorticoids), *J. Oral Implant.* 1993; 19: 95-105.

198. Lynch, M.P., Stein, J.L., Stein, G.S. e Lian, J.B.: The influence of type I collagen on the development and maintenance of the osteoblastic phenotype in primary and passaged rat calvarial osteoblasts: modification of expression of genes supporting cell growth, adhesion and extracellular matrix mineralization, *Exp. Cell Res.* 1995; 216: 35-45.

199. Satomura, K., Hiraiwa, K. e Nagayama, M.: Mineralized nodule formation in rat bone marrow stromal cell culture without β-glycerophosphate, *Bone and Min.* 1991; 14: 41-54.

200. Satomura, K. e Nagayama, M.: Ultrastruture of Mineralized Nodules Formed in Rat Bone Marrow Stromal Cell Culture *In Vitro*, *Acta Anat.* 1991; 142: 97-104.

201. Bernier, S.M., Desjardins, J., Sullivan, A.K. e Goltzman, D.: Establishment of an Osseous Cell Line From Fetal Rat Calvarial Using an Immunocytolytic Method of Cell Selection: Characterization of the Cell Line and of Derived Clones, *J. Cel. Physiol.* 1990: 145: 274-285.

202. Khouja, H.I., Bevington, A., Kemp, G.J. e Russell, G.G.: Calcium and Orthophosphate Deposits in vitro do not Imply Osteoblast-Mediated Mineralizaion: Mineralization by Betaglycerophospohate in the Absence of Osteoblasts, *Bone* 1990; 11: 385-391.

203. Marie, P.J.: Cellular and molecular alterations of osteoblast in human disorders of bone formation, *Histol. Histopathol.* 1999; 14: 525-538.

204. Turksen, K. e Aubin, J.E.: Positive and Negative Immunoselection for Enrichment of Two Classes of Osteoprogenitor Cells, *The J. Cell Biol.* 1991; 114 (2): 373-384.

205. Kamalia, N., McCulloch, C.A.G., Tenembaum, H.C. e Limeback, H.: Dexamethasone recruitment of self-renewing osteoprogenitor cells in chick bone marrow stromal cell culture, *Blood* 1992; 79: 320-326.

206. Sterck, J.G.H., Klein-Nulend, J., Burger, E.H. e Lips, P.: 1,25 dihydroxyvitamin D3-Mediated Transforming Growth Factor-β Release Is impaired in Cultured Osteoblasts from Patients with Multiple Pituitary Hormone Deficiencies, *J. Bone Min. Res.* 1996; 11(3): 367-376.

207. Ishibe, M., Nojima, T., Ishibashi, T., Koda, T., Kaneda, K., Rosier, R.N. e Puzas, J.E.: 17β-Estradiol Increases the Receptor Number and Modulates the Action of 1,25 dihydroxyvitamin D3 in Human Osteosarcoma-Derived Osteoblast-Like Cells, *Calcif Tissue Int.* 1995; 57: 430-435.

208. Franceschi, R.T., James, W.N. e Zerlauth, G.: 1α-25-dihydroxyvitamin D_3 specific regulation of grwth, morfology, and fibronectin in human osteosarcoma cell line, *J. Cell Physiol.* 1985; 123: 401-409.

209. Beresford, J.N., Gallagher, I.A. e Russel, R.G.G.: 1,25-dihydroxyvitamin D_3 and human bone-derived cells in vitro: Effects of alkaline phosphatase, type I collagen, and proliferation, *Endocrinology* 1986; 119: 1176-1185.

210. Marie, P.J., Lomri, A., Sabbagh, A. e Basle, M.: Culture and behavior of osteoblastic cells isolated from normal trabecular bone surfaces, *In Vitro Cell Develop. Biol.* 1989; 25: 373-380.

211. Canalis, E.: Effect of hormones and growth factors on alkaline phosphatase activity and collagen synthesis in cultured rat calvariae, *Metabolism.* 1983; 32: 14-20.

212. Wong, G.L., Luben, R.A. e Cohn, D.V.: 1,25-dihydroxycholecalciferol and parathormone: Effects on isolated osteoclast-like and osteoblast-like cells, *Science* 1977; 663-665.

213. Monolagas, S.C., Spiess, Y.H., burton, D.W. e Deftos, L.J.: Mechanism of action of 1,25-dihydroxyvitamin D_3 - induced stimulation of alkaline phosphatase in cultured osteoblast-like cells, *Mol. Cell Endocrinol.* 1983; 333: 27-36.

214. Fritsch, J., Grosse, B., Lieberherr, M. e Balsan, S.: 1,25-dihydroxyvitamin D_3 is required for growth-independent expression of alkaline phosphatase in cultured rat osteoblasts, *Calcif. Tissue Int.* 1985; 37: 639-645.

215. Wergedal, J.E., Matsuyama, T. e Strong, D.O.: Differentiation of normal human bone cells by transforming growth factor-β and of 1,25-$(OH)_2$ vitamin D_3, *Metabolism* 1992; 41: 42-48.

216. Rao, L.G., Wylie, J.N., Kung-Sututherland, M.S. e Murray, T.M.: 17β-Oestradiol enhances the stimulatory effct of 1,25 dihydroxyvitamin D_3 on alkaline phosphatase activity in human osteosarcoma SaOS-2 cells in a differentiation-dependent manner, *J. Endocrinol.* 1996; 148: 181-187.

217. Partridge, N.C., Opie, R.T. e Martin, T.J.: Inhibitory effects of parathiroid hormone on growth of osteogenic sarcoma cells, *Calcif. Tissue Int.* 1985; 37: 519-525.

218. Van der Plas, A., Feyen, J.H.M. e Nijweide, P.J.: Direct effect of parathyroid hormone on the proliferation of osteoblast-like cells; a possible involvement of cAMP, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1985; 129: 918-925.

219.MacDonald, B.R., Gallagher, J.A. e Russell, R.G.G.: Parathyroid hormone stimulated the proliferation of cells derived from human bone, *Endocrinology* 1986; 118: 2445-2449.

220.Reid, I.R., Civitelli, R., Avioli, L.V. e Hruska, K.A.: Parathyroid hormone depresses cytosolic pH and DNA synthesis in osteoblast-like cells, *Am. J. Physiol.* 1988; 255: E9-E15.

221.Kano, J., Sugimoto, T., Fukase, M. e Fujita, T.: The activation of cAMP-dependent protein kinase is directly linked to the regulation of osteoblasts proliferation (UMR-106) by parathyroid hormone, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1991; 177: 365-369.

222.Fang, M.A., Kujubu, D.A. e Hahn, T.J.: The effect of prostaglandin E_2, parathyroid hormone, and epidermal growth factor on mitogenesis, signaling and perimary response genes in UMR 106-01 osteoblast-like cells, *Endocrinology* 1992; 131: 2113-2119.

223.Finkelman, R.D., Mohan, S., Linkhart, T.A., Abraham, S.M., Boussy, J.P. e Baylink, D.Y.: PTH stimulates the proliferation of TE-85 human osteosarcoma cells by a mechamism not involving either increased secretion of IGF-I, IGF-II or TGF-β, *Bone Miner.* 1992; 16: 89-100.

224.Scutt, A., Duvos, C., Lauber, J. e Mayer, H.: Time-dependent effects of parathyroid hormone and prostaglandin E_2 on DNA synthesis by periostal cells from embrionic chick calvaria, *Calcif, Tissue Int.* 1994; 55: 208-215.

225.Pfeilschifter, J., Diel, I., Pilz, U., Brunote, K., Naumann, A. e Ziegler, R.: Mitogenic Responsiveness of Human Bone Cells In Vitro to Hormones And Growth factors Decreases With Age, *J. Bone Min. Res.* 1993; 8(6): 707-717.

226.Fitzpatrick, L.A. e Bilezikian, J.P.: Actions of Parathyroid Hormone, cap. 25 em. *Principles of Bone Biology*, Bilezikian, J.P., Raizs, L.G. e Rodan, G.A.(eds.), Academic Press, 1996; 339-346.

227.Nakatani, Y., Tsunoi, M., Hakeda, Y., Kurihara, N., Fugita, K. e Kumegawa, M.: Effects of parathyroid hormone on cAMP production and alkaline phosphatase activity in osteoclastic clone MC3T3-E1 cells, *Biochem. Biophys. Res.* 1984; 123: 894-898.

228.Yee, J.A., Sutton, J.K., Shew, R.L. e Olansky, L.: Parathyroid hormone stimulation of alkaline phosphatase activity in cultured neonatal mouse calvarial bone cells: involvment of cyclic AMP and calcium, *J. Cell Physiol.* 1986; 128: 246-250.

229.Onishi, T. e Hruska, K.: Expression of $p27^{kip\ 1}$ in osteoblast-like cells during differentiation with parathyroid hormone, *Endocrinology* 1997; 138: 1995-2004.

230.Majeska, R.J. e Rodan, G.A.: Alkaline phosphatase inhibition by parathyroid hormone and isoproterenol in a clonal rat osteosarcoma cell line. Possible mediation by cyclic AMP, *Calcif. Tissue Int.* 1982; 34: 59-66.

231. Bellows, C.G., Ishida, H., Aubin, J.E. e Heersche, J.N.M.: Parathyroid hormone reversibly suppresses the differentiation of osteoprogenitor cells into functional osteoblasts, *Endocrinology* 1990; 127: 3111-3116.

232. Jongen, J.W.J.M., Bos, M.P., Meer, J.M.V.D. e Herrmann-Erlee, M.P.M.: Parathyroid hormone-induced changes in alkaline phosphatase expression in fetal calvarial osteoblasts: differences between rat and mouse, *J. Cell Physiol.* 1993; 155: 36-43.

233. Schmidt, I.U., Dobnig, H. e Turner, R.T.: Intermittent Parathyroid Hormone Treatment Increases Osteoblast Nunber, Steady State Messenger Ribonucleic Acid Levels for Osteocalcin, and Bone formação in Tibial Methaphysis of Hypophysectomized female Rats, *Endocrinology* 1995; 136 (11): 5127-5134.

234. Ishizuya, T., Yokose, S., Hori, M., Noda, T., Suda, T. e Yoshiki, S.: Parathyroid Hormone Exerts Disparate Effects on osteoblastt Differentiation Depending on Exposure Time in rat Osteoblastic Cells, *J. Clin. Invest.* 1997: 99 (12): 2961-2970.

235. Majeska, R.J., Nair, B.C. e Rodan, G.A.: Glucocorticoid regulation of alkaline phosphatase in the osteoblástic osteosarcoma cell line ROS 17/2.8, *Endocrinology* 1985; 116: 170-179.

236. Kasperk, C., Cchneider, U., Sommer, U., Niethard, F. e Ziegler, R.: Differential Effects of Glucocorticoids on Human Osteoblastic Cell Metabolism *In Vitro*, *Calcif. Tissue Int.* 1995; 57: 120-126.

237. Chen, T.L. e Feldman, D.: Glucocorticoid potentiation of the 3',5'-monophosphate response to parathyroid hormone in cultured rat bone cells, *Endocrinology* 1978; 102: 589-596.

238. Wong, G.L., Lukert, B.P. e Adams, J.S.: Glucocorticoids increase osteoblast-like bone cell response to $1,25(OH)_2D_3$, *Nature* 1980; 285: 254-257.

239. Chaudhary, L.R. e Avioli, L.V.: Dexamethasone regulates IL-1β and TNF-α-Induced Interleukin-8 Production in Human Bone Marrow Stromal and Osteoblast-like Cells, *Calcif. Tissue Int.* 1994; 55: 16-20.

240. Benayahu, D., Kletter, Y, Zipori, D. e Wientroub, S.: Bone marrow-derived stromal cell line expressing osteoblastic phenotype in vitro and osteogenic capacity in vivo, *J. Cell Physiol.* 1989; 140: 1-7.

241. Simmons, D.J., Seitz, P., Kidder, P., Klein, G.L., Waeltz, M., Gundberg, C.M., Tabuchi, C., Yang, C. e Zhang, R.W.: Partial characterization of rat marrow stromal cells, *Calcif. Tissue Int.* 1991; 48: 326-334.

242.Leboy, P.S., Beresford, J.N., Devlin, C. e Owen, M.E.: Dexamethasone Induction of Osteoblastic mRNAs in Rat Marrow Stromal Cell Cultures, *J. Cell Physiol.* 1991; 146: 370-378.

243.Shalhoub, V., Conlon, D. Tassinari, M., Quinn, C., Partridge, N., Stein, G.S. e Lian, J.B.: Glucocorticoids promote development of the osteoblast phenotype by selectively modulating expression of cell growth and differentiation-associated genes, *J. Cell Biochem.* 1992; 50: 425-440.

244.Fromigué, O., Marie, J.P. e Lomri, A.: Differencial effects of tranforming growth factor β2, dexamethasone e 1,25 dihydroxyvitamin D on human bone marrow stromal cells, *Cytoline* 1997; 9: 613-623.

245.Centrella, M., Rosen, V., Wozney, J.M., Casinghino, S.R. e McCarthy, T.L.: Opposing Effects by Glucocorticoid and Bone Morphogenetic Protein-2 in Fetal Rat Bone Cell Cultures, *J. Cell. Biochem.* 1997; 67: 527-540.

246.Takada, J., Chevalley, T., Baylink, D.J. e Lau, K.H.W.: Dexamethasone Enhances the Osteogenic Effects of Fluoride in Human TE85 Osteosarcoma Cells In Vitro, *Calcif. Tissue Int.* 1996; 58: 355-361.

247.Mundy, G.R.: Hormonal Factors Which Regulate Bone resorption, Cap. 5 em: *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 107, Mundy, G.R. e Martin, T.J. (eds.), Springer-Verlag, 1993; 215-247.

248.Bloomfield, M.M.: The Remaining Twuenty-one Elements, cap. 18 em: *Chemistry and the Living Organism*, 4ª ed., Jhon Wiley & Sons 1987; 425-449.

249.Kleerekoper, M.: "Fluoride and the Skeleton", cap. 75 em: *Principles of Bone Biology*, Bilezikian, J.P., Raisz, L.G. e Rodan, G.A. (Edt.), Academic Press; 1996, 1053-1062.

250.Ohta, T., Wergedal, J.E., Matsuyama, T., Baylink, D.J. e William Lau, K.H.: Phenytoin and fluoride Act in Concert to Stimulate Bone Formation and to Increase Bone Volume in Adult Male Rats, *Calcif. Tissue Int.* 1995; 56: 390-397.

251.Favus, M.J.: Bone Density Reference Data, em: *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*, Raven Press, 2ª Ed., 1993; 426-430.

252.Boivin, G., Chapuy, M.C., Baud, C.A. e Meunier, P.J.: Fluoride Content in Human Iliac Bone: Results in Control, Patients with Fluorosis, and Osteoporotic Patients Treated with Fluoride, *J. Bone Min. Res.*, 1988; 3 (5): 497-502.

253.Rich, C. e Einsinck, J.: Effect of Sodium Fluoride on Calcium Metabolism of Humam Beings, *Nature* 1961; 191: 184-185.

254.Concensus Development Conference: Diagnosis, Prophylaxis and Treatment of Osteoporosis. *Am. J. Med.* 1993; 94: 646-650.

255.Meunier, P.J.: Introduction, em: Fluoride and Calcium Combined Therapy for Osteoporosis, Proceedings of a satellite symposium helt at The First European Conference on Osteoporosis, França, 1992; 7.

256.Libanati, C.R., Farley, S.M., Resch, H. e Baylink, D.J.: Fluoride therapy for osteoporosis, em: Fluoride and Calcium Combined Therapy for Osteoporosis, Preceedings of a satellite symposium helt at The First European Conference on Osteoporosis, França, 1992; 53-64.

257. Boivin, G., Grousson, B. e Meunier, P.J.: X-ray Microanalysis of Fluoride Distribution in Microfracture Calluses in Cancellous Iliac Bone from Osteoporotic Patients Treated with Fluoride and Untreated, *J. Bone Min. Res.* 1991; 6 (11): 1183-1190.

258.Pouillès, J.M., Trémollières, F. e Ribot, C.: Effets Comparés du Fluorure de Sodium et de L'hormonothérapie Substititive sur le Métabolisme Osseux de la Femme Osteopénique à Haut Risque Fracturaire, *Rev. Rhum. Mal. Ostéoartic.* 1992; 59 (2): 103-113.

259.Riggs, B.L.: Fluorid revisited, em: Fluoride and Calcium Combined Therapy for Osteoporosis, Preceedings of a satellite symposium helt at The First European Conference on Osteoporosis, França, 1992; 35-39.

260.Kleerekoper, M. e Balena, R.R.: Fluoride and Osteoporosis, *Ann. Rev. Nutr.* 1991; 11: 309-324.

261.Bonjour, J.P., Caverzasio, J. e Rizzoli, R.: Effect of fluoride on bone cells, em: Fluoride and Calcium Combined Therapy for Osteoporosis, Preceedings of a satellite symposium helt at The First European Conference on Osteoporosis, França, 1992; 9-12.

262.Rizzoli, P. e Bonjour, J.P.: Practical aspects of treatment with monofluorophosphate, em: Fluoride and Calcium Combined Therapy for Osteoporosis, Preceedings of a satellite symposium helt at The First European Conference on Osteoporosis, França, 1992; 41-44.

263.Boivin, G. e Meunier, P.J.: Effects of fluoride on bone mineral, em: Fluoride and Calcium Combined Therapy for Osteoporosis, Preceedings of a satellite symposium helt at The First European Conference on Osteoporosis, França, 1992; 13-19.

264.Grynpas, M.D. e Cheng, P.T.: Fluorid reduces the rate of dissolution of bone, *Bone Miner.* 1988; 5(1): 1-9.

265.Grynpas, M.D.: Fluoride effects on bone crystals, *J. Bone Min. Res.* 1990; 5 (suppl 1): S169-S175.

266.Boink, A.B.T.J., Wemer, J., Meulenbelt, J., Vaessen, H.A.M.G. e Wildt, D.J.: The Mechanism of Fluoride-Induced Hypocalcaemia, *Human & Exp. Tox.* 1994; 13: 149-155.

267.Riggs, B.L., O'Fallon, W.M., Lane, A. et al: Clinical Trial of Fluoride Therapy in Postmenopausal Osteoporotic Women: Extended Observations and Additional Analysis, *J. Bone Miner. Res.* 1994; 9 (2): 265-275.

268.Cheng, P.-T., Bader, S.M. e Grynpas M.D.: Biphasic Sodium Fluoride Effects on Bone and Bone Mineral: A Review, *Cells and Materials* 1995; 5 (3): 271-282.

269.Farley, J.R., Tarbaux, N., Hall, S. e Baylink, D.J.: Mitogenic Action(s) of Fluoride on Osteoblast Line Cells: Determinants of the Response *In Vitro*, *J. Bone Min. Res.* 1990; 5 (Suppl 1): S107-S113.

270.Farley, J.R., Wergedal, J.E. e Baylink, D.J.: Fluoride Directly Stimulates Proliferation and Alkaline Phosphatase Activity of Bone-Forming Cells, *Science* 1983; 222: 330-332.

271.Hall, B.K.: Sodium Fluoride as an Initiator of Osteogenesis from Embryonic Mesenchyme In Vitro, *Bone* 1987; 8: 111-116.

272.Khokher, M.A. e Dandona, P.: Fluoride Satimulates [^{3}H]Thymidine Incorporation and Alkaline Phosphatase Production by Human Osteoblasts, *Metabolism* 1990; 39 (11): 1118-1121.

273.Wergedal, J.E., Lau, K.H.W. e Baylink, D.J.: Fluoride and Bovine Bone Extract Influence Cell Proliferation and Phosphatase Activities in Human Bone Cell Cultures, *Clin. Ortho. Trel. Res.* 1988; 333: 274-282.

274.Koop, J.B. e Robey, P.G.: Sodium Fluoride Does Not Increase Human Bone Cell Proliferation or Protein Synthesis In Vitro, *Calcif. Tissue Int.* 1990; 47: 221-229.

275.Chavassieux, P., Chenu,C., Valentin-Opran, A., Delmas, P.D., Boivin, G., Chapuy, M.C. e Meunier, P.J.. In Vitro Exposure to Sodium Fluoride Does Not Modify Activity or Proliferation of Human Osteoblastic Cells in Primary Cultures", *J. Bone Min. Res.* 1993; 8 (1): 37-44.

276.Chavassieux, P., Boivin, G., Serre, C.M. e Meunier, P.J.: Fluoride Increases Rat Osteoblast Function and Population after In Vivo Administration but not after In Vitro Exposure, *Bone* 1993; 14: 721-725.

277.Oreffo, R.O.C., Wells, N. e Johnstone, D.: Sodium fluoride does not stimulate mammalian osteoblast-like cells, Workshop on Osteobiology, Cell-Matrix Interactions in Health and Disease, Itália, 2-5 de Junho de 1991; 150.

278.Bellows, C.G., Heersche, J.N.M. e Aubin, J.E.: The Effects of Fluoride on Osteoblast Progenitors *In Vitro*, *J. Bone Min. Res.* 1990; 5 (suppl 1): S101-S105.

279.Marie, P.J., Vernejoul, M.C. e Lomri, A.: Fluoride induced stimulation of bone formation is associated with increased DNA Synthesis by osteoblastic cells in vitro, *J. Bone Min. Res.* 1990; 5(5): S140-.

280.Marie, P.J., Vernejoul, M.C. e Lomri, A.: Stimulation of Bone Formation in Osteoporosis Patients Treated with Fluoride Associated with Increased DNA Synthesis by Osteoblastic Cells In Vitro, *J. Bone Min. Res.* 1992; 7 (1): 103-113.

281.Wu, L., Yoon, H.K., Baylink, D.J., Graves, L.M. e Lau, K.H.W.: Fluoride at Mitogenic Doses Induces a Sustained Activation of $P44^{mapk}$, but not $p42^{mapk}$, in Human TE85 Osteosarcoma Cells, *J. Clin. End. Met.* 1997; 82(4): 1126-1135.

282.Ammann, P., Rizzoli, R., Caverzasio, J. e Bonjour, J.-P.. Fluoride Potentiates the Osteogenic Effects of IGF-1 in Aged Ovariectomized Rats, *Bone* 1998; 22 (1): 39-43.

283.Lau, K.H.W., Farley, J.R., Freeman, T.K. e Baylink, D.J.: A proposed mechanism of the mitogenic action of fluoride on bone cells: inhibition of the activity of an osteoblastic acid phosphatase, *Metabolism.* 1989; 38 (9): 858-868.

284.Bellows, C.G., Aubin, J.E. e Heersche, J.N.M.: Differential Effects of Fluoride During Initiation and Progression of Mineralization of Osteoid Nodules Formed *In Vitro*, *J. Bone Min. Res.* 1993; 8 (11): 1357-1363.

285.Afonso, A.: *Interacção entre Biomateriais e Tecido ósseo*, Dissertação de Doutoramento, Faculdade de Medicina Dentária, Universidade do Porto 1998.

286.Bravo, I.: *Avaliação da Biocompatibilidade de ligas metálicas Ortopédicas: Estudos In Vitro e In Vivo*, Dissertação de Doutoramento, Universidade de Aveiro 1997.

287.Bloch,B.: The International Standards Organization Technical Committee on Surgical Implants, em *Biocompatibility of Co-CR-Ti Alloys*, Hildbrand, H. e Champy, M. (Edt.), Plenum Press,1988a.

288.Williams, D.F., Black, J. e Doherty, P.J.: Second Consensus Conference on Definitions in Biomaterials, em: *Advances in Biomaterials: Biomaterial-Tissue Interfaces*, vol 10, Doherty, P.J., Williams, R.L., Williams, D.F. et al (Edt.), Elsevier Science Publishers, 1992; 525-533.

289.Morais, S.: *Development and Applications of Electroanalytical Procedures In In Vitro Cytocompatibility Studies of 316L Stainless Steel*, Dissertação de Doutoramento, Faculdade de Engenharia, Universidade do Porto 1997.

290.Osborn, J.F., Neewesely, H.: em: *Dental Implants*, Heimke, G. (Edt.), Carl Hansen Verlag, 1980; 111-123.

291. Cavalheiro, J., Branco, R., Vasconcelos, M., Oliveira, A., Afonso, A., Sousa, H.: Prevenção da reabsorção do osso alveolar com utilização de grânulos de hidroxiapatite, *Stoma* 1991; 18:7-15.

292. Cavalheiro, J., Branco, R., Vasconcelos, M.: Modified hydroxyapatite granules and plaster as binder: *In vitro* and clinical tests, em *Bioceramics*, vol 4, Bonfield, W., Hastings, G.W., Tanner, K.E. (Edt.), Butterworth-Heinemann, 1991; 205-211.

293. Vasconcelos, M., Afonso, A., Branco, R., Cavalheiro, J.: Diferentes mecanismos de reconstrução do tecido ósseo utilizando grânulos de hidroxiapatite, *Rev. Port. de Est. e Cir. Maxilofac.* 1993; 34: 254-255.

294. Black, J.: Orthopedic Biomaterials in Research and Practice, Otway, M. (Edt.), Churchill Livingstone, 1988; 163-266.

295. Cigata, A., De Santis, G., Gatti, G., Zaffe, D.: In vivo behaviour of a high performance duplex stainless steel, *J. Appl. Biomat.* 1993; 4:39-46.

296. Williams, D.F.: Consensus and Definitions in Biomaterials, em: *Advances in Biomaterials – Implant Materials in Biofunction*, Putter, C., DeLange, G.L., Groot, K. et al. (Edt.), vol 8, Elsevier Science Publishers, 1988; 11-16.

297. Vince, D.G., Hunt, J.A., Williams, D.F.: Quantitative assessment of the tissue response to implanted biomaterials, *Biomaterials* 1991; 12:731-736.

298. Williams, D.F.: Objectivity in the evaluation of biological safety of medical devices and biomaterials, *Medical Device Technoloy* 1991; 44-48.

299. Williams, D.F.: Biocompatibility: performance in surgical reconstruction of man, *Interdiscip. Sci. Rev.* 1990; 15: 20-33.

300. Harmand, M.F.: Human cell culture and characterization of cell/biomaterial interface, *Clin. Mater.* 1992; 11: 145-150

301. International Standardization Organization (ISO) 10993-5, 1992.

302. American Society for Testing and Materials (ASTM) F813-83), 1983.

303. British Standard (BS) 5736, 1988.

304. Association Française de Normalisation (AFNOR), NF S 90-702, 1988.

305. Pizzoferrato, A., Ciapetti, G., Stea, S., Cenni, E., Arciola, C.R., Granchi, D. e Savarino, L: *Clin. Mater* 1994; 1:9-.

306. Muster, D.: Biomateriaux et biomateriels en chirurgie osseuse et dentaire (1ª partie). Encyclopedie Medico-Chirurgicale - Stomatologie, vol 22-014-F-10, Editions Techniques, 1993; 2-26.

307.Ohgushi, H., Dohi, Y., Yoshikawa, T. *et al.*: Osteogenic differentiation of cultured marrow stromal stem cells on the surface of bioactive glass ceramics, *J. Biomed. Mat. Res.* 1996; 32: 341-348.

308.Itakura, Y., Tajima, T., Ohoke, S., Matsuzawa, J., Sudo, H., Yamamoto, S.: Osteocompatibility of platinium-plated titanium assessed in vitro, *Biomater.* 1989; 10: 489-493.

309.Ong, J.L., Carnes, D.L., Cardenas, H.L., Cavin, R.: Surface roughness of titanium on bone morphogenetic protein-2 treated osteoblasts cells in vitro, *Implant. Dent.* 1997; 6: 19-24.

310.Berstein, A., Bernauer, I., Marx, R. e Geurtsen, W.: Human cell culture studies with dental metallic materials, *Biomater.* 1992; 13: 98-100.

311.Naji, A. e Harmand, M.F.: Study of the effect of the surface state on the cytocompatibility of a Co-Cr alloy using human osteoblasts and fibroblasts, *J. Biomed. Mat. Res.* 1990; 24: 861-871.

312.Lowenberg, B.F., Pilliar, R.M., Aubin, J.E., Sodek, J. e Melcher, A.H.: Cell attachement of human gingival fibroblasts in vitro to porous-surfaced titanium alloy disc coated with collagen and plated-derived growth factor, *Biomater.* 1988; 9: 302-309.

313.Smith, D.C.: Dental implants: Materials and design considerations, *Int. J. Prosthodont.* 1993; 6: 106-117.

314.Scwartz, Z., Martin, J.Y., Dean, D.D., Simpson, J., Cochran, D.L. e Boyan, B.D.: Effect of titanium surface roughness on condrocyte proliferation, matrix, production and differentiation depends on the state of cell maturation, *J. Biomed. Mat. Res.* 1996; 30: 145-155.

315.Sautier, J.M., Nefuss, J.R. e Forest, N.: Ultrastructural study of bone formation on synthetic hydroxyapatite in osteoblast cultures, *Cells and Materials* 1991; 1: 209-217.

316.Brook, I.M., Craig, G.T. e Lamb, D.J.: In vitro interaction between primary bone organ cultures, glass-ionomer cements and hydroxyapatite/tricalcium phosphate ceramics, *Biomaterials* 1991; 12: 179-186.

317.DiCarlo, E., Bullough, P.: The biological responses to orthopedic implants and their wear debris, *Clinical. Materals* 1992; 9:235-260.

318.Pohler, O.E.M.: Degradation of metallic orthopedic implants, em: *Biomaterials in Reconstructive Surgery*, Rubin, L.R. (Edt.), C.V. Mosby, 1983; 158-228.

319.Barbosa, M.A.: Surface layers and the reactivity of metallic implants, em: *Biomaterials, Hard Tissue Repair and Replacement*, Muster, D. (Edt.), Elsevier, 1992; 257-283.

320.Pilliar, R.M.: Porous-surface metallic implants for orthopedic aplications, *J. Biomed. Mater. Res.* 1987; 21(A1): 1-33 .

321.Bobyn, J.D., Tanzer, M., Drygier, J.J., Du Joune, A.R. e Brooks, C.E.: Concerns with modularity in total hip arthroplasty, *Clin. Orthop.* 1994; 298: 27-36.

322.Merritt, K. e Brown, S.A.: em: Corrosion and Degradation of Implant Materials: second symposium, ASTM STP 859, Fraker, A.C. e Griffin, C.D. (Edt.), American Society for Testing and Materials, Philadelphia, 1985; 195.

323.Merrit, K., Margevicius, R.W. e Brown, S.A.: Storage and elimination of titanium, aluminium and vanadium salts, *in vitro*, *J. Biomed. Mat. Res.* 1992; 26: 1503-1515.

324.Bartolozzi, A. e Black, J.: Chromium concentrations in serum, blood clot and urine from patients followwing totalhip arthroplasty, *Biomater.* 1985; 6: 2-8.

325.Dorr, L.D., Bloebaum, R. , Emanuel, J. e Meldrum, R.: Histologic, biochemical and ion analysis of tissue and fluids retrieved during total hip arthroplasty, *Clin. Orthop.* 1990; 261: 82-95.

326.Evans, E.M., Freeman, M.A.R., Miller, A.J. e Vernon-Roberts, B.: Metal sensitivity as a cause of bone necrosis and loosening of the prothesis in total joint replacement, *J. Bone Jt. Surg.* 1974; 56B: 626-642.

327.Deutman, R., Mulder, T.J., Brian, R. e Nater, J.P.: Metal sensitivity before and after total hip arthroplasty, *J. Bone Jt. Surg.* 1977; 59A: 862-865.

328.Huo, M.H., Salvati, E.A., Lieberman, J.R., Betts, F. e Bansal, M.: Metallic debris in femoral endosseolysis in failed cemented total hip arthroplasties, *Clin. Orthop.* 1992; 276: 157-168.

329.Pereira, M.L., Abreu, A.M., Sousa, J.P. e Carvalho, G.S.: Chromium accumulation and ultrastructural changes in the mouse liver caused by stainless steel corrosion pruducts, *J. Mat. Sci.: Mat. Med.* 1995; 6: 523-527.

330.Tracana, R., Pereira, M., Abreu, A.M., Sousa, J.P. e Carvalho, G.S.: Stainless steel corrosion products cause alterações on mouse spleen cellular populations, *J. Mat. Sci. : Mar. Med.* 1995; 6: 56-61.

331.Black, J.: Biological Performance of Materials, Dekker, M. (Edt.), N.Y., 1992.

332.Michel, R., Loer, F., Reich, M., Zilkens, J.: Phenomenology of the trace element burdening of the human organism by the in-body corrosion of Co-Cr-Ni alloys as revealed by neutron activation analysis, em: *Biocompatibility of Co-Cr-Ni alloys*, Hildebrand, H. e Champy, M. (Edt.), Plenum Press 1988; 57-95.

333.Hennig, F., Raithel, H., Schaler, K. e Dohler, J.: Nickel, chromium and cobalt concentrations in human tissue and body fluids of hip prostheses patients, *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.* 1992; 6: 239-243.

334.Jacobs, H.; Skipor, A., Urban, R., Manion, L. e Black, J.: Serum and urine metal content in patients with fretting corrosion of modular femoral THR components, *Trans. Soc. Biomater.* 1994; 17: 320-327.

335.Park, J.: Metllic Biomaterals, em: *The Biomedical Engineering Handbook*, Bronzine, J., (Edt.), CRC Press, 1995; 537-551.

336.Xulim, S., Atsuo, I., Hoshino, A.: Fretting corrosion resistance and fretting corrosion product cytocompatibility os ferric stainless steel, *J. Biomed. Mater Res.* 1997; 34: 9-14.

337.Smith, G.K. e Black, J.: em: Corrosion and Degradation of Implant Materials: second symposium, ASTM STP 859, Fraker, A.C. e Griffin, C.D. (Edt.), Philadelphia, American Society for Testing and Materials, 1985; 223.

338.Bravo, I., Sousa, J.P., Carvalho, G.S. e Barbosa, M.: Metals electrochemically dissolved in human serum inhibit T-lymphocyte function, em: *Biommaterial-Tissue Interfaces*, Doherty, P.J. (Edt.), "Advances in Biomaterials", vol 10, Amsterdam: Elsevier science Publishers, 1992; 7-11.

339.Carvalho, G.S., Castanheira, M., Diogo, I., Abreu, A.M., Sousa, J.P., Loon, J.A. e Van Blitterswijk, C.A.: Inhibition and stimulation of enzimatic activities of human fibroblasts by corrosion products and metal salts, *J. Mat. Sci.: Mat. Med.* 1996; 7: 77-83.

340.Puleo, D.A. e Huh, W.: Acute toxicity of metal ions in cultures of osteogenic cells derived from bone marrow stromal cells, *J. Appl. Biomater.* 1995; 6: 109-116.

341.Thompson, G.J. e Puleo, D.A.: Effects of sublethal metal ion concentration on osteogenic cells derived from bone marrow stromal cells, *J. Appl. Biomater* 1995; 6: 249-258.

342.Tomás, H., Carvalho, G.S., Fernandes, M.H., Freire, A.P. e Abrantes, L.M.: Effects of Co-Cr corrosion products and corresponding separate metal ions on human osteoblast-like cell cultures, *J. Mat. Sci.: Mat. Med.* 1996; 7: 291-296.

343.Tomás, H., Carvalho, G.S., Fernandes, M.H., Freire, A.P. e Abrantes, L.M.: The use of rabbit, rat or human bone marrow derived cells for cytocompatibility evaluation of metallic elements, *J. Mat. Sci.: Mat. Med.* 1997; 8: 233-238.

344.Sun, Z.L., Wataha, J.C. e Hanks, C.T.: Effect of metal ions on osteoblastc-like cell metabolism and differentiation, *J. Biomed. Mater. Res.* 1997; 34: 29-37.

345.Morais, S., Sousa, J.P., Fernandes M.H. e Carvalho, G.S.: "In vitro mineralization by osteoblast-like cells. Retardation of tissue mineralization by metal salts", *Biomater.* 1998; 19: 13-21.

346.Rae, T.: *J. Bone Jt. Surg.* 1981; 63-B: 435-.

347.Webb, M. e Weinzierl, S.M.: Uptake of nickel from its complexes with proteins and other ligands by mouse dermal fibroblasts in vitro, *Brit. J. Cancer* 1972; 26: 292-298.

348.Katz, S.A. e Salem, H.: *J. Appl. Toxicology* 1993; 13: 217-.

349.Merrit K., Wortman, R.S., Millard, M. e Brown, S.A.: *Biomat. Med. Dev. Artif. Organs* 1983; 11: 115-.

350.Lucas, L.C., Beardes L.J. e Lemons, J. E.: em: *Corrosion and Degradation of Implant Materials: second symposium*, ASTM STP 859, Fraker, A.C. e Griffin, C.D. (Edt.), American Society for Testing and Materials, Philadelphia 1985; 208.

351.Bianchi, V., Toso, R.D. e Debetto, P.: *Toxicology* 1980; 17: 219-.

352.Ducheyne, P.: Bioceramics: Materials Characteristics versus in vivo bahavior., *J. Biomed. Mat. Res.* 1987; 21: 219-236.

353.Ono, I., Gunji, H., Kaneko, F., Numazawa, S., Kodama, N. e Yosa, S.: Treatment of extensive cranial bone defects using computer-designed hydroxyapatite ceramics and periostal flaps, *Plast. Reconstr. Surg.* 1993; 92: 819-830.

354.Gross, K.A., Berndt, C.C., Goldschlag, D.D. e Iacono, V.J.: In vitro changes of Hydroxyapatite coatings, *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 1997: 12: 589-597.

355.Blitterswijk, C.A., Grott, J.J., Kuypers, W.: Hydroxyapatite in the infected middle ear, em: Proceedings of the First International Symposium "Biomaterials in Otology", Leiden, The Netherlands, 1983.

356.Lutgert, H.W., Blitterswijk, C.A. e Grote, J.J.: Reconstruction of the external ear canal and middle ear with hydroxyapatite implants, em: *Advances in Biomaterials – Implant Materials in Biofunction*, Putter, C., DeLange, G.L., Groot, K. *et al* (Edt.), vol. 8, Elsevier Science Publishers, 1988; 93-97.

357.Blitterswijk, C.A., Grotte, J.J., Lutgert, H.W. e Koerten, H.K.: Biological performance of hydroxyapatite as otologic biomaterial: An evaluation of clinically applied hydroxyapatite, em: *Advances in Biomaterials – Implant Materials in Biofunction*, Putter, C., DeLange, G.L., Groot, K. et al (Edt.), vol. 8, Elsevier Science Publishers, 1988; 221-225.

358.Portmann., M.: Les biomatérieux en otology, *Rev. de Laryngologie* 1991; 112 (4): 301-303.

359.Mehlisch, D.R., Leider, A.S. e Roberts, W.E.: Histologic evaluation of the bone/graft interface after mandibular augmentation with hydroxyapatite/purified fibrillar collagen composite implants, *Oral Surg. Oral. Med. Oral Pathol.* 1990; 70: 685-692.

360.Biesbrock, A.R., Edgerton, M.: Evaluation of the clinical predictability of hydroxyapatite –coated endosseous dental implants: A review of the literature, *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 1995; 10: 712-720.

361.Garcia, R. e Doremus, R.H.: Electron microscopy of the bone-hydroxyapatite interface from a human dental implant, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 1992; 3: 154-156.

362.Dattilo, D.J., Misch, C.M. e Arena, S.: Interface analysis of hydroxyapatite-coated implants in a human vascularized iliac bone graft, *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 1995; 10: 405-409.

363.Gottlander, M., Albrektsson, T. e Carlsson, L.V.: A histomorphometric study of unthreaded hydroxyapatite-coated and titanium-coated implants in rabbit bone, *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 1992; 7: 485-490.

364.Bloebaum, R.D., Bachus, K.N., Momberger, N.G. e Hofmann, A.A.: Mineral apposition rates of human cancellous bone at the interface of porous coated implants, *J. Biomed. Mat. Res.* 1994; 28: 537-544.

365.Bloebaum, R.D., Bachus, K.N., Rubman, M.H. e Dorrq, L.D.: Postmortem comparativ analysis of titanium and hydroxyapatite porous-coated femoral implants retrieved from the same patient, *J. Arthroplasty* 1993; 8: 203-211.

366.Kenney, E.B., Lekovic,V., Carranza, FA, Dimitrijeric, B., Han, T. e Takei, H.: A comparative clinical study of solid and granular porous hydroxyapatite implants in human periodontal osseous defects, *J.Biomed. Mat. Res.* 1988; 22: 1233-1243.

367.Inoue, O., Ibaraki, K., Shimabukuro, H. e Shingaki, Y.: Packing with high-porosity hydroxyapatite cubes alone for the treatment of simple bone cyst, *Clin. Orthop.* 1993; 293: 287-292.

368.Yamamura, K., Iwata, H. e Yotsuyanagi, T.: Synthesis of antibiotic-loaded hydroxyapatite beads and in vitro drug release testing, *J. Biomed. Mat. Res.* 1992; 26: 1053-1064.

369.Downes, S., Clifford, C.J., Scotchford, C. e Klein, C.P.A.T.: Comparison of the release of growth hormone from hydroxyapatite, heat-treated hydroxyapatite, and fluoroapatite coatings on titanium, *J. Biomed. Mat. Res.* 1995; 29: 1053-1060.

370.Hamanishi, C., Kitamoto, K., Tanaka, S., Otsuka, M., Doi, Y. e Kitahashi, T.: self-setting TTCP-DCPD apatite cement for releade of Vancomycin, *J. Biomed. Mat. Res. (Appl. Biomat.)*1996; 33: 139-143.

371.Muster, D.: Biomateriaux et biomateriels en chirurgie osseuse et dentaire (2ª partie). Encyclopedie Medico-Chirurgicale-Stomatologie, vol. 22-014-F-15, Editions Techniques, 1993; 2-26.

372.Donath, K.: A comparison of tissue-implant interface of osseous integrated titanium and hydroxyapatite coated titanium dental implants, em: *Progress in Biomedical Engineering – Oral Implantology and Biomaterials*, Kawahara, H. (Edt.), vol. 7; Elsevier Science Publishers, 1989; 193-196.

373.Hong, L., Klein, C.P.A.T. e Groot, K.: Histological observations of coated and prestressed dental implants under flexible or rigid loading conditions, *Biomaterials* 1994; 15: 390-395.

374.Hayashi, K., Inadome, T., Mashima, T. e Sugioka, Y.: Comparison of bone-implant interface shear strength of solid hydroxyapatite and hydroxyapatite-coated titanium implants, *J. Biomed. Mat. Res.* 1993; 27: 557-563.

375.Söballe, K., Hansen, E.S., Brocksted-Rasmussen, H., et al.: Gap healing enhanced by hydroxyapatite coating in dogs, *Clin. Orthop.* 1991; 272: 300-307.

376.Cavalheiro, J.: Hidroxiapatite modificada: um sucedâneo do tecido ósseo, *Quintessência* 1990; 1: 69-75.

377.Cavalheiro, J., Branco, R., Peres, F. e Vasconcelos, M.: Incremento de biorreactividade da hidroxiapatite pela modificação da sua composição química, *Stoma* 1992; 22: 41-47.

378.Cavalheiro, J., Vasconcelos, M., Afonso, A. e Branco, R.: Influência da composição química e da estrutura dos grânulos de hidroxiapatite na regeneração do tecido ósseo, *Rev. Port. Implantologia* 1994; 1: 35-38.

379.Cavalheiro, J., Afonso, A., Vasconcelos, M., Branco, R. e Peres, F.: Estudos *In Vivo* da Regeneração do Tecido ósseo com a Osteopatite e Gesso de Paris, *STOMA* 1994; 30: 15-17.

380.Peres, F., Branco, R., Afonso,A., Vasconcelos, M. e Cavalheiro, J.: Influência da dimensão das partículas na reconstrução do tecido ósseo: Avaliação por biópsia, *Rev. Port. de est. e Cir. Maxilofac.* 1993; 34: 254.

381.Ribeiro da Silva, J.P., Afonso, A., Vasconcelos, M., Branco, R., Cavalheiro, J. e Gameiro dos Santos, A.: New reconstruction biomaterials in the surgery of the middle ear – an animal experiment, *Revue Laryngologie, Rhinologie et Otologie*, em publicação.

382.Van Blitterswijk, C.A., Hesseling, S.C., Grote, J.J., Koerten, H.K. e de Groot, K.: The biocompatibility of hydroxyapatite ceramic: a study of retrieved human middle ear implants, *J. Biomeb. Mater. Res.* 1990; 24: 433-453.

383.Daculsi, G., LeGeroz, R.G., Heughebaert, M. e Barbieux, I.: Formation of carbonate-apatite crystals after implantation of calcium phosphate ceramics, *Calcif. Tissue Int.* 1990; 46: 20-27.

384.Ohgushi, H., Tamai, S. e Tabata, S.: Osteogenic differentiation of marrow stromal stem cells in porous hydroxyapatite ceramics, *J. Biomed. Mater. Res.* 1993; 27: 1401-1407.

385.Bagambisa, F.B., Joos, U. e Schilli, W.: Mechanisms and structure of the bond between bone and hydroxyapatite, *J. Biomed. Mater. Res.* 1993; 27: 1047-1055.

386.Seitz, T.L., Noonan, K.D., Hench, L.L. e Noon, N.E.: Effect of fibronectin on the adhesion of an established cell line to a surface reactive biomaterial, *J. Biomed. Mater. Res.* 1982; 16: 195-207.

387.El-Ghannam, A., Ducheyne, P. e Shapiro, I.: Bioactive material template for in vitro synthesis of bone, *J.Biomed. Mater. Res.* 1995; 29: 359-370.

388.Amédée, J., Faucheux, C., Verrier, S., Bareille, R. e Baquey, Ch.: The use of human osteoprogenitors cells in bone repaur. Transplants and Implants in Otology, Proc. of the 3rd Int. Symp., Portmann, M., Boudard, P. e Portmann, D. (Edt.), Amesterdão, Holanda, 1996; 7-13.

389.Bruijn, J.D., van Blitterswijk, C.A. e Davies, J.E.: Initial bone matrix formation at the hydroxyapatite interface in vivo, *J. Biomed. Mat. Res.* 1995; 29: 89-99.