



FEUP FACULDADE DE ENGENHARIA
UNIVERSIDADE DO PORTO

Comportamento Osteoclástico na Superfície de Hidroxiapatite Micro- e Nanoestruturada

Sílvia Carolina Fernandes do Carmo

Dissertação para a obtenção do grau de mestre em

Engenharia Biomédica

(2º ciclo de estudos)

Porto, 2012

Sílvia Carolina Fernandes do Carmo

Comportamento Osteoclástico na Superfície de Hidroxiapatite Micro- e Nanoestruturada

Dissertação de Candidatura ao grau de Mestre em Engenharia Biomédica submetida à Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto.

Orientador – Professor Doutor João Miguel Silva e Costa Rodrigues

Categoria – Professor auxiliar

Afiliação – Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto

Co-orientador - Professor Doutor Fernando Jorge Mendes Monteiro

Categoria – Professor catedrático

Afiliação – Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto

O Conhecimento é em Si Mesmo um Poder.

Francis Bacon

Agradecimentos

Agradeço de modo muito particular ao meu orientador, co-orientador e consultora, Professor João Rodrigues, Professor Fernando Jorge e Professora Maria Helena Fernandes Monteiro pela infindável ajuda, acompanhamento, apoio, disponibilidade e paciência demonstrada ao longo da realização de todo este projeto.

Ao Ricardo Vidal, Daniela Silva, Rui Rocha e Jorge Ferreira pela sua colaboração e auxílio demonstrados nas técnicas de FT-IR, CA, SEM, AFM e XRD.

À Marta Ribeiro e Liliana Grenho pelo seu apoio na preparação dos discos de hidroxiapatite.

Aos meus pais pelo seu incansável apoio, amor e carinho e por me proporcionarem tudo o que alcancei até hoje.

Ao Fábio por estar presente em tudo na minha vida, pelo seu amor, afeto e motivação que contribuíram de forma positiva para o sucesso deste projeto.

E a todos os meus amigos que me acompanharam e incentivaram no decurso desta caminhada.

Resumo

O osso é uma estrutura dinâmica que se encontra em constante remodelação. Este processo ocorre naturalmente e é responsável pela homeostasia do cálcio e conservação da integridade do esqueleto. A remodelação óssea resulta das atividades coordenadas dos osteoblastos e osteoclastos, responsáveis pela formação e reabsorção óssea, respetivamente. Os osteoblastos descendem de progenitores mesenquimais, enquanto que os osteoclastos têm a sua origem em células estaminais hematopoiéticas. No processo de osteoclastogénese são fundamentais dois fatores proteicos, o M-CSF (*monocyte-colony stimulation factor*) que influencia essencialmente a proliferação e sobrevivência das células hematopoiéticas e o RANKL (*receptor activator of nuclear factor- κ B ligand*) que promove a diferenciação e ativação osteoclásticas.

O osso possui diferentes elementos químicos que o caracterizam, nomeadamente a hidroxiapatite (HA) composta por sais de fosfato de cálcio e que é o principal componente da matriz extracelular óssea. Nesse contexto, a HA sintética é considerada um bom biomaterial para utilização em contextos de regeneração do tecido ósseo, pois é uma substância bioativa e osteocondutora. No entanto, esta apresenta uma taxa de reabsorção lenta e características mecânicas que nem sempre se adequam à aplicação do biomaterial. Com o intuito de melhorar as suas propriedades biológicas e com o advento da micro- e nanotecnologia, a HA micro e nanométrica tem sido cada vez mais estudada e aplicada, mostrando um elevado potencial neste tipo de aplicação.

Neste trabalho avaliou-se a diferenciação de células osteoclásticas obtidas a partir de precursores mononucleados isolados de sangue periférico humano e efetuadas em diferentes condições de cultura (ausência ou presença de M-CSF e RANKL). As culturas foram mantidas numa primeira fase, na ausência dos biomateriais. Na segunda parte do trabalho as mesmas foram efetuadas em três superfícies de HA (micro e nanoestruturada). As respostas celulares foram avaliadas através de diversos testes biológicos. Investigou-se, também, o envolvimento no comportamento celular observado, de vias de sinalização importantes no processo da osteoclastogénese. Adicionalmente, na segunda parte do trabalho, procedeu-se a uma caracterização exaustiva dos três tipos de HA no intuito de tentar obter uma melhor compreensão das respostas celulares observadas.

Observou-se que a presença de estímulos osteoclastogénicos induziu um comportamento celular distinto das culturas na ausência de M-CSF e RANKL, verificando-se que a resposta osteoclastogénica foi muito superior na presença dos mesmos.

Quanto ao comportamento das células osteoclásticas na presença de HA, verificou-se que existem características de superfície mais favoráveis para o seu desenvolvimento. Em particular, elevado tamanho de grão, baixa área superficial, baixos níveis de porosidade, elevado grau de rugosidade e reduzida hidrofiliabilidade, características observadas nos discos de HA microestruturada, conduziram a que ocorresse uma elevada diferenciação osteoclástica. Adicionalmente, foi possível constatar que os mecanismos intracelulares associados à diferenciação osteoclástica foram diferencialmente afetados pelas superfícies testadas.

Palavras-chave: Osso, Osteoclastos, Osteoclastogénese, TRAP, PBMC, Biomaterial, Hidroxiapatite micro- e nanoestruturada.

Abstract

Bone is a dynamic tissue that is constantly remodeling. This process occurs naturally and is responsible for calcium homeostasis and maintenance of skeletal integrity. Bone remodeling results from the coordinated activities of osteoblasts and osteoclasts responsible for bone formation and resorption, respectively. Osteoblasts descend from mesenchymal progenitors, while osteoclasts have their origin in hematopoietic stem cells. In the process of osteoclastogenesis there are two essential factors, the M-CSF (monocyte-colony stimulation factor) that mainly influences the proliferation of hematopoietic cells and RANKL (receptor activator of nuclear factor- κ B ligand) that promotes osteoclastic differentiation and activation.

The bone has different chemical elements that characterize it, namely the hydroxyapatite (HA), composed by salts of calcium phosphate and that is the main component of bone extracellular matrix. In that context, the synthetic HA is considered a good biomaterial in bone regeneration contexts because it is bioactive and osteoconductive substance. Nevertheless, presents a slow resorption rate and its mechanical characteristics are not always suitable for the proposed applications. In order to improve their biological properties and with the advent of micro and nanotechnology, micro and nano-HA has been increasingly studied and applied, showing a strong potential in this application.

This study evaluated the differentiation of osteoclastic cells derived from mononuclear precursors isolated from human peripheral blood and carried out in different culture conditions (absence or presence of RANKL and M-CSF). Cultures were made at first, in the absence of biomaterials. In the second part of this work were taken from the surface of HA (micro- and nanostructured). Cellular responses were evaluated using several biological tests. Were investigated also the signaling pathways important in the process of osteoclastogenesis. Finally, to the second part of the work carried out to a comprehensive characterization of three kinds of HA in order to understand the cellular responses obtained.

It was observed that the presence of stimuli of osteoclastogenesis induced behavior distinct from the cell cultures in the absence of M-CSF and RANKL, verifying that the response of osteoclastogenesis was very superior in their presence.

As regards the behavior of osteoclasts in the presence of HA was found that there are more favorable surface characteristics to their development. In particular, large grain size, low surface area, low porosity, high degree of roughness and low hydrophilicity, features observed in HA discs microstructured which resulted in a high osteoclast differentiation to occur.

Additionally, it was found that the intracellular mechanisms associated with osteoclast differentiation were differentially affected by the surfaces tested.

Keywords: Bone, Osteoclasts, Osteoclastogenesis, TRAP, PBMC, Biomaterial, Microphased Hydroxyapatite, Nanophased Hydroxyapatite

Índice

Agradecimentos	ii
Resumo.....	iv
Abstract	vi
Lista de Figuras	xi
Lista de Tabelas	xiv
Lista de Abreviaturas.....	xv
Capítulo I – Introdução.....	1
1. Engenharia de tecidos. Aspectos gerais.....	2
2. Tecido ósseo.....	5
2.1 Características estruturais do tecido ósseo	6
2.2 Matriz óssea	9
3. Células ósseas e Remodelação Óssea	11
3.1 Osteoblastos.....	13
3.2 Osteoclastos	15
4. Biomateriais	25
4.1 Requisitos dos biomateriais	27
4.2 Classificação	28
4.3 Osteointegração	30
4.4 Hidroxiapatite.....	32
5. Objetivos	35
Capítulo II - Culturas de Osteoclastos	36
.....	36
1. Introdução.....	37
2. Materiais e Métodos	38
2.1 Isolamento de células mononucleadas de sangue periférico humano (PBMC).....	38
2.2 Culturas celulares de osteoclastos	39
2.3 Quantificação da atividade da TRAP	40
2.4 Quantificação da Proteína Total.....	40
2.5 Coloração histoquímica da TRAP.....	41
3. Resultados	42
3.1 Quantificação da atividade da TRAP e de Células Osteoclásticas	42

4. Discussão	46
Capítulo III - Culturas de Osteoclastos em superfícies de Hidroxiapatite micro- e nanoestruturada	47
.....	47
1. Introdução	48
2. Materiais e Métodos	50
2.1 Preparação e caracterização dos discos de HA micro- e nanoestruturada.....	50
2.2 Isolamento de células mononucleadas de sangue periférico humano (PBMC).....	53
2.3 Culturas celulares	53
2.4 Quantificação de proteínas	54
2.5 Quantificação da atividade da TRAP	55
2.6 Quantificação do Ca^{2+} libertado para o meio de cultura.....	55
2.7 Microscopia Ótica Confocal.....	55
2.8 Microscopia Eletrónica de Varrimento (SEM)	56
3. Resultados	57
3.1 Caracterização dos discos de HA.....	57
3.2 Caracterização da superfície dos discos de HA	62
3.3 Resposta osteoclastogénica das culturas celulares	72
4. Discussão	85
Capítulo IV – Conclusões Finais e Perspetivas Futuras	89
.....	89
Bibliografia	92

Lista de Figuras

Figura 1 - Correlação dos efeitos de dimensão com bioreatividade no mapa relacional da nanotecnologia com física e biologia	3
Figura 2 – Vantagens biomiméticas dos nanomateriais	4
Figura 3 - Origem e localização das células ósseas	5
Figura 4 - Estrutura e constituição do osso cortical	6
Figura 5 - Representação esquemática dos ossos trabecular e cortical	7
Figura 6 - Representação esquemática de algumas estruturas importantes num osso longo normal	8
Figura 7 - Arranjo especial de tropocolagénio com vista à formação das regiões de lacunas para a deposição do cristal mineral durante a mineralização do osso	10
Figura 8 - Processo de remodelação óssea	11
Figura 9 - Mediadores envolvidos nas interações intracelulares entre células ósseas	12
Figura 10 - Diferenciação dos osteoblastos a partir de células estaminais que envolve a interação coordenada entre diversos fatores endócrinos, parácrinos e autócrinos	13
Figura 11. A - O osteoclasto em estado de não reabsorção. B – e na fase de reabsorção	16
Figura 12 - Acidificação e proteólise da matriz pelos osteoclastos	18
Figura 13 - Regulação da expressão do gene RANKL	20
Figura 14 - Representação esquemática da diferenciação e função dos osteoclastos reguladas por o RANKL e M-CSF	23
Figura 15 - Ilustração esquemática do mecanismo pelo qual os nanomateriais podem ser mais eficazes	31
Figura 16 - Isolamento das PBMC usando Ficoll-Paque™ PREMIUM	38
Figura 17 - Estrutura química do pNPP	40

Figura 18 - Atividade da TRAP normalizada com o conteúdo proteico em PBMC (MB) durante 7, 14 e 21 dias	42
Figura 19 - Atividade da TRAP normalizada com o conteúdo proteico em PBMC (M+R) durante 7, 14 e 21 dias	43
Figura 20 - Visualização das células multinucleadas e positivas para a TRAP em culturas de PBMC	44
Figura 21 - Quantificação de células osteoclásticas em culturas de PBMC (MB)	44
Figura 22 - Quantificação de células osteoclásticas em culturas de PBMC (M+R)	45
Figura 23 - Prensa uniaxial (Mestra snow P3)	50
Figura 24 - Representação dos discos de HA	51
Figura 25 - Dimensão dos diâmetros (mm) dos discos de HA: nHA830, nHA1000 e mHA ..	57
Figura 26 - Espectros obtidos da técnica FT-IR que analisa a composição química dos três discos de HA: nHA830, nHA1000 e mHA	59
Figura 27 - Espectros obtidos através da técnica de XRD para os discos de HA: nHA830 (A), nHA1000 (B) e mHA (C)	60
Figura 28 - Imagens de SEM das superfícies dos discos de nHA830 com diferentes escalas: 50 μ m (A), 20 μ m (B), 4 μ m (C) e 1 μ m (D)	63
Figura 29 - Imagens de SEM das superfícies dos discos de nHA1000 com diferentes escalas: 50 μ m (A), 20 μ m (B), 4 μ m (C) e 1 μ m (D)	64
Figura 30 - Imagens de SEM das superfícies dos discos de mHA com diferentes escalas: 50 μ m (A), 20 μ m (B), 4 μ m (C) e 1 μ m (D)	65
Figura 31 - Imagens de AFM das superfícies dos discos de nHA830	67
Figura 32 - Imagens de AFM das superfícies dos discos de nHA1000	68
Figura 33 - Imagens de AFM das superfícies dos discos de mHA	69
Figura 34 - Quantificação do conteúdo proteico em PBMC (BM) durante 14 e 21 dias nas superfícies de nHA830, nHA1000 e mHA	72

Figura 35 - Quantificação do conteúdo proteico em PBMC (M+R) durante 14 e 21 dias nas superfícies de nHA830, nHA1000 e mHA	72
Figura 36 - Atividade da TRAP, normalizada com o conteúdo proteico, em culturas de PBMC (BM) efetuadas sobre discos de nHA830, nHA1000 e mHA	74
Figura 37 - Atividade da TRAP, normalizada com o conteúdo proteico, em culturas de PBMC (M+R) efetuadas sobre discos de nHA830, nHA1000 e mHA	74
Figura 38 - Quantificação do Ca^{2+} libertado em culturas de PBMC (BM) efetuadas em superfícies nHA830, nHA1000 e mHA	76
Figura 39 - Quantificação do Ca^{2+} libertado em culturas de PBMC (M+R) efetuadas em superfícies nHA830, nHA1000 e mHA	76
Figura 40 - Imagens representativas de culturas de PBMC efetuadas na superfície de HA (nHA830, nHA1000 e mHA) obtidas através da técnica de microscopia confocal após 14 e 21 dias de cultura	78
Figura 41 - Micrografias de SEM em culturas de PBMC (BM) efetuadas nas superfícies dos discos de nHA830 (A e B), nHA1000 (C e D) e mHA (E e F)	79
Figura 42 - Micrografias de SEM em culturas de PBMC (M+R) efetuadas nas superfícies dos discos de nHA830 (A e B), nHA1000 (C e D) e mHA (E e F)	80
Figura 43 - Atividade da TRAP, normalizada com o conteúdo proteico, em culturas de PBMC (BM) tratadas com diferentes inibidores de vias de sinalização e efetuadas sobre as superfícies de (A) nHA830, (B) nHA1000 e (C) mHA	82
Figura 44 - Atividade da TRAP, normalizada com o conteúdo proteico, em culturas de PBMC (BM) tratadas com diferentes inibidores de vias de sinalização e efetuadas sobre as superfícies de (A) nHA830, (B) nHA1000 e (C) mHA	83

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Biomateriais no corpo	26
Tabela 2 - Classificação dos biomateriais	28
Tabela 3 - Inibidores testados com suas respectivas concentrações e vias de sinalização inibidas	39
Tabela 4 - Técnicas usadas na caracterização dos discos de HA	51
Tabela 5 - Inibidores de vias de sinalização utilizados	54
Tabela 6 - Resultados obtidos através da técnica FT-IR que mostra os grupos químicos existentes nos discos de nHA830, nHA1000 e mHA	58
Tabela 7 - Representação dos dados obtidos para os ângulos de contactos, nas superfícies dos discos de HA: nHA830 (n=8), nHA1000 (n=8) e mHA (n=7).....	62
Tabela 8 - Distribuição das dimensões dos grãos dos discos de nHA830, nHA1000 e mHA	66
Tabela 9 - Parâmetros das rugosidades para as diferentes amostras de HA	70
Tabela 10 - Dados obtidos através da técnica de porosimetria de Mercúrio para os discos nHA830, nHA1000 e mHA	71

Lista de Abreviaturas

AFM – Microscopia de força atômica

ATP – *Adenosine triphosphate*

BM – Meio base

BMP - *Bone morphogenetic protein*

BMU – Unidade básica multicelular

CA – Ângulos de contacto

CA2 – Anidrase carbónica 2

CATK - Catepsina K

CF – Fibras de carbono

c-fms – Recetor do M-CSF

CTR - Recetor da calcitonina

EDS – Energia dispersiva de raios-X

ERK - *Extracellular signal-regulated kinase*

FT-IR – Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

GH - Hormona de crescimento

GTP – *Guanosine-5'-triphosphate*

HA – Hidroxiapatite

HB-GAM - *Heparin-binding growth-associated molecule*

IGF-1 - *Insulin-like growth factor-1*

MAPK - *Mitogen-activated protein kinases*

M-CSF - *Monocyte-colony stimulation factor*

MSC - Células estaminais mesenquimais

M+R – Meio com estimuladores M-CSF e RANKL

NCP – Proteínas não colagénicas

NF-KB - *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

OPG – Osteoprotegerina

OCIF - Fator inibidor da osteoclastogénese

ODF - *Osteoclast differentiation factor*

OSF-1 - Fator de estimulação osteoblástico

PBMC - Células sanguíneas do sangue periférico

PDTC – *Pyrrolidine dithiocarbamate*

PEEK - *Polyethyletherketone*

PGE-2 - Prostaglandina E₂

PKC – *Protein kinase C*

PMMA - Polimetilmetacrilato

pNPP – *Para*-nitrofenol fosfato

PTFE - Politetrafluoretileno

PTH - Hormona da paratiróide

PTN – Pleiotrofina

PU - Poliuretano

RANK - *Receptor activator of nuclear factor-KB*

RANKL - *Receptor activator of nuclear factor-KB ligand*

SC – Células estaminal

Sca-1/Ly-6A – *Stem cell antigen*

SEM – Microscopia eletrónica de varrimento

SOFA - *Stromal osteoclast-forming activity*

TCP – Fosfato tricálcico

TGF- β – Fator de transformação de crescimento beta

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

TRANCE – *TNF-related activation-inducing cytokine*

TRAP – *Tartrate-resistant acid phosphatase*

UHMWPE – Polietileno de elevado peso molecular

VNR – Recetor da vitronectina

XRD – Difração de raios-X

α -MEM – *Alpha modified minimum essential medium*

Capítulo I – Introdução

1. Engenharia de tecidos. Aspetos gerais

O osso é um tecido conjuntivo especializado que apresenta uma matriz extracelular mineralizada, composta essencialmente por fosfato de cálcio, na forma de hidroxiapatite, e colagénio, o que lhe confere uma estrutura rígida, mas também, lhe faculta um certo grau de elasticidade (Datta H K 2008; Sandy C M 2002). Possui diferentes características que o tornam um tecido fundamental para o organismo, tais como elevada rigidez, confere forma, proteção e suporte às estruturas do corpo e auxilia na locomoção (Datta H K 2008). Para além do seu suporte e proteção, o osso é uma importante fonte de iões inorgânicos, participando ativamente na homeostase do organismo (Sandy C M 2002).

O tecido ósseo é uma estrutura bastante dinâmica que se encontra em constante remodelação. Esta característica permite que se auto-repare, após uma fratura por exemplo, e se adapte a diferentes forças exercidas sobre ele. Durante a infância existe uma elevada taxa de resposta do osso, onde a formação excede a reabsorção. Nos jovens adultos, a formação e reabsorção têm aproximadamente o mesmo balanço, mas com o avançar da idade é visível a perda óssea (Datta H K 2008). As propriedades mecânicas do osso são determinadas por vários fatores, tais como a taxa de remodelação óssea, composição da matriz extracelular, estrutura, geometria e densidade. Defeitos nestes parâmetros podem resultar em doenças como a osteoporose, doença de Paget do osso, osteopetrose, osteogénese imperfeita, entre outras (Datta H K 2008).

Devido à escassez de enxertos ósseos para procedimentos cirúrgicos e devido, também, aos riscos de infeção viral quando se utilizam estes mesmos enxertos, bem como à morbilidade associada à utilização de autoenxertos, existe atualmente um interesse crescente na utilização de substitutos ósseos nessas situações (Ferraz M P 2004). A engenharia de tecidos e a medicina regenerativa têm como objetivo desenvolver substitutos biológicos que restaurem, mantenham ou melhorem o tecido danificado e a funcionalidade do órgão (Zhang L 2009). Do ponto de vista biológico, os biomateriais biocerâmicos, tal como a hidroxiapatite, são amplamente promissores como substitutos ósseos. A HA é o principal componente mineral do osso. Consequentemente apresenta uma elevada biocompatibilidade e bioatividade no que diz respeito às células ósseas (Ferraz M P 2004). O desenvolvimento da micro- e nanotecnologia estabelece uma grande influência na vida humana. O efeito da dimensão nanométrica dos materiais dentro do organismo permanece uma incógnita. O tamanho nanométrico dos materiais, abaixo de 1,5nm, leva a um efeito quântico e à formação de locais de atividade, tal como os que são vistos nos catalisadores (Figura 1). O efeito mais inequívoco

e influente é o efeito da superfície. É sabido que a área específica da superfície para um volume unitário é aumentada simultaneamente com uma diminuição do tamanho da partícula e com um aumento pronunciado da sua reatividade. Por isso, será de prever uma elevada taxa de rendimento para funções e desempenho de materiais e dispositivos com diferentes propriedades (Fumio W 2009).

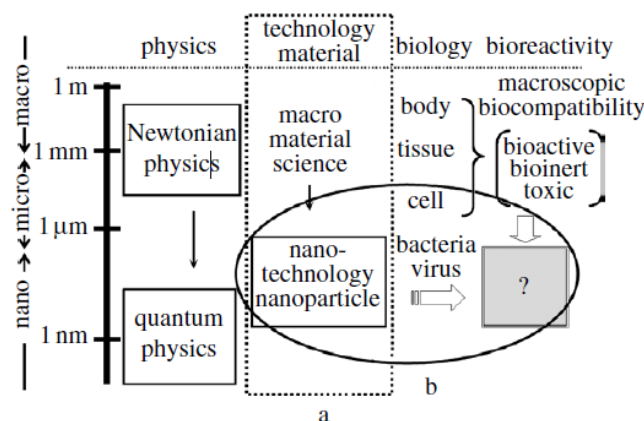


Figura 1. Correlação dos efeitos de dimensão com bioreatividade no mapa relacional da nanotecnologia com física e biologia. **a**, efeito específico da área originado somente a partir das propriedades do material. **b**, efeito do tamanho físico decorrente da interação partícula-célula/tecido (Fumio W 2009; Hong-wen D 2005).

A nanotecnologia, ou a utilização de nanomateriais (definidos como materiais que possuem dimensões abaixo dos 100 nm) pode representar uma solução futura, já que estes materiais conseguem mimetizar as propriedades da superfície (incluindo topografia, energia, etc) dos tecidos naturais. Por estas razões, nesta última década, os nanomateriais têm sido destacados como candidatos promissores no melhoramento dos materiais convencionais da engenharia de tecidos. Mais importante ainda, é que estes esforços têm realçado os nanomateriais, devido a estes apresentarem melhores propriedades em relação aos materiais convencionais (ou microestruturados). Destacam-se pela sua citocompatibilidade, pelas suas propriedades mecânicas, elétricas, óticas, magnéticas e catalíticas (figura 2). Estas propriedades únicas dos nanomateriais têm ajudado a melhorar o crescimento de vários tecidos, o que representa uma mais valia tendo em conta o que tem sido feito atualmente neste campo (Zhang L 2009).

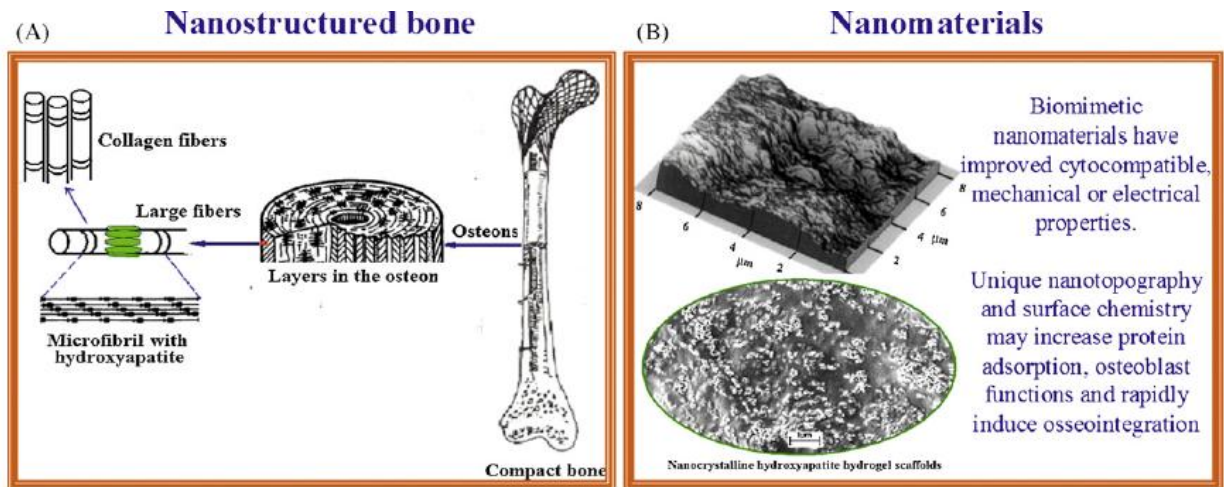


Figura 2. Vantagens biomiméticas dos nanomateriais (Zhang L 2009).

Neste contexto, é importante realçar que tem sido descrito que matrizes nanoestruturadas conferem uma maior bioatividade conduzindo a uma melhor resposta celular. Essa resposta parece envolver diferentes parâmetros, tais como a adesão, proliferação e expansão *ex vivo* por forma a minimizar o tempo de incubação, e *in vivo* integrando as células rapidamente no tecido circundante (Webster T J 2007).

2. Tecido ósseo

O tecido ósseo apresenta uma matriz extracelular composta por sais inorgânicos e por uma componente orgânica. Possui elevada rigidez e resistência mecânica quando comparado com outros tecidos conjuntivos (Hong-wen D 2005). Globalmente, os componentes do osso incluem a fase orgânica (20-40%), fase inorgânica (50-70%), elementos celulares (5-10%) e lípidos (3%). A componente orgânica da matriz é composta por aproximadamente 95% de colagénio tipo I e 5% de outras proteínas e proteoglicanos, sendo que a componente inorgânica apresenta sais cristalinos, essencialmente constituídos por cálcio e fosfato na forma de HA parcialmente substituída (Sandy C M 2002).

O osso é composto por quatro tipos de células diferentes: osteoblastos, osteoclastos, células de revestimento (*bone lining cells*) que se encontram presentes na superfície óssea e osteócitos no seu interior mineralizado (Figura 3). Os osteoblastos, as células de revestimento e os osteócitos têm origem nas células osteoprogenitoras locais, ao passo que os osteoclastos têm origem hematopoiética (Sandy C M 2002).

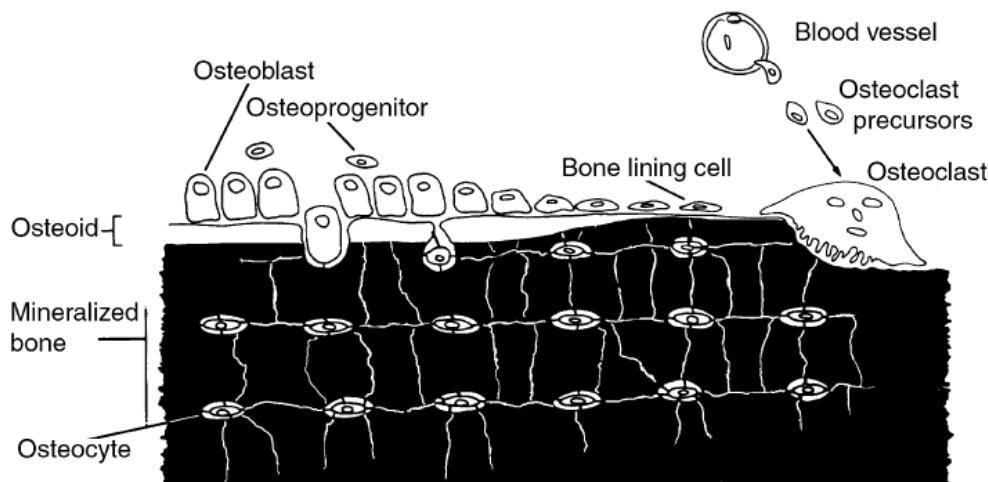


Figura 3. Origem e localização das células ósseas (Marks S C 1988).

2.1 Características estruturais do tecido ósseo

O esqueleto é composto por ossos longos, como o úmero, fêmur e tíbia, e ossos chatos, como os do crânio, escápula e *ileum*. Histologicamente, existem dois tipos principais de maturação óssea, o osso cortical ou compacto, que tem uma estrutura ordenada e é muito denso, e o osso trabecular que é leve, pouco compacto e tem uma estrutura irregular (Figura 5) (Datta H K 2008). O osso cortical é encontrado essencialmente no eixo e na superfície dos ossos chatos. É composto por osso que se posiciona concentricamente em torno dos canais centrais conhecidos por sistema *Haversiano*. Este sistema contém vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e tecido conjuntivo. Existe uma camada concêntrica de anéis ou lamela da matriz óssea adjacente em cada canal *Haversiano* (Datta H K 2008). Dentro da lamela existem pequenos espaços designados por “lacunas” que contêm osteócitos (figuras 3 e 4).

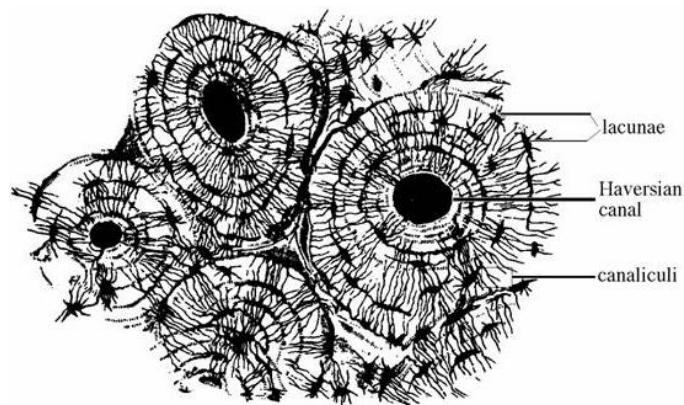


Figura 4. Estrutura e constituição do osso cortical. Os osteócitos localizam-se nas zonas das lacunas. Por sua vez, as lacunas estão localizadas nas junções ou fronteiras da lamela.

(<http://blog.dearbornschools.org/renkom/files/2011/02/compact-bone-lacunae.jpg>).

O osso trabecular está presente em menores quantidades e forma as extremidades dos ossos longos e partes internas dos ossos chatos. Contém placas interconectadas designadas de trabéculas, ligadas à medula, dando-lhe uma aparência de favo de mel. O osso trabecular é alinhado ao longo das linhas de tensão; esta conectividade aumenta consideravelmente o seu comprimento (Datta H K 2008). A distribuição anatômica específica do osso cortical e trabecular reflete as suas respectivas distribuições de tensões de compressão e tração. O osso trabecular é idealmente adequado a resistir a forças de compressão e, portanto, é o osso predominante nas vértebras (Datta H K 2008).

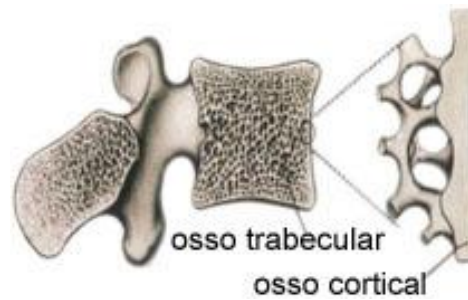


Figura 5. Representação esquemática dos ossos trabecular e cortical

(<http://www.cintimed.com.br/especial3.htm>).

O osso longo no adulto normal é composto por duas componentes: a diáfise na parte central, e a epífise em cada extremidade do osso. A metáfise é a região cônica que conecta a diáfise à epífise (Xiao-Man L 2005). A articulação é o ponto de conexão entre dois ossos. É responsável pela transferência de carga de um osso ao outro. Este conjunto é revestido por uma cartilagem articular, que tem como função minimizar o atrito e o desgaste entre as duas extremidades ósseas durante o movimento.

As superfícies do osso possuem uma importância singular, já que constituem a única região óssea onde as atividades celulares podem ocorrer (síntese e reabsorção) em resposta a fatores mecânicos e não mecânicos (Xiao-Man L 2005). Estas superfícies podem ser classificadas em dois tipos: periosteal e endosteal. A superfície periosteal abrange todo o perímetro exterior do osso. A superfície endosteal subdivide-se em superfície medular (superfície onde se encontram os canais de *Harvers*), superfície endocortical e superfície trabecular. Durante a idade adulta a formação óssea periosteal é quase insignificante, embora possa estar mais ativa em idade avançada. Quando existe uma fratura óssea, o periósteeo participa ativamente no processo de reparação do osso. O endósteeo é uma camada celular que reveste a superfície endocortical e delinea a cavidade da medula de todos os ossos individuais (Figura 6) (Jee 1988, 2001; Frost H M 1995; Parfitt A M 1983).

De acordo com o comprimento do osso a ser mantido, o processo da remodelação óssea é cuidadosamente regulado (Datta H K 2008). Esta remodelação serve para manter a força biomecânica do osso e suprir as necessidades metabólicas. O processo inclui reabsorção, formação e quiescência do tecido ósseo. A fase mais comumente observada é a de repouso/quiescência (Parfitt A M 1983; Jee 1988; Frost H M 1995; Jee 1999; Schenk R K 1993).

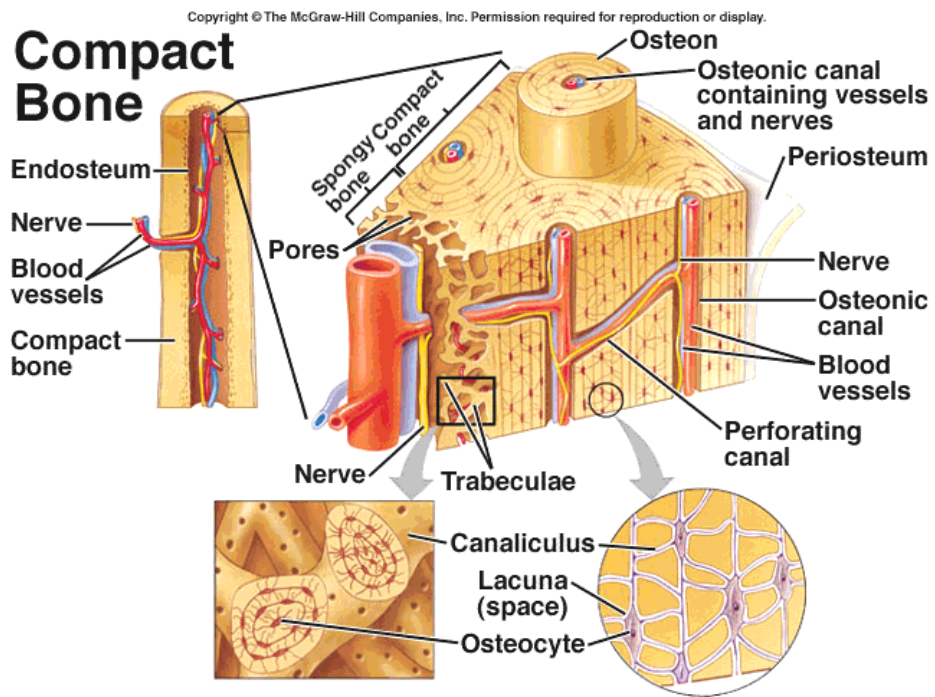


Figura 6. Representação esquemática de algumas estruturas importantes num osso longo normal.

Adaptada de <http://blog.dearbornschools.org/renkom/2011/02/09/microscopic-structure-of-bone/>.

2.2 Matriz óssea

A matriz óssea apresenta, conforme já foi referido, uma **fase inorgânica** e uma **fase orgânica**.

2.2.1 Fase Inorgânica

A hidroxiapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) é a molécula predominante no osso mineralizado. Existe em diferentes formas e é depositada dentro das lacunas, nas fibras de colagénio (Hong-wen D 2005). Fornece à matriz óssea rigidez mecânica e capacidade de carga. A HA natural não apresenta a sua formulação estequiométrica pura, pois contém também muitos componentes minoritários, tais como carbonato, citrato, magnésio, flúor e estrôncio, que estão incorporados na rede cristalina ou são adsorvidos na superfície do cristal (Xiao-Man L 2005). A HA do osso pode ser sintetizada a partir destes cristais e, assim, torna-se mais solúvel do que a HA na sua forma geológica natural, permitindo que o osso possa ser novamente solubilizado e que liberte os seus iões de fosfato de cálcio, magnésio ou outros iões no líquido extracelular (Hong-wen D 2005). Deste modo, o osso funciona também como uma reserva de iões minerais que responde às necessidades homeostáticas do organismo. As substâncias que possuem afinidade óssea podem ser facilmente incorporadas na sua matriz, ocorrendo o processo de mineralização. Estas substâncias, geralmente, incluem tetraciclina, polifosfatos, bisfosfatos e moléculas com afinidade para radionuclídeos (Xiao-Man L 2005; Bigi A 1997).

2.2.2 Fase Orgânica

A fase orgânica da matriz óssea consiste predominantemente em colagénio tipo I e uma pequena quantidade de colagénio tipo III, V e X. Muitas moléculas de colagénio (tropocolagénios) são agrupadas de modo a formarem fibras de colagénio. Posteriormente, as fibras de colagénio vão alinhar-se lado a lado, de modo a formarem uma *lamella sheet*. Entre as extremidades dos tropocolagénios existem ligações interfibrilares cruzadas que são formadas por reticulação entre piridinolinas tri-valentes e pirróis, o que estabiliza a matriz (Xiao-Man L 2005). Estes encontram-se alinhados e sobrepostos, formando uma fibra de colagénio com numerosas lacunas, em que cristais de HA são depositados aquando da

mineralização óssea (Figura 7). Os vestígios de colagénio tipo III, V e X podem servir para regular o diâmetro das fibrilas de colagénio durante certas fases da matriz óssea (Xiao-Man L 2005).

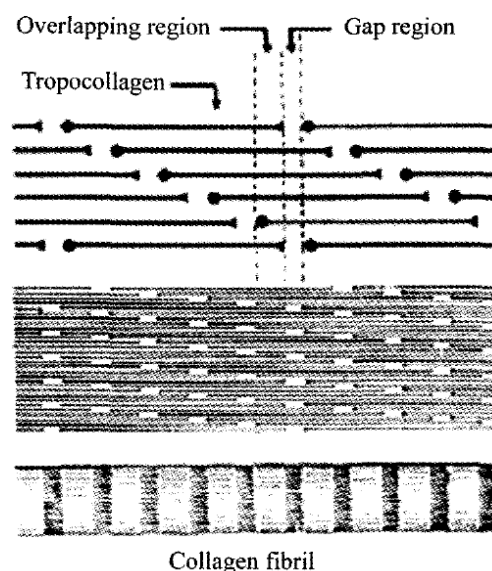


Figura 7. Arranjo especial de tropocolagénio com vista à formação das regiões de lacunas para a deposição do cristal mineral durante a mineralização do osso (Hong-wen D 2005).

No osso, existem ainda várias proteínas não colagénicas (NCPs, *non-collagenous proteins*) que constituem cerca de 10% da matriz orgânica total. Na sua maioria, as suas funções específicas não estão elucidadas, mas são consideradas importantes no processo de calcificação, na fixação dos cristais de HA no colagénio, bem como no controlo do metabolismo osteoblástico e osteoclástico (Xiao-Man L 2005). De entre todas as NCPs existentes no osso, as mais abundantes são a osteocalcina, osteopontina, osteonectina e sialoproteína. Somente a sialoproteína e a osteocalcina são específicas para o tecido ósseo. Durante o metabolismo ósseo, alguns componentes das proteínas ósseas, incluindo a hidroxiprolina e as ligações cruzadas de colagénio, são libertados na circulação durante a decomposição da matriz óssea (Khosla S 2003). Desta forma, avaliar os seus níveis na urina e no plasma torna-se clinicamente útil na monitorização do estado da remodelação óssea para, assim, diagnosticar, detetar a progressão e determinar a eficácia do tratamento no caso de doenças metabólicas do osso (Lian J B 1999, 2003; Khosla S 2003; Gehron-Robey P 1996; Gorski J P 1998; Watts N B 2003).

3. Células ósseas e Remodelação Óssea

A remodelação óssea verifica-se num ciclo extremamente bem regulado no qual, os osteoclastos aderem ao tecido ósseo e o reabsorvem por acidificação e digestão proteolítica e os osteoblastos sintetizam, no mesmo local, uma matriz orgânica que é posteriormente calcificada. Assim, os processos de regulação do metabolismo ósseo envolvem a disponibilidade de vários sais minerais e homeostasia iónica, hormonas calciotrópicas e numerosos fatores locais (Guyton A C 1986; Beorkitt H G 1993; Green J 1991; Bronner F 1992) (Väänänen H K 1993).

Esta remodelação ocorre em áreas discretas do tecido ósseo, denominadas por unidade básica multicelular (BMU, *basic multicellular unit*), descrita por Frost há mais de quarenta anos (Figura 8) (Frost H M 1964).

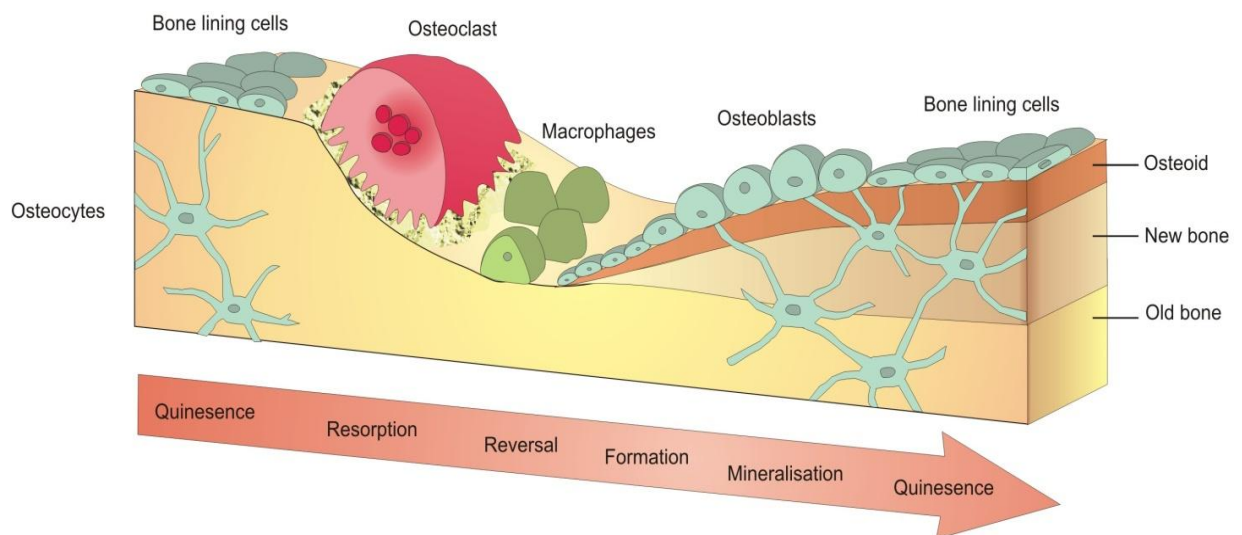


Figura 8. Processo de remodelação óssea. O osso é continuamente remodelado em sítios discretos no esqueleto, de modo a manter a integridade do tecido. Primeiro, os osteoclastos são ativados, e a fase de reabsorção ocorre em aproximadamente 10 dias. Após a reabsorção, os precursores de osteoblastos são recrutados, proliferam e diferenciam-se em osteoblastos maduros. Estes produzem a matriz mineralizada do osso, finalizando o processo de remodelação. (<http://www.york.ac.uk/res/btr/Image%20Library/Bone%20remodelling.jpg>).

A BMU do osso compreende os osteócitos, osteoblastos e osteoclastos. A sua atividade é regulada essencialmente por forças mecânicas, volume de células ósseas, fatores sistémicos, hormonas (como por exemplo, a hormona da paratiróide (PTH) e a hormona do crescimento (GH)), citocinas e fatores locais (figura 9). O processo de ativação da remodelação óssea é regulado parcialmente pelos osteócitos, que detetam tensão mecânica e respondem a

estímulos bioquímicos (Datta H K 2008). Esta ativação resulta na retração das *bone lining cells* que revestem a superfície endosteal, e na digestão da superfície endosteal da membrana de colagénio por parte das metaloproteinases, conduzindo à sua apoptose. De seguida, os precursores osteoclásticos são recrutados e ocorre a sua fusão, originando osteoclastos multinucleados, que vão mediar a reabsorção do osso (Sommerfeldt D W 2001; Robling A G 2006; Perez-Amodio S 2004). Este processo é completado, em média, após 3-6 meses do seu início. A taxa de remodelação óssea varia de acordo com o tipo de osso, sendo que é maior em locais onde o osso trabecular predomina, como nas vértebras, e menor em locais ricos em osso cortical, como regiões da anca (Datta H K 2008; Lane N E 2009).

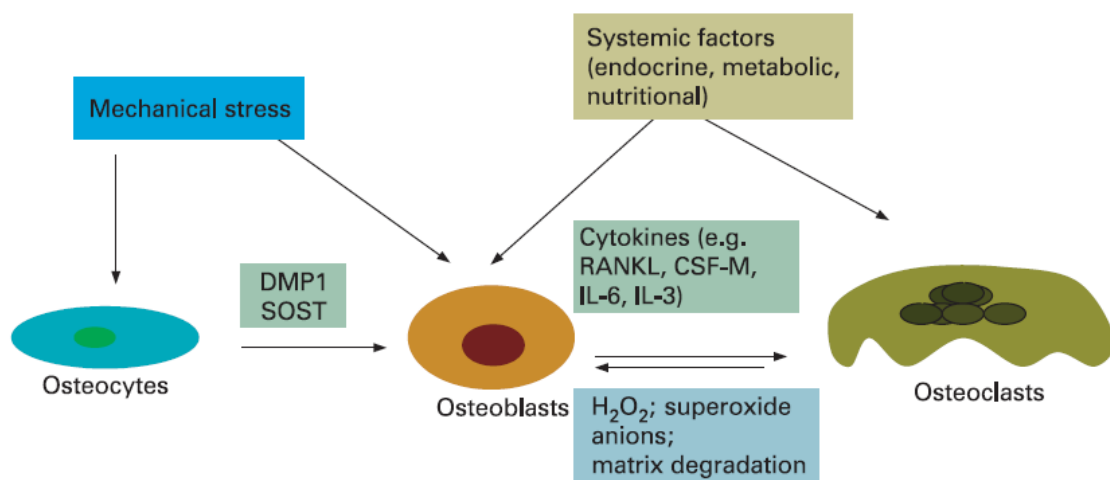


Figura 9. Mediadores envolvidos nas interações intracelulares entre células ósseas (Datta H K 2008).

3.1 Osteoblastos

Os osteoblastos são as células ósseas responsáveis pela deposição de substâncias proteicas e inorgânicas na matriz extracelular e são também responsáveis pela secreção de fatores de crescimento necessários à osteogênese (Tamer M K E 2009), ou seja, são responsáveis pela síntese do material ósseo.

Progressos notáveis têm vindo a ser feitos na sua identificação morfogênética, mais concretamente na identificação de vias de sinalização e de reguladores transcricionais que medeiam a diferenciação de células estaminais mesenquimais (MCS) em células osteoprogenitoras (figura 10).

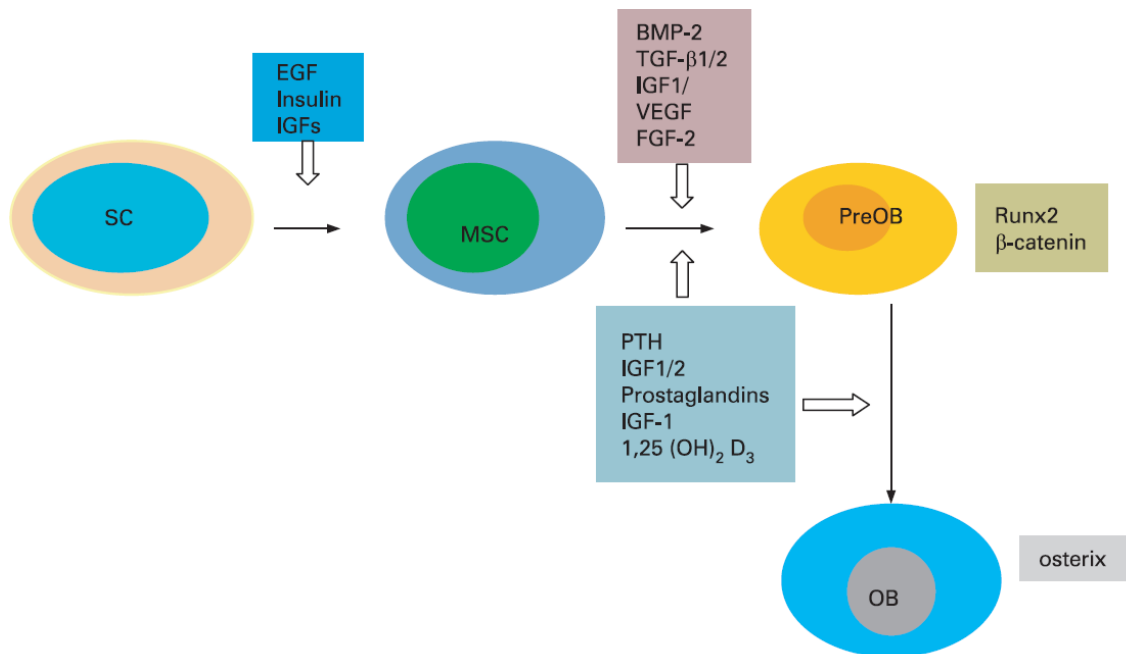


Figura 10. Diferenciação dos osteoblastos a partir de células estaminais que envolve a interação coordenada entre diversos fatores endócrinos, parácrinos e autócrinos. **SC**, célula estaminal; **MCS**, célula estaminal mesenquimal; **OB**, osteoblasto (Datta H K 2008).

Durante o desenvolvimento ósseo ocorre a diferenciação dos osteoblastos e a deposição da matriz óssea. Nesta fase estão envolvidas interações coordenadas no espaço e no tempo através de diversos fatores parácrinos, endócrinos e autócrinos (Datta H K 2008). A diferenciação dos osteoblastos é estimulada por diferentes fatores. O fator de crescimento epidérmico promove a renovação de células estaminais mesenquimais, sendo que a auto-renovação parece ser um fator crítico que depende da expressão de certos genes, como o

stem cell antigen (Sca-1/Ly-6A) (Tamama K 2006; Bonyadi M 2003). O fator de estimulação osteoblástico (OSF-)-1, também conhecido como pleiotrofina (PTN) ou *heparin-binding growth-associated molecule* (HB-GAM), é um fator quimiotático para as células osteoprogenitoras e estimula a atividade do osteoblasto maduro (Yang X B 2001; Tare R S 2002). Outros fatores como a PTH, GH, prostaglandinas e IGF-1 (*insulin-like growth factor-1*) possuem efeitos mais marcantes por afetarem a renovação das MSC e por estimularem a diferenciação osteogênica através da proteína morfogenética do osso (BMP, *bone morphogenetic protein*) (Datta H K 2008).

O processo de diferenciação osteoblástica parece ser particularmente dependente das interações entre Wnt/catenina e *transforming growth factor* β (TGF- β)/BMP mediado por diferentes vias de sinalização (Datta H K 2008). A expressão de Runx2, um fator de transcrição associado à diferenciação osteoblástica, é requerida para as células MSC multipotentes se diferenciarem na linhagem osteoblástica (Datta H K 2008). O Runx2 inibe também a diferenciação de MSC em adipócitos e em linhagem de condrócitos. Globalmente, as vias BMP2 e WNT, em conjunto, promovem a expressão de RUNX2, que por sua vez promove a diferenciação osteoblástica (Datta H K 2008).

Após a síntese da matriz óssea, os osteoblastos podem sofrer morte celular programada (apoptose) ou diferenciarem-se em osteócitos ou células de revestimento, que correspondem a osteoblastos inativos (Sarah L D 2010). Neste contexto, os osteócitos são o tipo de células mais abundante no osso e atuam como sensores mecânicos, regulando a atividade dos osteoblastos e osteoclastos (Caetano-Lopes J 2007).

3.2 Osteoclastos

Os osteoclastos são células multinucleadas (4-8 núcleos) especializadas na reabsorção óssea. São formados a partir da fusão dos seus progenitores mononucleados, diferenciando-se, posteriormente, em células osteoclásticas (osteoclastogénese) (Suda T 1996). Foi demonstrado que estes precursores existem na medula óssea (Suda T 1992; Yoshida H 1990) e na circulação sanguínea periférica, através do qual chegam ao tecido ósseo, onde aderem e se desenvolvem. São descendentes de células da linhagem de macrófagos/ monócitos CD14+ (Kierszenbaum A L 2002).

Os osteoclastos funcionais podem ser encontrados nos ossos trabecular e cortical. Adicionalmente, células muito semelhantes podem ser encontradas nas cartilagens calcificadas e na dentina dos dentes, sendo por isso designadas por condroclastos e dentinoclastos, respetivamente (Väänänen H K 2004).

A reabsorção óssea é iniciada quando os osteoclastos aderem à superfície do osso, através dos podossomas, seguida da impermeabilização da matriz óssea em áreas circulares de selagem (*sealing zone*). Nestas zonas de impermeabilização dos osteoclastos desenvolvem-se as *ruffled border membranes*, que correspondem à área central da membrana plasmática altamente invaginada responsável pela reabsorção óssea (figura 11), por onde é secretado o HCl, que irá promover a dissolução da fase mineral do osso, e enzimas líticas, como a catepsina K (CATK), que irão degradar a matriz orgânica do osso (Boyce B F 2008; Väänänen H K 2008).

Para além de serem células multinucleadas, os osteoclastos contêm um grande número de mitocôndrias e demonstram uma polarização distinta de acordo com a sua atividade funcional (Lakkakorpi P T 1996). Possuem, ainda, diversos complexos de Golgi em torno dos núcleos e numerosas vesículas lisossomais que se originam a partir dos complexos de Golgi e se situam junto à *ruffled border* (Marks S C 1996). Assim sendo, os osteoclastos são células com uma ultraestrutura única, o que auxilia na sua identificação e distinção relativamente a outras células multinucleadas presentes na cavidade da medula óssea (Teixeira C 2008).

Os osteoclastos foram identificados pela primeira vez em 1873 por Albert Kölliker, na Alemanha (Kffiker A 1873). Foram necessários quase 100 anos para se desenvolverem modelos *in vitro* apropriados para se estudar a reabsorção óssea e a sua regulação com maior detalhe (Väänänen H K 2004). De uma forma resumida, o “ciclo de reabsorção” pressupõe:

- Adesão dos precursores osteoclásticos ao tecido ósseo;
- Fusão e diferenciação em células osteoclásticas;
- Polarização das mesmas;

- Formação da zona de selagem (*sealing zone*);
- Reabsorção óssea;
- Libertação do osteoclasto (Lakkakorpi P T 1996).

Segundo vários estudos *in vitro*, os osteoclastos podem passar por diversos ciclos de reabsorção consecutivos (Kanehisa J 1990).

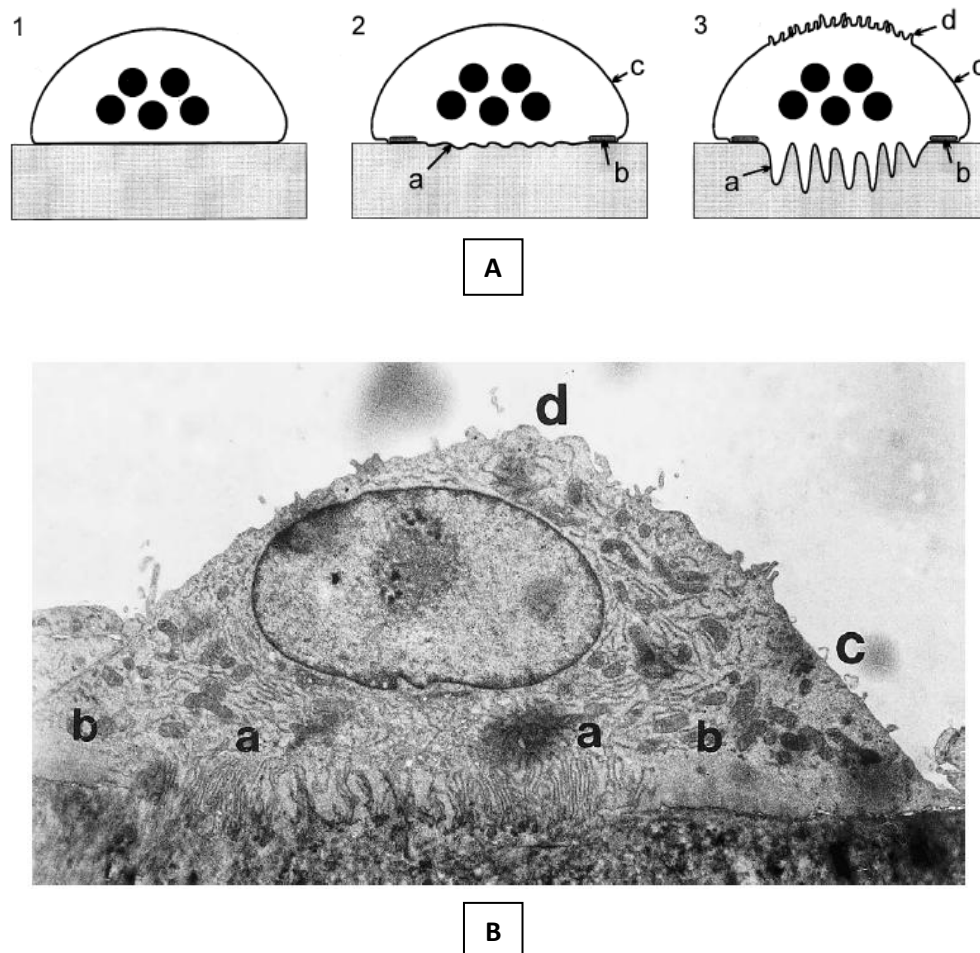


Figura 11. A – O osteoclasto em estado de não reabsorção é polarizado (1). Mas imediatamente após a adesão, na fase de reabsorção são identificados três domínios membranares (2): *ruffled border* (a), zona de selagem (b), e membrana basal (c). Uma vez que a degradação da matriz é iniciada (3), o quarto domínio membranar surge na membrana basal (d). **B** – imagem de microscopia eletrônica de transmissão de um osteoclasto na fase de reabsorção óssea, exibindo a *ruffled border* (a), zona de selagem (b), membrana basal (c), e domínio funcional secretor (d) (Väänänen H K 2002).

Conforme referido em cima, no processo de adesão os osteoclastos organizam o seu citoesqueleto de um modo muito específico. Nesta fase, os podossomas encontram-se densamente agregados e ao mesmo tempo a F-actina forma uma estrutura em forma de anel

que se encontra em contacto com a membrana plasmática (Lakkakorpi P T 1991). Proteínas associadas à actina como a vinculina e a talina organizam-se em torno do anel de actina e a co-localização da F-actina e da integrina $\alpha_v\beta_3$ observada inicialmente nos podossomas, desaparece (Lakkakorpi P T 1991). Isto sugere a formação de novas interações moleculares entre o citoesqueleto dos osteoclastos e a matriz extracelular na membrana plasmática abaixo do anel de actina (Väänänen H K 1995). A ultraestrutura desta região mostra uma ligação bastante forte entre a membrana da célula e a matriz, sendo que a primeira demarca a área de reabsorção. Apesar do papel da integrina $\alpha_v\beta_3$ neste processo não estar completamente esclarecido sabe-se que é essencial na adesão dos osteoclastos. Interferências na sua função podem ser usadas para inibir a reabsorção óssea, como já foi demonstrado experimentalmente (Duong L T 2002).

A reabsorção óssea envolve a dissolução da matriz inorgânica cristalina de HA, e a degradação do colagénio na lacuna de reabsorção extracelular. Estes processos requerem a secreção de quantidades elevadas de ácido e enzimas líticas para a lacuna de reabsorção, e ainda a endocitose¹ e posterior transcitose² dos produtos de degradação oriundos da lacuna (Väänänen H K 2004). Para conseguir responder a todas estas funções, os osteoclastos necessitam de muita energia, um considerável movimento de iões através da membrana plasmática e substituição intracelular intensiva de material membranar de um compartimento para o outro através do movimento vesicular (Väänänen H K 2004).

Quando um osteoclasto é estimulado para reabsorver osso, um grande número de vesículas intracelulares ácidas fundem-se com a membrana plasmática, que se encontra voltada para o osso, no interior do anel de actina (Palokangas H 1997). Como consequência, liberta-se ácido para o espaço de reabsorção e inicia-se a dissolução de cristais de HA. Adicionalmente, as bombas de prótons (H^+ - ATPase do tipo vacuolar) localizadas na *ruffled border* efetuam o bombeamento contínuo de prótons, diretamente do citoplasma para a lacuna de reabsorção extracelular (Blair H C 1989; Tuukkanen J 1986; Väänänen H K 1990). Consequentemente, a lacuna de reabsorção apresenta um pH ácido (Li Y P 1999). É necessário um número grande de mitocôndrias para garantir a produção de ATP e GTP para o bombeamento de prótons e movimento vesicular, respetivamente. Atualmente, não se sabe

¹ Processo no qual uma substância contida numa vesícula celular se funde com a membrana celular e penetra no seu interior.

² Uma forma de tráfego vesicular intracelular em que macromoléculas endocitadas são transferidas através da célula e libertadas (via exocitose) no domínio oposto da membrana plasmática.

qual dos dois processos – fusão de vesículas ácidas ou bombeamento de prótons através da *ruffled border* – será o mais importante para efetuar o transporte ácido para o interior da lacuna de reabsorção (figura 12). Nesse contexto, os ensaios experimentais são uma tarefa difícil devido à ocorrência de fusão contínua de novas vesículas e devido também ao facto da inibição da bomba de prótons levar a um aumento do pH nas vesículas intracelulares, o que conduz imediatamente à interrupção da fusão vesicular (Palokangas H 1997).

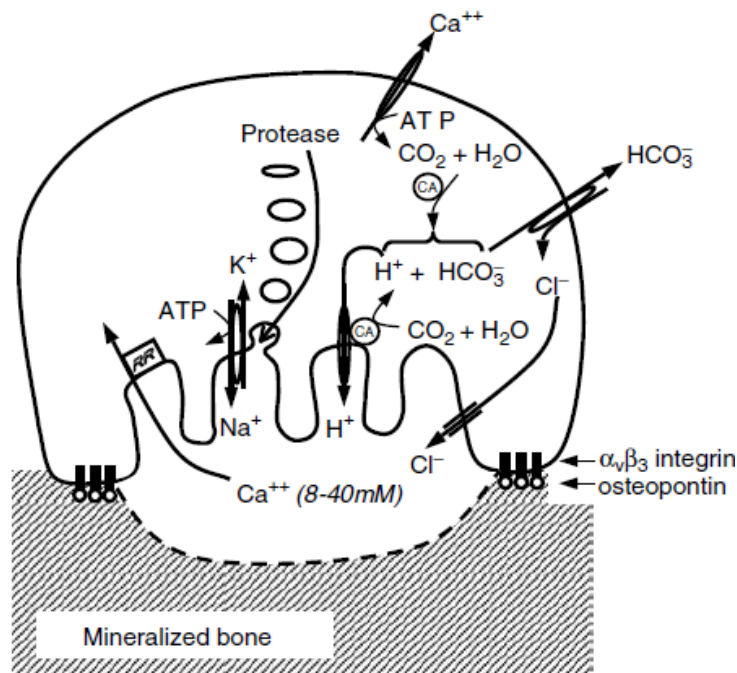


Figura 12. Acidificação e proteólise da matriz pelos osteoclastos. A ligação dos osteoclastos à matriz mineralizada através da osteopontina-integrina $\alpha_v\beta_3$ inicia a formação das *ruffled border* e o posicionamento das proteínas transportadoras de iões. A anidrase carbónica encontra-se localizada no citosol e ocorre o fornecimento de prótons (H^+) para o vacúolo através da ATPase. O desequilíbrio iónico resultante é corrigido pelo efluxo de HCO_3^- , através da troca $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$. A Ca^{2+} -ATPase é responsável pelo efluxo do cálcio. Metaloproteínases da matriz, formadas no complexo de Golgi, são secretadas para a lacuna de reabsorção (Carol V G 2005).

3.2.1 Células precursoras de osteoclastos

Os precursores das células osteoclásticas encontram-se no baço, medula óssea e células sanguíneas do sangue periférico (PBMC) (Faust J 1999).

Essas células chegam ao osso através da circulação sanguínea e fundem-se originando células multinucleadas (osteoclastos maduros). A osteoclastogénese é regulada por diferentes células, como os osteoblastos e células do estroma da medula óssea (Boyle W J 2003; Kierszenbaum A L 2002). Evidências experimentais sugerem que os osteoblastos mediam a formação osteoclástica e a reabsorção óssea através da produção de fatores solúveis e por contactos célula a célula (Takahashi N 1988; Suda T 1992). Assim, *in vitro*, os osteoclastos podem ser obtidos a partir de co-culturas com precursores mononucleados e osteoblastos ou células do estroma da medula óssea, na presença de fatores osteotrópicos, tais como $1\alpha,25(\text{OH})_2$ vitamina D_3 e dexametasona (Suda T 1992; Udagawa N 1990). De facto, este sistema de co-cultura foi o único método disponível para obter osteoclastos *in vitro*, antes da descoberta do sistema RANKL/RANK (Hong-wen D 2005). Desde esta descoberta que a formação e função dos osteoclastos podem ser mantidas *in vitro* somente pelas duas principais citocinas osteoclastogénicas: RANKL e M-CSF, mas também pelos osteoblastos/células do estroma da medula, que atuam principalmente ao nível da diferenciação dos osteoclastos, funcionando como fonte de M-CSF e RANKL (Suda T 1999).

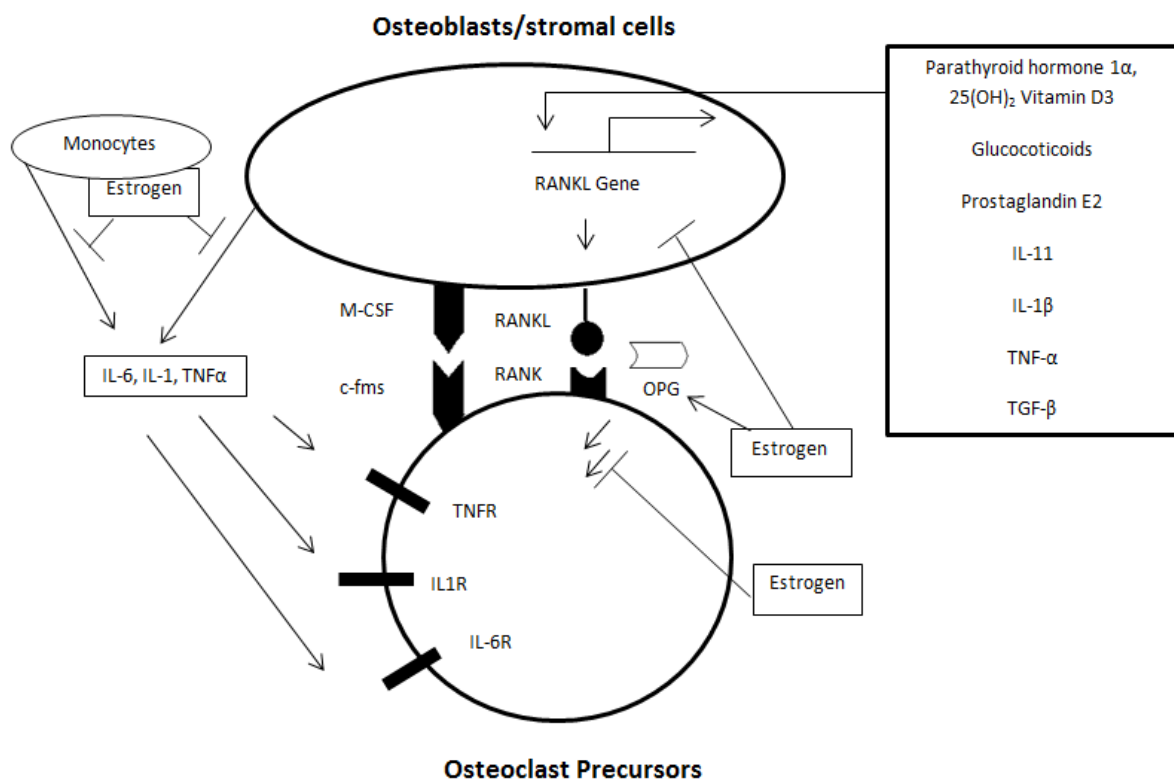


Figura 13. Regulação da expressão do gene RANKL. Adaptada de (Hong-wen D 2005).

A figura 13 representa a relação que existe entre a comunicação osteoblasto-osteoclasto e a osteoclastogénese. Os osteoblastos e as células do estroma expressam M-CSF e RANKL (RANKL ligado à membrana e RANKL solúvel), que se vão ligar aos seus respetivos recetores c-fms e RANK, expressos pelos precursores dos osteoclastos, estimulando a sua diferenciação (Hong-wen D 2005). Nos osteoclastos maduros, somente o RANKL é necessário para mediar a sua função e sobrevivência. Além disso, os osteoblastos ou as células do estroma produzem também um fator proteico denominado por OPG (*osteoprotegerin*), que é um recetor competitivo do RANKL. Este fator bloqueia a interação RANKL-RANK inibindo a reabsorção do osso e protegendo, assim, o tecido ósseo (Teitelbaum S L 2000; Suda T 1999).

Outras hormonas e citocinas, como a IL-1, fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), prostaglandina E₂ (PGE-2), IL-11 e PTH foram identificadas como moduladores da estimulação da expressão génica do RANKL em osteoblastos ou células do estroma (Lee S K 1999; Yasuda H 1998; Hofbauer L C 1999). Contrariamente, constatou-se que o TGF-β suprime a expressão desse gene (Takai H 1998).

Finalmente, o estrogénio encontra-se fortemente implicado na regulação da remodelação óssea (Hong-wen D 2005). O declínio dos níveis de estrogénio resulta da

cessação da função ovarina após o período da menopausa da mulher subjacente à patologia da osteoporose. É sabido que o estrogénio regula, em parte, a reabsorção óssea, pois modula a formação osteoclástica. Este é um fator potente que inibe a produção de três citocinas pró-osteoclastogénicas, IL-1, IL-6 e TNF- α (Manolagas S C 1995; Pacifici R 1996; Hofbauer L C 1999). Por outro lado, estimula a expressão da OPG, inibindo a osteoclastogénese (Hofbauer L C 1999; Eghbali-Fatourehchi G 2003; Shevde N K 2000).

3.2.2 Osteoclastogénese

Estudos anteriores sugeriam que *in vitro*, a osteoclastogénese só era observada em co-culturas efetuadas com células do baço ou da medula óssea e osteoblastos ou células do estroma (Takahashi N 1988). Há uma década atrás, foi identificado e caracterizado um fator osteoclastogénico essencial, RANKL, que mostrou ser semelhante a fatores descobertos anteriormente, tais como o ODF (*osteoclast differentiation factor*) e SOFA (*stromal osteoclast-forming activity*) (Costa-Rodrigues J 2010). Atualmente, pode-se afirmar que existem dois fatores de crescimento, M-CSF e RANKL, que são suficientes para promover a osteoclastogénese *in vitro* (Boyle W J 2003).

O M-CSF é uma glicoproteína com uma estrutura homodimérica e com as subunidades ligadas covalentemente entre si por ligações dissulfureto. O M-CSF é sintetizado por monócitos, granulócitos, fibroblastos, células endoteliais, por alguns linfócitos B e T e algumas linhas celulares tumorais, quando ativadas (Chitu V 2006; Fixe P 1997; Makrigiannakis A 2006; Perez-Amodio S 2004; Ryan G R 2001). Foi identificado como sendo um fator que estimula o desenvolvimento de colónias de macrófagos e granulócitos e que influencia a proliferação e diferenciação de células hematopoiéticas em macrófagos, principalmente a fusão de monócitos e a sua posterior diferenciação (figura 14) (Chitu V 2006; Fixe P 1997; Pixley F J 2004). O M-CSF é essencial para os primeiros passos osteoclastogénicos, pois aumenta a sobrevivência dos osteoclastos e dos seus precursores (Buijs J T 2009). Encontra-se, portanto, envolvido na formação, desenvolvimento e função dos osteoclastos (Wada T 2006; Chitu V 2006; Fixe P 1997; Makrigiannakis A 2006; Pixley F J 2004; Ryan G R 2001).

O RANKL, também conhecido como TRANCE (*TNF-related activation-inducing cytokine*), é uma proteína transmembranar homotrimérica do tipo II e pertence à superfamília do fator de necrose tumoral (Lacey D L 1998; Anderson D M 1997; Wong B R 1997). É sintetizado por diferentes células, tais como osteoblastos, células da medula óssea, linfócitos T

ativados e fibroblastos (Wada T 2006). Estimula a osteoclastogénese promovendo a diferenciação e a ativação osteoclástica através da ligação ao seu recetor RANK, na superfície dos precursores osteoclásticos (Burgess T L 1999; Li Y P 1999). A interação RANK/RANKL ativa algumas vias de sinalização que são cruciais para a osteoclastogénese, promovendo a fusão e ativação dos precursores dos osteoclastos (figura 14) e estimulação da expressão de vários marcadores osteoclásticos, como a TRAP (*tartrate-resistant acid phosphatase*) e catepsina K (CATK), anidrase carbónica 2 (CA2), recetor da calcitonina (CTR) e a integrina $\alpha_v\beta_3$ (recetor da vitronectina, VNR) (Boyce B F 2008; Boyle W J 2003). Esta interação pode ser regulada pela presença da OPG, ou fator inibidor da osteoclastogénese (OCIF), conforme mencionado na subsecção anterior.

A TRAP é uma enzima produzida abundantemente pelos osteoclastos e muito usada como marcador fenotípico deste tipo celular. É secretada para a circulação sanguínea e foi demonstrado que é um potencial marcador para a reabsorção óssea (Halleen J M 1996; Halleen J M 2000).

A CATK é um membro da família das proteases de cisteína, que é altamente expressa pelos osteoclastos ativados. Possui um papel importante no processo inicial de reabsorção óssea, mas também na degradação de colagénio tipo I, o principal componente da matriz óssea orgânica (Costa A G 2011).

A CA2 desempenha um papel fulcral no controlo da função dos osteoclastos e remodelação óssea, catalisando a formação de bicarbonato e de prótons a partir de dióxido de carbono e água (Oksala N 2010).

A integrina $\alpha_v\beta_3$ pertence à superfamília das proteínas de adesão denominadas por “recetores da vitronectina”, uma vez que se ligam à vitronectina que é uma proteína da matriz extracelular. Nos osteoclastos, a integrina $\alpha_v\beta_3$ é a predominante, quantitativa e funcionalmente (Horton M A 1997).

A calcitonina é uma hormona que inibe a reabsorção óssea (Feldman R S 1980; Hirsch P F 1969) e induz a contração de osteoclastos isolados de mamíferos (Chambers T J 1982). A contração como resposta à calcitonina parece ser uma característica exclusiva dos osteoclastos, que possuem recetores específicos para a hormona. A calcitonina inibe a formação de osteoclastos ao inibir a fusão dos seus precursores, assim como a sua subsequente diferenciação (Kurihara N 1991). Esta inibição da atividade osteoclástica tem como principal objetivo a preservação da massa óssea (Horton M A 1997). A calcitonina induz a fosforilação e ativação de ERK1/2 através de várias vias de sinalização, sendo uma delas a PKC (*protein kinase C*) (Baron R 2005). O fator GO6983 inibe a PKC, inibindo, deste modo, a adesão celular.

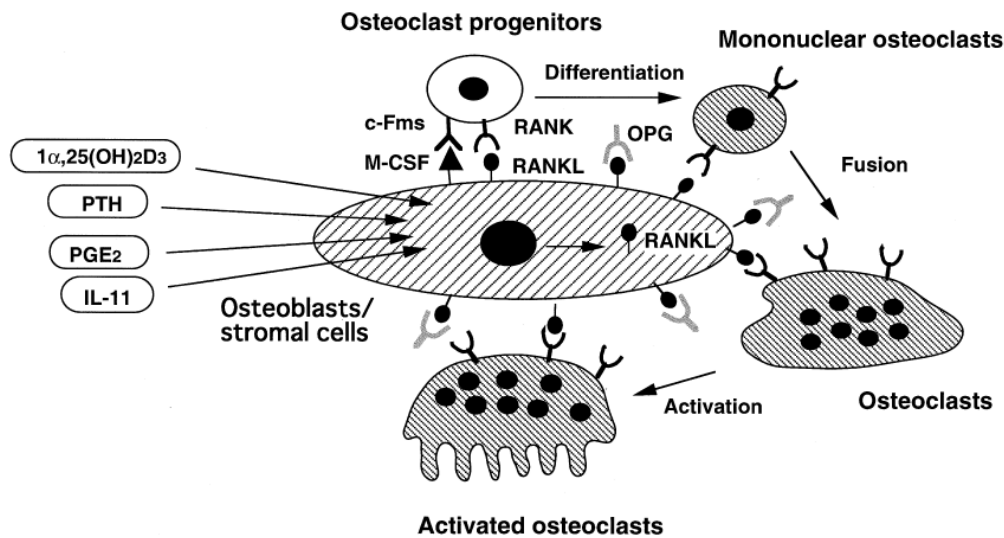


Figura 14. Representação esquemática da diferenciação e função dos osteoclastos reguladas pelo RANKL e M-CSF. Os progenitores e os osteoclastos maduros expressam o RANK, recetor do RANKL. Fatores osteotrópicos como $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, PTH e IL-11 estimulam a expressão do RANKL nos osteoblastos/células do estroma. RANKL e M-CSF associados à matriz ou à membrana expressos pelos osteoblastos/células do estroma são responsáveis por induzir a diferenciação dos osteoclastos em co-culturas. O RANKL é também estimulado diretamente pela fusão e ativação dos osteoclastos. Os osteoblastos/células do estroma são as principais células produtoras de OPG, um *decoy receptor* solúvel do RANKL. A OPG inibe fortemente a fusão, diferenciação e os processos de ativação dos osteoclastos, induzidos pelo RANKL (Takahashi N 2002).

A osteoclastogénese é um processo bastante complexo, que envolve múltiplas vias de sinalização intracelular, tais como a via NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) e a via MEK (*MAPK-ERK kinases*). A via mais relevante ativada pelo RANKL é a NF- κ B (Zhao Q 2007). O NF- κ B corresponde a um fator de transcrição, que é crucial para a diferenciação e para a ativação dos osteoclastos, mais especificamente, para a diferenciação de precursores mononucleares em osteoclastos multinucleados. É importante também para a transcrição de diversos genes que tipificam as células osteoclásticas (Hotokozaka H 2002). Eventuais falhas no fator NF- κ B originam osteopetrose, que é normalmente causada por diminuição das taxas de osteoclastogénese (Boyle W J 2003; Zhao Q 2007). O PDTC (*pyrrolidine dithiocarbamate*) é um inibidor conhecido da via NF- κ B.

As proteínas MAPK (*mitogen-activated protein kinases*) regulam diferentes atividades celulares, como expressão génica, mitose, diferenciação, proliferação e apoptose celular. As MAPK parecem estar envolvidas na osteoclastogénese através da via MEK (Ozaki K 1997).

Nesse contexto, uma inibição da via ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) leva à inibição da diferenciação osteoclástica (Yang Q 2008; Yang C R 2004; Kim H J 2007). As MAPK são inibidas por PD98,059 e a ERK é inibida pelo U0126.

Existem três subfamílias principais das MAPK que têm sido identificadas em células de mamíferos:

- 1) ERKs;
- 2) JNKs (*c-Jun N-terminal kinase*);
- 3) P38 MAPK.

É amplamente aceite que fatores de crescimento peptídicos e ésteres de forbol ativam preferencialmente as ERKs, enquanto que fatores de stress celular, como a hiperosmolaridade ou espécies reativas de oxigénio, podem ativar potencialmente as JNKs e p38 MAPK (Iwasaki S 1999; Schwenger P 1998; Cobb M H 1995). Vários trabalhos mostraram que a diferenciação osteoclástica se encontra relacionada com a ativação intracelular de várias vias de sinalização, incluindo a JNK e p38 (Rossa C Jr 2008). Foi mostrado também que o papel do RANKL no processo envolve também a via de sinalização p38 (Lee S E 2002). Os fatores SB202190 e o SP600125 inibem as vias p38 e JNK, respetivamente.

A prostaglandina E_2 é libertada na corrente sanguínea como resposta a infeções ou inflamações, atuando no cérebro de forma a induzir o aumento de temperatura. A ativação dos recetores superficiais dos osteoclastos para a PGE-2 (entre outros) potencia a osteoclastogénese *in vitro* e estimula a reabsorção do osso *in vivo* (Boyle W J 2003). A produção de PGE-2 pode ser inibida por ação da indometacina.

4. Biomateriais

A aplicação de biomateriais remonta à pré-história, como o indicia a descoberta de crânios com trepanações nas quais foram utilizadas placas de ouro e prata (Laurencin C T 2004). Está também descrita, há milhares de anos, a aplicação de implantes dentários e a utilização de fios de sutura. Mais recentemente, já no século XX, a utilização de biomateriais sofreu um forte impulso com o aparecimento de lentes intraoculares, próteses articulares, implantes mamários, próteses valvulares e vasculares, entre outros (Perez-Amodio S 2004; Ratner B D 2004). Nesse contexto, desde o início do século XX que os biomateriais começaram a ser fortemente usados em áreas como a medicina, odontologia e biotecnologia (Lemons J E 2004).

Um biomaterial, por definição, é “uma substância inerte farmacologicamente concebida para ser incorporada num sistema vivo, aumentando ou substituindo a função dos tecidos corporais ou órgãos” (Doremus R H 1992). Os principais fatores por detrás da utilização de biomateriais são as suas características: biocompatibilidade, biofuncionalidade, bem como a sua biodisponibilidade. É também importante que permitam uma boa adesão celular à sua superfície, tenham uma resistência mecânica adequada, não tenham características oncogénicas, sejam hemostáticos, esterilizáveis e, por fim, que a sua produção em grandes quantidades seja fácil e com custos aceitáveis.

Os biomateriais usados atualmente podem ser divididos em duas categorias distintas, biológicos e sintéticos. Os biomateriais biológicos são compostos por polipeptídeos (proteínas), polissacarídeos, ácidos nucleicos, poliésteres, hidroxiapatite ou seus derivados (Ikada Y 2002). Os biomateriais sintéticos subdividem-se em materiais metálicos, poliméricos, cerâmicos e compósitos. O desempenho dos biomateriais no organismo pode ser classificado de diferentes modos. Um dos modos encontra-se relacionado com as suas diferentes aplicações (tabela 1).

Tabela 1. Biomateriais no corpo.	
Sistema	Exemplo
Esquelético	Placas de osteossíntese, próteses
Muscular	Suturas, estimulador muscular
Circulatório	Válvulas cardíacas artificiais, vasos sanguíneos
Respiratório	Sistema de oxigenação
Tegumentar	Suturas, pele artificial
Urinário	Catéteres, <i>stents</i> , sistemas de diálise
Nervoso	Drenagem hidrocefálica, <i>pacemaker</i> cardíaco, estimulador nervoso
Endócrino	Células do ilhéu pancreático encapsuladas
Reprodutivo	Mamoplastia de aumento, outros substitutos cosméticos

Adaptado de (Joon B P 2003).

Nas últimas duas décadas houve um aumento muito significativo ao nível da investigação e desenvolvimento de novos biomateriais para aplicações ósseas, tendo sido criadas equipas multidisciplinares com a finalidade de ultrapassar as complicações e limitações decorrentes da colheita de enxerto ósseo autólogo (Banwart J C 1995). Nesse contexto, é importante salientar que a utilização de aloenxertos³ apresenta um elevado risco de transmissão de doenças infecciosas (Tomford W W 2000). Além disso, nem sempre existe a disponibilidade ou acessibilidade fácil para recorrer aos bancos de osso existentes, que se debatem habitualmente com problemas ao nível do insuficiente volume de colheitas. A utilização de xenoenxertos⁴ também apresenta várias desvantagens, nomeadamente a necessidade prévia de um tratamento antigénico de deslipidização e desproteínização, o que lhe reduz concomitantemente as suas capacidades osteoindutoras (Reddi A H 2003).

Anualmente, a nível mundial, são efetuados mais de 2 milhões de cirurgias ortopédicas nas quais se aplicam autoenxertos⁵ (Vaccaro A R 2002b). Efetivamente, este método é o que apresenta as melhores características de osteogénese, osteoindução e osteocondução (Khan S N 2000). É difícil concentrar estas três propriedades num material sintético, mas é possível adicionar a uma matriz osteocondutora (cerâmicos como a hidroxiapatite ou o fosfato tricálcico), agentes bioativos (como aspirado de medula e BMP's) que lhe forneçam as duas características restantes para substituírem com sucesso os auto e aloenxertos (Gutierrez M 2006).

³ Enxertos colhidos de um outro indivíduo da mesma espécie, geneticamente idêntico.

⁴ Enxertos provenientes de outras espécies animais (Exemplo: Dador (suíno) para recetor (humano)).

⁵ Enxertos colhidos do próprio indivíduo.

4.1 Requisitos dos biomateriais

Os biomateriais devem possuir propriedades específicas e flexíveis, de modo a atender às necessidades de uma aplicação particular. Entre outras, um biomaterial deve apresentar propriedades como ser compatível, anti-cancerígeno, resistente à corrosão, de baixa toxicidade e baixo desgaste (Ratner B D 1996; Park J B 1992).

De um modo geral, os requisitos dos biomateriais podem ser agrupados em quatro grandes categorias (Hin T S 2004):

1. **Biocompatibilidade:** o material não deve perturbar ou induzir uma resposta de rejeição por parte do hospedeiro, mas sim promover uma boa integração do implante no tecido. Uma resposta inflamatória inicial é esperada e é por vezes considerada crucial no processo de recuperação/cura. No entanto, a inflamação prolongada não é desejável, pois pode indicar que o tecido entrou em necrose ou pode ainda ser indicativo de incompatibilidade.
2. **Esterilizabilidade:** o material deve ser capaz de suportar as técnicas de esterilização. Estas incluem esterilização por radiação gama, a gás (óxido de etileno (ETO)) e autoclavagem a vapor.
3. **Funcionalidade:** a funcionalidade de um dispositivo médico depende da capacidade do material se moldar para exercer uma determinada função. O material deve ser moldado por processos de fabricação que não sejam muito dispendiosos. Por exemplo, o sucesso do *stent* usado na artéria coronária – que foi considerado o aparelho médico mais utilizado – pode ser atribuído ao seu processo de fabricação eficiente. Neste caso, a fabricação eficiente com aço inoxidável a quente, e tratamento a frio, melhorou significativamente a sua durabilidade.
4. **Conformabilidade:** o material pode ser facilmente manuseado, prensado sem que a sua integridade física seja afetada. É corrente dizer-se que existem muitos materiais que são candidatos porque são biocompatíveis. No entanto, a última etapa, de fabricação do material, é a que dificulta a produção real de materiais médicos (Hin T S 2004).

4.2 Classificação

Conforme referido anteriormente, os biomateriais podem ser classificados de duas formas: i) biomateriais biológicos, e ii) biomateriais sintéticos. A tabela 2 mostra as diferentes classificações e alguns exemplos de cada. Os materiais biológicos podem ser classificados em tecidos moles e tecidos duros. No caso dos materiais sintéticos, estes podem ser subdivididos em biomateriais metálicos, poliméricos, cerâmicos e compósitos (Hin T S 2004).

Tabela 2. Classificação dos biomateriais

Materiais biológicos	Materiais biomédicos sintéticos
1.Tecido mole Pele, Tendão, Pericárdio, Córnea	1.Polimérico Polietileno de elevado peso molecular (UHMWPE), Polimetilmetacrilato (PMMA), <i>Polyethyletherketone</i> (PEEK), Sílica, Poliuretano (PU), Politetrafluoretileno (PTFE)
2. Tecido duro Osso, Dentina, Cutícula	2.Metálico Aço inoxidável, Liga de cobalto crómio, Liga de titânio 3.Cerâmico Alumina (Al_2O_3), Zircónia (ZrO_2), Carbono, Hidroxiapatite [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$], Fosfato tricálcico [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$], vidro bioativo [$\text{Na}_2\text{O}(\text{CaO})(\text{P}_2\text{O}_3)(\text{SiO}_2)$], Aluminato de cálcio [$\text{Ca}(\text{Al}_2\text{O}_4)$] 4.Compósitos Fibras de carbono (CF)/PEEK, CF/UHMWPE, CF/PMMA, Zircónia/Sílica/BIS-GMA

Adaptado de (Hin T S 2004).

Os biomateriais podem ser classificados, também, segundo o seu comportamento biológico que é baseado na resposta do tecido hospedeiro (Bauer T W 2000):

1. **Bioinertes** – são os biomateriais que não provocam reação inflamatória/imunitária, encontrando-se ligados diretamente ao tecido recetor. Exemplos: titânio, zircónia e alumina.
2. **Biotolerados** – são moderadamente aceites pelo tecido recetor, sendo geralmente envolvidos por uma cápsula fibrosa. Exemplos: aço inoxidável, ligas de crómio-cobalto e PMMA.
3. **Bioativos** – nestes existe a formação de uma ligação direta aos tecidos vivos, pois geralmente têm na sua composição iões de cálcio e/ou fósforo (no caso dos

substitutos ósseos) que vão estabelecer uma ponte química com o osso envolvente. Exemplos: Hidroxiapatite, vidros bioativos.

4. **Reabsorvíveis** - biomateriais que são lentamente degradáveis e gradualmente substituídos pelos tecidos onde são implantados. Exemplos: fosfato tricálcico (TCP), vidros bioativos (Gutierrez M 2006).

4.3 Osteointegração

A osteointegração é definida como uma fixação direta de um implante pela formação de tecido ósseo em redor do mesmo, sem que haja crescimento de tecido fibroso na interface do implante ósseo. Este processo torna-se crucial para a estabilidade do implante a longo prazo (Al-Munajjed A A 2009).

Para o sucesso clínico de um substituto é necessário que a uma boa osteointegração esteja associada uma resistência mecânica necessária para o desempenho de funções de suporte. No sentido de potenciar as suas propriedades mecânicas e físico-químicas, podem combinar-se diferentes tipos de materiais que se complementam entre si. Por esta razão, muitos ortopedistas utilizam atualmente materiais compósitos para reconstrução óssea (Fleming J E Jr 2000), cujas propriedades são superiores às que resultariam da simples adição dos seus componentes.

Alguns princípios fundamentais da engenharia de tecidos devem também ser respeitados (Vacaro A R 2002a). Por exemplo, para ocorrer regeneração tecidual é necessária a presença de células capazes de formar novo tecido ósseo (osteogénese), sendo igualmente importante que estas consigam aderir, crescer e atravessar todo o material (osteocondução) e que estejam presentes fatores que estimulem a sua diferenciação fenotípica em osteoblastos (osteoindução) (Gutierrez M 2006). Exemplos de materiais osteocondutivos são os cerâmicos e materiais baseados em fosfato de cálcio (HA, biocompósitos, fosfato tricálcico).

O fator da osteointegração deve ser tido em conta na conceção dos biomateriais para implantes ortopédicos e deve ser suficientemente forte entre os materiais sintéticos e o tecido ósseo. Estudos têm demonstrado que quando os materiais nanoestruturados são colocados em contacto com superfícies celulares que possuam propriedades favoráveis, podem promover um aumento das interações com proteínas específicas, produzindo, assim, um estímulo mais eficiente face ao crescimento de novo tecido ósseo, em relação aos materiais convencionais (Degasne I 1999; Webster T J 2000a; Webster T J 2001b) (figura 15). Este pode ser um dos mecanismos subjacentes que explicam o porquê dos nanomateriais aparentarem ser mais eficazes do que os materiais convencionais, em relação ao crescimento tecidual.

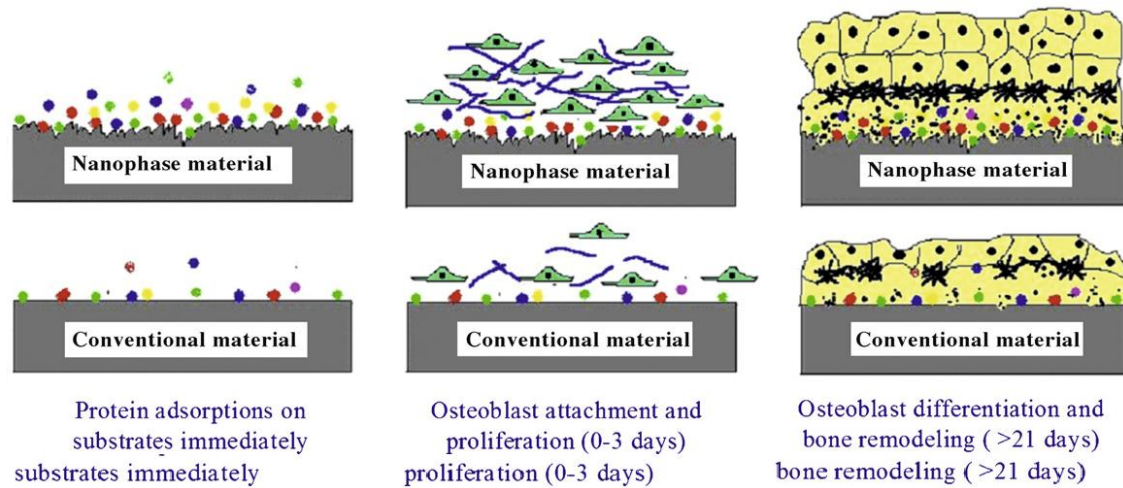


Figura 15. Ilustração esquemática do mecanismo pelo qual os nanomateriais podem ser mais eficazes, no que diz respeito à regeneração óssea, face aos materiais convencionais. As superfícies bioativas dos nanomateriais mimetizam as do osso natural, promovendo, deste modo, a existência duma maior quantidade de proteínas de adsorção e estímulos mais eficientes na formação óssea, em relação aos materiais convencionais (Zhang L 2009).

4.4 Hidroxiapatite

Estruturas de biocerâmicos compostas por HA são capazes de induzir crescimento ósseo. A principal limitação da HA está relacionada com as reduzidas propriedades mecânicas, que incluem baixa tenacidade à fratura e baixa resistência (Xu J L 2007).

Há uma grande semelhança entre a HA natural e a sintetizada em laboratório, no que diz respeito à sua composição química, biocompatibilidade e comportamento *in vivo*, pelo que a sua aplicação se generalizou não só na reparação óssea, no preenchimento de cavidades pós-exérese de tumores (Tadic D 2004) e osteotomias de valgização tibial (Santos J D 1999), como também no revestimento de próteses dentárias e ortopédicas (Lopes M A 1999b). No entanto, o osso natural contém outros elementos químicos, tais como magnésio, carbonato e silicato. Esses elementos ajudam na exposição do osso natural a uma maior atividade biológica e melhores propriedades mecânicas que a HA sintética. De facto, a deficiência em silício pode ocasionar uma formação óssea anormal, o que evidencia a influência desse elemento na mineralização óssea e seu metabolismo, bem como na síntese de colagénio (Xu J L 2007). Adicionalmente, para além da HA, a componente orgânica da matriz óssea desempenha também um papel muito importante nas características físicas desse tecido.

A HA é um fosfato de cálcio cuja composição é $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (relação molar Ca/P = 1,67) pelo que apresenta, ao contrário do fosfato tricálcico, uma reabsorção/remodelação muito lenta, levando a que se mantenha no organismo durante anos (Lopes M A 1999a). A HA é um biomaterial bioativo e osteocondutor, o que permite que esta estabeleça ligações químicas fortes com o tecido ósseo hospedeiro (Ferraz M P 2004; Murugan R 2005; Wahl D 2006; Chen Q Z 2004), criando condições locais adequadas para formação óssea quando implantado (Watari F 2007; Le Nihouannen D 2007; Le Nihouannen D 2005). Atualmente, a indústria da saúde reconhece a HA como um bom material sintético para enxerto ósseo (Kalita S J 2007), devido à sua semelhança química e estrutural com o osso natural (Murugan R 2005).

4.4.1 HA Micro- e Nanoestruturada

A HA nanoestruturada é o principal componente do osso (Wei G 2004; Murugan R 2005). Atualmente muitas metodologias de produção de HA micro- e nanoestruturada têm sido descritas (Murugan R 2005), e têm sido amplamente utilizadas em diversas aplicações clínicas de diversas formas (pós, grânulos, blocos porosos ou densos, filmes espessos e finos) (Kong L B 2002; Kalita S J 2007; Habibovic P 2008; Simon J L 2007; Clarke S A 2007). No entanto, com o advento da nanotecnologia, a HA nanométrica tem sido preparada e estudada no intuito de poder melhorar as propriedades biológicas da HA (por exemplo, adsorção, configuração e bioatividade) (Wei G 2004; Murugan R 2005). Portanto, modulando a estrutura da HA é possível melhorar a adesão dos osteoblastos e posteriormente alcança-se uma funcionalidade superior a longo prazo. Webster e os seus colaboradores (Webster T J 2000a; Webster T J 2000b; Webster T J 2001c) descobriram que o melhoramento das funções dos osteoblastos, induzido pela estrutura nanométrica da HA, se verifica essencialmente na adesão e proliferação celulares, bem como na síntese de fosfatase alcalina e deposição de cálcio. A topografia das partículas nanométricas e a molhabilidade são propriedades dos nanocerâmicos que não só promovem o aumento seletivo da adsorção da vitronectina (uma proteína que promove a adesão dos osteoblastos) como afetam também as conformações que melhoram as funções dos osteoblastos (Ferraz M P 2004). Além disso, um aumento considerável nas funções celulares de osteoclastos de ratinhos (como a síntese de TRAP e a formação de *pits* de reabsorção) tem sido observado em superfícies nanoestruturadas em relação às superfícies convencionais (Webster T J 2001a). É de realçar, no entanto, que nesse estudo a HA foi preparada de uma forma diferente da efetuada no presente trabalho.

A nanoHA é mecanicamente robusta e pode servir de apoio e proteção para o tecido ósseo durante o procedimento de implantação e dentro do próprio corpo. Estas propriedades fazem da nanoHA uma plataforma óssea *in vivo* ou *ex vivo* atraente, no campo da engenharia de tecidos (Webster T J 2007). De facto, a maioria dos materiais nanoestruturados (com dimensões abaixo dos 100 nm) recentemente desenvolvidos para implantes ósseos, como os cerâmicos, polímeros e metais (Xu T 2007) aparentam ter uma resposta mais dinâmica quando comparados com materiais de maiores dimensões/convencionais (com cristais de dimensões acima dos 100 nm) (Mateus A Y 2007). Estes materiais apresentam *performances* melhoradas devido à sua relação superfície/volume que lhes confere uma área superficial maior, promovendo assim uma reatividade superficial maior (efeitos eletrónicos sinérgicos/química de superfície aumentada) (Murugan R 2005; Kalita S J 2007). Os biocerâmicos de HA podem ser aplicadas nas suas formas densa ou porosa. No entanto as estruturas porosas possuem uma

área superficial muito maior, permitindo uma boa fixação e crescimento ósseo (Potoczek M 2009; Okamoto M 2006). Os poros devem-se encontrar abertos e interconectados entre si para permitirem a migração celular, neovascularização, circulação de fluidos, nutrientes, gases e para remover resíduos metabólicos (Le Nihouannen D 2005). Comparando com blocos prismáticos de HA pré-moldados, os grânulos macroporosos e nanoestruturados podem facilmente preencher defeitos ósseos ou espaços vazios de formas irregulares e específicas do doente, resultantes, por exemplo, de cirurgias ortopédicas e periodontais (Clarke S A 2007; Tas A C 2008). Os biocerâmicos porosos podem também ser preparados a partir de estruturas porosas naturais, tais como algas, corais, ou de osso trabecular (Joschek S 2000; Turhani D 2005). As suas composições são alteradas, mas mantêm a sua estrutura original.

5. Objetivos

Este trabalho encontra-se dividido em duas partes distintas. A primeira parte (Capítulo II) teve como objetivo avaliar o envolvimento de diferentes vias de sinalização na diferenciação de células osteoclásticas, obtidas a partir de precursores mononucleados isolados de sangue periférico humano, quando cultivadas em diferentes condições de cultura (ausência ou presença dos indutores osteoclastogênicos M-CSF e RANKL). Para tal, foram efetuados diversos testes, tais como, quantificação da proteína, quantificação da atividade da TRAP e contagem de células multinucleadas positivas para a TRAP. A segunda parte deste trabalho (Capítulo III) teve como objetivo caracterizar o comportamento osteoclastogênico de culturas de precursores osteoclásticos (mantidos na ausência ou presença de M-CSF e RANKL) efetuadas sobre três superfícies distintas de HA (micro e nanoestruturada). Foi, então, efetuada uma caracterização exaustiva dos três tipos de HA, a fim de compreender melhor as respostas celulares obtidas. Finalmente, foi analisado o envolvimento de várias vias de sinalização no comportamento celular.

Capítulo II - Culturas de Osteoclastos

1. Introdução

O tecido ósseo está continuamente num processo de remodelação, que se diz ser a base do metabolismo ósseo. A massa óssea é mantida através de um balanço constante entre a sua formação e destruição. Várias patologias ósseas, como a osteoporose refletem o aumento da função dos osteoclastos em relação à função dos osteoblastos (Teitelbaum S L 2007). Tendo em conta o papel fundamental que os osteoclastos possuem em diversas patologias (Datta H K 2008) e na resposta na colocação de implantes, tem sido feito um grande esforço no intuito de tentar aprofundar o conhecimento acerca da biologia desta célula (Datta H K 2008) e do seu modo de atuação perante o meio envolvente.

Existem vários modelos de culturas de células ósseas humanas e de roedores que têm contribuído para a elucidação de aspetos fisiopatológicos do metabolismo ósseo. No entanto, cada um apresenta limitações próprias. As culturas primárias de células ósseas humanas reproduzem, em princípio, mais fielmente a atividade óssea *in vivo*; contudo, estas podem perder o fenótipo característico quando se cultivam por tempo prolongado (Schmidt R 1993; Fernandes M H 1997, 1995). A expressão de um determinado fenótipo celular em cultura depende fundamentalmente do material biológico utilizado (e da sua manipulação) e das condições de cultura, nomeadamente, meio de cultura, presença de substâncias que afetam a proliferação e diferenciação celular e o tempo de cultura (Fernandes M H 1998).

Este estudo, em particular, teve como objetivo avaliar a diferenciação de células osteoclásticas obtidas a partir de precursores mononucleados isolados de sangue periférico humano e cultivadas em diferentes condições de cultura (ausência ou presença de M-CSF e RANKL). Pretendeu-se, também, investigar qual o envolvimento de diferentes vias de sinalização importantes no processo da osteoclastogénese. Para tal, foram efetuados diversos testes, tais como, quantificação do conteúdo proteico, quantificação da atividade da TRAP e contagem de células multinucleadas positivas para a TRAP, na ausência/presença de diferentes inibidores das vias de sinalização para a osteoclastogénese.

2. Materiais e Métodos

2.1 Isolamento de células mononucleadas de sangue periférico humano (PBMC)

No âmbito deste trabalho laboratorial foram utilizados precursores osteoclásticos isolados a partir de sangue humano proveniente de doadores do sexo masculino com idades compreendidas entre os 25 e os 35 anos.

O sangue foi diluído na proporção de 1:2 em PBS suplementado com 2 mM de EDTA e foi transferido para tubos que continham Ficoll-Paque™ PREMIUM (GE Healthcare Bio-Sciences). Após centrifugação a 400g durante 30 minutos, as PBMC foram recolhidas e transferidas para um tubo onde foram novamente lavadas com PBS + 2 mM de EDTA e foram centrifugadas a 400g durante 10 minutos. Por fim, foi efetuada a contagem destas mesmas células em um hematocítmetro (Celltac MEK-5103). As PBMC foram semeadas, em placas com 96 poços, a uma densidade de $1,5 \times 10^6$ células/cm².

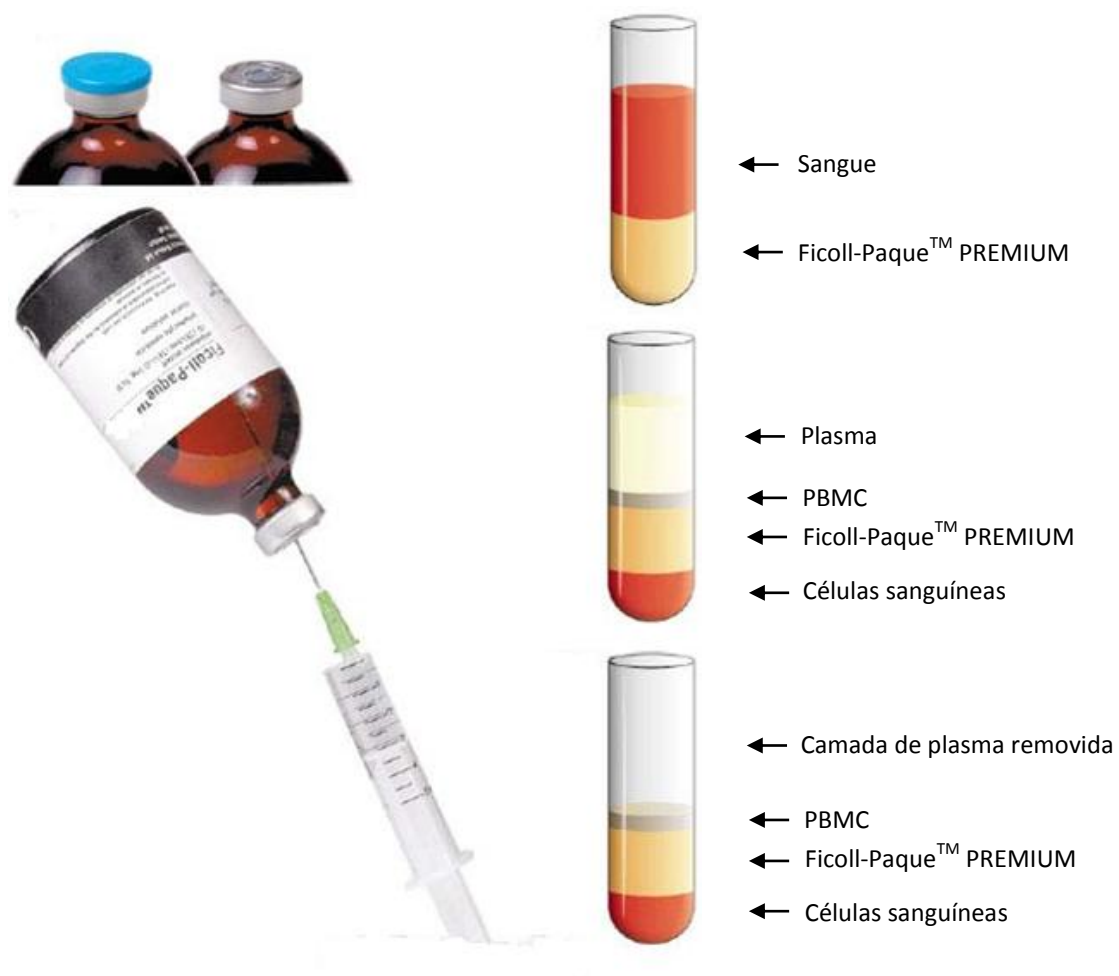


Figura 16. Isolamento das PBMC usando Ficoll-Paque™ PREMIUM. Imagem adaptada de <http://www.ebiotrade.com/newsf/2005-10/20051020104642.htm>.

2.2 Culturas celulares de osteoclastos

As culturas celulares de osteoclastos foram realizadas em α -MEM (*Alpha modified minimum essential medium*) suplementado com 30% (V/V) de soro humano, proveniente dos mesmos doadores das PBMC, 100 IU/mL de penicilina, 2,5 μ g/mL de estreptomicina, 2,5 μ g/mL de anfotericina e 2 mM de L-glutamina, e foram mantidas na ausência de qualquer estímulo osteoclástico, ou seja, em meio base (BM), e na presença de fatores que promovem a osteoclastogênese, 25ng/mL M-CSF e 40ng/mL RANKL (M+R) (Boyle W J 2003; Väänänen H K 2008).

As células foram tratadas com inibidores de vias de sinalização importantes para a osteoclastogênese. Os inibidores que foram usados nesta experiência encontram-se agrupados na tabela 3.

Tabela 3. Inibidores testados com suas respectivas concentrações e vias de sinalização inibidas.

Inibidor	Concentração do Inibidor (μ M)	Vias de sinalização inibidas
U0126	1	MEK (MAPK/ERK kinases) - ERK
PDTC	10	NF-kB
GO6983	5	PKC
PD98,059	10	MEK (MAPK/ERK kinases) - MAPK
SP600125	10	JNK
SB202190	5	p38
Indometacina	1	PGE-2

As culturas celulares foram mantidas numa atmosfera húmida contendo 5% de CO₂, a 37°C, durante 21 dias. O meio de cultura foi renovado uma vez por semana. Foram retiradas amostras ao sétimo, décimo quarto e vigésimo primeiro dias, no intuito de quantificar o conteúdo proteico, a atividade da TRAP e a proceder à contagem de células multinucleadas positivas para a TRAP.

2.3 Quantificação da atividade da TRAP

A atividade da TRAP foi quantificada usando o método colorimétrico de hidrólise de *p*NPP (*para*-nitrofenol fosfato) que é um substrato cromogénico (figura 17). Este substrato é hidrolisado originando *para*-nitrofenol, que apresenta cor amarela em meio alcalino.

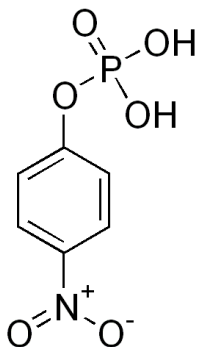


Figura 17. Estrutura química do *p*NPP.

(<http://en.wikipedia.org/wiki/File:Para-Nitrophenylphosphate.png>).

As culturas celulares foram lavadas 2 vezes com PBS e foram solubilizadas com 0,1% Triton X-100 (V/V) durante um período de 30 minutos à temperatura ambiente. Após a incubação adicionou-se uma solução de 22,5mM *p*NPP preparada em 0,225M de acetato de sódio, 0,3375M de KCl, 0,1% Tx-100, 22,5mM de tartarato de sódio, 0,225mM de ferro, a pH 5,8. Seguiu-se uma incubação de 1 hora a 37°C, após a qual se adicionou NaOH 5M de modo a parar a reação. Por fim, foi determinada a absorvância a 400nm num leitor ELISA (Synergy HT, Biotek). A atividade da TRAP foi normalizada tendo em conta a proteína celular total para cada condição e os seus resultados foram expressos em $nmol/min. \mu g_{proteína}^{-1}$.

2.4 Quantificação da Proteína Total

A quantificação da proteína foi determinada utilizando o método de Bradford (Bradford M M 1976). Para tal, as culturas celulares foram lavadas duas vezes com PBS, seguindo-se a solubilização das mesmas com NaOH 0,1M. Após incubar 10 a 15 minutos à temperatura ambiente adicionou-se, água destilada para diluir as amostras, sendo adicionado posteriormente reagente de Bradford (Fluka). Após homogeneização, mediu-se a absorvância a 595nm num leitor ELISA (Synergy HT, Biotek).

2.5 Coloração histoquímica da TRAP

As culturas foram lavadas duas vezes com PBS, seguindo-se uma fixação com formaldeído 3,7% durante 15 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, lavaram-se as células com água destilada. As células foram coradas com o *Acid Phosphatase Leukocyte* (TRAP) kit (Sigma), de acordo com as instruções do fabricante. Para tal, as células foram incubadas com 0,12mg/mL de naftol AS-BI, na presença de 6,76nM de tartatato e 0,14mg/mL Fast Garnet GBC, durante 1 hora a 37°C. Após incubação, as amostras foram lavadas com água destilada e coradas com hematoxilina durante 2 minutos. Procedeu-se a uma nova lavagem com água e visualizaram-se as camadas celulares ao microscópio ótico. As células multinucleadas e positivas para a TRAP presentes em cada condição experimental foram contadas.

3. Resultados

3.1 Quantificação da atividade da TRAP e de Células Osteoclásticas

A atividade da TRAP e o número de células osteoclásticas foram quantificados a partir de PBMC que foram mantidas na ausência ou presença de inibidores de vias de sinalização.

Foram feitos dois ensaios, um deles em meio base (sem nenhuma suplementação osteoclastogénica) e na presença dos dois fatores osteoclastogénicos, o M-CSF e o RANKL.

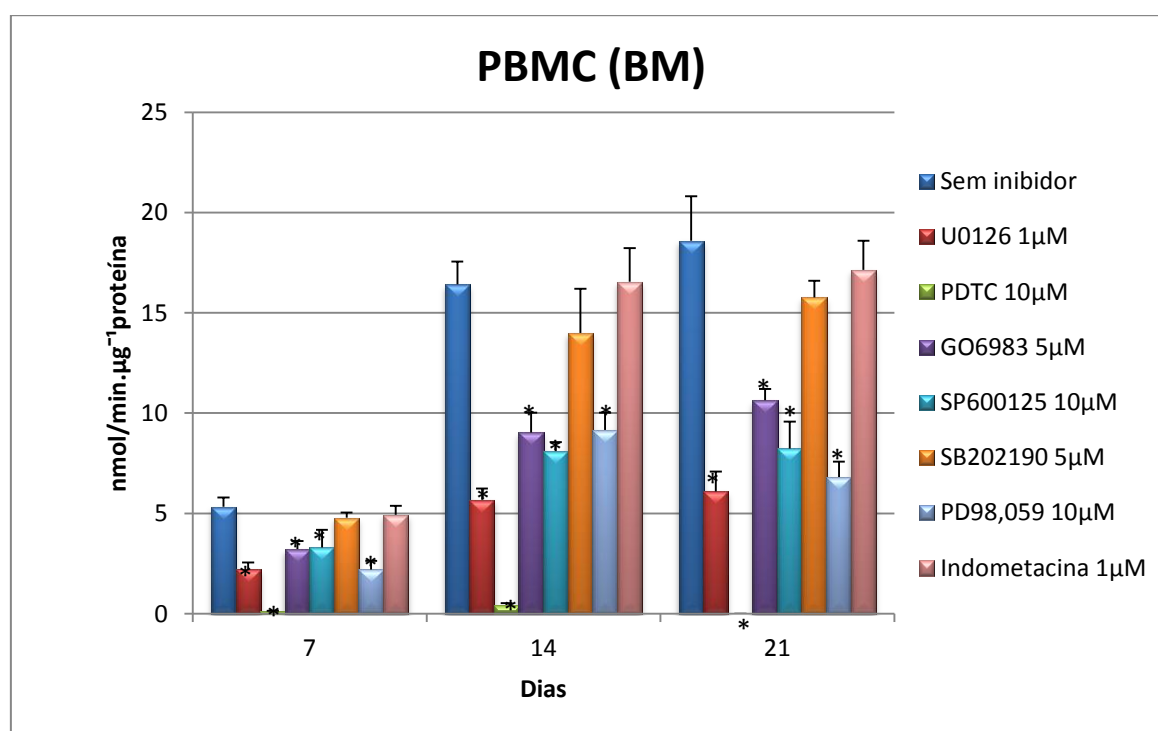


Figura 18. Atividade da TRAP normalizada com o conteúdo proteico em PBMC (BM) durante 7, 14 e 21 dias; * significativamente diferente do controlo.

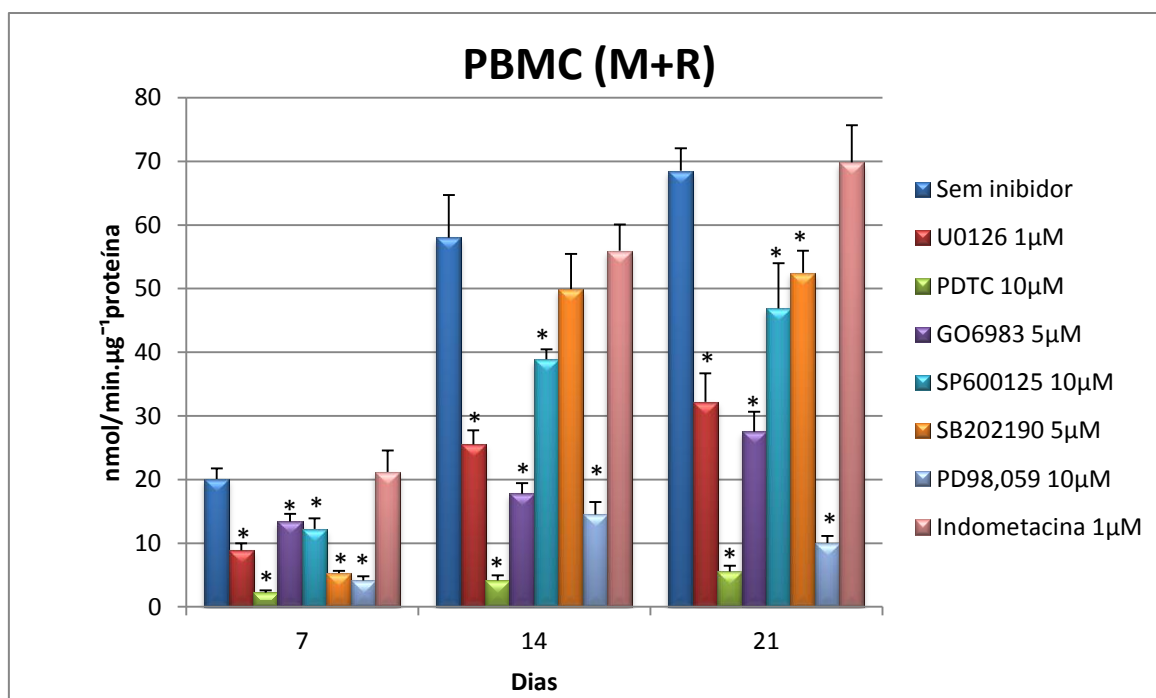


Figura 19. Atividade da TRAP normalizada com o conteúdo proteico em PBMC (M+R) durante 7, 14 e 21 dias; * significativamente diferente do controle.

Verificou-se que as culturas de PBMC que foram colocadas em meio base (figura 18) quando comparadas com as que foram cultivadas na presença dos dois fatores osteoclastogênicos, M-CSF e RANKL (figura 19), apresentaram um valor muito baixo para a atividade da TRAP.

A presença de PDTC induziu uma diminuição total (BM) ou quase total (M+R) da atividade da TRAP. Adicionalmente, os inibidores U0126, GO6983, SP600125 e PD98,059 também provocaram uma diminuição muito significativa da atividade enzimática, sendo que o SP600125 pareceu ter um efeito inibitório mais acentuado nas culturas mantidas em BM. O inibidor SB202190 não afetou significativamente a atividade da TRAP nas culturas mantidas na ausência de estímulos osteoclastogênicos, mas na presença destes inibiu a resposta celular. Finalmente, a presença de indometacina não afetou o comportamento das culturas.

A coloração das culturas celulares para a TRAP e para os núcleos permitiu comprovar a existência de células osteoclásticas em cultura. A figura 20 apresenta uma imagem representativa da coloração histoquímica da TRAP.

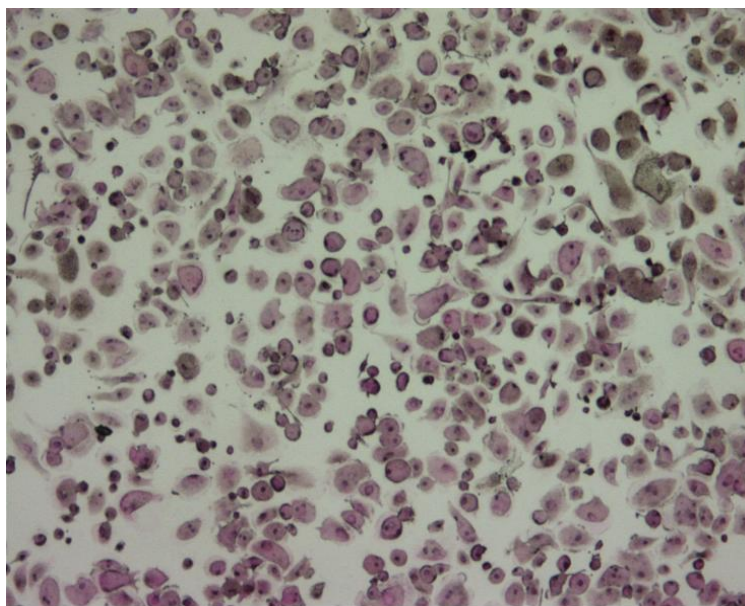


Figura 20. Visualização das células multinucleadas e positivas para a TRAP em culturas de PBMC mantidas na presença de M-CSF e RANKL e na ausência de inibidores de vias de sinalização.

Após visualização das culturas celulares, procedeu-se à contagem das células multinucleadas positivas para a TRAP (figuras 21 e 22).

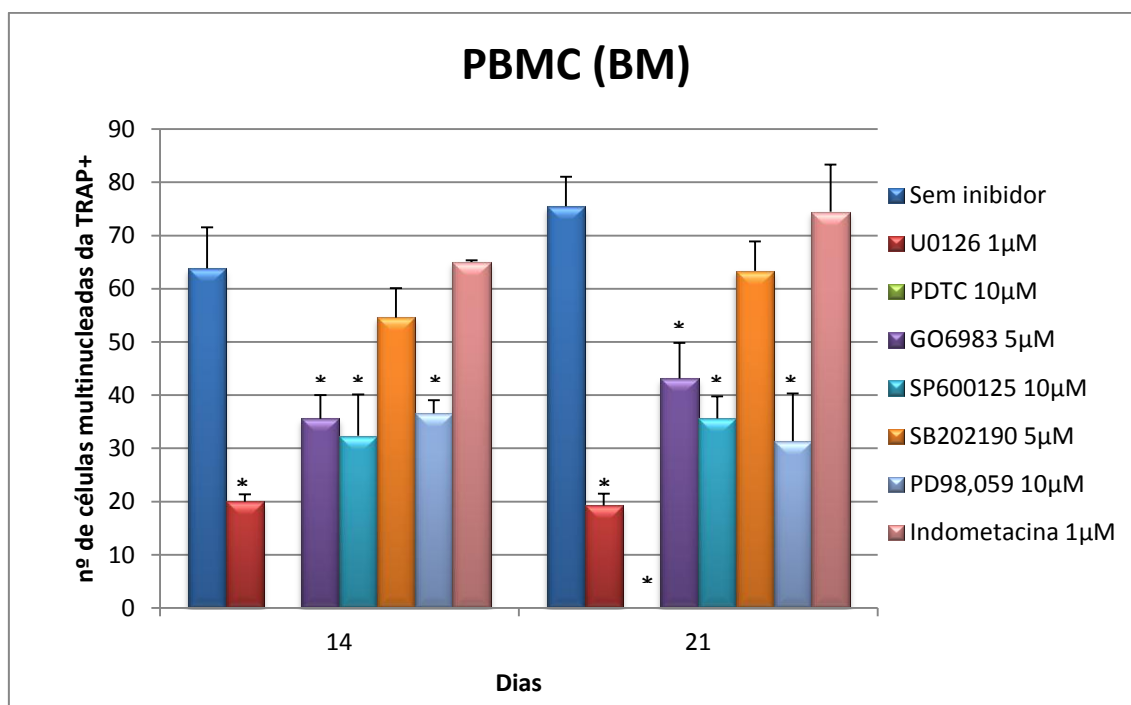


Figura 21. Quantificação de células osteoclásticas em culturas de PBMC (BM); * significativamente diferente do controlo.

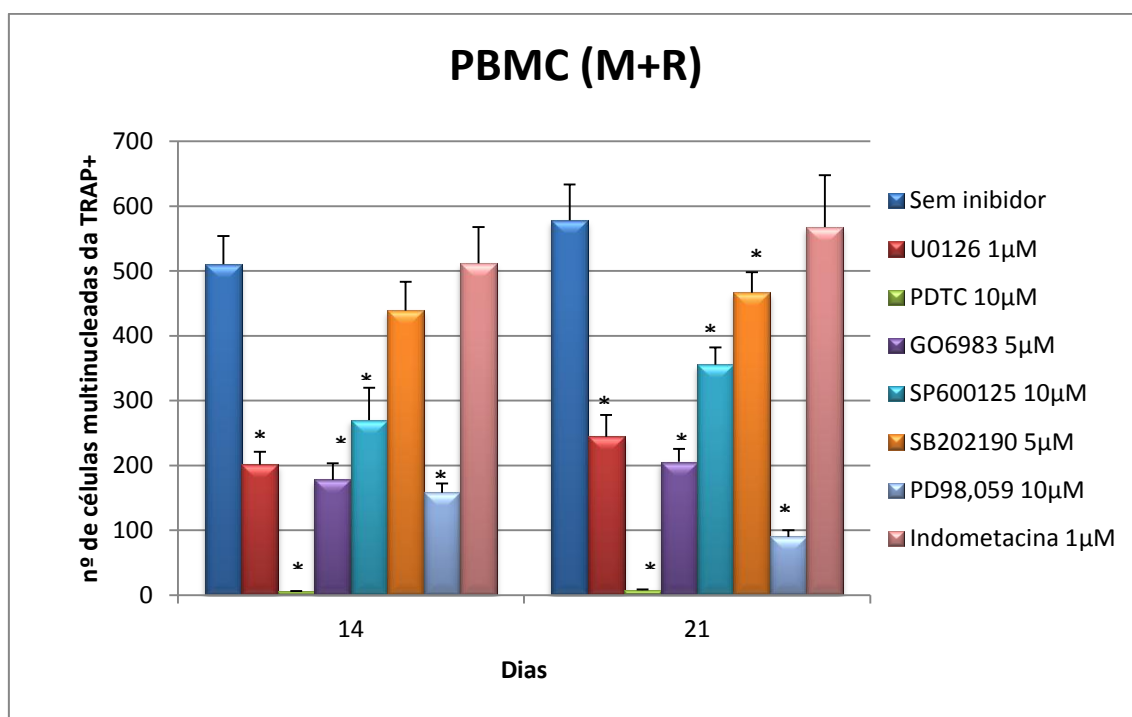


Figura 22. Quantificação de células osteoclásticas em culturas de PBMC (M+R); * significativamente diferente do controlo.

Tendo em conta os dois gráficos anteriores é possível verificar que as culturas celulares suplementadas com M-CSF e RANKL apresentaram um nº de células osteoclásticas cerca de 7x superior ao obtido nas culturas efetuadas em BM. De uma maneira geral, os resultados obtidos estão de acordo com os observados para a quantificação da atividade da TRAP.

Não foram apresentados dados do sétimo dia de cultura, pois após uma semana de cultura ainda não se observam osteoclastos na camada celular.

4. Discussão

A atividade da TRAP foi quantificada usando o método da hidrólise de *p*NPP e foi posteriormente normalizada ao teor proteico das culturas celulares, determinado pelo método de Bradford. Adicionalmente, procedeu-se a uma técnica de coloração histoquímica da TRAP. Ambas as técnicas apresentaram uma elevada sensibilidade, permitindo distinguir o comportamento das células quando testadas em diferentes condições, isto é, em meio base ou na presença de fatores osteoclastogénicos (M-CSF e RANKL), com ou sem inibidores osteoclásticos. Todas estas condições foram testadas usando culturas celulares PBMC. Foi possível observar que a presença de estímulos osteoclastogénicos induziu um comportamento celular distinto das culturas em BM, observando-se que a resposta osteoclastogénica foi muito superior na primeira condição. Adicionalmente, verificou-se que há vias de sinalização que apresentam uma importância relativa na osteoclastogénese idêntica nas duas condições, enquanto outras apresentam uma influência diferente consoante as culturas são mantidas na ausência ou presença de M-CSF e RANKL.

Como a presença de PDTC induziu uma diminuição total (BM) ou quase total (M+R) da atividade da TRAP pode-se concluir que a correspondente via de sinalização (NF- κ B) foi bastante importante para a osteoclastogénese nas condições de cultura utilizadas. Tendo em conta os resultados obtidos na presença dos inibidores U0126, GO6983, SP600125 e PD98,059 também podemos constatar que as vias de sinalização correspondentes (ERK, PKC, JNK, MAPK, respetivamente) possuíam uma relevância significativa para este processo. O inibidor SB202190 não afetou significativamente a atividade da TRAP nas culturas BM, mas em M+R inibiu a resposta celular, logo, nesta última condição, a via de sinalização p38 contribuiu de forma parcial para a osteoclastogénese. Já a presença de indometacina não afetou o comportamento das culturas, o que permite concluir que aparentemente a produção de PGE-2 não está envolvida no comportamento osteoclastogénico observado.

Capítulo III - Culturas de Osteoclastos em superfícies de Hidroxiapatite micro- e nanoestruturada

1. Introdução

Os osteoclastos são células multinucleadas responsáveis pela reabsorção óssea. O controlo do seu desenvolvimento e da sua função depende em grande parte de alguns fatores, como o TNF- α , a OPG, o M-CSF e o RANKL (Boyle W J 2003; Teitelbaum S L 2000), já mencionados no primeiro capítulo. O RANKL e a OPG são produzidos por diversos tipos de células, principalmente pelos osteoblastos. O M-CSF é produzido pelos monócitos, granulócitos, células endoteliais e fibroblastos e também pelos linfócitos B e T e algumas linhas celulares, quando ativadas (Chitu V 2006; Fixe P 1997; Makrigiannakis A 2006; Pixley F J 2004). Atualmente é possível obter células osteoclásticas a partir de PBMC, suplementando as últimas com os fatores recombinantes solúveis M-CSF e RANKL (Fujikawa Y 1996; Fuller K 1998). Estes sistemas de culturas celulares oferecem a oportunidade de estudar o desenvolvimento e a função dos osteoclastos em estudos de biocompatibilidade celular, em contraste com outros métodos que usam osteoclastos maduros obtidos a partir de espécies de aves ou animais em fase neonatal (Spence G 2010).

A compreensão dos fenómenos celulares e moleculares envolvidos na interação entre o tecido ósseo e o biomaterial é fundamental, nomeadamente através do conhecimento do papel dos osteoclastos na interface tecido ósseo/biomaterial, já que os osteoclastos possuem a capacidade de reabsorver alguns biomateriais, promovendo, dessa forma, a sua substituição por osso novo (Schilling A F 2004). Este evento é crucial para que o processo da regeneração óssea ocorra com sucesso. As propriedades físico-químicas do material, como as características da superfície, porosidade, composição química e tamanho dos cristais, influenciam o processo de biocompatibilidade e de osteocondução (van Eeden S P 1994; Chesmel K D 1995; Gomi K 1993). A apatite do osso não é nada mais do que hidroxiapatite parcialmente substituída e não-estequiométrica com tamanho de grão de escala nanométrica (Rubin M A 2003). A estrutura nanométrica da apatite óssea e algumas outras moléculas encontradas no tecido ósseo indiciam que as células ósseas estão adaptadas para interagir com superfícies que apresentam uma morfologia nanométrica. Neste contexto, vários estudos correlacionam positivamente a adesão e função das células ósseas com características superficiais nanométricas de potenciais implantes (Webster T J 2000a; Price R L 2004; Price R L 2003; Gutwein L G 2002; Elias K L 2002; Kay S 2002; Webster T J 1999; Webster T J 2004; Webster T J 2001b; Webster T J 2000b). A HA apresenta uma composição química muito próxima da apatite natural do osso humano, mimetizando a matriz extracelular inorgânica do tecido ósseo. Apresenta uma elevada biocompatibilidade, sendo, atualmente, um dos biomateriais

CAPITULO III - Culturas de Osteoclastos em superfícies de HA micro- e nanoestruturada mais utilizados em contextos de reparação óssea. Assim, a influência das características de superfície da HA para o processo de osteointegração reveste-se de particular importância para o sucesso dos implantes (Zhao Y 2007).

O objetivo do presente estudo prendeu-se com a avaliação dos efeitos da superfície de HA micro- e nanoestruturada (mHA, nHA1000 e nHA830 – microHA sinterizada a 1300°C, nanoHA sinterizada a 1000°C e a 830°C, respetivamente) na ativação e diferenciação espontânea e induzida de células osteoclásticas humanas, obtidas a partir de precursores mononucleados isolados de sangue periférico. Com o intuito de tentar entender de que modo é que as características intrínsecas dos biomateriais podem afetar a resposta biológica das células, foi efetuada uma caracterização extensiva dos discos de HA. As culturas celulares foram efetuadas na ausência ou na presença de indutores osteoclastogénicos M-CSF e RANKL (Boyle W J 2003; Datta H K 2008). Estas foram caracterizadas através de diferentes técnicas de biologia celular e molecular, nomeadamente, quantificação da atividade TRAP, atividade de reabsorção de HA, presença de células com anéis de actina, VNR e CTR, e caracterização morfológica de células. Adicionalmente, investigou-se o envolvimento de várias vias de sinalização importantes para a osteoclastogénese na resposta celular observada.

2. Materiais e Métodos

2.1 Preparação e caracterização dos discos de HA micro- e nanoestruturada

Foram preparados discos de HA microestruturada (Plasma Biotall Limited) e nanoestruturada (Fluidinova S.A. - Portugal, nanoXIM.HAp202), com diferentes temperaturas de sinterização.



Figura 23. Prensa uniaxial (Mestra snow P3) usada neste trabalho.

Para tal, compactou-se 75 mg de pó de HA, tendo sido usada uma prensa uniaxial (Mestra snow P3) representada na figura 23, com os respetivos moldes. A pressão de compactação foi de aproximadamente 20 Bar. A massa dos discos de HA foi avaliada usando uma balança analítica (Melter AG285), e os seus diâmetros e espessuras foram medidos usando um paquímetro digital Mitutoyo.

No caso dos discos de hidroxiapatite nanoestruturada foram utilizadas duas temperaturas distintas de sinterização, a primeira foi de 830°C (nHA830), com um patamar de 1h e aplicando uma taxa de aquecimento de 4°C/min e a segunda foi de 1000°C (nHA1000), com um patamar de 15 min e aplicando uma taxa de aquecimento 20°C/min. Para ambas o arrefecimento foi também feito no interior do forno com este desligado até ser atingida a temperatura ambiente. Já para os discos de HA microestruturada a temperatura de sinterização usada foi de 1300°C (mHA), com um patamar de 1h e aplicando uma taxa de aquecimento de 4°C/min e arrefecimento no interior do forno com este desligado até ser atingida a temperatura ambiente. Na figura 24 são apresentados os discos obtidos em cada uma das condições utilizadas.

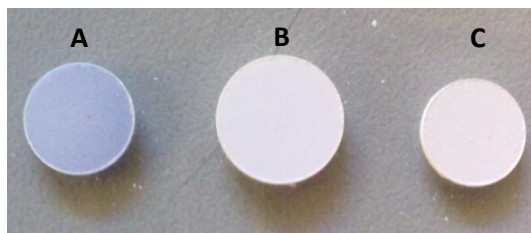


Figura 24. Representação dos discos de HA: microestruturada, mHA, sinterizada a 1300°C (**A**); nanoestruturada aplicando uma temperatura de sinterização de 830°C, nHA830 (**B**) e nanoestruturada aplicando uma temperatura de sinterização de 1000°C, nHA1000 (**C**).

Os discos obtidos foram analisados através de diferentes técnicas (Tabela 4).

Tabela 4. Técnicas usadas na caracterização dos discos de HA (Mateus A Y 2007; Mateus A Y 2008; Oliveira G M 2008; Talik E 2005; Chau T T 2009).

Técnicas	Descrição
Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR)	Caracterização química e identificação dos grupos funcionais da superfície.
Difração de raios X (XRD)	Informação acerca da estrutura cristalina, composição química e propriedades físicas.
Análise de ângulos de contacto (CA)	Determinação do grau de molhabilidade da superfície da amostra.
Microscopia eletrónica de varrimento (SEM)	Análise da morfologia da superfície da amostra.
Microscopia de força atómica (AFM)	Análise da nano-topografia da superfície da amostra.
Porosimetria de intrusão de mercúrio	Determinação da área superficial e da porosidade.

A caracterização química dos discos foi efetuada por FT-IR (*Fourier Transformed Infrared Spectroscopy*), com um espectrómetro FT-IR Perkin-Elmer 2000. Para tal, os discos de HA, depois de moídos num almofariz, foram analisados em modo de transmitância, depois de porções dos pós resultantes terem sido integrados em *pellets* de KBr, com uma resolução espectral de 2 cm⁻¹. Foram efetuados cem varrimentos por amostra.

A caracterização física dos discos foi efetuada por XRD. Para tal, os três tipos de discos de HA foram moídos num almofariz resultando em pós finos, foram analisados por um difractor de raios-X Panalytical Xpert-pro, usando uma radiação anticátodo Cu-Kα (Kα=

CAPITULO III - Culturas de Osteoclastos em superfícies de HA micro- e nanoestruturada 1,54056 Å). Os dados foram adquiridos para 2 θ valores entre 7° e 100°, com intervalos de 0,0016°/s.

A caracterização da superfície dos discos foi avaliada através de CA, SEM e AFM. A área de superfície e a caracterização da porosidade foram avaliadas através de porosimetria de intrusão de mercúrio.

Estudos de molhabilidade foram efetuados fazendo a medição através dos ângulos de contacto, usando o sistema *Data physics Instruments GmbH*, Alemanha, modelo OCA 15, equipado com um dispositivo de vídeo de carga acoplada com câmara (CCD), uma unidade com uma seringa eletrônica (Hamilton) e com um *software* SCA 20. Foi usada água ultrapura com resistividade igual a 18.2 M Ω cm. Os ângulos de contacto foram obtidos através do método da gota sésil, a 25°C numa câmara saturada com líquido da amostra. As imagens digitais foram recolhidas a cada 40 ms durante 30 s com uma câmara CCD. Devido à natureza de absorção dos discos de HA o ângulo de contacto foi calculado, no momento em que a gota de água (4 μ L de água ultrapura) contactou com a superfície. Para proceder ao cálculo do valor do ângulo para as amostras nanoHA (nHA830 e nHA1000), foi usado o método manual, no qual se aplica uma função tangente e o método automático, que é um método intrínseco ao *software*. Para as amostras mHA os valores foram obtidos através da medição de ângulos de contacto dinâmicos através da gota sésil. Os resultados apresentados são uma média $\pm$ desvio padrão (SD) de pelo menos 7 medições (uma por amostra).

As análises SEM foram realizadas usando um microscópio FEI Quanta 400FEG/EDAX Pegasus X4M sob condições de alto vácuo. Os discos de HA, nHA830, nHA1000 e mHA foram previamente revestidos com um filme fino de ouro, usando um *sputter coater* (SPI-Module) em atmosfera de árgon. Com esta técnica foi também possível visualizar os elementos químicos presentes nas amostras através da obtenção dos espectros EDS (análise de energia dispersiva de raio-X).

Os estudos feitos com AFM foram realizados usando um microscópio de sonda de varrimento com um controlador Picoscan 2500 (ambos da Molecular Imaging). Cada amostra foi fotografada com um *scanner* piezoelétrico 150x150 μ m². As análises de imagem e rugosidade foram realizadas à temperatura ambiente, em modo Tapping[®], usando uma alavanca (*cantilever*) com uma constante de mola de 25-75 N/m (raio da ponta <10 nm). Três amostras de cada tipo foram analisadas em três locais escolhidos aleatoriamente. Para caracterizar a rugosidade, a rugosidade média (R_A) e a rugosidade média quadrática (R_Q) foram obtidas a partir de 16 áreas digitalizadas aleatoriamente de 2x2 μ m² para os discos de nHA830 e nHA1000, usando o *software* Veeco NanoScope v6.13. Para os discos de mHA, foram obtidas

CAPITULO III - Culturas de Osteoclastos em superfícies de HA micro- e nanoestruturada

aleatoriamente 9 áreas de $4 \times 4 \mu\text{m}^2$, usando o mesmo *software*. Esta área foi escolhida tendo em conta que a zona de observação é simultaneamente suficientemente pequena para avaliar com precisão a nano-rugosidade, mas é também suficientemente grande para cobrir vários cristais em cada medição. Os resultados referentes à rugosidade de cada superfície correspondem à média $\pm$ SD. Efetuaram-se estes dois tipos de medições (R_A e R_Q) devido ao tipo de informação dada por cada um deles. O parâmetro R_A está associado à amplitude, isto é, caracteriza a superfície com base nos desvios verticais do perfil de rugosidade a partir da linha média. R_A é a média aritmética dos valores absolutos. Já o fator R_Q é a raiz quadrada média dos valores absolutos, também designado como média quadrática, e é uma medida estatística da magnitude das diferentes amplitudes.

A porosimetria de mercúrio (Quantachrome Poremaster model No. 60) foi usada com o intuito de avaliar a porosidade e área da superfície dos três tipos de discos de HA (nHA830, nHA1000 e mHA). Neste procedimento, foram utilizados aproximadamente 90 discos de cada amostra e os dados apresentados foram obtidos usando o programa Quantachrome Poremaster para o Windows, versões 3.0 e 4.02.

2.2 Isolamento de células mononucleadas de sangue periférico humano (PBMC)

Os precursores osteoclásticos foram isolados a partir de sangue humano proveniente de doadores do sexo masculino com idades compreendidas entre os 25 e os 35 anos. Para tal, o sangue foi diluído na proporção de 1:2 em PBS suplementado com 2 mM de EDTA e foi transferido para tubos que continham Ficoll-Paque™ PREMIUM (GE Healthcare Bio-Sciences). Após centrifugação a 400g, durante 30 minutos, as PBMC foram recolhidas e transferidas para um tubo onde foram novamente lavadas com PBS + 2 mM de EDTA e foram centrifugadas a 400g durante 10 minutos. Por fim, foi efetuada a contagem destas mesmas células num hematocitómetro (Celltac MEK-5103).

2.3 Culturas celulares

As PBMC foram semeadas sobre os três tipos de discos de HA (nHA830, nHA1000 e mHA), em placas com 48 poços, a uma densidade de $1,5 \times 10^6$ células/cm². As culturas celulares foram realizadas em α -MEM suplementado com 30% (V/V) de soro humano, proveniente dos mesmos doadores das PBMC, 100 IU/mL de penicilina, 2,5 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina, 2,5 $\mu\text{g/mL}$

CAPITULO III - Culturas de Osteoclastos em superfícies de HA micro- e nanoestruturada de anfotericina e 2 mM de L-glutamina. O meio de cultura foi mantido na ausência de qualquer estímulo osteoclastogénico, ou seja, em BM, ou na presença dos dois fatores que promovem a osteoclastogénese, 25ng/mL M-CSF e 40ng/mL RANKL (M+R) (Väänänen H K 2008; Boyle W J 2003).

Quando indicado, as culturas celulares foram tratadas com inibidores de vias de sinalização importantes para a osteoclastogénese (Boyle W J 2003; Zhao Q 2007). Os inibidores que foram utilizados estão sumariados na tabela 5 com as respetivas concentrações usadas e vias de sinalização inibidas.

Tabela 5. Inibidores de vias de sinalização utilizados.

Inibidor	Concentração (µM)	Via de sinalização inibida
U0126	1	MAPK/ERK kinases (MEK)
PDTC	10	Nuclear Factor-kappa B (NF-kB)
GO6983	5	Protein Kinase C (PKC)
SP600125	10	c-Jun N-terminal Kinase (JNK)
SB202190	5	p38 mitogen-activated protein kinase

As culturas celulares foram mantidas numa atmosfera húmida contendo 5% de CO₂, a 37°C, durante 21 dias. O meio de cultura foi renovado uma vez por semana. Foram retiradas amostras ao décimo quarto e vigésimo primeiro dias, no intuito de quantificar o conteúdo proteico, a atividade da TRAP, atividade de reabsorção de HA, presença de células multinucleadas com anéis de actina e expressão de VNR e CTR e morfologia celular.

2.4 Quantificação de proteínas

A quantificação de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (Bradford M M 1976). Para tal, as culturas celulares foram lavadas duas vezes com PBS, seguindo-se a solubilização das mesmas com NaOH 0,1M. Após uma incubação de 10-15 minutos à temperatura ambiente adicionou-se água destilada para diluir as amostras, sendo adicionado posteriormente reagente de Bradford (Fluka). Após homogeneização, determinou-se a absorvância a 595nm.

2.5 Quantificação da atividade da TRAP

A atividade da TRAP foi quantificada usando o método colorimétrico de hidrólise de *p*NPP que é um substrato cromogénico. Este substrato é hidrolisado originando *para*-nitrofenol, que apresenta cor amarela em meio alcalino.

As culturas celulares efetuadas na superfície dos três tipos de discos de HA foram lavadas 2 vezes com PBS e foram solubilizadas com 0,1% Triton X-100 (V/V) durante um período de 30 minutos à temperatura ambiente. Adicionou-se uma solução de 22,5mM *p*NPP preparada em 0,225M de acetato de sódio, 0,3375M de KCl, 0,1% Tx-100, 22,5mM de tartarato de sódio, 0,225mM de ferro, a pH 5,8. Seguiu-se uma incubação de 1 hora a 37°C, após a qual se adicionou NaOH 5M de modo a parar a reação. Por fim, foi determinada a absorvância a 400nm num leitor de ELISA (Synergy HT, Biotek). A atividade da TRAP foi normalizada tendo em conta a concentração de proteína celular total para cada condição experimental e os seus resultados foram expressos em $nmol/min. \mu g_{proteína}^{-1}$.

2.6 Quantificação do Ca^{2+} libertado para o meio de cultura

As células foram cultivadas sobre os discos de hidroxiapatite nHA830, nHA1000 e mHA. Após 7 dias de cultura, o meio de cultura foi substituído por um sem cálcio. O meio de cultura foi recolhido aos décimo quarto e vigésimo primeiro dias de cultura e o cálcio foi quantificado através do kit CalciFluor™. A fluorescência emitida foi determinada num fluorímetro (Synergy HT, Biotek). A concentração de Ca^{2+} nas amostras foi corrigida com os correspondentes valores obtidos na presença de discos de HA e na ausência de células.

2.7 Microscopia Ótica Confocal

Visualização das células osteoclásticas com anéis de actina e com a expressão de VNR e CTR

As culturas celulares foram lavadas duas vezes com PBS e fixadas com 3,7% (v/v) de *para*-formaldeído durante 15 minutos à temperatura ambiente. Após a fixação, as células foram permeabilizadas com 0,1 % (v/v) de Triton X-100 durante 5 minutos e foram marcadas para a actina com 5 U/mL Alexa Fluor® 647-Faloidina (Invitrogen), e para o VNR e CTR com 50 µg/mL de IgGs anti-VNR e IgGs anti-CTR de ratinho (R&D Systems), respetivamente. A deteção

CAPITULO III - Culturas de Osteoclastos em superfícies de HA micro- e nanoestruturada
das IgGs anti-VNR e IgGs anti-CTR foi efetuada com 2 µg/mL de Alexa Fluor® 488-Goat anti-ratinho IgGs. Por fim, as culturas celulares foram visualizadas através de microscopia ótica confocal.

2.8 Microscopia Eletrônica de Varrimento (SEM)

As células foram fixadas com 1,5% de glutaraldeído em 0,14 M de cacodilato de sódio. As amostras foram desidratadas em séries de diferentes soluções de etanol e secas até se atingir o ponto crítico. Posteriormente foram colocadas em suportes de alumínio usando Araldite™, revestidas com paládio-ouro e observadas num microscópio eletrônico de varrimento equipado com um espectroscópio de dispersão de energias de raios-X FEI Quanta 400FEG/EDAX Pegasus X4M sob condições de alto vácuo.

3. Resultados

3.1 Caracterização dos discos de HA

Os diâmetros dos três tipos de discos de HA foram medidos e apresentam-se na figura 25.

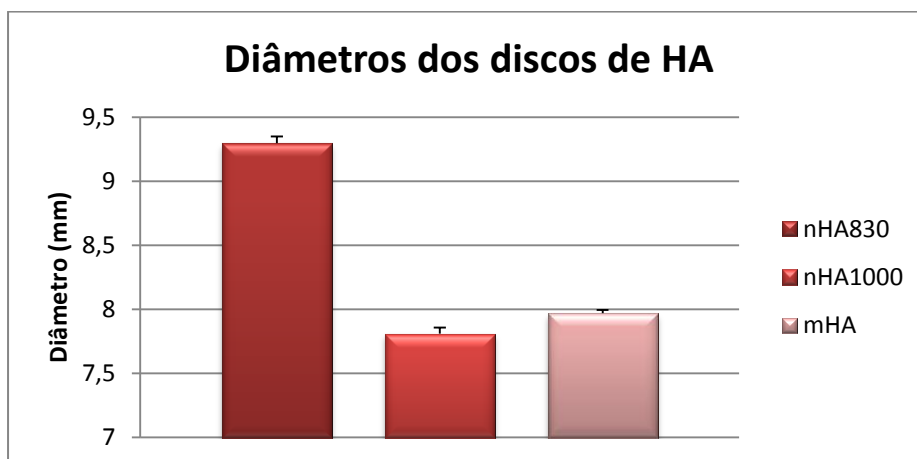


Figura 25. Dimensão dos diâmetros (mm) dos discos de HA: nHA830, nHA1000 e mHA.

Observando os resultados obtidos para os diâmetros dos três discos de HA pode constatar-se que os discos que apresentaram um maior diâmetro foram os nHA830 ($\approx 9,3$ mm), seguindo-se os mHA com 7,9 mm e os nHA1000 com 7,8 mm. Todos eles apresentaram uma espessura média de 0,6 mm.

3.1.1 FT-IR

Para a obtenção fiel dos grupos químicos existentes nos discos de nHA830, nHA1000 e mHA foi utilizada a técnica de FT-IR e os espectros com os resultados apresentam-se na figura 26. A presença de grupos PO_4^{3-} , OH^- e H_2O foi confirmada pelo espectro FT-IR, nos diferentes discos de HA. O espectro de FT-IR revela picos de fosfato a 474, 571, 600, 962, 1036 e 1088 cm^{-1} . Os grupos hidroxilo (OH^-) foram detetados nos correspondentes picos a 631 e 3572 cm^{-1} . O pico observado com o comprimento de onda de $3422/3432\text{ cm}^{-1}$ indicou a água absorvida pelos materiais. O pico a 873 cm^{-1} , que se verificou nos discos nHA830 e mHA, e a banda com comprimento de onda compreendido entre $1456\text{--}1412\text{ cm}^{-1}$ foram devidos ao grupo carbonato (CO_3^{2-}). A banda com comprimento de onda compreendido entre $2300\text{--}2000$

CAPITULO III - Culturas de Osteoclastos em superfícies de HA micro- e nanoestruturada

cm^{-1} pode ter sido devida ao grupo de hidrogenosfato (HPO_4^{2-}). A tabela 6 sintetiza os dados obtidos.

Tabela 6. Resultados obtidos através da técnica FT-IR que mostra os grupos químicos existentes nos discos de nHA830, nHA1000 e mHA.

Amostras	$\text{PO}_4^{3-} (\text{cm}^{-1})$	$\text{OH}^- (\text{cm}^{-1})$	$\text{H}_2\text{O} (\text{cm}^{-1})$	$\text{CO}_3^{2-} (\text{cm}^{-1})$	$\text{HPO}_4^{2-} (\text{cm}^{-1})$
nHA830	474, 571,			873, 1456-	
nHA1000	600, 962,	631, 3572	3422/3432	1412	2300-2000
mHA	1036, 1088				

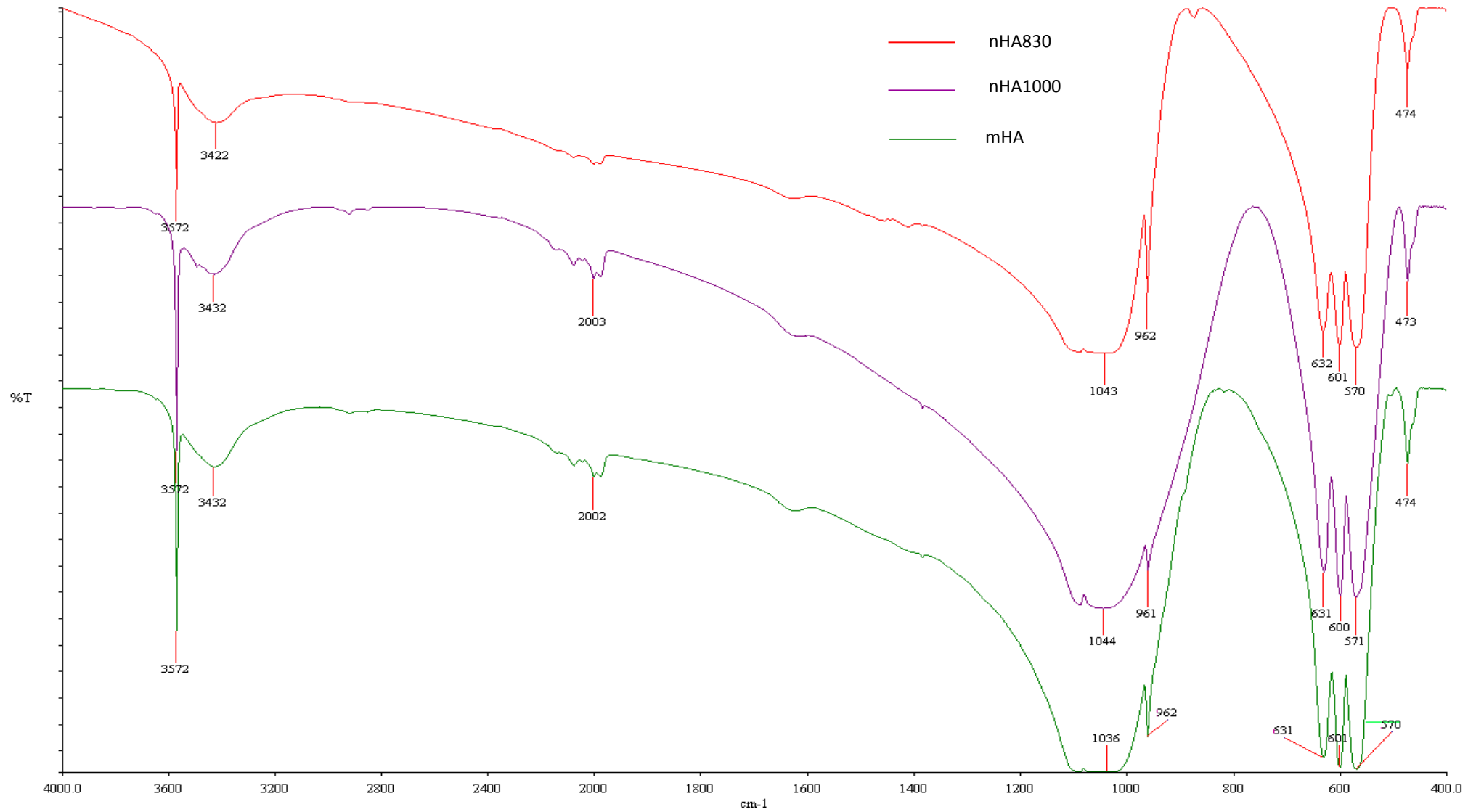


Figura 26. Espectros obtidos da técnica FT-IR que analisa a composição química dos três discos de HA: nHA830, nHA1000 e mHA.

3.1.2 XRD

A técnica de difração de raios-X foi utilizada para analisar a composição e a cristalinidade dos discos nHA830, nHA1000 e mHA. Os dados obtidos para os diferentes materiais encontram-se representados na figura 27.

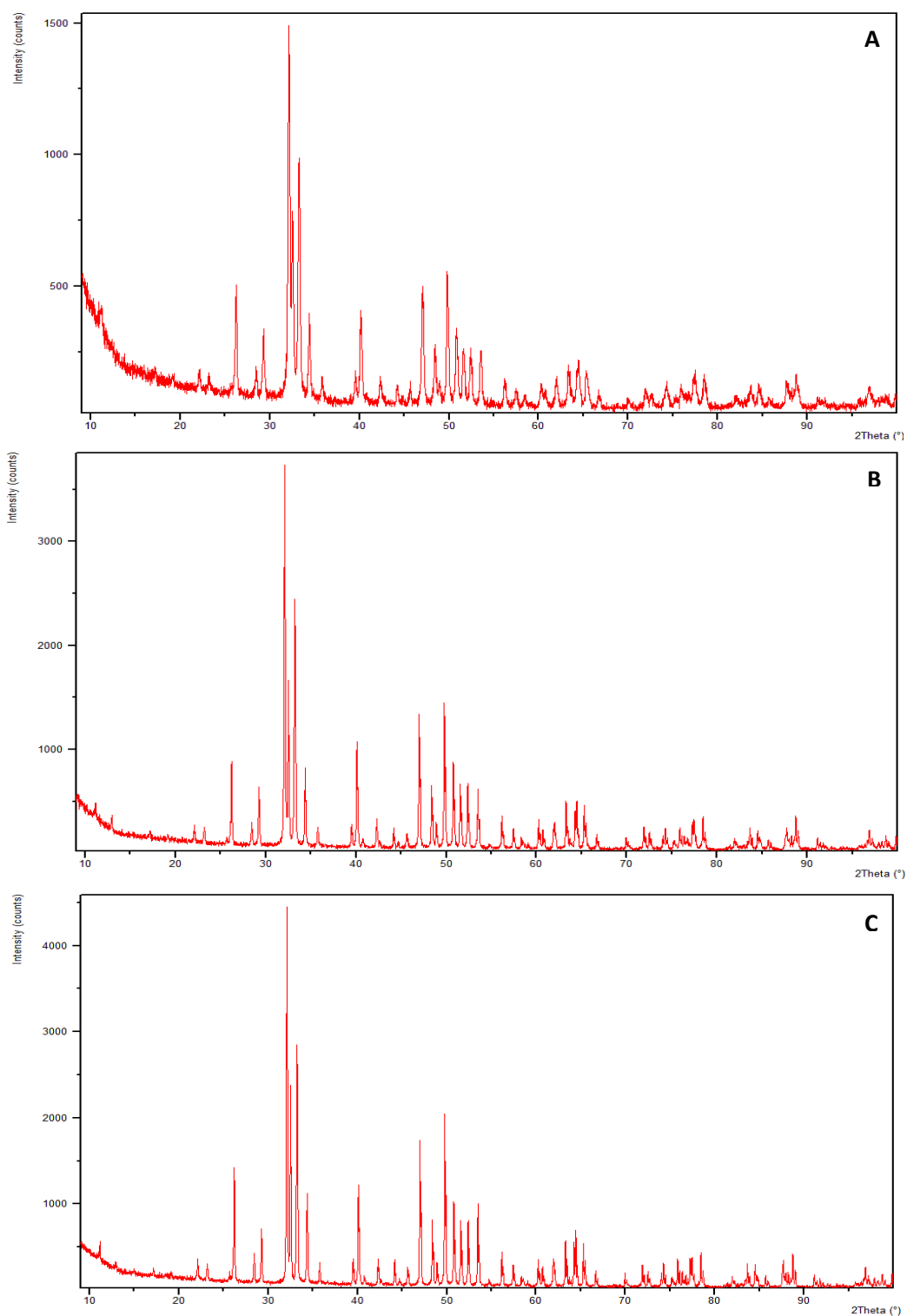


Figura 27. Espectros obtidos através da técnica de XRD para os discos de HA: nHA830 (A), nHA1000 (B) e mHA (C).

Os três espectros de XRD para os discos de HA foram apresentados com o intuito de comparar a posição dos picos e as suas respectivas intensidades. Pode-se, portanto, constatar que a HA esteve presente como único constituinte em todas as amostras. A intensidade foi maior para os discos de mHA e menor para os discos de nHA830, devido às temperaturas de sinterização aplicadas (Ribeiro N 2010), mas as posições mantiveram o mesmo padrão, ou seja, ocorreu uma maior cristalinidade entre os valores de 2θ entre 30° e 35° .

3.2 Caracterização da superfície dos discos de HA

3.2.1 Ângulos de Contacto

Os resultados obtidos para os ângulos de contacto (θ) dos discos de HA, nHA830 (n=8), nHA1000 (n=8) e mHA (n=7), usando água ultrapura como teste líquido, apresentam-se na tabela 7.

Tabela 7. Representação dos dados obtidos para os ângulos de contactos (valor médio $\pm$ SD), nas superfícies dos discos de HA: nHA830 (n=8), nHA1000 (n=8) e mHA (n=7).

	$\theta \pm SD (^{\circ})$
nHA830	$17,4 \pm 4,2$
nHA1000	$37,6 \pm 10,6$
mHA	$56,7 \pm 9,3$

Observando-se os resultados obtidos para os ângulos de contacto pode verificar-se que todos os discos de HA apresentam um carácter hidrofílico, pois o seu ângulo situa-se abaixo dos 90° (Park J 2008). Comparando os três tipos de HA pode constatar-se que os discos nHA830 são os mais hidrofílicos. Os discos menos hidrofílicos são os mHA. Este parâmetro é bastante importante para compreendermos como é que as células podem interagir com estes diferentes tipos de superfície.

3.2.2 SEM

No intuito de averiguar detalhadamente a morfologia das superfícies foi efetuada a observação por SEM, e os resultados obtidos encontram-se ilustrados nas figuras 28, 29 e 30. Com esta técnica foi também possível visualizar o espectro EDS dos discos nHA830, nHA1000 e mHA, onde foi possível observar os elementos químicos presentes em cada amostra.

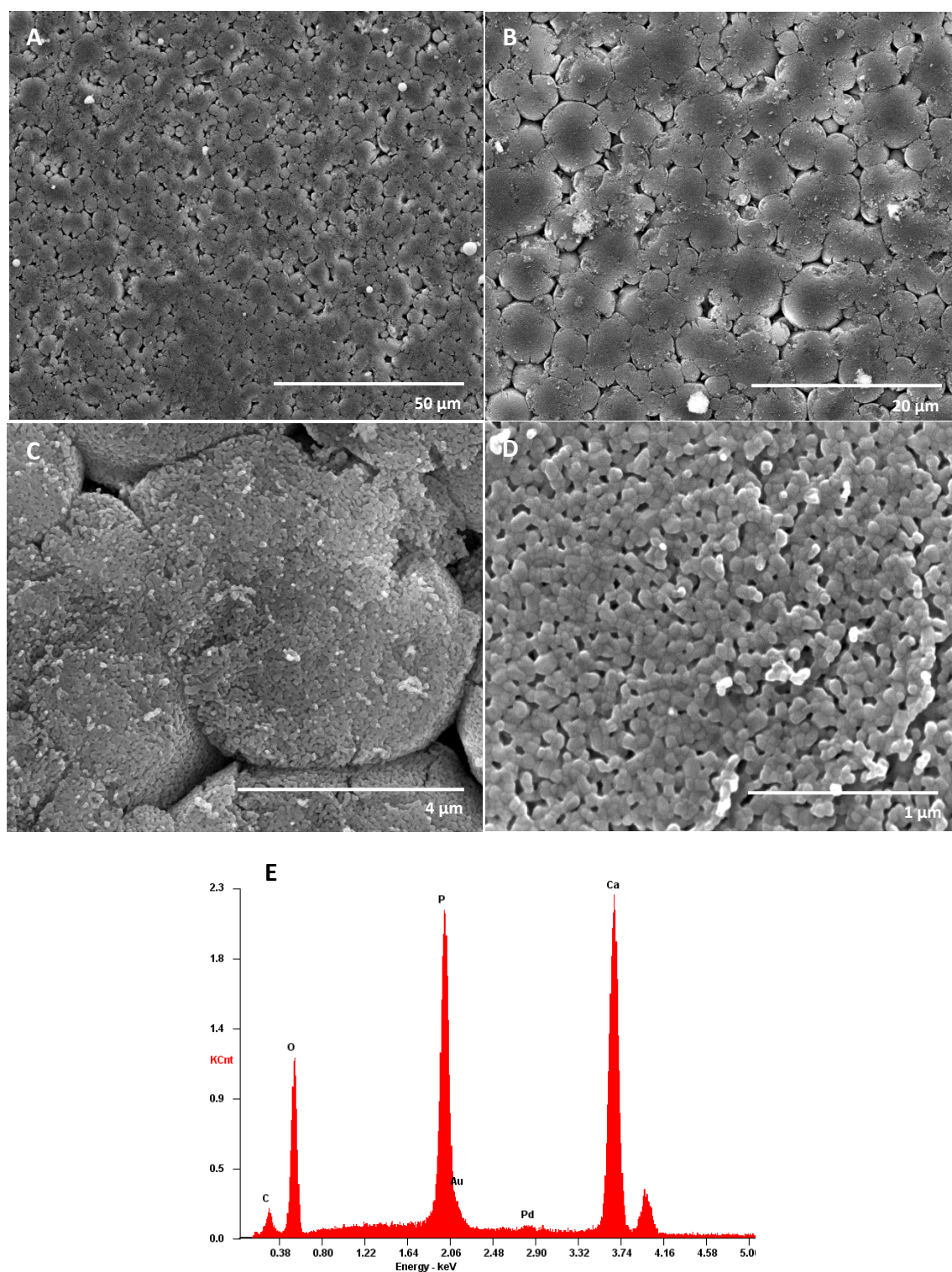


Figura 28. Imagens de SEM das superfícies dos discos de nHA830 com diferentes escalas: 50 μm (A), 20 μm (B), 4 μm (C) e 1 μm (D). Ilustração do espectro EDS com informação da composição química dos discos de nHA830 (E).

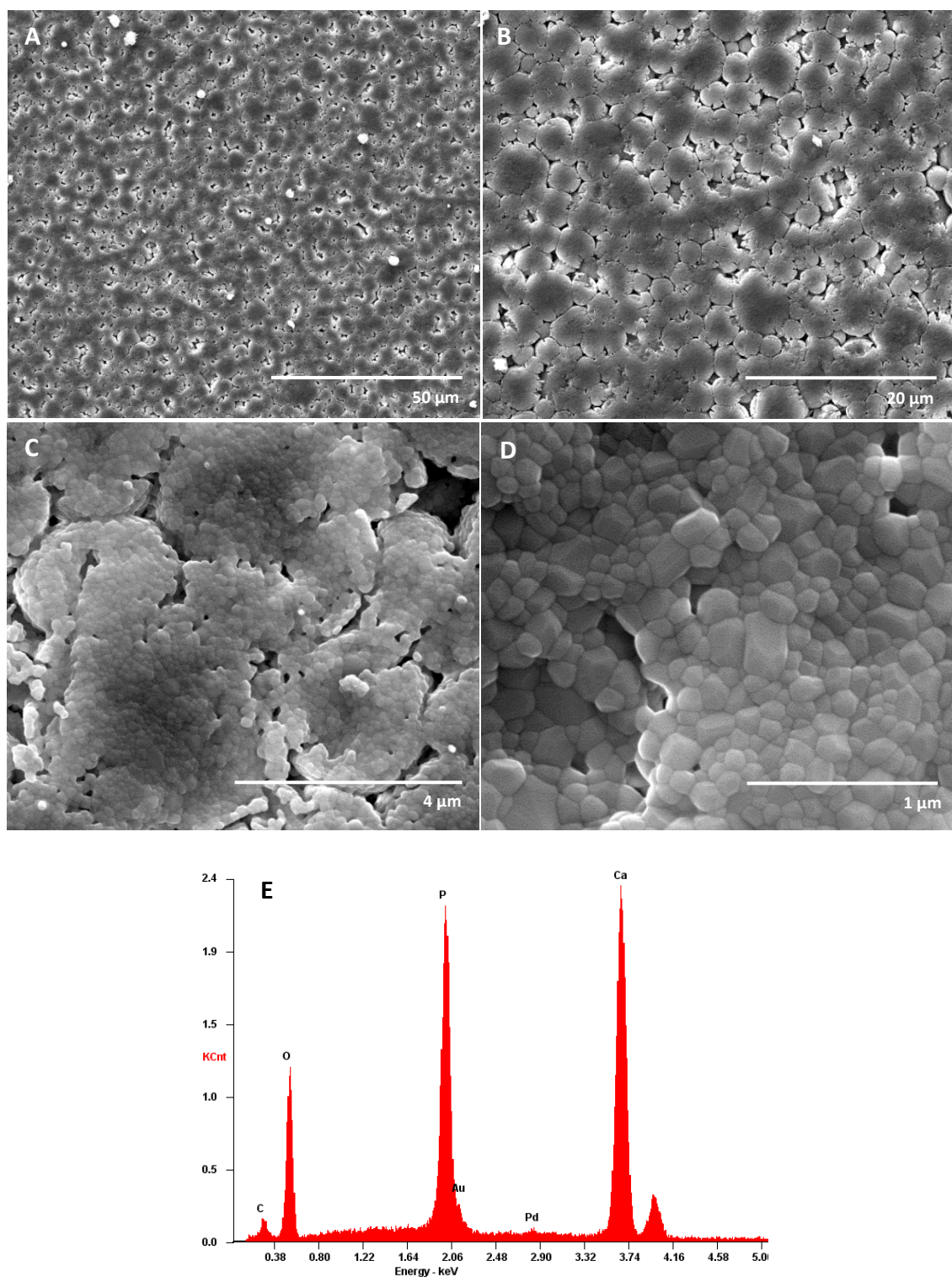


Figura 29. Imagens de SEM das superfícies dos discos de nHA1000 com diferentes escalas: 50 μm (A), 20 μm (B), 4 μm (C) e 1 μm (D). Ilustração do espectro EDS com informação da composição química dos discos de nHA1000 (E).

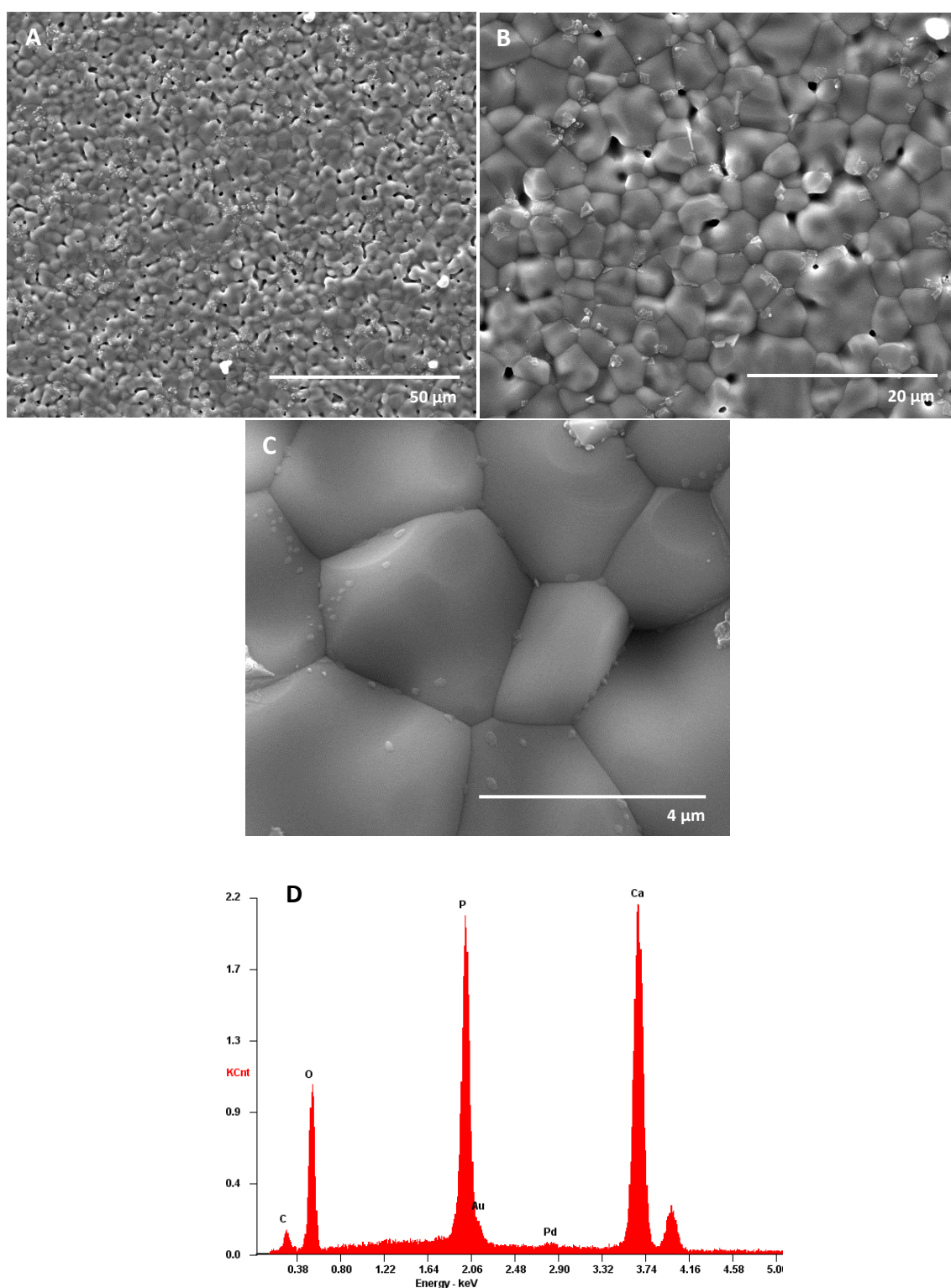


Figura 30. Imagens de SEM das superfícies dos discos de mHA com diferentes escalas: 50 μm (A), 20 μm (B) e 4 μm (C). Ilustração do espectro EDS com informação da composição química dos discos de mHA (D).

Observando as imagens obtidas podemos concluir que as amostras possuem diferentes morfologias, formas e tamanhos de cristais, sendo que as diferenças mais evidentes são entre os discos de microHA e os discos de nanoHA em termos de estrutura e organização cristalinas. Isto é, as superfícies dos discos nanoestruturados possuem os grãos visivelmente mais pequenos e de tamanho mais homogêneo enquanto que os discos microestruturados têm um tamanho de grão muito maior, e demonstrando maior disparidade nos diversos tamanhos de cristais.

Analisando os espectros de EDS podemos verificar que todos os discos de HA apresentam os mesmos elementos químicos na sua composição.

Através da técnica SEM foi, também, possível obter informação acerca dos diâmetros dos grãos de cada amostra. Esses dados foram agrupados e encontram-se ilustrados na tabela 8.

Tabela 8. Distribuição das dimensões dos grãos dos discos de nHA830, nHA1000 e mHA.

Dimensão média do grão $\pm$ SD (nm)	
nHA830	69,6 $\pm$ 23,1
nHA1000	154,6 $\pm$ 73,1
mHA	3895,2 $\pm$ 1343,1

Pode portanto verificar-se que as dimensões dos grãos dos discos de mHA rondam os 3,9 μ m, os grãos dos discos de nHA1000 possuem uma média de 155 nm de diâmetro e os grãos dos discos de nHA830 assumem valores de aproximadamente 70 nm.

3.2.3 AFM

Para se obter uma informação mais detalhada sobre a topografia das superfícies dos discos de nHA830, nHA1000 e mHA procedeu-se à sua análise por AFM (figuras 31, 32 e 33). Esta técnica permitiu, ainda, determinar os parâmetros das rugosidades (R_A e R_Q) das superfícies dos discos de HA. Esses mesmos resultados estão representados na tabela 9 e a esses valores estão associados os respetivos erros.

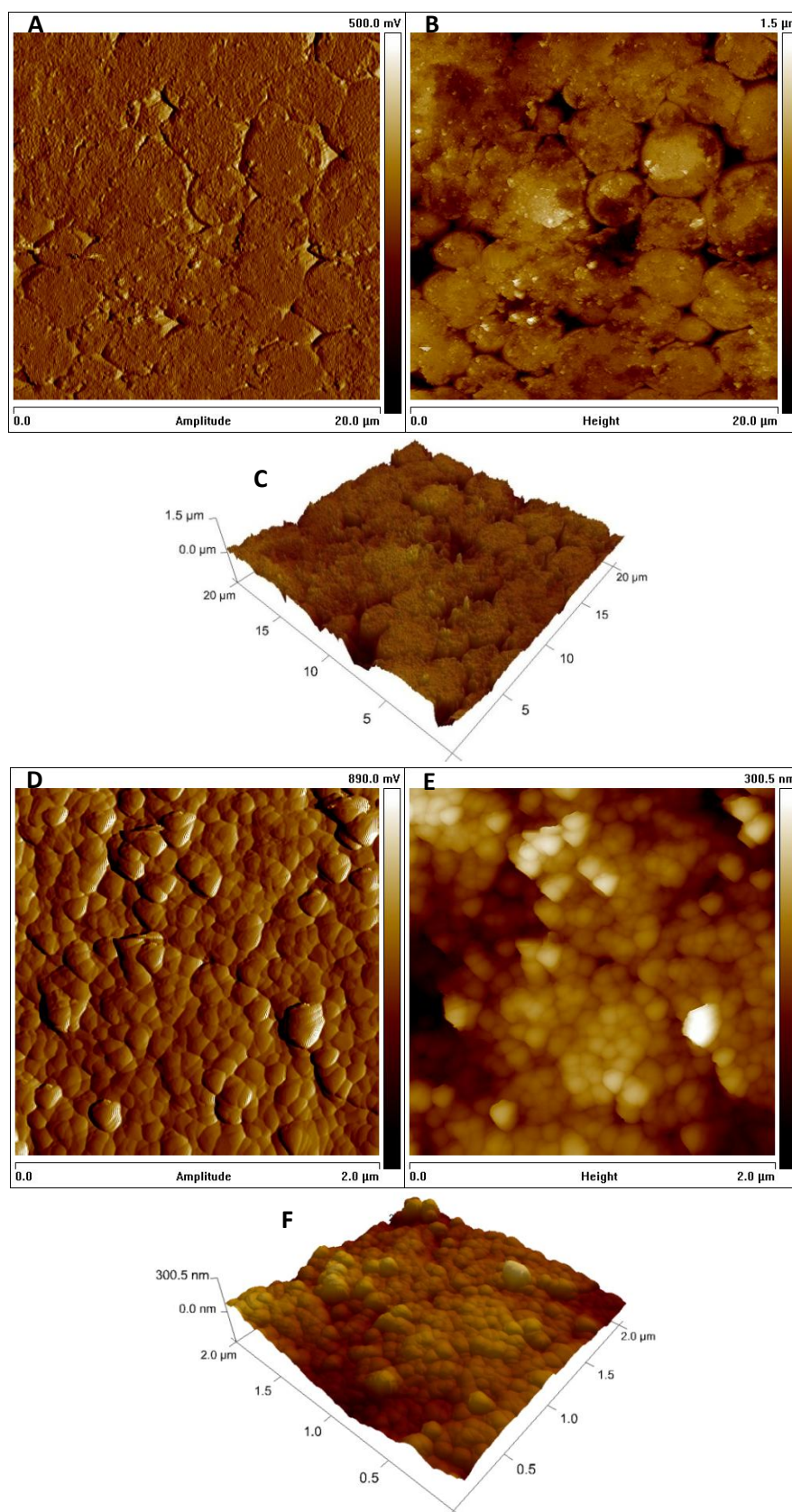


Figura 31. Imagens de AFM das superfícies dos discos de nHA830 em modo de amplitude (escala 20000 x 20000 nm²) (A), modo de altura (escala 20000 x 20000 nm²) (B), 3D (escala 20000 x 20000 nm²) (C) em modo de amplitude (escala 2000 x 2000 nm²) (D) modo de altura (escala 2000 x 2000 nm²) (E) e 3D (F) (escala 2000 x 2000 nm²), obtidos em *tapping mode*.

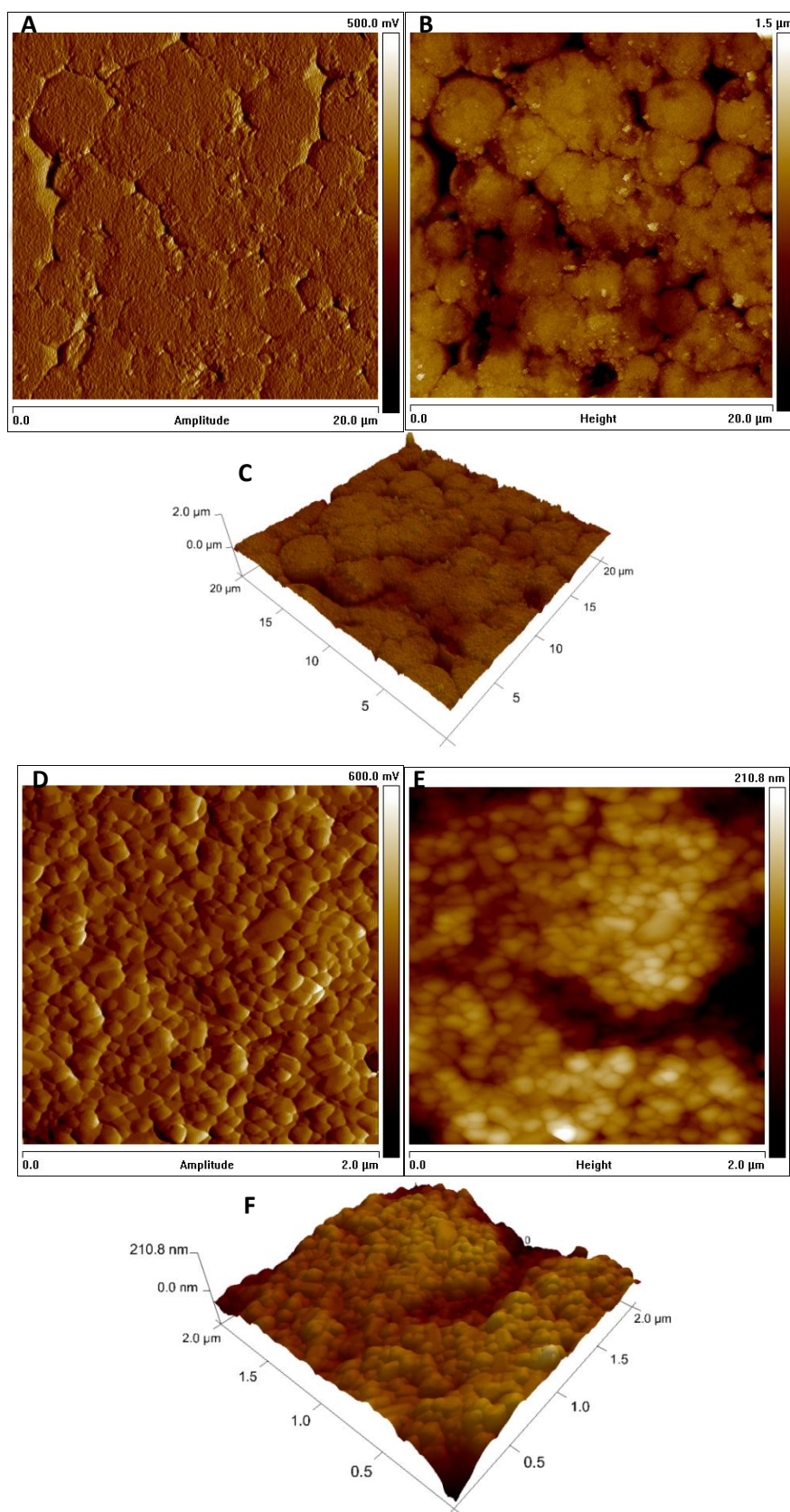


Figura 32. Imagens de AFM das superfícies dos discos de nHA1000 em modo de amplitude (escala 20000 x 20000 nm²) **(A)**, modo de altura (escala 20000 x 20000 nm²) **(B)**, 3D (escala 20000 x 20000 nm²) **(C)** em modo de amplitude (escala 2000 x 2000 nm²) **(D)** modo de altura (escala 2000 x 2000 nm²) **(E)** e 3D **(F)** (escala 2000 x 2000 nm²), obtidos em *tapping mode*.

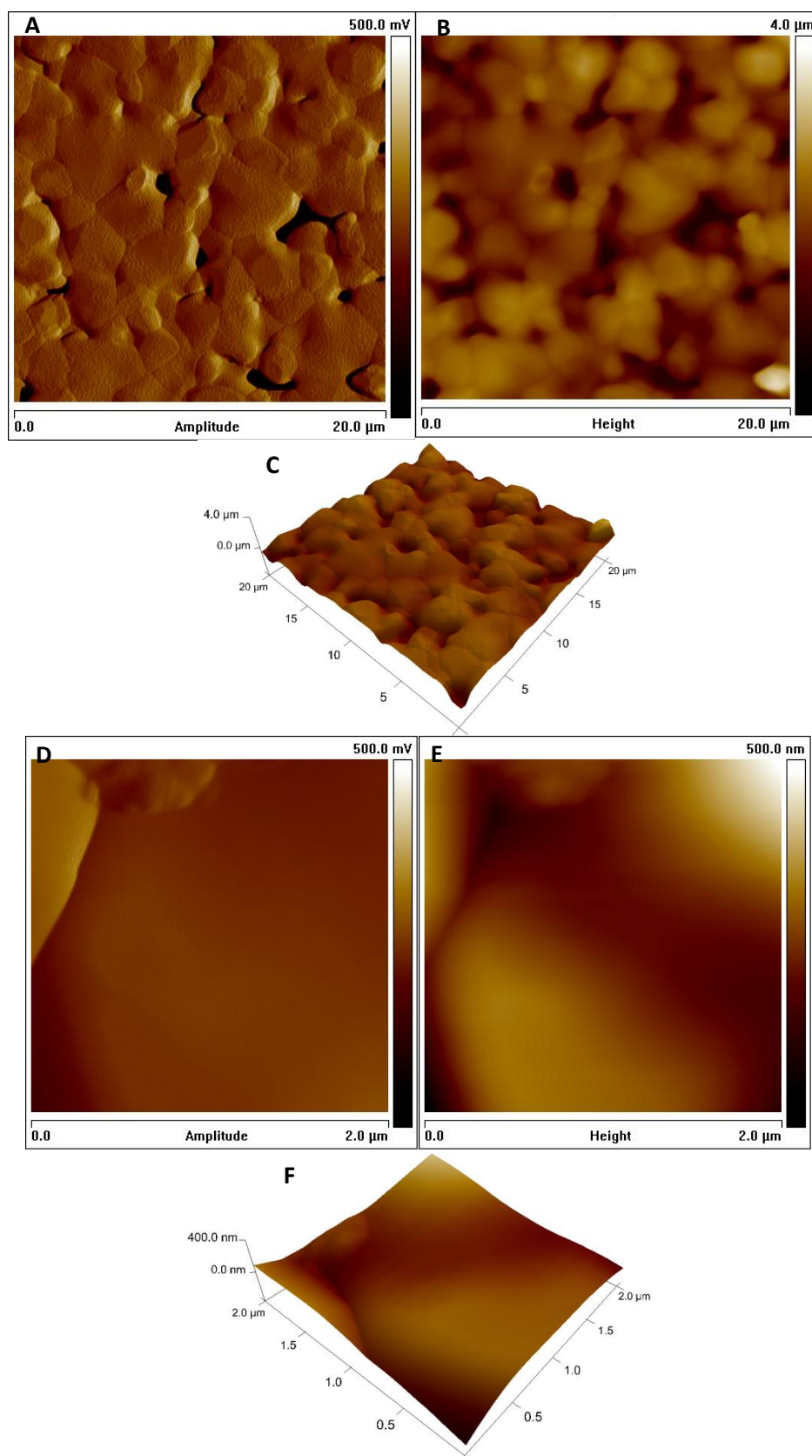


Figura 33. Imagens de AFM das superfícies dos discos de mHA em modo de amplitude (escala 20000 x 20000 nm²) **(A)**, modo de altura (escala 20000 x 20000 nm²) **(B)**, 3D (escala 20000 x 20000 nm²) **(C)** em modo de amplitude (escala 2000 x 2000 nm²) **(D)** modo de altura (escala 2000 x 2000 nm²) **(E)** e 3D **(F)** (escala 2000 x 2000 nm²), obtidos em *tapping mode*.

CAPITULO III - Culturas de Osteoclastos em superfícies de HA micro- e nanoestruturada

Analisando detalhadamente as topografias dos três discos podemos verificar diferenças significativas entre os discos mHA e os discos nHA: nHA830 e nHA1000. Se compararmos entre si os discos nanoestruturados já não se observam diferenças tão significativas como as anteriores. Ou seja, a topografia dos discos mHA é totalmente distinta dos discos nHA, ao passo que os discos nanoestruturados apresentam topografias significativamente semelhantes.

Tendo em conta as imagens topográficas dos discos podemos verificar que estas estão de acordo com os valores das rugosidades obtidos, com a mesma técnica.

Tabela 9. Parâmetros das rugosidades para as diferentes amostras de HA.

Amostras	$R_A \pm SD$ (nm)	$R_Q \pm SD$ (nm)
nHA830	$104,8 \pm 18,9$	$161,6 \pm 25,2$
nHA1000	$124,9 \pm 27,3$	$198,3 \pm 31,5$
mHA	$242,8 \pm 25,1$	$312,6 \pm 26,4$

Observando os resultados das rugosidades R_A e R_Q pode-se verificar que a gama de valores aumenta consoante o tamanho de grão aumenta, ou seja, os discos de mHA são os que apresentam os valores mais elevados de R_A e R_Q ao passo que os nHA830 são os que possuem os valores mais baixos, sendo que a diferença entre os valores obtidos para as amostras nHA830 e nHA1000 não foi muito significativa. Já os valores obtidos para a amostra mHA ultrapassaram o dobro das amostras nHA, sendo uma diferença expressiva.

3.2.4 Porosimetria de Mercúrio

A técnica de porosimetria de Mercúrio permitiu obter parâmetros quantitativos das áreas superficiais das amostras. Os parâmetros obtidos apresentam-se na tabela 10.

Tabela 10. Dados obtidos através da técnica de porosimetria de Mercúrio para os discos nHA830, nHA1000 e mHA.

	nHA830	nHA1000	mHA
Volume dos poros (cm³/g)	6.791x10 ⁻²	1.685x10 ⁻²	8.332x10 ⁻³
Área superficial dos poros (m²/g)	2.584	4.159x10 ⁻¹	7.997x10 ⁻²
Área superficial total (m²/g)	18.8394	1.4446	0.2238
Porosidade interparticular total (%)	0.3359	0.1627	0.1841
Porosidade intraparticular total (%)	44.2569	7.5339	3.2885
Porosidade total (%)	44.5928	7.6967	3.4725

De acordo com os dados de porosimetria de Mercúrio, os discos que exibiram uma maior área de superfície foram os nHA830, que apresentaram um valor de 18.8 m²/g. E, os discos que apresentaram uma área de superfície mais baixa foram os mHA, com um valor de 0.2 m²/g. O intervalo de diâmetro dos poros centrou-se entre 3 nm e 10.6 µm.

Em termos de porosidade foi possível observar-se que os discos de nHA830 assumiram um valor de 44.6% e os discos de mHA apresentaram um valor de 3.5%, sendo uma diferença significativa.

3.3 Resposta osteoclastogénica das culturas celulares

3.3.1 Quantificação do conteúdo proteico

A quantificação do conteúdo proteico foi efetuada em culturas de PBMC mantidas na ausência ou presença de M-CSF e RANKL (BM ou M+R, respetivamente), nos décimo quarto e vigésimo primeiro dias de cultura (figura 34 e 35).

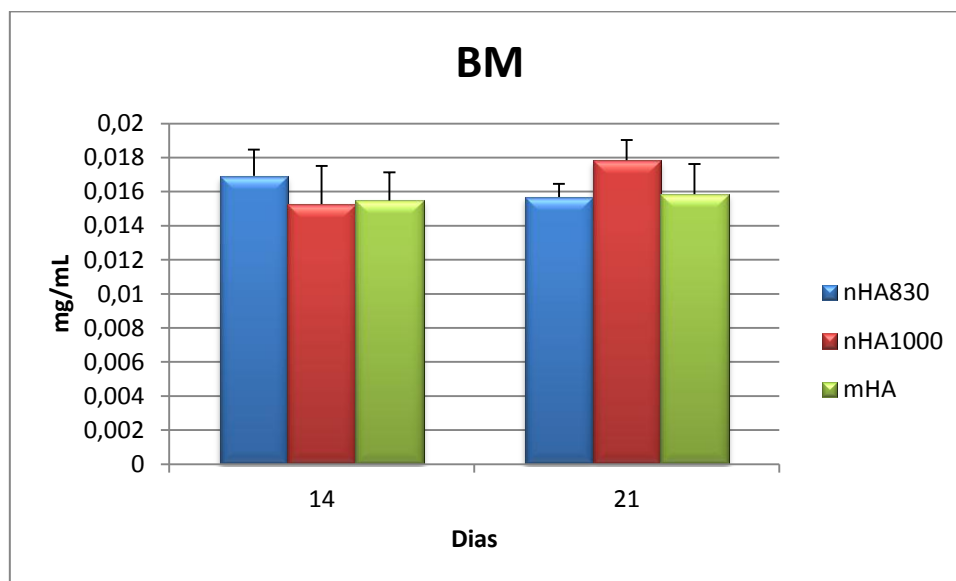


Figura 34. Quantificação do conteúdo proteico em PBMC (BM) durante 14 e 21 dias nas superfícies de nHA830, nHA1000 e mHA.

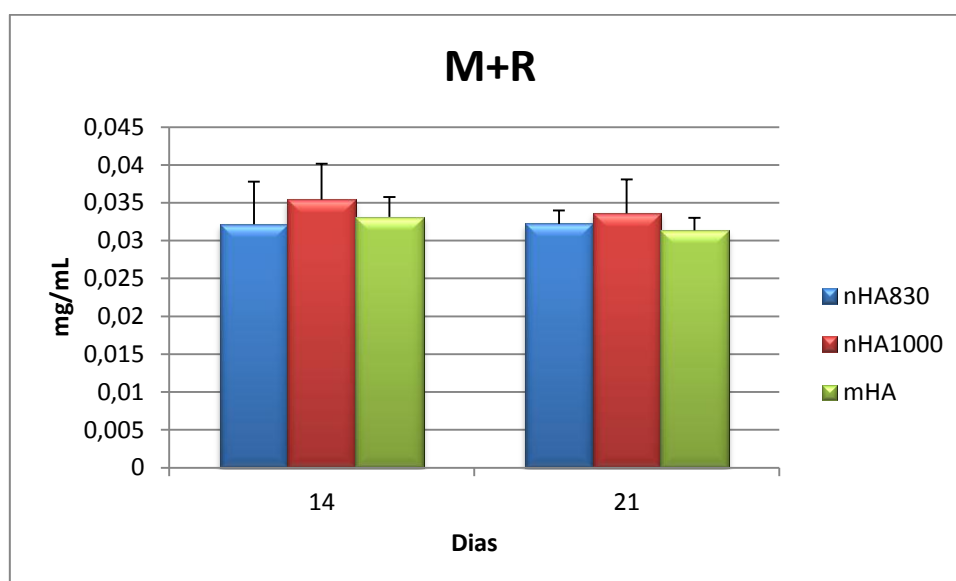


Figura 35. Quantificação do conteúdo proteico em PBMC (M+R) durante 14 e 21 dias nas superfícies de nHA830, nHA1000 e mHA.

CAPITULO III - Culturas de Osteoclastos em superfícies de HA micro- e nanoestruturada

Globalmente, os valores obtidos em BM (figura 34) foram inferiores aos obtidos na presença de M-CSF e RANKL (figura 35). No entanto, independentemente da condição experimental considerada, não se observaram diferenças significativas entre as culturas celulares efetuadas sobre os três tipos de HA.

3.3.2 Quantificação da atividade da TRAP

A quantificação da atividade da TRAP foi efetuada em culturas de PBMC mantidas na ausência ou presença de M-CSF e RANKL (BM ou M+R, respetivamente), nos décimo quarto e vigésimo primeiro dias de cultura (figuras 36 e 37).

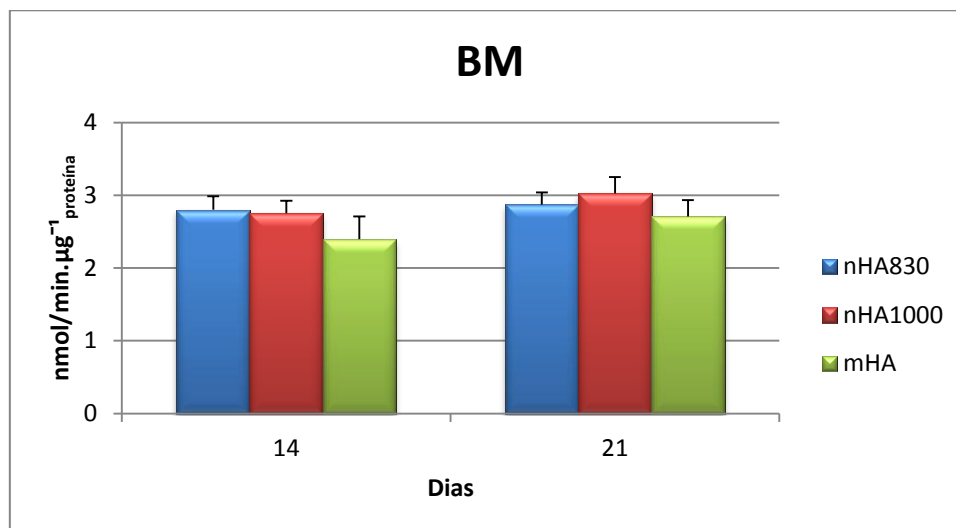


Figura 36. Atividade da TRAP, normalizada com o conteúdo proteico, em culturas de PBMC (BM) efetuadas sobre discos de nHA830, nHA1000 e mHA.

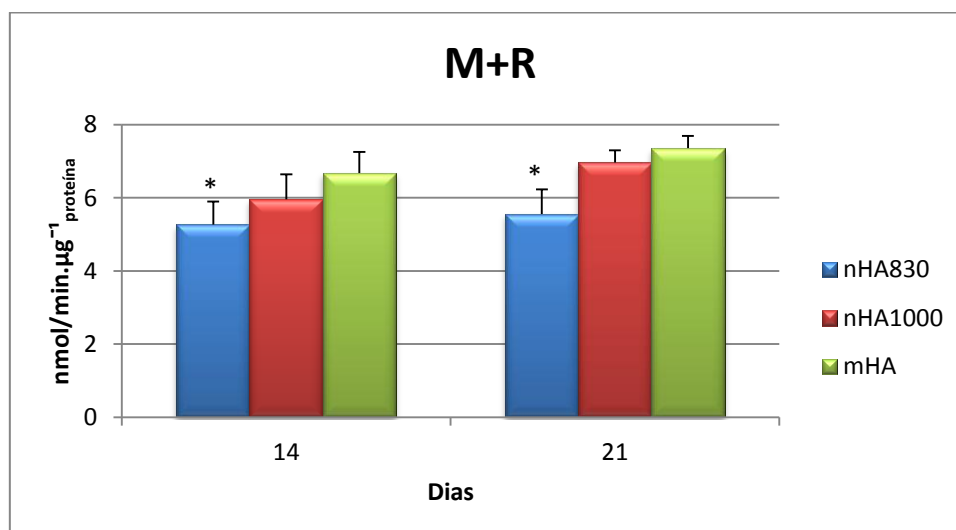


Figura 37. Atividade da TRAP, normalizada com o conteúdo proteico, em culturas de PBMC (M+R) efetuadas sobre discos de nHA830, nHA1000 e mHA. * significativamente diferente do controlo.

CAPITULO III - Culturas de Osteoclastos em superfícies de HA micro- e nanoestruturada

Tendo em conta os resultados obtidos podemos verificar que a atividade da TRAP na primeira condição de cultura, isto é, em BM (figura 36), foi inferior à obtida em M+R (figura 37), não se tendo observado diferenças significativas entre as três superfícies de HA estudadas. Em relação à segunda condição de cultura, verificou-se que a atividade da TRAP foi superior na superfície mHA e menor na superfície nHA830.

3.3.3 Quantificação do Ca^{2+} libertado para o meio de cultura

A quantificação do Ca^{2+} libertado para o meio de cultura foi efetuada de forma a averiguar a atividade de reabsorção de HA por parte das células osteoclásticas formadas nos diferentes tipos de superfícies de HA testadas (Figuras 38 e 39).

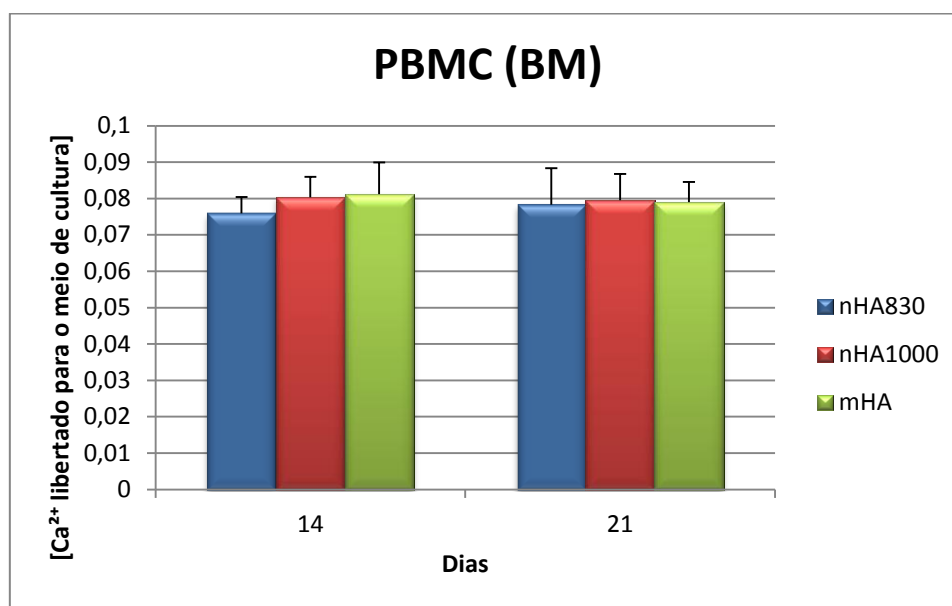


Figura 38. Quantificação do Ca^{2+} libertado em culturas de PBMC (BM) efetuadas em superfícies nHA830, nHA1000 e mHA.

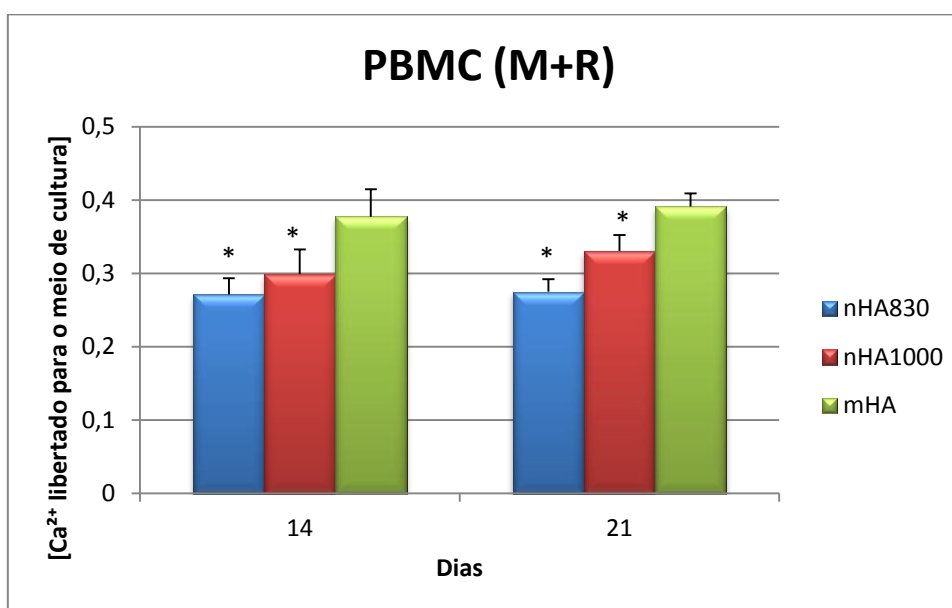


Figura 39. Quantificação do Ca^{2+} libertado em culturas de PBMC (M+R) efetuadas em superfícies nHA830, nHA1000 e mHA. * significativamente diferente do controlo.

Tendo em conta os resultados obtidos podemos verificar que em ambas as condições experimentais (BM e M+R), a concentração de Ca^{2+} libertado para o meio de cultura apresentou um comportamento semelhante no décimo quarto e no vigésimo primeiros dias de cultura.

Nas culturas mantidas em BM (Figura 38), a quantidade de Ca^{2+} libertada foi muito reduzida, sendo que não se observaram alterações significativas nas diferentes superfícies testadas. Em relação às culturas suplementadas com os fatores osteoclastogénicos (Figura 39), a concentração de Ca^{2+} foi superior no caso das culturas efetuadas sobre mHA, e menor no caso da nHA830.

3.3.4 Microscopia Ótica Confocal

Visualização das células osteoclásticas com anéis de actina e com a expressão de VNR e CTR

No intuito de averiguar a presença de células com diferentes características osteoclásticas, nomeadamente, os anéis de actina e a expressão de VNR e CTR as culturas celulares foram marcadas para essas moléculas e observadas através de microscopia ótica confocal (Figura 40).

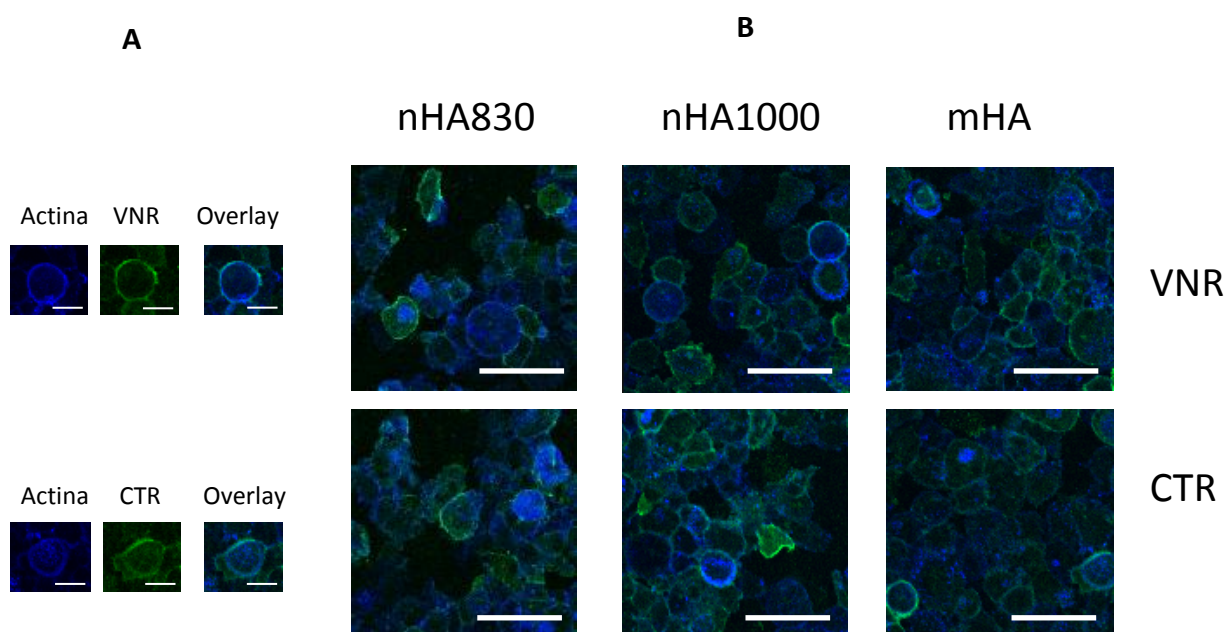


Figura 40. Observação de culturas de PBMC efetuadas na superfície de HA (nHA830, nHA1000 e mHA), através de microscopia ótica confocal. Os osteoclastos apresentam-se com uma coloração azul para a actina e com uma coloração verde para os recetores da vitronectina (VNR) ou os recetores da calcitonina (CTR). **A** – Imagens representativas da coloração obtida. **B** – Culturas de PBMC mantidas na presença de M-CSF e RANKL, durante 21 dias. As barras brancas representam 40 μ m (A) e 170 μ m (B).

Observou-se em todas as condições experimentais testadas a presença de células osteoclásticas em cultura. Globalmente, a quantidade das mesmas aparentou estar em concordância com os resultados obtidos para a atividade da TRAP, isto é, verificou-se uma maior quantidade de osteoclastos na superfície de mHA, e menor no caso da nHA830.

3.3.5 SEM

As culturas celulares foram também observadas através de SEM (Figuras 41 e 42).

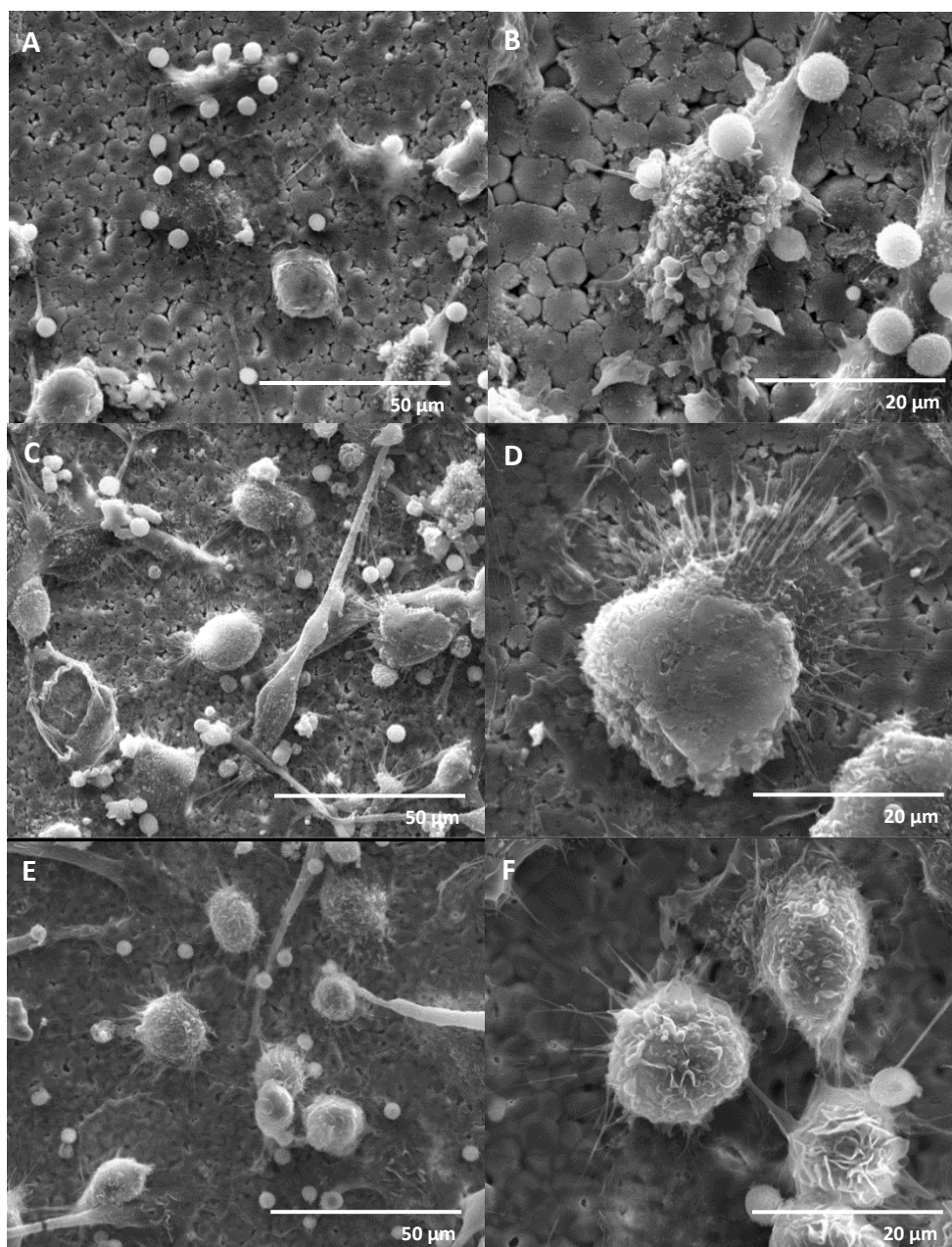


Figura 41. Micrografias de SEM em culturas de PBMC (BM) efetuadas nas superfícies dos discos de nHA830 (A e B), nHA1000 (C e D) e mHA (E e F).

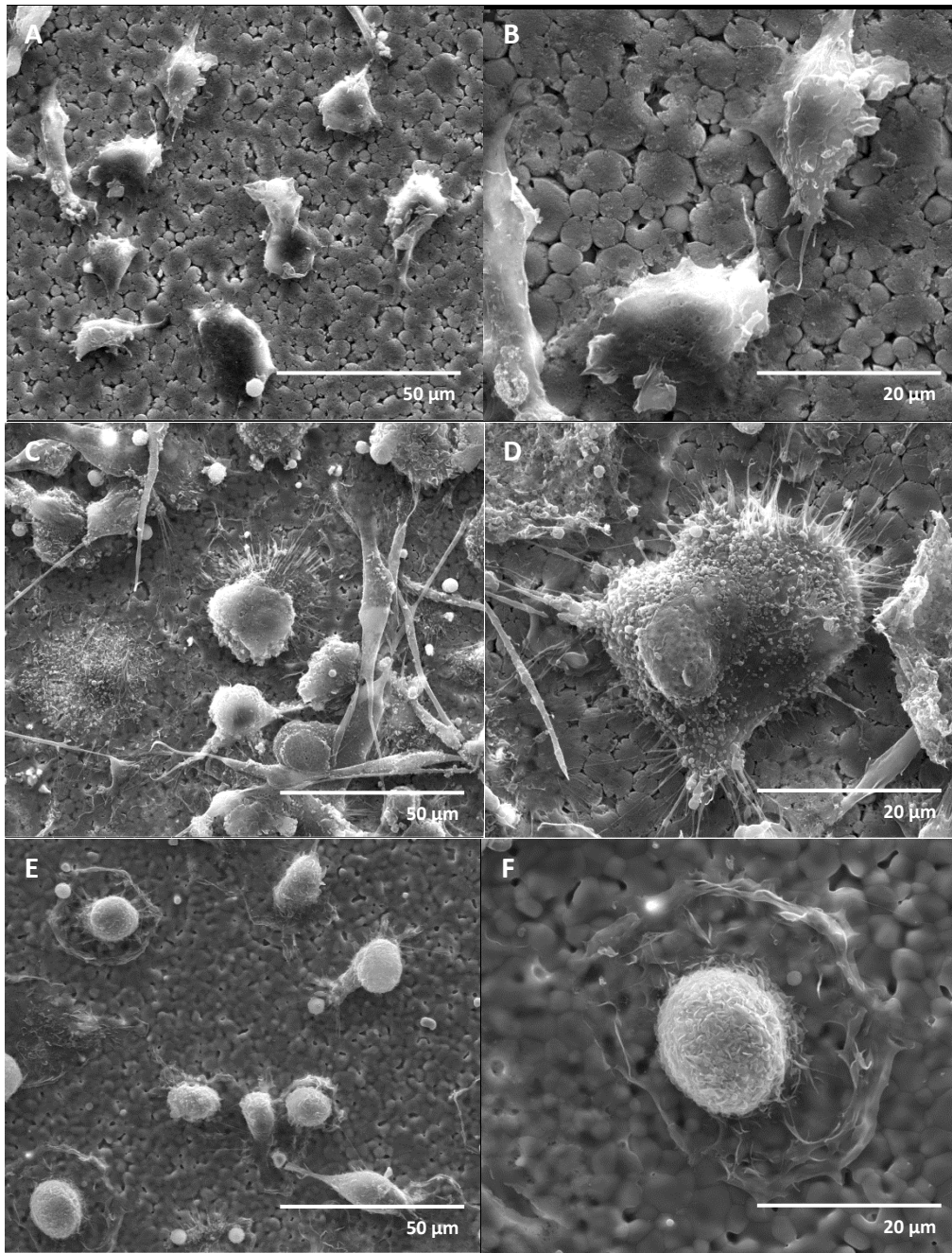


Figura 42. Micrografias de SEM em culturas de PBMC (M+R) efetuadas nas superfícies dos discos de nHA830 (A e B), nHA1000 (C e D) e mHA (E e F).

Observando-se as imagens obtidas pode-se confirmar que em ambas as condições experimentais (BM e M+R) existiam células osteoclásticas nos três tipos de superfícies de HA testados (nHA830, nHA1000 e mHA). A morfologia celular permaneceu globalmente idêntica nas três superfícies. Contudo, na superfície de mHA as células apresentaram-se um pouco mais esféricas do que nas restantes superfícies, sendo que este efeito foi mais evidente no caso das culturas celulares efetuadas na presença de M-CSF e RANKL.

3.3.6 Mecanismos Intracelulares envolvidos

No sentido de tentar perceber se algumas vias de sinalização envolvidas na diferenciação osteoclástica eram moduladas pelas diferentes superfícies de HA testadas, as culturas celulares foram tratadas com inibidores dessas mesmas vias (Figuras 43 e 44).

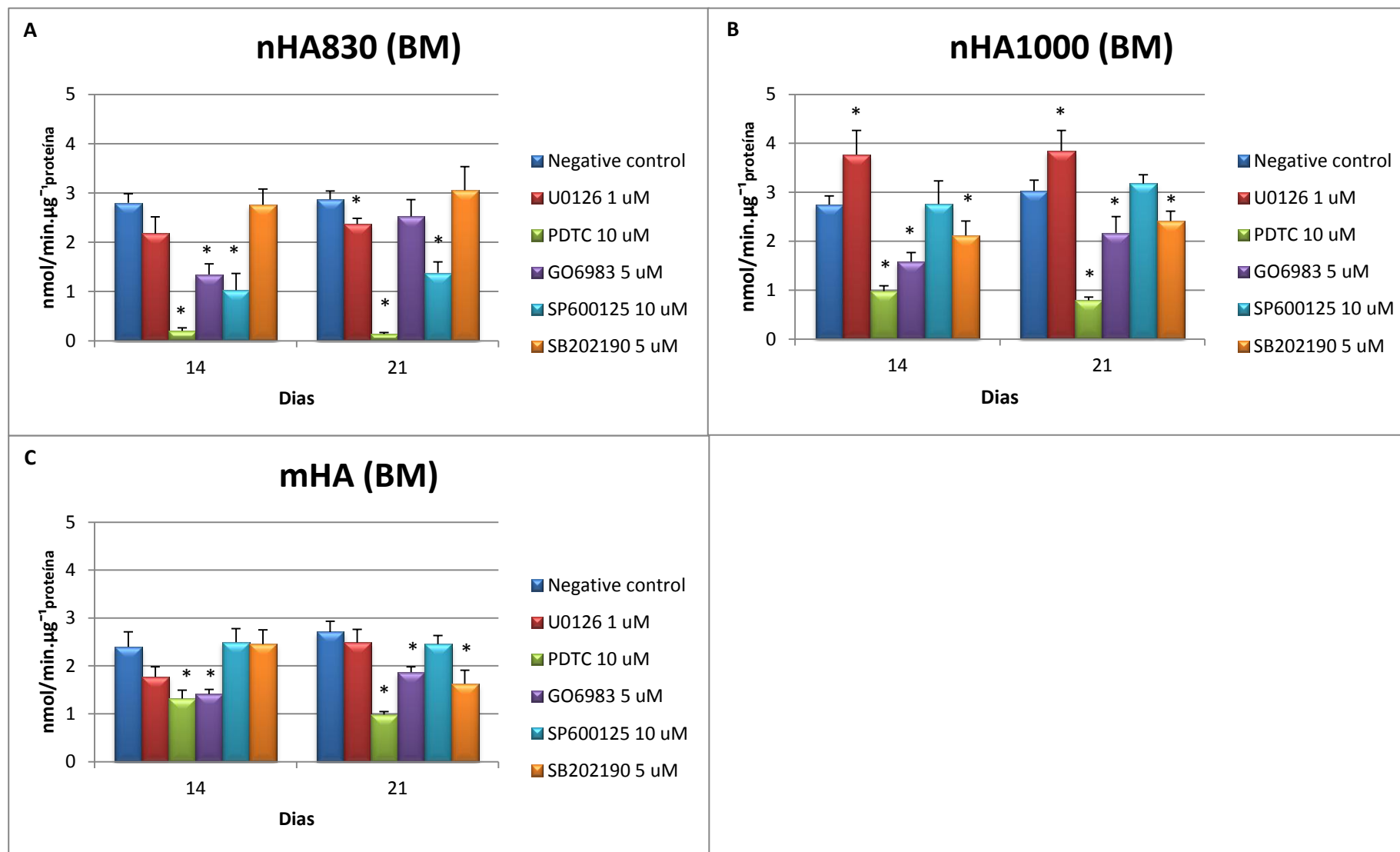


Figura 43. Atividade da TRAP, normalizada com o conteúdo proteico, em culturas de PBMC (BM) tratadas com diferentes inibidores de vias de sinalização e efetuadas sobre as superfícies de **(A)** nHA830, **(B)** nHA1000 e **(C)** mHA. * significativamente diferente do controle.

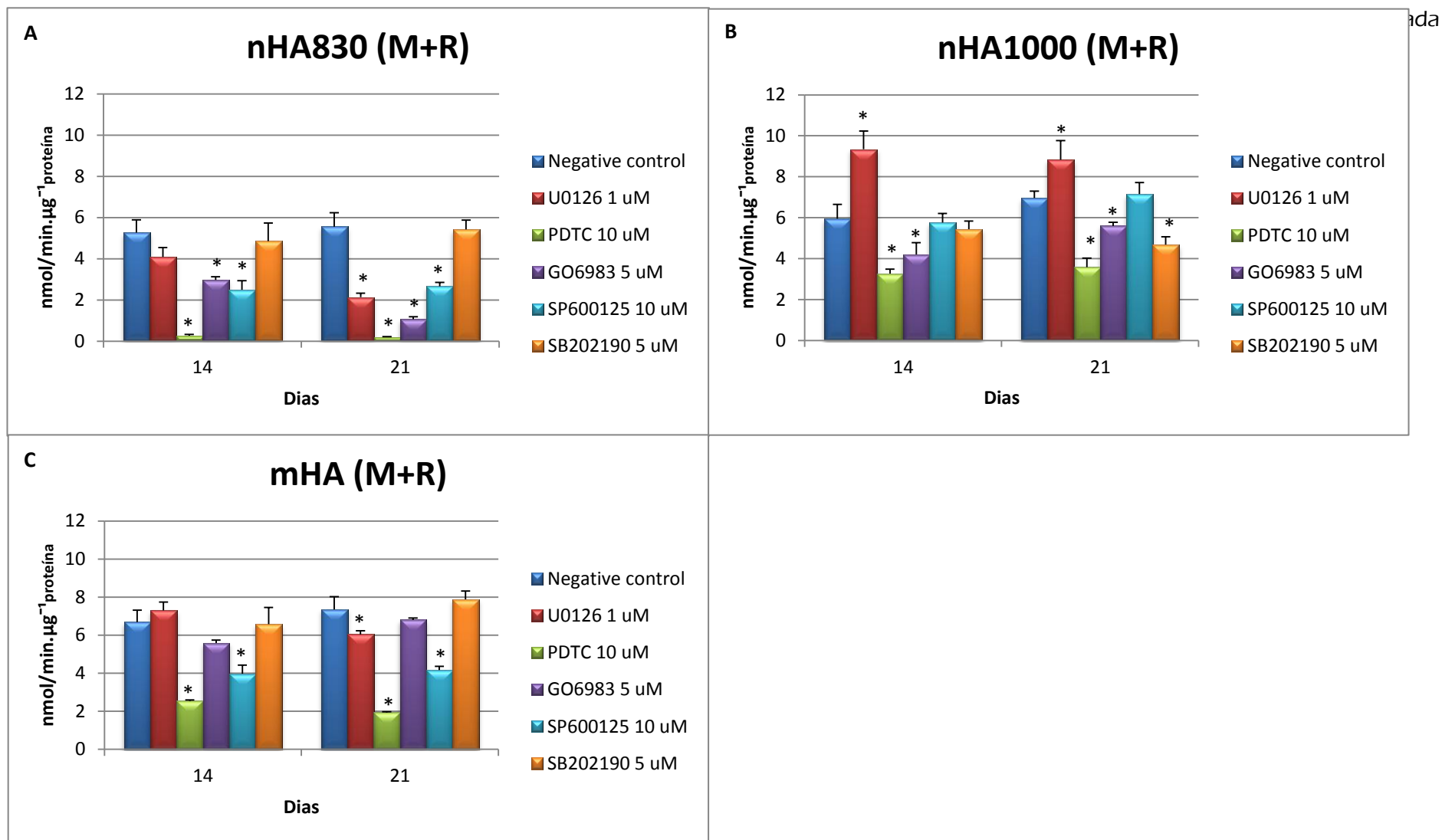


Figura 44. Atividade da TRAP, normalizada com o conteúdo proteico, em culturas de PBMC (M+R) tratadas com diferentes inibidores de vias de sinalização e efetuadas sobre as superfícies de **(A)** nHA830, **(B)** nHA1000 e **(C)** mHA. * significativamente diferente do controle.

Nas culturas efetuadas em BM sobre os discos de nHA830 (Figura 43A), os inibidores U0126 (dia 21), SP600125 e principalmente o PDTC provocaram uma diminuição da resposta celular (17,4%, 52% e 95,1%, respetivamente). Os restantes inibidores (GO6983 e SB202190) não afetaram a atividade da TRAP. No caso das culturas com nHA1000 (Figura 43B), os inibidores PDTC, GO6983 e SB202190 provocaram uma diminuição da atividade enzimática, enquanto que o U0126 provocou um aumento da mesma. A resposta celular permaneceu inalterada na presença de SP600125. Nas culturas efetuadas em mHA (Figura 43C), os inibidores U0126, GO6983, SB202190 (dia 21) e, principalmente, o PDTC induziram uma diminuição da resposta celular. Já os inibidores, SP600125 e SB202190 (dia 14), não provocaram alterações na atividade enzimática.

Nas culturas efetuadas em M+R na superfície dos discos de nHA830 (Figura 44A), os inibidores U0126, GO6985, SP600125 e, em particular, o PDTC provocaram uma diminuição na atividade enzimática de 61,6%, 80,8%, 52,2% e 96,5%, respetivamente. A resposta celular não sofreu alterações com a presença do inibidor SB202190. Nas culturas efetuadas em nHA1000 (figura 44B), os inibidores induziram um comportamento semelhante ao verificado em BM. No caso das culturas efetuadas na superfície mHA (Figura 44C), os inibidores PDTC e SP600125 foram os que induziram uma maior inibição da resposta celular (43,4% e 73,5%, respetivamente). O inibidor GO6985 provocou também uma diminuição da resposta celular, tal como o U0126 (dia 21), mas estas não foram tão intensas em relação às obtidas em BM. O inibidor SB202190, no dia 14, não provocou alterações na resposta celular, mas no dia 21 provocou um aumento da resposta.

4. Discussão

Com este trabalho pretendeu-se avaliar o comportamento de células osteoclásticas humanas cultivadas sobre diferentes superfícies de HA. Esta análise reveste-se de particular importância, pois visa contribuir para uma melhor compreensão acerca do modo como estas células se vão desenvolver perante biomateriais com diferentes características de superfície. Este assunto encontra-se ainda muito pouco explorado, no que concerne às células osteoclásticas, apesar de ser irrefutável o papel central que essas células desempenham ao nível do metabolismo ósseo (Datta H K 2008). No entanto, em determinados contextos a aplicação dos substitutos ósseos pode requerer que a reabsorção osteoclástica ocorra na superfície do implante para uma correta formação óssea posterior. Para que este fenómeno ocorra é importante adaptar as propriedades (solubilidade, rugosidade, entre outros) dos biomateriais, neste caso em particular, da HA, de forma a permitir uma taxa de osteoclastogénese apropriada. Resumindo, o objetivo deste trabalho foi, portanto, analisar o comportamento dos precursores dos osteoclastos isolados a partir do sangue periférico humano, cultivados na superfície de amostras de nHA830, nHA1000 e mHA. A resposta celular foi avaliada quer ao nível da osteoclastogénese espontânea (ausência de estímulos osteoclastogénicos) quer ao nível da induzida (presença de M-CSF e RANKL).

Para avaliar a estrutura dos discos de nHA830, nHA1000 e mHA foram estudados diferentes parâmetros, como: composição química e física, hidrofobicidade, fatores morfológicos e topográficos, diâmetro de grão, fatores de rugosidade e porosidade. Com as técnicas de SEM e AFM foi possível observar a morfologia e a topografia das superfícies dos três tipos de discos e obter informações sobre os diâmetros dos grãos e as rugosidades das superfícies, respetivamente.

Tendo em conta os resultados obtidos para os três tipos de discos verificámos que os nHA830 são os que possuem diâmetros de grão inferiores a 100 nm, possuem uma área superficial total e uma percentagem de porosidade elevadas ($18,8 \text{ m}^2/\text{g}$ e 44,6%, respetivamente), são os menos rugosos ($R_A=104,8 \text{ nm}$ e $R_Q = 161,6 \text{ nm}$) e os mais hidrofílicos ($17,4^\circ$). Os discos nHA1000 possuem diâmetros de grão que ultrapassam os 100 nm e possuem um perfil intermédio face aos discos nHA830 e mHA, isto é, possuem uma área superficial total e uma percentagem de porosidade de $1,4 \text{ m}^2/\text{g}$ e 7,7%, respetivamente, rugosidades $R_A=124,9 \text{ nm}$ e $R_Q = 198,3 \text{ nm}$ e possuem um carácter hidrofílico ($37,6^\circ$). Já os discos de mHA possuem diâmetros de grão na ordem dos $3,8 \text{ }\mu\text{m}$, uma área superficial e porosidade baixas ($0,2 \text{ m}^2/\text{g}$ e

3,4%, respetivamente), são os mais rugosos ($R_A=242,8$ nm e $R_Q = 312,6$ nm) e os menos hidrofílicos (56,7°).

Os padrões analisados na caracterização química (FT-IR) e física (XRD) estão de acordo com a literatura, apresentando bandas com comprimentos de onda semelhantes para os mesmos grupos químicos (Laranjeira M S 2010; Ribeiro N 2010) e estrutura cristalina marcadamente semelhante (Detsch R 2010).

Em relação ao diâmetro de grão, área superficial e porosidade para os discos nHA1000, os resultados obtidos são concordantes com alguns dados descritos previamente (Ribeiro N 2010). Os dados da autora Ribeiro N foram obtidos de modo semelhante aos do presente trabalho. Em relação aos dados obtidos com os discos de nHA830 e de mHA, a ausência de dados previamente publicados sobre as características de superfície de biomateriais com composição semelhante impede o estabelecimento de comparações. No entanto, de acordo com um estudo efetuado anteriormente (Pattanayak D K 2005), quanto maior a temperatura de sinterização menor a percentagem de porosidade, o que está de acordo com os resultados obtidos neste trabalho.

Na análise dos resultados obtidos para a diferenciação e função osteoclástica, foi possível constatar que na ausência de estímulos osteoclastogénicos exógenos (M-CSF e RANKL), a resposta celular foi pouco acentuada, e idêntica para os três tipos de discos testados (nHA830, nHA1000 e mHA). Já na presença dos dois fatores recombinantes, a resposta celular foi marcadamente superior, o que se encontra de acordo com o papel fundamental do M-CSF e do RANKL na sobrevivência, diferenciação e função osteoclásticas (Datta H K 2008; Väänänen H K 2008). Adicionalmente, nesta condição verificou-se uma taxa de osteoclastogénese significativamente superior nos discos de mHA. De modo geral, os resultados obtidos na quantificação do conteúdo proteico revelaram que se verifica uma maior adesão celular nos discos de mHA. É importante salientar que existem numerosos estudos que analisaram o comportamento celular em micro- e nanobiomateriais. Muitos desses trabalhos têm sido efetuados para averiguar como é que o efeito da superfície micro e nanoestruturada pode afetar a orientação celular, migração, morfologia e proliferação (Martínez E 2009). Verificou-se que o efeito da superfície micro- e nanoestruturada na proliferação celular é altamente difuso e dependente do tipo de célula e estruturas envolvidas (Dalby M J 2004; Miller D C 2004; Green A M 1994), pelo que o estabelecimento de comparações com outros tipos celulares se revela uma tarefa bastante difícil e, eventualmente, pouco rigorosa.

Considerando todos os resultados obtidos e tendo em conta que os materiais testados eram quimicamente semelhantes, pode-se afirmar que as suas propriedades físicas (tamanho de grão, área superficial, porosidade, rugosidade e hidrofobicidade) causaram um efeito

significativo na modulação da diferenciação osteoclástica. Ou seja, a dimensão elevada do grão, baixa área superficial, baixos níveis de porosidade, elevado grau de rugosidade e baixa hidrofília conduziram a que ocorresse uma osteoclastogénese mais acentuada.

A topografia da superfície, independentemente da sua composição química, tem sido um parâmetro muito estudado na área da bioengenharia, tendo-se constatado que o mesmo tem efeitos significativos no comportamento celular (Martínez E 2009). A rugosidade das superfícies aparenta influenciar mais eficazmente a adesão celular; contudo pode representar um obstáculo para a mobilidade celular. A adesão e a mobilidade celular são os primeiros passos da osteoclastogénese, porque os precursores osteoclastogénicos aderem à superfície e migram de modo a iniciarem o processo de fusão (Väänänen H K 2008). Assim, ambos os processos podem ser significativamente afetados pela rugosidade da superfície (Costa-Rodrigues J 2012). Os autores Chehroudi B e Brunette D M (Chehroudi B 1995) verificaram, também, que a diferenciação e função osteoclástica são favorecidas em superfícies mais rugosas. Tendo em conta os resultados obtidos neste trabalho pode-se observar que nas superfícies mais rugosas, isto é nos discos mHA, foi onde ocorreu uma maior diferenciação dos osteoclastos, o que está de acordo com os dados publicados. Por outro lado, estudos sugerem que as células têm tendência a aderir e proliferar mais em superfícies hidrofílicas (Bacakova L 2011). No entanto, em superfícies altamente hidrofílicas a adesão celular é bastante limitada, pois as moléculas que medeiam a adsorção celular possuem forças de ligação relativamente fracas, o que leva a que as células se desprendam mais facilmente deste tipo de superfície (Bacakova L 2011). Neste trabalho as superfícies mHA foram as que apresentaram um carácter menos hidrofílico (56,7°) e aparentemente foram as superfícies onde se obteve uma resposta osteoclastogénica superior, o que está de acordo com os dados apresentados no estudo liderado pelo autor Bacakova L.

Webster e os seus colaboradores (Webster T J 2001a) demonstraram, pela primeira vez, que a função dos osteoclastos em materiais cerâmicos nanoestruturados foi mais intensa do que em cerâmicos convencionais (microestruturados). Tendo em conta que os autores utilizaram condições experimentais muito diferentes deste estudo, tais como método de preparação de HA e os osteoclastos foram diferenciados a partir de células da medula óssea de ratinho, é expectável que se possam obter comportamentos celulares distintos dos do presente trabalho. Portanto, existe alguma controvérsia nos poucos trabalhos publicados, o que reforça a relevância e pertinência deste tipo de estudos, particularmente dos que envolve células humanas primárias, como é o caso do presente trabalho.

Este trabalho visou também analisar as vias de sinalização importantes para a osteoclastogénese moduladas pela superfície dos materiais (nHA830, nHA1000 e mHA). Este

estudo é particularmente interessante devido ao facto de não existir muita informação que relacione a osteoclastogénese modulada por diferentes biomateriais (e, em particular, pelas diferentes superfícies de HA) com os processos intracelulares envolvidos.

Constatou-se que nas culturas efetuadas em BM e em M+R sobre os discos de nHA830 a via de sinalização NF- κ B é de extrema importância para o processo da osteoclastogénese. Em BM, as vias de sinalização do MEK (dia 21), JNK foram relativamente relevantes para este processo nestes discos. Já as vias PKC e p38 não mostraram uma relevância significativa. Em M+R, as vias de sinalização MEK, PKC e JNK estiveram envolvidas para a osteoclastogénese observada em nHA830. Nas culturas efetuadas em nHA1000 (BM e M+R) as vias mais importantes para a osteoclastogénese foram NF- κ B, PKC e p38. A via de sinalização JNK não aparentou ser importante para o processo. E, no caso dos discos de mHA (BM) as vias de sinalização envolvidas na osteoclastogénese foram a MEK, PKC, p38 (dia 21), e, em especial, a NF- κ B. No caso das culturas suplementadas com M-CSF e RANKL, as vias mais significativas foram NF- κ B, JNK, PKC e MEK (dia 21).

Resumindo, este trabalho demonstrou que as propriedades de superfície da HA têm a capacidade de afetar a diferenciação e função osteoclástica, através da modulação de diferentes mecanismos intracelulares.

Capítulo IV – Conclusões Finais e Perspetivas Futuras

O osso é um tecido especializado concebido para fornecer resistência, proteção e rigidez de modo a suportar as cargas mecânicas que lhe são aplicadas, mas precisa de ser leve o suficiente para permitir a mobilidade. Possui uma estrutura complexa e encontra-se constantemente em remodelação, sendo que este processo é regulado pela BMU. Vários avanços recentes têm mostrado que as células dos ossos não estão apenas envolvidas na remodelação e manutenção da massa óssea, mas estão envolvidas num número de outras funções importantes. De entre estas funções destacam-se a produção de energia metabólica, regulação de imunidade e na homeostase do fósforo no sangue (Datta H K 2008).

Com a descoberta da importância da angiogénese e dos fatores de crescimento nos mecanismos de formação do osso, abriu-se um universo de novas aplicações clínicas para os biomateriais (Gutierrez M 2006). De facto, a engenharia biomédica tem sofrido uma evolução quase exponencial em termos de avanços científicos, surgindo como um potencial extremamente elevado na resolução de diversos problemas clínicos. Os avanços científicos na área dos substitutos ósseos são notórios (Gutierrez M 2006). A nível de materiais osteocondutores, a evolução deu-se com a introdução de técnicas inovadoras na preparação dos biocerâmicos com um comportamento mecânico e biológico mais próximo do osso. A engenharia de tecidos segue agora com estudos no sentido da associação de biomateriais com células ósseas com o propósito de lhes conferir o componente osteogénico que lhes falta (Gutierrez M 2006). Nesse contexto, torna-se crucial um conhecimento detalhado do comportamento de células ósseas (osteoblastos e osteoclastos, ou os seus precursores) quando colocadas perante biomateriais com diferentes propriedades.

Durante a última década foi feito um progresso significativo na compreensão dos mecanismos envolvidos no processo da osteoclastogénese. No entanto, e apesar de muitos fatores e mecanismos moleculares responsáveis pela diferenciação e funções específicas dos osteoclastos já terem sido esclarecidos, o conhecimento do processo ainda é incompleto, particularmente quando os osteoclastos (ou os seus precursores) se encontram na presença de biomateriais.

A osteoclastogénese aparenta ser influenciada pelas propriedades da superfície da HA. Neste contexto, torna-se imprescindível compreender como é que esta modulação ocorre para assim possibilitar desenhar novos biomateriais para serem usados na estratégia da regeneração óssea. O presente estudo veio portanto contribuir para uma melhor compreensão do comportamento dos osteoclastos na presença de HA e das características de superfície mais favoráveis para o seu desenvolvimento. Em particular, elevado tamanho de grão, baixa área superficial, baixos níveis de porosidade, elevado grau de rugosidade e reduzida hidrofilicidade conduziram a que ocorresse uma elevada diferenciação osteoclástica. Adicionalmente, foi

possível constatar que os mecanismos intracelulares associados à diferenciação osteoclástica foram diferencialmente afetados pelas superfícies testadas. Concluindo, este trabalho pode abrir portas a uma elucidação mais detalhada do processo osteoclastogénico na presença de HA e/ou de outros biomateriais.

Estudos futuros poderão incluir testes equivalentes com osteoblastos, com co-culturas de osteoblastos e osteoclastos, com células endoteliais (para avaliar o processo de angiogénese) e testes *in vivo* com estes três tipos de HA.

Bibliografia

- Al-Munajjed A A, O'Brien F J. 2009. "Influence of a novel calcium-phosphate coating on the mechanical properties of highly porous collagen scaffolds for bone repair." *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* no. 2 (2):138-46.
- Anderson D M, Maraskovsky E, Billingsley W L, Dougall W C, Tometsko M E, Roux E R, Teepe M C, DuBose R F, Cosman D, Galibert L 1997. "A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function." *Nature* no. 390 (6656):175-9.
- Bacakova L, Filova E, Parizek M, Ruml T, Svorcik V. 2011. "Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants." *Biotechnol Adv* no. 29 (6):739-67.
- Banwart J C. 1995. "Iliac crest bone graft harvest donor site morbidity." *Spine* no. 20 (9):1055-60.
- Baron R, Horne C W. 2005. "Regulation of Osteoclast Activity." In *Bone Resorption*, 34-46. USA: Springer Science.
- Bauer T W, Muschler G F. 2000. "Bone graft materials. An overview of the basic science." *Clin Orthop* no. 371:10-27.
- Beorkitt H G, Young B, Heath J H. 1993. "Wheater's functional histology." In *A text and colour atlas*, edited by Churchill Livingstone, 170-90.
- Bigi A, Cojazzi G, Panzavolta S, Ripamonti A, Roveri N, Romanello M, Noris Suarez K, Moro L. 1997. "Chemical and structural characterization of the mineral phase from cortical and trabecular bone." *J Inorg Biochem* no. 68 (1):45-51.
- Blair H C, Teitelbaum S L, Ghiselli R, & Gluck S. 1989. "Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump." *Science* no. 245 (4920):855-7.
- Bonyadi M, Waldman S D, Liu D, Aubin J E, Grynpas M D, Stanford W L. 2003. "Mesenchymal progenitor self-renewal deficiency leads to age-dependent osteoporosis in Sca-1/Ly-6A null mice." *Proc Natl Acad Sci USA* no. 100 (10):5840-5.
- Boyce B F, Xing L. 2008. "Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling " *Arch Biochem Biophys* no. 473 (2):139-46.
- Boyle W J, Simonet W S, Lacey D L. 2003. "Osteoclast differentiation and activation." *Nature* no. 423 (6937):337-42.
- Bradford M M. 1976. "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* no. 72:248-54.
- Bronner F. 1992. "Bone and calcium homeostasis." *Neurotoxicology* no. 13 (4):775-82.
- Buijs J T, van der Pluijm G. 2009. "Osteotropic cancers: from primary tumor to bone." *Cancer Lett* no. 273 (2):177-93.
- Burgess T L, Qian Y, Kaufman S, Ring B D, Van G, Capparelli C, Kelley M, Hsu H, Boyle W J, Dunstan C R, Hu S, & Lacey D L. 1999. "The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts." *J Cell Biol.* no. 145 (3):527-38.
- Caetano-Lopes J, Canhão H, Fonseca J E. 2007. "Osteoblasts and bone formation " *Acta Reum Port* no. 32 (2):103-10.
- Carol V G, Henry J D, Christopher A S, and Erwin V. 2005. "Cell Biology of the Skeletal System: Osteoblasts, Osteocytes, Osteoclasts, Bone Marrow Stromal Cells." In *Bone Tissue Engineering* edited by Thomas A. Einhorn Jeffrey O. Hollinger, Bruce A. Doll, and Charles Sfeir, 43. Boca Raton: CRC PRESS.
- Chambers T J, Magnus C J. 1982. "Calcitonin alters behaviour of isolated osteoclasts." *J Pathol* no. 136 (1):27-39.
- Chau T T. 2009. "A review of techniques for measurement of contact angles and their applicability on mineral surfaces." *Minerals Engineering* no. 22:213-9.

- Chehroudi B, Brunette D M. 1995. "Effects of surface topography on cell behaviour." In *Encyclopedic handbook of biomaterials and bioengineering*, edited by Wise L Donald DJT, Altobelli DE, Michael J, Yaszewski MY, Gresser JD, et al., editors, 813-42. New York: Marcel Dekker.
- Chen Q Z, Wong C T, Lu W W, Cheung K M, Leong J C, Luk K D. 2004. "Strengthening mechanisms of bone bonding to crystalline hydroxyapatite in vivo." *Biomaterials* no. 25 (18):4243-54.
- Chesmel K D, Black J. 1995. "Cellular responses to chemical and morphologic aspects of biomaterial surfaces. I. A novel in vitro model system." *J Biomed Mater Res* no. 29 (9):1089-99.
- Chitu V, Stanley E R. 2006. "Colony-stimulating factor-1 in immunity and inflammation." *Curr Opin Immunol.* no. 18 (1):39-48.
- Clarke S A, Hoskins N L, Jordan G R, Henderson S A, Marsh D R. 2007. "In vitro testing of advanced JAX TM bone void filler system: Species differences in the response of bone marrow stromal cells to b tri-calcium phosphate and carboxymethylcellulose gel." *J Mater Sci Mater Med* no. 18 (12):2283-90.
- Cobb M H, Goldsmith E J 1995. "How MAP kinases are regulated." *J Biol Chem* no. 270 (25):14843-6.
- Costa-Rodrigues J, Fernandes A, Lopes M A, Fernandes M H. 2012. "Hydroxyapatite surface roughness: complex modulation of the osteoclastogenesis of human precursor cells." *Acta Biomater* no. 8 (3):1137-45.
- Costa-Rodrigues J, Teixeira C A, Sampaio P, Fernandes M H. 2010. "Characterisation of the Osteoclastogenic Potential of Human Osteoblastic and Fibroblastic Conditioned Media." *Journal of Cellular Biochemistry* no. 109 (1):205-16.
- Costa A G, Cusano N E, Silva B C, Cremers S, Bilezikian J P. 2011. "Cathepsin K: its skeletal actions and role as a therapeutic target in osteoporosis." *Nat Rev Rheumatol* no. 7 (8):447-56. doi: 10.1038/nrrheum.2011.77.
- Dalby M J, Riehle M O, Sutherland D S, Agheli H, Curtis A S. 2004. "Fibroblast response to a controlled nanoenvironment produced by colloidal lithography." *J Biomed Mater Res A* no. 69 (2):314-22.
- Datta H K , Ng W F, Walker J A, Tuck S P, Varanasi S S. 2008. "The cell biology of bone metabolism." *J Clin Pathol* no. 61 (5):577-87.
- Degasne I, Baslé MF, Demais V, Huré G, Lesourd M, Grolleau B, Mercier L, Chappard D. 1999. "Effects of roughness, fibronectin and vitronectin on attachment, spreading, and proliferation of human osteoblast-like cells (Saos-2) on titanium surfaces." *Calcif Tissue Int.* no. 64 (6):499-507.
- Detsch R, Hagmeyer D, Neumann M, Schaefer S, Vortkamp A, Wuelling M, Ziegler G, Eppel M. 2010. "The resorption of nanocrystalline calcium phosphates by osteoclast-like cells." *Acta Biomater* no. 6 (8):3223-33.
- Doremus R H. 1992. "Bioceramics." *J Mater Sci* no. 27:285-97.
- Duong L T, Sanjay A, Horne W, Baron R, Rodan G A. 2002. "Integrin and calcitonin receptor signaling in the regulation of the cytoskeleton and function of osteoclasts." In *Principles of Bone Biology*, edited by L.G. Raisz J.P. Bilezikian, G.A. Rodan, 141-150. San Diego Academic Press.
- Eghbali-Fatourehchi G, Khosla S, Sanyal A, Boyle W J, Lacey D L, Riggs B L. 2003. "Role of RANK ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women." *J Clin Invest* no. 111 (8):1221-30.
- Elias K L, Price R L, Webster T J. 2002. "Enhanced functions of osteoblasts on nanometer diameter carbon fibers." *Biomaterials* no. 23 (15):3279-87.
- Faust J, Lacey D L, Hunt P, Burgess T L, Scully S, Eli A, Qian Y, Shalhoub V. 1999. "Osteoclast markers accumulate on cells developing from human peripheral blood mononuclear precursors." *J Cell Biochem* no. 72 (1):67-80.

- Feldman R S, Krieger N S, Tashjian A H. 1980. "Effects of parathyroid hormone and calcitonin on osteoclast formation in vitro." *Endocrinology* no. 107 (4):1137-43.
- Fernandes M H. 1998. "Regulation mechanisms of bone metabolism." *Acta Med Port.* no. 11 (1):41-52.
- Fernandes M H, Costa M A, Carvalho G S. 1995. "In vitro osteogenesis by human alveolar bone cells in the presence of dexamethasone " *Pharm Res* no. 31 (suppl 8).
- . 1997. "Mineralization in serially passaged human alveolar bone cells." *J Mater Sci Mater Med* no. 8 (2):61-5.
- Ferraz M P, Monteiro F J, Manuel C M. 2004. "Hydroxyapatite nanoparticles: A review of preparation methodologies." *Journal of Applied Biomaterials & Biomechanics* no. 2 (2):74-80.
- Fixe P, Rougier F, Ostyn E, Gachard N, Faucher J L, Praloran V, Denizot Y. 1997. "Spontaneous and inducible production of macrophage colony-stimulating factor by human bone marrow stromal cells." *Eur Cytokine Netw.* no. 8 (1):91-5.
- Fleming J E Jr, Cornell C N, Muschler G F. 2000. "Bone cells and matrices in Orthopedic Tissue Engineering." *Orthop Clin North Am* no. 31 (3):357-74.
- Frost H M. 1964. "Bone biodynamics." In *Dynamics of bone remodeling*, edited by Little & Brown. Boston.
- . 1995. *Introduction to a new skeletal physiology* Vol. I and II. Pueblo: Pajaro Group.
- Fujikawa Y, Quinn J M, Sabokbar A, McGee J O, Athanasou N A. 1996. "The human osteoclast precursor circulates in the monocyte fraction." *Endocrinology* no. 137 (9):4058-60.
- Fuller K, Wong B, Fox S, Choi Y, Chambers T J. 1998. "TRANCE is necessary and sufficient for osteoblast-mediated activation of bone resorption in osteoclasts." *J Exp Med* no. 188 (5):997-1001.
- Fumio W, Noriyuki T, Atsuro Y, Motohiro U, Tsukasa A, Yoshinori, Shigeaki A, Yasunori T, Kazuyuki T. 2009. "Material nanosizing effect on living organisms: non-specific, biointeractive, physical size effects." *The Royal Society* no. 6 (supp3):S371-S388.
- Gehron-Robey P, and Boskey, A L. 1996. *Osteoporosis*. Edited by Feldman D Marcus F, Kelsey J. San Diego: Academic Press.
- Gomi K, Bruijn J D, Ogura M, Davies J E 1993. "The effect of substratum roughness on osteoclast-like cells *in vitro*." *Cell and Mat* no. 3:151-60.
- Gorski J P. 1998. "Is all bone the same? Distinctive distributions and properties of non-collagenous matrix proteins in lamellar vs. woven bone imply the existence of different underlying osteogenic mechanisms." *Critical Review of Oral Biology* no. 9 (2):201-23.
- Green A M, Jansen J A, van der Waerden J P, von Recum A F. 1994. "Fibroblast response to microtextured silicone surfaces: texture orientation into or out of the surface." *J Biomed Mater Res* no. 28 (5):647-53.
- Green J, Kleeman C R. 1991. "Role of bone in regulation of systemic acid-base balance." *Kidney Int* no. 39 (1):9-26.
- Gutierrez M, Lopes M, Hussain N, Cabral A, Almeida L, Santos J. 2006. "Substitutos ósseos. Conceitos gerais e estado actual " *Arquivos de medicina* no. 19 (4):153-62.
- Gutwein L G, Webster T J. 2002. "Osteoblast and chondrocyte proliferation in the presence of alumina and titania nanoparticles." *J Nanopart Res* no. 4:231-8.
- Guyton A C. 1986. "Parathyroid hormone, calcitonin and phosphate metabolism, vitamin D, bone, and teeth." In *Textbook of Medical Physiology* edited by W. B. Saunders Company, 937-52.
- Habibovic P, Krut M C, Juhl M V, Clyens S, Martinetti R, Dolcini L, Theilgaard N, Blitterswijk C Av. 2008. "Comparative in vivo study of six hydroxyapatite-based bone graft substitutes." *J Orthop Res* no. 26 (10):1363-70.
- Halleen J M, Alatalo S L, Suominen H, Cheng S, Janckila A J, & Vaananen H K. 2000. "Tartrate-resistant acid phosphatase 5b: a novel serum marker of bone resorption." *J Bone Miner Res* no. 15 (7):1337-45.

- Halleen J M, Hentunen T A, Hellman J, & Vaananen H K. 1996. "Tartrate-resistant acid phosphatase from human bone: purification and development of an immunoassay." *J Bone Miner Res* no. 11:1444-52.
- Hin T S. 2004. "Introduction to biomaterials engineering and processing - an overview." In *Engineering Materials for Biomedical Applications*. Singapore: World Scientific.
- Hirsch P F, Munson P L. 1969. "Thyrocalcitonin." *Physiol Rev* no. 49 (3):548-622.
- Hofbauer L C, Lacey D L, Dunstan C R, Spelsberg T C, Riggs B L, Khosla S 1999. "Interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α , but not interleukin-6, stimulate osteoprotegerin ligand gene expression in human osteoblastic cells." *Bone* no. 25 (3):255-9.
- Hong-wen D, Yao-zhong L. 2005. *Current Topics in Bone Biology*. Singapore: World Scientific.
- Horton M A. 1997. "The α v β 3 integrin "vitronectin receptor"." *Int J Biochem Cell Biol* no. 29 (5):721-5.
- Hotokezaka H, Sakai E, Kanaoka K, Saito K, Matsuo K, Kitaura H, Yoshida N, Nakayama K. 2002. "U0126 and PD98059, specific inhibitors of MEK, accelerate differentiation of RAW264.7 cells into osteoclast-like cells." *J Biol Chem* no. 277 (49):47366-72.
- Ikada Y. 2002. *Biological Materials. In Integrated Biomaterials Science*. Edited by R. BARBUCCI. Siena: Kluwer Academic Publishers.
- Iwasaki S, Iguchi M, Watanabe K, Hoshino R, Tsujimoto M, Kohno M 1999. "Specific activation of the p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway and induction of neurite outgrowth in PC12 cells by bone morphogenetic protein-2." *J Biol Chem* no. 274 (37):26503–10.
- Jee, W S S. 1988. *Cell and tissue biology, textbook of histology*. Edited by Weiss. sixth ed. Baltimore: Urban and Schwarzenberg.
- . 1999. *Orthopaedics, principles of basic and clinical science*. Edited by F and Worrell Ronner. Boca Raton: CRC Press.
- . 2001. *Bone mechanics handbook* Edited by Ed. Cowin. Second ed. Boca Raton: CRC Press.
- Joon B P, Joseph D B. 2003. *Biomaterials PRINCIPLES and APPLICATIONS*. Edited by Joseph D. Bronzino Joon B Park. 2nd ed. Vol. 1. Boca Raton: CRC PRESS.
- Joschek S, Nies B, Krotz R, GoKpferich A. 2000. "Chemical and physicochemical characterization of porous hydroxyapatite ceramics made of natural bone." *Biomaterials* no. 21 (16):1645–58.
- Kalita S J, Bhardwaj A, Bhatt H A. 2007. "Nanocrystalline calcium phosphate ceramics in biomedical engineering." *Mater Sci Eng C* no. 27:441–9.
- Kanehisa J, Yamanaka T, Doi S, Turksen K, Heersche J N, Aubin J E, Takeuchi H. 1990. "A band of F-actin containing podosomes is involved in bone resorption by osteoclasts." *Bone* no. 11 (4):287-93.
- Kay S, Thapa A, Haberstroh K M, Webster T J. 2002. "Nanostructured polymer/nanophase ceramic composites enhance osteoblast and chondrocyte adhesion." *Tissue Eng* no. 8 (5):753-61.
- Kffiker A. 1873. "Die normale Resorption des Knochengewebes und ihre Bedeutung fqr die Entstehung der typischen Kochformen." *Leipzig FCW Vogel*.
- Khan S N. 2000. "Clinical applications of Bone Graft substitutes." *Orthop Clin North Am* no. 31 (3):389-98.
- Khosla S, Kleerekoper M. 2003. *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. Edited by M J Favus, *American Society for Bone and Mineral Research* Wash. D. C.
- Kierszenbaum A L. 2002. *Histology and cell biology: an introduction to pathology.*: Elsevier Health Sciences Edition.

- Kim H J, Lee Y, Chang E J, Kim H M, Hong S P, Lee Z H, Ryu J, Kim H H. 2007. "Suppression of osteoclastogenesis by N,N-dimethyl-D-erythrosphingosine: a sphingosine kinase inhibition-independent action." *Mol Pharmacol* no. 72 (2):418-28.
- Kong L B, Ma J, Boey F. 2002. "Nanosized hydroxyapatite powders derived from coprecipitation process." *J Mater Sci* no. 37:1131-4.
- Kurihara N, Civin C, Roodman G D. 1991. "Osteotropic factor responsiveness of highly purified populations of early and late precursors for human multinucleated cells expressing the osteoclast phenotype." *J Bone Miner Res* no. 6 (3):257-61.
- Lacey D L, Timms E, Tan H L, Kelley M J, Dunstan C R, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian Y X, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle W J. 1998. "Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation." *Cell* no. 93 (2):165-76.
- Lakkakorpi P T, Horton M A, Helfrich M H, Karhukorpi E K, & Vaananen H K. 1991. "Vitronectin receptor has a role in bone resorption but does not mediate tight sealing zone attachment of osteoclasts to the bone surface." *J Cell Biol* no. 115:1179-86.
- Lakkakorpi P T, Vaananen H K 1996. "Cytoskeletal changes in osteoclasts during the resorption cycle." *Microsc Res Tech* no. 33 (2):171-81.
- Lane N E, Yao W. 2009. "Developments in the scientific understanding of osteoporosis." *Arthritis Res Ther* no. 11 (3):228.
- Laranjeira M S, Fernandes M H, Monteiro F J. 2010. "Innovative macroporous granules of nanostructured-hydroxyapatite agglomerates: bioactivity and osteoblast-like cell behaviour." *J Biomed Mater Res A*. no. 95 (3):891-900.
- Laurencin C T. 2004. "Bone graft and bonegraft substitutes a brief history." In *Bone graft substitute*, edited by Laurencin CT. ASTM International.
- Le Nihouannen D, Daculsi G, Saffarzadeh A, Gauthier O, Delplace S, Pilet P, Layrolle P. 2005. "Ectopic bone formation by microporous calcium phosphate ceramic particles in sheep muscles." *Bone* no. 36 (6):1086-93.
- Le Nihouannen D, Duval L, Lecomte A, Julien M, Guicheux J, Daculsi G, Layrolle P. 2007. "Interactions of total bone marrow cells with increasing quantities of macroporous calcium phosphate ceramic granules." *J Mater Sci Mater Med* no. 18 (10):1983-90.
- Lee S E, Woo K M, Kim S Y, Kim H M, Kwack K, Lee Z H, and Kim H H. 2002. "The phosphatidylinositol 3-kinase, p38, and extracellular signal-regulated kinase pathways are involved in osteoclast differentiation." *Bone* no. 30 (1):71-7.
- Lee S K, Lorenzo J A 1999. "Parathyroid hormone stimulates TRANCE and inhibits osteoprotegerin messenger ribonucleic acid expression in murine bone marrow cultures: correlation with osteoclast-like cell formation." *Endocrinol.* no. 140 (8):3552-61
- Lemons J E. 2004. *Materials Science and Engineering In An Introduction to Materials in Medicine*. Edited by Frederick J. Schoen A. S. H. Buddy D. Ratner, Jack E. Lemons. San Diego, USA: Elsevier Academic Press.
- Li Y P, Chen W, Liang Y, Li E, Stashenko P. 1999. "Atp6i-deficient mice exhibit severe osteopetrosis due to loss of osteoclast-mediated extracellular acidification." *Nat Genet.* no. 23 (4):447-51.
- Lian J B, Stein G S, Canalis E, Gehron-Robey P, Boskey A L. 2003. *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. Edited by Favus M J. fifth ed. Wash. D.C.: American Society for Bone and Mineral Research.
- Lian J B, Stein G S, Canalis E, Robey P G, Boskey A I. 1999. *Primer on the metabolic bone diseases and disorder of mineral metabolism*. Edited by M J Favus. fourth ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins.

- Lopes M A. 1999a. *Glass reinforced hydroxyapatite composites: structure, physico chemical characterization and biological performance*, FEUP, Porto.
- Lopes M A, Santos J D, Monteiro F J, Ohtsuki C, Osaka A, Kaneko S, Inoue H. 1999b. "Osteocompatibility and in vivo evaluation of glass reinforced hydroxyapatite composite." *Bioceramics* no. 12:421-4.
- Makrigiannakis A, Minas V, Kalantaridou S N, Nikas G, Chrousos G P. 2006. "Hormonal and cytokine regulation of early implantation." *Trends Endocrinol Metab.* no. 17 (5):178-85.
- Manolagas S C, and Jilka R L. 1995. "Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis." *N. Engl. J. Med.* no. 332 (5):305-11
- Marks S C. 1996. "The structure and development of bone." In *Principles of Bone Biology* edited by Rodan G A Bilezikian J P, 3-14.
- Marks S C, Popoff S N. 1988. "Bone cell biology: The regulation of development, structure, and function in the skeleton " *Am. J. Anat.* no. 183 (1):1-44.
- Martínez E, Engel E, Planell J A, Samitier J. 2009. "Effects of artificial micro- and nano-structured surfaces on cell behaviour." *Ann Anat* no. 191 (1):126-35.
- Mateus A Y, Barrias C C, Ribeiro C, Ferraz M P, Monteiro F J. 2008. "Comparative study of nanohydroxyapatite microspheres for medical applications." *J Biomed Mater Res A* no. 86 (2):483-93.
- Mateus A Y, Ferraz M P, Monteiro F J. 2007. "Microspheres based on hydroxyapatite nanoparticles aggregates for bone regeneration." *Key Eng Mater* no. 330–332:243–6.
- Miller D C, Thapa A, Haberstroh K M, Webster T J. 2004. "Endothelial and vascular smooth muscle cell function on poly(lactic-co-glycolic acid) with nano-structured surface features." *Biomaterials* no. 25 (1):53-61.
- Murugan R, Ramakrishna S. 2005. "Development of nanocomposites for bone grafting." *Compos Sci Technol* no. 65:2385–406.
- Okamoto M, Dohi Y, Ohgushi H, Shimaoka H, Ikeuchi M, Matsushima A, Yonemasu K, Hosoi H. 2006. "Influence of the porosity of hydroxyapatite ceramics on in vitro and in vivo bone formation by cultured rat bone marrow stromal cells." *J Mater Sci Mater Med* no. 17 (4):327–36.
- Oksala N, Levula M, Pelto-Huikko M, Kytömäki L, Soini J T, Salenius J, Kähönen M, Karhunen P J, Laaksonen R, Parkkila S, Lehtimäki T. 2010. "Carbonic anhydrases II and XII are up-regulated in osteoclast-like cells in advanced human atherosclerotic plaques-Tampere Vascular Study." *Ann Med* no. 42 (5):360-70.
- Oliveira G M, Ferraz M P, González P G, Serra J, Leon B, Pèrez-Amor M, Monteiro F J. 2008. "PLD bioactive ceramic films: the influence of CaO-P2O5 glass additions to hydroxyapatite on the proliferation and morphology of osteoblastic like-cells." *J Mater Sci Mater Med* no. 19 (4):1775-85.
- Ozaki K, Takeda H, Iwahashi H, Kitano S, Hanazawa S. 1997. "NF-kappaB inhibitors stimulate apoptosis of rabbit mature osteoclasts and inhibit bone resorption by these cells." *FEBS Letters* no. 410 (2-3):297-300.
- Pacifici R. 1996. "Estrogen, cytokines, and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis." *J. Bone Miner. Res.* no. 11 (8):1043-51
- Palokangas H, Mulari M, Väänänen H K. 1997. "Endocytic pathway from the basal plasma membrane to the ruffled border membrane in bone-resorbing osteoclasts." *J Cell Sci* no. 110 (Pt 15):1767-80.
- Parfitt A M. 1983. *Bone histomorphometry: techniques and interpretation* Edited by Recker. Boca Raton: CRC Press.

- Park J. 2008. *Bioceramics Properties, Characterizations, and Applications*. USA: Springer Science+Business Media, LLC.
- Park J B, Lakes R S. 1992. *Biomaterials - an introduction*. 2nd ed. New York: Plenum Press.
- Pattanayak D K. 2005. "Synthesis and Evaluation of Hydroxyapatite Ceramics." *Trends Biomater* no. 18 (2):87-91.
- Perez-Amodio S, Beertsen W, Everts V. 2004. "(Pre-)osteoclasts induce retraction of osteoblasts before their fusion to osteoclasts." *J Bone Miner Res* no. 19 (10):1722-31.
- Pixley F J, Stanley E R. 2004. "CSF-1 regulation of the wandering macrophage: complexity in action." *Trends Cell Biol* no. 14 (11):628-38.
- Potoczek M, Zima A, Paszkiewicz Z, Slosarczyk A. 2009. "Manufacturing of highly porous calcium phosphate bioceramics via gel-casting using agarose." *Ceram Int* no. 35:2249–54.
- Price R L, Ellison K, Haberstroh K M, Webster T J. 2004. "Nanometer surface roughness increases select osteoblast adhesion on carbon nanofiber compacts." *J Biomed Mater Res A* no. 70 (1):129-38.
- Price R L, Gutwein LG, Kaledin L, Tepper F, Webster T J. 2003. "Osteoblast function on nanophase alumina materials: Influence of chemistry, phase, and topography." *J Biomed Mater Res A* no. 67 (4):1284-93.
- Ratner B D. 2004. "A history of Biomaterials." In *Biomaterials Science*, edited by Ratner, 10-9. Elsevier Inc.
- Ratner B D, Hoffman A S, Schoen F J, Lemons J E. 1996. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. New York: Elsevier Sci.
- Reddi A H. 2003. "Marshall R. Urist: A renaissance scientist and orthopedic surgeon." *J Bone Joint Surgery Am* no. 85-A (Suppl 3):3-7.
- Ribeiro N, Sousa S R, Monteiro F J. 2010. "Influence of crystallite size of nanophased hydroxyapatite on fibronectin and osteonectin adsorption and on MC3T3-E1 osteoblast adhesion and morphology." *J Colloid Interface Sci* no. 351 (2):398-406.
- Robling A G, Castillo A B, Turner C H. 2006. "Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling." *Annu Rev Biomed Eng* no. 8:455-98.
- Rossa C Jr, Liu M, Kirkwood K L. 2008. "A dominant function of p38 Mitogen Activated Protein Kinase signaling in Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand expression and osteoclastogenesis induction by *A. actinomycetemcomitans* and *E. coli* LPS." *J Periodontal Res* no. 43 (2):201–11. doi: 10.1111/j.1600-0765.2007.01013.x.
- Rubin M A, Jasiuk I, Taylor J, Rubin J, Ganey T, Apkarian R P. 2003. "TEM analysis of the nanostructure of normal and osteoporotic human trabecular bone." *Bone* no. 33 (3):270-82.
- Ryan G R, Dai X M, Dominguez M G, Tong W, Chuan F, Chisholm O, Russell R G, Pollard J W, Stanley E R. 2001. "Rescue of the colony-stimulating factor 1 (CSF-1)-nullizygous mouse (Csf1(op)/Csf1(op)) phenotype with a CSF-1 transgene and identification of sites of local CSF-1 synthesis." *Blood* no. 98 (1):74-84.
- Sandy C M, Paul R O. 2002. *Principles of Bone Biology* Second ed. Vol. 1. San Diego Academic Press.
- Santos J D, Hastings G W, Knowles J C. 1999. Sintered hydroxyapatite compositions and method for the preparation thereof. edited by European Patent WO.
- Sarah L D, Lynda F B. 2010. "Dynamics of the transition from osteoblast to osteocyte " *Annals of the New York Academy of Sciences*:437-43.
- Schenk R K, Felix R, Hofstetter W. 1993. *Connective tissue and its heritable disorders. Molecular, genetic and medical aspects*. Edited by PM and Steinmann Royce, B. New York: Wiley-Liss.
- Schilling A F, Linhart W, Filke S, Gebauer M, Schinke T, Rueger J M, Amling M. 2004. "Resorbability of bone substitute biomaterials by human osteoclasts." *Biomaterials* no. 25 (18):3963-72.

- Schmidt R, Kulbe K D. 1993. "Long-term cultivation of human osteoblasts." *Bone Miner* no. 20 (3):211-21.
- Schwenger P, Alpert D, Skolnik E Y, Vilcek J. 1998. "Activation of p38 mitogen-activated protein kinase by sodium salicylate leads to inhibition of tumor necrosis factor-induced I κ B α phosphorylation and degradation." *Mol Cell Biol* no. 18 (1):78–84.
- Shevde N K, Bendixen A C, Dienger K M, Pike J W. 2000. "Estrogens suppress RANK ligand-induced osteoclast differentiation via a stromal cell independent mechanism involving c-Jun repression." *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* no. 97 (14):7829-34.
- Simon J L, Michna S, Lewis J A, Rekow E D, Thompson V P, Smay J E, Yampolsky A, Parsons J R, Ricci J L. 2007. "In vivo bone response to 3D periodic hydroxyapatite scaffolds assembled by direct ink writing." *J Biomed Mater Res A* no. 83 (3):747–58.
- Sommerfeldt D W, Rubin C T. 2001. "Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton." *Eur Spine J* no. 10 (Suppl 2):S86-95.
- Spence G, Patel N, Brooks R, Bonfield W, Rushton N. 2010. "Osteoclastogenesis on hydroxyapatite ceramics: the effect of carbonate substitution." *J Biomed Mater Res A* no. 92 (4):1292-300.
- Suda T, Takahashi N. 1996. "Cells of bone: osteoclast generation." In *Principles of Bone Biology* edited by Rodan G A Bilezikian J P, 87-102.
- Suda T, Takahashi N, Martin T J. 1992. "Modulation of osteoclast differentiation " *Endocr Rev* no. 13 (1):66-80.
- Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie M T, Martin T J. 1999. "Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families." *Endocr. Revs.* no. 20 (3):345-57.
- Tadic D, Epple M. 2004. "A thorough physicochemical characterisation of 14 calcium phosphate-based bone substitution materials in comparison to natural bone." *Biomaterials* no. 25 (6):987-94.
- Takahashi N, Akatsu T, Udagawa N, Sasaki T, Yamaguchi A, Moseley J M, Martin T J, Suda T. 1988. "Osteoblastic cells are involved in osteoclast formation " *Endocrinol.* no. 123 (5):2600-02.
- Takahashi N , Udagawa N, Takami M, Suda T 2002. "Cells of Bone: Osteoclast Generation." In *Principles of Bone Biology* edited by ACADEMIC PRESS, 109-126. San Diego, California.
- Takai H, Kanematsu M, Yano K, Tsuda E, Higashio K, Ikeda K, Watanabe K, Yamada Y 1998. "Transforming growth factor-beta stimulates the production of osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor by bone marrow stromal cells." *J.Biol.Chem.* no. 273 (42):27091-6.
- Talik E, Zdyb R, Dziedzic A 2005. "Chemical characterization of selected high copper dental amalgams using XPS and XRD techniques." *J Alloys Compounds* no. 398:276-82.
- Tamama K, Fan V H, Griffith L G, Blair H C, Wells A. 2006. "Epidermal growth factor as a candidate for ex vivo expansion of bone marrow-derived mesenchymal stem cells." *Stem Cells* no. 24 (3):686-95.
- Tamer M K E, Reis R L 2009. "Progenitor and stem cells for bone and cartilage regeneration." *Journal of Tissue and Regenerative Medicine* no. 3 (5):327-37.
- Tare R S, Oreffo R O, Clarke N M, Roach H I. 2002. "Pleiotrophin/osteoblast-stimulating factor 1: dissecting its diverse functions in bone formation." *J Bone Miner Res* no. 17 (11):2009-20.
- Tas A C. 2008. "Preparation of porous apatite granules from calcium phosphate cement." *J Mater Sci Mater Med* no. 19 (5):2231–9.
- Teitelbaum S L. 2000. "Bone resorption by osteoclasts." *Science* no. 289 (5484):1504-8.
- . 2007. "Osteoclasts: what do they do and how do they do it?" *Am J Pathol* no. 170 (2):427-35.

- Teixeira C. 2008. *Utilização de diferentes meios condicionados como promotores da osteoclastogénese* Departamento de Botânica, Faculdade de Medicina Dentária do Porto, Porto.
- Tomford W W. 2000. "Bone allografts : Past, Present and future." *Cell Tissue Bank* no. 1 (2):105-9.
- Turhani D, Cviki B, Watzinger E, Weißenböck M, Yerit K, Thurnher D, Lauer G, Ewers R. 2005. "In vitro growth and differentiation of osteoblast-like cells on hydroxyapatite ceramic granule calcified from red algae." *J Oral Maxillofac Surg* no. 63 (6):793–9.
- Tuukkanen J, & Vaananen H K. 1986. "Omeprazole, a specific inhibitor of H⁺-K⁺-ATPase, inhibits bone resorption in vitro." *Calcif Tissue Int* no. 38 (2):123-5.
- Udagawa N, Takahashi N, Akatsu T, Tanaka H, Sasaki T, Nishihara T, Suda T. 1990. "Origin of osteoclasts: mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* no. 87 (18):7260-64.
- Väänänen H K. 1993. "Mechanism of bone turnover." *Ann Med* no. 25 (4):353-9.
- . 2004. "Mechanism of osteoclast mediated bone resorption - rationale for the design of new therapeutics " *Advanced Drug Delivery Reviews* no. 57 (7):959-71.
- Väänänen H K, & Horton M. 1995. "The osteoclast clear zone is a specialized cell-extracellular matrix adhesion structure." *J Cell Sci* no. 108 (Pt 8):2729-32.
- Väänänen H K, Karhukorpi E K, Sundquist K, Wallmark B, Roininen I, Hentunen T, Tuukkanen J, & Lakkakorpi P. 1990. "Evidence for the presence of a proton pump of the vacuolar H⁺-ATPase type in the ruffled borders of osteoclasts." *J Cell Biol.* no. 111 (3):1305-11
- Väänänen H K, Laitala-Leinonen T. 2008. "Osteoclast lineage and function " *Arch Biochem Biophys* no. 473 (2):132-8.
- Väänänen H K, Zhao H. 2002. "Osteoclast Function: Biology and Mechanisms." In *Principles of Bone Biology* edited by Lawrence G. Raisz John P. Bilezikian, Gideon A. Rodan, 128-9. San Diego Academic Press
- Vaccaro A R. 2002a. "The Role of the Osteoconductive Scaffold in Synthetic Bone Graft." *Orthopedics* no. 25 (suppl 5):S71-8.
- Vaccaro A R, Chiba K, Heller J G, Patel T Ch, Thalgott J S, Truumees E, Fischgrund J S, Craig M R, Berta S C, Wang J C. 2002b. "Bone grafting alternatives in spinal surgery." *Spine J* no. 2 (3):206-15.
- van Eeden S P, Ripamonti U. 1994. "Bone differentiation in porous hydroxyapatite in baboons is regulated by the geometry of the substratum: implications for reconstructive craniofacial surgery." *Plast Reconstr Surg* no. 93 (5):959-66.
- Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, & Penninger J M. 2006. "RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease." *Trends Mol Med.* no. 12 (1):17-25.
- Wahl D, Czernuszka J T. 2006. "Collagen-hydroxyapatite composites for hard tissue repair." *Eur Cell Mater* no. 11:43–56.
- Watari F, Yokoyama A, Gelinsky M, Pompe W. 2007. "Conversion of functions by nanosizing from osteoconductivity to bone substitutional properties in apatite." *Interface Oral Health Sci* no. 23:139–48.
- Watts N B. 2003. *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. Edited by Favus M J. fifth ed. Wash. D. C. : American Society for Bone and Mineral Research.
- Webster T J. 2000a. "Specific proteins mediate enhanced osteoblast adhesion on nanophase ceramics." *J Biomed Mater Res* no. 51 (3):475-83.
- Webster T J, Ahn E S. 2007. "Nanostructured biomaterials for tissue engineering bone." *Adv Biochem Eng Biotechnol* no. 103:275-308.

- Webster T J, Eijofor J U. 2004. "Increased osteoblast adhesion on nanophase metals: Ti, Ti6Al4V, and CoCrMo." *Biomaterials* no. 25 (19):4731-9.
- Webster T J, Ergun C, Doremus R H, Siegel R W, Bizios R. 2000b. "Enhanced functions of osteoblasts on nanophase ceramics." *Biomaterials* no. 21 (17):1803-10.
- . 2001a. "Enhanced osteoclast-like cell functions on nanophase ceramics." *Biomaterials* no. 22 (11):1327-33.
- Webster T J, Schadler L S, Siegel R W, Bizios R. 2001b. "Mechanisms of enhanced osteoblast adhesion on nanophase alumina involve vitronectin." *Tissue Eng* no. 7 (3):291-301.
- Webster T J, Siegel R W, Bizios R. 1999. "Design and evaluation of nanophase alumina for orthopaedic/dental applications." *Nanostuct Mater* no. 12:983-6.
- . 2001c. "Enhanced surface and mechanical properties of nano phase ceramics to achieve orthopaedic/dental implant efficacy." *Key Engeneering Materials* no. 192 (5):321-4.
- Wei G, Ma P X. 2004. "Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering." *Biomaterials* no. 25 (19):4749–57.
- Wong B R, Rho J, Arron J, Robinson E, Orlinick J, Chao M, Kalachikov S, Cayani E, Bartlett F S. 1997. "TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-Jun N-terminal kinase in T cells." *J Biol Chem.* no. 272 (3rd):25190-4.
- Xiao-Man L, Webster S S J. 2005. "Integrated Bone Tissue Anatomy and Physiology." In *Current Topics on Bone Biology*, edited by Yao-zhong Liu Hong-wen Deng, 11-21. USA: World Scientific
- Xu J L, Khor K A, Lu Y W, Chen W N, Kumar R. 2007. "Osteoblast Interactions With Various Hydroxyapatite Based Biomaterials Consolidated Using a Spark Plasma Sintering Technique " *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* no. 84 (1):224-30. doi: 10.1002/jbmb.
- Xu T, Zhang N, Nichols H L, Shi D, Wen X. 2007. "Modification of nanostructured materials for biomedical applications." *Mater Sci Eng C* (27):579–94.
- Yang C R, Wang J H, Hsieh S L, Wang S M, Hsu T L, Lin W W. 2004. "Decoy receptor 3 (DcR3) induces osteoclast formation from monocyte/macrophage lineage precursor cells." *Cell Death Differ* no. 11 Suppl 1:S97-107.
- Yang Q, McHugh K P, Patntirapong S, Gu X, Wunderlich L, Hauschka P V. 2008. "VEGF enhancement of osteoclast survival and bone resorption involves VEGF receptor-2 signaling and beta3-integrin " *Matrix Biol* no. 27 (7):589-99.
- Yang X B, Roach H I, Clarke N M, Howdle S M, Quirk R, Shakesheff K M, Oreffo R O. 2001. "Human osteoprogenitor growth and differentiation on synthetic biodegradable structures after surface modification " *Bone* no. 29 (6):523-31.
- Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Udagawa N, Takahashi N, Suda T. 1998. "Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL." *Proc Natl Acad Sci USA* no. 95 (7):3597-602.
- Yoshida H, Hayashi S, Kunisada T, Ogawa M, Nishikawa S, Okamura H, Sudo T, Shultz L D, Nishikawa S. 1990. "The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene." *Nature* no. 345 (6274):442-4.
- Zhang L, Webster T J. 2009. "Nanotechnology and nanomaterials: Promises for improved tissue regeneration." *Nano Today* no. 4:66-80.
- Zhao Q, Shao J, Chen W, Li Y P. 2007. "Osteoclast differentiation and gene regulation." *Front Biosci* no. 12:2519-29.
- Zhao Y, Zhang Y, Ning F, Guo D, Xu Z. 2007. "Synthesis and cellular biocompatibility of two kinds of HAP with different nanocrystal morphology." *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* no. 83 (1):121-6.