

Análise de ensaios *in vitro* do compósito de 50% HA-50% TiO₂ fabricados pelo método da esponja polimérica

(In vitro essay analysis of 50wt.% HA-50wt.% TiO₂ composite prepared by the polymeric sponge method)

A. G. S. Galdino¹, E. M. Oliveira², F. B. Filippin-Monteiro², C. A. C. Zavaglia³

¹Instituto Federal de Ensino, Pesquisa e Extensão do Espírito Santo, S. Mateus, ES, Brasil

²Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de S. Paulo, S. Paulo, SP, Brasil

³Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil
andregsg@ifes.edu.br

Resumo

À medida que há uma melhoria na tecnologia aplicada à saúde humana, a expectativa de vida vem aumentando, mas nem todas as partes do corpo podem manter suas funções com o processo de envelhecimento. A engenharia tecidual foi desenvolvida para substituir, reparar ou reconstruir tecidos ou órgãos perdidos ou danificados por acidentes ou doenças graves através da utilização e desenvolvimento de novos materiais, que sejam biocompatíveis, bioabsorvíveis, porosos, entre outras características. O objetivo deste trabalho é avaliar através dos ensaios *in vitro* o compósito poroso de hidroxiapatita - titânia (HA-TiO₂), com composição de 50% HA - 50% TiO₂ para obter arcabouços utilizados para engenharia tecidual óssea. Os corpos de prova foram produzidos pelo método da esponja polimérica, utilizando bicarbonato de sódio como ligante e floculante. A sinterização foi realizada em três temperaturas: a 1250 °C; 1300 °C e 1350 °C. Linhagens imortalizadas de fibroblastos e osteoblastos foram utilizadas para avaliar o compósito frente à citotoxicidade, crescimento e adesão celular. Nesses ensaios foram utilizados três corpos de prova porosos em um intervalo de cinco dias. Os resultados obtidos mostraram-se satisfatórios, com adesão e crescimento das células de fibroblastos e osteoblastos, o que serve como indicador para que esse compósito seja submetido posteriormente a ensaios *in vivo*.

Palavras-chave: hidroxiapatita, titânia, engenharia tecidual óssea, ensaios *in vitro*, método da esponja polimérica.

Abstract

Once there is an increase on technology applied to human health, life expectancy has increased, but not all body parts can maintain their functions with aging process. Tissue engineering has developed for replacing, repairing or reconstructing lost or damaged tissues or organs by accidents or serious diseases through using and developing of new materials, which are biocompatible, bioabsorbable, porous, etc. This research aimed on evaluating *in vitro* essays of porous hydroxyapatite - titanium oxide (HA-TiO₂) composite, with 50wt.% HA - 50wt.% TiO₂ for using as scaffolds on bone tissue engineering. Samples have been made by the polymeric sponge method, using sodium bicarbonate as binder and flocculant. Sintering has been done at 1250 °C; 1300 °C and 1350 °C. Fibroblasts and osteoblasts immortalized lineages have been used to evaluate the composite cytotoxicity, cell adhesion and growth. Three samples were used for those essays at an interval of five days. Results have shown satisfactory, with fibroblasts and osteoblasts adhesion and growth, which serves as an indicator for the composite can be submitted to *in vivo* essays.

Keywords: hydroxyapatite, titanium oxide, bone tissue engineering, *in vitro* essays, polymeric sponge method.

INTRODUÇÃO

À medida que há uma melhoria na tecnologia aplicada à saúde humana, a expectativa de vida vem aumentando, mas nem todas as partes do corpo podem manter suas funções com o processo de envelhecimento. É preciso que os ossos e a cartilagem apoiem o envelhecimento do corpo, embora as células que os produzem se tornem menos ativas com o tempo. Outros órgãos, tais como os rins, o coração e o fígado devem ser operados para ter um tempo de vida maior [1].

Procedimentos cirúrgicos para o reparo de perda de tecido devido a algum trauma ou extração de tecido doente envolvem implantes de enxerto (transplantes), que podem

ser doados de um sítio do mesmo paciente (autoenxerto), de outro ser humano (homoenxerto) ou de outras espécies (xenoenxertos). Tanto nos homoenxertos quanto nos xenoenxertos, há a possibilidade de transmissão de doenças, o que faz com que haja uma grande demanda para substitutos sintéticos especialmente projetados e fabricados para agir como um *scaffold* (arcabouço tridimensional poroso) na regeneração de tecidos para seu estado natural e suas funções, que é fundamental para a engenharia tecidual [1]. Os *scaffolds* normalmente possuem propriedades osteocondutivas, e raramente propriedades osteoindutivas ou osteogênicas, além de possuírem a grande vantagem de servir de suporte mecânico [2]. Quando utilizados para regeneração

do tecido ósseo, os *scaffolds* podem ser classificados em dois tipos: arcabouços que induzem a migração e o crescimento celular, provenientes de tecidos vizinhos, para a formação de tecido ósseo; arcabouços carreadores de células osteogênicas autógenas, que foram colonizadas em biorreatores e subsequentemente reimplantadas no paciente [3]. Eles podem ser de origem natural, como as cerâmicas, a exemplo do coral; sintéticos bioabsorvíveis, como o PGLA (Poli ácido glicólico - ácido lático), caprolactama (CPL) e cerâmicas porosas; ou híbridos [4].

A engenharia tecidual (também chamada de engenharia de tecidos) tem sido desenvolvida para substituir, reparar ou reconstruir tecidos ou órgãos perdidos ou danificados por acidentes ou doenças graves [5]. Esse processo é relativamente complexo, e por conta disso, a engenharia tecidual é um campo multidisciplinar que envolve a aplicação de princípios e métodos da engenharia e das ciências da saúde para assistir e acelerar a regeneração e o reparo de tecidos defeituosos ou danificados, através de melhorias nas terapias já existentes [6, 7]. Deste modo, essa ciência visa criar e aprimorar novas terapias e/ou desenvolver novos biomateriais que restaurem, melhorem ou impeçam o agravamento da função tecidual comprometida, o que resulta em redução significativa de custos [8-10].

Vários materiais vêm sendo desenvolvidos para utilização em implantes cirúrgicos e dispositivos médico-odontológicos. Foi indicado que, devido às limitações da utilização de enxerto ósseo autógeno, materiais sintéticos para essa aplicação vêm sendo pesquisados com uma alternativa de tratamento e lesões em tecido ósseo [11]. Para isso, são criados suportes de crescimento tecidual (*scaffolds*) que são biorreabsorvíveis.

Os eventos que são esperados que os implantes promovessem nos tecidos vivos são: (a) habilidade de se auto-reparar; (b) capacidade de manutenção do suprimento sanguíneo; e (c) a alteração da sua estrutura em resposta a fatores ambientais. Espera-se, ainda, que os novos biomateriais possam, através da interação entre biologia e engenharia, promover um reparo tecidual por um tempo mais longo do que a limitada expectativa de vida para os implantes humanos [12].

Dentre os biomateriais que foram desenvolvidos, e vem sendo aperfeiçoados estão alguns polímeros (poli ϵ -caprolactona), polimetacrilato de metila, etc., cerâmicas (hidroxiapatita), vidros bioativos (Bioglass®), compósitos (poli ϵ -caprolactona) (PCL) e β -fostato tricálcico (β -TCP) [13], hidroxiapatita-titânia [14], etc.

As características que os biomateriais devem possuir são [15, 16]: a) **biocompatibilidade**: o material deve ser atóxico, não promover reação de inflamação aguda ou crônica, ter uma baixa reatividade tecidual, ou seja, não promover rejeição do hospedeiro; b) **bioabsorção**: o material deve possuir degradabilidade que irá acompanhar a formação de um novo tecido; c) **porosidade**: o material deve possuir uma densidade de poros em torno de 75% com tamanhos médios de 200 a 400 μ m de diâmetro, onde os poros devem ser interconectados, possuir grande área superficial, para

favorecer a adesão protéica, além de aumentar a formação de colágeno; d) **quimiotaxia**: o material deve atrair células mesenquimais e fornece meios de adesão celular, facilitando a proliferação e a diferenciação celulares; e) **angiogênese**: o material deve promover vascularização, sendo hidrofílico, para absorver fluido sanguíneo e reforçar a coagulação inicial após a implantação; f) **baixo custo**: o material não pode exceder o valor do autoenxerto, possuindo materiais constituintes em abundância e uma esterilização eficiente.

Para que sejam desenvolvidos *scaffolds*, algumas características devem ser levadas em conta: a) suportar a deposição e crescimento celular; b) possuir uma taxa de degradação controlada a fim de suportar as duas fases de desenvolvimento tecidual (*in vitro* e *in vivo*), sem perder as propriedades mecânicas necessárias para substituir o tecido perdido; c) ter uma taxa de degradação de tal forma que haja espaço suficiente para o tecido se desenvolver, à medida que o material é reabsorvido [17].

Os biomateriais interagem com o ambiente do tecido em que são implantados, podendo ter interações onde há os seguintes efeitos: a) do implante sobre o hospedeiro; e b) do hospedeiro sobre o implante [18]. Os efeitos do implante no hospedeiro podem ser: a) local (interação entre sangue - material, toxicidade, infecção, etc.); e b) sistêmica e remota (hipersensibilidade, elevação dos elementos do implante no sangue, etc.), enquanto que os efeitos do hospedeiro no implante podem ser: a) efeitos físico-mecânicos (desgaste abrasivo, fadiga, corrosão, degeneração, etc.); e b) efeitos biológicos (calcificação, degradação enzimática, etc.) [18]. Essas etapas são as fases desejáveis para integração do implante ao organismo vivo. Contudo, a presença do biomaterial pode acarretar em processos indesejáveis para interação com o tecido, estimulando uma resposta inflamatória, levando a uma agressão no local de implantação. Nesse processo inflamatório, a resposta do hospedeiro ao biomaterial promove a liberação de mediadores químicos que desencadearão processos tais como a vasodilatação, com aumento da permeabilidade vascular e extravasamento de líquido intravascular. Este exsudado, com vários mediadores químicos, pode ativar células vizinhas e outros vasos sanguíneos, determinando a liberação de outros fatores pré-inflamatórios e o recrutamento celular [18]. A inflamação aguda pode evoluir para um processo crônico, com a permanência do estímulo, promovendo o recrutamento e a diferenciação de fibroblastos, assim como sua ativação, o que dá início ao processo de reparo ou remodelagem do tecido [19]. Também é possível que esses fibroblastos formem um depósito de tecido conjuntivo denso e colagenoso em torno do material, encapsulando e isolando o implante do tecido circunvizinho. Com isso, não há possibilidade de integração do tecido ao biomaterial, o que é considerado como uma resposta negativa à sua presença no organismo e à sua função de proliferação celular [18].

Outra estratégia é a combinação de células, que são elementos fundamentais durante o reparo e regeneração com o biomaterial. Com a utilização de uma linhagem de células apropriadas, seria possível prever as respostas celulares com

técnicas de proliferação e diferenciação dessas [20].

Atualmente, a engenharia tecidual vem permitindo a utilização de células do próprio paciente, de doadores e células-tronco fetais ou de adultos, cultivados em *scaffolds* de materiais compatíveis com o organismo. Essa metodologia aparece como uma boa alternativa para aplicações médicas pelo benefício ao paciente, uma vez que, a partir de um pequeno número de células, via expansão em culturas *in vitro*, podem minimizar a rejeição dos implantes [21, 22].

Este trabalho objetivou avaliar toxicidade e crescimento de células nos suportes porosos de HA-TiO₂.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

A hidroxiapatita (HA) foi cedida pela empresa Inside Materiais Avançados Ltda., Belo Horizonte, MG. Foram realizados ensaios de fluorescência de raios X com o intuito de identificar o percentual de elementos químicos presentes, além das temperaturas onde ocorreu mudança de fases. A fluorescência de raios X foi realizada em um espectrômetro Rigaku RIX 3100, Os percentuais dos elementos químicos na hidroxiapatita estão indicados na Tabela I.

Tabela I - Resultados de fluorescência de raios X da hidroxiapatita, como recebida.

[Table I - X-ray fluorescence results for hydroxyapatite, as received.]

Componente	Quantidade em massa (%)
O	45,428
Ca	37,168
P	17,018
Mg	0,131
Sr	0,083
Si	0,051
Al	0,045
Fe	0,022
S	0,019
Na	0,017
K	0,013
Ni	0,005

Foram realizados ensaios de fluorescência de raios X e difração de raios X na titânia comercial sobre a amostra, com o intuito de identificar o percentual de elementos químicos, além das temperaturas onde ocorreu mudança de fases.

Os resultados da fluorescência de raios X (FRX) estão indicados na Tabela II a seguir.

A esponja polimérica utilizada foi uma esponja de poliuretano, adquirida no comércio de Campinas, SP, e a sua estrutura de poros pode ser vista na Fig. 1.

Tabela II - Resultados de fluorescência de raios X para a titânia, como recebida.

[Table II - X-ray fluorescence results for titanium oxide, as received.]

Componente	Quantidade em massa (%)
TiO ₂	95,084
Al ₂ O ₃	3,586
SiO ₂	1,106
Na ₂ O	0,115
SO ₃	0,033
CaO	0,028
P ₂ O ₅	0,023
Fe ₂ O ₃	0,009
NiO	0,009
As ₂ O ₃	0,007

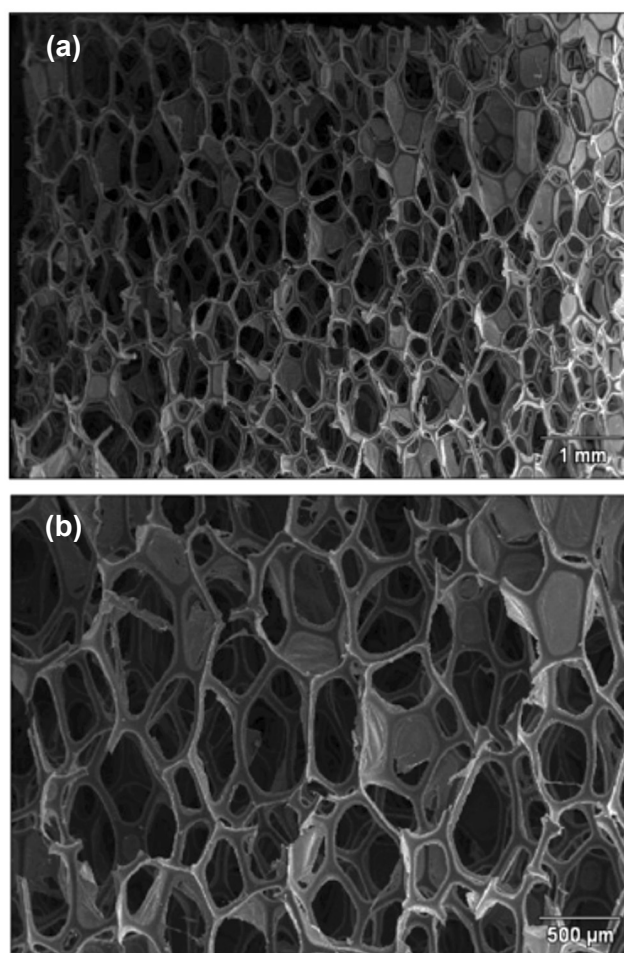


Figura 1: Distribuição e forma dos poros para a esponja comercial de poliuretano. A parte (a) mostra uma visão geral da esponja (aumento de 15x), enquanto que a parte (b) mostra a geometria dos poros.

[Figure 1: Porous distribution and shape for commercial polyurethane sponge. (a) It shows a general view of the sponge (15x), while (b) shows pores geometry.]

Foram utilizados bicarbonato de sódio NaHCO_3 Merck, álcool comercial Cooperalcool INPM 92,8° e água destilada.

Métodos

Inicialmente, a hidroxiapatita e a titânia, juntamente com o bicarbonato de sódio, foram misturadas e peneiradas em peneira ABNT com 710 μm de abertura. O bicarbonato de sódio foi misturado ao compósito por ser um agente ligante e floculante. Uma porção do compósito foi preparada com a seguinte composição: 50% HA - 50% TiO_2 . Foram confeccionados três corpos de prova para a realização dos ensaios *in vitro* por meio do método de esponja polimérica [23] com dimensões 5 mm de diâmetro por 12,5 mm. Estes foram aquecidos a 550 °C em rampa de aquecimento de 0,5 °C/min para a retirada da esponja polimérica e em seguida sinterizados a 1250 °C, 1300 °C e 1350 °C em rampa de aquecimento de 10 °C/min, permanecendo em tais temperaturas durante 2 h. Para a retirada da esponja polimérica foi utilizado um forno EDG FA-IV e para a sinterização dos corpos de prova um forno Lindberg Blue M. O resfriamento até a temperatura ambiente aconteceu dentro do forno.

Os materiais utilizados para os ensaios citotoxicológicos e para crescimento de células nos corpos de prova foram: a) soro fetal bovino (SFB), penicilina, estreptomicina e meio Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), Invitrogen - Carlsbad, California, EUA); b) brometo de (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) e dimetilsulfóxido (DMSO), Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA); c) formaldeído Merck (Darmstadt, Alemanha).

Para os ensaios de adesão e proliferação nos suportes foram utilizados fibroblastos e osteoblastos murinos imortalizados da linhagem NHI-3T3 e OFCOL II, respectivamente. As células foram cultivadas com meio de cultura DMEM suplementado com 10% de SFB, 10.000 U/mL penicilina e 10.000 $\mu\text{g/mL}$ estreptomicina. As células foram mantidas em estufa com 5% de CO_2 a 37 °C. O meio foi trocado a cada dois dias. As células foram colocadas na superfície dos suportes na densidade de $2,5 \times 10^4$ células e mantidas em estufa de CO_2 por cinco dias. Após este período os suportes foram lavados com solução tampão fosfato (PBS) pH 7,4 e as células fixadas com formalina 10% por 15 min. Para análise de microscopia eletrônica de varredura, o material foi desidratado em soluções crescentes de etanol (25, 50, 70, 90, 95, 100, 100%), 10 min em cada concentração. Os suportes foram analisados por microscopia eletrônica de varredura.

A viabilidade e proliferação celular foram determinadas pelo ensaio do MTT (capacidade das células viáveis reduzirem o brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio com a formação de cristais de formazan de cor púrpura), executado em diferentes períodos de interação das células com os suportes. As células foram colocadas na superfície dos suportes na densidade de $2,5 \times 10^4$ células e mantidas em estufa de CO_2 por cinco dias. A cada 24 h, as membranas foram lavadas com PBS pH 7,4 e adicionado MTT (solução

de 5 mg/mL) juntamente com meio DMEM (sem soro) na proporção de 1:5. As células foram incubadas por 3 h a 37 °C. Após este período, o meio foi aspirado e adicionado 0,3 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). Após a dissolução dos cristais, a absorbância foi lida no espectrofotômetro a 490 nm (Biotek Microplate Reader).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Linhagens imortalizadas de fibroblastos e osteoblastos foram utilizadas para avaliar o compósito frente a citotoxicidade, crescimento e adesão celular. Nesses ensaios foram utilizados três corpos de prova porosos em um intervalo de 5 dias.

Em células viáveis o reagente MTT, de coloração amarelada, é reduzido a cristais de formazan de cor púrpura, através de enzimas chamadas redutases. A concentração de cristais formados é diretamente proporcional à concentração de células viáveis em um experimento. Uma vez que o compósito testado é rígido e as células estão aderidas ao material (Fig. 2), um passo de solubilização foi acrescido à

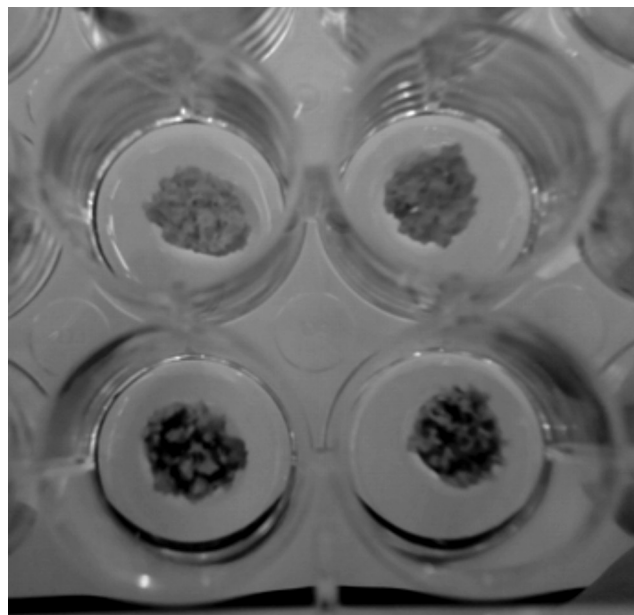


Figura 2: Ensaio de viabilidade celular frente a compósitos cerâmicos pelo método de redução de MTT. Linhagens de fibroblastos (3T3 L1) e osteoblasto (OFCOL II) de camundongos foram incubadas na presença dos compósitos durante cinco dias a 37 °C em estufa de CO_2 . Os compósitos foram lavados e em seguida o reagente de MTT foi adicionado. Nos poços superiores os compósitos não foram incubados com células (controle negativo) e nos poços inferiores as células foram adicionadas. Nos poços inferiores os pontos escuros referem-se aos grupos de células aderidas ao compósito.

[Figure 2: Cellular feasibility assay of ceramic composites by MTT assay. Mouse fibroblasts (3T3 L1) and osteoblasts (OFCOL II) cells were incubated on composites during five days at 37 °C in CO_2 kiln. Composites were washed and then MTT reagent was added. Composites were not incubated with cells (negative control) at upper wells and they were incubated at lower wells. Dark points are referred to cell groups adhered to composite.]

metodologia. O solvente aprótico DMSO foi utilizado para solubilizar os cristais de formazan formados internamente às células, com isto, houve a formação de uma solução de cor purpura (Fig. 3) e esta foi medida por espectrofotômetro no comprimento de onda de 490 nm. É possível verificar que nos compósitos e soluções dos compósitos controles não se observou coloração alguma enquanto que nos compósitos e soluções dos compósitos que foram colocados em contato com as células durante cinco dias de incubação observou-se uma coloração roxa intensa, demonstrando a presença de células viáveis em contato com o material estudado.

O MTT é um reagente que mede enzimas ativas capazes de reduzir este reagente a um reagente roxo. A presença de células no compósito A também pode ser observada na Fig. 3, onde a coloração roxa indica a reação das células com o reagente utilizado. A coloração roxa é diretamente proporcional à quantidade de células viáveis no ensaio, ou seja, quanto maior a intensidade do roxo, mais quantidade de células viáveis.

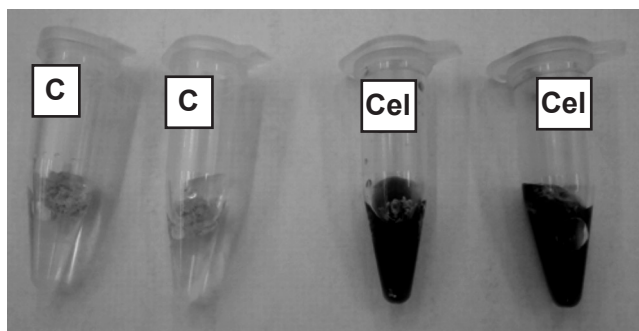


Figura 3: Solubilização dos cristais de formazan por DMSO. O solvente DMSO foi adicionado aos compósitos testados para a dissolução dos cristais de formazan formados internamente às células. Nos compósitos controle (C) não foi observado a alteração de coloração da solução, devido à ausência de células viáveis. Já nos compósitos testes (Cel), verificou-se uma intensa coloração roxa, demonstrando a presença de células viáveis aderidas ao material.

[Figure 3: Formazan crystals solubilization by DMSO. DMSO solvent was added to composites for dissolving formazan crystals formed internally to cells. There was not solution color change for control composites (C) due to viable cells absence. At tested composites (Cel), an intense purple color was observed, demonstrating viable cells presence adhered to material.]

Uma vez que as células crescem aderidas no material sem perder a sua viabilidade, curvas de crescimento foram realizadas durante cinco dias. Observa-se, nas Figs. 4 e 5, que as duas linhagens celulares aderiram ao suporte desde o primeiro dia de ensaio e as células cresceram linearmente durante os cinco dias de avaliação. Nota-se esta linearidade pelos valores de R^2 encontrados pela regressão linear onde os fibroblastos apresentaram R^2 de 0,98952 e os osteoblastos apresentaram R^2 de 0,97612. Os valores de absorbância em 490 nm foram expressos em média \pm erro padrão ($n = 3$). Percebe-se um crescimento linear em função do tempo evidenciado pela regressão linear $R^2 = 0,98952$ para os

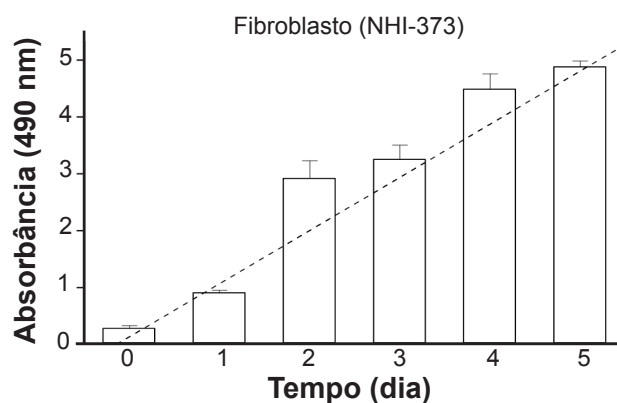


Figura 4: Ensaio de proliferação da linhagem de fibroblastos NIH-3T3 de camundongos no compósito 50%HA-50%TiO₂ sinterizado a 1350 °C. As células foram incubadas a 37 °C em estufa de CO₂ na presença dos compósitos e a cada intervalo de tempo de 24 h, um compósito foi retirado o método de redução de MTT e a dissolução dos cristais de formazan foi realizada. A solução final de coloração roxa foi medida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 490 nm. O resultado da curva mostrou-se linear com uma regressão de $R^2 = 0,98952$. Os resultados foram expressos pela média e desvio padrão de três ensaios distintos.

[Figure 4: Mouse NIH-3T3 fibroblast cells proliferation assay on 50%hydroxyapatite-50%TiO₂ sintered at 1350 °C. Cells were incubated at 37 °C on CO₂ kiln with composites and one sample was removed MTT for periods of 24 h and formazan crystals dissolution was realized. Purple colored actual solution was measured in spectrophotometer with 490 nm wavelength. Result was linear with $R^2 = 0.98952$. Results were represented by medium and standard deviation of three distinct assays.]

fibroblastos assim como para os osteoblastos, cuja regressão linear $R^2 = 0,97612$.

Ao se comparar a proliferação dos fibroblastos com a dos osteoblastos, verifica-se que os fibroblastos apresentaram melhor adaptação ao meio, devido ao seu maior crescimento (Fig. 6).

Os compósitos foram ainda avaliados por microscopia de varredura, para verificar se realmente houve a adesão e crescimento das células e qual o local do compósito estas células cresceram mais.

Os fibroblastos são células constituintes do tecido conjuntivo e cuja função é formar uma substância fundamental amorfa [24]. Cada fibroblasto possui um citoplasma ramificado e rodeado de um núcleo elíptico contendo 1-2 nucléolos. Os fibroblastos ativos podem ser reconhecidos pela abundante ocorrência de retículo endoplasmático. Amadurece, transformando-se em um fibrócito. É responsável pela biossíntese de colágeno do tipo 1. Produz substância intercelular e origina células de outros tecidos conjuntivos, são responsáveis pela regeneração. Os fibroblastos sintetizam as proteínas colágeno e elastina, além das glicosaminoglicanas e glicoproteínas multiadesivas que farão parte da matriz extracelular. Essas células estão também envolvidas na produção de fatores de crescimento, que controlam o crescimento e a diferenciação celular. Os fibroblastos são as células mais comuns do tecido conjuntivo e

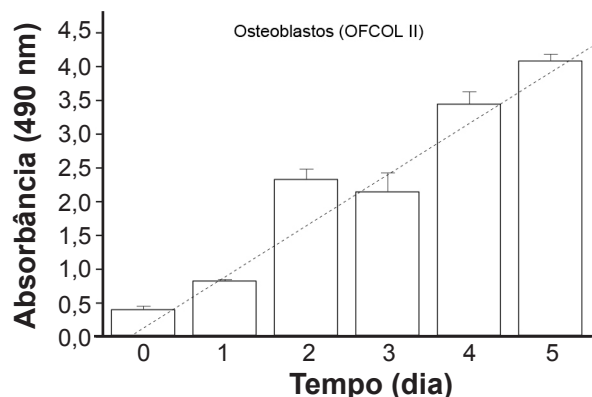


Figura 5: Proliferação de osteoblastos OFCOL II no compósito 50%HA-50%TiO₂ sinterizado a 1350 °C. As células foram incubadas a 37 °C em estufa de CO₂ na presença dos compósitos e a cada intervalo de tempo de 24 h, um compósito foi retirado o método de redução de MTT e a dissolução dos cristais de formazan foram realizados. A solução final de coloração roxa foi medida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 490 nm. O resultado da curva mostrou-se linear com uma regressão de $R^2 = 0,97612$. Os resultados foram expressos pela média e desvio padrão de três ensaios distintos.

[Figure 5: Mouse OFCOL II osteoblast cells proliferation assay on 50%hydroxyapatite-50%TiO₂ sintered at 1350 °C. Cells were incubated at 37 °C on CO₂ kiln with composites and one sample was removed MTT for periods of 24 h and formazan crystals dissolution was realized. Purple colored actual solution was measured in spectrophotometer with 490 nm wavelength. Result was linear with $R^2 = 0.97612$. Results were represented by medium and standard deviation of three distinct assays.]

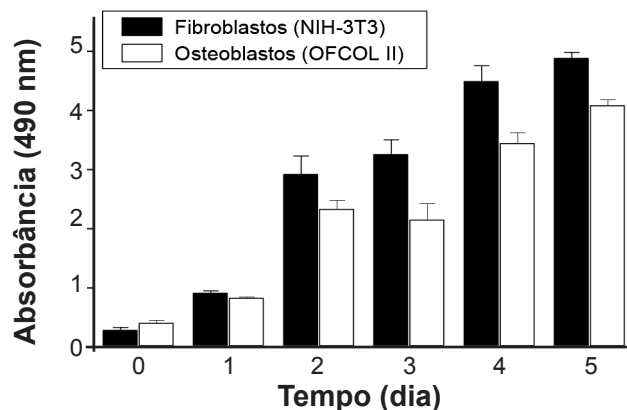


Figura 6: Comparação da proliferação de fibroblastos NIH-3T3 e osteoblastos OFCOL II no compósito A sinterizado a 1350 °C. As células foram incubadas a 37 °C em estufa de CO₂ na presença dos compósitos e a cada intervalo de tempo de 24 h, um compósito foi retirado o método de redução de MTT e a dissolução dos cristais de formazan foram realizados. A solução final de coloração roxa foi medida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 490 nm. Nota-se uma maior absorbância nos fibroblastos em comparação aos osteoblastos. Os resultados foram expressos pela média e desvio padrão de três ensaios distintos.

[Figure 6: Proliferation comparison of NIH-3T3 fibroblast and OFCOL II osteoblast cells in composite 50%hydroxyapatite-50%TiO₂ sintered at 1350 °C. Cells were incubated at 37 °C on CO₂ kiln with composites and one sample was removed MTT for periods of 24 h and formazan crystals dissolution was realized. Purple colored actual solution was measured in spectrophotometer with 490 nm wavelength. There was higher absorbance for fibroblasts than for osteoblasts. Results were represented by medium and standard deviation of three distinct assays.]

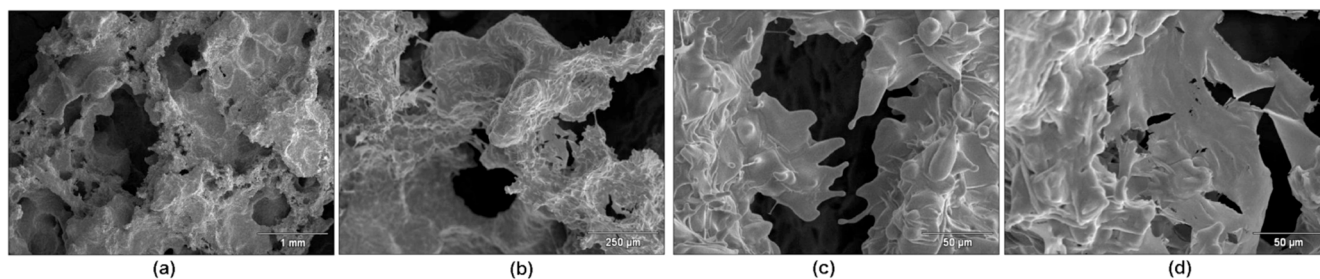


Figura 7: Micrografias obtidas em microscópio eletrônico de varredura indicando o crescimento das células NIH-3T3. (a) visão geral do compósito poroso; (b) visão do formato e tamanho dos poros do compósito poroso; (c) e (d) células NIH-3T3 crescendo nos poros após cinco dias de incubação.

[Figure 7: Scanning electron microscopy micrographs showing NIH-3T3 cells growth. (a) general vision of porous composite; (b) shape and porous size of porous composite; (c) and (d) NIH-3T3 cells growing over pores after incubation during five days.]

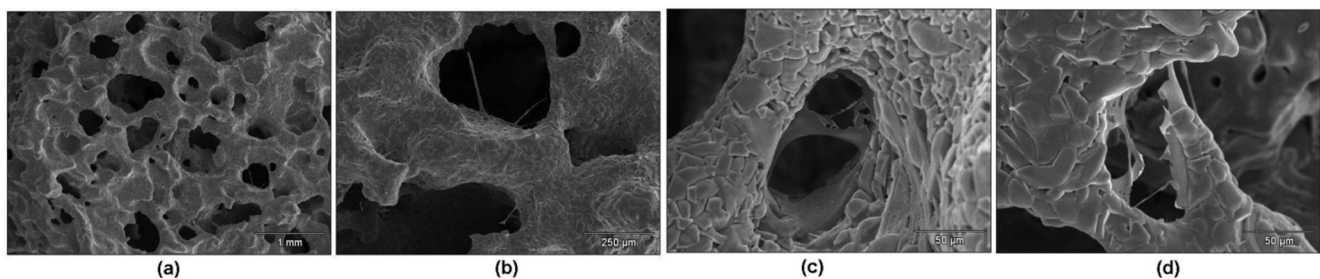


Figura 8: Micrografias obtidas em microscópio eletrônico de varredura indicando o crescimento das células OFCOL II. (a) visão geral do compósito poroso; (b) visão do formato e tamanho dos poros do compósito poroso; (c) e (d) células OFCOL II crescendo nos poros após cinco dias de incubação.

[Figure 8: Scanning electron microscopy micrographs showing OFCOL II cells growth. (a) general vision of porous composite; (b) shape and porous size of porous composite; (c) and (d) OFCOL II cells growing over pores after incubation during five days.]

são capazes de modular sua capacidade metabólica, a qual vai refletir em sua morfologia. As células com intensa atividade de síntese são denominadas de fibroblastos, enquanto as células metabolicamente quiescentes são conhecidas como fibrócitos. Como os fibroblastos são células de regeneração, estes tem uma tendência a crescimento rápido, e isto foi bem caracterizado no gráfico da Fig. 6, e pode ser observado que tais células cresceram inicialmente sobre a superfície do compósito A (Figs. 7c e 7d), para depois crescer sobre os poros. Como o ensaio durou cinco dias, acredita-se que tais células tendem a fechar os poros rapidamente, porém é preciso realizar ensaios mais longos para avaliar o tempo em que isso ocorre. Como o objetivo deste trabalho era avaliar se as células iriam aderir e crescer à estrutura porosa da amostra A, este ensaio não foi realizado.

Os osteoblastos são as células provenientes das células osteoprogenitoras, sendo responsáveis pela síntese dos componentes orgânicos da matriz óssea, a saber: colágeno, proteoglicanos, glicoproteínas. Os Osteoblastos localizam-se na superfície do osso, formando lâminas de células cubóides a colunares [25]. Quando estão em intensa atividade sintética, suas formas modificam-se, lembrando um cubo, com citoplasma tornando-se mais basófilo. Em estado pouco ativo tornam-se achatados e a basofilia citoplasmática diminui. Uma vez aprisionado pela matriz óssea recém sintetizada, o osteoblasto recebe o nome de osteócito. A matriz deposita-se em redor da célula e dos seus prolongamentos, formando assim as lacunas e os canalículos (canais de Havers). Quando os osteoblastos entram em estado de quiescência, deixam de produzir a matriz, se tornam em células de revestimento ósseo. Assim como aconteceu com os fibroblastos, os osteoblastos também aderiram à estrutura da amostra A e também houve crescimento, porém com uma tendência de velocidade menor (intensidade de absorvância menor para os osteoblastos quando comparados com os fibroblastos, observado na Fig. 6) quando comparados aos fibroblastos. Este crescimento sobre a estrutura da amostra A pode ser observado nas Figs. 8b, 8c e 8d, com alguns pontos de crescimento sobre os poros da amostra A. Também é possível observar que os osteoblastos tem uma tendência a crescimento em um tempo bem maior que o dos fibroblastos, uma vez que estes não são células de regeneração, e sim células ósseas. Assim como para os fibroblastos, também não foi realizado um ensaio para ver em quanto tempo tais células irão crescer e fechar totalmente os poros da estrutura porosa da amostra A.

CONCLUSÕES

Após os ensaios *in vitro*, as células de fibroblastos e osteoblastos de camundongos aderiram ao compósito; as células acima citadas cresceram ao longo do compósito, o que indica que além de biocompatível, o compósito é atóxico para as células. De forma geral, esse compósito não é nocivo às células, mesmo tendo sido produzido através de uma matriz polimérica (derivado do petróleo), estando apto a ser submetido a ensaios *in vivo*, para

avaliação do comportamento do mesmo no meio biológico vivo (informações úteis sobre a reação orgânica induzida pelo produto-teste), uma vez que o estudo das respostas inflamatórias, agudas e crônicas, bem como a relação destas no período tardio, com sucesso ou insucesso do biomaterial é realizado via ensaio *in vivo* no modelo animal.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de fomento para doutorado; à Profa. Dra. Ana Campa, USP, pela realização dos ensaios *in vitro* e às Profas. Dras. Silvyta Stucchi e Primavera Garcia Borelli da FCF, USP, pela cessão das células.

REFERÊNCIAS

- [1] M. Scheffler, P. Colombo, *Cellular Ceramics*, Weinheim: Wiley-Vch Verlag GmbH & Co. (2005) 670p.
- [2] A. Blom, "Which scaffold for which application?", *Curr. Orthop.* **21** (2007) 280-287.
- [3] K. J. L. Burg, S. Porter, J. F. Kellam, "Biomaterial developments for bone tissue engineering", *Biomater.* **21** (2000) 2347-2359.
- [4] T. Ahsan, R. M. Nerem, "Bioengineered tissues: the science, the technology, and the industry", *Orthod. Craniofacial Res.* **8** (2005) 134-140.
- [5] R. Langer, *Tissue Eng. Molecular Therapy* **1** (2000) 12.
- [6] Y. Tabata, "Biomaterial technology for tissue engineering applications", *J. R. Soc. Interface* **6** (2009) S311-324.
- [7] L. L. Hench, M. M. Pereira, R. L. Oréfice, J. R. Jones, "Biocompatibilidade, bioatividade e Engenharia de Tecidos", in: *Biomateriais: Fundamentos e Aplicações*, Ed. Cultura Médica, Rio de Janeiro, RJ, **16** (2006) 481-506.
- [8] D. Kaigler, D. Mooney, "Tissue engineering's impact on dentistry", *J. Dent. Educ.* **65**, 5 (2001) 456-462.
- [9] E. Sachlos, J. T. Czernuska, "Making tissue engineering scaffolds work. Review on the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds", *Eur. Cell Mater.* **5** (2003) 29-40.
- [10] L. V. Marins, T. M. Cestari, A. D. Sottovia, J. M. Granjeiro, R. Taga, "Radiographic and histological study of perennial bone defect repair in rat calvaria after treatment with blocks of porous bovine organic graft material", *J. Appl. Oral Sci.* **12**, 1 (2004) 62-69.
- [11] L. L. Hench, "Biomaterials: a forecast for the future", *Biomater.* **19** (1998) 1419-1423.
- [12] L. L. Hench, J. M. Polak, I. D. Xynos, L. D. Buttery, "Bioactive materials to control cell cycle", *Mater. Res. Innovat.* **3** (2000) 313-323.
- [13] Z. Solomão, "Desenvolvimento e Caracterização de Compósitos de Poli(ϵ -Caprolactona) (PCL) e β -Fostato Tricálcico (β -TCP) para Uso em Biomateriais", Diss. Mestrado, Fac. Engenharia Mecânica, Univ. Estadual de Campinas, SP (2011).
- [14] V. S. Gomide, "Desenvolvimento e caracterização mecânica de compósitos hidroxiapatita-zircônia, hidro-

xiapatita-alumina e hidroxiapatita-titânia para fins biomédicos”, Diss. Mestrado, Fac. Engenharia Mecânica, Univ. Estadual de Campinas, SP (2005).

- [15] M. B. Coelho, I. R. Soares, M. M. Pereira, “Estruturas macroporosas de vidro bioativo para cultura de células do tecido ósseo”, in: Anais 15º Cong. Bras. Eng. Ci. Mater., Natal, RN (2002).
- [16] P. Valerio, M. P. Pereira, A. M. Góes, M. F. Leite, “The effect of ionic products from bioactive glass dissolution on osteoblast proliferation and collagen production”, *Biomater.* **25** (2004) 2941-2948.
- [17] B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, J. E. Lemons, *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*, Academic Press, London, UK (1996) 864p.
- [18] J. M. Anderson, A. G. Gristina, S. R. Hanson, “Host reactions to biomaterials and their evaluation”, in: B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, J. E. Lemons, *Biomaterials science; an introduction to materials in medicine*, **1**, Academic Press, San Diego, CA, EUA (1996) 165-214.
- [19] P. J. Bayley, “Sponge implants as models”, *Methods in Enzymology* **162** (1988) 327-334.
- [20] L. L. Hench, J. M. Polak, “Third generation biomedical materials”, *Science* **295** (2002) 1014-1017.
- [21] M. Kellomaki, P. Tormala, “Processing of resorbable poly-alpha-hydroxy acids for use as tissue engineering scaffolds”, *Methods Molecular Biology* **238** (2004) 1-10.
- [22] T. May, H. Hauser, D. Wirth, “In vitro expansion of tissue cells by conditional proliferation”, in: H. Hauser, M. Fussenegger, *Tissue Engineering*, 2nd Ed., Humana Press Inc., Totowa, NJ, EUA (2007) 1-15.
- [23] J. Saggio-Woyansky, C. E. Scott, “Processing of Porous Ceramics”, *Am. Ceram. Soc. Bul.* **71**, 11 (1992) 1674-1682.
- [24] L. C. Junqueira, J. Carneiro, *Histologia Básica*, 11^a Ed., Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ (2008) 528 p.
- [25] L. P. Gartner, *Tratado de Histologia*, 2^a Ed. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ (2003) 472 p.
(Rec. 18/11/2013, Rev. 28/10/2014, Ac. 30/10/2014)