



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia

2008

**Tânia Raquel
Domingues Almeida**

**TOXICIDADE DE CIMENTOS ÓSSEOS DE BASE
ACRÍLICA: ESTUDOS *in vitro***

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Molecular, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Conceição Santos, Professora Associada com agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro e sob co-orientação do Professor Doutor Rui Correia, Professor Associado com agregação aposentado do Departamento de Engenharia Cerâmica e do Vidro da Universidade de Aveiro.



o júri

Presidente / President:

Prof. Dr. António José Arsénia Nogueira
professor associado com agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Vogais / Members:

Prof. Dra. Maria da Conceição Lopes Vieira dos Santos
professora associada com agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro
(Orientadora)

Prof. Dr. Rui Nunes Correia
professor associado com agregação aposentado do Departamento de Engenharia Cerâmica e do Vidro da Universidade de Aveiro (Co-orientador)

Prof. Dra. Meriem Lamghari
professora auxiliar da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto
Investigadora auxiliar do Laboratório Associado - Instituto de Engenharia Biomédica / Instituto de Biologia Molecular e Celular

Prof. Dr. Francisco Luis Maia Mamede Pimentel
professor associado convidado da Secção Autónoma de Ciências da Saúde da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer de um modo especial à Professora Conceição Santos, por me ter permitido realizar a dissertação no seu laboratório, pelo apoio e incentivo que sempre demonstrou e pelas agradáveis discussões que tivemos e que em muito contribuíram para o progresso do trabalho.

Gostaria de agradecer também ao Professor Rui Correia, pela sua disponibilidade para co-orientar esta dissertação e por todas as suas opiniões e esclarecimentos que foram bastante importantes, dado esta ser uma área nova para mim.

Gostaria de agradecer com particular apreço a três colegas que foram fundamentais para o sucesso do trabalho: à Bárbara Leite pela sua preciosa ajuda no corte dos materiais e pela sua constante disponibilidade para esclarecer dúvidas e dar sugestões; ao João Loureiro pela forma entusiástica como me transmitiu os conhecimentos de citometria de fluxo, pelo seu optimismo e pela sua contribuição nos ensaios experimentais e na revisão desta Tese; à Tina Lopes pelo apoio que me deu na fase inicial do trabalho e pelos comentários a esta Tese.

Não posso deixar de agradecer a todos os colegas do Laboratório de Biotecnologia e Citómica, que sempre se mostraram disponíveis para me auxiliarem nas dificuldades que tive, pelo seu companheirismo e boa disposição que tornaram a minha estadia neste laboratório bastante agradável.

Gostaria igualmente de agradecer às colegas do Laboratório de Biomateriais pela simpatia e por estarem sempre disponíveis para me ajudarem durante a minha curta passagem por esse laboratório.

Agradeço à Doutora Meriem Lamghari do Instituto de Engenharia Biomédica e à Eng. Susana Carrilho do Instituto de Biologia Molecular e Celular, pela formação e apoio dado na implementação dos métodos de cultura celular e pelo fornecimento da linha celular utilizada neste trabalho.

Finalmente, um agradecimento muito especial à minha família, em particular ao meu pai e à minha mãe pelo apoio que sempre me deram para realizar este Mestrado.

palavras-chave

Cimento ósseo, PMMA-co-EHA, PMMA, toxicidade *in vitro*, citometria de fluxo, ciclo celular, linha celular MG-63, osteoblastos

resumo

Nos últimos 40 anos, os cimentos ósseos têm sido usados na fixação de próteses articulares ao osso, fornecendo o suporte e a estabilidade estrutural inicial necessários ao sucesso do implante. Actualmente, os cimentos ósseos de base acrílica (*i.e.*, baseados numa matriz de poli(metil metacrilato), PMMA) ocupam uma posição de relevo, sendo extensivamente usados em cirurgia ortopédica cimentada. Sabe-se, no entanto, que este tipo de cimentos apresentam algumas desvantagens. Nomeadamente, causam alguma morte celular ao redor do local do implante, quer devido à elevada temperatura de polimerização, quer devido ao efeito tóxico do monómero de metil metacrilato (MMA) libertado do material aquando a polimerização que ocorre *in situ*. Para além dos problemas biológicos, os cimentos de PMMA apresentam também algumas limitações ao nível das propriedades mecânicas, sendo normalmente frágeis e pouco resistentes à fadiga.

Neste trabalho, avaliou-se a toxicidade *in vitro* de três novos cimentos ósseos, que foram desenvolvidos na tentativa de melhorar algumas das propriedades dos cimentos convencionais baseados em PMMA. Um dos cimentos, o C0M, é constituído por um copolímero de PMMA e etil hexilacrilato (EHA) (1:1) e os outros dois, os cimentos C3M e C5M, são materiais compósito de matriz PMMA-co-EHA reforçada com partículas de vidro do sistema $3\text{CaO} \cdot \text{P}_2\text{O}_5 \cdot \text{MgO} \cdot \text{SiO}_2$, nas proporções de 30 e 50%, respectivamente.

A linha de osteoblastos humanos MG-63 foi exposta a várias diluições do extracto dos cimentos e determinou-se a função metabólica celular pelo ensaio do MTT. Além deste método de referência, foi desenvolvido um protocolo de citometria de fluxo (FCM) para monitorização da progressão das células pelo ciclo celular durante o período de exposição, determinando o conteúdo em DNA pela incorporação de iodeto de propídio.

Os resultados de MTT demonstraram que sobretudo os extractos mais concentrados, influenciaram o crescimento celular quando comparados com as células cultivadas em meio de cultura. Verificou-se também que o extracto do cimento C5M, com maior percentagem de vidro, foi aquele que conduziu a efeitos mais nocivos no metabolismo dos osteoblastos. A análise do ciclo celular mostrou que os extractos dos três cimentos induziram alterações na proliferação celular. Contudo, nos cimentos C0M e C5M os resultados sugerem que o efeito tóxico provocado pelo extracto não é irreversível, e as células que sobrevivem mantêm a sua capacidade proliferativa.

keywords

Bone cement, PMMA-co-EHA, PMMA, *in vitro* toxicity, flow cytometry, cell cycle, MG-63 cell line, osteoblasts

abstract

In the last 40 years, bone cements have been used to anchor the components of articular prostheses to the bone, providing the support and initial structural stability essential for the long-term success of the implant. Nowadays, acrylic bone cements (*i.e.*, based in a matrix of poly(methyl methacrylate), PMMA) occupy a distinctive position, being extensively employed in cemented orthopaedic surgery. However, it is known that this type of cements exhibit some drawbacks. Namely, they cause some cell death at the surrounding of implantation site due to either the exothermal polymerization or the local toxic effect of methyl methacrylate (MMA) monomer leaching out of the material as it cures *in situ*. In addition to biological problems, PMMA based cements have also some limitations at the mechanical properties level, being usually brittle and little resistant to fatigue.

In the present work it was evaluated the *in vitro* toxicity of three new bone cements, which were developed as an attempt to improve some properties of conventional PMMA based bone cements. One of the cements, C0M, is formed by a copolymer of PMMA and ethyl hexylacrylate (EHA) (1:1) and the other two, C3M and C5M, are composite materials with a PMMA-co-EHA matrix reinforced with glass particles ($3\text{CaO}\cdot\text{P}_2\text{O}_5\text{-MgO-SiO}_2$) in 30 and 50% proportions, respectively.

Human osteoblast-like MG-63 cell line was exposed to several dilutions of cements extracts and the cellular metabolic function was determined by the MTT assay. Besides this standard method, it was also used a new flow cytometry (FCM) approach and developed a protocol to monitor cell cycle progression during exposure time, measuring DNA content by propidium iodide uptake.

MTT results demonstrated that especially the most concentrate extracts had influence in cell growth compared to cells cultivated only in culture medium. It was also observed that C5M cement, with the highest content in glass, was the one that exerted more severe effects on the osteoblast metabolism. Cell cycle analysis showed that all materials extracts led to changes in cellular proliferation. However, results of C0M and C5M cements suggest that the damage caused by the extract is not irreversible and the surviving cells maintain their proliferation ability.

ÍNDICE

Júri	v
Agradecimentos	vii
Resumo (em português)	ix
Resumo (em inglês)	xi
Abreviaturas	xvii
I. Revisão teórica	1
Biomateriais – Definições	1
Classes de biomateriais.....	2
Biomateriais Metálicos	3
Biomateriais Cerâmicos, Vidros, Vitrocerâmicos	3
Biomateriais Poliméricos.....	5
Cimentos ósseos	6
Compósito PMMA-co-EHA com enchimento de vidro.....	7
Compósitos – conceito.....	7
Vidro $3\text{CaO} \cdot \text{P}_2\text{O}_5 \cdot \text{MgO} \cdot \text{SiO}_2$	7
Avaliação da biocompatibilidade de um material <i>in vitro</i>	8
Bioactividade	9
Citotoxicidade.....	9
Genotoxicidade	12
Citometria de fluxo	13
Princípios básicos	13
Análise do ciclo celular.....	16
Tecido ósseo.....	19
Linha celular MG-63	21

Manutenção da linha celular MG-63	21
Ojectivos desta dissertação.....	22
II. Materiais e Métodos	23
Preparação dos cimentos ósseos	24
Manutenção da linha celular MG-63.....	25
Trypsinização das células	25
Criopreservação das células.....	26
Descongelação das células	26
Avaliação da toxicidade dos cimentos ósseos <i>in vitro</i>	27
Preparação dos extractos dos biomateriais e controlos usados nos ensaios	27
Análise dos extractos por "Inductively Coupled Plasma"	28
Ensaio do MTT	28
Análise do ciclo celular por citometria de fluxo	30
Análise estatística	31
III. Resultados	33
Análise dos extractos por ICP	33
Avaliação da toxicidade dos cimentos ósseos <i>in vitro</i>	33
Efeito dos extractos no metabolismo celular (ensaio de MTT).....	33
Efeitos dos extractos no ciclo celular (ensaio de citometria de fluxo)	36
IV. Discussão	51
V. Perspectivas Futuras	57
Referências	59
ANEXO I	65
ANEXO II	67
ANEXO III	68

ABREVIATURAS

A₅₇₀ – absorvância a 570 nm

atm – atmosfera

BE – brometo de etídio

BPO – peróxido de benzoílo

C⁻ - controlo negativo

C⁺ - controlo positivo

C0M – cimento de PMMA-co-EHA

C3M – cimento de PMMA-co-EHA com 30% de enchimento de vidro VH1

C5M – cimento de PMMA-co-EHA com 50% de enchimento de vidro VH1

CE – controlo de extracção

CM – controlo do meio

Ctrl neg – controlo negativo

CV – coeficiente de variação

DAPI – 4,6-diamino-2-fenil indol

DMPT – N,N-dimetil-p-toluidina

DMSO – dimetilsulfóxido

DNA – ácido desoxirribonucleico

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

EHA – etil hexilacrilato

Extr 25% - extracto do cimento diluído a 25% (v/v)

Extr 50% - extracto do cimento diluído a 50% (v/v)

Extr 100% - extracto do cimento não diluído

FACS – “fluorescence activated cell sorter”

FBS – soro bovino fetal

FCM – citometria de fluxo

FDA – diacetato de fluoresceína

FL – fluorescência relativa

FS – dispersão frontal (“forward scatter”)

HAP – hidroxiapatite

HQ – hidroquinona

ICP – AES – “inductively coupled plasma – atomic emission spectroscopy”

IP – iodeto de propídio

IPC – índice de proliferação celular

Laser – “light amplification by simulated emission of radiation”

LDH – lactato desidrogenase

MMA – metil metacrilato

MTT – 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio

PBS – solução tampão salina de fosfato

PCR – “polymerase chain reaction”

PMMA – poli (metil metacrilato)

RNA – ácido ribonucleico

RNAase – ribonuclease

rpm – rotações por minuto

SBF – “simulated body fluid”

SD – desvio padrão (“standard deviation”)

SEM – microscopia electrónica de varrimento

SS – dispersão lateral (“side scatter”)

TCP – fosfato tricálcico

TEM – microscopia electrónica de transmissão

WPB – “woody plant buffer”

α – MEM – “α-Minimal Essential Medium”

I. REVISÃO TEÓRICA

Biomateriais – Definições

O aumento da duração média de vida, aliado ao stress da vida moderna, tem levado ao aparecimento de diversas doenças relacionadas com o desgaste do organismo humano. Uma das áreas que mais tem contribuído para uma melhoria da qualidade de vida é a Engenharia Biomédica. Esta é uma ciência multidisciplinar que envolve conhecimentos e o trabalho conjunto de áreas como a Engenharia, a Química, a Ciência dos Materiais, a Mecânica, a Biologia e claro, as Ciências Médicas. É uma área que tem um grande impacto económico, atendendo ao facto de milhões de pessoas em todo o mundo usufruírem dos seus avanços. Tem havido, por isso, bastantes progressos neste campo, com o conseqüente aparecimento de biomateriais cada vez mais adequados às funções pretendidas.

De acordo com a conferência "Consensus Development on the Clinical Applications of Biomaterials" (1982) do "National Institute of Health", podemos definir um biomaterial como qualquer substância ou combinação de substâncias, que não sejam fármacos, de origem natural ou sintética, que possam ser usadas por tempo indeterminado, tratando, aumentando ou substituindo, parcial ou totalmente, qualquer tecido, órgão ou função do corpo, com a finalidade de melhorar a qualidade de vida (Dee *et al.* 2002, Ratner *et al.* 1996). Na Tabela 1.1 apresentam-se alguns exemplos de biomateriais e a respectiva aplicação.

Tabela 1.1. Alguns exemplos de materiais sintéticos e materiais naturais modificados que são usados em medicina (adaptada de Ratner *et al.* 1996)

Tipos de biomateriais	Aplicação
Titânio, polietileno, liga Ti-Al-V	Substituição de articulações (anca, joelho)
Poli (metil metacrilato)	Cimento ósseo
Hidroxiapatite	Reparação de defeito ósseo
Titânio, fosfato de cálcio	Implantes dentários
Borracha de silicone, teflon, poliuretano	Catéteres
Tecido reprocessado, aço inox, carbono	Válvulas cardíacas
Poliuretano	Coração artificial
Compósito silicone-colagénio	Molde para reparação de pele
Poli (metil metacrilato), borracha de silicone, hidrogel	Lentes intraoculares

Um biomaterial deve possuir características de acordo com a função que vai desempenhar; no entanto, um requisito fundamental é a sua biocompatibilidade (Ramakrishna *et al.* 2004). A biocompatibilidade de um biomaterial pode ser definida como a capacidade de coexistir com o hospedeiro, desencadeando uma resposta adequada de acordo com a sua função, sem que haja rejeição devida a reacção imunológica do hospedeiro ou toxicidade por parte do material (Ratner *et al.* 1996). Actualmente, é aceite que "biocompatibilidade" significa não só ausência de efeito citotóxico mas também efeitos positivos no sentido da biofuncionalidade, isto é, promoção de mecanismos biológicos que favoreçam o uso do biomaterial na aplicação para que foi projectado (Chiellini 2006). Existem diversos graus de compatibilidade consoante a resposta do tecido humano que envolve o biomaterial e que resultam nas seguintes classificações (Dee *et al.* 2002, Ratner *et al.* 1996, <http://igitur-archive.library.uu.nl/dissertations/2003-1028-131747/c1.pdf>):

Biotolerado – é um material tolerado pelo organismo, mas em que há a formação de uma camada de tecido fibroso que isola o implante do tecido envolvente (*e.g.*, cimento ósseo, aço inox).

Bioinerte – refere-se a um material que após o implante mantém a sua integridade no organismo, não induz uma resposta imunológica do hospedeiro e mantém contacto directo com o tecido circundante, embora sem ligação (*e.g.*, alumina, titânio).

Bioactivo – trata-se de um material que tem a capacidade de estabelecer ligações com os tecidos vivos, devido à semelhança química, e é capaz de se integrar no tecido ósseo formando uma camada de apatite na superfície (*e.g.*, biovidros, fosfatos de cálcio).

Biodegradável – refere-se a um material que se degrada no organismo ao mesmo tempo que é substituído por regeneração do tecido natural; os produtos de degradação são eliminados por processos metabólicos (*e.g.*, fosfato tricálcico (TCP), políácido láctico).

Classes de biomateriais

Podemos dividir os os materiais usados em medicina, em três classes principais, consoante a sua natureza: metais, cerâmicos (incluindo vidros) e polímeros (Ratner *et al.* 1996). Como as estruturas destes materiais diferem, eles apresentam diferentes propriedades e têm, por isso, diferentes utilizações no organismo. A seguir faz-se uma breve descrição das principais características de cada uma das classes.

Biomateriais Metálicos

Ao nível atômico os metais são constituídos por íons positivos imersos numa “nuvem” de electrões fracamente ligados, que lhes conferem a condutividade térmica e eléctrica características destes materiais (Dee *et al.* 2002).

Dada a sua resistência mecânica, os metais são sobretudo usados em implantes carregados, como as próteses da anca e do joelho e também em fixação (Figura 1.1). Um dos principais problemas da utilização dos metais, prende-se com a possível corrosão no meio fisiológico aquoso que envolve o implante. Durante o processo de corrosão há libertação de íons que podem reduzir a biocompatibilidade do material (Dee *et al.* 2002, Katti 2004). Apesar de algumas vezes serem utilizados os metais puros, as ligas (metais contendo dois ou mais elementos) são frequentemente vantajosas, por melhorarem algumas propriedades como a resistência à tensão mecânica e à corrosão (Dee *et al.* 2002).

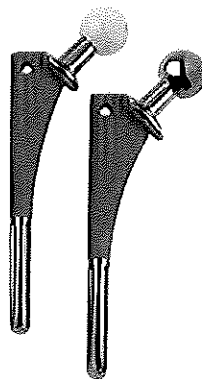


Figura 1.1. Hastes femurais de prótese total da anca em liga de CoCr (retirado do endereço http://www.corin.co.uk/p_producttotalhips.html).

Biomateriais Cerâmicos, Vidros, Vitrocerâmicos

Os cerâmicos, os vidros e os vitrocerâmicos são materiais inorgânicos não metálicos que podem apresentar uma variada gama de composições (Hamadouche *et al.* 2000). Aplicam-se sobretudo em implantes dentários e na reparação ou substituição de articulações ou no revestimento da superfície de implantes metálicos (Figura 1.2) (Katti 2004, Ratner *et al.* 1996). São normalmente materiais com uma excelente biocompatibilidade. No entanto, os maiores problemas na utilização desta classe de biomateriais são a fragilidade e a fraca resistência a tensões tractivas (Dee *et al.* 2002); por isso, são muitas vezes associados a outros materiais de forma a complementar propriedades. Além disso,

embora não sofram corrosão, são materiais sensíveis a outras formas de degradação quando expostos ao meio fisiológico, o que pode conduzir ao fracasso do implante (Dee *et al.* 2002).

A alumina (Al_2O_3), dada a sua biocompatibilidade, a resistência mecânica ao desgaste e à compressão e a estabilidade no meio fisiológico, é um cerâmico usado há um longo período de tempo. É um material geralmente classificado como bioinerte, o que limita a sua aplicação apenas à substituição da cabeça do fêmur (Katti 2004, Ratner *et al.* 1996). Da família dos cerâmicos de fosfato de cálcio destaca-se a hidroxiapatite (HAP) ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) que, dada a sua semelhança com a componente mineral do osso, é um dos materiais conhecidos mais biocompatível, além de bioativo, sendo muitas vezes usado no preenchimento de defeitos ósseos (Katti 2004) e no revestimento de próteses metálicas.

O modelo dos biovidros é o Bioglass[®] 45S5 desenvolvido por Hench e Wilson, que pertence ao sistema $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-Na}_2\text{O}$ (Hamadouche e Sedel 2000). É um vidro bioativo e demonstrou estimular uma maior produção de osso quando comparado com a HAP *in vivo*, mas, atendendo às suas propriedades mecânicas, não é um material normalmente escolhido para próteses sujeitas a carga (Hamadouche e Sedel 2000). Entretanto, outros sistemas têm sido desenvolvidos, mantendo a sílica como óxido base e adicionando outros elementos que lhes conferem diferentes propriedades.

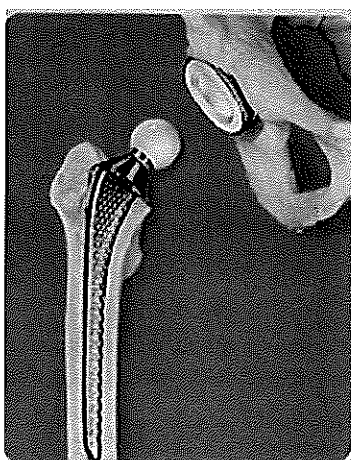


Figura 1.2. Prótese do quadril com condilo e acetábulo cerâmicos
(retirado do endereço <http://www.materials.qmul.ac.uk/casestud/implants/index.php>).

Biomateriais Poliméricos

Os polímeros são moléculas de cadeia longa formadas pela repetição de pequenas unidades. Estas unidades diferem das moléculas que são usadas na síntese dos polímeros, os monómeros, por perda de insaturação ou eliminação de pequenos grupos moleculares, como H₂O ou HCl, durante a polimerização (Ratner *et al.* 1996). Existe uma grande variedade de polímeros naturais e sintéticos com aplicações biomédicas: borracha natural, amidos, polietileno, poli (metil metacrilato) (PMMA), poli (ácido láctico), são alguns exemplos (Ratner *et al.* 1996). Comparando com os metais e os cerâmicos, os polímeros têm ligações mais fracas e maior deformabilidade; conseqüentemente, não são usados em aplicações biomédicas sob cargas importantes. No entanto, as suas propriedades mecânicas são ainda suficientes para numerosas aplicações (Dee *et al.* 2002).

Na síntese dos polímeros são normalmente utilizados aditivos como catalizadores, inibidores, e outros compostos químicos necessários para a polimerização. Ao longo do tempo e em contacto com o meio fisiológico, estes aditivos podem libertar-se da superfície do polímero e, tal como os produtos de corrosão e degradação dos metais e dos cerâmicos, podem levar a reacções adversas do hospedeiro (Dee *et al.* 2002). Este factor limita a biocompatibilidade dos polímeros, e por isso, um dos desafios da preparação química consiste em melhorar esta propriedade, dependente das reacções de interface com o tecido e com os fluidos do hospedeiro (Wang *et al.* 2004). No entanto, os polímeros são relativamente fáceis de transformar em produtos de diversas formas, a custo razoável e com os quais facilmente se conseguem as propriedades mecânicas e físicas desejadas (Wang *et al.* 2004) e por isso continuam a ser dos biomateriais mais usados em medicina. Algumas das aplicações passam por sistemas de libertação de fármacos, válvulas cardíacas, lentes de contacto, cimentos ortopédicos e órgãos artificiais (Figura 1.3) (Dee *et al.* 2002). Os polímeros podem ser utilizados de duas formas: como homopolímeros, resultantes de um único tipo de monómero ou como copolímeros, produzidos por reacção entre vários monómeros, geralmente, com o objectivo de melhorar o seu desempenho no organismo (Ratner *et al.* 1996).



Figura 1.3. Válvula cardíaca tricúspida em polímero (retirado do endereço http://www.bme.vanderbilt.edu/King/Teaching_powerpoints).

Cimentos ósseos

Quando procede à fixação de um implante, o cirurgião tem a possibilidade de escolher entre dois métodos: cimentado ou não cimentado (Harper 1998). Os cimentos ósseos foram introduzidos em ortopedia por John Charnley (Charnley 1960) e revelaram-se da maior importância nesta área médica. Uma das características dos cimentos é serem materiais polimerizáveis *in situ*, o que possibilita que sejam introduzidos no organismo ainda como uma massa viscosa que polimeriza num curto espaço de tempo (Harper 1998). A sua aplicação permite a fixação do implante e uma melhor distribuição de carga entre a prótese e o osso (Lewis 1997, Morejón *et al.* 2005).

Os cimentos ósseos de base acrílica, isto é, que têm na sua composição o polímero poli (metil metacrilato) (PMMA) são, actualmente, os únicos materiais usados em artroplastias cimentadas (Kuehn *et al.*, 2005). Todos os cimentos acrílicos resultam da mistura de componentes líquidos e sólidos em pó. O pó consiste numa mistura de PMMA pré polimerizado (reduz a contracção do cimento durante a polimerização) que pode estar na forma de copolímero, de um iniciador da reacção de polimerização (geralmente, peróxido de benzol, BPO) e um radiopacificador (BaSO_4 ou ZrO_2). Da parte líquida fazem parte os monómeros de metil metacrilato (MMA), um acelerador/activador da reacção (usualmente N,N-dimetil-p-toluidina, DMPT) e um estabilizador/inibidor (normalmente hidroquinona, HQ) (Lewis e Mishra 2007).

Apesar do sucesso dos cimentos ósseos baseados em PMMA, existem algumas desvantagens inerentes ao seu uso (Corbellini 2006, Deb *et al.* 2005, Lewis 1997): a) a elevada temperatura da reacção exotérmica de polimerização, que pode conduzir à necrose dos tecidos envolventes, b) a toxicidade do cimento, devido à libertação de monómeros de MMA que não reajam, c) a contracção do cimento durante a polimerização, d) a fragilidade mecânica do cimento, que pode conduzir à sua fractura, com consequências graves para o paciente, e) possibilidade de formação de uma camada de tecido fibroso na interface osso-cimento e consequente laxação do implante, uma vez que o polímero não estabelece ligação com o tecido envolvente. No entanto, mesmo com todas as desvantagens enumeradas, 90% dos implantes cimentados aplicados em pacientes com mais de 50 anos só são substituídos ao fim de 15 anos (Lewis 1997). Portanto, um dos grandes desafios desta área é tentar colmatar alguns destes problemas, desenvolvendo cimentos mais biocompatíveis, melhorando a sua bioactividade e baixando a sua temperatura de polimerização.

Os biomateriais alvo de estudo neste trabalho são cimentos ósseos desenvolvidos pelo laboratório de Biomateriais do Departamento de Engenharia Cerâmica e do Vidro da Universidade de Aveiro, com o objectivo de melhorar alguns dos problemas anteriormente mencionados. Um dos cimentos é constituído por um copolímero de PMMA e etil hexilacrilato (EHA) e os outros dois são materiais

compósitos de matriz PMMA-co-EHA reforçada com diferentes percentagens de partículas de vidro do sistema $3\text{CaO} \cdot \text{P}_2\text{O}_5 \cdot \text{MgO} \cdot \text{SiO}_2$ desenvolvido pelo mesmo laboratório.

Compósito PMMA-co-EHA com enchimento de vidro

Compósitos – conceito

Podemos definir os compósitos como sendo materiais que consistem em dois ou mais constituintes quimicamente diferentes que têm, geralmente, uma interface a separá-los (Ratner *et al.* 1996). Os constituintes mantêm a sua identidade e não se dissolvem nem se fundem um no outro embora actuem em conjunto (Ramakrishna *et al.* 2004). Num compósito existe normalmente uma ou mais fases descontínuas incorporadas numa fase contínua. A fase descontínua (ou reforço) é geralmente mais dura e rígida que a contínua (ou matriz) (Ratner *et al.* 1996). As propriedades dos compósitos são influenciadas pelas dos materiais constituintes, a sua distribuição e a interacção entre eles. Assim, a variação do tipo e distribuição do reforço (material de enchimento) permite obter as propriedades mecânicas e biológicas mais adequadas ao desempenho do dispositivo médico. Nos cimentos compósitos, o PMMA é a matriz polimérica mais usada. Dos enchimentos podem destacar-se os biovidros, os fosfatos de cálcio e partículas de osso (Harper 1998).

Vidro $3\text{CaO} \cdot \text{P}_2\text{O}_5 \cdot \text{MgO} \cdot \text{SiO}_2$

Os vidros-óxido são materiais não cristalizados, formados pelo óxido de um elemento de elevado estado de oxidação, normalmente a sílica (SiO_2), responsável por formar uma rede tridimensional infinita (Ratner *et al.* 1996). A adição de modificadores, óxidos de catiões como Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , causa a descontinuidade da rede através da quebra de ligações Si-O-Si (Corbellini 2006). Quando a mistura (sólida) de SiO_2 e dos modificadores de rede é aquecida até à temperatura de fusão e mantida por tempo suficiente a esta temperatura, dão-se reacções físico-químicas que originam um fluido homogéneo (Ratner *et al.* 1996). A estrutura amorfa dos vidros é obtida através do arrefecimento rápido do material líquido a partir da temperatura de fusão (1000-1500 °C). Devido à quebra das ligações pelos modificadores de rede e à elevada taxa de arrefecimento, o fundido solidifica numa estrutura formada por tetraedros (SiO_4^{4-}) desordenadamente dispostos (Corbellini 2006, Ratner *et al.* 1996). A desordem estrutural causa um aumento da reactividade destes vidros, nomeadamente em meio aquoso. A reactividade é a principal vantagem na reparação de defeitos ósseos, uma vez que há interacção do vidro com o plasma e o fluido intersticial e a consequente formação da camada

interfacial de hidroxiapatite (Corbellini 2006). O conhecimento do comportamento dos vários iões na rede global do silicato é extremamente importante, sobretudo porque permite compreender as propriedades do vidro.

O vidro usado na preparação dos compósitos em estudo pertence ao sistema $3\text{CaO}\cdot\text{P}_2\text{O}_5\text{-MgO-SiO}_2$ e tem a composição (% massa), 27,1% CaO, 22,8% P_2O_5 , 20,5% MgO, 29,9% SiO_2 , sendo denominado VH1 (Corbellini 2006).

Oliveira *et al.* (2000) avaliaram a influência da razão CaO/MgO na estrutura bifásica de vidros do sistema $\text{SiO}_2\text{-CaO-MgO-P}_2\text{O}_5$. Os autores concluíram que o Mg^{2+} , para além de substituir o Ca^{2+} actua como modificador de rede e aumenta a percentagem da fase amorfa nos vitrocerâmicos obtidos a partir do vidro (Oliveira *et al.* 2000). O papel do MgO na reactividade da superfície do vidro não gera consenso. Alguns estudos realizados *in vitro* indicam que este óxido inibe a mineralização enquanto outros sugerem que a formação da camada rica em Ca-P não é afectada (in Pereira *et al.* 2004). Contudo, existem vidros cerâmicos que possuem quantidades significativas de MgO e cuja bioactividade tem sido clinicamente confirmada (Pereira *et al.* 2004). Entretanto, Pereira *et al.* (2004) realizaram ensaios de bioactividade de dois vidros com baixo conteúdo de SiO_2 (25 e 29 % massa) e elevado conteúdo de MgO (31 e 36 % massa) e observaram que ambos os vidros induziam a precipitação de camadas ricas em Ca-P. No entanto, também verificaram que estas camadas estabeleciam ligações fracas com a superfície dos vidros. A formação da camada de apatite em vidros do sistema Si-Ca-P-Mg já tinha sido observada anteriormente por Oliveira *et al.* (2002) (in Pereira *et al.* 2004). Assim, este sistema de vidros demonstra que tem potencialidades, mas necessita de ser melhorado no que respeita à aderência da camada mineralizada, de modo a obter um material bioactivo com interesse biomédico.

Com a inclusão de MgO no vidro e com a utilização do copolímero PMMA-co-EHA, espera-se obter um cimento ósseo que apresente vantagens em relação a outros já existentes, tanto ao nível das propriedades biológicas como das mecânicas.

Avaliação da biocompatibilidade de um material *in vitro*

Hoje em dia existe uma grande pressão para reduzir os ensaios de investigação utilizando animais, e a área dos biomateriais não é excepção. Além disso, a própria utilização de um modelo animal pode ser questionável, atendendo à diversidade da anatomia, da fisiologia e da bioquímica animal, não se sabendo se este modelo fornece informação útil na previsão do comportamento de um dispositivo médico em humanos (Ratner *et al.* 1996). Embora os ensaios *in vitro*, forneçam informação fundamental ao nível das interacções celulares e moleculares, ainda não conseguem substituir a

avaliação *in vivo*, sobretudo no caso dos implantes cujo meio envolvente é muito mais complexo. Mas, com os adventos da biologia celular e molecular, têm surgido novos testes *in vitro* que permitem uma avaliação cada vez mais precisa da biocompatibilidade dos materiais.

Na Europa, a escolha dos testes adequados à avaliação biológica dos dispositivos médicos deve ser guiada pela norma ISO 10993.

Bioactividade

Quando o biomaterial desenvolvido tem como função estabelecer ligações com o osso, um dos primeiros ensaios a realizar é o da bioactividade. Este ensaio permite fazer a medição da bioactividade, não só qualitativamente como quantitativamente (Kokubo e Takadama 2006).

Na maioria dos casos o ensaio é realizado num meio acelular com uma composição iónica semelhante à do plasma humano, denominado "Simulated Body Fluid" (SBF), como proposto por Kokubo *et al.* em 1991 (*in* Kokubo e Takadama 2006). O biomaterial é colocado neste meio durante determinados períodos de tempo, ao fim dos quais se avalia se houve formação de uma camada superficial de apatite. A formação desta camada é indicativa de que aquele biomaterial é potencialmente bioactivo. Tem sido comprovado por diversos estudos que os biomateriais que demonstram ser bioactivos em SBF também o são no meio *in vivo* (*in* Kokubo e Takadama 2006).

Citotoxicidade

O termo citotoxicidade estabelece que existem efeitos tóxicos ao nível celular (morte, alterações da permeabilidade da membrana celular, inibições enzimáticas, etc.) (Ratner *et al.* 1996). Os efeitos adversos causados pelos dispositivos médicos são muitas vezes devidos à toxicidade química dos vários constituintes do material, contaminantes ou produtos de degradação (Chiellini 2006). Existem três tipos de ensaios que são usados para avaliar a biocompatibilidade de um biomaterial em cultura de células (Chiellini 2006, Ratner *et al.* 1996):

Contacto directo – neste método, como o nome indica, o biomaterial a ser testado é colocado em contacto directo com as células.

Difusão em agar – neste método, uma fina camada de meio de cultura suplementado com agar é colocada sobre as células. O biomaterial (ou um extracto do biomaterial seco em filtro de papel) é posteriormente colocado por cima da camada de agar.

Eluição ou Extractos – o biomaterial é colocado em meio líquido por um determinado período de tempo e em determinadas condições de extracção, de acordo com os objectivos do estudo. Neste método são os extractos que são colocados em contacto com as células.

A escolha do método ou dos métodos a utilizar depende do tipo de biomaterial a ser testado e dos ensaios que se pretendem fazer após a exposição.

Algumas das vantagens e desvantagens dos três métodos estão descritas na Tabela 1.2.

Tabela 1.2. Vantagens e desvantagens dos métodos de cultura celular usados para testar biomateriais (adaptada de Ratner *et al.* 1996).

	Contacto directo	Difusão em agar	Extractos
Vantagens	Elimina a preparação dos extractos	Elimina a preparação dos extractos	Processo de extracção é independente do ensaio
	Zona de difusão	Zona de difusão	Escolha das condições de extracção e solventes a usar
	As células contactam com o material	Melhor gradiente de concentração do tóxico	Permite análise do efeito de diferentes concentrações
	Imita as condições fisiológicas	Pode ser testado um lado do material	Não há risco de trauma celular por contacto com o biomaterial
	Permite prolongar o tempo de exposição por adição de meio fresco	Independente da densidade do material	
Desvantagens	Risco de trauma celular se o material se mover	Uso de discos de papel filtro para testar líquidos ou extractos	
	Risco de trauma celular com materiais de densidade elevada	Requer uma superfície lisa	Tempo de execução mais elevado
	Diminuição da população celular com tóxicos de solubilidade elevada	Solubilidade do tóxico em agar	Mais laborioso
		Tempo de exposição limitado	
		Risco de absorção de água do agar	Não permite avaliar parâmetros que necessitem de contacto celular
	Risco de choque térmico aquando da preparação da camada de agar		

Após a exposição, pode ser feita uma análise qualitativa das alterações morfológicas das células, avaliando o desprendimento, formação de grânulos, fragmentação do citoplasma e redução do núcleo, pela observação num microscópio invertido de células vivas ou fixadas e marcadas (Chiellini 2006). Quando se pretende uma análise mais profunda pode-se recorrer à microscopia de epifluorescência e à microscopia laser confocal após marcação fluorescente do citoesqueleto ou do núcleo da célula, ou ainda à microscopia electrónica de varrimento e transmissão (SEM e TEM, respectivamente) (Chiellini 2006). No entanto, uma avaliação mais objectiva carece da realização, sempre que possível, de uma análise quantitativa dos efeitos citotóxicos do biomaterial testado, havendo para o efeito, várias técnicas disponíveis, das quais se destacam abaixo os ensaios do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio) e da libertação da enzima lactato desidrogenase (LDH) e a coloração com diacetato de fluoresceína (FDA) e brometo de etídio (BE).

O ensaio normalmente designado por ensaio do MTT é um dos testes bioquímicos mais usado para avaliar a citotoxicidade de um biomaterial (Silva *et al.* 2004a). Este teste fornece uma medida da função metabólica da célula por via da integridade e actividade da enzima mitocondrial, desidrogenase do succinato, que pode ser afectada após a exposição das células a um ambiente tóxico (Kirkpatrick *et al.* 1998). Esta enzima tem a capacidade de reduzir o MTT, que é solúvel em água e tem tonalidade amarela. Dessa redução resulta a produção de cristais de formazano (de cor púrpura) no interior das células, cristais esses que podem ser dissolvidos com solventes orgânicos, como o dimetilsulfóxido (DMSO) ou o isopropanol, e posteriormente quantificados por espectrofotometria (Kirkpatrick *et al.* 1998, Silva *et al.* 2004a). Como apenas as células vivas são capazes de metabolizar o MTT, este ensaio fornece uma medida da viabilidade e da proliferação celular (Silva *et al.* 2004a).

Os efeitos tóxicos de um biomaterial podem também envolver alterações da integridade estrutural e funcional da membrana plasmática, que por constituir uma barreira entre a célula e o meio envolvente, desempenha um papel vital (Kirkpatrick *et al.* 1998). Uma técnica simples, que permite fazer uma avaliação exacta da integridade da membrana e da viabilidade celular é o ensaio da libertação da enzima lactato desidrogenase (LDH) (Chiellini 2006). Esta é uma enzima citosólica que é libertada para o meio de cultura devido à perda da integridade da membrana e que pode ser quantificada por espectrofotometria, permitindo também fazer a avaliação do número de células viáveis (Chiellini 2006, Marques *et al.* 2002). A coloração com diacetato de fluoresceína (FDA) e brometo de etídio (BE) é também uma técnica bastante usada para a avaliação da integridade da membrana. No citoplasma de células íntegras, o FDA é convertido em fluoresceína apresentando uma fluorescência verde quando excitado propriamente ($\lambda=493$ nm). O BE, por seu lado, só consegue penetrar se a membrana plasmática estiver danificada, ligando-se aos ácidos nucleicos, sobretudo ao DNA nuclear, e apresenta fluorescência laranja avermelhada (Kirkpatrick *et al.* 1998).

Estes são apenas alguns dos métodos mais usados para avaliar a toxicidade de um biomaterial *in vitro*. Outros testes são baseados na avaliação da síntese e do conteúdo de DNA, e na ocorrência de apoptose e de diferenciação celular (Homaeigohar *et al.* 2006, Kirkpatrick *et al.* 1998).

Genotoxicidade

Dependendo da composição do biomaterial, pode existir a necessidade de avaliar os seus possíveis efeitos genotóxicos. Estes ensaios são importantes, sobretudo quando não há conhecimento dos efeitos de cada um dos componentes do material. Testar a genotoxicidade implica determinar se os materiais com possível aplicação originam mutações ao nível dos genes, alterações na estrutura dos cromossomas ou outras alterações ao nível do DNA, podendo os testes ser realizados *in vitro* ou *in vivo* (Chiellini 2006, Kirkpatrick *et al.* 1998).

Um dos métodos mais usados e referenciados na norma ISO 10993 para avaliar a mutagenicidade *in vitro* é o teste de Ames, que permite detectar mutações ao nível de genes relacionados com funções metabólicas, usando estirpes de *Salmonella* desenvolvidas para o efeito (Kirkpatrick *et al.* 1998, Montanaro *et al.* 2006). Para além deste ensaio, existem outros testes igualmente referidos na norma que podem ser usados para determinar a mutagenicidade de biomateriais, e incluem o teste dos micronúcleos ou da troca de cromátídeos irmãos (Kirkpatrick *et al.* 1998).

Com o desenvolvimento de novas tecnologias, nomeadamente nas áreas da genómica e da proteómica, têm surgido diversos métodos que permitem um rastreio mais completo da genotoxicidade de biomateriais. Estes métodos tornam possível o estudo de mecanismos celulares regulatórios, principalmente a dois níveis – da transcrição de genes e da sua tradução (Kirkpatrick *et al.* 1998). Portanto, são já alguns os trabalhos que recorrem a métodos como o “northern blot”, a hibridação *in situ*, ou mesmo às técnicas de “real-time PCR” ou de “microarrays” para estudos de genotoxicidade de biomateriais (Chiellini 2006, Xynos *et al.* 2001).

Para além dos testes referidos, existem outros parâmetros que são igualmente importantes estudar quando se desenvolve um novo biomaterial. Estes incluem a adesão celular, estudos da função biossintética da célula ou a resposta inflamatória por parte do organismo (Kirkpatrick *et al.* 1998, Ratner *et al.* 1996), mas que não irão ser abordados nesta revisão teórica.

Citometria de fluxo

A citometria de fluxo (FCM) é uma técnica amplamente usada no diagnóstico/prognóstico clínico, sendo esta a área onde ela tem tido maiores avanços. No entanto, são variadas as áreas de investigação básica e aplicada que recorrem à citometria de fluxo e que têm contribuído igualmente para o seu progresso.

Esta técnica surgiu nos anos 50 com o objectivo primário de detectar e contar células sanguíneas (Shapiro 2004). No entanto, até aos dias de hoje, devido às enormes potencialidades da FCM, inúmeras áreas têm progressivamente obtido bastante usufruto desta técnica, particularmente a biologia molecular e celular, biotecnologia, toxicologia, microbiologia e fisiologia (O'Connor *et al.* 2001). Estudos de viabilidade celular, conteúdo em DNA nuclear, nível de ploidia, necrose e apoptose celular e análise do ciclo celular são algumas das aplicações mais comuns da FCM nestas áreas.

No entanto, uma das grandes potencialidades desta técnica surgiu com o desenvolvimento de instrumentos que permitem a selecção e seriação de partículas de interesse ("Fluorescence activated cell sorter" - FACS). Assim, estas partículas podem ser utilizadas em novos ensaios *a posteriori* (Cram 2002).

Princípios básicos

A citometria de fluxo é uma técnica que permite medir as propriedades ópticas (dispersão da luz e fluorescência) de partículas (biológicas e não biológicas) que fluem numa suspensão líquida (Loureiro 2007, Loureiro e Santos 2004). Uma das mais-valias da FCM, quando comparada com outras técnicas, é o facto de permitir realizar análises multiparamétricas (medição simultânea de vários parâmetros físicos e químicos). Num citómetro de fluxo as medições são realizadas à medida que as partículas passam, uma a uma, no centro de uma câmara de fluxo laminar (Loureiro 2007). A medição em fluxo, permite que as análises sejam realizadas a uma velocidade elevada (*e.g.*, $10^2 - 10^3$ partículas por segundo) e garante que as partículas analisadas são seleccionadas aleatoriamente de toda a população (Loureiro e Santos 2004).

Um citômetro de fluxo é constituído por 5 elementos: fonte(s) de radiação (lâmpada de mercúrio ou laser), uma câmara de fluxo, unidades de filtros ópticos, fotodíodos ou fotomultiplicadores e uma unidade de processamento dos dados recolhidos (Figura 1.4) (Silva *et al.* 2004b).

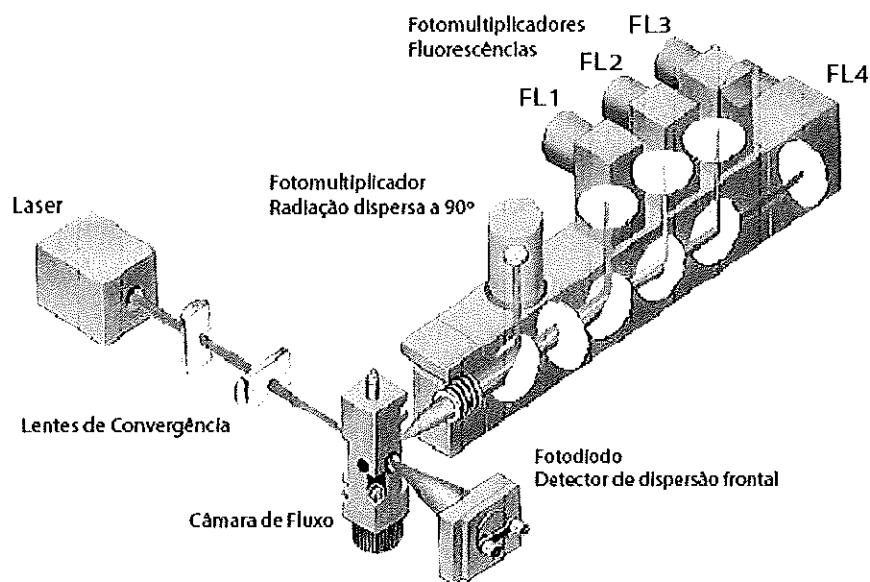


Figura 1.4. Representação esquemática de um citômetro de fluxo (retirado de Silva *et al.* 2004b).

A suspensão líquida a analisar é introduzida na câmara de fluxo que se encontra preenchida por um fluido envolvente, que possui uma velocidade superior à da amostra. Esta diferença de velocidades leva a que se dê um fenómeno físico, designado por focagem hidrodinâmica, que faz com que as partículas se movam em regime laminar e individualmente no centro do fluxo sem se misturarem com o fluido envolvente (Figura 1.5) (Loureiro e Santos 2004, Silva *et al.* 2004b). Durante o fluxo, cada partícula é intersectada por um ou mais feixes de luz, ocorrendo um processo de dispersão fotónica e/ou emissão de fluorescência, cuja intensidade está dependente das características das partículas (Côrte-Real *et al.* 2002). A radiação pode sofrer quer dispersão frontal ("forward scatter" - FS) quer dispersão lateral ("side scatter" - SS) e ser desviada ortogonalmente (90°) (Loureiro e Santos 2004, Silva *et al.* 2004b). Enquanto, a análise da dispersão frontal da luz fornece uma indicação do tamanho da partícula, a dispersão lateral representa a granularidade/complexidade e rugosidade de cada partícula (Loureiro 2007). Ambos os tipos de dispersão da luz são únicos de cada partícula e em conjunto podem ser usadas para distinguir diferentes tipos de células numa amostra heterogénea (*e.g.*, diferentes tipos de glóbulos brancos).

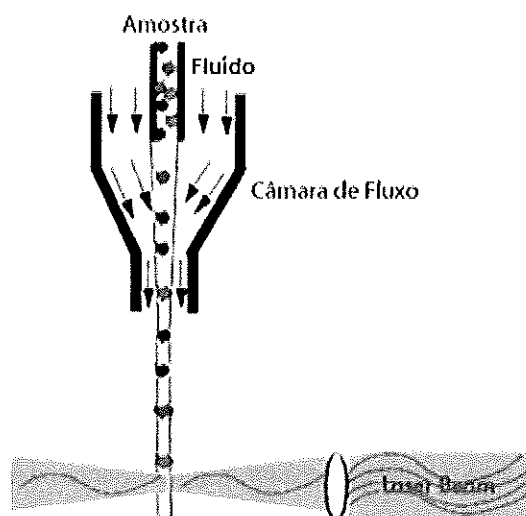


Figura 1.5. Representação esquemática de uma câmara de fluxo (adaptado de Silva *et al.* 2004b).

Para além das propriedades associadas à dispersão de luz, a amostra pode conter compostos intracelulares com fluorescência intrínseca ou com capacidade para se ligarem a marcadores fluorescentes (fluorocromos) e conseqüentemente emitir luz fluorescente, sendo este outro dos parâmetros possíveis de analisar com esta técnica (Loureiro 2007, Silva *et al.* 2004b). As medições de fluorescência com diferentes comprimentos de onda de emissão, permitem obter informações qualitativas e quantitativas simultaneamente de vários compostos marcados. Os sinais luminosos detectados são amplificados e convertidos em pulsos elétricos pelos tubos fotomultiplicadores. Posteriormente estes pulsos elétricos são convertidos em pulsos analógico-digitais (Loureiro e Santos 2004). Por sua vez, os sinais digitalizados são processados numa escala arbitrária de 1024 canais, tornando possível a acumulação dos sinais emitidos por cada uma das partículas, em tempo real, na forma de histogramas mono- ou biparamétricos, que são visualizados no monitor de um computador (Côrte-Real *et al.* 2002). Além disso, é possível guardar a informação da análise num formato que permite fazer o reprocessamento dos dados "offline" (O'Connor *et al.* 2001). Na reanálise dos dados existem diversas abordagens que podem ser seguidas e que permitem obter uma melhor compreensão ou comparação dos dados obtidos: criação de regiões; subdelimitação de partículas ("gating"); sobreposição de histogramas, etc (Loureiro 2007). O "software" existente na maior parte dos citômetros permite igualmente efectuar uma análise estatística básica, útil para a interpretação dos resultados, que inclui a média, a moda e a posição do canal do pico, assim como, o coeficiente de variação (CV) (Loureiro 2007).

Análise do ciclo celular

A análise do ciclo celular e da cinética da proliferação celular são dois parâmetros importantes na avaliação da progressão de tumores e em estudos toxicológicos. Devido à sua importância, têm-se investido bastantes esforços para desenvolver técnicas que sejam cada vez mais precisas, rápidas e fáceis de executar. Os primeiros métodos que foram desenvolvidos eram baseados na autoradiografia com utilização de radioisótopos [(³²P ou ³H)-timidina], estando associados a técnicas de microespectrofotometria e de microfluorometria (Darzynkiewicz *et al.* 2004). No entanto devido à execução complicada e morosa e à reduzida disponibilidade deste tipo de equipamentos, estas técnicas foram escassamente utilizadas (Darzynkiewicz *et al.* 2004). O aparecimento da FCM levou à possibilidade de executar estas medições com uma precisão e rapidez inigualáveis, levando a enormes progressos na área da biologia celular, especialmente no campo do ciclo celular.

O ciclo celular é um fenómeno biológico que permite a todas as células indiferenciadas originarem células filhas com as mesmas características genéticas, após o qual se diferenciam. São quatro as principais fases do ciclo celular: G₁, S, G₂ e M (Azevedo 1999) (Figura 1.6). A fase G₁ é considerada o primeiro "gap" do ciclo celular, no qual as células se preparam para a replicação do DNA, ou seja, é o intervalo de tempo que medeia o fim de um ciclo e o início de outro. É nesta fase que a célula prossegue, interrompe ou sai do ciclo celular (Johnson e Walker 1999). A fase S é definida como o período no qual ocorre a síntese de DNA. G₂ é o segundo "gap" do ciclo celular, durante o qual a célula prepara o processo de divisão. A fase M corresponde à mitose, período no qual os cromossomas replicados são divididos em dois núcleos separados e onde ocorre a divisão citoplasmática, originando duas células filhas. Para além destas quatro fases, existe uma quinta, a fase G₀, que é definida como uma fase G₁ prolongada. Esta fase pode ser observada em células caracterizadas por um longo período de vida e por raramente se dividirem (células quiescentes). Todavia, perante estímulos adequados, as células podem deixar este estado e efectuar um ou mais ciclos de divisão (Azevedo 1999, Johnson e Walker 1999).

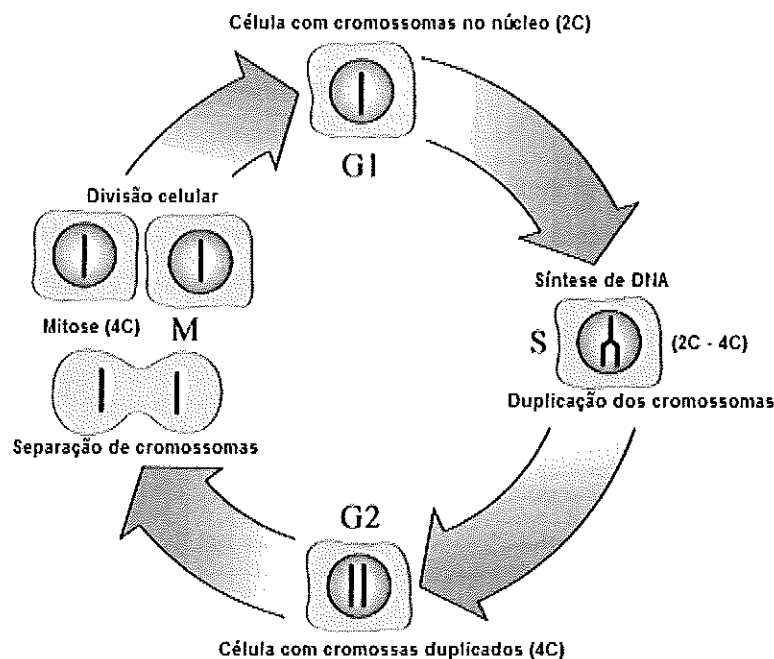


Figura 1.6. Esquema representativo do ciclo celular de eucariontes (adaptado do endereço http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2001/press.html).

Ao longo das várias fases do ciclo celular o conteúdo em DNA nuclear das células vai variando. Nas fases G_0 e G_1 uma célula diplóide apresenta uma quantidade de DNA que é muitas vezes expressa como sendo $2C$ (C – conteúdo de um conjunto haplóide de cromossomas), possuindo duas cópias de cada gene. Durante a fase S ocorre a duplicação do genoma nuclear e cada célula atinge o nível $4C$. Esta quantidade de DNA é mantida durante a fase G_2 , e após a mitose, cada célula filha herda metade do material genético da célula mãe e fica com um conteúdo $2C$ em DNA (Loureiro e Santos 2004, Shapiro 1995). Esta variação do conteúdo em DNA nuclear ao longo da divisão celular é o princípio em que se baseiam os métodos de citometria de fluxo utilizados para esta análise.

Dado que o objectivo é quantificar (de forma absoluta ou relativa) o DNA total do núcleo, o passo inicial deste tipo de análises por citometria de fluxo, consiste no isolamento de núcleos intactos, o que é geralmente conseguido com a utilização de um tampão de lise e de um método de isolamento adequado ao tipo de material a analisar (*e.g.*, tecido animal, tecido vegetal, células em suspensão, material parafinado) (Shapiro 1995). Após o isolamento dos núcleos, estes têm de ser marcados com um ou mais fluorocromos que se liguem específica e de preferência estequiometricamente ao DNA e que sejam excitados pela fonte de luz disponível no citómetro de fluxo a utilizar. Até ao momento já foram desenvolvidos alguns fluorocromos específicos para o DNA (Tabela 1.3), sendo os mais populares o iodeto de propídio (IP) e o DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindole).

Tabela 1.3. Exemplos de fluorocromos mais usados em citometria de fluxo para a análise do conteúdo em DNA (adaptada de Loureiro 2007)

Fluorocromo	Comprimento de onda (nm)	
	Excitação	Emissão
Iodeto de propídio	530 (Azul-verde)	605 (Vermelho)
Brometo de etídio	540 (Azul-verde)	615 (Vermelho)
DAPI	365 (UV)	450 (Azul)
Mitramicina	445 (Violeta-Azul)	575 (Verde)
Hoechst 33258	365 (UV)	465 (Azul)
Hoechst 33342	365 (UV)	460 (Azul)
Laranja de acridina	502 (Azul)	525 (Verde)
Coromicina A3	445 (Violeta-Azul)	570 (Verde)

Na Figura 1.7. apresenta-se um exemplo de um histograma típico de análise do ciclo celular por citometria de fluxo. No eixo dos x é apresentada a fluorescência do iodeto de propídio como medida da quantidade de DNA de cada núcleo, e no eixo dos y é apresentado o número de núcleos com determinada quantidade de fluorescência, ou seja que se encontram em cada uma das fases do ciclo celular. Por citometria de fluxo e utilizando a maioria dos fluorocromos, não é possível distinguir as células que estão na fase G_0 das que estão em G_1 do ciclo celular, uma vez que ambas apresentam o mesmo conteúdo em DNA nuclear (2C). As células em G_2 , com um conteúdo 4C, emitem o dobro da fluorescência em relação às da fase G_0/G_1 , enquanto as células na fase S possuem uma quantidade de DNA intermédio entre 2C e 4C. Uma das limitações da citometria de fluxo está relacionada com a determinação das células que se encontram na fase M do ciclo celular. Como no início da mitose, o invólucro nuclear se desorganiza, não é possível isolar e analisar núcleos de células que estejam nesta fase. Portanto, num histograma apenas são visíveis as fases G_0/G_1 , S e G_2 .

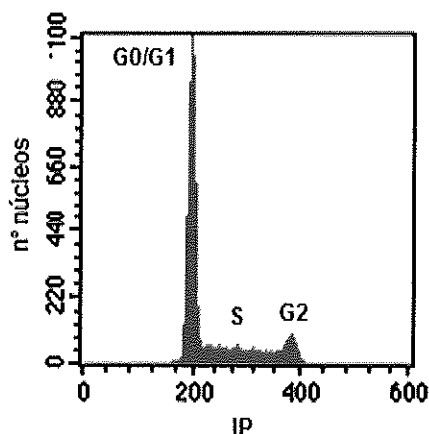


Figura 1.7. Exemplo de histograma obtido na análise do ciclo celular (adaptado do endereço http://science.cancerresearchuk.org/sci/facs/facs_major_apps/cell_cycle_analysis/).

Tecido ósseo

O osso é um tecido dinâmico, altamente vascularizado, que é continuamente destruído e reparado, de modo a manter o seu volume e a garantir a homeostasia do cálcio ao longo da vida de um vertebrado (Katagiri e Takahashi 2002, Salgado *et al.* 2004). Designa-se por remodelação óssea, ao processo que ocorre sobretudo num adulto, no qual há a remoção do osso velho (reabsorção) e substituição com osso recém sintetizado (Hill 1998). Para além da sua principal função como estrutura de sustentação do organismo, o osso desempenha um papel importante na protecção de órgãos internos e ao nível metabólico como reservatório mineral. O tecido ósseo de um adulto é organizado por duas formas estruturais: o osso trabecular ou esponjoso (cerca de 20% da massa total de osso) e o osso cortical ou compacto (cerca de 80% da massa total de osso) (Salgado *et al.* 2004). A maioria das propriedades relevantes do osso está relacionada com a constituição da sua matriz. A matriz óssea possui uma parte inorgânica mineral constituída por cristais de hidroxiapatite (65-70% da matriz) e uma parte orgânica composta por células, colagénio tipo I e proteínas não colagénicas (osteocalcina, osteonectina, proteoglicanos, etc) (Hill 1998, Sommerfeldt e Rubin 2001). A produção, manutenção e reabsorção deste tecido, resulta da interacção de três tipos de células: osteoblastos, osteócitos e osteoclastos, que têm funções bem definidas e são essenciais para manter o tecido ósseo saudável (Salgado *et al.* 2004).

A formação do osso resulta de uma complexa cascata de eventos que envolve a proliferação de células do mesênquima não diferenciadas, a sua diferenciação em células precursoras de osteoblastos, a maturação de osteoblastos, formação da matriz e finalmente a sua mineralização (Hill

1998). Durante o processo de reabsorção, de forma a dar início à formação de osso novo, são produzidos factores que serão responsáveis por atrair osteoblastos ou os seus percursos. Assim, o passo inicial do processo de síntese de osso é o alinhamento de osteoblastos na cavidade onde se deu a reabsorção, também designada por lacuna de Howship's. O passo seguinte é a sua proliferação, que é mediada por factores de crescimento derivados dos percursos dos osteoblastos e por factores que são libertados durante o processo de reabsorção. O terceiro evento da fase de formação é a diferenciação dos percursos de osteoblastos em células maduras que posteriormente se tornam quiescentes. Após esta sequência de eventos está formada a matriz osteóide (matriz óssea não mineralizada), que é posteriormente alvo de mineralização (formação de cristais de hidroxiapatite) (Hill 1998). Alguns dos osteoblastos da matriz osteóide diferenciam-se em osteócitos, que ficam inseridos na matriz e permanecem ali durante anos, sendo as células mais abundantes do osso adulto. Diversos estudos demonstram que os osteócitos respondem a estímulos mecânicos e enviam sinais bioquímicos responsivos. Além disso, existem alguns trabalhos que evidenciam que estas células têm também um papel activo no processo de mineralização (Bonewald 2006, Hill 1998). Os osteoclastos são células migratórias, multinucleadas que possuem várias enzimas lisossomais e que são responsáveis pelo processo de reabsorção de osso mineralizado nas lacunas de Howship's (Sommerfeldt e Rubin 2001). Na Figura 1.8 apresenta-se um esquema onde estão representados os principais constituintes do tecido ósseo.

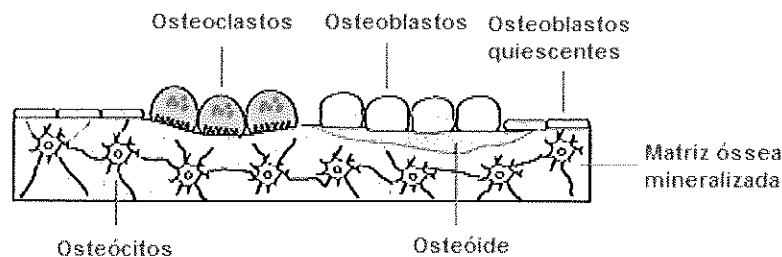


Figura 1.8. Esquema representativo da organização dos principais constituintes do tecido ósseo (adaptado do endereço <http://www.iofbonehealth.org/health-professionals/about-osteoporosis/basic-bone-biology.html>).

Linha celular MG-63

Neste trabalho foi usada a linha celular MG-63 (gentilmente cedida pelo Laboratório de Biomaterias do Instituto de Engenharia Biomédica - INEB), que é uma linha de osteoblastos derivada de células de osteossarcoma (tumor) humano. As células têm uma morfologia de fibroblastos e crescem em monocamada aderente.

Esta é uma linha de osteoblastos moderadamente diferenciados, muitas vezes designados por "osteoblast-like", dado que não mineralizam em cultura (Hattar *et al.* 2002, Schwartz *et al.* 1999). No entanto, estas células exibem muitas das características dos osteoblastos que formam o tecido ósseo, como o facto de apresentarem a capacidade de sintetizar marcadores fenotípicos característicos, como a fosfatase alcalina e a osteocalcina (Lossdörfer *et al.* 2004). Uma das principais vantagens desta linha celular é ser contínua que, ao contrário de uma linha celular derivada de uma cultura primária, apresenta um potencial de crescimento indefinido e pode ser mantida durante um longo período com uma taxa de proliferação constante (Freshney 1983).

Manutenção da linha celular MG-63

Criopreservação das células

Quando uma linha celular é utilizada por rotina, a melhor forma de garantir que se mantém estável e livre de contaminações é preservar as células em "stocks", recorrendo a métodos de preservação que mantenham a sua integridade. Neste trabalho, as células foram mantidas em azoto líquido (-196°C), que é o meio de preservação mais usado, apresentando resultados bastante satisfatórios dado as células se manterem viáveis por longos períodos de tempo (Freshney 1983).

A congelação de células em cultura é um processo delicado, que quando não é realizado de forma adequada, incorre no risco de provocar danos celulares que levam à morte da maioria das células. Assim, dois pontos importantes do processo de congelamento são, o controlo da velocidade de congelação e a presença de um agente preservante como glicerol ou DMSO (Freshney 1983). As células devem congelar lentamente, baixando a sua temperatura 1°C por minuto. Este processo é conseguido utilizando um contentor de congelação (com um reservatório contendo isopropanol), onde as ampolas são colocadas antes de serem transferidas para o azoto líquido.

Descongelamento das células

Se o modo como se procede à congelação das células é fundamental para manter a sua viabilidade, o processo de descongelamento não é menos importante. A descongelamento deve ser feita de um modo bastante rápido, para que as células não estejam sujeitas aos efeitos tóxicos do agente criopreservante e de forma a evitar o seu choque osmótico. Atendendo a que a linha celular MG-63 é susceptível à toxicidade do DMSO a uma temperatura superior a 4°C, uma forma de minimizar este efeito é diluir rapidamente as células descongeladas em meio de cultura e assim diluir também o criopreservante.

Ojectivos desta dissertação

Esta dissertação tinha como objectivo principal, avaliar a toxicidade *in vitro* de cimentos ósseos de base acrílica. Para isso, osteoblastos humanos (linha MG-63) foram expostos a extractos dos cimentos e a toxicidade destes foi avaliada, ao longo do tempo, recorrendo a um ensaio de referência (ensaio de MTT) para determinar a viabilidade celular, em complementaridade com estudos de citometria de fluxo para monitorização de: a) potenciais efeitos genotóxicos; b) potenciais alterações na progressão das células pelas diferentes fases do ciclo celular (*e.g.*, efeito mitogénico).

Para que fosse possível realizar o estudo, houve necessidade de implementar as várias técnicas associadas à manutenção de células animais em cultura e em particular da linha celular utilizada.

Finalmente, ressalve-se que este trabalho resultou dum objectivo mais amplo de colaboração interdisciplinar (Biologia e Biomateriais) a decorrer na Universidade de Aveiro.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

Para um melhor entendimento da estratégia utilizada neste trabalho, apresenta-se na Figura 2.1 um dendrograma com o respectivo planeamento experimental.

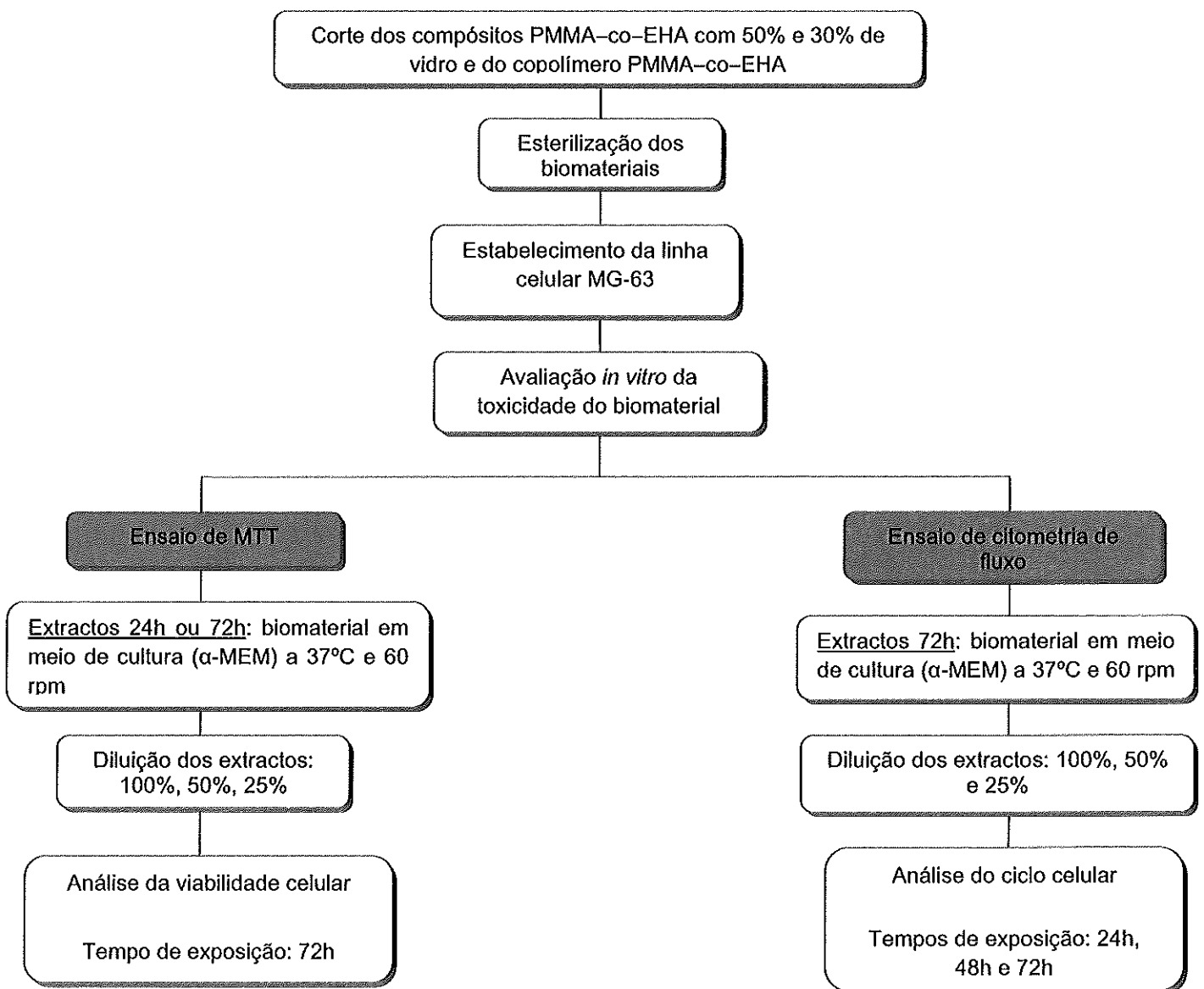


Figura 2.1. Dendrograma do planeamento experimental.

Preparação dos cimentos ósseos

Foram usados três cimentos ósseos com diferentes percentagens (em massa) de vidro: 0% - C0M, 30% - C3M, 50% - C5M. O processo de fabrico encontra-se detalhadamente descrito em Corbellini (2006) e é resumido em seguida.

Os reagentes utilizados foram: PMMA pré-polimerizado, vidro VH1 (partículas com tamanho médio de 10 μm , aproximadamente), BPO, monómeros MMA e EHA na proporção 1:1 em massa e DMPT (Tabela 2.1). Primeiro misturaram-se os monómeros, em seguida foi adicionado o BPO, e só depois da dissolução completa deste reagente foram adicionados os pós, previamente misturados, de vidro e PMMA (ou só PMMA). Por fim, foi acrescentado o DMPT. Após homogeneização, a mistura foi colocada num molde e curada ao ar, à temperatura ambiente. O endurecimento da massa no molde foi rápido (10 minutos em média), sendo acompanhado de subida de temperatura (processo de polimerização exotérmico).

Tabela 2.1. Composição dos cimentos ósseos usados neste estudo. Os valores indicam as percentagens mássicas relativas dos componentes principais nas misturas e a massa de aditivo em 100% das misturas.

Cimento ósseo	Componentes sólidos			Componentes líquidos		
	PMMA	VH1	BPO	MMA	EHA	DMPT
C0M	100	0	2	50	50	1
C3M	70	30	2	50	50	1
C5M	50	50	2	50	50	1

Os materiais foram obtidos na forma de placas, que posteriormente foram cortadas em blocos com as dimensões 5 x 5 x 3 mm^3 (Figura 2.2). Antes de serem usados nos ensaios *in vitro*, os blocos foram esterilizados durante 20 minutos em autoclave a 121°C e à pressão de 1 atm.

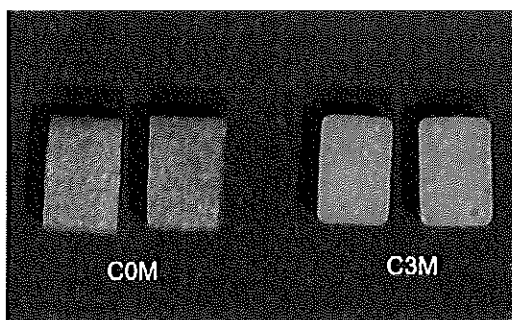


Figura 2.2. Blocos ($5 \times 5 \times 3 \text{ mm}^3$) dos cimentos ósseos C0M e C3M usados nos ensaios *in vitro*.

Neste trabalho, todo o material e reagentes utilizados encontravam-se esterilizados e as manipulações dos ensaios *in vitro* foram realizadas em condições de assépsia.

Todos os reagentes líquidos, antes da sua utilização, foram aquecidos a 37°C num banho e mantidos à temperatura ambiente.

Manutenção da linha celular MG-63

As células foram cultivadas a 37°C numa atmosfera húmida contendo 5% de CO_2 , em frascos de 75 cm^2 (Nunc) com 10 mL de meio "α – Minimal Essential Medium" (α-MEM) (Gibco) suplementado com 10% (v/v) de soro bovino fetal (FBS) (Gibco) e na presença de $10.000 \text{ unidades mL}^{-1}$ de penicilina - estreptomicina (Gibco), $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de fungizona (Gibco) e $0,0085 \text{ mg mL}^{-1}$ de sulfato de gentamicina (Gibco).

As células foram subcultivadas de três em três dias, período após o qual atingiam 80-90% de confluência (% da área de ocupação da superfície do frasco disponível para crescimento celular).

Tripsinização das células

Atendendo a que as células MG-63 crescem em monocamada aderente, a passagem de frasco envolve a adição de uma enzima proteolítica, a tripsina, que quebra as ligações das células ao substrato (poliestireno do frasco de cultura).

Após a observação inicial das células no microscópio invertido (ampliação 100x) (Leica), para verificar a sua morfologia e eventuais contaminações (bactérias, fungos), retirou-se o meio de cultura e as células foram lavadas com 5 mL de uma solução tampão salina de fosfato pH 7,2 (PBS) (Gibco). De

seguida adicionaram-se 3 mL de uma solução de tripsina-etilendiaminotetracético (EDTA) (0,25% tripsina, 1 mM EDTA) (Gibco) e incubou-se o frasco durante 5 min a 37°C. Ao fim deste tempo, observou-se novamente o frasco no microscópio para verificar se todas as células estavam em suspensão. O efeito da tripsina foi inibido, adicionando 7 mL de meio de cultura à temperatura ambiente e ressuspendendo as células. Fez-se uma nova observação no microscópio de modo a verificar se a maioria das células estava isolada. Posteriormente, foi realizada a contagem das células usando uma câmara de contagem ou hemocítmetro (Marienfeld) e determinou-se a densidade celular da suspensão. Num frasco novo, adicionou-se o volume adequado da suspensão a meio α -MEM completo de modo a obter a densidade de 1×10^6 células mL⁻¹ num volume de 10 mL. As células foram usadas nos diversos ensaios entre as passagens 4 e 10 após a descongelação.

No Anexo I encontra-se o procedimento da utilização do hemocítmetro com a descrição dos cálculos a efectuar para determinar a densidade celular.

Criopreservação das células

Aquando da renovação do meio de cultura, dado a densidade celular ser elevada, procedeu-se à criopreservação das células. Após a tripsinização e determinação da densidade celular, o volume adequado da suspensão celular foi transferido para um tubo de 15 mL, de modo a obter-se a densidade de $1,5 \times 10^6$ células mL⁻¹. A suspensão foi centrifugada a 180xg durante 5 min. Removeu-se o sobrenadante, tendo o cuidado de não perturbar o sedimento, e ressuspenderam-se as células em 1 mL de meio de cultura com 10% (v/v) de DMSO previamente adicionado. A suspensão foi transferida para uma ampola de criopreservação e colocada no "Mr. Frosty" (contentor de congelação) (NALGENE®) a 4°C durante 1h. No fim deste período, o "Mr. Frosty" foi colocado a -80°C onde foi mantido durante a noite. No dia seguinte as ampolas foram transferidas para o contentor de azoto líquido.

Descongelação das células

A ampola com as células foi colocada num banho a 37°C durante 1 - 2 min até estar praticamente descongelada. Transferiu-se o conteúdo da ampola (gota a gota) para um tubo de 15 mL com 5 mL de meio de cultura e centrifugou-se a solução durante 5 min a 180xg. Retirou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento em 5 mL de meio de cultura. Finalmente, a suspensão foi transferida para um frasco de cultura com 5 mL de meio, e este foi colocado na incubadora a 37°C e em atmosfera húmida com 5% de CO₂.

Avaliação da toxicidade dos cimentos ósseos *in vitro*

O método dos extractos foi o escolhido para avaliar a toxicidade dos biomateriais. Com este método são analisados eventuais elementos lixiviáveis que são libertados para o meio quando o material é colocado em contacto com este. As células foram expostas aos extractos dos cimentos ósseos e os possíveis efeitos tóxicos foram avaliados pelo método do MTT e pela análise do ciclo celular por citometria de fluxo.

Preparação dos extractos dos biomateriais e controlos usados nos ensaios

Em todos os ensaios realizados manteve-se constante a relação de superfície externa do biomaterial e o volume de meio, o rácio usado foi de $3 \text{ cm}^2 \text{ mL}^{-1}$ (de acordo com a norma ISO 10993). Os blocos esterilizados dos três cimentos ósseos (C0M, C3M e C5M) foram imersos, em número adequado, num tubo cónico (de 50 mL) com meio α -MEM completo e colocados num banho termostalizado a 37°C em agitação constante (60 rpm) (Orbit). O tempo de extracção variou consoante o ensaio a realizar, 24h e 72h para o ensaio do MTT e apenas 72h para a análise do ciclo celular por citometria de fluxo.

Em ambos os métodos fez-se também um controlo da extracção (CE) que consistiu em meio α -MEM completo sujeito às mesmas condições de extracção das amostras. Este controlo serviu para assegurar que as condições da extracção por si só não alteravam as propriedades do meio de cultura. Considerou-se como o controlo negativo dos ensaios (C^-), as células incubadas com meio não sujeito às condições de extracção (condições em que não há toxicidade celular). No método do MTT utilizou-se ainda o cobre como controlo positivo (C^+) (material tóxico para as células) de acordo com Josset *et al.* (1999). Cortaram-se quadrados de $1 \times 1 \text{ cm}^2$ de folha de cobre (Semimetais) com espessura inferior a 0,1 mm, que foram esterilizados em autoclave nas mesmas condições dos cimentos. Os extractos de cobre foram preparados seguindo o mesmo protocolo utilizado na extracção dos cimentos, sendo o tempo de extracção apenas de 24h. Finalmente, foi também efectuado um controlo de meio (CM), em que foi colocado meio de cultura em poços sem células. Este CM serviu para avaliar a existência de eventuais contaminações do meio e além disso foi considerado o branco do ensaio.

Análise dos extractos por “Inductively Coupled Plasma – Atomic Emission Spectroscopy”

Os extractos dos cimentos C3M e C5M foram analisados por “Inductively Coupled Plasma – Atomic Emission Spectroscopy” (ICP-AES) com o objectivo de analisar a sua composição elementar em Si, Ca, Mg e P e verificar a eventual libertação destes iões do vidro para o meio de cultura (α -MEM) durante o processo de extracção.

Para este ensaio foram preparados extractos de 72h dos cimentos com enchimento de vidro (C3M e C5M). Os extractos foram preparados como foi descrito anteriormente e antes de serem analisados foram diluídos 20 vezes com uma solução aquosa de ácido nítrico a 2% (v/v). Nesta análise foi usado como controlo, meio sem biomaterial sujeito às mesmas condições da extracção e analisado da mesma forma que as restantes amostras.

Ensaio do MTT

Antes de realizar os ensaios com os extractos, determinou-se qual a densidade celular adequada para obter um valor de absorvância que fornecesse uma quantificação precisa da proliferação celular.

Determinação da densidade celular apropriada para o ensaio do MTT

Após a tripsinização, as células foram ressuspendidas em meio de cultura à densidade final de 1×10^6 células mL^{-1} e a partir desta prepararam-se diluições seriadas, no mesmo meio, de 1×10^3 a $1,5 \times 10^5$ células mL^{-1} . De cada diluição foram plaqueados 100 μL por poço em microplaca de 96 poços, efectuando-se três réplicas por diluição. Incluíram-se também três poços apenas com meio, que funcionaram como branco. As células foram incubadas durante 72h a 37°C e em atmosfera humidificada com 5% de CO_2 . O reagente MTT (Sigma) com uma concentração final de 1 mg mL^{-1} foi preparado de fresco em PBS pH 7,2 (Gibco). Após três dias de incubação, adicionaram-se 50 μL do reagente MTT a cada poço, incluindo aos brancos. Colocou-se a placa novamente na incubadora durante 4h e foi-se observando ao longo do tempo num microscópio invertido (ampliação 100x) a formação de cristais de cor púrpura no interior das células. Ao fim das 4h retirou-se a solução de MTT e adicionaram-se 150 μL de DMSO (Sigma) para a dissolução dos cristais. A placa foi deixada por 2h à temperatura ambiente, com agitação e ao abrigo da luz (Figura 2.3). A obtenção de diferentes tonalidades de cor púrpura é devida ao número de cristais de formazano dissolvidos, que por sua vez é proporcional ao número de células viáveis presentes em cada poço. Finalmente, a absorvância de cada placa a 570 nm (A_{570}) foi medida num leitor de microplacas (Labsystem Mulliskan EX). As médias das absorvâncias foram corrigidas subtraindo a absorvância média do branco. Da

representação gráfica, densidade celular vs A_{570} , escolheu-se um valor de densidade celular da região linear do gráfico e cujo valor de A_{570} média se situava entre 0,75 e 1,25 (Figura III. I, Anexo III).

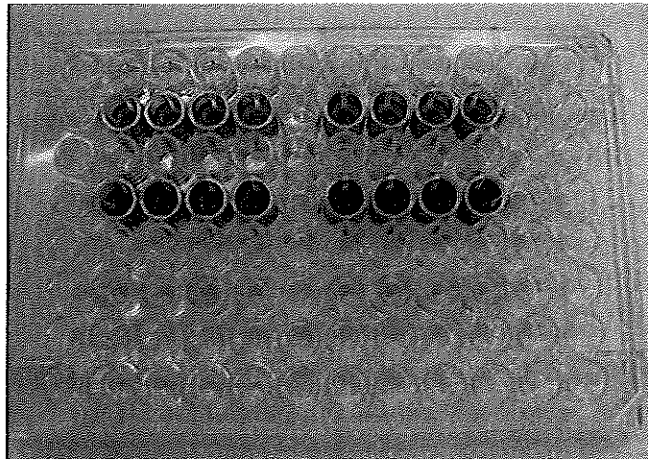


Figura 2.3. Placa de 96 poços resultante do ensaio de MTT após incubação com DMSO.

Exposição aos extractos e reacção do MTT

No ensaio do MTT, utilizaram-se os extractos dos cimentos ósseos de 24h e de 72h não diluídos (100%) e diluídos a 50% e 25% (percentagem de extracto) em meio de cultura. O extracto do cimento C5M apenas foi testado não diluído e diluído a 50%. O extracto de 24h do cobre foi diluído a 25% (percentagem de extracto) também em meio de cultura.

As células foram ressuspendidas em meio de cultura na densidade apropriada, $1,0 \times 10^5$ células mL^{-1} e plaqueadas ($100 \mu\text{L}/\text{poço}$) em placas de 96 poços. As placas foram incubadas 24h a 37°C e em atmosfera humidificada com 5% de CO_2 . No dia seguinte, o meio de cultura foi substituído pelo mesmo volume dos extractos dos cimentos (25%, 50% e 100%), do extracto de cobre (25%), e pelos vários controlos (CE, C e CM). Tanto nos controlos como nos extractos foram efectuadas 4 réplicas. As células foram incubadas durante 72h nas condições normais de cultura. Após o período de incubação, as células foram observadas num microscópio invertido (ampliação 100x) e foi adicionada a solução de MTT (1 mg mL^{-1} em PBS pH 7,2) a cada poço. As placas foram mantidas 4h a 37°C em atmosfera humidificada com 5% CO_2 . Após o período de incubação, removeu-se a solução de MTT e adicionou-se o DMSO (Sigma). Incubou-se a placa durante 2h à temperatura ambiente com agitação e ao abrigo da luz. Por fim, foram medidas as absorvâncias a 570 nm no leitor de microplacas, que foram corrigidas com a A_{570} média do branco. A absorvância média obtida para o controlo negativo foi

considerada como o 0% de inibição do metabolismo celular. A percentagem da inibição do crescimento celular foi calculada usando a fórmula:

$$\% \text{ Inibição do crescimento celular} = 100 - \frac{A_{570} \text{ extracto}}{A_{570} \text{ controlo negativo}} \times 100$$

Análise do ciclo celular por citometria de fluxo

Nesta análise, depois de tripsinizadas, as células foram ressuspensas em meio α -MEM completo, à densidade de $0,5 \times 10^5$ células mL^{-1} e plaqueadas em placas de 24 poços (400 μL /poço). As placas foram incubadas 24h nas condições de cultura. Após este tempo, o meio foi substituído pelo mesmo volume dos extractos de 72h, não diluídos e diluídos (50%, 25%), bem como pelo CE e pelo C. Efectuaram-se 4 réplicas de todas as amostras (extractos e controlos). Para cada cimento foram preparadas placas, cuja análise foi realizada após 24h, 48h e 72h de incubação (37°C, 5% CO_2). No fim de cada tempo de incubação observaram-se as células num microscópio invertido (ampliação 100x). A seguir, as células foram lavadas com 1 mL de PBS pH 7,2 (Gibco) e tratadas com 150 μL de tripsina/EDTA (Gibco), que foi posteriormente inactivada com 300 μL de meio de cultura. Depois de ressuspensas, as células foram centrifugadas a 300xg durante 6 min. Retirou-se o sobrenadante com cuidado, e ressuspendeu-se o sedimento em 1 mL de tampão WPB (a composição química do tampão encontra-se no Anexo II) (Loureiro *et al.* 2007). Desta forma por acção química os núcleos foram isolados. Adicionaram-se 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de RNAase (Sigma) para eliminar o RNA da amostra e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do fluorocromo IP (Fluka) para marcar o DNA nuclear. Depois da adição destes reagentes, a primeira amostra a analisar foi incubada 15 minutos à temperatura ambiente e posteriormente analisada no citómetro de fluxo. As amostras foram mantidas à temperatura ambiente e ao abrigo da luz até se proceder à sua análise. A análise das 4 réplicas de cada amostra foi realizada de forma aleatória. A intensidade da fluorescência relativa (FL) dos núcleos marcados com IP foi medida num citómetro de fluxo Beckman-Coulter EPICS-XL (Beckman-Coulter®). Como fonte de excitação foi usado um laser de Argon de 15 mW e a emitir a 488 nm. A fluorescência do IP foi registada através de um filtro dicróico "long-pass" a 645 nm e de um filtro "band-pass" a 620 nm e convertida em 1024 canais. Os resultados foram adquiridos usando o programa SYSTEM II versão 3.0 (Beckman Coulter®). Em cada réplica, sempre que possível, foram analisados pelo menos 5000 núcleos. Os núcleos agregados (dupletos), núcleos parciais, núcleos associados ao citoplasma e outro lixo presente nas amostras, foram eliminados da análise definindo uma região específica no citograma representativo da área vs altura do pico da FL. A análise do ciclo celular foi efectuada no histograma

da fluorescência do IP. Os resultados obtidos directamente do citómetro foram posteriormente analisados usando o programa Cylchred versão 1.0.2 (Cardiff University, UK). Este programa permite uma análise automática do ciclo celular baseado em algoritmos definidos por Watson *et al.* (1987) e Ormerod *et al.* (1987).

Foi também calculado o índice de proliferação celular (IPC) de acordo com a fórmula (Sun *et al.* 2007):

$$\%IPC = \frac{(\%S + \%G_2)}{(\%G_0G_1 + \%S + G_2)}$$

Análise estatística

A análise estatística dos dados foi efectuada usando o programa SigmaStat versão 3.1. Nos ensaios de MTT, a avaliação da existência de diferenças significativas nos valores de absorvância entre o controlo negativo e os extractos foi realizada através de uma análise de variância de uma via (ANOVA), usando o teste paramétrico Dunnett's para a análise entre grupos. As percentagens de inibição da proliferação celular obtidas com os extractos de 24h e de 72h foram comparadas por um teste de t ("unpaired Student's t-test"). Na análise do ciclo celular por FCM e na avaliação do IPC, as diferenças entre os valores obtidos no controlo e nos extractos foram igualmente analisadas usando uma ANOVA, com a comparação entre grupos a ser efectuada através do teste de Dunnett's. Na análise estatística dos resultados do IPC, em alguns casos, houve a necessidade de utilizar o teste de Dunn's que contempla um número diferente de amostras a comparar. Considerou-se que os resultados eram estatisticamente significativos sempre que $p < 0,05$. Todos os dados são expressos como a média \pm desvio padrão (S.D.) da média.

III. RESULTADOS

Análise dos extractos por ICP - AES

O resultado da composição elementar dos extractos dos cimentos C3M e C5M é apresentado na Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Análise por ICP - AES do meio α -MEM (controlo) e dos extractos de 72h dos cimentos C3M e C5M.

Composição elementar dos extractos				
Amostra	P (mgL ⁻¹)	Si (mgL ⁻¹)	Mg (mgL ⁻¹)	Ca (mgL ⁻¹)
Controlo	35,9	< 0,2	21,1	76,5
Extracto 72h C3M	31,8	8,1	23,8	66,8
Extracto 72h C5M	29,2	17,8	35,2	71,1

Verificou-se que após o tempo de extracção, a composição do meio α -MEM sofreu alterações, sobretudo na composição em Si, cuja concentração aumentou em relação ao controlo cerca de 5300,0% no extracto do C3M e 11766,7% no extracto do C5M. A concentração do elemento Mg teve também um incremento de 13,1% e de 67,2% nos extractos dos cimentos C3M e C5M, respectivamente. Relativamente aos outros dois elementos analisados, o P e o Ca, houve um decréscimo da sua concentração nos extractos em relação à do meio α -MEM que não esteve em contacto com os biomateriais.

Avaliação da toxicidade dos cimentos ósseos *in vitro*

Efeito dos extractos no metabolismo celular (ensaio de MTT)

Como foi descrito nos Materiais e Métodos, o efeito dos extractos no crescimento das células MG-63 foi avaliado usando o ensaio de MTT, no qual é originado um produto de cor púrpura que é quantificado fazendo a medição da A_{570} , e cujo valor é directamente proporcional ao número de células viáveis e permite, conseqüentemente, fazer uma avaliação da proliferação celular. Na Figura 3.1 estão representados os valores de absorvância obtidos após a exposição das células MG-63 aos extractos dos cimentos, C0M, C3M e C5M. Na Tabela 3.2 encontra-se calculada a respectiva inibição do crescimento celular como medida da proliferação celular.

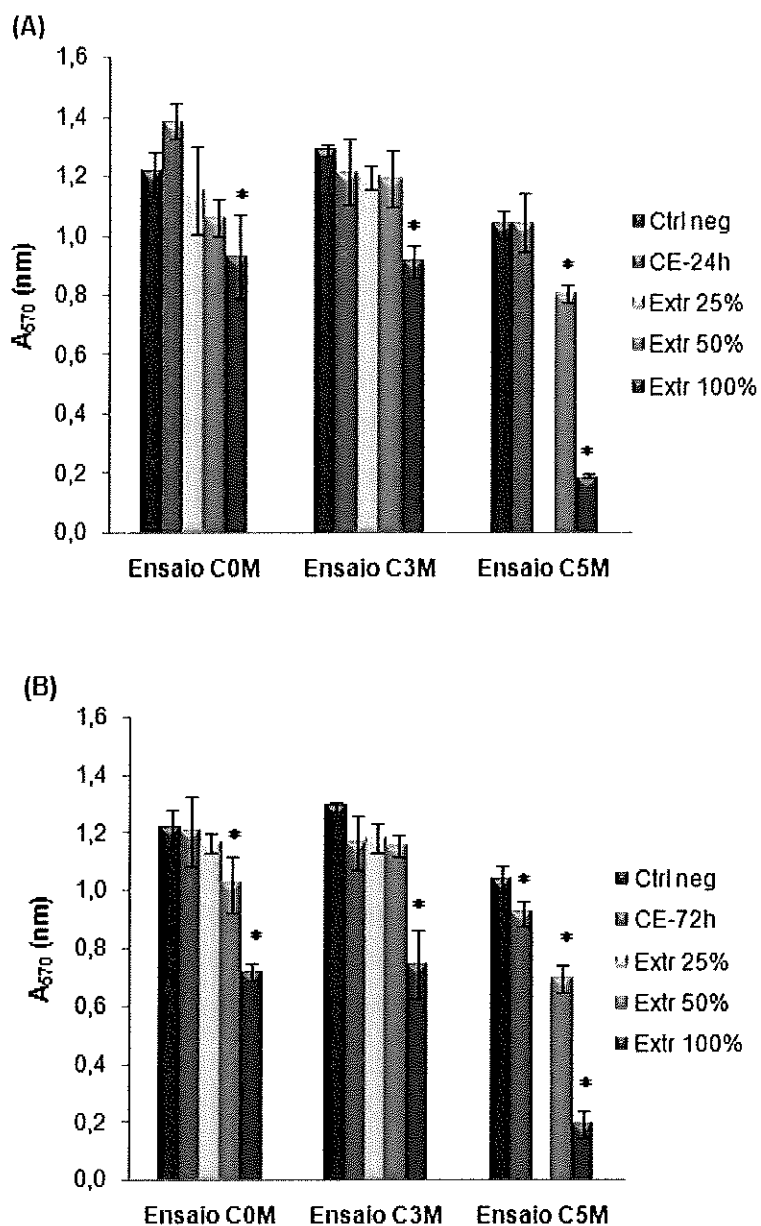


Figura 3.1. Resultados dos ensaios de MTT. Efeito dos extractos dos cimentos ósseos de 24h (A) e de 72h (B) no crescimento das células MG-63 após 72h de exposição. Os valores obtidos nos grupos controlo (Controlo negativo – Ctrl neg e Controlo de extracção – CE-72h) são também apresentados. Os valores representam a média \pm S.D. O símbolo * indica diferenças significativas entre o controlo negativo e as restantes amostras ($p < 0,001$).

Tabela 3.2. Efeito dos extractos de 24h e 72h dos cimentos ósseos no crescimento celular após 72h . São também apresentados os valores determinados para o Controlo de extracção (CE) e para o Controlo positivo (C⁺).

(%) Inibição do crescimento celular						
Amostra	C0M		C3M		C5M	
	24h extracção	72h extracção	24h extracção	72h extracção	24h extracção	72h extracção
CE	0,0 ± 6,0	0,6 ± 12,0	5,9 ± 11,1	9,7 ± 9,7	0,0 ± 9,9	11,4 ± 4,2
Extracto 25%	5,0 ± 14,9	4,1 ± 3,3	7,2 ± 4,0	8,4 ± 5,1	n.d ^a	n.d ^a
Extracto 50%	12,7 ± 6,1	15,9 ± 9,8	7,4 ± 9,6	10,5 ± 3,6	22,5 ± 2,7*	33,4 ± 4,6*
Extracto 100%	23,5 ± 14,1	41,1 ± 3,1	29,1 ± 5,2*	42,3 ± 11,7*	81,5 ± 0,5	81,6 ± 4,5
Extracto Cu 25% (C ⁺)	95,5 ± 1,2					

^a valor não determinado

Os valores representam a média ± S.D.

O símbolo * significa que existem diferenças significativas ($p < 0,05$) no crescimento celular após exposição às diluições de cada extracto quando comparados os dois tempos de extracção (24h vs 72h). O teste estatístico não foi realizado para o grupo CE.

Após as 72h de exposição, o extracto de 24h do cimento C0M, levou a um decréscimo no número de células (Figura 3.1). Esse decréscimo acentuou-se com o aumento da concentração de extracto, apresentando diferenças significativas, em relação ao controlo negativo, apenas quando não foi diluído. A diminuição do número de células traduziu-se numa inibição do crescimento de cerca de 23,5% comparativamente ao controlo negativo (Tabela 3.2). Com o aumento do tempo de extracção para as 72h, verificou-se um maior efeito do extracto do cimento C0M no metabolismo celular. Quando a concentração do extracto era de 50 e 100%, o número de células viáveis apresentou diferenças significativas, relativamente ao controlo negativo, e em termos da inibição do crescimento celular, os efeitos do extracto mais concentrado conduziram a uma diminuição de 41,1% vs o controlo negativo (Tabela 3.2).

Após a exposição das células MG-63 aos extractos de 24h e 72h do cimento C3M, observou-se também uma diminuição da redução do reagente MTT. No entanto, o efeito tóxico dos extractos mostrou ser estatisticamente diferente do controlo negativo, apenas quando as células foram expostas aos extractos não diluídos (Figura 3.1). Estes efeitos levaram à diminuição do crescimento celular em cerca de 29,1% e de 42,3% após a exposição aos extractos (100%) de 24h e de 72h de extracção, respectivamente (Tabela 3.2).

Os extractos do cimento C5M demonstraram ser os mais tóxicos para as células MG-63. Tanto os extractos de 24h como os de 72h, provocaram uma diminuição bastante acentuada no número de células metabolicamente activas. Neste ensaio, as células foram expostas apenas aos extractos não

diluídos e diluídos a 50%. Os valores de absorvância obtidos para ambos os tempos de extracção e para as duas concentrações, mostraram ser significativamente diferentes quando comparados com os valores correspondentes às células cultivadas em meio de cultura (Figura 3.1). A toxicidade do cimento C5M desencadeou uma resposta idêntica das células expostas aos extractos das 24h e das 72h, causando a inibição do metabolismo em cerca de 81,5% das células em contacto com o extracto concentrado de 24h e 81,6% nas células expostas ao extracto de 72h (Tabela 3.2).

O controlo positivo (extracto de cobre) provocou, tal como se esperava, uma elevada redução do número de células capazes de incorporar e metabolizar o MTT, levando a uma inibição média do crescimento celular de cerca de 95,5% (Tabela 3.2). Foi também possível verificar que o facto do meio estar sujeito às condições de extracção (CE), não conduziu a uma resposta significativamente diferente do controlo negativo nos ensaios dos cimentos C0M e C3M. No entanto, no ensaio do cimento C5M, o meio sujeito às 72h de extracção causou uma ligeira toxicidade (11,4%) (Tabela 3.2), que não deverá ser considerado um resultado relevante tendo em conta a resposta celular ao extracto concentrado deste cimento.

Comparando os valores das percentagens de inibição do crescimento celular obtidos com os extractos de 24h e 72h de extracção, verificou-se que no cimento C0M tanto nos extractos concentrados como nos diluídos não houve diferenças estatisticamente significativas ($p \geq 0,05$) na resposta celular. Em relação aos extractos do cimento C3M, foram detectadas diferenças entre a exposição das células aos extractos não diluídos das 24h ou das 72h ($p=0,029$), que não são observadas quando os extractos são diluídos ($p \geq 0,05$). No cimento C5M, os extractos a 100% resultaram numa redução significativa do número de células, independentemente dos dois tempos de extracção ($p=0,983$). No entanto, a resposta das células aos extractos das 24h e das 72h diluídos a 50% foi estatisticamente diferente ($p=0,005$).

Efeitos dos extractos no ciclo celular (ensaio de citometria de fluxo)

Usando a citometria de fluxo fez-se a análise da progressão das células pelas diferentes fases do ciclo celular. Como foi descrito nos Materiais e Métodos usou-se o iodeto de propídio como fluorocromo, que emite fluorescência na zona do vermelho-alaranjado, e a análise foi realizada após as 24h, 48h e 72h de exposição celular aos extractos dos cimentos.

A Figura 3.2 mostra o aspecto morfológico das células MG-63 cultivadas em meio de cultura (Ctrl neg) nos tempos de exposição de 24h e 72h. Ao fim das 24h a maioria das células apresentava uma morfologia semelhante a fibroblastos, encontrando-se dispersas por toda a área do poço.

Eram também visíveis algumas células predominantemente esféricas, que possivelmente correspondiam a células em mitose. Após as 72h, o estado de confluência do poço era de quase 100%, existindo ainda algumas células aparentemente em divisão celular.

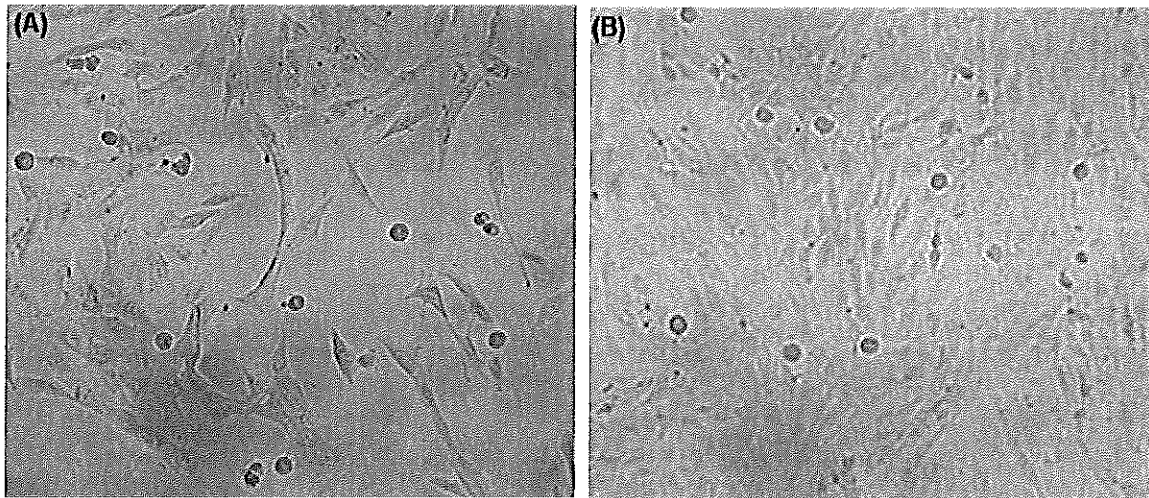


Figura 3.2. Morfologia das células MG-63 cultivadas em meio de cultivo (DMEM) às 24h (A) e às 72h (B) de exposição. Observação em microscópio invertido (ampliação 100x).

Após a exposição das células MG-63 aos extractos, observaram-se algumas alterações no aspecto das culturas quando comparado com as culturas controlo (Figura 3.2). Logo após as 24h de exposição verificou-se que, em qualquer dos cimentos, a densidade celular das culturas expostas aos extractos (100%) era inferior à densidade do controlo negativo. Em todas as amostras eram visíveis células com a morfologia característica de fibroblasto, mas também se observavam células arredondadas com aparentes contornos irregulares.

Às 48h de exposição, o número de células aumentou em todas as amostras, no entanto, este aumento foi mais acentuado nas culturas expostas ao extracto do cimento C0M. Em comparação com as 24h, o número de células arredondadas e de contornos irregulares aumentou de forma geral em todos os tratamentos. Além disso, observaram-se algumas células mortas em suspensão, sobretudo nas culturas expostas aos extractos dos cimentos C3M e C5M.

Ao fim das 72h, as culturas expostas ao extracto não diluído apresentavam uma confluência mais elevada que as culturas expostas aos extractos diluídos, mas inferior à observada no controlo negativo. Após a exposição aos extractos diluídos, tendo no entanto visível um número considerável de células de aspecto arredondado e irregular. Também se observou que, às 72h, o número de células em suspensão nas amostras dos extractos diluídos dos cimentos C3M e C5M era elevado.

Após os vários tempos de exposição e em todos os tratamentos, verificou-se que, com o aumento da diluição dos extractos, as diferenças entre os extractos e as culturas controlo de cultura eram cada vez menos evidentes (resultados não mostrados).

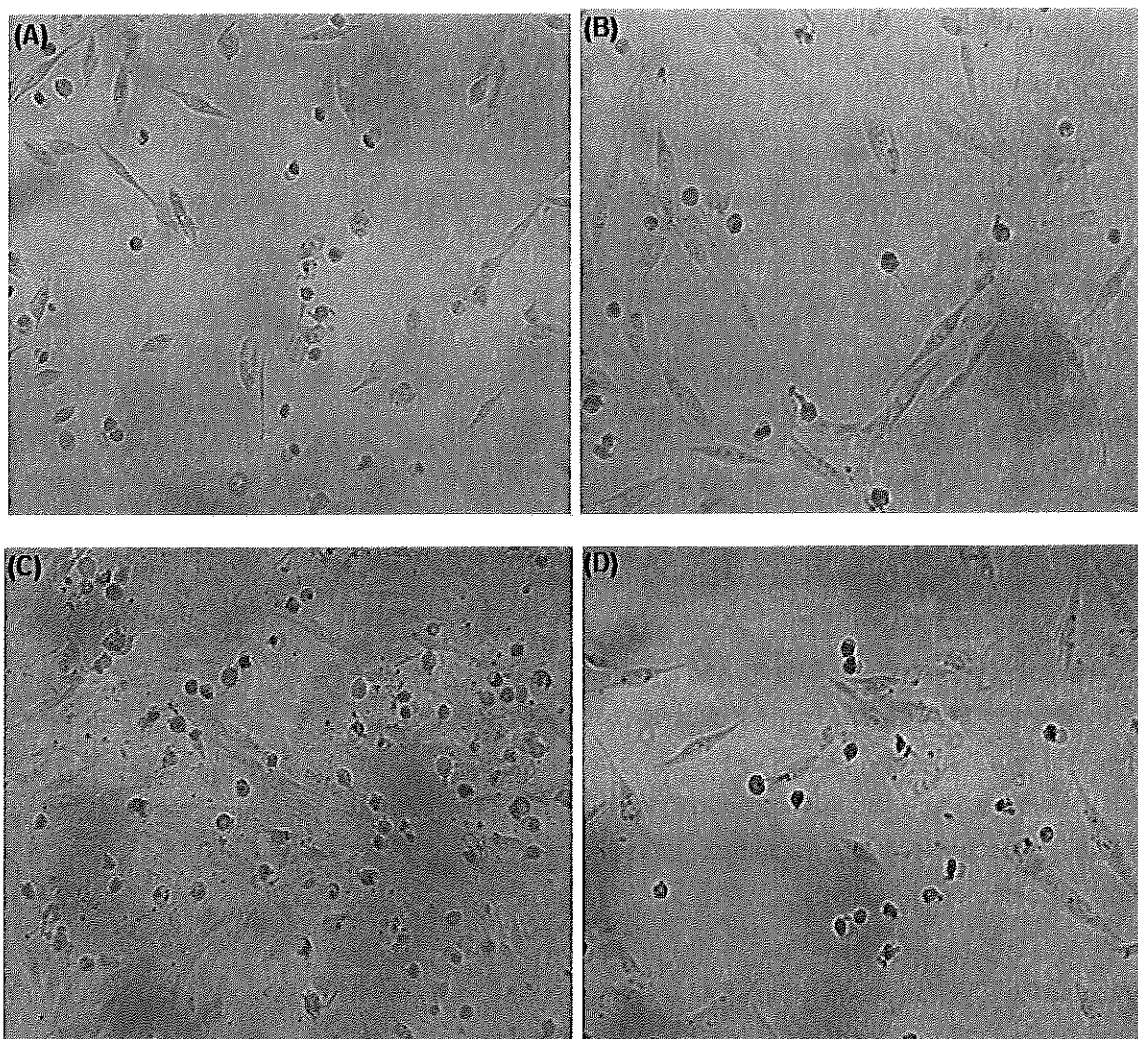


Figura 3.3. Imagens exemplificativas do aspecto morfológico das células MG-63 após o contacto com os extractos dos cimentos C0M e C5M: exposição durante 24h (A) e 72h (C) ao extracto não diluído do cimento C0M; exposição durante 24h (B) e 72h (D) ao extracto não diluído do cimento C5M. Observação em microscópio invertido (ampliação 100x).

Como se encontra evidenciado na Figura 3.4 e como já foi referido nos Materiais e Métodos, antes das análises por citometria de fluxo, os sinais de fluorescência do IP correspondentes a núcleos agregados ou outro lixo, foram eliminados da análise definindo uma região no citograma da área vs altura do pico da FL do IP. De uma maneira geral e mesmo nas amostras dos extractos mais tóxicos, após o tratamento com o tampão o número de núcleos agregados ou outro lixo, como restos celulares, era relativamente baixo, o que de alguma forma demonstra a eficácia do protocolo usado para o isolamento dos núcleos.

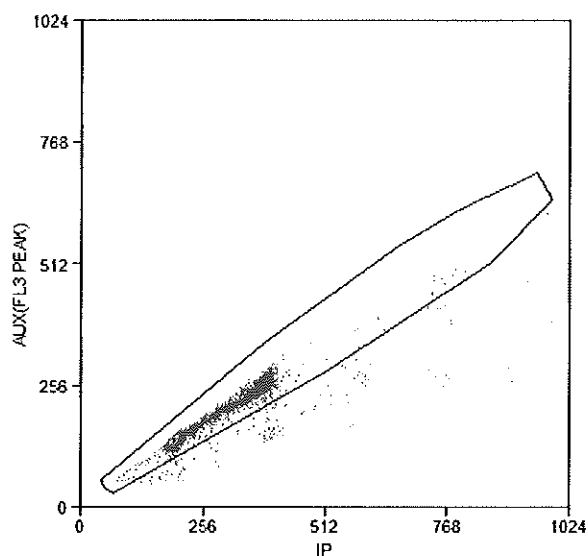


Figura 3.4. Citograma representativo da área vs a altura do pico da intensidade da fluorescência relativa do IP. A linha sólida mostra a área de "gating" seleccionada para excluir da análise o lixo e agregados.

Na Figura 3.5 são apresentados alguns exemplos de histogramas de FL obtidos na análise por citometria de fluxo do ciclo celular das células MG-63 cultivadas em meio de cultura. Os histogramas apresentaram um perfil bem definido, com um pico principal correspondente aos núcleos na fase G_0/G_1 com um conteúdo 2C em DNA e um segundo pico com o dobro da intensidade de fluorescência, correspondente aos núcleos que se encontram na fase G_2 do ciclo celular e que possuem um conteúdo 4C em DNA. Os núcleos que emitem uma fluorescência entre os dois picos têm uma quantidade intermédia de DNA e representam os núcleos na fase S do ciclo celular.

No Anexo III podem ser encontrados outros histogramas exemplificativos dos resultados obtidos após os tratamentos com os extractos dos três cimentos.

A exposição dos osteoblastos às várias diluições dos extractos dos biomateriais, originou histogramas cujo perfil variou não só com o tempo de exposição mas também com a concentração do extracto a que as células estiveram sujeitas, evidenciando uma variação no número de células presentes nas várias fases do ciclo celular associada a estes dois factores.

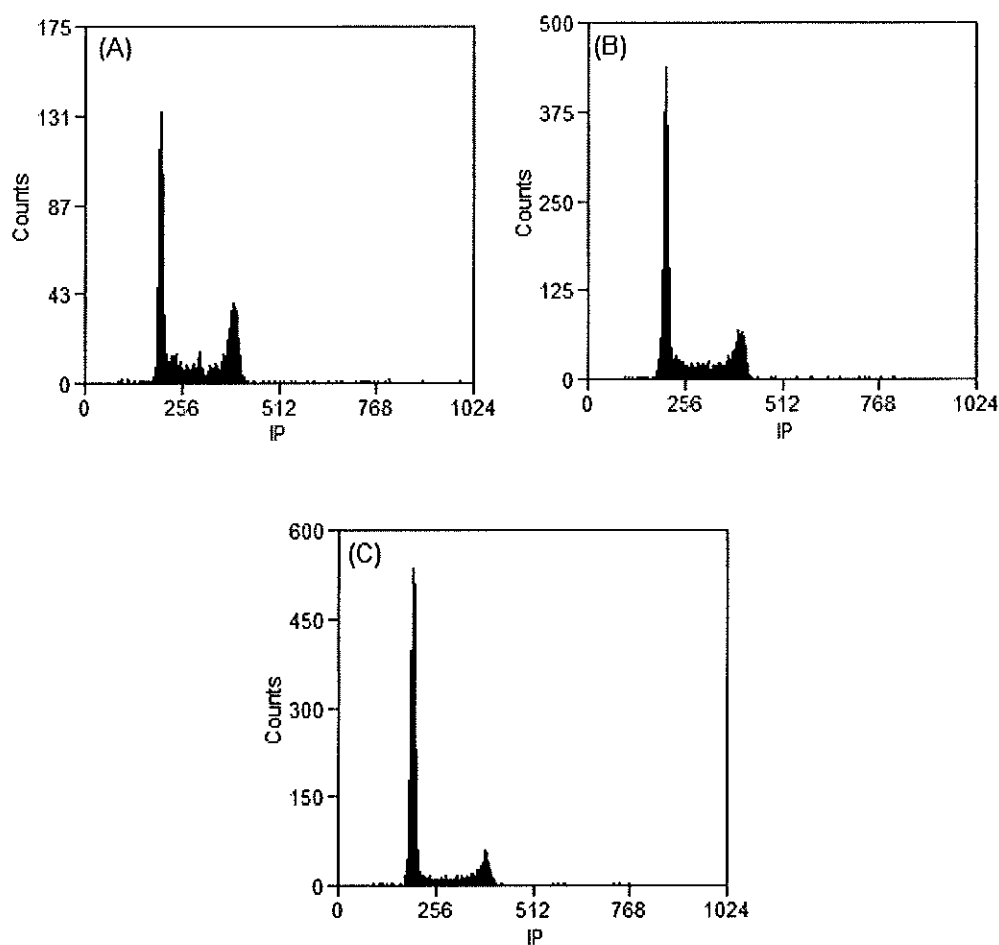


Figura 3.5. Exemplos de histogramas da intensidade da fluorescência relativa do IP obtidos após análise por citometria de fluxo de núcleos isolados das células MG-63 cultivadas em meio de cultura (controlo negativo) às 24h (A), 48h (B) e 72h (C) de exposição.

Os resultados nas Figuras 3.6 a 3.8 mostram a progressão temporal das células MG-63 pelas várias fases do ciclo celular, após exposição às diferentes concentrações dos extractos de cimento em estudo.

Ensaio do cimento COM

A percentagem de células cultivadas em meio de cultura e presentes na fase G_0/G_1 aumentou com o tempo de exposição, atingindo o seu máximo ao fim das 72h (73,0%) quando a cultura estava confluenta. Por outro lado, às 24h de exposição atingiu-se a maior percentagem de células na fase S do ciclo celular (43,0%), tendo este valor diminuído ao longo do tempo. Quanto ao número de células em G_2 não se registaram grandes alterações nas primeiras 48h (12,9% e 12,7%), diminuindo ligeiramente após as 72h (9,9%) de cultura.

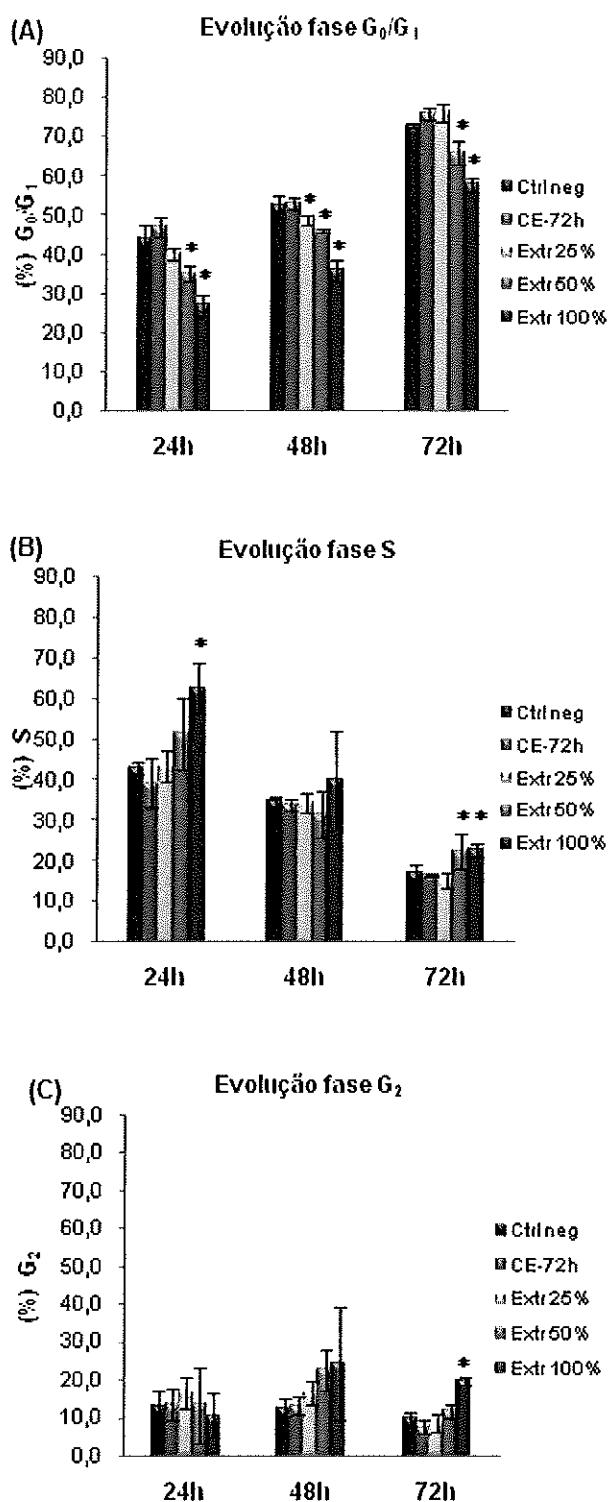


Figura 3.6. Proporção de células expostas às várias diluições de extracto do cimento COM em cada uma das fases do ciclo celular após 24h, 48h e 72h de exposição: (A) G₀/G₁, (B) S, (C) G₂. Os valores obtidos nos grupos controlo (Controlo negativo – Ctrl neg e Controlo de extracção – CE-72h) são também apresentados. Os valores representam a média \pm S.D. O símbolo * indica diferenças significativas entre o Ctrl neg e as restantes amostras ($p < 0,001$) em cada tempo de exposição.

Logo após as 24h de exposição, a proporção de células na fase G_0/G_1 nas culturas expostas ao extracto não diluído do cimento C0M, sofreu uma diminuição estatisticamente significativa ($p < 0,001$) quando comparada com a percentagem destas células no controlo negativo (27,0% vs 44,1%, respectivamente). Essa diferença manteve-se às 48h (35,9% vs 52,8%) e às 72h de exposição (57,8% vs 73,0%). No entanto, ao longo do período de exposição o comportamento das culturas sujeitas aos efeitos do extracto foi semelhante ao das culturas controlo, *i.e.*, houve um aumento da percentagem de células nesta fase do ciclo celular. Quando o extracto foi diluído a 50% verificou-se igualmente que, ao longo das 72h de exposição, existia um menor número de células na fase G_0/G_1 em relação ao controlo negativo. Embora a diferença de valores entre ambas as concentrações seja menos acentuada, continua a ser estatisticamente significativa ($p < 0,001$).

Após as 24h de contacto com o extracto do cimento C0M, houve um aumento significativo ($p < 0,001$) da proporção de células na fase S em relação às culturas controlo (62,4% e 43,0%, respectivamente). Todavia, em ambas as culturas, verificou-se que era ao fim deste tempo de exposição que se atingia o máximo da actividade sintética. Ao longo do período de exposição esta actividade foi diminuindo, sendo que às 72h, nas culturas expostas ao extracto, o número de células na fase S continuava superior ao controlo, embora a diferença entre ambos os ensaios não fosse tão acentuada como a verificada às 24h (22,7% e 17,2%, respectivamente) ($p < 0,001$). Com a diluição dos efeitos do extracto, as alterações no ciclo celular também diminuíram e embora houvessem diferenças, estas só mostraram ser estatisticamente significativas, comparativamente ao controlo negativo, quando o extracto foi diluído a 50% e às 72h de exposição.

Em relação ao efeito do extracto na fase G_2 do ciclo celular, verificou-se que até às 48h as diferenças que existiam não eram estatisticamente significativas, apesar de após 48h de exposição ao extracto concentrado, a percentagem de células em G_2 fosse superior à do controlo negativo (24,3% vs 12,7%, respectivamente). No entanto, só às 72h, a proporção de células em G_2 no extracto não diluído mostrou ser estatisticamente diferente da obtida nas culturas controlo (19,6% vs 9,9%, respectivamente) ($p < 0,001$).

Foi igualmente visível que a exposição do meio às condições de extracção, não provocou alterações no ciclo celular, uma vez que as pequenas diferenças encontradas não foram estatisticamente significativas.

Ensaio do cimento C3M

No ensaio relativo à exposição das células MG-63 ao extracto do cimento com 30% de enchimento de vidro (C3M), o comportamento das células cultivadas em meio de cultura foi idêntico ao obtido no ensaio do cimento C0M. Sendo assim, às 72h a maioria das células encontrava-se na fase G_0/G_1 (71,4%). A percentagem de células em fase S foi diminuindo ao longo do tempo de exposição, passando de 37,2% às 24h para 17,3% às 72h de exposição. Já a proporção de células em G_2 , diminuiu, neste ensaio, entre

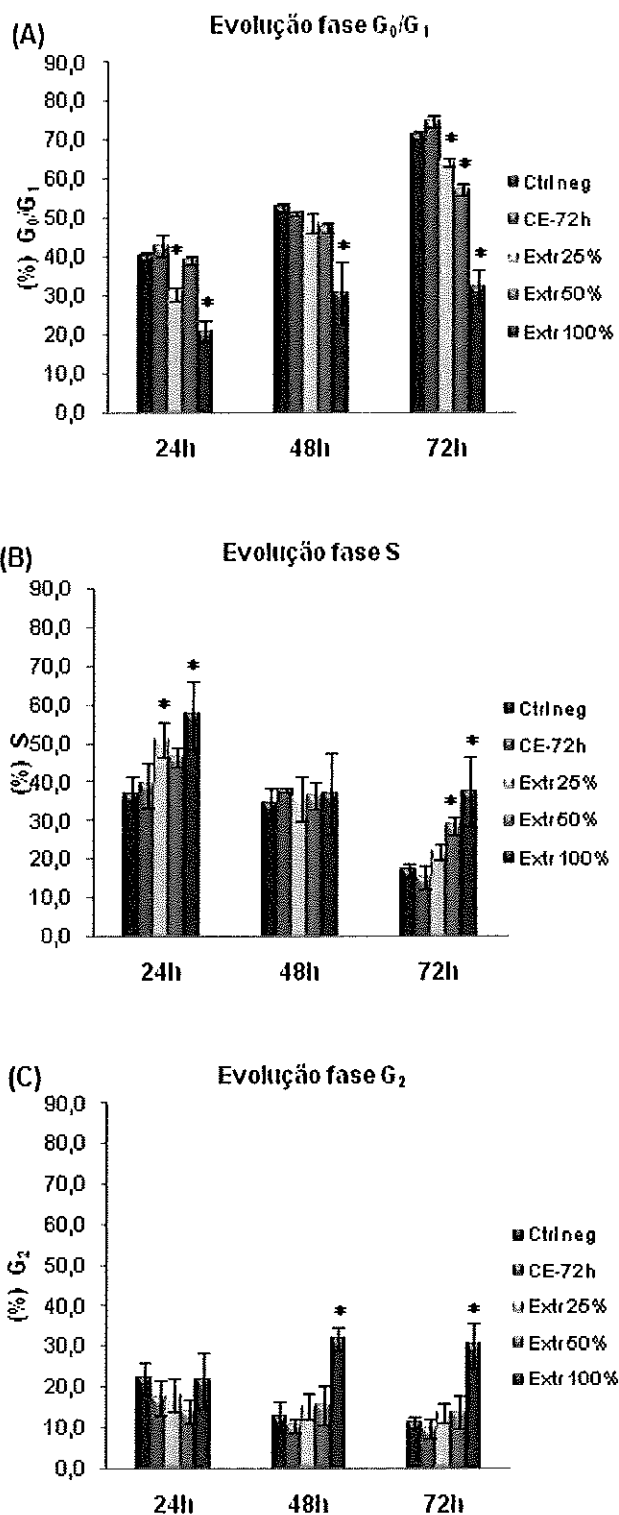
as 24h e as 48h de 22,3% para 12,6%, mantendo-se este valor praticamente inalterável até às 72h (11,2%).

Após a exposição às diferentes concentrações do extracto do cimento C3M, observaram-se algumas alterações do ciclo celular. Nas primeiras 24h, o número de células na fase G_0/G_1 das culturas expostas ao extracto não diluído, foi significativamente inferior ($p < 0,001$) ao observado no controlo negativo (21,1% vs 40,5%, respectivamente), mantendo-se sempre abaixo deste ao longo do tempo de exposição. Contudo, a percentagem de células nesta fase não sofreu grandes alterações ao longo do tempo de análise, sobretudo entre as 48h (31,1%) e as 72h (32,4%). A diluição do extracto diminuiu as diferenças relativamente ao controlo negativo, mas as percentagens mantiveram-se sempre abaixo das observadas neste. Todavia, às 72h, as três concentrações do extracto conduziram a diferenças significativas ($p < 0,001$) na percentagem de células nesta fase em relação à observada no controlo negativo.

Nas primeiras 24h, após a exposição ao extracto concentrado do cimento C3M, a diminuição da percentagem de células na fase G_0/G_1 foi acompanhada por um aumento significativo no número de células na fase S em comparação com as culturas controlo (57,5% e 37,2%, respectivamente) ($p < 0,001$). Às 48h as variações observadas, em qualquer das concentrações de extracto, da percentagem de células em actividade sintética não eram estatisticamente diferentes do controlo negativo ($p = 0,921$). Além disso, como já se tinha verificado para as células que se encontravam na fase G_0/G_1 , entre as 48h e as 72h não houve uma alteração significativa no número de células na fase S expostas ao extracto concentrado (37,1% e 37,4%, respectivamente), embora às 72h este valor fosse significativamente diferente do valor observado nas culturas controlo ($p < 0,001$).

O extracto concentrado do cimento C3M só originou alterações estatisticamente significativas na proporção de células na fase G_2 após as 48h de exposição, observando-se um aumento do número de células quando comparado com o controlo negativo (31,9% vs 12,6%, respectivamente) ($p < 0,001$). Às 72h, a percentagem de células em G_2 manteve-se quase inalterável, como aliás já se tinha verificado nas outras fases do ciclo celular. Ao longo do tempo de exposição, as diluições do extracto não desencadearam respostas celulares estatisticamente diferentes do controlo negativo.

Tal como no ensaio anterior, as condições de extracção não induziram alterações significativas no ciclo celular.



Figuras 3.7. Proporção de células expostas às várias diluições de extracto do cimento C3M em cada uma das fases do ciclo celular após 24h, 48h e 72h de exposição: (A) G₀/G₁, (B) S, (C) G₂. Os valores obtidos nos grupos controlo (Controlo negativo – Ctrl neg e Controlo de extração – CE-72h) são também apresentados. Os valores representam a média ± S.D. O símbolo * indica diferenças significativas entre o Ctrl neg e as restantes amostras ($p < 0,001$) em cada tempo de exposição.

Ensaio do cimento C5M

Neste ensaio as células do controlo negativo tiveram um perfil de divisão semelhante ao que já se tinha observado nos ensaios dos outros cimentos. A percentagem de células em G_0/G_1 aumentou ao longo do tempo e às 72h, 74,6% das células encontrava-se nesta fase do ciclo celular. O número de células na fase S manteve-se quase constante nas primeiras 48h, atingindo os 37,7% às 24h e os 36,2% às 48h, sofrendo uma diminuição mais acentuada às 72h quando apenas 16,7% das células se encontravam nesta fase. A proporção de células em G_2 , diminuiu com o tempo de exposição passando de 18,5% às 24h para 8,7% às 72h.

Os osteoblastos expostos às três concentrações do extracto do cimento C5M mostraram também alterações ao nível da sua divisão celular. Às 24h cerca de 34,0% das células expostas à concentração mais elevada do extracto encontrava-se na fase G_0/G_1 . Esta proporção foi aumentando ao longo do tempo atingindo os 59,7% às 72h de exposição. Como já se tinha verificado nos ensaios anteriores, o número de células em G_0/G_1 nas culturas expostas ao extracto não diluído foi significativamente inferior ao observado no controlo negativo ($p < 0,001$) em todos os períodos de exposição. Após as primeiras 24h, verificou-se ainda que para qualquer uma das três concentrações do extracto, a percentagem de células em G_0/G_1 foi significativamente inferior ($p < 0,001$) à obtida no controlo, apesar de não ser esperado um efeito tão significativo na diluição a 25%. No entanto, estas diferenças foram atenuadas nos tempos de análise posteriores.

No que diz respeito à fase S, às 24h, nas culturas expostas ao extracto não diluído, a percentagem de células nesta fase (38,1%) era ligeiramente superior à que se encontrava em G_0/G_1 . As restantes concentrações do extracto originaram uma resposta muito idêntica à observada na concentração mais elevada, sendo que nestas as variações foram estatisticamente diferentes do controlo negativo ($p = 0,006$). Das 24h para as 48h a proporção de células em actividade sintética não sofreu uma grande variação nos diferentes extractos. Contudo, às 72h houve uma redução do número de células na fase S expostas ao extracto concentrado do cimento, tendo a sua percentagem decrescido de 38,0% para 23,1%.

Após as 24h de exposição ao extracto concentrado, a percentagem de células na fase que antecede a mitose (a fase G_2) aumentou em relação ao controlo negativo, não tendo sido este aumento estatisticamente significativo (27,9% vs 18,5%, respectivamente) ($p = 0,060$). O número de células em G_2 sofreu uma diminuição às 48h para 16,2%, mantendo-se este valor quase inalterável às 72h (17,2%). Ambos os valores são significativamente superiores aos observados no controlo negativo nestes tempos de exposição. Ao longo do período de exposição, com a diluição dos extractos não se registaram diferenças significativas, comparativamente ao controlo negativo, na percentagem de células nesta fase.

Neste ensaio, as células cultivadas no meio sujeito às condições de extracção (CE-72h) apresentaram, em alguns tempos e algumas fases do ciclo celular, alterações estatisticamente significativas face aos resultados obtidos para o controlo negativo (Figura 3.8 A e B). No entanto, é de realçar que são

alterações contrárias às que se registaram na exposição ao extracto a 100%. Por conseguinte, considerou-se que as condições de extracção não terão influenciado os resultados, como se observou para os outros cimentos.

Variação do Índice de proliferação celular (IPC)

Para uma melhor interpretação dos resultados, calculou-se o IPC das diferentes culturas em cada um dos tempos de análise. O IPC é uma medida da percentagem de células que deixaram a fase G_0/G_1 e entraram na fase de síntese de DNA e na fase G_2 . As células que se encontram nestas fases são aquelas que, por as condições lhes serem favoráveis, prosseguiram o ciclo celular, iniciando a síntese de DNA (fase S), podendo completar o ciclo celular avançando para a fase G_2 e posterior divisão celular (fase M), resultando num aumento da população celular. Os resultados obtidos são apresentados nas Figuras 3.9 a 3.11.

Como era espectável, os valores dos IPCs observados nas culturas crescidas em meio de cultura, foram idênticos em cada um dos ensaios realizados separadamente para cada cimento estudado. Ao longo do tempo, o IPC foi diminuindo, o que era de esperar, com o aumento do estado de confluência das culturas e com o conseqüente esgotamento dos nutrientes do meio.

Como já foi referido, os extractos dos três cimentos causaram algumas alterações no ciclo celular, que também são evidentes na variação dos respectivos índices de proliferação celular. De uma forma geral, os efeitos dos extractos levaram a um aumento do número de células nas fases S e G_2 e conseqüente diminuição na fase G_0/G_1 , resultando em IPCs mais elevados. Os valores de IPC dos vários ensaios encontram-se no Anexo III.

O extracto do cimento C0M provocou um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,001$) do IPC, não só na sua concentração mais elevada, mas também quando os seus efeitos foram diluídos a 50%. Observou-se, tal como no controlo, uma diminuição das células proliferativas ao longo do tempo, sendo esta mais evidente entre as 48h e as 72h (Figura 3.9).

O efeito do extracto concentrado do cimento C3M, na proporção das células nas fases S e G_2 resultou nas primeiras 48h em IPCs significativamente superiores ($p < 0,05$) aos das células cultivadas em meio de cultura. No entanto, às 72h as diferenças estenderam-se também às restantes concentrações do extracto ($p < 0,001$). Todavia, verificou-se que o índice de proliferação das células expostas ao extracto não diluído quase não variou entre os dois últimos tempos de análise (Figura 3.10).

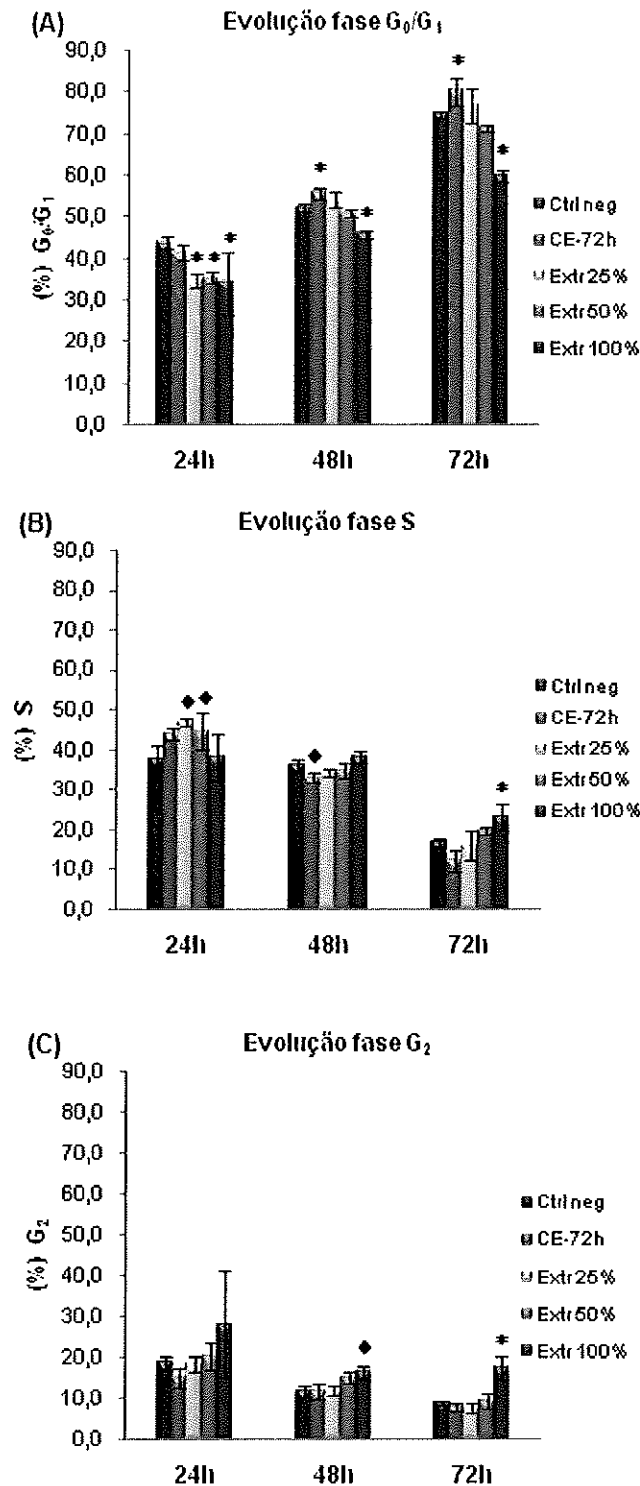


Figura 3.8. Proporção de células expostas às várias diluições de extracto do cimento C5M em cada uma das fases do ciclo celular após 24h, 48h e 72h de exposição: (A) G₀/G₁, (B) S, (C) G₂. Os valores obtidos nos grupos controlo (Controlo negativo – Ctrl neg e Controlo de extracção – CE-72h) são também apresentados. Os valores representam a média ± S.D. Os símbolos indicam diferenças significativas entre o Ctrl neg e as restantes amostras (* $p < 0,001$, ♦ $p < 0,01$) em cada tempo de exposição.

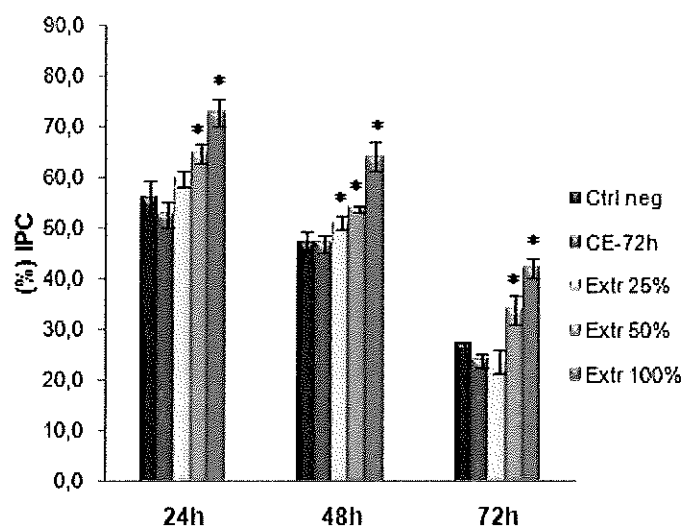


Figura 3.9. Variação do índice de proliferação celular (IPC em %) após os vários tempos de exposição das células MG-63 às diluições do extracto do cimento C0M. Os valores obtidos nos grupos controlo (Controlo negativo – Ctrl neg e Controlo de extracção – CE-72h) são também apresentados. Os valores representam a média \pm S.D. O símbolo * indica diferenças significativas entre o Ctrl neg e as restantes amostras ($p < 0,001$) em cada tempo de exposição.

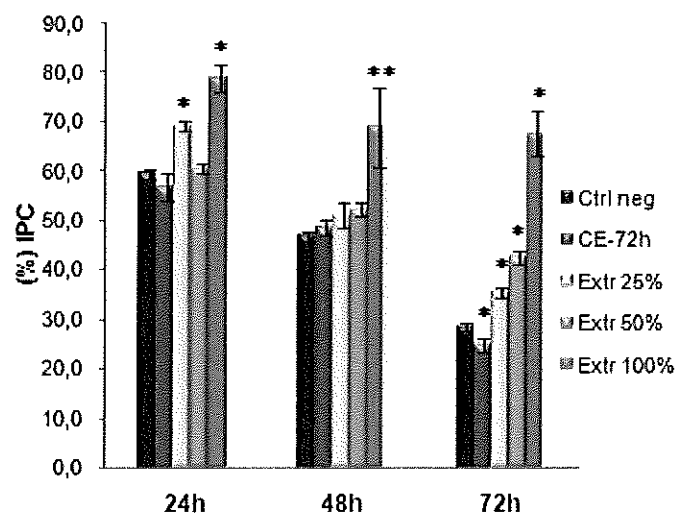


Figura 3.10. Variação do índice de proliferação celular (IPC em %) após os vários tempos de exposição das células MG-63 às diluições do extracto do cimento C3M. Os valores obtidos nos grupos controlo (Controlo negativo – Ctrl neg e Controlo de extracção – CE-72h) são também apresentados. Os valores representam a média \pm S.D. Os símbolos indicam diferenças significativas entre o Ctrl neg e as restantes amostras (* $p < 0,001$; ** $p < 0,05$) em cada tempo de exposição.

Em relação ao cimento C5M, nas primeiras 24h de exposição às várias concentrações de extracto, não foram registadas alterações significativas do IPC. Embora após 48h de exposição se tenham observado alterações estatisticamente diferentes do controlo negativo ($p < 0,001$), só às 72h os valores de IPC dos extractos registaram um aumento evidente face ao grupo controlo, salientando-se as diferenças significativas ($p < 0,05$) obtidas nos extractos concentrado e diluído a 50% (Figura 3.11). Finalmente é de notar que, sobretudo nas primeiras 48h, o IPC das culturas expostas ao cimento C5M foi inferior ao que se observou nos outros dois cimentos (Figuras 3.9 a 3.11).

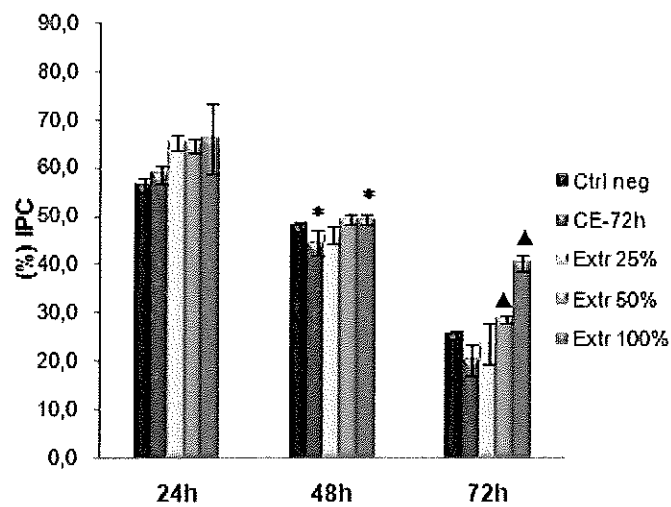


Figura 3.11. Variação do Índice de proliferação celular (IPC em %) após os vários tempos de exposição das células MG-63 às diluições do extracto do cimento C5M. Os valores obtidos nos grupos controlo (Controlo negativo – Ctrl neg e Controlo de extração – CE-72h) são também apresentados. Os valores representam a média \pm S.D. Os símbolos indicam diferenças significativas entre o Ctrl neg e as restantes amostras (* $p < 0,001$; ▲ $p < 0,05$) em cada tempo de exposição.

IV. DISCUSSÃO

A biocompatibilidade de um biomaterial é um parâmetro que deve ser exaustivamente estudado antes de este poder ser aplicado no organismo humano. Embora ambas as avaliações *in vivo* e *in vitro* sejam bastante importantes, a primeira é mais difícil de testar. Os ensaios *in vivo* envolvem, geralmente, a implantação dos materiais e os resultados são obtidos a longo prazo, para além de que é mais difícil a quantificação de processos celulares específicos. Pelo contrário, nos ensaios *in vitro* é possível avaliar de forma reprodutível, controlada e num curto espaço de tempo a resposta celular. Por estas razões, é frequente o estudo da biocompatibilidade de um material se iniciar com ensaios *in vitro*.

Neste trabalho, foi avaliada a toxicidade *in vitro* dos extractos de cimentos com base no copolímero PMMA-co-EHA e determinou-se qual o seu efeito na viabilidade celular pelo ensaio de MTT e na progressão das células pelas diferentes fases do ciclo celular usando a FCM.

Os resultados do ensaio de MTT mostraram que houve uma diminuição da viabilidade celular, indicando que a actividade mitocondrial foi afectada na presença dos extractos de 24h e 72h dos três cimentos em avaliação. Contudo, a extensão do efeito dos elementos que se libertaram durante o processo de extracção, foi diferente consoante o cimento. Os extractos dos cimentos C0M e C3M desencadearam respostas semelhantes por parte das células MG-63, ao passo que a resposta ao extracto do cimento C5M foi bastante diferente, o que parece indicar que ou os elementos presentes neste extracto são distintos dos demais, ou que, sendo semelhantes, encontram-se em concentrações diferentes.

Atendendo ao seu uso frequente, os cimentos comerciais de base acrílica têm sido alvo de vários estudos de avaliação da sua toxicidade *in vitro* (e.g., Ciapetti *et al.* 2000, Gough e Downes 2001, Granchi *et al.* 1995). Mas, embora os cimentos comerciais sejam também uma mistura de componentes sólidos e líquidos, da qual fazem parte o PMMA pré polimerizado, monómeros de MMA, um activador (e.g., DMPT) e um iniciador como o BPO, a maioria possui também outros constituintes. Além disso, existem outras diferenças dos cimentos estudados comparativamente aos comerciais, como o facto de a matriz não ser constituída apenas por monómeros de MMA, mas por uma mistura destes com monómeros de EHA (na proporção 1:1) e de dois dos cimentos apresentarem enchimento com vidro. Assim, e tendo em conta igualmente que os três cimentos estudados, no âmbito desta dissertação, têm uma composição de base mais simples, a comparação dos resultados obtidos nestes trabalhos com os obtidos aqui deve ser efectuada com precaução. A toxicidade dos monómeros de MMA residuais, *i.e.*, que não reagem, assim como a de outros aditivos, como o DMPT ou BPO, já foi previamente demonstrada (Ciapetti *et al.* 2000, Gough e Downes 2001, Stea *et al.* 1997). No entanto,

estes trabalhos verificaram que a toxicidade dos cimentos está inversamente relacionada com o tempo que decorre desde a sua polimerização. Stea *et al.* (1997) observaram que, sete dias após a polimerização, a concentração de DMPT libertada de cimentos ósseos comerciais era quase nula. Além disso, mostraram também que o cimento com maior concentração de activador (2,60%; v/v) e sujeito ao processo de extracção 24h após a polimerização, conduziu a uma inibição da proliferação celular de apenas 18,2%. Ciapetti *et al.* (2000) obtiveram resultados concordantes relativamente ao DMPT e verificaram também que não existia uma correlação entre o grau de toxicidade e a quantidade inicial de DMPT ou de BPO. Estes autores mostraram igualmente que a toxicidade dos cimentos com um conteúdo elevado de BPO (3,0% ou 2,0%; m/m) desaparece ao fim de alguns dias quando os cimentos são deixados em atmosfera normal após a polimerização. Assim, no caso dos cimentos usados neste trabalho, cujo fabrico já tinha sido efectuado há alguns meses, não são espectáveis quantidades significativas destes elementos nos extractos, sendo pouco provável que sejam estes os elementos responsáveis pela toxicidade observada.

O uso de EHA no fabrico de biomateriais não é comum e por isso não são conhecidos estudos sobre a citotoxicidade dos monómeros de EHA neste contexto. A avaliação da toxicidade do composto revelou que o EHA não induziu mutações pontuais nos testes bacterianos, mas nos ensaios realizados em células de mamíferos, os resultados foram positivos sobretudo nas concentrações que provocaram uma clara citotoxicidade (http://ecb.jrc.it/documents/Existing-Chemicals/RISK_ASSESSMENT/SUMMARY/2ehasum058.pdf). Contudo, tendo em conta a informação disponível, o Comité Científico em Toxicidade, Ecotoxicidade e Ambiente não considera o EHA um composto mutagénico *in vivo* (http://ecb.jrc.it/documents/Existing-Chemicals/RISK_ASSESSMENT/SUMMARY/2ehasum058.pdf).

Entre os factores que podem ter tido alguma influência nos resultados obtidos podem incluir-se: o efeito da coexistência dos monómeros de MMA e de EHA na eficiência da polimerização, com a possível existência de monómeros livres; e a interacção do vidro com o copolímero (nos cimentos que possuem enchimento deste tipo). Ainda assim, e mais uma vez devido à inexistência de estudos anteriores, não é possível atribuir a toxicidade observada a algum destes factores em particular.

Os resultados do ensaio de MTT permitiram verificar que o copolímero por si só (C0M) deverá libertar elementos para o meio de cultura que afectam a actividade metabólica das células ao fim de 72h de exposição. Verificou-se também que, o enchimento com 30% de vidro VH1 (C3M) não desencadeia uma resposta muito diferente da do copolímero, mas com o aumento da percentagem para 50%, existem efeitos mais nocivos para o metabolismo das células MG-63. Efectivamente, a análise por ICP revelou que as maiores diferenças comparativamente ao controlo, observaram-se no extracto do cimento C5M, que registou um aumento na concentração do elemento Si e, em menor percentagem, do elemento Mg. A diminuição observada na concentração dos elementos Ca e P, poderá estar

relacionada com o consumo destes íons para formação da camada de hidroxiapatite, sinónimo de bioactividade *in vitro*, previamente verificada em SBF (Corbellini 2006).

A toxicidade observada após exposição dos osteoblastos aos extractos dos cimentos com enchimento de vidro não se encontra de acordo com alguns estudos publicados (*e.g.*, Josset *et al.* 2003, Nayab *et al.* 2007, Xynos *et al.* 2000a). Relativamente à influência da concentração extracelular de cálcio na proliferação e diferenciação de osteoblastos, são vários os trabalhos que apresentam conclusões divergentes entre si, o que talvez possa ser explicado pela utilização de células de diversas origens e em vários estádios de maturação (*in* Eklou-Kalonji *et al.* 1998). Contudo, Farley *et al.* (1994) observaram que, uma concentração baixa em cálcio (0,2 mM) estimulava a proliferação celular da linha de osteoblastos humanos SaOS-2 (derivada de um osteossarcoma) (*in* Eklou-Kalonji *et al.* 1998). Também Xynos *et al.* (2000a) mostraram que o extracto do vidro comercial Bioglass® 45S5 provocava um aumento do número de osteoblastos quando comparado com culturas controlo. No entanto, na presente dissertação verificou-se que o extracto do cimento C5M, com uma concentração em Si e P semelhante à determinada no trabalho destes autores levou ao decréscimo da população, embora se tenha de ter em consideração que as condições experimentais e a composição dos dois vidros são distintas. Portanto, tendo em conta a informação disponível e a complexidade dos biomateriais estudados, apenas se pode inferir que, possivelmente, a toxicidade dos cimentos não resulta de um factor em particular, mas da interacção de vários factores. E ainda que, a elevada toxicidade observada no cimento C5M pode estar eventualmente relacionada com o papel indirecto dos íons do vidro neste efeito.

Apesar de nos ensaios de MTT terem existido diferenças na resposta dos osteoblastos aos extractos de 24h e de 72h, nos ensaios da análise do ciclo celular apenas se expuseram as células a estes últimos, quer por uma questão de disponibilidade do biomaterial, quer por ter sido o extracto que mostrou ser mais tóxico.

No ensaio de análise do ciclo celular por FCM, os osteoblastos expostos ao extracto concentrado do cimento C0M apresentaram um aumento da fase de síntese de DNA em relação ao controlo, logo após as primeiras 24h. Aparentemente, este resultado indica que este biomaterial promove a proliferação celular, tal como se confirmou com o cálculo do IPC. Contudo, no fim do tempo de exposição e apesar de existir este aumento do índice de proliferação, não foi observável um número de células superior ao das culturas controlo, o que está de acordo com os resultados do ensaio de MTT. Este resultado, pode ser explicado com o facto de ter existido uma percentagem elevada de células que sofreu danos irreversíveis que conduziram à sua morte, sobretudo nas primeiras 48h de exposição. Assim, aparentemente as células que se mantiveram metabolicamente activas foram capazes de se dividir normalmente, o que resultou num aumento mais acentuado na confluência das culturas no terceiro dia de exposição. No entanto, o facto de após este período, as amostras

continuarem a exibir uma confluência inferior à do controlo, pode explicar a percentagem mais elevada de células na fase S do ciclo celular observada naquelas culturas.

O extracto do cimento C3M desencadeou uma resposta semelhante à do cimento C0M nas primeiras 24h, ou seja, provocou um aumento da proporção de células na fase S comparativamente ao controlo, o que indicia também a capacidade de estimular a proliferação celular. No entanto, nos tempos de análise subsequentes, o número de células em actividade de síntese quase não variou. Observou-se igualmente que a percentagem de células nas fases G_0/G_1 e G_2 se manteve praticamente constante durante o período de exposição. Este resultado leva-nos a especular sobre a possível ocorrência de um bloqueio do ciclo celular em qualquer uma destas fases. Estes bloqueios estão habitualmente associados a uma avaliação das condições extracelulares, em que só quando existem condições favoráveis, as células prosseguem e completam o ciclo celular (Golias *et al.* 2004, Johnson e Walker 1999). Os resultados obtidos por citometria de fluxo foram confirmados pela observação microscópica, em que se verificou que nos dois últimos tempos de incubação o grau de confluência praticamente não aumentou. Além disso, o número de células em suspensão era elevado e a confluência das culturas expostas ao extracto não diluído era muito inferior à observada no controlo, o que por si só indica que para além do bloqueio terá havido um número elevado de células que morreram. Atendendo aos resultados do ensaio de MTT, não seria de esperar uma diferença tão marcada na confluência das culturas às 72h de exposição, uma vez que a inibição do crescimento dos osteoblastos, expostos ao extracto concentrado deste cimento, rondou os 42,3%. A variabilidade observada nestes parâmetros suporta a necessidade de confirmação deste resultado em particular.

Nas primeiras 48h de exposição dos osteoblastos ao extracto do cimento C5M não se verificou, em relação ao controlo, um aumento no índice de proliferação tão significativo como o que se observou nos outros dois cimentos. A proporção de células na fase S do ciclo celular manteve valores próximos dos do controlo, apesar de este ser o cimento com maior percentagem de vidro e que demonstrou ser bioactivo em SBF (Corbellini 2006). Estes resultados podem indicar que o possível efeito, já referido, dos iões Si^{4+} do vidro no aumento da proliferação celular (Xynos *et al.* 2000a) pode estar a ser diminuído por uma interacção com outro componente do cimento. Tal como nos cimentos C0M e C3M, um aumento do IPC não se encontrou relacionado com um aumento na confluência das culturas em relação ao controlo. As observações microscópicas revelaram um número bastante elevado de células em suspensão, que terão resultado da morte celular devido aos efeitos tóxicos do extracto, e que terão contribuído para o nível baixo de confluência das culturas. Às 72h, contudo, o valor do IPC distanciou-se do valor calculado para as células cultivadas em meio de cultura, tendo sofrido um aumento significativo, que teve reflexos no aumento do número de células aderidas, relativamente ao período imediatamente anterior. Ainda assim, a confluência continuou a ser bastante inferior à que foi observada no grupo controlo. Tal como no cimento C0M, tudo indica que parte da população de

osteoblastos, que no cimento C5M é superior à do C0M, sofreu morte celular, mas que as células que foram capazes de sobreviver continuaram a dividir-se. Um estudo anterior de Xynos *et al.* (2000b), mostrou que quando uma cultura primária de osteoblastos era cultivada directamente sobre a superfície do vidro comercial Bioglass[®] 45S5, existia uma percentagem elevada de células apoptóticas que prevalecia até ao dia 6. Só após 12 dias de exposição foi observado um aumento efectivo do número de células nas culturas. Os autores sugeriram que a disparidade entre o estímulo da síntese de DNA, logo a seguir à exposição ao substrato bioactivo, e a não progressão para a mitose, pode estar associada com o facto de existir uma população que sofre morte celular em favorecimento de uma subpopulação que se pode adaptar melhor ao ambiente químico do meio. Apesar de se tratar de um sistema celular e biomateriais diferentes, pode ser que estejamos perante uma resposta idêntica por parte das células MG-63 aos extractos dos cimentos C0M e C5M.

Um dos objectivos desta dissertação era implementar as técnicas necessárias à manutenção da linha celular MG-63, objectivo este que foi alcançado com sucesso. Depois de estabelecidos os procedimentos para a manutenção desta linha, desenvolveram-se métodos de avaliação da toxicidade dos extractos dos cimentos, que consistiram no método do MTT e na utilização da FCM para a análise do ciclo celular após a exposição. Se o primeiro é um método de referência na área dos biomateriais, a FCM surge como uma técnica pouco usual, mas bastante inovadora. Antes de ser aplicado nos ensaios, o protocolo de FCM usado neste estudo foi testado de modo a averiguar se os resultados seriam equivalentes aos obtidos com um protocolo anteriormente descrito por Lopes *et al.* (1998) usando também a linha celular MG-63. Verificou-se que os resultados (percentagem de células nas diferentes fases do ciclo celular, C.V) obtidos pelos dois métodos foram semelhantes (resultados não mostrados). Assim, a escolha recaiu sobre este novo protocolo, que é mais simples e por envolver menos passos se torna adequado quando a densidade celular é baixa. Os resultados obtidos nesta dissertação e a reprodutibilidade observada entre ensaios, vieram confirmar a eficiência do protocolo de FCM desenvolvido e mostraram que este pode ser uma alternativa a aplicar neste tipo de estudos.

Em conclusão, estes resultados mostram que os novos cimentos com base no copolímero PMMA-co-EHA apresentam alguma toxicidade, que é mais notória quando a matriz é reforçada com 50% de vidro VH1. Contudo, pela análise do ciclo celular verifica-se que, as células que são capazes de ultrapassar os efeitos tóxicos dos cimentos C0M e C5M, continuam a proliferar. No caso do cimento C0M, ao fim das 72h de exposição, observa-se inclusive que os valores de confluência da cultura exposta ao extracto não diluído se aproximam dos do controlo. Assim, com este estudo e tendo também em consideração alguns ensaios de propriedades mecânicas já realizados pelo laboratório de biomateriais, pode deduzir-se que sobretudo o cimento C0M, com a toxicidade mais baixa, tem potencial para ser usado como cimento ósseo na junção de implantes ao osso.

V. PERSPECTIVAS FUTURAS

No seguimento deste trabalho e com o objectivo de consolidar algumas das deduções feitas, podem perspectivar-se vários trabalhos futuros.

A avaliação isolada da toxicidade de cada um dos componentes nas mesmas condições que foram analisados os cimentos, aparece como um estudo importante para tentar entender se a toxicidade dos cimentos é devida a um componente em particular ou à acção conjunta de vários elementos. Um estudo deste tipo permitiria produzir cimentos com diferentes percentagens dos vários constituintes, que garantissem o melhor compromisso entre as propriedades biológicas e mecânicas do biomaterial.

Seria também interessante realizar ensaios usando o contacto directo como método de exposição. Este método permitiria verificar se existe adesão celular aos cimentos ósseos, assim como avaliar a morfologia das células e a sua capacidade de proliferar na superfície do biomaterial.

Atendendo aos resultados, seria igualmente importante tentar perceber se ao longo da exposição se detectam sinais característicos de apoptose, como a alteração do potencial de membrana ou a degradação da estrutura da cromatina, ensaios estes que poderiam ser realizados usando marcação múltipla e detecção de fluorescência utilizando a citometria de fluxo.

Finalmente, na perspectiva de fazer uma análise ainda mais completa da biocompatibilidade dos cimentos, poderá usar-se a citometria de fluxo, para analisar a expressão de proteínas constituintes da matriz extracelular dos osteoblastos, como a osteocalcina, fibronectina ou colagénio tipo I, após a exposição das células ao biomaterial e assim avaliar que alterações ocorrem no seu fenótipo.

REFERÊNCIAS

- Azevedo C (1999) *Biologia Celular e Molecular* (3ªed) Lidel - Edições Técnicas, Lisboa.
- Bettencourt A, Calado A, Amaral J, vale FM, Rico JMT, Monteiro J, Lopes A, Pereira L, Castro M (2000) *In vitro* release studies of methylmethacrylate liberation from acrylic cement powder. *Int J Pharm* **197**: 161-168.
- Bhogal N, Grindon C, Combes R, Balls M (2005) Toxicity testing: creating a revolution based on new technologies. *Trends in Biotech* **23**: 299-307.
- Bonewald L (2006) Osteocytes as multifunctional cells. *J Musculoskelet Neuronal Interact* **6**: 331-333.
- Ciapetti G, Granchi D, Savarino L, Cenni E, Magrini E, Baldini N, Giunti A (2002) *In vitro* testing of the potential for orthopedic bone cements to cause apoptosis of osteoblast-like cells. *Biomaterials* **23**: 617-627.
- Ciapetti G, Granchi D, Stea S, Cervellati M, Pizzoferrato A, Toni A (2000) *In vitro* testing of ten bone cements after different time intervals from polymerization. *J Biomater Sci Polymer Ed* **11**: 481-493.
- Charnley J (1960) Anchorage of the femoral head prosthesis to the shaft of the femur. *J Bone Joint Surg Br* **42**: 28-30.
- Chiellini F (2006) Perspectives on: *In vitro* evaluation of biomedical polymers. *J Bioact Compat Polym* **21**: 257-271.
- Corbellini MP (2006) Estudo das propriedades biológicas e mecânicas de compósitos com matriz polimérica de PMMA-co-EHA com carga vítrea. Relatório de graduação em Engenharia de Materiais. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- Côrte-Real M, Sansonetty F, Ludovico P, Prudêncio C, Rodrigues F, Fortuna M, Sousa M, Silva M, Leão C (2002) Contributos da citologia analítica para estudos de biologia de leveduras. *Boletim de Biotecnologia* **71**: 19-33.
- Cram LS (2002) Flow cytometry, an overview. *Methods Cell Sci* **24**: 1-9.
- Crissman H, Oka MS, Steinkamp JA (1976) Rapid staining methods for analysis of Deoxyribonucleic-acid and protein in mammalian-cells. *J Histochem Cytochem* **24**: 64-71.
- Crissman HA, Steinkamp JA (1973) Rapid, simultaneous measurement of DNA, protein, and cell volume in single cells from large mammalian cell populations. *J Cell Biology* **59**: 766-771.
- Darzynkiewicz Z, Crissman H, Jacobberger JW (2004) Cytometry of the cell cycle: cycling through history. *Cytometry A* **58**: 21-32.

- Deb S, Aiyathurai L, Roether JA, Luklinska ZB (2005) Development of high-viscosity two-paste bioactive bone cements. *Biomaterials* **26**: 3713-3718.
- Deb S, Silvio LD, Vazquez B, San Roman J (1999) Water absorption characteristics and cytotoxic and biological evaluation of bone cements formulated with a novel activator. *J Biomed Mater Res* **48**: 719-725.
- Dee KC, Puleo DA, Bizios R (2002) *An Introduction to Tissue-Biomaterial Interactions* (1st ed) John Wiley & Sons, Inc, New Jersey.
- Dolezel J, Bartos J (2004) Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Annals of Botany* **95**: 99-110.
- Eklou-Kalonji E, Denis I, Liberheer M, Pointillart A (1998) Effects of extracellular calcium on the proliferation and differentiation of porcine osteoblast *in vitro*. *Cell Tissue Res* **292**: 163-171.
- Ferraz MP, Knowles JC, Olsen I, Monteiro FJ, Santos JD (1999) Flow cytometry analysis of effects of glass on response of osteosarcoma cells to plasma-sprayed hydroxyapatite/CaO-P₂O₅ coatings. *J Biomed Mater Res* **47**: 603-611.
- Freshney RI (1983) *Culture of Animal Cells – A Manual of Basic Technique* (2nd ed). Alan R. Liss, Inc., New York.
- Golias CH, Charalabopoulos A, Charalabopoulos K (2004) Cell proliferation and cell cycle control: a mini review. *Int J Clin Pract* **58**: 1134-1141.
- Gough JE, Downes S (2001) Osteoblast cell death on methacrylate polymers involves apoptosis. *J Biomed Mater Res* **57**: 497-505.
- Granchi D, Stea S, Ciapetti G, Savarino L, Cavedagna D, Pizzoferrato A (1995) *In vitro* effects of bone cements on the cell cycle of osteoblast-like cells. *Biomaterials* **16**: 1187-1192.
- Hamadouche M, Sedel L (2000) Ceramics in orthopaedics. *J Bone Joint Surg* **82**: 1095-1099.
- Harper EJ (1998) Bioactive bone cements. *Proc Inst Mech Eng [H]* **212**: 113-120.
- Hattar S, Berdal A, Asselin A, Loty S, Greespan DC, Sautier JM (2002) Behaviour of moderately differentiated osteoblast-like cells cultured in contact with bioactive glasses. *Eur Cell Mater* **4**: 61-69.
- Hench LL, Xynos ID, Polak JM (2004) Bioactive glasses for *in situ* tissue regeneration. *J Biomater Sci Polymer Ed* **15**: 543-562.
- Hill PA (1998) Bone remodeling. *Br J Orthod* **25**: 101-107.
- Hill R (1996) An alternative view of the degradation of bioglass. *J Mater Sci Lett* **15**: 1122-1125.

- Homaeigohar SS, Shokrgozar MA, Javadpour J, Khavandi A, Sadi AY (2006) Effect of reinforcement particle size on *in vitro* behavior of β -tricalcium phosphate-reinforced high-density polyethylene: A novel orthopedic composite. *J Biomed Mater Res A* **78**: 129-138.
- Hunt JA, McLaughlin PJ, Flanagan BF (1997) Techniques to investigate cellular and molecular interactions in the host response to implanted biomaterials. *Biomaterials* **18**: 1449-1459.
- Johson DG, Walker CL (1999) Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **39**: 295-312.
- Josset Y, Nasrallah F, Jallot E, Lorenzato M, Dufour-Mallet O, Balossier G (2003) Influence of physicochemical reactions of bioactive glass on the behavior and activity of human osteoblasts *in vitro*. *J Biomed Mater Res* **67**: 1205-18.
- Josset Y, Oum'Hamed Z, Zarrinpour A, Lorenzato M, Adnet JJ, Laurent-Maquin D (1999) *In vitro* reactions of human osteoblasts in culture with zirconia and alumina ceramics. *J Biomed Mater Res* **47**: 481-493.
- Katagiri T, Takahashi N (2002) Regulatory mechanism of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Diseases* **8**: 147-159.
- Katti KS (2004) Biomaterials in total joint replacement. *Colloids Surf B Biointerfaces* **39**: 133-142.
- Kim HS, Park YB, Oh JH, Yoo KH, Lee SH (2001) The cytotoxic effect of methotrexate loaded bone cement on osteosarcoma cell lines. *Int Ortop* **25**: 343-348.
- Kirkpatrick CJ, Bittinger F, Wagner M, Köhler H, van Kooten TG, Klein CL, Otto M (1998) Current trends in biocompatibility testing. *Proc Instn Mech Engrs* **212**: 75-84.
- Kirkpatrick CJ, Wagner M, Köhler H, Bittinger F, Otto M, Klein CL (1997) The cell and molecular biological approach to biomaterial research: a perspective. *J Mater Sci Mater Med* **8**: 131-141.
- Kokubo T, Takadama H (2006) How useful is SBF in predicting *in vivo* bone bioactivity? *Biomaterials* **27**: 2907-2915.
- Kuehn KD, Ege W, Gopp U (2005) Acrylic bone cements: composition and properties. *Orthop Clin North Am* **36**: 17-28.
- Lewis G (1997) Properties of acrylic bone cement: state of the art review. *J Biomed Mater Res* **38**: 155-182.
- Lewis G, Mishra SR (2007) Influence of changes in the composition of an acrylic bone cement on its polymerization kinetics. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **81**: 524-529.
- Lian JB, Stein GS (1992) Concepts of Osteoblast growth and differentiation: basis for modulation of bone cell development and tissue formation. *Oral Biology and Medicine* **3**: 269-305.

- Lopes MA, Knowles JC, Kuru L, Santos JD, Monteiro FJ, Olsen I (1998) Flow cytometry for assessing biocompatibility. *J Biomed Mater Res* **41**: 649-656.
- Lopes MA, Knowles JC, Santos JD, Monteiro FJ, Olsen I (2000) Direct and indirect effects of P₂O₅ glass reinforced-hydroxyapatite composites on the growth and function of osteoblast-like cells. *Biomaterials* **21**: 1165-1172.
- Loureiro JCM (2007) Flow cytometric approaches to study plant genomes. Ph.D. Thesis. Universidade de Aveiro, Aveiro.
- Loureiro J, Rodriguez E, Dolezel J, Santos C (2007) Two new nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry: A test with 37 species. *Annals of Botany* **100**: 875-888.
- Loureiro J, Santos C (2004) Aplicação da citometria de fluxo ao estudo do genoma vegetal. *Boletim de Biotecnologia* **77**: 18-29.
- Lossdörfer S, Schwartz Z, Lohmann CH, Greenspan DC, Ranly DM, Boyan BD (2004) Osteoblast response to bioactive glasses *in vitro* correlates with inorganic phosphate content. *Biomaterials* **25**: 2547: 2555.
- Marques AP, Reis RL, Hunt JA (2002) The biocompatibility of novel starch-based polymers and composites: *in vitro* studies. *Biomaterials* **23**: 1471-1478.
- Mendes SC, Reis RL, Bovell YP, Cunha AM, van Blitterswijk CA, de Bruijn JD (2001) *Biomaterials* **22**: 2057-2064.
- Montanaro L, Cervellati M, Campoccia D, Arciola CR (2006) Promising *in vitro* performances of a new nickel-free stainless steel. *J Mater Sci* **17**: 267-275.
- Morejón L, Mendizábal AE, Delgado JA, Menocal G, Ginebra MP, Aparicio C, Mur FJG, Marsal M, Davidenko N, Ballesteros ME, Planell JA (2005) Static mechanical properties of hydroxyapatite (HA) powder-filled acrylic bone cements: effect of type of HA powder. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **72**: 345-352.
- Nayab SN, Jones FH, Olsen I (2007) Modulation of the human bone cell cycle by calcium ion-implantation of titanium. *Biomaterials* **28**: 38-44.
- O'Connor JE, Callaghan RC, Escudero M, Guadalupe H, Martínez A, Monteiro MC, Montolíu H (2001) The relevance of flow cytometry for biochemical analysis. *IUBMB Life* **51**: 231-239.
- Oliveira JM, Correia RN, Fernandes MH (1995) Surface modifications of a glass and a glass-ceramic of the MgO-3CaO.P₂O₅-SiO₂ system in a simulated body fluid. *Biomaterials* **16**: 849-854.
- Oliveira JM, Correia RN, Fernandes MH, Rocha J (2000) Influence of the CaO/MgO ratio on the structure of phase-separated glasses: a solid state ²⁹Si and ³¹P MAS NMR study. *J Non-Crystalline Solids* **265**: 221-229.

- Ormerod MG, Payne AW, Watson JV (1987) Improved program for the analysis of DNA histograms. *Cytometry* **8**: 637-641.
- Pereira D, Cachinho S, Ferro MC, Fernandes MHV (2004) Surface behaviour of high MgO-containing glasses of the Si–Ca–P–Mg system in a synthetic physiological fluid. *Journal of the European Ceramic Society* **24**: 3693-3701.
- Ramkrishna S, Huang ZM, Kumar GV, Batchelor AW, Mayer J (2004) *An Introduction to Biocomposites (Series on Biomaterials and Bioengineering, Vol I)*. Imperial College Press, London.
- Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE (1996) *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*. Academic Press, San Diego.
- Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL (2004) Bone Tissue Engineering: State of the Art and Future Trends. *Macromol Biosci* **4**: 743-765.
- Salinas AJ, Román J, Vallet-Regí M, Oliveira JM, Correia RN, Fernandes MH (2000) *In vitro* bioactivity of glass and glass-ceramics of the $3\text{CaO} \cdot \text{P}_2\text{O}_5\text{-CaO} \cdot \text{SiO}_2\text{-CaO} \cdot \text{MgO} \cdot 2\text{SiO}_2$ system. *Biomaterials* **21**: 251-257.
- Schwartz Z, Lohmann CH, Oefinger J, Bonewald LF, Dean DD, Boyan BD (1999) Implant surface characteristics modulate differentiation behavior of cells in the osteoblastic lineage. *Adv Dent Res* **13**: 38-48.
- Shapiro HM (1994) *Practical Flow Cytometry (3rd ed)* Wiley-Liss, Inc., New York.
- Silva GA, Costa FJ, Coutinho OP, Radin S, Ducheyne P, Reis RL (2004a) Synthesis and evaluation of novel bioactive composite starch/bioactive glass microparticles. *J Biomed Mater Res A* **70**: 442-449.
- Silva TL, Reis A, Hewitt C, Roseiro JC (2004b) Citometria de fluxo – funcionalidade celular on-line em bioprocessos. *Boletim de Biotecnologia* **77**: 32-40.
- Sommerfeldt DW, Rubin CT (2001) Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton. *Eur Spine J* **10**: S86-S95.
- Stea S, Granchi D, Zolezzi C, Ciapetti G, Visentin M, Cavedagna D, Pizzoferrato A (1997) High-performance liquid chromatography assay of N,N-dimethyl-p-toluidine released from bone cements: evidence for toxicity. *Biomaterials* **18**: 243-246.
- Sun JY, Dai Z, Zhao Y, Chen GQ (2007) *In vitro* of oligo-hydroxyalkanoates on the growth of mouse fibroblast cell line L929. *Biomaterials* **28**: 3896-3903.
- Sun JY, Yang YS, Zhong J, Greespan DC (2007) The effect of the ionic products of Bioglass[®] dissolution on human osteoblasts growth cycle *in vitro*. *J Tissue Eng Regen Med* **1**: 281-286.

Wang YX, Robertson JL, Spillman WB Jr, Claus RO (2004) Effects of the chemical structure and the surface properties of polymeric biomaterials on their biocompatibility. *Pharms Res* **21**: 1362-1373.

Watson JV, Chambers SH, Smith PJ (1987) A pragmatic approach to the analysis of DNA histograms with a definable G1 peak. *Cytometry* **8**: 1-8.

Xynos ID, Alasdair JE, Buttery LD, Hench LL, Polak JM (2001) Gene expression profiling of human osteoblasts following treatment with the ionic products of Bioglass[®] 45S5 dissolution. *J Biomed Mater Res* **55**: 151-157.

Xynos ID, Edgar AJ, Buttery LDK, Hench LL, Polak JM (2000a) Ionic products of bioactive glass dissolution increase proliferation of human osteoblast and induce insulin-like growth factor II mRNA expression and protein synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* **276**: 461-465.

Xynos ID, Hukkanen MVJ, Batten JJ, Buttery LD, Hench LL, Polak JM (2000b) Bioglass[®] 45S5 stimulates osteoblasts turnover and enhances bone formation *in vitro*: implications and applications for bone tissue engineering. *Calcif Tissue Int* **67**: 321-329.

Zreiqat H, Howlett CR, Zannettino A, Evans P, Schulze-Tanzil G, Knabe C, Shakibaei M (2002) Mechanism of magnesium-stimulated adhesion of osteoblastic cells to commonly used orthopaedic implants. *J Biomed Mater Res* **62**: 175-184.

Endereços Internet

<http://igitur-archive.library.uu.nl/dissertations/2003-1028-131747/c1.pdf>

http://ecb.jrc.it/documents/Existing-Chemicals/RISK_ASSESSMENT/SUMMARY/2ehasum058.pdf

ANEXO I

Determinação da densidade celular das culturas, utilizando a câmara de contagem (hemocitómetro)

Depois de tripsinizadas as células foram ressuspensas em meio de cultura e a suspensão foi transferida para um tubo de 15 mL. Limpou-se o hemocitómetro com EtOH a 70% (v/v) e colocou-se a lamela, que foi fixa com pinças. Pipetaram-se 10 μL da suspensão celular, tendo o cuidado de inverter o tubo várias vezes. Com cuidado, encostou-se a ponta da micropipeta ao bordo da câmara e deixou-se que a suspensão penetrasse na câmara por via da acção capilar até um preenchimento completo. Repetiu-se o processo para encher a segunda câmara. Observou-se a suspensão de células no hemocitómetro num microscópio óptico (ampliação 100x) e procedeu-se à contagem das células presentes no quadrado central, que corresponde a 1 mm^2 (Figura I.1). Para evitar a contagem da mesma célula duas vezes, incluíram-se as células que estavam sobre os limites superior e esquerdo e excluíram-se as que se encontravam nos limites inferior e direito.

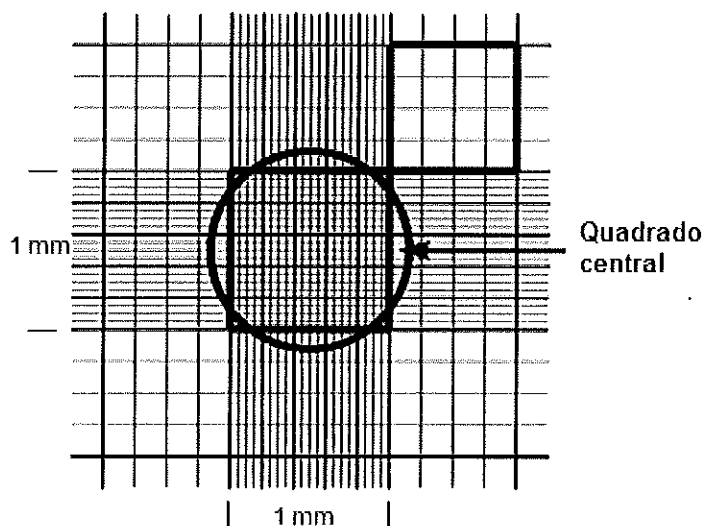


Figura I.1. Representação do hemocitómetro.

Após a contagem efectuaram-se os seguintes cálculos para determinar a densidade celular da suspensão.

Cada quadrado do hemocítómetro, com a lamela colocada, representa um volume total de:

$$0,1 \text{ mm (profundidade)} \times 1 \text{ mm (largura)} \times 1 \text{ mm (altura)} = 0,1 \text{ } \mu\text{L} = 1 \times 10^{-4} \text{ mL}$$

Para calcular a concentração celular total usou-se a equação:

$$C = M \times D \times 10^4$$

onde,

C é a concentração celular (células/mL);

M é a média do número de células contadas nas duas câmaras;

D é o factor de diluição.

Nota: Como neste trabalho não houve necessidade de diluir, o factor de diluição é igual a 1

Assim,

$$\text{Densidade celular da suspensão} = C \times V$$

onde,

V é o volume da suspensão.

ANEXO II**Composição química do tampão WPB para isolamento de núcleos****Tabela II.1. Composição química do tampão WPB (Loureiro *et al.* 2007)**

Composto	Concentração final
Tris.HCl	0,2 M
MgCl ₂ .6H ₂ O	4 mM
EDTA Na ₂ .2H ₂ O	2 mM
NaCl	86 mM
Metabissulfito sódico	10 mM
PVP-10	1% (m/v)
Triton X-100	1% (v/v)

Acertar o pH a 7,5. Este tampão deve ser guardado a 4°C, mantendo-se estável durante 3 meses.

ANEXO III

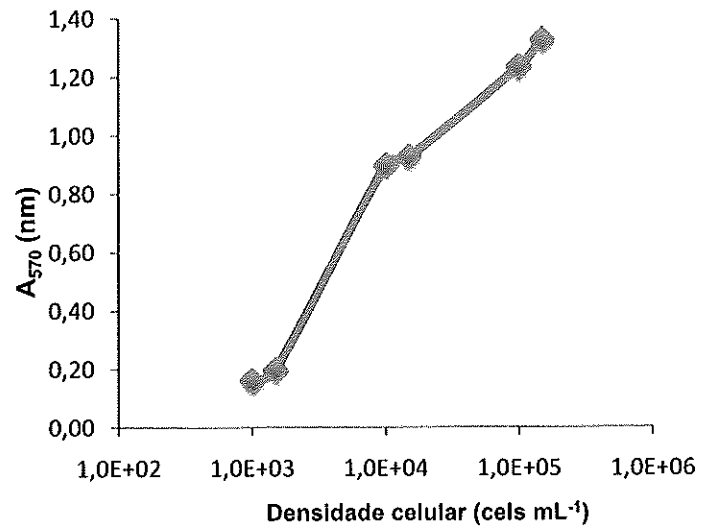


Figura III.1. Representação gráfica da densidade celular vs valores de Absorvância a 570 nm (A_{570}) para determinação da densidade celular óptima a usar nos ensaios de MTT. O valor de A_{570} escolhido deve estar compreendido entre 0,75 e 1,25.

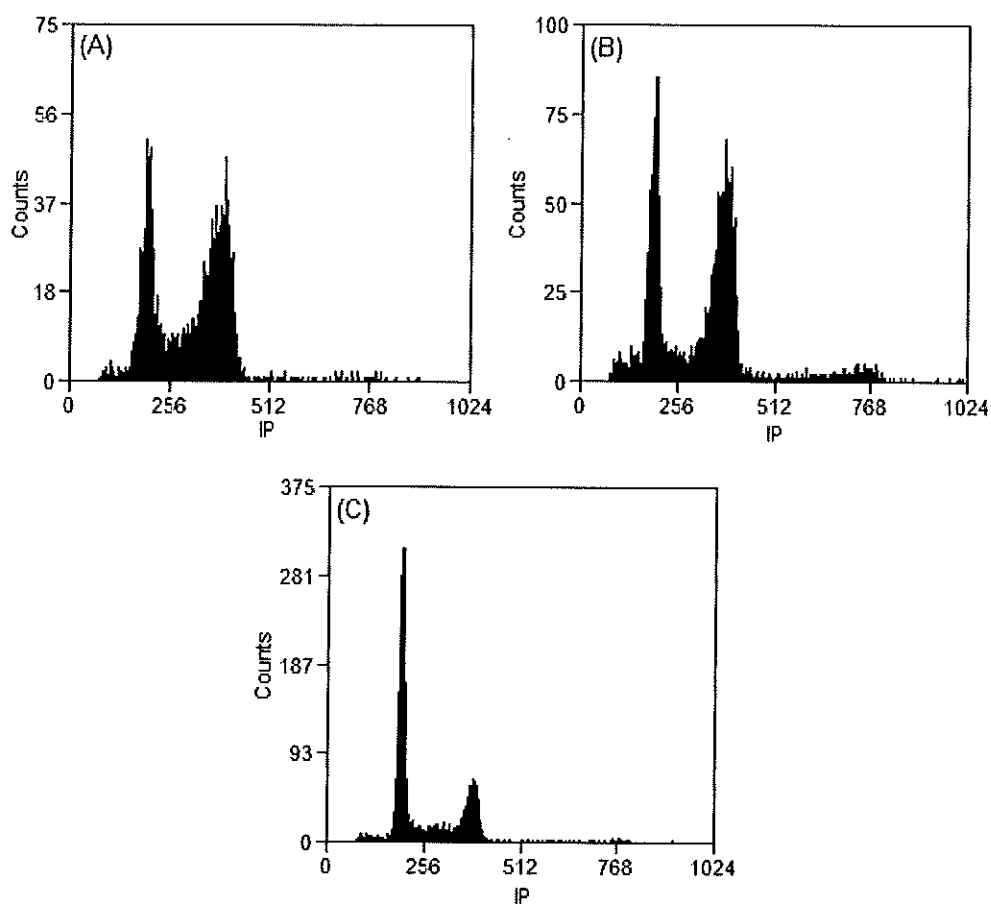


Figura III.2. Exemplos de histogramas da intensidade da fluorescência relativa do IP (conteúdo em DNA) obtidos após análise por citometria de fluxo das células MG-63 expostas ao extracto concentrado do cimento C0M: 24h (A), 48h (B) e 72h (C) de exposição.

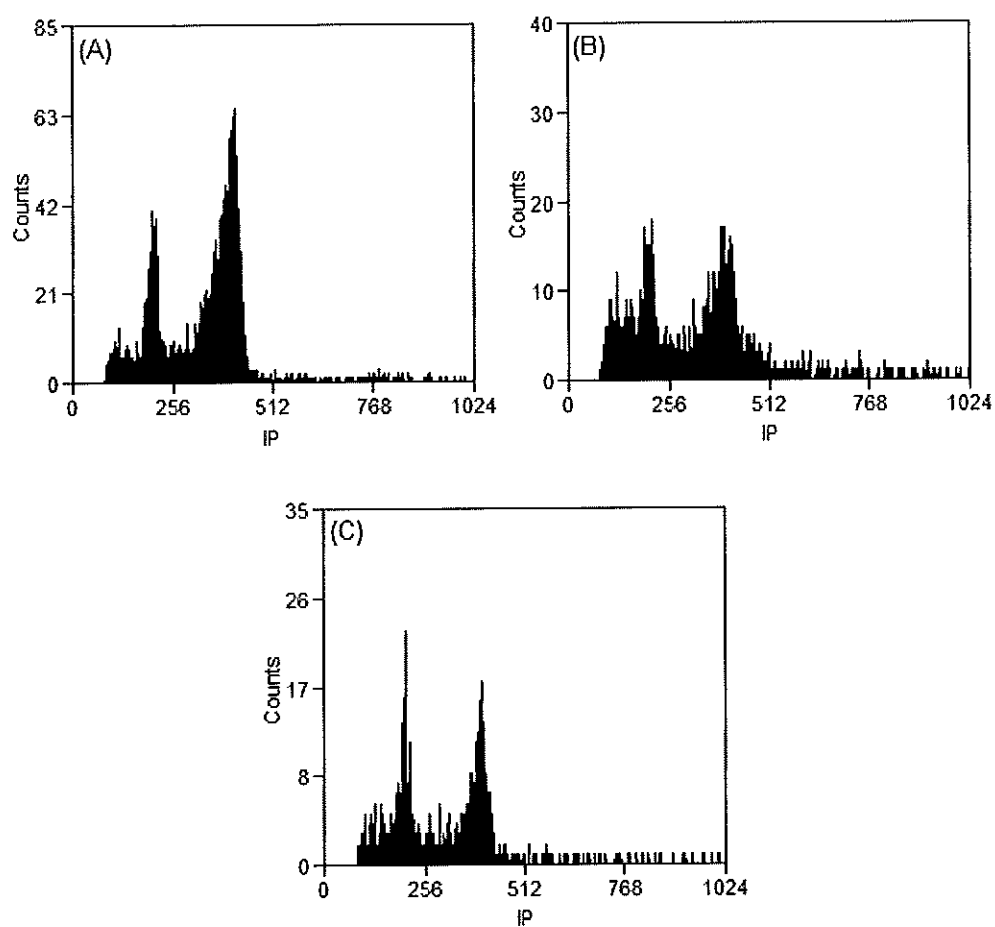


Figura III.3. Exemplos de histogramas da intensidade da fluorescência relativa do IP (conteúdo em DNA) obtidos após análise por citometria de fluxo das células MG-63 expostas ao extracto concentrado do cimento C3M: 24h (A), 48h (B) e 72h (C) de exposição.

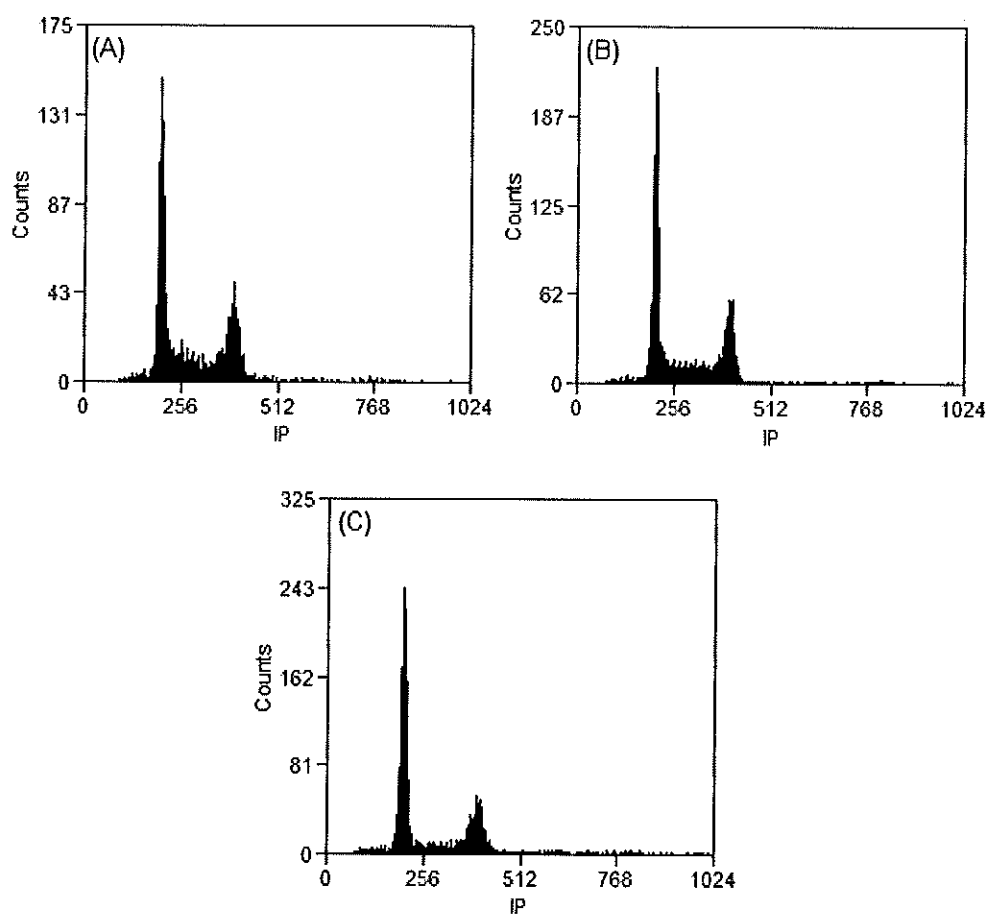


Figura III.4. Exemplos de histogramas da intensidade da fluorescência relativa do IP (conteúdo em DNA) obtidos após análise por citometria de fluxo das células MG-63 expostas ao extracto concentrado do cimento C5M: 24h (A), 48h (B) e 72h (C) de exposição.

Tabela III.1. Valores dos índices de proliferação celular resultantes da análise do ciclo celular por FCM após os três tempos de exposição das células MG-63 aos extractos do cimento C0M. Os valores obtidos para os grupos controlo são também apresentados (Ctrl neg – Controlo negativo, CE -72h – Controlo de extracção de 72h). Os valores representam a percentagem média \pm SD.

Amostra	24h	48h	72h
Ctrl neg	55,9 \pm 3,4	47,3 \pm 2,0	27,0 \pm 0,5
CE-72h	52,8 \pm 2,4	47,0 \pm 1,8	24,0 \pm 1,4
Extr 25%	60,0 \pm 1,5	51,1 \pm 1,3	23,7 \pm 2,3
Extr 50%	64,8 \pm 2,1	53,9 \pm 0,5	34,0 \pm 2,9
Extr 100%	73,0 \pm 2,7	64,1 \pm 2,9	42,2 \pm 1,9

Tabela III.2. Valores dos índices de proliferação celular resultantes da análise do ciclo celular por FCM após os três tempos de exposição das células MG-63 aos extractos do cimento C3M. Os valores obtidos para os grupos controlo são também apresentados (Ctrl neg – Controlo negativo, CE -72h – Controlo de extracção de 72h). Os valores representam a percentagem média \pm SD.

Amostra	24h	48h	72h
Ctrl neg	59,5 \pm 1,1	47,0 \pm 0,9	28,5 \pm 0,8
CE-72h	56,8 \pm 2,8	48,6 \pm 1,4	24,9 \pm 1,4
Extr 25%	69,3 \pm 0,9	51,1 \pm 2,7	35,4 \pm 0,9
Extr 50%	60,6 \pm 0,9	52,2 \pm 1,4	42,5 \pm 1,5
Extr 100%	79,0 \pm 2,8	68,9 \pm 8,1	67,6 \pm 4,6

Tabela III.3. Valores dos índices de proliferação celular resultantes da análise do ciclo celular por FCM após os três tempos de exposição das células MG-63 aos extractos do cimento C5M. Os valores obtidos para os grupos controlo são também apresentados (Ctrl neg – Controlo negativo, CE -72h – Controlo de extracção de 72h). Os valores representam a percentagem média \pm SD.

Amostra	24h	48h	72h
Ctrl neg	56,2 \pm 1,6	47,8 \pm 1,0	25,4 \pm 0,9
CE-72h	58,6 \pm 1,8	44,4 \pm 2,6	20,1 \pm 3,2
Extr 25%	65,2 \pm 1,7	46,0 \pm 1,9	23,5 \pm 4,2
Extr 50%	64,6 \pm 1,3	49,3 \pm 1,0	28,8 \pm 0,8
Extr 100%	66,0 \pm 7,4	49,3 \pm 0,9	40,3 \pm 1,5