



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

NOALA VICENSOTO MOREIRA MILHAN

**ANÁLISE DOS INDICADORES DA OSTEOGÊNESE,
CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE DE SUBSTITUTOS
ÓSSEOS EM OSTEOBLASTOS-*LIKE***

2013

NOALA VICENSOTO MOREIRA MILHAN

**ANÁLISE DOS INDICADORES DA OSTEOGÊNESE,
CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE DE SUBSTITUTOS
ÓSSEOS EM OSTEOLASTOS-LIKE**

Dissertação apresentada ao curso de Odontologia do Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP – Univ Estadual Paulista, Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área de Patologia.

Orientador: Samira Esteves Afonso Camargo

Co-orientador: Renata Falchete do Prado

São José dos Campos

2013

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Samira Esteves Afonso Camargo (Orientadora)

Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos

UNESP – Univ Estadual Paulista

Prof. Dr. Cacio de Moura Netto

Instituto de Ciências da Saúde da UNIP

Profa. Tit. Marcia Carneiro Valera Garakis

Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos

UNESP – Univ Estadual Paulista

São José dos Campos, 19 de dezembro de 2013.

DEDICATÓRIA

Ao meu marido, Anderson, por todo amor, incentivo e cuidado. Você foi um presente que Deus colocou na minha vida e que eu espero que ele nunca tire. Sou muito feliz ao seu lado. Obrigada por tudo meu amor.

À minha mãe, Tânia, por ter me ensinado tudo que eu sei de mais importante e ter conseguido exercer tão bem sua função materna (e ao mesmo tempo paterna). Você é a melhor mãe do mundo. Obrigada mamãe.

À minha avó, Celina, e ao meu avô, Valdemar (in memoriam) por terem ajudado a minha mãe a cuidar de mim com tanto amor. Sou muito grata a vocês. Vô, onde quer que o senhor esteja, saiba que sinto muito a sua falta, que o senhor

representa muito para mim e que eu acredito e torço para um dia nos reencontramos.

Aos meus irmãozinhos, Pedro Henrique e Luis, que chegaram pra alegrar a agitar (literalmente) a família. Laços sanguíneos não são relevantes e hoje vocês são essenciais para nós. Vocês poderão contar sempre comigo, aconteça o que acontecer.

Ao meu padrasto, Luis, por toda sua bondade e alegria. Pra mim você representa a “prova viva ” que convivência e cuidado são mais importantes que laços sanguíneos. Obrigada por tudo, inclusive por ter me ensinado a torcer para o nosso poderoso TIMÃO.

Aos meus tios (Rose, Dino, Wagner e Suad) e também aos meus primos (Arthur, Douglas, Heitor e Henrique) pelo carinho e por tudo que já fizeram por mim. Também sou muito grata a vocês. Obrigada.

AGRADECIMENTOS

A DEUS POR TER ME DADO A VIDA, UMA FAMÍLIA
MARAVILHOSA, SAÚDE E DISCERNIMENTO PARA TRILHAR
MEUS CAMINHOS.

À minha orientadora, Profa. Samira Esteves Afonso Camargo, por sempre estar à disposição para ajudar, pelo apoio e tranquilidade passados durante os momentos difíceis da execução do trabalho e também pelo bom humor diário, que nos viabilizou uma agradável convivência durante esses dois anos.

À aluna de doutorado, Isabel Chaves, pela fundamental ajuda e pelos momentos divertidos durante a execução experimental do trabalho.

À Profa. Renata Falchete do Prado, minha co-orientadora na execução desse trabalho, por todas as dicas e pela ajuda fornecida no decorrer do mestrado.

À aluna de iniciação científica, Fernanda de Oliveira, por ter me ajudado sempre que necessário.

Aos meus professores de AIKIDO, Sensei Fernando e Ligia, que estão me passando ensinamentos a respeito do AIKIDO e tudo que ele representa. O AIKIDO está me ajudando a ter calma e me harmonizar com as situações difíceis encontradas no dia a dia. E com certeza fará cada vez mais diferença tanto na minha vida pessoal quanto na profissional.

Aos professores do programa de pós-graduação em Biopatologia Bucal pelos ensinamentos transmitidos.

Aos amigos feitos durante a pós-graduação pelos bons momentos e conhecimentos compartilhados.

Aos amigos do ensino médio e da graduação, com quem ainda mantenho contato, pela amizade verdadeira e apoio nos momentos difíceis.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro nos processos 2012/02649-1 e 2012/15650-8.

Aos professores, funcionários e todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para minha formação.

“A força de um homem não está na coragem de atacar, mas na capacidade de resistir aos ataques”. (Morihei Ueshiba)

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 Tecido ósseo, biomateriais e classificação dos enxertos ósseos	19
2.2 Enxertos ósseos autógenos, homogêneos, xenógenos e aloplásticos	22
2.2.1 Hidroxiapatita.....	24
2.2.2 Cerâmicas sintéticas de fosfato de cálcio.....	31
2.3 Indicadores da Osteogênese, proliferação celular e mutações cromossômicas <i>in vitro</i>	37
3 PROPOSIÇÃO	41
4 MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1 β-fosfato tricálcico (β-TCP) experimental	42
4.2 Partículas de Bio-Oss® (Geistlich) e β-TCP (Bionnovation)	43
4.3 Preparo dos meios condicionados	44
4.4 Procedimentos de cultura de células	45
4.4.1 Cultivo, subcultivo e plaqueamento celular.....	45
4.4.2 Determinação da proliferação e viabilidade celular.....	48

4.4.3	Conteúdo de proteína total.....	49
4.4.4	Atividade de fosfatase alcalina (ALP).....	51
4.4.5	Análise qualitativa e quantitativa de formações nodulares de matriz mineralizada.....	52
4.4.6	Ensaio de genotoxicidade.....	56
4.5	Forma de análise dos resultados.....	59
5	RESULTADOS.....	61
5.1	Determinação da proliferação e viabilidade celular.....	61
5.2	Conteúdo de proteína total.....	63
5.3	Atividade de fosfatase alcalina (ALP).....	68
5.4	Análise qualitativa e quantitativa de formações nodulares de matriz mineralizada.....	73
5.5	Ensaio de genotoxicidade.....	80
6	DISCUSSÃO.....	83
7	CONCLUSÃO.....	96
8	REFERÊNCIAS.....	97
	ANEXO.....	109

Milhan NVM. Análise dos indicadores da osteogênese, citotoxicidade e genotoxicidade de substitutos ósseos em osteoblastos-*like* [dissertação]. São José dos Campos (SP): Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2013.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi investigar *in vitro* os indicadores osteogênese, a citotoxicidade e genotoxicidade de osteoblastos-*like* (MG 63) em contato indireto com três substitutos ósseos: Hidroxapatita bovina (HA) (Bio-Oss®- Geistlich), Beta fosfato tricálcico (β -TCP - Bionnovation) e Beta fosfato tricálcico experimental (β -TCP experimental). Os osteoblastos-*like* foram expostos aos materiais por 24 h, por meio da utilização de meio condicionado pelos substitutos ósseos na concentração de 16 mg/mL. Os indicadores da osteogênese foram analisados pelos testes atividade de fosfatase alcalina, conteúdo de proteína total e formação de nódulos de mineralização. A viabilidade celular foi mensurada pelo teste de MTT e a genotoxicidade foi determinada pela formação de micronúcleos (MNT) nas células após exposição aos substitutos ósseos e também ao etilmetano sulfonato (controle positivo). Os dados obtidos foram submetidos aos testes estatísticos ANOVA, comparação múltipla de Tukey (Post Hoc) e teste Z ($p \leq 0,05$). Pelo teste de MTT observou-se que nenhum dos materiais avaliados foi citotóxico, sendo que o β -TCP, seguido pelo Bio-Oss®, induziram proliferação celular após 24 h. O ensaio de MNT indicou que nenhum dos substitutos ósseos apresentou genotoxicidade. Em relação aos indicadores da osteogênese, foi observado que as células em contato com os materiais foram capazes de induzir a osteogênese e que esse processo foi influenciado pelo período de cultura dos osteoblastos-*like* em contato com os substitutos ósseos. O conteúdo de proteína total apresentou-se maior em geral aos 10 dias, enquanto a atividade de fosfatase alcalina foi superior em todos os materiais aos 14 dias, semelhante à formação de nódulos de mineralização, que também apresentou pico de

formação no período de 14 dias. Dentre os substitutos ósseos avaliados, foi constatado que o β -TCP induziu maior osteogênese em todos os testes. Com base nos resultados deste trabalho, pôde-se concluir que todos os substitutos ósseos avaliados foram biocompatíveis e induziram a osteogênese, sendo que o β -TCP apresentou maiores índices de proliferação celular e osteogênese *in vitro*.

Palavras-chave: Hidroxiapatita bovina. Beta fosfato tricálcico. Osteoblastos. Osteogênese. Citotoxicidade. Genotoxicidade.

Milhan NVM. Analysis of osteogenesis, cytotoxicity and genotoxicity of bone substitutes in osteoblasts-like cells [dissertation]. São José dos Campos (SP): Institute of Science and Technology, UNESP – Univ Estadual Paulista; 2013.

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate in vitro the indicators of osteogenesis, the cytotoxicity and genotoxicity of osteoblast-like (MG 63) in indirect contact with three bone substitutes: Hydroxypatite Bovine (HA) (Bio -Oss ® - Geistlich), Beta Tricalcium Phosphate (β - TCP - Bionnovation) and experimental Beta Tricalcium Phosphate (β -TCP experimental). The osteoblasts-like were exposed to the materials for 24 h, through the use of conditioned medium by bone substitutes in the concentration of 16 mg/mL. The indicators of osteogenesis were analyzed by alkaline phosphatase activity, total protein content and formation of mineralized nodules. Cell viability was measured by MTT assay and genotoxicity was determined by the formation of micronuclei (MNT) in the cells after exposure to the bone substitute and also to the etilmetano sulfanato (positive control). The data obtained were submitted to ANOVA, Tukey's multiple comparison (Post Hoc) and Z test ($p < 0,05$). The MTT assay showed that none of the tested materials was cytotoxic. Furthermore, the β - TCP, followed by Bio- Oss®, induced proliferation of cells after 24 h. The MNT test indicated that none of the bone substitutes was genotoxic. Concerning the indicators of osteogenesis, it was observed that cells in contact with the materials were able to induce osteogenesis and that this process was influenced by the period of culture of osteoblast-like in contact with bone substitutes. The total protein content was the highest in general on the 10th day, while the alkaline phosphatase activity was the highest in all the materials on the 14th day, similar to the formation of mineralized nodules, which also showed the highest values on the 14th day. Among the evaluated

bone substitutes, it was found that the β -TCP induced higher osteogenesis than others on all the tests. Based on the results of this study, it was concluded that all bone substitutes evaluated were considered biocompatible and induced osteogenesis. Moreover, the β -TCP showed the highest rates of cell proliferation and osteogenesis in vitro.

Keywords: Bovine hydroxyapatite. Beta tricalcium phosphate. Osteoblasts. Osteogenesis. Cytotoxicity. Genotoxicity.

1 INTRODUÇÃO

Os substitutos ósseos são utilizados com o objetivo de preencher, reconstruir ou substituir as falhas ósseas (Calixto et al., 2001). Após o procedimento de exodontia, o osso alveolar sofre reabsorção óssea, o que faz com o mesmo apresente perda óssea em altura e espessura. Essa deficiência óssea é muitas vezes responsável pela dificuldade ou impossibilidade na colocação de implantes ou até mesmo na estabilização de próteses parciais ou totais. Além disso, pode representar ainda um problema estético na instalação de próteses convencionais ou sobre implantes (Camargo et al., 2000; Munhoz, 2009).

Os implantes dentais têm sido utilizados com grande eficácia. Entretanto, a presença de defeitos ósseos nos rebordos alveolares têm se apresentado como um fator indesejável da reabilitação estética e funcional dos pacientes no momento da indicação da colocação de implantes (Ferreira et al., 2007).

Além de serem utilizados na Odontologia na preparação do leito para a instalação de implantes, os substitutos ósseos são importantes também nos casos de lesões císticas, deficiências congênitas, traumas, defeitos ósseos periodontais, lesões apicais e levantamento do seio maxilar (Cruz, 2004; Ferreira, 2007).

O reparo celular envolve uma cascata complexa de eventos, incluindo o crescimento e a diferenciação das células (Rosa, Beloti, 2003). Assim a avaliação da biocompatibilidade e a mensuração dos indicadores da osteogênese são maneiras de avaliar substitutos ósseos *in vitro*.

Para o ensaio da osteogênese é comum a utilização de testes bioquímicos como o de fosfatase alcalina e proteína total e também a mensuração da formação de matriz mineralizada. Sabe-se que a quantidade de proteínas totais produzidas pelos osteoblastos aumenta proporcionalmente com o número de células ósseas. Já a fosfatase alcalina é uma enzima marcadora de formação óssea que tem um papel importante na mineralização (Beloti, Rosa, 2005). Além disso, a presença de nódulos de mineralização em meio osteogênico comprova a diferenciação e funcionalidade dos osteoblastos (Hoemann et al., 2009; Fontana, 2009). Dessa forma, tais indicadores da osteogênese foram avaliados no presente estudo.

Para a determinação da biocompatibilidade de biomateriais, os testes de citotoxicidade e genotoxicidade são utilizados. A avaliação da citotoxicidade pelo ensaio pelo brometo (3-(4,5 dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT), promove resultados rápidos e precisos. Este teste reflete não somente o número de células de uma amostra, mas também o nível de sua atividade metabólica, porque é baseado na atividade de enzimas, como a succinil desidrogenase, presente em células viáveis (Bouillaguet et al., 2004).

Apesar de existirem muitos estudos na literatura que avaliam a citotoxicidade dos substitutos ósseos, verifica-se que ainda existem poucos trabalhos que avaliam a genotoxicidade desses biomateriais.

Devido a ampla aplicabilidade médico-odontológica, existe uma busca intensa por substitutos ósseos que tenham boas propriedades mecânicas, sejam reabsorvíveis e apresentem características de osteocondução e osteoindução. Dois biomateriais têm sido amplamente utilizados para substituição de tecido duro, a Hidroxiapatita [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$] e o β -fosfato tricálcico [$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$] (Liu et al., 2013).

O Bio-Oss® corresponde a um substituto ósseo de origem bovina (hidroxapatita bovina) amplamente documentado e analisado. É considerado um biomaterial de comportamento previsível devido às suas propriedades físico-químicas. Esse substituto ósseo tem sido utilizado para comparação com outros biomateriais, uma vez que resultados positivos têm sido obtidos com o seu uso na regeneração óssea. (Kim et al., 2010; Desterro, 2012).

O β -fosfato tricálcico (β -TCP) é um biomaterial que tem sido amplamente avaliado e utilizado para substituição óssea. Trata-se de um substituto ósseo, que apesar de ter propriedade mecânicas inferiores aquelas apresentadas pela hidroxiapatita (Lew et al., 2012), é biocompatível, absorvível e apresenta propriedades de osteocondução (Hirota et al., 2009; Al-Sanabani et al., 2013).

Estudos têm demonstrado que pequenas alterações na morfologia, cristalinidade, porosidade, temperatura e pH durante a

fabricação dos materiais pode levar a diferentes comportamentos dos substitutos ósseos tanto mecanicamente quanto biologicamente (Oliveira et al., 2007; Aarvold et al., 2013; Cox et al., 2013).

Dessa forma, o desenvolvimento de novos substitutos ósseos com características físico-químicas e biológicas superiores e o aperfeiçoamento do estudo em relação aos materiais já existentes no mercado, são quesitos muito importantes para a evolução das pesquisas médico-odontológicas no setor de biomateriais. De acordo com esse propósito, o presente estudo avaliou e comparou um β -TCP experimental produzido por reação em estado sólido, o qual já foi testado favoravelmente quanto as suas propriedades físico-químicas e dois substitutos ósseos comercialmente disponíveis, através de testes de biocompatibilidade e dos indicadores da osteogênese.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Tecido ósseo, biomateriais e classificação dos enxertos ósseos

O tecido ósseo é originário de um tecido embrionário chamado mesênquima e composto por três tipos celulares, osteoblastos, osteócitos e osteoclastos. Histologicamente, existem dois tipos de tecidos ósseos, o imaturo (ou primário) e o maduro (ou secundário). No osso primário as fibras colágenas se dispõem irregularmente, sem orientação definida. Já no secundário, as fibras colágenas se organizam em lamelas dispostas paralelamente (Junqueira, Carneiro, 2008).

O osso pode se desenvolver a partir de dois mecanismos. Pode ser formado a partir de um arcabouço cartilaginoso preexistente ou pode surgir no seio de uma região condensada de natureza conjuntiva. Ambos os processos recebem a denominação de ossificação ou osteogênese. O primeiro processo é denominado de ossificação endocondral, enquanto que o segundo é conhecido por ossificação intramembranosa (Katchburian, Arana, 2004).

Bioquimicamente, o tecido ósseo é definido por um conjunto especial de matriz orgânica (35%) e elementos inorgânicos (65%). O componente inorgânico, a hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$,

é o mineral que confere força e resistência aos ossos, sendo responsável pelo armazenamento de 99% do cálcio, 85% do fósforo e 65% do sódio e magnésio corporais (Robbins et al., 2000; Teixeira, 2009).

O osso representa um dos tecidos mais resistentes e rígidos do corpo humano. Apesar de sua resistência às pressões e de sua dureza, é muito plástico, sendo capaz de remodelar sua estrutura interna em resposta a modificações nas forças a que está submetido normalmente (Junqueira, Carneiro, 2008).

Os materiais utilizados para os procedimentos de enxerto são denominados de biomateriais (Calixto et al., 2001b). O termo biomaterial pode ser definido como uma substância ou combinação de duas ou mais substâncias, de natureza sintética ou natural, que são utilizadas para melhorar, aumentar ou substituir, parcial ou integralmente, tecidos e órgãos (Williams, 1987).

Um requisito fundamental para que um biomaterial seja considerado eficaz para o procedimento de enxerto é a biocompatibilidade. Esse termo pode ser definido como um estado de mútua coexistência entre um material e o ambiente fisiológico, sem que um exerça efeito desfavorável sobre o outro (Boss et al., 1995).

Os biomateriais podem ser classificados em biotoleráveis, bioinertes e bioativos. Aqueles classificados como biotoleráveis apresentam a característica de não serem rejeitados quando implantados em tecido vivo, porém possuem a desvantagem de se tornarem envolvidos por uma cápsula fibrosa. Já os bioinertes, permitem o íntimo contato com o osso conduzindo a osteogênese

enquanto que os bioativos permitem formação de novo osso e a troca de íons com o tecido ósseo (Andrade, 2011).

O reparo ósseo é um processo complexo que tem como propósito uma restauração anatômica e funcional. Muitos eventos ocorrem quando um determinado biomaterial entra em contato com o ambiente biológico. A principal função dos biomateriais utilizados para enxerto ósseo é promover formação óssea. Sendo assim, quando se estabelece uma total integração, ocorrerá uma gradual substituição por um osso novo (Garofalo, 2007; Teixeira, 2009).

Os substitutos ósseos podem ser classificados de acordo com a sua origem ou mecanismo de ação. Em relação a sua origem, os substitutos ósseos podem ser divididos em autógenos, homogêneos (ou aloenxertos), xenógenos (ou heterogêneos) e aloplásticos. Os substitutos autógenos são aqueles obtidos do próprio indivíduo, ou seja, de um sítio intra ou extra-oral. Já os substitutos homogêneos são aqueles vindos de outros indivíduos de mesma espécie. Os substitutos xenógenos, por sua vez, são obtidos de seres de espécies diferentes. E por fim os substitutos aloplásticos são aqueles provenientes de materiais sintéticos (Ferreira et al., 2007; Teixeira, 2009).

Quanto ao mecanismo de ação, os substitutos podem ser classificados em osteogênicos, osteoindutores e osteocondutores. São denominados osteogênicos os biomateriais capazes de promover formação óssea uma vez que possuem células ósseas em sua composição. Os biomateriais com características osteoindutoras são aqueles que possuem a capacidade de induzir a diferenciação de

células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos, levando dessa forma à deposição óssea. Já os biomateriais osteocondutores são aqueles que possuem a característica de fornecer um arcabouço para a migração celular e deposição óssea ectópica oriunda das imediações. Dessa forma, ao mesmo tempo em que esse biomaterial é reabsorvido, ele é também substituído por novo tecido ósseo (Teixeira, 2009).

2.2 Enxertos ósseos autógenos, homólogos, xenógenos e aloplásticos

Os enxertos ósseos autógenos são considerados o padrão ouro no âmbito da reposição óssea uma vez possuem propriedades osteogênicas, osteoindutivas e osteocondutivas (Calixto et al., 2001b). Além disso, é inexistente a possibilidade de rejeição desse enxerto uma vez que é obtido do tecido ósseo do próprio indivíduo (Munhoz, 2009).

Os enxertos ósseos autógenos podem ter origem intra ou extra-oral. Os enxertos ósseos provenientes do ambiente intra-oral são originários geralmente da tuberosidade maxilar, ramo ascendente do processo coronoíde da mandíbula, sínfise mentoniana, alvéolos ou cavidades em cicatrização. Já os enxertos ósseos de origem extra-oral são normalmente obtidos da crista anterior do osso ilíaco, embora possam ser adquiridos também da costela, tíbia, calota craniana entre outras localizações (Shallhorn, 1972; Calixto et al., 2001b).

Embora os substitutos de origem autógena representem a melhor opção por apresentarem boas propriedades osteogênicas, osteoindutivas e osteocondutivas, devido a algumas características como morbidade relacionada à técnica cirúrgica e também a pequena quantidade disponível, existe a necessidade de utilização de outros substitutos ósseos (Calixto et al., 2001b; Lourenço, 2002).

Os enxertos homogêneos (ou aloenxertos) são transferidos de um doador da mesma espécie para outro indivíduo. São disponibilizados em partículas ou blocos, sendo que o osso pode ser medular, cortical ou córtico-medular. De acordo com o tratamento que esse material recebe no banco de tecidos musculo-esqueléticos podem ser destacadas algumas formas disponíveis de substitutos ósseos homogêneos. O material pode ser disponibilizado de forma fresca, fresca congelada ou liofilizada. Dentre os enxertos homogêneos liofilizados existem aqueles que são mineralizados e também os desmineralizados (Irinakis, 2006; Figueira, 2011).

No entanto, os enxertos homogêneos induzem uma resposta imunológica no hospedeiro, com a possibilidade de serem rejeitados. A rejeição do enxerto homogêneo é marcada pela presença de processo inflamatório onde existe presença de linfócitos, reabsorção periférica do enxerto, falta de união, encapsulação fibrosa e fratura por fadiga (Burchardt, 1983; Teixeira, 2009).

Os substitutos ósseos xenógenos (ou heterógenos), que são provenientes de sítios ósseos de outra espécie, são disponíveis de forma liofilizada, geralmente no formato de partículas. Além disso,

podem ser encontrados tanto na versão mineralizada quanto desmineralizada (Irinakis, 2006; Figueira, 2011).

Os substitutos aloplásticos, que em geral mostram uma boa resistência à compressão e uma pobre resistência à tensão (semelhante ao tecido ósseo), vem recebendo atenção especial, já que podem eliminar ou diminuir a necessidade de utilização dos substitutos ósseos autógenos, homogêneos e xenógenos (Ferreira et al., 2007; Teixeira, 2009).

Desta maneira, os materiais a base de cerâmica têm sido amplamente utilizados em cirurgias de enxerto ósseo. Podem ser caracterizados por possuírem origem natural ou sintética. Dentro do grupo correspondente a origem natural encontram-se as hidroxiapatitas, as quais podem ser obtidas de estruturas de coral ou da matriz mineral de tecido ósseo bovino. Em relação às cerâmicas de origem sintética, destacam-se a hidroxiapatita (HA), o beta fosfato tricálcico (β - TCP), o fosfato de cálcio bifásico (HA + β -TCP) e os vidros bioativos (Cruz, 2004).

2.2.1 Hidroxiapatita

A hidroxiapatita de origem natural, constituída por matriz óssea inorgânica bovina e cristais de carbonato de cálcio, encontra-se comercialmente disponível. Pode ser utilizada isoladamente ou em associação com o substituto ósseo autógeno.

Permite a reparação óssea, uma vez que é potencialmente osteocondutiva e tem a característica de não ativar o sistema imunológico do hospedeiro (Bassi, Carvalho, 2011). Além disso, é biocompatível e libera íons cálcio e fosfato os quais são fundamentais para a osteogênese (Accorsi-Mendonça et al., 2008).

O Bio-oss® é uma matriz óssea mineral de osso bovino comumente utilizada, que promove nova formação de tecido ósseo, não interfere na cicatrização do osso e, além disso possui propriedades osteocondutivas que são superiores àquelas do β -TCP (Rokn et al., 2011). O Bio-Oss®, é obtido após a remoção dos componentes orgânicos do osso medular bovino, através de um tratamento térmico à 300°C (Accorsi-Mendonça et al., 2008).

Do ponto de vista químico e físico o Bio-Oss® é idêntico ao osso humano. Possui uma força de compressão de 35 MPa. Além disso, tem uma natureza porosa que corresponde de 75% a 80% do seu volume total, o que aumenta consideravelmente a área de superfície desse material, contribuindo para a osteogênese (Sollazzo et al., 2010).

Valentini e Abensur (1997) realizaram um estudo histomórfométrico de 20 levantamentos de seio maxilar em 15 pacientes, utilizando o Bio-Oss®. Após 6 meses do procedimento, os autores observaram que havia 28% de osso, 44% de tecido conjuntivo e 28% de partículas de hidroxiapatita bovina, o que mostra que este material induz a formação óssea.

Kübler et al. (2004) investigaram *in vitro* o efeito de cinco substitutos ósseos em contato com osteoblastos humanos da

crista íliaca. Dentre eles, foram avaliados a hidroxiapatita bovina de baixa temperatura (Bio-Oss®), o α -TCP (Bio-Base®), hidroxiapatita bovina de alta temperatura (Osteograf®), hidroxiapatita (Algipore®) e hidróxiapatita de alta temperatura com peptídeo sintético (Pep- Gen p-15®). A proliferação, viabilidade celular e níveis de fosfatase alcalina foram analisados após 6 e 9 dias de contato dessas células com os substitutos ósseos. Os resultados indicaram que o Pep- Gen p-15® induz maior taxa de proliferação e diferenciação celular enquanto o Bio-Oss® apresenta a menor. Dessa forma, os autores concluíram que existe uma diferença no padrão de proliferação e diferenciação dos osteoblastos de acordo com o substituto ósseo utilizado.

Beloti et al. (2008) avaliaram a osteogênese *in vitro* induzida por células derivadas de sítios submetidos ao levantamento de seio maxilar com osso bovino inorgânico (Bio-Oss®). As biópsias foram realizadas após seis meses da cirurgia inicial, no momento da colocação dos implantes. Foram avaliados a adesão, a proliferação e viabilidade celular, o conteúdo de proteína total, o nível de fosfatase alcalina e a formação de nódulos de mineralização. Os autores concluíram que o contato a longo prazo das células *in vivo* com o osso bovino inorgânico diminui a expressão do fenótipo dos osteoblastos, e conseqüentemente a osteogênese *in vitro*.

Bernhardt et al. (2011) realizaram um estudo *in vitro* investigando o comportamento celular de osteoblastos em contato direto com três tipos de substitutos ósseos, uma hidroxiapatita sintética nova (Osbone) e outros dois substitutos ósseos já estabelecidos no mercado (Cerasorb M e Bio-Oss®). Foram realizados

testes para obtenção da adesão, proliferação celular, atividade de fosfatase alcalina e marcadores osteogênicos. Os autores concluíram neste estudo que o Bio-Oss® não promoveu uma adequada proliferação celular. Entretanto, o Osbone mostrou boa capacidade de adesão, proliferação e diferenciação celular, sendo semelhante ao Cerasorb, considerando a adesão e os marcadores osteogênicos.

Jo et al. (2011) investigaram *in vitro* a capacidade de adesão de células de osso medular de ratos com diferentes biomateriais. Foram avaliados o osso bovino desproteinizado (DMMB), o DMMB revestido com fibronectina (FN), a hidroxiapatita sintética (HA), a HA revestida com FN, a HA revestida com β -TCP, e o β -TCP puro. Os autores observaram que a HA proporcionou o ambiente mais favorável para a adesão celular, enquanto poucas células aderiram ao DMMB.

Liu Q et al. (2011) compararam um substituto ósseo de origem bovina (Bio-Oss®) com outro biomaterial de origem sintética (NanoBone®). Foi avaliado o comportamento *in vitro* de osteoblastos humanos em contato com ambos os materiais, sendo que foi realizada análise de microscopia eletrônica de varredura, a mensuração da viabilidade celular e testes de biocompatibilidade (LDH, MTT, WST, BrdU). Os resultados indicaram que ambos os materiais apresentam baixa citotoxicidade e boa compatibilidade, sendo que o NanoBone® promoveu maior proliferação celular no teste MTT.

Doostmohammadi et al. (2011) prepararam e avaliaram o comportamento do vidro bioativo 63 S e hidroxiapatita bovina (HA). Esses biomateriais foram colocados em contato direto com células

tronco mesenquimais humanas (hMSCs) e a proliferação dessas células foi avaliada pelo ensaio de MTT. Foi observado que, exceto durante o primeiro dia, as células hMSCs proliferaram em ambos os materiais de maneira semelhante ao grupo controle. Dessa forma, conclui-se que essas partículas fabricadas de vidro bioativo 63 S e hidroxiapatita bovina são compatíveis com as células hMSCs e podem ser utilizadas na engenharia tecidual óssea.

Vaziri et al. (2012) avaliaram três diferentes marcas de substitutos ósseos desmineralizados liofilizados (DFDBA) em contato indireto com células derivadas de sarcoma osteoblástico. Os DFDBA das marcas Osseo, AlloOss e Cenobone foram avaliados quanto à proliferação celular e capacidade osteoindutiva. Os autores concluíram que esses três tipos comercialmente disponíveis de DFDBA são capazes de diminuir a proliferação e aumentar a diferenciação osteogênica na concentração de 16 mg/mL. Além disso, possuem atividade osteoindutiva *in vitro*.

Chaves et al. (2012) analisaram e compararam *in vivo* a expressão dos marcadores ósseos Osteocalcina (OC), Receptor ativador do fator nuclear kappa B ligante (RANK-L) e Osteoprotegerina (OPG) em substitutos ósseos de origem bovina (Bio-Oss®) e substitutos autógenos, em procedimentos de levantamento de seio maxilar de coelhos. Os animais foram sacrificados depois de 14 e 30 dias para análise microscópica e imunohistoquímica. Os resultados revelaram que o Bio-Oss® é um substituto ósseo que tem um comportamento biológico semelhante aos substitutos ósseos autógenos

nos procedimentos de levantamento de seio maxilar, promovendo migração de células osteoprogenitoras para dentro do defeito ósseo.

Markazi et al. (2012) avaliaram *in vitro* dois substitutos ósseos xenogênicos (Bio-Oss® e Tutodent®) e dois sintéticos (Osteon® e Cerasorb®) em contato direto com osteoblastos-*like* (SaOS-2). Esses substitutos ósseos foram avaliados por meio de testes quanto à diferenciação, proliferação e viabilidade celular, além da mensuração da atividade da fosfatase alcalina. Os autores concluíram que os quatro substitutos ósseos promovem alta proliferação celular, entretanto estão associados a baixa taxa na diferenciação celular após 15 dias das células em contato com esses materiais.

Panseri et al. (2012) analisaram *scaffolds* de hidroxiapatita (HA) associada a magnetita(Mgn) em diferentes proporções (H/Mgn 100/0, HA/Mgn 95/5, HA/Mgn 90/10 e HA/Mgn 50/ 50). Esses *scaffolds* foram avaliados *in vitro* em células SaOS-2 e *in vivo* em lesões condilares de coelho. Os resultados indicaram que a presença da magnetita não altera a biocompatibilidade dos *scaffolds*, sendo que na proporção 90/10 pode ser observado uma elevada proliferação celular em estágio inicial *in vitro* e bons níveis de histocompatibilidade *in vivo*.

Çakmak et al. (2013) desenvolveram e analisaram um *scaffold* constituído pelo nanocompósito PA-RGD/HA (ácido arginina-glicina-aspártico com peptídeo anfífilo em gel e matriz de hidroxiapatita). Foram realizados testes *in vitro* em células pré-osteoblásticas (MC3T3-E1) os quais mostraram que esse

nanocompósito induz a diferenciação osteogênica das células MC3T3-E1 e possui características osteoindutivas e osteocondutivas.

Cox et al. (2013) analisaram uma hidroxapatita (HA) sintetizada por um método de precipitação aquosa. A influência de várias condições de reação, a cristalinidade, o tamanho e morfologia das partículas, a estrutura molecular, bem como a viabilidade celular foram avaliados. A análise da viabilidade celular foi realizada *in vitro* em células precursoras de osteoblastos (MC3T3) após 24 h de contato direto com as amostras. Os autores observaram que as células mostram-se viáveis em todas as amostras em que o pH foi controlado e mantido entre 10-11 durante o método de precipitação aquosa.

Quan et al. (2013) avaliaram a citotoxicidade e genotoxicidade da hidroxiapatita (HA) associada à zircônia (ZnO_2) *in vitro*. O teste de MTT mostrou proliferação celular significativa nos compósitos de HA puros e associados ao ZnO_2 . Por outro lado, os compósitos constituídos apenas de ZnO_2 não induziram proliferação celular. Quanto à genotoxicidade pôde-se concluir que a HA não é genotóxica, o ZnO_2 induz a formação relevante de micronúcleos e que os compósitos de HA/ ZnO_2 tornam-se mais genotóxicos a medida que aumentou-se a proporção de ZnO_2 .

2.2.2 Cerâmicas sintéticas de fosfato de cálcio

Entre vários biomateriais sintéticos as cerâmicas de fosfato de cálcio (Ca-P) tornaram-se populares devido a sua composição e estrutura semelhantes ao osso humano. Os fosfatos de cálcio estão geralmente disponíveis em forma de blocos ou grânulos de cerâmica porosa ou densos (Yang et al., 2013).

Os fosfatos tricálcicos (TCP) existem em várias fases (α , β , γ , e super- α), sendo que as fases α e β são utilizadas como biomateriais (Al-Sanabani et al., 2013). No entanto, maior atenção tem sido dada ao β -TCP para aplicações biomédicas devido ao fato de ter sido observado citotoxicidade (dos Santos et al., 2002) e instabilidade em partículas de α -TCP (Lew et al., 2012).

Dentro da Odontologia os fosfatos tricálcicos são utilizados em defeitos ósseos verticais, preenchimentos de fendas palatinas, revestimentos de implantes, além de serem utilizados também como anteparo. (Al-Sanabani et al., 2013).

O β -TCP corresponde a uma cerâmica sintética de fosfato de cálcio que tem sido utilizado para a regeneração óssea em uma variedade de procedimentos cirúrgicos, com resultados clínicos e histológicos satisfatórios, em modelos animais e humanos (Brkovic et al., 2008).

O β -TCP é um substituto ósseo biocompatível, absorvível e que apresenta propriedades de osteocondução, levando a

formação de tecido ósseo ao redor e também no interior dos seus poros (Hirota et al., 2009; Al-Sanabani et al., 2013).

A macro e micro porosidade do biomaterial β -TCP promove o aumento interno de vasos sanguíneos e permite a infiltração de prolongamentos dos osteócitos nos microporos (Eleftheriadis et al., 2010). Apesar do β -TCP apresentar rápida degradação e fracas propriedades mecânicas, esse biomaterial oferece um excelente ambiente para a regeneração óssea (Jo et al., 2011).

Shiratori et al. (2005) avaliaram o comportamento do β -TCP em defeitos ósseos realizados no fêmur de 65 ratos, e verificaram que o β -TCP corresponde a um substituto ósseo que promove osteocondução e conseqüentemente formação óssea na área do defeito. Foi observado formação de novo tecido ósseo tanto na área central quanto na região lateral aquela onde foi implantado o β -TCP em todos os tempos analisados.

Segundo Somanathan e Simunek (2006), estudos histomorfométricos analisando o β -TCP no seio maxilar têm demonstrado aumento da formação óssea, em torno de 29%, 6 meses após a implantação. Quando um fator osteocondutivo (plasma rico em plaquetas) é misturado com o β -TCP a capacidade de regeneração óssea aumenta em 38%.

Maus et al. (2008) realizaram um estudo *in vivo* comparando o β -TCP puro, β -TCP associado a rhBMP-2 e um osso autógeno. Para tal, defeitos ósseos na epífise femoral distal de ovelhas foram preenchidos com esses materiais. Após a eutanásia dos animais, nos períodos de sete semanas e três meses, foram realizadas análises

microrradiográficas, histológicas e histomorfométricas. Os autores concluíram que a adição de rhBMP-2 ao β -TCP promove uma remodelação rápida do osso, comparável àquela que ocorre com o substituto ósseo autógeno. Por outro lado, nesses mesmos tempos, o β -TCP puro não promoveu uma remodelação completa dos defeitos ósseos.

Oliveira et al. (2007) investigaram duas rotas diferentes de síntese de β -TCP (reação em estado sólido e precipitação em solução aquosa) e suas consequências sobre as propriedades finais do cimento β -TCP. Verificou-se que ambas as vias são equivalentes, pois não houveram diferenças relevantes nas propriedades do cimento, com exceção da resistência mecânica. Dessa forma, os autores concluíram que a rota de reação em estado sólido é mais interessante devido a sua simplicidade.

De acordo com Hirota et al. (2009), uma desvantagem associada ao β -TCP é a absorção precoce desse material, sem regeneração óssea. Entretanto, esse problema pode ser resolvido com a associação desse biomaterial com materiais osteogênicos, tais como osso autógeno ou células osteoprogenitoras.

Kanayama et al. (2010) realizaram um estudo sobre a atividade osteoblástica e osteoclástica da apatita carbonatada (CA) em culturas celulares, comparando-a ao β -TCP e a HA. Os autores avaliaram a expressão de RNA mensageiro através de PCR em tempo real. Este estudo mostrou que a cerâmica CA suporta o crescimento e diferenciação de osteoblastos e osteoclastos. Além disso, os autores

concluíram que a CA é superior ao β -TCP como um substituto ósseo para engenharia tecidual.

Kadow-Romacker et al. (2013) analisaram o efeito do β -TCP (ChronOS) revestido com ácido zoledrônico em contato com osteoblastos e osteoclastos humanos *in vitro*. Os resultados deste estudo mostraram que o β -TCP revestido com ácido zoledrônico tem efeito estimulante sobre células osteoblásticas e também pode levar a inibição de osteoclastos.

Bernhardt et al. (2011) analisaram diferentes substitutos ósseos à base de fosfato de cálcio, *in vitro*. O objetivo foi realizar uma comparação entre dois novos substitutos ósseos (Ceracell e Osseolive) e outras três cerâmicas já estabelecidas no mercado (Cerasorb M, NanoBone e BONIT Matrix). Os resultados mostraram uma baixa taxa de adesão e proliferação celular em relação aos substitutos NanoBone e BONIT Matrix. Por outro lado, os grânulos de Ceracell, Osseolive e Cerasorb induziram uma boa adesão e proliferação celular. Além disso, nesses materiais os níveis de fosfatase alcalina aumentaram com o tempo e foi observada uma boa formação de genes relacionados à formação óssea.

Cao et al. (2012) realizaram um estudo *in vitro* e *in vivo* com intuito de avaliar a degradação e o potencial osteogênico de *scaffolds* constituídos por poli ácido lático (PLA) associados a nano β -TCP ($n\beta$ -TCP). Descobriram que tanto o tamanho das partículas quanto o quantidade de β -TCP, podem conduzir a diferenças na degradação e propriedades de osteocondução das matrizes porosas do PLA/ $n\beta$ -TCP. Além disso, observaram que os *scaffolds* contendo

30% β -TCP apresentam similar osteocondutividade e melhor propriedades mecânicas que aqueles constituídos por 50% β -TCP, sendo o PLA/ 30% β -TCP um compósito promissor para regeneração óssea.

Draenert et al. (2013) investigaram o comportamento do β -TCP e da HA em defeitos ossos esponjosos realizados em tíbia de cães. Foram avaliados os períodos de 6 semanas, 2, 3, 4 e 15 meses. Ambos os substitutos ósseos foram considerados osteoindutores. A HA foi completamente osseointegrada após 4 meses e não deixou sinais de reabsorção, enquanto que o β -TCP foi completamente osseointegrado mais rapidamente, após seis semanas, e foi observado reabsorção durante a remodelação.

Shuai et al. (2013) investigaram as propriedades mecânicas, o comportamento de degradação e o desempenho biológico do fosfato tricálcico/hidroxiapatita (TCP/HAP). *Scaffolds* de fosfato de cálcio porosos foram preparados através de sinterização seletiva a laser com várias proporções em peso de TCP/HAP (0/100, 10/90, 30/70, 50/50, 70/30 e 100/0) em pó. Os resultados mostraram que tanto a resistência à fratura quanto a força de compressão aumentaram quando o peso de TCP aumentou de 0-30, porém depois diminuíram. Dessa forma a proporção 30/70 seria a ideal, sendo também possível controlar a reabsorção da cerâmica de fosfato de cálcio ajustando essa proporção.

Yang et al. (2013) analisaram *in vivo* o padrão de qualidade óssea induzida por três tipos de cerâmicas de fosfato de cálcio. Para isso foram realizados defeitos de 8 mm de diâmetro na

calvária de 10 coelhos. Foram comparados o β -TCP puro, o BCP composto de HA/ β -TCP na proporção de 60/ 40 (BCP 60/40) e o BCP composto de HA/ β -TCP na proporção de 20/80(BCP 20/80). Os autores observaram que todas as cerâmicas de fosfato de cálcio levaram a maior formação óssea comparadas ao grupo controle. Além disso, foi observado que ambos os grupos BCP induziram maior formação óssea nos períodos de 2 e 8 semanas após a cirurgia.

Aarvold et al. (2013) estudaram o efeito da porosidade de um *scaffold* de cerâmica bifásica (HA/TCP) no crescimento e diferenciação de células tronco esqueléticas humanas (SSC) *in vitro* e *in vivo*. Para isso os *scaffolds* HA/TCP foram fabricados utilizando técnica previamente publicada, que permite o controle da porosidade e tamanho dos poros. Os autores observaram que embora ambas as porosidades estudadas (30 e 45 ppi) tenham demonstrado indução da proliferação das células SSC *in vivo*, a porosidade do *scaffold* pode influenciar na diferenciação dessas células. Pode ser observado também que a proliferação e diferenciação osteogênica das células SSC em contato com este *scaffold*, combinado com a sua resistência mecânica, indicam a sua adequação como um osso extensor de enxerto para aplicação clínica ortopédica.

2.3 Indicadores da osteogênese, proliferação celular e mutações cromossômicas *in vitro*

Os métodos de cultura celular *in vitro* são relevantes e satisfatórios para o estudo dos biomateriais. Esse métodos são facilmente padronizados, sendo sua realização rápida, fácil, e associada a um custo relativamente baixo (Camps et al., 1992; Huang, Chang, 2002; Souza et al., 2006). Outra vantagem do experimento realizado *in vitro* é a facilidade no controle dos fatores experimentais, o que representa frequentemente um problema em experimentos *in vivo* (Camps et al., 1992; Huang, Chang, 2002; De-Deus et al., 2005).

Segundo Long (2001), define-se como osteopoiese o processo de desenvolvimento de células ósseas que gera osteoblastos a partir de células-tronco mesenquimais. O termo osteogênese deve ser reservado para geração de matriz óssea mineralizada por osteoblastos maduros. A indução da osteopoiese é observada pelo aparecimento de morfologia de osteoblastos, pelo aumento na atividade da fosfatase alcalina e pela formação de matriz mineralizada (Jaiswal et al., 1997). Segundo Fontana (2009), a determinação do parâmetro bioquímico do teste de fosfatase alcalina juntamente com a mensuração das proteínas totais confirmam a diferenciação de osteoblastos.

A enzima fosfatase alcalina hidrolisa o pirifosfato inorgânico, inibidor da hidroxipatita, em fosfato. Dessa forma fornece moléculas de fosfato, as quais são necessárias na formação da hidroxipatita, tornando-se relevante nos processos de formação e remodelação óssea (Calle et al., 2011).

Foi observada uma relação entre a atividade de fosfatase alcalina e produção de matriz mineralizada por alguns autores (Sugawara et al., 2002; Rosa, Beloti, 2005; Beloti, Rosa, 2005; Hoemann et al., 2009). A maturação e a mineralização da matriz extracelular indicam maior diferenciação das células, e como consequência uma menor proliferação celular (Rosa, Beloti, 2005; Beloti, Rosa, 2005).

Dessa forma, a análise da atividade da fosfatase alcalina, o nível produzido de proteínas totais e a observação da formação de nódulos de mineralização são importantes indicadores da osteogênese, devendo ser avaliados nos estudos *in vitro* dos substitutos ósseos.

Além da avaliação da osteogênese é muito importante a verificação da proliferação e viabilidade celular e a detecção de possíveis mutações cromossômicas no DNA das células em contato com esses materiais. Essas análises são relevantes no presente estudo principalmente pela presença de um material experimental que ainda não havia sido avaliado quanto à sua biocompatibilidade.

Os ensaios de citotoxicidade *in vitro* podem ser realizados por microscopia eletrônica de varredura (MEV) ou ensaio enzimático (Camilleri, Pitt Ford, 2006). Os ensaios enzimáticos são capazes de medir a atividade metabólica do crescimento celular em contato com materiais (Camilleri, Pitt Ford, 2006) e podem ser realizados pela interpretação da marcação celular com cromo radioativo, identificação do halo de inibição por contato direto material - célula, mensuração do grau de destruição da monocamada

celular, contagem de células por exclusão com azul de Trypan (Cavalcanti et al., 2005), método do corante brometo de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT) (De-Deus et al., 2005), teste de cristal violeta (Schweikl et al., 2005), entre outros. O método de avaliação da citotoxicidade pelo uso do corante MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium) tem se mostrado extremamente confiável, rápido e facilmente reproduzível, refletindo não somente o número de células em uma amostra, mas também o nível de sua atividade metabólica, pois baseia-se na atividade de enzimas, como a succinil desidrogenase, presentes em células viáveis.

Os testes de análise de DNA celular podem ser realizados *in vitro* e *in vivo* e são capazes de detectar dano genético como quebra na cadeia de DNA, mutação gênica, quebra cromossômica e alteração na capacidade de reparo do DNA (Chang et al., 1998; Ribeiro et al., 2006). Dentre os testes de genotoxicidade *in vitro* encontram-se o teste de cometa (Chang et al., 1998; Ribeiro et al., 2006) e o de micronúcleo (Andrighetti-Fröhner et al., 2006).

O teste de micronúcleo (MNT) é utilizado para detecção de mutações cromossômicas no DNA celular. Este teste é capaz de detectar agentes clastogênicos e aneugênicos, porque fragmentos cromossômicos e cromossomos inteiramente isolados levam a formação de micronúcleos na interfase do ciclo celular normal (Schweikl, Schmalz, 2000).

Os testes de genotoxicidade envolvendo o contato de substitutos ósseos com osteoblastos são restritos na literatura. Dessa forma, esse teste foi importante não apenas para detectar possíveis

mutações cromossômicas no DNA das células em contato com o β -TCP experimental mas também para avaliar os demais substitutos ósseos quanto a uma possível genotoxicidade.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi analisar *in vitro* os indicadores da osteogênese, a citotoxicidade e a genotoxicidade em osteoblastos-*like* (MG-63) em contato com três substitutos ósseos, uma hidroxiapatita bovina (HA) e dois Beta fosfatos tricálcicos (β -TCP), sendo um comercial e o outro experimental.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado após aprovação pelo comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto de Ciências e Tecnologia, UNESP – Univ Estadual Paulista (ANEXO A).

Uma parte deste trabalho está vinculada a Universidade Federal do Estado de São Paulo (UNIFESP), onde o β -TCP experimental foi preparado e testado mecanicamente com resultados satisfatórios (Oliveira et al., 2007). No presente estudo esse material, juntamente com outros dois substitutos ósseos disponíveis comercialmente, foi testado biologicamente através de testes de biocompatibilidade e indicadores da osteogênese.

4.1 β -fosfato tricálcico (β -TCP) experimental

A reação para obtenção do pó de β -TCP consistiu da mistura de carbonato de cálcio (CaCO_3 – Synth) e fosfato bibásico anidro (CaHPO_4 – Synth) na razão molar de 1:2 (Equação 1). O pó obtido foi calcinado a 1050 °C por 6 h em um forno mufla (EDG, modelo 3000 10P INOX) e em seguida, foi moído em moinho de

bolas (Modelo MA-500) durante 48 h. Após este processo, obteve-se um pó apresentando partículas de tamanho variando entre 1– 1,36 μm .



4.2 Partículas de Bio-Oss® (Geistlich) e β -TCP (Bionnovation)

Os biomateriais comercialmente disponíveis utilizados nessa pesquisa apresentam partículas de tamanho variando de 0,25-1 mm (Bio-Oss®) e 0,1-0,5 mm (β -TCP) (Bionnovation). Esses substitutos ósseos podem ser visualizados na Figura 1.

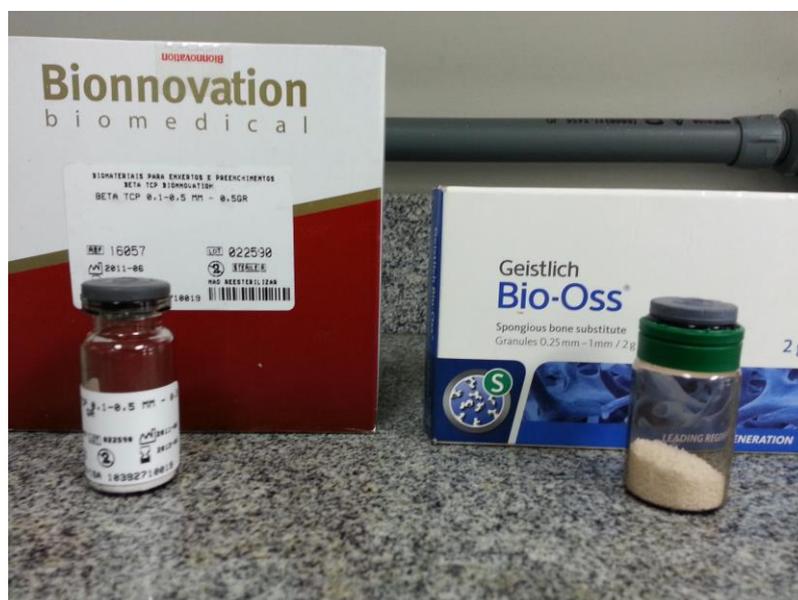


Figura 1- Substitutos ósseos β -TCP (Bionnovation) e Bio-Oss®.

4.3 Preparo dos meios condicionados

Foi realizado um teste piloto, antes da realização do presente trabalho, com intuito de selecionar qual método de contato celular (direto ou indireto) seria utilizado, já que ambos são encontrados na literatura (Bernhardt et al., 2011; Doostmohammadi et al., 2011; Vaziri et al., 2012; Tavares et al., 2013). O método direto levou a uma taxa de morte celular superior ao indireto, auxiliando na escolha pelo método indireto.

Dessa forma, no presente estudo as células foram expostas aos materiais pelo método indireto. Para tal, foram preparados meios condicionados pelos substitutos ósseos. A proporção preconizada de material/meio foi de 16 mg/mL, a qual foi realizada em estudo prévio por Vaziri et al. (2012).

Os substitutos ósseos foram pesados em balança digital e colocados no fundo de tubos falcons de 50 mL. Foi adicionado meio de cultura, seguindo a proporção de 16 mg/mL, e em seguida os tubos foram agitados por 1 min em vórtex. Após esse procedimento, os substitutos ósseos ficaram em contato com o meio durante 24 h, armazenados em estufa a 37°C em 5% de CO₂ (Figura 2).

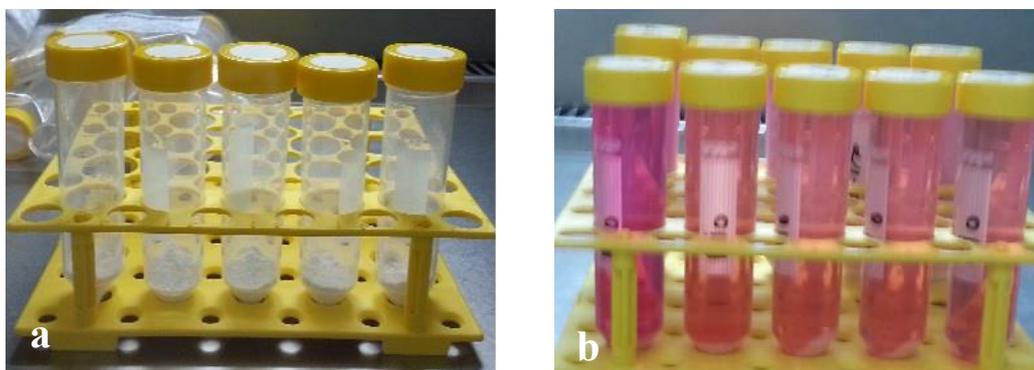


Figura 2- Preparo dos meios condicionados. a) substitutos ósseos; b) meio em contato com os substitutos ósseos.

4.4 Procedimentos de cultura de células

4.4.1 Cultivo, subcultivo e plaqueamento celular

No presente estudo foi utilizada uma linhagem estabelecida de células - osteoblastos-*like* (MG 63) - obtidas do Banco de células do Rio de Janeiro. As células foram cultivadas em meio DMEM (Cultilab, Curitiba, Brasil) suplementado com 10% Soro Fetal Bovino(SBF), com penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) e mantidas em estufa a 37°C e 5% CO₂. Foram utilizados frascos para cultura celular de 250 mL e 75 cm². O meio de cultura foi trocado a cada dois dias e o desenvolvimento das células foi avaliado por microscopia de fase invertida (Microscópio Carl Zeiss Microlimaging GmbH – Axiovert 40C, Germany) (Figura 3).



Figura 3 - Cultivo celular. a) meio para cultivo celular (DMEM); b) cultivo de células em frascos; c) microscópio de fase invertida.

As células ficaram em cada frasco por tempo suficiente para se tornarem confluentes e ocuparem quase todo o frasco, atingindo aproximadamente 90% de confluência. Depois disso, foram realizadas subculturas e as células foram colocadas em outros frascos, até que o crescimento celular fosse suficiente para o plaqueamento das células envolvendo todos os testes. No momento da subcultura, as células foram lavadas com PBS (solução salina de tampão de fosfato) (Cultilab Ltda, Campinas, Brasil) e foi adicionado ao frasco solução de tripsina 0,25% (Cultilab Ltda, Campinas, Brasil), para que as células se destacassem. Depois que as células se destacaram, o conteúdo de tripsina foi neutralizado com meio e o conjunto foi levado para um tubo Falcon de 15 mL para que fosse realizada a centrifugação em 3000 rpm por 5 min (Centrífuga Labnet– HERMLE Z 300K, NJ, USA) com consequente formação do pellet (Figura 4). Então, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspendidas e colocadas em um número maior de frascos.

Após as expansões celulares, foi realizado o plaqueamento para cada teste. Para esse procedimento, as células foram contadas em câmara de Neubauer (Optik Labor) (Figura 4) e foram plaqueadas aproximadamente 20.000 células/poço nos testes que utilizaram placa de 24 poços, 8.000 células/poço no teste que utilizou placa de 96 poços, e 300.000 células/poço no teste envolvendo placas de 4 poços. Todos os testes foram realizados em duplicata.

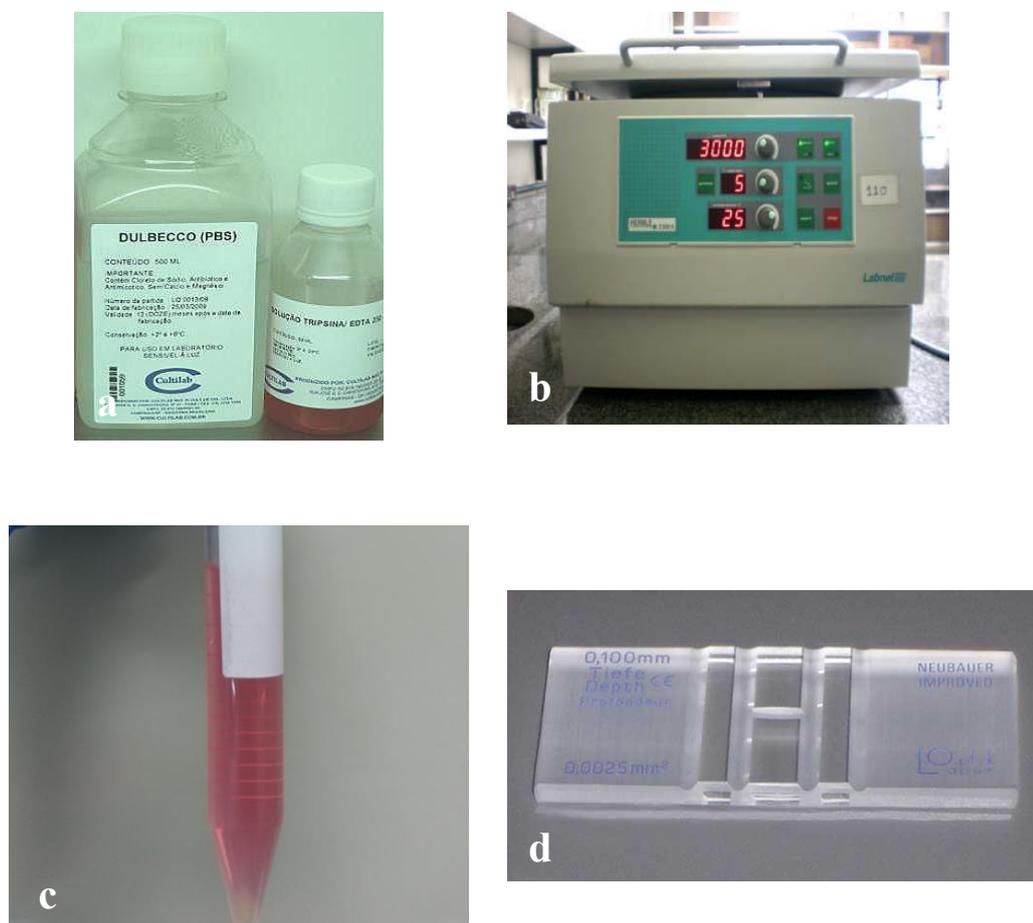


Figura 4 – Subcultivo e plaqueamento celular. a) soluções de PBS e tripsina; b) centrífuga; c) precipitado de células (*pellet*); d) câmara de Neubauer.

4.4.2 Determinação da proliferação e viabilidade celular

Para o teste de citotoxicidade, inicialmente as 8×10^3 células foram plaqueadas em placas de 96 poços com um número de poços igual a quatro para cada material e controle positivo ($n=4$). As células foram mantidas em meio DMEM (Cultilab, Curitiba, Brasil) suplementado com 10% SBF, com penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 $\mu\text{g/mL}$) à temperatura de 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 por 24 h. Após esse período, o meio antigo foi removido e as culturas celulares foram expostas aos meios condicionados pelos substitutos ósseos (200 μL para cada biomaterial, controle positivo e controle negativo) e mantidas em estufa por mais 24 h.

Após este período, a sobrevivência celular foi determinada pela mensuração da atividade da succinil desidrogenase (SDH). A atividade da SDH, indicativa da função mitocondrial, foi observada pelo ensaio de MTT (3-(4,5 dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazólio; Sigma, St Louis, MO, USA). A atividade foi quantificada pela dissolução do MTT em 0,1 N NaOH (6,25 v/v%) em DMSO (Dimethyl Sulfoxide) e a leitura da densidade óptica resultante da solução foi mensurada em um espectrofotômetro a 570nm (Biotek – EL808IU). A citotoxicidade foi expressa como porcentagem em relação ao grupo controle (=100%) (Figura 5).



Figura 5- Determinação da proliferação e viabilidade celular. a) sal MTT; b) DMSO; c) espectrofotômetro.

4.4.3 Conteúdo de proteína total

Para o teste de proteína total as células foram plaqueadas em placas de 24 poços na densidade de 20.000 células/poço. Foram utilizados cinco poços para cada material e grupo controle (n=5). Essas células foram mantidas em meio DMEM (Cultilab, Curitiba, Brasil) suplementado com 10% SBF, com penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) à temperatura de 37 °C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ por 24 h. Após esse período, o meio antigo foi removido e as culturas celulares foram expostas ao meio condicionado pelos substitutos ósseos (800 µL para cada bimatéria e controle positivo) e mantidas em estufa por períodos de 7, 10 e 14 dias.

Após esses períodos o conteúdo de proteína total foi avaliado de acordo com o método modificado de Lowry et al. (1951). As proteínas foram extraídas de cada poço com lauril sulfato de sódio a 0,1%. Após 30 min, 1 mL da solução de cada poço foi misturada a 1mL da solução de Lowry e deixado por 20 min à temperatura ambiente. O extrato foi diluído em reagente de Folin e Ciocalteau por 30 min à temperatura ambiente. A seguir, a absorbância foi aferida em espectrofotômetro (Shimadzu Europa GmbH UV 1203) a 680 nm e o conteúdo de proteína total foi calculado a partir de uma curva padrão determinada pela albumina bovina e expresso em $\mu\text{g/mL}$ (Figura 6).

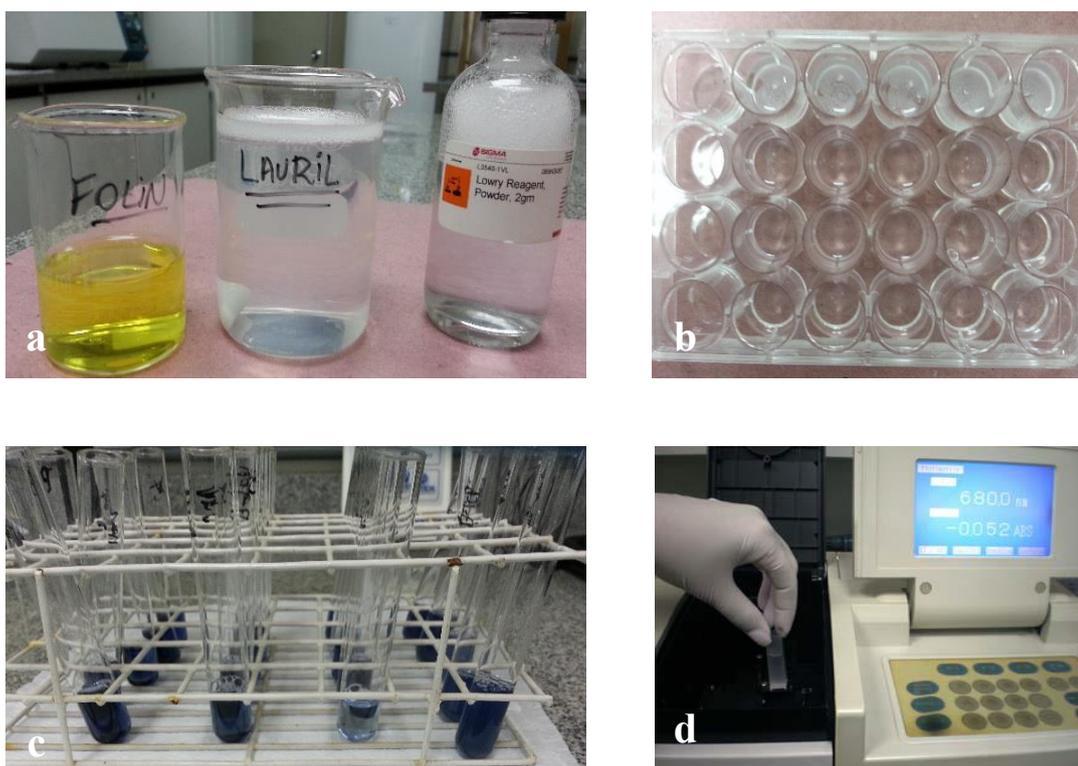


Figura 6 – Conteúdo de proteína total. a) Reagente de Folin e Ciocalteau, solução de lauril sulfato de sódio e solução de Lowry; b) Placa de 24 poços contendo a solução de lauril sulfato de sódio; c) tubos de ensaio contendo os reagentes e as alíquotas; d) espectrofotômetro no comprimento de onda de 680 nm.

4.4.4 Atividade de fosfatase alcalina (ALP)

A atividade de fosfatase alcalina foi determinada nos mesmos lisados utilizados para a avaliação do conteúdo de proteína total, dessa forma também foram avaliados os períodos de 7, 10 e 14 dias. A atividade da fosfatase alcalina foi mensurada por meio da liberação de timolftaleína por hidrólise do substrato de timolftaleína monofosfato, utilizando kit comercial de acordo com as instruções do fabricante (Fosfatase alcalina 50-100 Labtest). Inicialmente, 50 μ L de timolftaleína monofosfato foram misturados com 0,5 mL de tampão dietanolamina a 0,3 M, pH 10,1, por 2 min a 37°C. Foi então acrescentada à solução uma alíquota de 50 μ L de lisados obtidos de cada poço, sendo que o conjunto permaneceu por 10 min a 37 °C. Para o desenvolvimento de cor, foram adicionados 2 mL de Na₂CO₃ a 0,09 M e NaOH a 0,25 M. Após 30 min, a absorbância foi mensurada em espectrofotômetro (Shimadzu Europa GmbH UV 1203) utilizando comprimento de onda de 590 nm e a atividade da fosfatase alcalina foi calculada seguindo os procedimentos de cálculos preconizados na bula do Kit comercial (Fosfatase alcalina 50-100 Labtest). Os dados obtidos foram expressos como atividade da fosfatase alcalina normalizada pelo conteúdo de proteína total e os valores foram apresentados em μ mol de timolftaleína/h/ μ g de proteína/mL (Figura 7).



Figura 7 – Atividade da fosfatase alcalina. a) kit comercial Labtest; b) tubos de ensaio contendo os reagentes e as alíquotas; c) espectrofotômetro no comprimento de onda de 590 nm.

4.4.5 Análise qualitativa e quantitativa de formações nodulares de matriz mineralizada

Para análise qualitativa e quantitativa de formações nodulares de matriz mineralizada as células foram colocadas em placas de 24 poços na densidade de 20.000 células/poço. Foram utilizados cinco poços para cada material e grupo controle (n=5). Essas células foram mantidas em meio DMEM (Cultilab, Curitiba, Brasil) suplementado com 10% SBF, com penicilina (100 U/mL) e

estreptomicina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) à temperatura de 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 por 24 h. Após esse período, o meio antigo foi removido e as culturas celulares foram expostas ao meio condicionado pelos substitutos ósseos (800 μL para cada biomaterial e controle positivo) e mantidas em estufa por períodos de 14 e 21 dias.

Após esses períodos, os osteoblastos-*like* foram lavados em 1 mL de solução de Hank's (Sigma) a 37°C por duas vezes e as células foram fixadas em 2 mL de álcool 70% (Synth) por 1 h a 4°C. Em seguida, o álcool foi retirado e os poços foram lavados com 1 mL PBS (Gibco) por duas vezes. Posteriormente, o PBS foi retirado, a cultura celular foi lavada com 1 mL de água deionizada por duas vezes e corada com vermelho de Alizarina S 2% (Sigma), pH 4,2, por 15 min à temperatura ambiente (De Oliva et al., 2009). Depois disso, cada poço foi lavado várias vezes com intuito de retirar o excesso de corante e as placas foram deixadas por 24 h em temperatura ambiente para secagem total dos poços. Depois da secagem, os poços foram avaliados qualitativamente em relação à formação de nódulos de matriz mineralizada. Essa análise qualitativa foi baseada em avaliações macro e microscópicas das formações nodulares de matriz mineralizada, as quais foram fotografadas com câmera digital (Sony Digital F828, CyberShot, 8.0 megapixels) acoplada em microscópio de luz invertida (Microscópio Carl Zeiss Microimaging GmbH – Axiovert 40C, Germany).

A quantificação das formações mineralizadas foi realizada de acordo com o método descrito por Gregory et al. (2004) e Rosa et al. (2009). Para tal, 560 μL de ácido acético a 10% foi

adicionado a cada um dos poços e incubados em temperatura ambiente, sob agitação, durante 30 min. Após este período, todos os poços foram raspados com auxílio de uma ponteira, para a remoção de maior quantidade de corante. Todo conteúdo de cada um dos poços foi transferido para microtubos de centrífuga de 1,5 mL, e agitados em vórtex (Vertex QL – 901) por 30 s. Os microtubos foram levados ao banho-maria (Banho Metabólico Dubnoff – MA- 095/CF) e aquecidos por 10 min, a 85°C sendo posteriormente transferidos a um becker com gelo por 5 min. Depois disso, os microtubos foram centrifugados (Centrífuga Labnet – HERMLE Z 300K, NJ, USA) por 20 min e 100 µL do sobrenadante de cada microtubo foi transferido para poços de placa de 96 poços. Nestes foram acrescentados 40 µL de hidróxido de amônia a 10%, para neutralização do ácido, e a leitura foi então realizada em espectrofotômetro (Biotek – EL808IU), sob o comprimento de onda de 405 nm (Figura 8).



Figura 8 – Análise qualitativa e quantitativa de formações nodulares de matriz mineralizada. a) sal de Hank's; b) corante vermelho Alizarina S; c) placa de 24 poços contendo matriz mineralizada corada com vermelho de alizarina; d) reagentes de hidróxido de amônia e ácido acético; e) placa de 96 poços contendo as alíquotas para leitura.

4.4.6 Ensaio de genotoxicidade

Para realização do teste de micronúcleo foi plaqueada uma quantidade de 3×10^5 células em lâminas de vidro dispostas dentro de placas de 4 poços (3 mL de meio com células por poço). Os osteoblastos-*like* foram mantidos em meio DMEM (Cultilab, Curitiba, Brasil) suplementado com 10% SBF, com penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) à temperatura de 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ por 24 h. Então, o meio antigo foi removido e as células foram expostas aos meios condicionados pelos substitutos ósseos e mantidas em estufa por mais 24 h. Algumas lâminas foram expostas também ao etilmetano sulfanato (EMS) na concentração de 5 mM por 24h, para obtenção do controle positivo.

Após esse período, as placas foram lavadas em solução salina tamponada (livre de cálcio e magnésio PBS-CMF). As lâminas foram fixadas em etanol 100% por 30 min e lisadas em 5 N HCl por 40 min. Foram então lavadas com água deionizada e coradas com reagente SCHIFF (Sigma) por 30 min em temperatura ambiente. Após lavagem em sulfato/água por 6 min e em água corrente por 10 min, as células foram desidratadas e montadas com Entellan (Merck). Os micronúcleos foram observados e contados em microscópio de luz invertida (Zeiss) com óleo de imersão (100X). A contagem foi realizada levando em consideração a quantidade de micronúcleos em cada 1000 células. Os micronúcleos foram identificados como estruturas de DNA contidas no citoplasma claramente separadas do

núcleo principal, cercados por uma membrana nuclear, e incluindo uma área menor que $1/3$ da área do núcleo principal. Somente as células mononucleadas contendo menos que 5 micronúcleos foram contadas; células em mitose e que exibiram fragmentação nuclear por apoptose não foram consideradas na contagem (Figura 9).

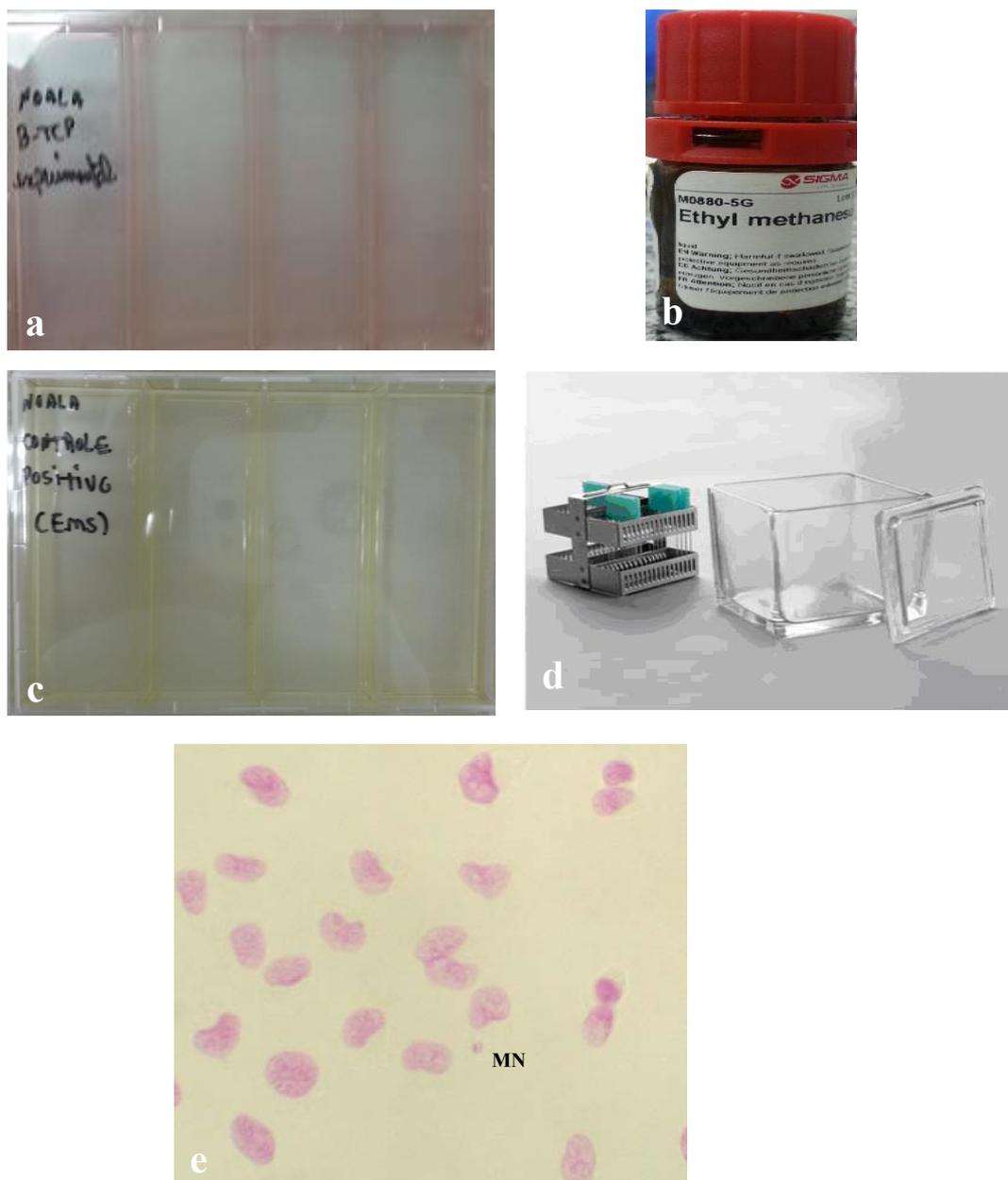


Figura 9 - Ensaio de Genotoxicidade. a) placa de 4 poços contendo células em contato com meio condicionado; b) EMS; c) placa de 4 poços contendo células em contato com EMS; d) berço utilizado para coloração das lâminas; e) formação de micronúcleo (MN) em núcleo de célula do grupo controle negativo.

4.5 Forma de análise dos resultados

Para análise estatística do presente trabalho, foi utilizado valor de confiança estatística de 95%. Dessa forma, a porcentagem de erro estatístico ou nível de significância adotado foi de 0,05 (5%).

Os dados foram avaliados por testes estatísticos paramétricos, uma vez que os resultados foram considerados quantitativos e contínuos. Além disso, o tamanho da amostragem foi considerado grande o que, pelo Teorema do Limite Central, garante que a distribuição tenha tendência a ser uma distribuição Normal. Dessa maneira, pôde ser utilizado testes estatísticos paramétricos, os quais representam testes muito precisos, e superiores em relação aos testes não paramétricos.

O teste ANOVA (Analysis of variance) é um teste bastante usual que faz uma comparação de médias utilizando a variância. Esse teste foi utilizado no presente estudo em todas as análises realizadas. Para os resultados estatisticamente significativos, foi aplicado também o teste de Comparação Múltipla de Tukey (Post Hoc), com intuito de fazer uma comparação mais específica (entre pares).

O teste de igualdade de duas médias (Teste Z) foi também utilizado no presente trabalho. Esse teste é utilizado quando a variância populacional é conhecida, independente e normal. O Teste Z foi aplicado para as análises de citotoxicidade e nódulos de

mineralização, quando os grupos foram comparados ao controle, que nesses testes foi considerado como 100%.

5 RESULTADOS

5.1 Determinação da proliferação e viabilidade celular

A análise de dados do teste MTT indicou que nenhum dos substitutos ósseos avaliados é citotóxico, uma vez que a porcentagem de absorvância, relacionada à proliferação e viabilidade das células em contato com esses materiais, não foi inferior a 50% da média encontrada no grupo controle, a qual foi considerada como 100%.

Nesse teste foram analisados estatisticamente os valores da porcentagem de absorvância dos substitutos ósseos em relação ao controle (=100%) e também os valores da porcentagem de absorvância dos substitutos ósseos entre si.

A comparação dos materiais, em relação ao grupo controle, realizada por meio do teste Z, mostrou que os substitutos ósseos testados no presente estudo possuem valores de absorvância estatisticamente diferentes do grupo controle ($p < 0,05$) (Tabela 1). Os substitutos ósseos β -TCP experimental e Bio-Oss® apresentaram valores de absorvância superiores a 100%. Já no β -TCP experimental foi observado valor abaixo de 100% (Figura 10).

Tabela 1 - Média, mediana, desvio padrão, valor máximo, valor mínimo e p-valor das porcentagens de absorvância obtidas na análise de proliferação e viabilidade celular. Comparação dos substitutos ósseos com o grupo controle (100%). Teste Z ($p < 0,05$)

Citotoxicidade	β -TCP	Bio-Oss®	β -TCP EXP
Média	130,6	105,3	86,4
Mediana	131,5	105,3	84,8
Desvio Padrão	2,8	3,8	3,9
Valor mínimo	126,0	100,0	83,1
Valor máximo	133,9	111,8	94,8
P-valor	<0,001 *	0,006 *	<0,001 *

*Diferença estatisticamente significante
EXP - experimental

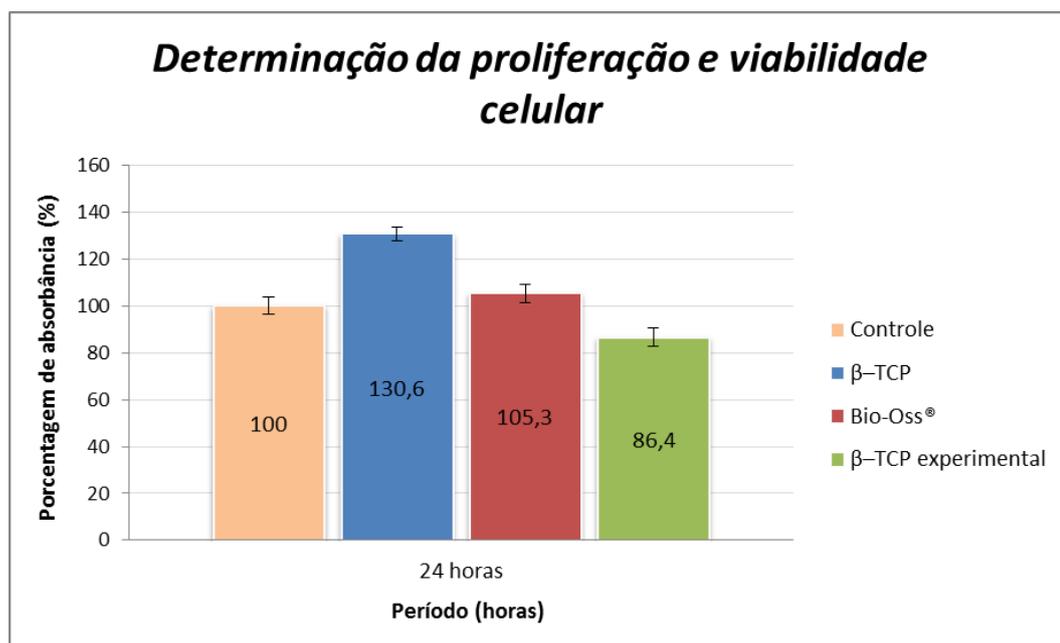


Figura 10 - Gráfico representativo das porcentagens médias de absorvância, obtidas no teste MTT, dos substitutos ósseos e do grupo controle (100%) após 24 h.

Os dados do teste MTT também foram submetidos a análise estatística com objetivo de compará-los entre si. Para essa

comparação foi utilizado o teste estatístico ANOVA. Os resultados demonstraram que os três substitutos ósseos possuem valores de absorbância estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,05$). Levando esse resultado em consideração, foi realizada a comparação Múltipla de Tukey (Post Hoc) com intuito de comparar todos os grupos aos pares. Essa comparação mostrou que existe diferença estatisticamente significativa entre a porcentagem de absorbância envolvendo todos os pares de substitutos ósseos (Tabela 2).

Tabela 2 - Valores de p das porcentagens de absorbância obtidas na análise de proliferação e viabilidade celular. Substitutos ósseos comparados aos pares. Teste de Tukey ($p < 0,05$)

	β -TCP	Bio-Oss®
Bio-Oss®	<0,001*	
β -TCP EXP	<0,001*	<0,001*

*Diferença estatisticamente significante
EXP - experimental

5.2 Conteúdo de proteína total

Os dados obtidos na análise do conteúdo de proteína total foram avaliados estatisticamente com intuito de comparar os diferentes grupos dentro de cada período (7, 10 e 14 dias), e também

os diferentes períodos dentro de cada grupo, acompanhando a evolução de cada grupo de acordo com a passagem do tempo.

Na análise onde os grupos foram comparados dentro de cada período, através do teste ANOVA, foi observado que somente aos 7 e 14 dias houveram diferenças estatisticamente significantes entre os substitutos ósseos ($p < 0,05$), sendo que o β -TCP apresentou maior média de conteúdo de proteína total em todos os períodos (Tabela 3 e Figura 11).

Desta forma, foi utilizada a comparação Múltipla de Tukey (Post Hoc) com objetivo de comparar todos os grupos aos pares nos períodos de 7 e 14 dias. Os resultados dessa comparação indicaram que β -TCP foi o único material que mostrou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), em relação aos demais substitutos ósseos e grupo controle nesses períodos (Tabela 4).

Tabela 3 - Média, mediana, desvio padrão, valor mínimo, valor máximo e p-valor dos dados obtidos na análise do conteúdo de proteína total em $\mu\text{g/ml}$. Comparação entre os grupos dentro de cada período. Teste ANOVA ($p < 0,05$)

Conteúdo de Proteína Total	Média	Mediana	Desvio Padrão	Valor mínimo	Valor máximo	P-valor	
7 dias	β -TCP	2.463	2.466	459	1.892	2.995	<0,001*
	Bio-Oss®	1.422	1.508	363	408	1.656	
	β -TCP EXP	1.780	1.781	153	1.448	2.059	
	Controle	1.770	1.763	93	1.584	1.897	
10 dias	β -TCP	2.773	3.028	1.095	1.165	4.072	0,115
	Bio-Oss®	1.926	2.300	820	528	2.766	
	β -TCP EXP	2.252	2.532	715	331	2.710	
	Controle	2.546	2.555	404	1.758	3.055	
14 dias	β -TCP	3.473	3.041	1.241	2.657	6.879	<0,001*
	Bio-Oss®	1.736	2.043	725	433	2.407	
	β -TCP EXP	1.643	1.726	470	572	2.092	
	Controle	1.606	1.664	803	331	3.055	

*Diferença estatisticamente significativa
EXP – experimental

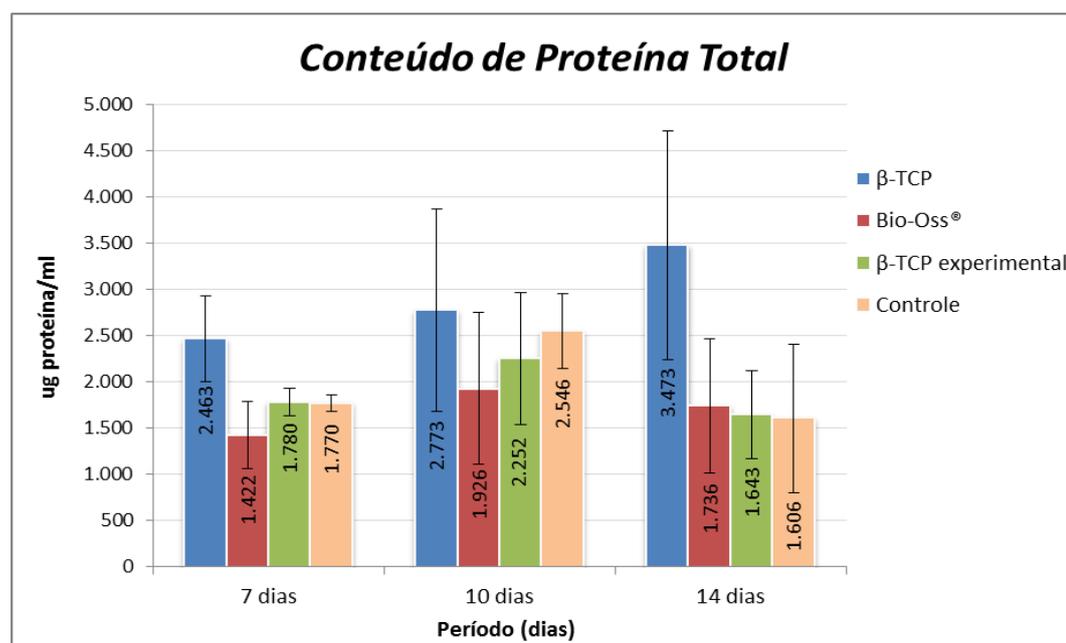


Figura 11 - Gráfico representativo do conteúdo de proteína total em $\mu\text{g/mL}$ em cada grupo, dentro dos períodos avaliados.

Tabela 4 - Valores de p dos dados obtidos na análise do conteúdo de proteína total em $\mu\text{g/ml}$. Grupos comparados dois a dois dentro dos períodos de 7 e 14 dias. Teste de Tukey ($p < 0,05$)

		β -TCP	Bio-Oss®	β -TCP EXP
7 dias	Bio-Oss®	<0,001*		
	β -TCP EXP	<0,001*	0,059	
	Controle	<0,001*	0,071	1,000
14 dias	Bio-Oss®	<0,001*		
	β -TCP EXP	<0,001*	0,995	
	Controle	<0,001*	0,986	1,000

*Diferença estatisticamente significante
EXP – experimental

Na análise dos períodos dentro de cada grupo foi observado que, com exceção do grupo β -TCP, as médias do conteúdo de proteína total foram maiores no período de 10 dias (Figura 12). A realização do teste ANOVA mostrou que apenas os grupos controle e β -TCP experimental apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) em relação a evolução dos períodos (Tabela 5).

Dessa maneira, a comparação múltipla de Tukey (Post Hoc) foi realizada e indicou que dentro grupo β -TCP experimental apenas os períodos de 10 e 14 dias se diferiram, enquanto no grupo controle os períodos 7 e 10 e também 10 e 14 dias apresentaram diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) (Tabela 6).

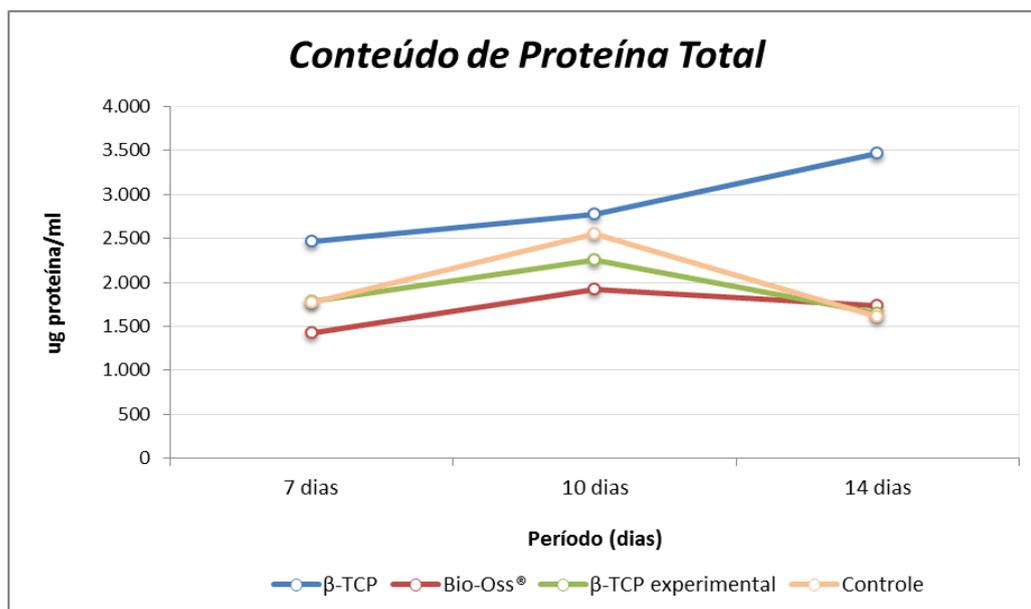


Figura 12 - Gráfico que representa a evolução do conteúdo de proteína total em $\mu\text{g/mL}$ nos períodos avaliados, dentro de cada grupo.

Tabela 5 - Média, mediana, desvio padrão, valor mínimo, valor máximo e p-valor dos dados obtidos na análise do conteúdo de proteína total em $\mu\text{g/ml}$. Comparação entre os períodos dentro de cada grupo. Teste ANOVA ($p < 0,05$)

Conteúdo de Proteína Total	Média	Mediana	Desvio Padrão	Valor Mínimo	Valor Máximo	P-valor	
β -TCP	7 dias	2.463	2.466	459	1.892	2.995	
	10 dias	2.773	3.028	1.095	1.165	4.072	0,084
	14 dias	3.473	3.041	1.241	2.657	6.879	
Bio-Oss®	7 dias	1.422	1.508	363	408	1.656	
	10 dias	1.926	2.300	820	528	2.766	0,249
	14 dias	1.736	2.043	725	433	2.407	
β -TCP EXP	7 dias	1.780	1.781	153	1.448	2.059	
	10 dias	2.252	2.532	715	331	2.710	0,029*
	14 dias	1.643	1.726	470	572	2.092	
Controle	7 dias	1.770	1.763	93	1.584	1.897	
	10 dias	2.546	2.555	404	1.758	3.055	0,001*
	14 dias	1.606	1.664	803	331	3.055	

*Diferença estatisticamente significante
EXP - experimental

Tabela 6 - Valores de p dos dados obtidos na análise do conteúdo de proteína total em $\mu\text{g/ml}$. Períodos experimentais comparados aos pares dentro dos grupos. Teste de Tukey ($p < 0,05$)

Conteúdo de Proteína Total		7 dias	10 dias
β -TCP EXP	10 dias	0,109	
	14 dias	0,816	0,030*
Controle	10 dias	0,007*	
	14 dias	0,766	0,001*

*Diferença estatisticamente significante
EXP - experimental

5.3 Atividade de fosfatase alcalina (ALP)

Os dados obtidos no teste da atividade fosfatase alcalina também foram avaliados de forma que foi realizada uma comparação entre os grupos dentro de cada período experimental, e também entre os períodos dentro de cada grupo.

O teste ANOVA indicou que dentro de cada período avaliado apenas existiu diferença estatisticamente significante ($p < 0,05$) entre os grupos no décimo dia (Tabela 7). Nesse período, assim como nos demais, houve maior atividade de fosfatase alcalina pelo grupo β -TCP (Figura 13).

A Comparação Múltipla de Tukey (Post Hoc) indicou que no décimo dia, o grupo β -TCP se diferiu de maneira estatisticamente significativa ($p < 0,05$) dos grupos β -TCP experimental e controle (Tabela 8).

Tabela 7 - Média, mediana, desvio padrão, valor mínimo, valor máximo e p-valor dos dados obtidos na análise de fosfatase alcalina (ALP) em μmol timolftaleína/h/mg proteína. Comparação entre os grupos dentro de cada período. Teste ANOVA ($p < 0,05$)

	ALP	Média	Mediana	Desvio Padrão	Valor Mínimo	Valor Máximo	p-valor
7 dias	β -TCP	0,050	0,048	0,018	0,017	0,075	0,220
	Bio-Oss®	0,036	0,024	0,037	<0,001	0,105	
	β -TCP EXP	0,017	0,016	0,008	0,007	0,032	
	Controle	0,042	0,021	0,057	0,004	0,198	
10 dias	β -TCP	0,047	0,034	0,025	0,024	0,089	0,004*
	Bio-Oss®	0,011	0,001	0,046	-0,034	0,129	
	β -TCP EXP	-0,003	0,001	0,024	-0,055	0,030	
	Controle	0,006	0,009	0,020	-0,016	0,042	
14 dias	β -TCP	0,335	0,278	0,233	0,159	0,946	0,128
	Bio-Oss®	0,183	0,098	0,209	-0,056	0,643	
	β -TCP EXP	0,153	0,073	0,181	<0,001	0,611	
	Controle	0,110	0,079	0,242	-0,357	0,549	

*Diferença estatisticamente significativa
EXP – experimental

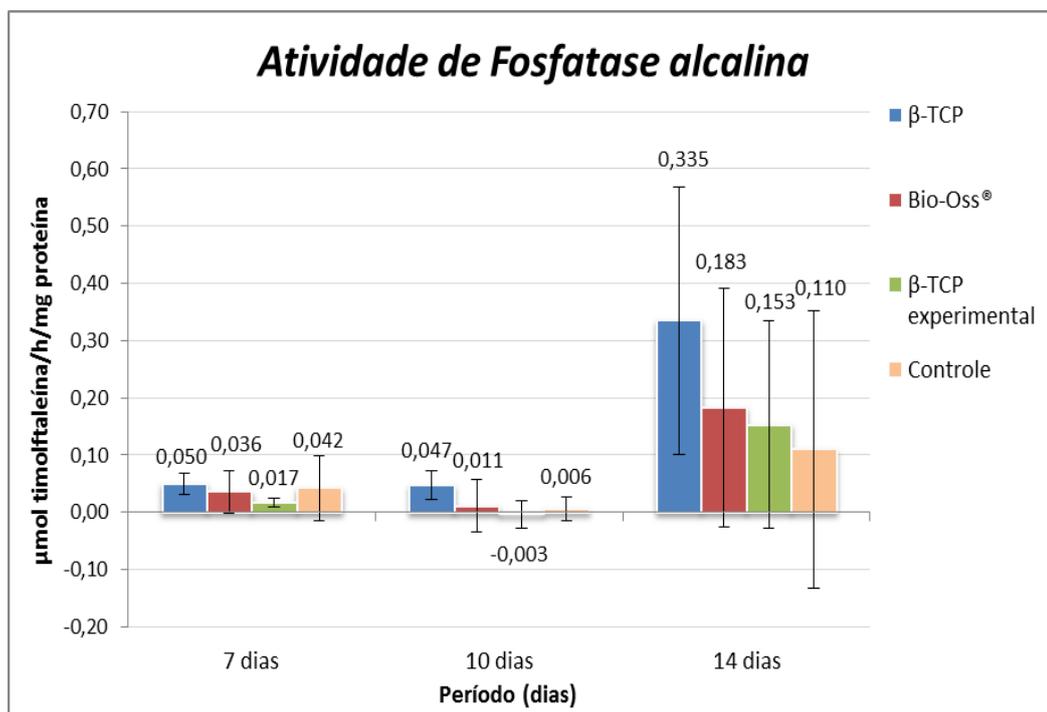


Figura 13 - Gráfico representativo da atividade de fosfatase alcalina em μmol timolftaleína/h/mg proteína em cada grupo, dentro dos períodos avaliados.

Tabela 8 - Valores de p dos dados obtidos na análise da atividade de fosfatase alcalina (ALP) em μmol timolftaleína/h/mg proteína. Grupos comparados dois a dois dentro do período de 10 dias. Teste de Tukey ($p < 0,05$)

10 dias	β -TCP	Bio-Oss®	β -TCP EXP
Bio-Oss®	0,060		
β -TCP EXP	0,004*	0,717	
Controle	0,024*	0,979	0,909

*Diferença estatisticamente significante
EXP – experimental

Na análise da atividade de fosfatase alcalina dentro de cada grupo foi possível observar, após a realização do teste ANOVA, que todos os grupos, com exceção do grupo controle, apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os diferentes períodos (Tabela 9). Em todos os grupos a atividade de fosfatase alcalina foi maior no período de 14 dias (Figura 14).

A comparação múltipla de Tukey constatou que o período de 14 dias apresentou diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) para os períodos de 7 e 10 dias, nos três substitutos ósseos avaliados. Os outros períodos não se diferiram entre si em nenhum dos grupos (Tabela 10).

Tabela 9 - Média, mediana, desvio padrão, valor mínimo, valor máximo e p-valor dos dados obtidos na análise da atividade de fosfatase alcalina (ALP) em $\mu\text{mol timolftaleína/h/mg}$ proteína. Comparação entre os períodos dentro de cada grupo. Teste ANOVA ($p < 0,05$)

ALP		Média	Mediana	Desvio Padrão	Valor Mínimo	Valor Máximo	P-valor
β-TCP	7 dias	0,050	0,048	0,018	0,017	0,075	<0,001*
	10 dias	0,047	0,034	0,025	0,024	0,089	
	14 dias	0,335	0,278	0,233	0,159	0,946	
Bio-Oss®	7 dias	0,036	0,024	0,037	<0,001	0,105	0,010*
	10 dias	0,011	0,001	0,046	-0,034	0,129	
	14 dias	0,183	0,098	0,209	-0,056	0,643	
β-TCP EXP	7 dias	0,017	0,016	0,008	0,007	0,032	0,005*
	10 dias	-0,003	0,001	0,024	-0,055	0,030	
	14 dias	0,153	0,073	0,181	<0,001	0,611	
Controle	7 dias	0,042	0,021	0,057	0,004	0,198	0,276
	10 dias	0,006	0,009	0,020	-0,016	0,042	
	14 dias	0,110	0,079	0,242	-0,357	0,549	

*Diferença estatisticamente significante

EXP – experimental

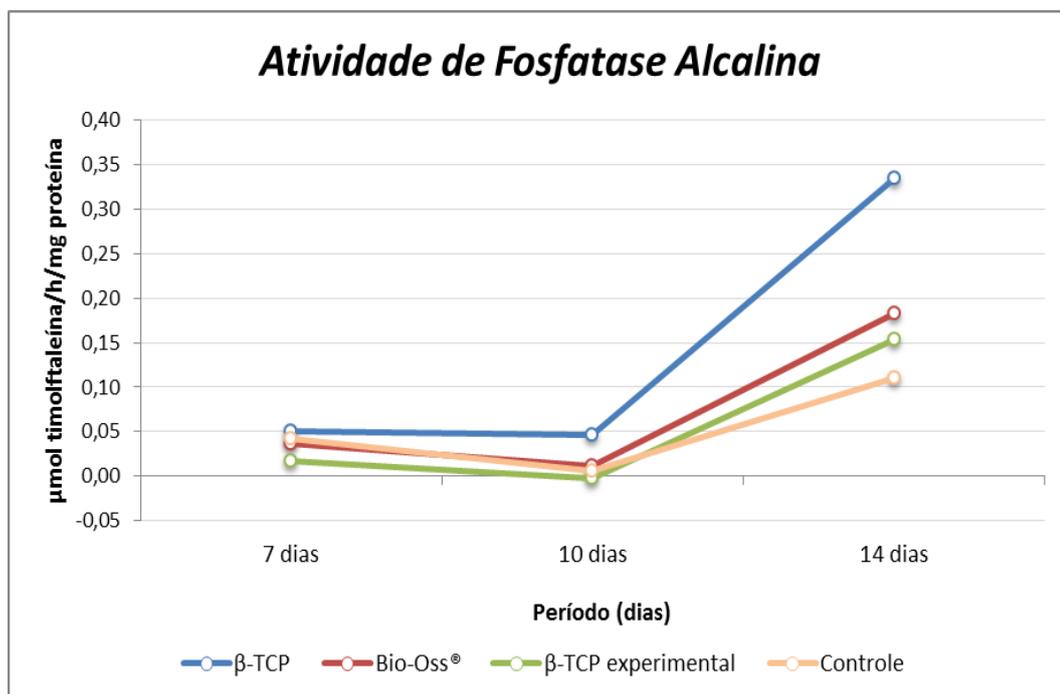


Figura 14 - Gráfico que representa a evolução da atividade de fosfatase alcalina em $\mu\text{mol timolftaleína/h/mg proteína}$ nos períodos avaliados, dentro de cada grupo.

Tabela 10 - Valores de p dos dados obtidos na análise da atividade de fosfatase alcalina (ALP). Períodos experimentais comparados aos pares dentro dos grupos. Teste de Tukey ($p < 0,05$)

ALP		7 dias	10 dias
β -TCP	10 dias	0,999	
	14 dias	<0,001*	<0,001*
Bio-Oss®	10 dias	0,899	
	14 dias	0,036*	0,013*
β -TCP EXP	10 dias	0,899	
	14 dias	0,020*	0,007*

*Diferença estatisticamente significante
EXP - experimental

5.4 Análise qualitativa e quantitativa de formações nodulares de matriz mineralizada

Na análise qualitativa das formações de matriz mineralizada foi possível visualizar nos grupos controle, Bio-Oss® e β -TCP experimental uma grande quantidade de nódulos de mineralização após 14 dias de cultura das células em contato indireto com os materiais. Os poços contendo o substituto ósseo β -TCP ficaram excessivamente corados mesmo após sucessivas lavagens, preconizadas pelo protocolo, o que inviabilizou uma visualização precisa das formações nodulares de matriz mineralizada nesse grupo (Figura 15).

Do período de 14 dias para o de 21 dias, foi observado que grande parte das células morreram, levando ao destacamento de grande parte do tecido formado. Dessa forma, visualizou-se uma quantidade menor de formações nodulares de matriz mineralizada nos grupos controle, Bio-Oss® e β -TCP experimental. No grupo β -TCP foi novamente difícil a observação dos nódulos de mineralização devido a hipercoloração dos poços (Figura 16).

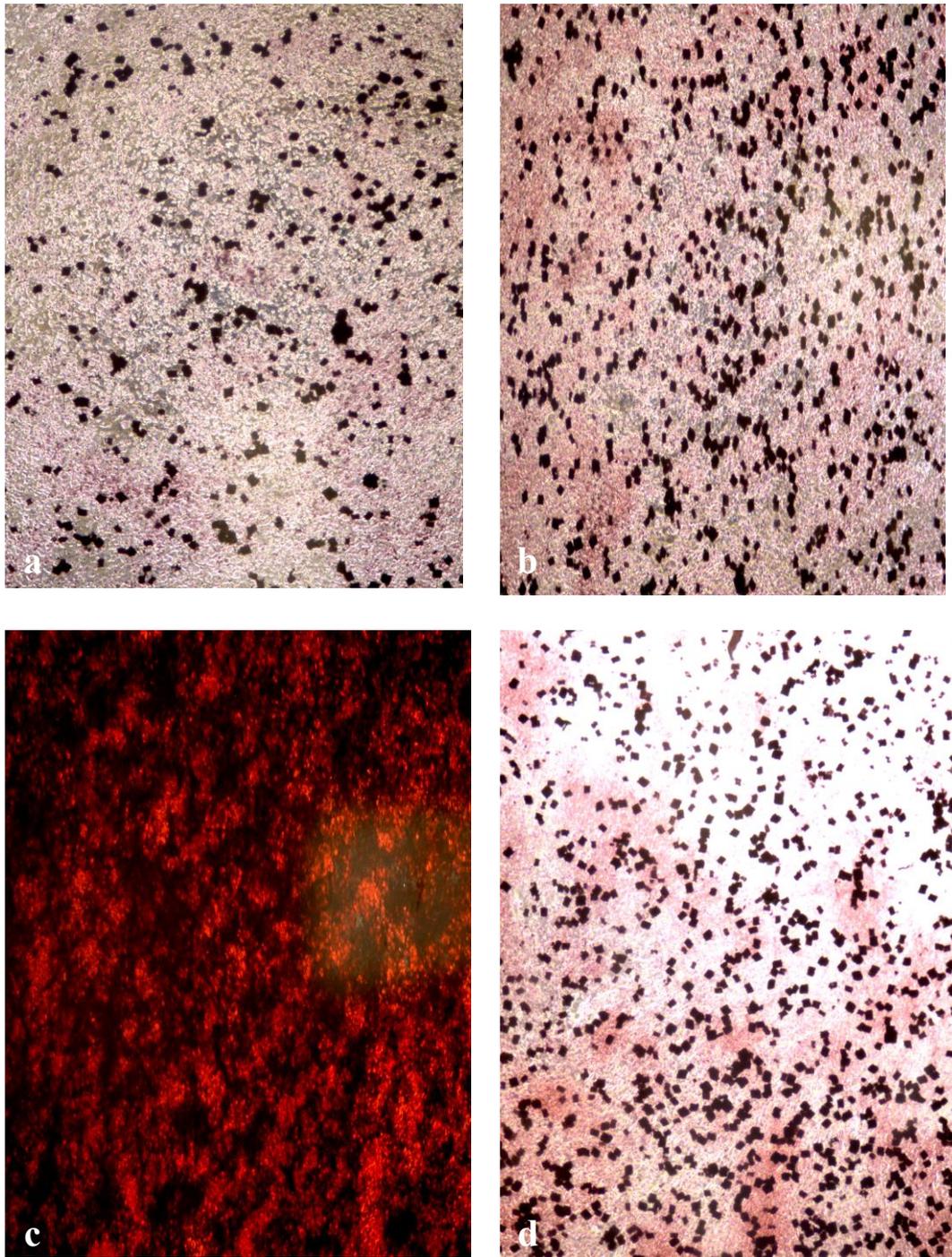


Figura 15 - Formações nodulares de matriz mineralizada aos 14 dias em aumento de 5x. a) Bio-Oss®; b) β -TCP experimental; c) β -TCP; d) controle.

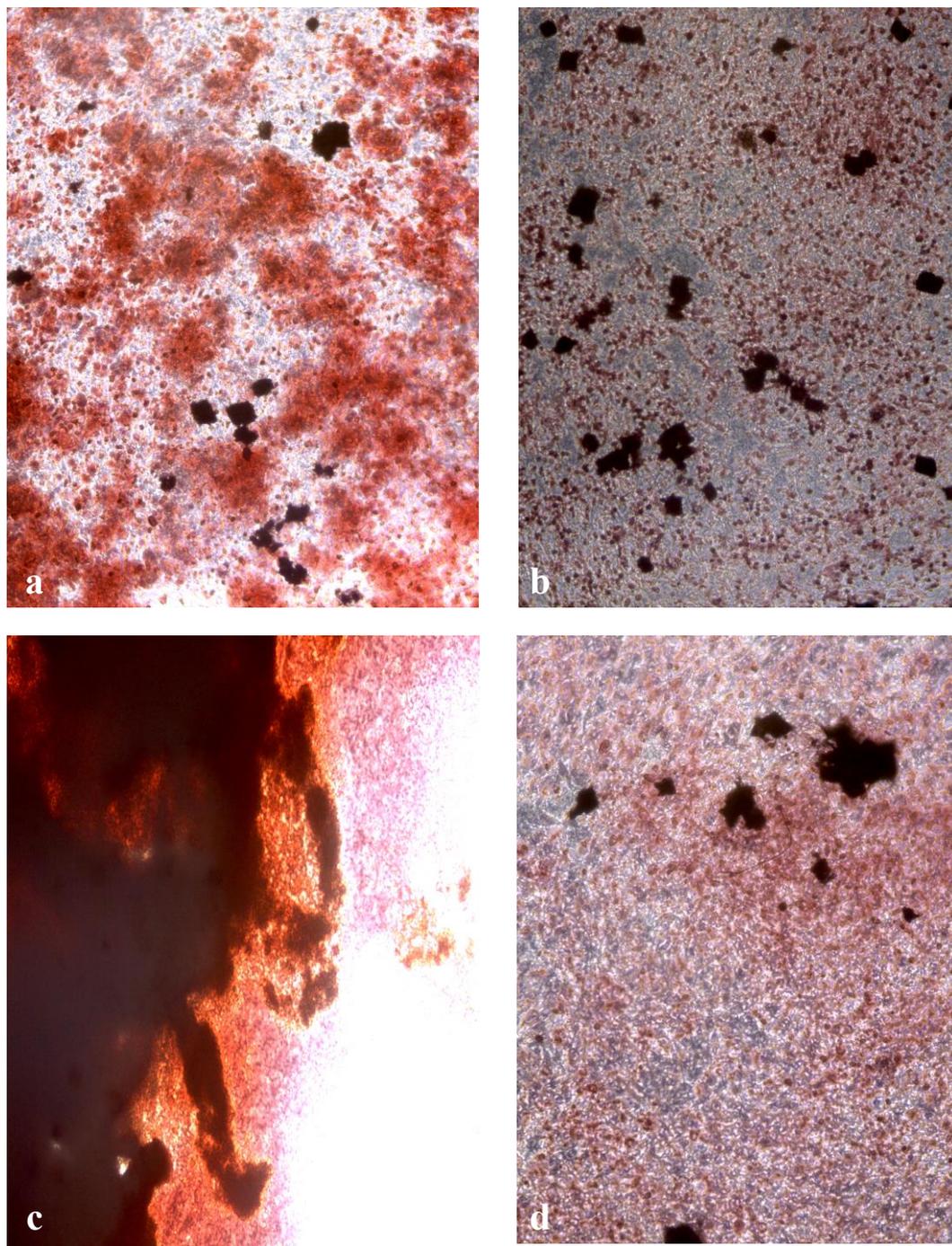


Figura 16 - Formações nodulares de matriz mineralizada aos 21 dias. a) Bio-Oss® (aumento de 10x); b) β -TCP experimental (aumento de 10x); c) β -TCP (aumento de 20x); d) controle (aumento de 20x).

A análise quantitativa das formações nodulares de matriz mineralizada foi realizada de modo que os dados obtidos foram transformados em porcentagem em relação ao grupo controle (100%). Dessa forma, as porcentagens de absorbância dos substitutos ósseos foram comparadas estatisticamente entre si e com o grupo controle dentro de cada período e também foram avaliadas as diferenças entre os períodos de 14 e 21 dias dentro de cada grupo.

O teste estatístico ANOVA indicou que existe diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre os substitutos ósseos em ambos os períodos, sendo que foi observado maiores médias de porcentagem no grupo β -TCP (Tabela 11 e Figura 17).

Verificou-se a partir da comparação múltipla de Tukey (Post Hoc) que o grupo β -TCP apresentou diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) para os demais substitutos ósseos em ambos os períodos, diferentemente do Bio-Oss® e β -TCP experimental que não se diferiram de maneira relevante em nenhum dos períodos (Tabela 12).

Tabela 11 - Média, mediana, desvio padrão, valor mínimo, valor máximo e p-valor das porcentagens de absorvância obtidas na análise quantitativa das formações nodulares de matriz mineralizada. Comparação entre os grupos dentro de cada período. Teste ANOVA ($p < 0,05$)

Quantificação dos Nódulos de Mineralização		Média	Mediana	Desvio Padrão	Valor Mínimo	Valor Máximo	P-valor
14 dias	β -TCP	1.104,6	1.108	284,5	728	1.732	<0,001*
	Bio-Oss®	240,1	209	80,7	160	429	
	β -TCP EXP	129,0	103	50,1	89	235	
21 dias	β -TCP	608,6	603	165,5	408	983	<0,001*
	Bio-Oss®	135,8	124	34,0	109	223	
	β -TCP EXP	109,9	111	16,1	82	130	

*Diferença estatisticamente significante

EXP – experimental

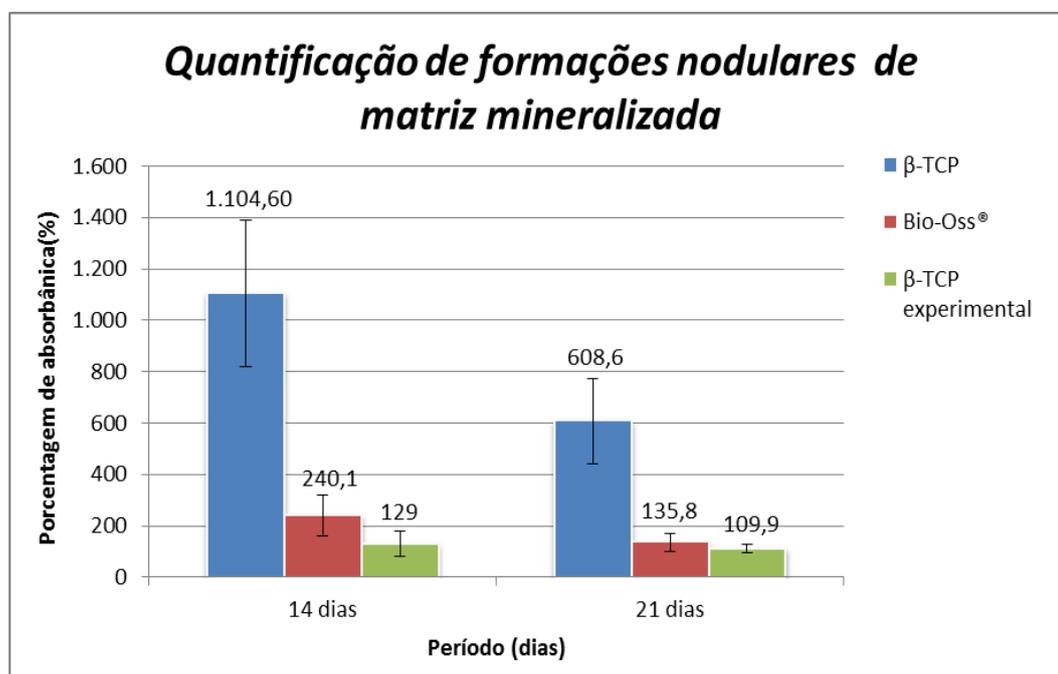


Figura 17 - Gráfico representativo das porcentagens de absorvância, obtidas na análise quantitativa de formação nodulares de matriz mineralizada, em cada grupo dentro dos períodos avaliados.

Tabela 12- Valores de p das porcentagens de absorvência obtidas na análise quantitativa de formações nodulares de matriz mineralizada. Grupos comparados dois a dois dentro do período de 14 e 21 dias. Teste de Tukey ($p < 0,05$)

		β -TCP	Bio-Oss®
14 dias	Bio-Oss®	<0,001*	
	β -TCP EXP	<0,001*	0,338
21 dias	Bio-Oss®	<0,001*	
	β -TCP EXP	<0,001*	0,826

*Diferença estatisticamente significante
EXP - experimental

As porcentagens de absorvência de cada substituto ósseo também foram comparadas estatisticamente com aquela apresentada pelo grupo controle, considerada como 100%. Para essa análise, os dados foram submetidos ao Teste Z. Verificou-se que o β -TCP experimental em ambos os períodos foi o único grupo que não se diferiu significativamente ($p < 0,05$) do grupo controle (Tabela 13).

A análise de cada grupo de acordo com a evolução dos períodos indicou, por meio do teste ANOVA, que os substitutos ósseos β -TCP e Bio-Oss® apresentaram diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre os períodos de 14 e 21 dias, o que não foi notado no grupo β -TCP experimental (Tabela 14). As maiores médias de porcentagem de absorvência foram observadas no período de 14 dias em todos os grupos (Figura 18).

Tabela 13 - Valores de p das porcentagens de absorbância obtidas na análise quantitativa de formações nodulares de matriz mineralizada. Comparação de cada substituto ósseo com o grupo controle (100%) em ambos os períodos. Teste de Z ($p < 0,05$)

Quantificação dos nódulos de mineralização	β -TCP		Bio-Oss®		β -TCP EXP	
	14 dias	21 dias	14 dias	21 dias	14 dias	21 dias
P-valor	<0,001*	<0,001*	<0,001*	0,009*	0,100	0,084

*Diferença estatisticamente significativa

EXP - experimental

Tabela 14 - Média, mediana, desvio padrão, valor mínimo, valor máximo e p-valor das porcentagens de absorbância obtidas na análise quantitativa das formações nodulares de matriz mineralizada. Comparação entre os períodos de cada substituto ósseo. Teste ANOVA ($p < 0,05$)

Quantificação dos nódulos de mineralização	β -TCP		Bio-Oss®		β -TCP EXP	
	14 dias	21 dias	14 dias	21 dias	14 dias	21 dias
Média	1.104,6	608,6	240,1	135,8	129,0	109,9
Mediana	1.108	603	209	124	103	111
Desvio Padrão	284,5	165,5	80,7	34,0	50,1	16,1
Valor Mínimo	728	408	160	109	89	82
Valor Máximo	1.732	983	429	223	235	130
P-valor	<0,001*		0,001*		0,265	

*Diferença estatisticamente significativa

EXP - experimental

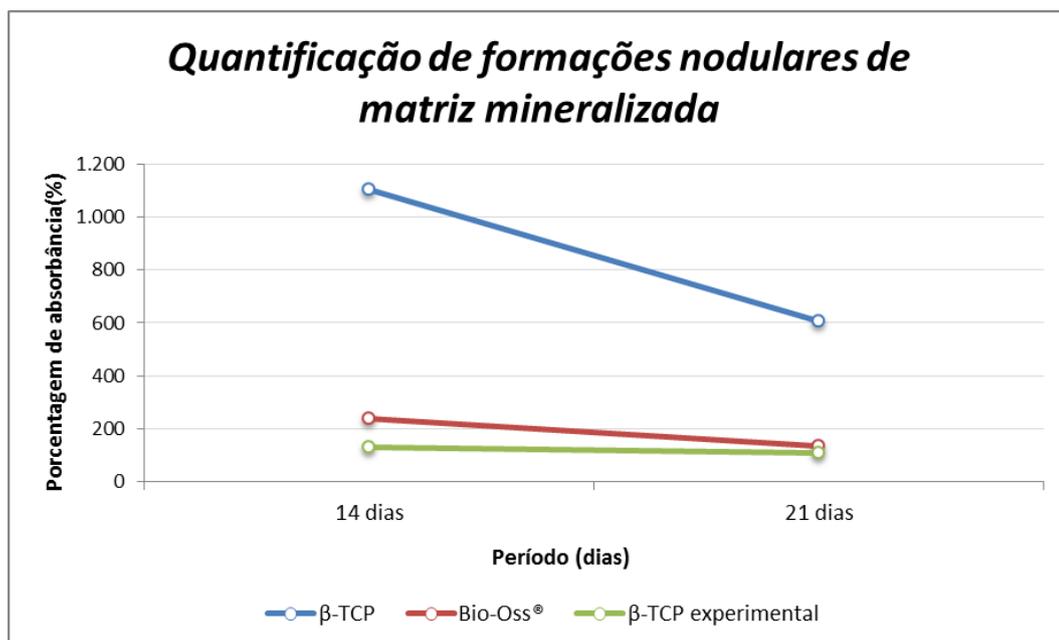


Figura 18 - Gráfico representativo das porcentagens de absorvância, obtidas na análise quantitativa de formações nodulares de matriz mineralizada, apresentando a evolução do período de 14 para o de 21 dias em cada substituto ósseo.

5.5 Ensaio de Genotoxicidade

A contagem de micronúcleos no ensaio de genotoxicidade indicou, através do teste estatístico ANOVA, que os substitutos ósseos avaliados no presente estudo não apresentam genotoxicidade. Todos os materiais e o grupo controle positivo (EMS) foram comparados ao controle negativo.

A análise estatística demonstrou que apenas o grupo controle positivo (EMS) apresentou diferenças estatisticamente significantes para o controle negativo, sendo que o número de micronúcleos contabilizados nas células em contato com o EMS foi

muito superior (Tabela 15). A média de micronúcleos apresentada pelos materiais em contato com os osteoblastos-*like* foi semelhante a do controle negativo e muito inferior aquela apresentada pelo controle positivo (EMS) (Figura 19).

Tabela 15 - Média, mediana, desvio padrão, valor máximo, valor mínimo e p-valor, dos dados obtidos na contagem de micronúcleos no teste MNT. Comparação dos substitutos ósseos com o grupo controle negativo. Teste ANOVA ($p < 0,05$)

Número de Micronúcleos	Controle Negativo	β-TCP	Bio-Oss®	β-TCP EXP	EMS
Média	13,0	14,3	13,5	14,3	65,5
Mediana	13,0	14,5	13,5	14,0	65,5
Desvio Padrão	1,8	1,7	2,4	2,2	4,9
Valor Mínimo	11,0	12,0	11,0	12,0	62,0
Valor Máximo	15,0	16,0	16,0	17,0	69,0
P-valor	-	0,944	0,998	0,944	<0,001*

*Diferença estatisticamente significativa
EXP - experimental

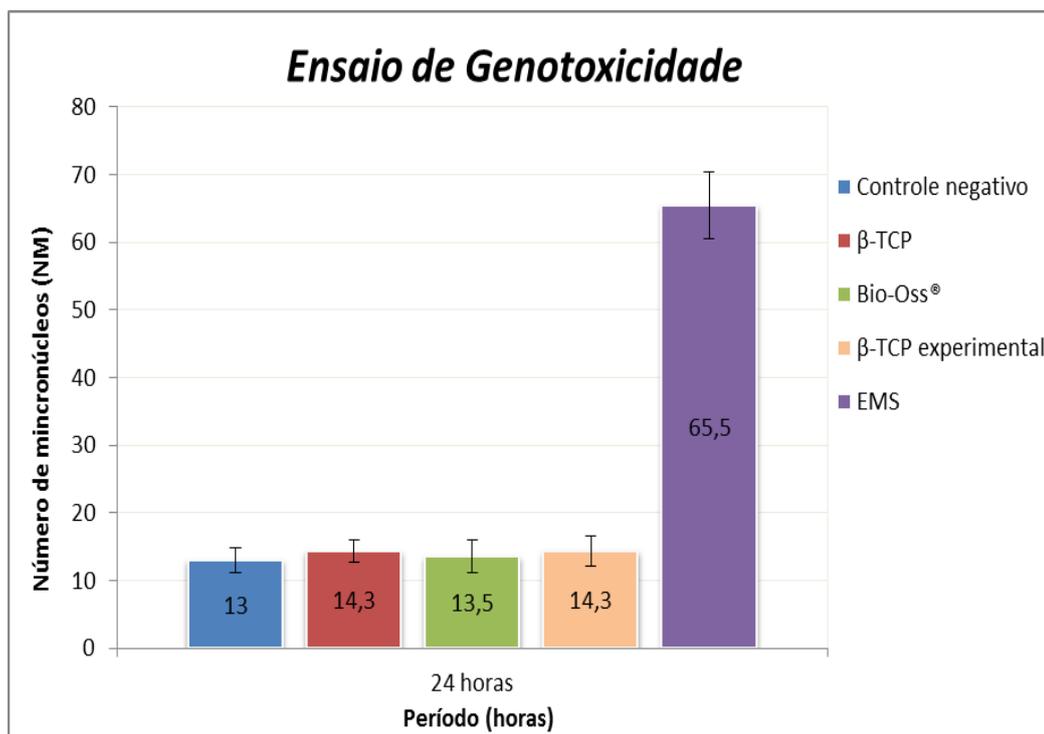


Figura 19 - Gráfico representativo das médias de micronúcleos, obtidas no teste MNT, dos substitutos ósseos, do controle negativo e do controle positivo (EMS), após 24 h.

6 DISCUSSÃO

Existe uma busca intensa na área médica e odontológica por materiais que possam substituir o tecido ósseo perdido com consequente restabelecimento anatômico e funcional do tecido ou órgão. O osso autógeno, apesar de ser considerado como padrão ouro para uso em enxertos, possui uso limitado uma vez que constitui fonte esgotável, causa sequelas no sítio doador, além de apresentar qualidades relacionadas à idade e estado geral de saúde do indivíduo (Zabeu, Mercadante, 2008).

Os materiais a base de fosfato de cálcio têm recebido relevante atenção nos últimos anos devido à sua semelhança mecânica e química com o tecido ósseo (Al-Sanabani et al., 2013). Podem ser caracterizados por possuírem origem natural ou sintética. Dentro do grupo pertencente a origem natural, destaca-se a hidroxiapatita, derivada de matriz mineral de tecido ósseo bovino (Cruz, 2004; Accorsi-Mendonça et al., 2008). Em relação às cerâmicas de origem sintética, são comumente utilizados como substitutos ósseos a hidroxiapatita sintética (HA), o beta fosfato tricálcico (β -TCP), e o fosfato de cálcio bifásico (HA + β -TCP) (Cruz, 2004; Yang et al., 2013).

No presente estudo, foram analisados dois substitutos ósseos comercialmente disponíveis e um material experimental.

Dentre os substitutos ósseos já comercializados, foram escolhidos uma hidroxiapatita bovina (Bio-Oss[®]) e uma cerâmica sintética, o β -TCP (Bionnovation).

Muitos trabalhos na literatura avaliaram o comportamento do Bio-Oss[®] sendo que tanto resultados negativos (Beloti et al., 2008; Bernhardt et al., 2011) como positivos têm sido obtidos em testes *in vivo* e *in vitro* (Sollazzo et al., 2010; Kim et al., 2010; Liu Q et al., 2011; Chaves et al., 2012).

Já em relação ao β -TCP da marca Bionnovation, não foram encontrados relatos na literatura. Apesar disso, o β -TCP de uma forma geral têm sido amplamente estudado e considerado biocompatível, osteocondutivo e reabsorvível (Shiratori et al., 2005; Hirota et al., 2009; Al-Sanabani et al., 2013).

O material experimental testado no presente trabalho corresponde a um β -TCP fabricado por rota de reação em estado sólido, o qual apresentou resultados mecânicos positivos (Oliveira et al., 2007). No entanto, este material ainda não foi testado quanto a sua biocompatibilidade.

Dessa forma, o presente trabalho avaliou a biocompatibilidade e os indicadores da osteogênese de osteoblastos-*like* em contato com os três substitutos ósseos apresentados. A metodologia utilizada foi baseada em trabalhos prévios que também analisaram o comportamento de células ósseas *in vitro* (Rosa et al., 2002; Rosa, Beloti, 2003; Beloti, Rosa, 2005; Rosa, Beloti, 2005; Simão et al., 2007; Beloti et al., 2008; De Oliva et al., 2009, Carvalho, 2011; Quan et al., 2013).

Os testes de biocompatibilidade indicaram que os materiais testados nesse estudo não apresentam citotoxicidade e nem genotoxicidade, podendo ser considerados biocompatíveis de acordo com as condições desse trabalho.

Com intuito de avaliar a citotoxicidade, foi utilizado o ensaio de MTT que mensurou a proliferação e viabilidade celular dos osteoblastos-*like* em contato com os substitutos ósseos. O teste de MTT está relacionado com capacidade de células viáveis converterem um sal de tetrazólio solúvel (MTT) num precipitado de formazan insolúvel. A redução de MTT ocorre principalmente na mitocôndria por meio da ação da enzima succinato desidrogenase fornecendo então uma medida de função mitocondrial das células (Huang, Chang, 2002). No presente estudo, essa análise mostrou que o β -TCP e Bio-Oss® induziram proliferação celular de 130% e 105%, respectivamente, sendo maior que o grupo controle (100%). Já o β -TCP experimental promoveu diminuição das células viáveis (86%), comparado ao grupo controle, porém não foi citotóxico. A comparação entre os três substitutos ósseos indicou que após o período de 24 h, o β -TCP foi o material relacionado a maiores índices de proliferação e viabilidade celular.

A citotoxicidade de materiais em cultura de células pode ser analisada pelo método direto ou indireto. No método direto, a cultura celular se prolifera em contato diretamente com o material. Já no método indireto, as amostras são preparadas e colocadas em uma solução na qual os materiais são capazes de liberar suas substâncias formando extratos (Schmalz, 1994).

No presente estudo a citotoxicidade de substitutos ósseos foi mensurada utilizando extratos a partir desses materiais (método indireto).

No entanto, alguns estudos utilizaram a análise de substitutos ósseos pelo método direto. Beloti et al. (2008) não perceberam diferenças estatisticamente significativas de proliferação e viabilidade celular entre o Bio-Oss® e grupo controle após 24 h do plaqueamento celular. A diferença desses resultados em relação ao presente trabalho pode estar relacionada ao método de análise da proliferação e viabilidade celular, que por esses autores, foi feito pela coloração de células viáveis através do azul de Trypan. Além disso, as células ficaram previamente em contato direto com o Bio-Oss® por no mínimo seis meses (*in vivo*), antes de serem realizados os procedimentos *in vitro* com as células humanas.

Ainda Bernhardt et al. (2011) verificaram que o Bio-Oss® não foi capaz de induzir proliferação celular sobre osteoblastos-like (SaOS-2) *in vitro* em períodos de 24 h a 28 dias em contato direto com esse substituto ósseo. A diferença de comportamento do Bio-Oss® verificada nesse estudo, comparada ao presente trabalho, pode estar relacionada a colocação dos substitutos ósseos em contato direto com as células. Porém nesse mesmo estudo o β -TCP (Cerasorb) e a hidroxiapatita (Osbone) induziram proliferação das células, assim como foi observado no presente trabalho.

Tavares et al. (2013) observaram que o β -TCP não se diferiu do grupo controle no teste de proliferação e viabilidade celular após 24 h de contato indireto desse material com células MC3T3. A

diferença de comportamento do β -TCP encontrada por esses autores comparada aos resultados deste trabalho pode estar relacionada, não ao método indireto, mas a maior concentração de substituto ósseo (100 mg/ml substituto ósseo/ meio) ou ainda a diferença da marca do β -TCP (Merck). No presente trabalho, a concentração preconizada foi de 16 mg/ml (substituto ósseo/meio) de acordo com estudo realizado por Vaziri et al. (2012).

A presença de mutações cromossômicas no DNA celular foi avaliada pelo teste MNT, o qual possui a capacidade de detectar formação de micronúcleos na interfase do ciclo celular normal. A formação destes micronúcleos indica que houve alteração irreversível do DNA durante a replicação celular (Schweikl, Schmalz, 2000). O EMS é reconhecidamente uma substância genotóxica, pois causa mutação genética e induz formação de micronúcleos (Schweikl, Schmalz, 2000). Devido a estas características, este material foi utilizado como controle positivo no presente estudo, e o mesmo causou aumento significativo no número de micronúcleos em osteoblastos-*like*, comprovando o seu potencial genotóxico.

No presente estudo, os três substitutos ósseos testados não foram capazes de aumentar o número de micronúcleos significativamente em relação ao grupo tratado com EMS (controle positivo). Estes materiais apresentaram um número de micronúcleos semelhante ao grupo não tratado (controle negativo), indicando que estes materiais não são genotóxicos nas condições experimentais do estudo.

Quan et al. (2013) observaram que a hidroxiapatita pura não induz genotoxicidade em osteoblastos, achado que condiz com o presente estudo. Entretanto, não existem muitos trabalhos na literatura abordando a respeito da genotoxicidade dos substitutos ósseos avaliados. Esperava-se que o β -TCP e Bio-Oss® não apresentassem genotoxicidade, já que são substitutos ósseos comercializados com bons resultados *in vivo*. Essa hipótese foi confirmada, juntamente com o fato de que o β -TCP experimental também não induziu genotoxicidade.

Os indicadores da osteogênese foram analisados nesse estudo através da avaliação do conteúdo de proteína total, atividade de fosfatase alcalina e também pela análise qualitativa e quantitativa de formação de matriz mineralizada. Sabe-se que o conteúdo de proteína total está relacionado com a capacidade de síntese das células, sendo considerado um parâmetro importante na avaliação da osteogênese *in vitro* (Beloti, Rosa, 2005; Rosa, Beloti, 2005; Andrade, 2011). No presente estudo o conteúdo de proteína total foi avaliado pelo método modificado de Lowry (Lowry et al., 1951), nos períodos de 7, 10 e 14 dias.

Rosa et al. (2002) ao avaliarem a topografia de superfície da hidroxiapatita, perceberam que o conteúdo de proteína total não é afetado pelos períodos de avaliação. Já Beloti et al. (2008) verificaram que o conteúdo de proteína total aumentou nos períodos de 10 a 14 dias nos grupos controle e Bio-Oss®, sendo que os valores encontrados no grupo Bio-Oss® foram significativamente maiores que aqueles apresentados pelo grupo controle. Diferentemente, no presente

trabalho foi notado que o pico de síntese de proteína total das células em contato com o Bio-Oss® ocorreu aos 10 dias.

Observou-se também que dentre os materiais avaliados neste estudo, aquele que apresentou maior síntese de proteína total foi o β -TCP. Embora não tenha sido observado diferença estatística significativa entre os períodos de análise das células em contato com esse substituto ósseo, observou-se que esse material aumentou sua síntese com o passar dos dias, apresentando maior conteúdo de proteína total aos 14 dias. A alta atividade de síntese dos osteoblastos-*like* em contato com β -TCP mostrou que esse material apresenta um importante indicador da osteogênese *in vitro*. Trata-se de um achado importante, pois existe uma carência na literatura de trabalhos avaliando o conteúdo de proteína total das células em contato com os substitutos ósseos, especialmente em relação ao β -TCP. Com relação ao β -TCP experimental verificou-se que houve maior conteúdo de proteína total no 10º dia, semelhante ao Bio-Oss®.

Outro importante fator indicador da osteogênese é a produção da enzima fosfatase alcalina, a qual está localizada na superfície externa da célula, onde exerce sua atividade (Szejnfeld, 2000; Mödder, Klosla, 2008). A fosfatase alcalina está relacionada com a mineralização do tecido ósseo, sendo responsável pela captação de íons fosfato durante o processo da osteogênese. Assim, em estudos *in vitro*, a diferenciação celular pode ser avaliada pelos níveis de atividade de fosfatase alcalina (Carvalho, 2011). A atividade dessa

enzima foi mensurada no presente estudo pelos mesmos lisados obtidos na análise do conteúdo de proteína total aos 7, 10 e 14 dias.

Os dados relacionados a atividade de fosfatase alcalina indicaram maior produção dessa enzima pelo β -TCP em todos os períodos, comparado aos outros substitutos ósseos. Verificou-se que o Bio-Oss® e o β -TCP experimental apresentaram diminuição da quantidade de fosfatase alcalina de 7 para 10 dias. Após 14 dias, foi observado no presente estudo que a atividade de fosfatase alcalina foi maior em todos os substitutos ósseos.

Beloti et al. (2008) observaram que as células em contato com o Bio-Oss® apresentaram atividade de fosfatase alcalina estatisticamente inferior comparado com as células do grupo controle nos períodos de 7, 10 e 14 dias. Rosa et al. (2002) não observaram diferenças na atividade de fosfatase alcalina nos períodos de 10 e 14 dias de cultura, em nenhuma das diferentes porosidades de hidroxapatita avaliadas. Esses resultados são divergentes daqueles encontrados no presente estudo, uma vez que neste trabalho o Bio-Oss® não diferiu do grupo controle em nenhum dos períodos avaliados, sendo ainda que aos 14 dias apresentou maior nível de fosfatase alcalina comparado aos outros períodos.

Já Bernhardt et al. (2011) observaram que o β -TCP (Cerasorb M) em geral apresentou maior atividade de fosfatase alcalina comparada a hidroxapatita sintética (Osbone). Esses achados estão em parte de acordo com os resultados encontrados no presente estudo, uma vez que o β -TCP foi o substituto ósseo que exibiu as maiores médias de atividade de fosfatase alcalina.

Kubler et al. (2004) avaliaram a hidroxiapatita (Algipore[®]), α -fosfato tricálcico (Bio-Base[®]), hidroxiapatita bovina de baixa temperatura (Bio-Oss[®]), hidroxiapatita bovina de alta temperatura (Osteograf[®]), e hidroxiapatita bovina de alta temperatura com peptídeo sintético (Pep-Gen p-15[®]). Esses autores observaram que atividade de fosfatase alcalina aumentou entre os grupos com o passar dos períodos, apesar de ter sido maior no grupo controle. Bernhardt et al. (2011) também constataram que a atividade de fosfatase alcalina aumentou nos materiais estudados com o passar dos períodos, em uma análise de até 28 dias. Esse achados são condizentes com aqueles encontrados no presente trabalho, pois apesar de ter ocorrido um pequeno decréscimo na atividade de fosfatase alcalina no período de 7 para o de 10 dias, houve um aumento relevante de produção dessa enzima no 14^o dia por todos os substitutos ósseos.

Alguns autores observaram correlação entre a atividade de fosfatase alcalina e produção de matriz mineralizada por células osteoblásticas (Sugawara et al., 2002; Beloti, Rosa, 2005; Rosa, Beloti, 2005). O processo de mineralização da matriz corresponde ao evento final de formação de tecido ósseo (Rosa et al., 2009), e em estudos utilizando culturas osteogênicas tem sido considerado um importante parâmetro *in vitro*, que indica a presença da diferenciação celular (Hoemann et al., 2009).

Nesse estudo foi realizada uma análise qualitativa e também quantitativa da formação de matriz mineralizada das células osteoblásticas, em contato com os substitutos ósseos, nos períodos de 14 e 21 dias.

A análise qualitativa revelou que aos 14 dias houve formação de nódulos de mineralização nos grupos Bio-Oss®, β -TCP experimental e também controle. Essa formação de matriz mineralizada manteve um padrão homogêneo entre os grupos, inclusive no grupo controle, o que indica que as formações mineirais observadas caracterizavam nódulos de mineralização verdadeiros.

Já no grupo β -TCP não foi possível a visualização adequada dos nódulos de mineralização, em nenhum dos períodos avaliados, uma vez que mesmo após sucessivas lavagens, preconizadas pelo protocolo de Gregory et al. (2004), os poços continuaram hipercolorados. As possíveis hipóteses para esse problema podem estar relacionadas com a forma de preparo e com as características físico-químicas desse substituto ósseo, que podem ter induzido uma grande liberação de seus componentes no meio, favorecendo a uma formação excessiva de nódulos de mineralização.

No período de 21 dias, o tecido formado no interior dos poços destacou-se de forma relevante em todos os grupos, levando consigo células mortas e provavelmente nódulos de mineralização já formados. Então, foi visualizada uma quantidade menor de formação de matriz mineralizada comparada ao período de 14 dias em todos os grupos. Uma hipótese para a morte dos osteoblastos-*like* pode ser a associação do tempo prologando de cultura celular com a intensa proliferação destas células *in vitro*.

A análise quantitativa foi realizada por meio da extração do corante dos poços utilizando ácido acético. Segundo Gregory et al. (2004), esse método produz pouca variabilidade de

resultados, além de apresentar grande especificidade, uma vez que detecta pequenos níveis de incorporação de mineral dentro das células.

Foi observado nessa análise que o β -TCP foi estatisticamente diferente dos demais grupos, apresentando maiores níveis de corante, indicativos de maior formação de matriz mineralizada. Apesar do β -TCP ter apresentado os melhores resultados, o substituto ósseo Bio-Oss® também mostrou índices de formação de nódulos de mineralização maiores que aqueles apresentados pelo grupo controle. Em relação aos períodos de avaliação, houve um decréscimo de valores do período de 14 para o de 21 dias, o qual apenas não foi significativo no grupo β -TCP experimental.

Têm sido observado correlação entre a atividade de fosfatase alcalina e a produção de matriz mineralizada por osteoblastos (Sugawara et al., 2002; Beloti, Rosa, 2005; Rosa, Beloti, 2005). Dessa forma, os altos níveis de fosfatase alcalina produzido pelo β -TCP aos 14 dias estão correlacionados com a grande formação de matriz mineralizada por esse material neste mesmo período.

Na literatura verifica-se poucos estudos abordando sobre a formação de nódulos de mineralização por células em contato com substitutos ósseos, principalmente em relação ao β -TCP. Beloti et al. (2008) observaram menor formação de nódulos de mineralização pelo grupo Bio-Oss® comparado ao grupo controle no período de 21 dias. No entanto, esses autores apenas avaliaram esse único período e apresentaram condições de estudo diferentes da realizada no presente trabalho.

Ni et al. (2011) estudaram o efeito da incorporação do estrôncio em uma hidroxiapatita, observando maior formação de nódulos de mineralização pelas células em contato indireto com este material. Ainda visualizaram que no período de 21 dias, houve maior formação de nódulos de mineralização em todos os grupos comparados aos do período de 14 dias. A diferença desses resultados, para os do presente estudo, em relação ao período de formação dos nódulos de mineralização, pode estar relacionada a utilização de osteoblastos primários de ratos por esses autores, os quais podem ter apresentado baixa taxa de proliferação ao longo dos 21 dias.

Vaziri et al. (2012) observaram maior formação de nódulos de mineralização por células SaOS-2, após 5 dias de contato indireto com substitutos ósseos alógenos, na concentração de 16 mg/mL (substituto ósseo/meio), comparada a de 8 mg/mL. Então, pode-se dizer que essa concentração de material em contato indireto com as células foi positiva, promovendo a formação de matriz mineralizada, o que concorda com os resultados do presente estudo no qual foi utilizado a mesma concentração (16 mg/mL).

Os testes indicadores da osteogênese, mostraram nas condições desse trabalho, que o β -TCP promoveu excelentes condições para a osteogênese *in vitro*, superiores àquelas apresentadas pelo Bio-Oss® e β -TCP experimental. Além disso, foi observado que os materiais estudados não apresentaram citotoxicidade e genotoxicidade, podendo ser considerados biocompatíveis *in vitro*.

No entanto, o β -TCP experimental ainda precisa ser testado *in vivo* quanto a suas propriedades biológicas antes de ser

utilizado em aplicações clínicas, por se tratar de um material experimental. O β -TCP (Bionnovation), apesar de ser um material já comercializado e que apresentou excelentes características *in vitro* também deveria ser avaliado *in vivo*, já que estudos relacionados ao β -TCP dessa marca não foram encontrados na literatura.

7 CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados nessa dissertação foi possível concluir que o β -TCP (Bionnovation), Bio-Oss® e β -TCP experimental foram substitutos ósseos biocompatíveis, pois não foram citotóxicos e nem genotóxicos sobre osteoblastos-*like*. Concluiu-se também que, os três substitutos ósseos avaliados induziram a osteogênese *in vitro*. Ainda, o β -TCP (Bionnovation) foi o material que promoveu maior proliferação celular e osteogênese, comparado aos outros materiais, nas condições em que este estudo foi realizado.

8 REFERÊNCIAS*

Aarvold A, Smith JO, Tayton ER, Lanham SA, Chaudhuri JB, Turner IG, et al. The effect of porosity of a biphasic ceramic *scaffold* on human skeletal stem cell growth and differentiation *in vivo*. J Biomed Mater Res A. 2013 Dec;101(12):3431-7.

Accorsi-Mendonça T, Conz MB, Barros TC, Sena LA, Soares GA, Granjeiro JM. Physicochemical characterization of two deproteinized bovine xenografts. Braz Oral Res. 2008 Jan-Mar; 22(1):5-10.

Al-Sanabani JS, Madfa AA, Al-Sanabani FA. Application of calcium phosphate materials in dentistry. Int J Biomater. 2013; 2013:876132. doi:10.1155/2013/876132. Epub 2013 Jun 26.

Andrade DP. Biocompatibilidade *in vitro* em amostras densas e porosas de titânio-35nióbio submetidas a tratamento biomimético [tese]. São José dos Campos(SP): Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2011.

Andrighetti-Fröhner CR, Kratz JM, Antonio RV, Creczynski-Pasa TB, Barardi CRM, Simões CMO. *In vitro* testing for genotoxicity of violacein assessed by comet and micronucleus assays. Mutat Res. 2006 Jan;603(1):97-103.

Asrari M, Lobner D. *In Vitro* Neurotoxic Evaluation of Root-end-filling Materials. J Endod. 2003 Nov;29(11):743-6.

* Baseado em:

International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [acesso ago. 2008] Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Bassi AP, Carvalho PS. Repair of bone cavities in dogs mandible filled with inorganic bovine bone and bioactive glass associated with platelet rich plasma. *Braz Dent J.* 2011;22(1):14-20.

Beloti MM, Rosa AL. Osteoblast differentiation of human bone marrow cells under continuous treatment with dexamethasone. *Braz Dent J.* 2005;16(2):156-61.

Beloti MM, Martins WJ, Xavier SP, Rosa AL. *In vitro* osteogenesis induced by cells derived from sites submitted to sinus grafting with an organic bovine bone. *Clin Oral Implants Res.* 2008 Jan;19(1):48-54.

Bernhardt A, Lode A, Peters F, Gelinsky M. Novel ceramic bone replacement material Osbones in a comparative *in vitro* study with osteoblasts. 2011 Jun;22(6):651-7.

Bernhardt A, Lode A, Peters F, Gelinsky M. Comparative evaluation of different calcium phosphate-based bone graft granules – an *in vitro* study with osteoblast-like cells. *Clin Oral Implants Res.* 2013 Apr;24(4):441-9.

Boss JH, Shayrawi I, Aunullah J, Mendes DG. The relative of biocompatibility. A critical of the concept of biocompatibility. *Israel J Med Sci.* 1995 Apr;31(4):203-9.

Bouillaguet S, Wataha JC, Lockwood PE, Galgano C, Golay A, Krejci I. Cytotoxicity and sealing properties of four classes of endodontic sealers evaluated by succinil dehydrogenase activity and confocal laser scanning microscopy. *Eur J Oral Sci.* 2004 Apr; 112(2):182–7.

Brtrovic BMB, Prasad HS, Konandreas G, Milan R, Antunovic D, Sándor GKB, et al. Simple preservation of a maxillary extraction socket using beta-tricalcium phosphate with type I collagen: preliminary clinical and histomorphometric observations. *J Can Dent Assoc.* 2008;74(6)1488-2159.

Burchardt H. The biology of bone graft repair. *Clin Orthop Relat Res.* 1983 Apr;(174):28-42.

Çakmak S, Çakmak AS, Gumusderelioglu M. RGD-bearing peptide-amphiphilehydroxyapatite nanocomposite bone *scaffold*: an *in vitro* study. *Biomed Mater*. 2013 Aug;8(4):045014. doi:10.1088/1748-6041/8/4/045014. Epub 2013 Jul 16.

Calle JD, Sañudo C, Verde LS, Renedo RJG, Arozamena J, Riancho JA. Epigenetic regulation of alkaline phosphatase in human cells of the osteoblastic lineage. *Bone*. 2011 Oct;49(4):830–8.

Calixto RFE. Implante de um floculado de resina derivada de óleo de mamona (*Ricinus Communis*) em alvéolo de rato imediatamente após a extração dental. Avaliações histológica e histométrica da biocompatibilidade e da cronologia do reparo ósseo [dissertação]. Ribeirão Preto(SP): Universidade de São Paulo; 2001a.

Calixto RFE, Teófilo JM, Brentegant LG, Lamano Carvalho TL. Implantation of flakes of castor oil resin in rat dental alveolus. *Pesqui Odontol Bras*. 2001b Jul-Sep;15(3):257-62.

Camargo PM, Lekovik V, Weinlaender M, Klollebold R, Kenney EB, Dimitrijevic B, et al. Influence of bioactive glass on changes in alveolar process dimensions after exodontia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 2000 Nov;90(5):581-6.

Camilleri J, Pitt Ford TR. Mineral trioxide aggregate: a review of the constituents and biological properties of the material. *Int Endod J*. 2006 Oct;39(10):747–54.

Camps J, Salomon JP, Pertot WJ, Dejou J. The coherence between 3 evaluation methods of biocompatibility. *J Biol Buccale*. 1992 Dec;20(4):211–7.

Cao L, Duan PG, Wang HR, Li XL, Yuan FL, Fan ZY, et al. Degradation and osteogenic potencial of a novel poly(lactic acid)/nano-sized β -tricalcium phosphate *scaffold*. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:5881-8.

Carvalho ICS. Efeito do álcool em osteoblastos de recém-nascidos de ratas submetidas ao consumo crônico de etanol [dissertação]. São José dos Campos(SP) : Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2011.

Cavalcanti BN, Rode SM, Marques MM. Cytotoxicity of substances leached or dissolved from pulp capping materials. *Int Endod J.* 2005 Aug;38(8):505-9.

Chan C, Thompson I, Robinson P, Wilson J, Hench L. Evaluation of Bioglass/dextran composite as a bone graft substitute. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2002 Feb;31(1):73-7.

Chang YC, Huang FM, Cheng MH, Chou LS, Chou MY. *In vitro* evaluation of the cytotoxicity and genotoxicity of root canal medicines on human pulp fibroblasts. *J Endod.* 1998 Sep; 24(9):604-6.

Chaves MD, Nunes LLS, Oliveira, RV, Holgado LA, Filho HN, Matsumoto MA, Ribeiro DA. Bovine hydroxyapatite (Bio-Oss®) induces osteocalcin, RANK-L and osteoprotegerin expression in sinus lift of rabbits. *J Craniomaxillofac Surg.* 2012 Dec;40(8):315-20.

Cox SC, Jamshidi P, Grover LM, Mallick KK. Low temperature aqueous precipitation of needle-*like* nanophase hydroxyapatite. *J Mater Sci Mater Med.* 2013 Sep. doi : 10.1007/s10856-013-5042-y. [Epub ahead of print]

Cruz ACC. Caracterização físico-química e avaliação de biocompatibilidade de biovidros - Estudo laboratorial e histomorfométrico em ratos [dissertação]. Ponta Grossa(PR): Universidade Estadual de Ponta Grossa; 2004.

De-Deus G, Ximenes R, Gurgel-Filho ED, Plotkowski MC, Coutinho-Filho T. Cytotoxicity of MTA and Portland cement on human ECV 304 endothelial cells. *Int Endod J.* 2005 Sep;38(9):604-9.

De Oliva MA, Maximiano WMA, Castro LMS, Silva PL, Fernandes RR, Ciancaglini P, et al. Treatment with a growth factor-protein mixture inhibits formation of mineralized nodules in osteogenic cell cultures grown on titanium. *J Histochem Cytochem.* 2009 Mar;57(3):265-76.

Desterro FP. Comparação das características físico-químicas de três ossos bovinos inorgânicos e seu comportamento *in vitro*. [dissertação]. Duque de Caxias (RJ): Universidade do Grande Rio Prof. José de Souza Herdy; 2012.

Doostmohammadi A, Monshi A, Salehi R, Fathi MH, Seyedjafari E, Shafiee A, et al. Cytotoxicity evaluation of 63 S bioactive glass and bone derived hydroxyapatite particles using human bone-marrow stem cells. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2011 Dec;155(4):323-6.

Dos Santos LA, Carrodéguas RG, Rogero SO, Higa OZ, Boschi AO, De Arruda ACF. Alpha-tricalcium phosphate cement: “*in vitro*” cytotoxicity. *Biomaterials.* 2002 May;23(9):2035-42.

Draenert M, Draenert A, Draenert K. Osseointegration of hydroxyapatite and remodeling resorption of tricalciumphosphate ceramics. *Microsc Res Tech.* 2013 Apr;76(4):370-80.

Eleftheriadis E, Leventis M, Tosios k, Faratzis G, Titsinidis S, Dontas I. Osteogenic activity of β -TCP in a hydroxly sulphate matrix and desmineralized bone matrix: a histological study in rabbit mandible. *J Oral Sci.* 2010 Sep;52(3):377-84.

Ferreira JRM, Dalapícula SS, Conz MB, Vidigal Júnior GM. Xenogenic bone grafts used in oral Implantology. *ImplantNews.* 2007;4(3):303-6.

Figueira EA. Avaliação clínica, histológica e imunológica de enxertos ósseos alógenos fresco-congelados utilizados como técnica na preservação de rebordo alveolar pós- extração [tese]. Bauru(SP): Universidade de São Paulo; 2011.

Fontana V. Análise da expressão gênica em células tronco mesenquimais de medula óssea humana durante o comprometimento com a linhagem osteogênica [dissertação]. Ribeirão Preto (SP): Universidade de São Paulo; 2009.

Garofalo GS. Autogenous, allogenic and xenogenic grafts for maxillary sinus elevation: literature review, current status and prospects. *Minerva Stomatol.* 2007 Jul-Aug;56(7-8):373-92.

Gregory AC, Gunn WG, Peister A, Prockop DJ. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal Biochem.* 2004 Jun;329(1):77-84.

Hirota M, Matori Y, Mizuki N, Kishi T, Watanuki K, Ozawa T, et al. Combination with allogenic bone reduces early absorption of β -tricalcium phosphate (β -TCP) and enhances the role as a bone regeneration *scaffold*. Experimental animal study in rat mandibular bone defects. *Dental Mater J.* 2009 Mar;28(2):153-61.

Hoemann CD, El-Gabalawy H, McKee MD. *In vitro* osteogenesis assays: influence of the primary cell source on alkaline phosphatase activity and mineralization. *Pathol Biol (Paris).* 2009 Jun;57(4):318-23.

Huang FM, Chang YC. Cytotoxicity of resin-based restorative materials on human pulp cell cultures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002 Sep;94(3):361-5.

Irinakis T. Rationale for socket preservation after extraction of a single rooted tooth when planning for future implant placement. *J Can Dent Assoc.* 2006 Dec;72(10):917-22.

Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells *in vitro*. *J Cell Biochem.* 1997 Feb;64(2):295–312.

Jo YK, kim KH, Koo KT, Kim TI, Seol YJ, Lee YM, et al. Initial adhesion of bone marrow stromal cells to various bone graft substitutes. *J Periodontal Implant Sci.* 2011 Apr;41(2):67-72.

Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.

Kadow-Romacker A, Greiner S, Schmidmaier G, Wildemann B. Effect of β -tricalcium phosphate coated with zoledronic acid on human osteoblasts and human osteoclasts *in vitro*. *J Biomater Appl.* 2013 Jan;27(5):577-85.

Kanayama K, Sriarj W, Shimokawa H, Ohya K, Doi Y, Shibutani T. Osteoclast and osteoblast activities on carbonate apatite plates in cell cultures. *J Biomater Appl.* 2011 Nov;26(4):435-49.

Katchburian E, Arana V. *Histologia e Embriologia Oral.* 2.ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan;2004.

Kim DK, Lee S-J, Cho TH, Hui P, Kwon M-S, Hwang SJ. Comparison of a synthetic bone substitute composed of carbonated apatite with an anorganic bovine xenograft in particulate forms in a canine maxillary augmentation model. *Clin Oral Implants Res.* 2010 Dec;21(12):1334-44.

Kübler A, Neugebauer J, Oh JH, Scheer M, Zöller JE. Growth and proliferation of human osteoblasts on different bone graft substitutes : an *in vitro* study. *Implant Dent.* 2004 Jun;13(2):171-9.

Lew KS, Othman R, Ishikawa K, Yeoh FY. Macroporous bioceramics: a remarkable material for bone regeneration. *J Biomater Appl.* 2012 Sep;27(3):345-58.

Liu Q, Douglas T, Zamponi C, Becker ST, Shen E, Savanthan S, et al. Comparison of *in vitro* biocompatibility of NanoBone® and BioOss® for humans osteoblasts. *Clin Oral Impl.* 2011 Nov; 22(11):1259-64.

Liu S, Jin F, Lin K, Lu J, Sun J, Chang J, et al. The effect of calcium silicate on *in vitro* physiochemical properties and *in vivo* osteogenesis, degradability and bioactivity of porous β -tricalcium phosphate bioceramics. *Biomed Mater*. 2013 Apr; 8(2):025008. doi: 10.1088/1748-6041/8/2/025008. Epub 2013 Feb 22.

Long MW. Osteogenesis and bone-marrow-derived cells. *Blood Cells Mol Dis*. 2001 May-Jun;27(3):677-90.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193(1):265-75.

Lourenço EJV. Avaliação da osteogênese com proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs) [tese]. Bauru(SP): Universidade de São Paulo; 2002.

Markazi NA, Fouroutan T, Kharazifa MJ. Comparison of cell viability and morphology of a human osteoblast-like cell line (SaOS-2) seeded on various bone substitute materials: An *in vitro* study. *Dent Res J (Isfahan)*. 2012 Jan;9(1):86–92.

Maus U, Andereya S, Gravius S, Ohnsorge JA, Niedhart C, Siebert CH. BMP-2 Incorporated in a Tricalcium Phosphate Bone Substitute Enhances Bone Remodeling in Sheep. *J Biomater Appl*. 2008 May;22(6): 559-76.

Mödder UI, Khosla S. Skeletal stem/osteoprogenitor cells: current concepts, alternate hypotheses, and relationship to the bone remodeling compartment. *J Cell Biochem*. 2008 Feb;103(2):393-400.

Munhoz EA. Avaliação radiográfica, biomecânica e microscópica de enxerto ósseo xenogênico associado a implantes de titânio em mandíbula de coelhos [tese]. Bauru(SP): Universidade de São Paulo; 2009.

Ni GX, Yao ZP, Huang GT, Liu WG, Lu WW. The effect of strontium incorporation in hydroxyapatite on osteoblasts *in vitro*. *J Mater Sci Mater Med*. 2011 Apr;22(4):961-7.

Oliveira AP, Motisuke M, Leal CV, Beppu MM. A Comparative study between β -TCP prepared by solid state reaction and by aqueous solution precipitation: application in cements. *Key Eng Mater*. 2007 Nov;361-363:355-358.

Panseri S, Cunha C, D'Alessandro T, Sandri M, Russo A, Giavaresi G, et al. Magnetic hydroxyapatite bone substitutes to enhance tissue regeneration: evaluation *in vitro* using osteoblast-like cells and *in vivo* in a bone defect. *PLoS One*. 2012;7(6):e38710. doi: 10.1371/journal.pone.0038710. Epub 2012 Jun 7.

Quan R, Tang Y, Huang Z, Xu J, Wu X, Yang D. Study on the genotoxicity of HA/ZrO₂ composite particles *in vitro*. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2013 Apr;33(3):1332-8.

Quattelbaum JB, Melloning JT, Hensel NF. Antigenicity of freeze-dried cortical bone allograft in human periodontal osseous defects. *J Periodontol*. 1998 Jun;59(6):394-7.

Ribeiro DA, Sugui MM, Matsumoto MA, Duarte MAH, Marques MEA, Salvadori DMF. Genotoxicity and cytotoxicity of mineral trioxide aggregate and regular and white Portland cements on Chinese hamster ovary (CHO) cells *in vitro*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006 Feb;101(2):258-61.

Robbins S, Cotran RS, Kumar V, Collins T. *Patologia estrutural e funcional*. Rio de Janeiro: Guanabara toogan; 2000.

Rokn AR, Khodadoostan MA, Reza Rasouli Ghahroudi AA, Motahhary P, Kharrazi Fard MJ, Bruyn HD, et al. Bone formation with two types of grafting materials: A histologic and histomorphometric study. *Open Dent J*. 2011;5:96-104.

Rosa AL, Beloti MM. Development of the osteoblast phenotype of

serial cell subcultures from human bone marrow. *Braz Dent J.* 2005;16(3):225-30.

Rosa AL, Beloti MM. TAK-778 enhances osteoblast differentiation of human bone marrow cells. *J Cel Biochem.* 2003Aug;89(6):1148-53.

Rosa AL, Beloti MM, Noort RV, Hatton AV, Devlin AJ. Surface topography of hidroxiapatite affects ROS17/2.8 cells response. *Pesqui Odontol Bras.* 2002 Jul-Sep;16(3):209-15.

Rosa AL, Crippa GE, De Oliveira PT, Taba Júnior M, Lefebvre L-P, Beloti MM. Human alveolar bone cell proliferation, expression of osteoblastic phenotype, and matrix mineralization on porous titanium produced by powder metallurgy. *Clin Oral Implants Res.* 2009 May;20(5):472-81.

Schallhorn RG. Postoperaive problems associated with iliac transplants. *J Periodontol.* 1972 Jan;43(1): 3-9.

Schmalz G. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials – advantages and limitations. *J Dent.* 1994;22 Suppl 2:S6-11.

Schweikl H, Hiller K-A, Bolay C, Kreissl M, Kreismann W, Nusser A, et al. Cytotoxic and mutagenic effects of dental composite materials. *Biomaterials.* 2005 May;26(14):1713-9.

Schweikl H, Schmalz G. The induction of micronuclei in V79 cells by the root canal filling material AH Plus. *Biomaterials.* 2000 May; 21(9):939-44.

Shiratori k, Matsuzaka k, koike Y, Murakami S, Shimono M, Inoue T. Bone formation in β -tricalcium phosphate-filled bone defects of the rat femur: morphometric analysis and expression of bone related protein mRNA. *Biomed Res.* 2005 Apr;26(2):51-9.

Shuai C, Li P, Liu J, Peng S. Optimization of TCP/HAP ratio for better properties of calcium phosphate *scaffold* via selective laser sintering. Mater Charact. 2013 Mar;77:23-31.

Simão AM, Beloti MM, Rosa AL, de Oliveira PT, Granjeiro JM, Pizauro JM, et al. Culture of osteogenic cells from human alveolar bone: a useful source of alkaline phosphatase. Cell Biol Int. 2007 Nov;31(11):1405-13.

Sollazzo V, Palmiere A, Scapoli L, Martinelli M, Girardi A, Alviano F, et al. Bio-Oss® acts on stem cells derived from peripheral blood. Oman Med J. 2010 Jan;25(1):26-31.

Somanathan RV, Simunek A. Evaluation of the success of β -tricalciumphosphate and deproteinized bovine bone in maxillary sinus augmentation using histomorphometry: a review. Acta Medica (Hradec Kralove). 2006;49(2):87-9.

Souza NJA, Justo GZ, Oliveira CR, Haun M, Bincoletto C. Cytotoxicity of materials used in perforation repair tested using the V79 fibroblast cell line and the granulocyte-macrophage progenitor cells. Int Endod J. 2006 Jan;39(1):40-7.

Sugawara Y, Suzuki K, Koshikawa M, Ando M, Iida J. Necessity of enzymatic activity of alkaline phosphatase for mineralization osteoblastic cells. Jpn J Pharmacol. 2002 Mar;88(3):262-9.

Szejnfeld VL. Osteoporose: diagnóstico e tratamento. São Paulo: Sarvier; 2000.

Tavares DS, Castro LO, Sores GDA, Alves GG, Granjeiro JM. Synthesis and cytotoxicity evaluation of granular magnesium substituted β -tricalcium phosphate. J Appl Oral Sci. 2013 Jan-Feb; 21(1):37-42.

Teixeira LJC. Potencial osteocondutor de grânulos de hidroxiapatita em defeitos críticos na calvária de ratos [dissertação]. Rio de Janeiro(RJ): Universidade do Grande Rio; 2009.

Valentini P, Abensur D. Maxillary sinus floor elevation for implant placement with demineralised freeze-dried bone and bovine bone (Bio-Oss®): a clinical study of 20 patients Int J Periodontics Restorative Dent. 1997 Jun;17(3):232-41.

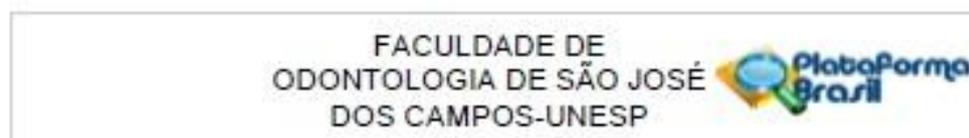
Vaziri S, Vahabi S, Torshabi M, Hematzadeh S. *In vitro* assay for osteoinductive activity of different demineralized freeze-dried bone allograft. J Periodontal Implant Sci. 2012 Dec;42(6):224-30.

Willians DF. Definition in biomaterials. Progress in biomedical engineering. Amsterdam: Elsevier; 1987.

Yang C, Unursaikhan O, Lee JS, Jung UW, Kim CS, Choi SH. Osteoconductivity and biodegradation of synthetic bone substitutes with different tricalcium phosphate contents in rabbits. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2013 Jul. doi: 10.1002/jbm.b.32984. [Epub ahead of print]

Zabeu JLA, Mercadante MT. Bone graft substitutes compared to autologous bone graft in orthopedic surgery – Systematic literature review. Rev Bras Ortop. 2008;43(3):59-68.

ANEXO A – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise da osteogênese, citotoxicidade e genotoxicidade de substitutos ósseos em osteoblastos derivados de osso humano

Pesquisador: Noaila Vicensoto Moreira Milhan

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 06238812.0.0000.0077

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos

Patrocinador Principal: Fundação de Amparo a Pesquisa de São Paulo ((FAPESP))

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 232.062

Data da Relatoria: 14/03/2013

Apresentação do Projeto:

O estudo utilizará células osteoblásticas humanas NhOst compradas de um banco de células. Os osteoblastos serão colocados em contato com dois tipos de substitutos ósseos, um xenogênico e outro aloplástico, e dessa forma será avaliada a osteogênese, citotoxicidade e genotoxicidade desses substitutos ósseos

Objetivo da Pesquisa:

Avaliação da osteogênese, citotoxicidade e genotoxicidade de dois tipos substitutos ósseos em osteoblastos derivados de osso humano.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos uma vez que o tecido é adquirido de banco de ossos e não diretamente de pacientes. Não cabe a análise de benefícios pelas mesmas razões citadas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é válida e pode trazer contribuições relevantes à comunidade científica.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A solicitação de modificação do TCLE não cabe mais para o momento uma vez que, a pesquisadora alterou a metodologia e passou a adquirir as células osteoblásticas de banco específico e, não de pacientes como anteriormente proposto portanto, não há TCLE a ser aplicado.

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE SÃO JOSÉ
DOS CAMPOS-UNESP



Recomendações:

Recomenda-se que se anexe no trabalho final toda a documentação da entidade doadora pertinente a aquisição do material de estudo.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As alterações tanto no título, quanto no escopo do trabalho foram adequadas, não havendo maiores empecilhos para a continuidade do trabalho.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado acata o parecer do relator

SAO JOSE DOS CAMPOS, 28 de Março de 2013

Assinador por:
JANETE DIAS ALMEIDA
(Coordenador)