

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**ESTHER RIEKO TAKAMORI**

**ESTUDO *IN VITRO* DA CITOTOXICIDADE DO OSSO BOVINO  
MISTO QUIMICAMENTE TRATADO**

**DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO INSTITUTO DE  
BIOLOGIA PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE  
MESTRE EM BIOLOGIA FUNCIONAL E  
MOLECULAR, NA ÁREA DE BIOQUÍMICA**

**ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ MAURO GRANJEIRO**

**2004**





*Este trabalho foi realizado no Laboratório de Bioquímica do Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, USP.*

***DEDICO ESTE TRABALHO AOS MEUS PAIS MARIO E TOSHIE E  
ÀS MINHAS IRMÃS EVELYN, JULIE E ANNE PELO AMOR  
INCONDICIONAL E PELO APOIO CONSTANTE***

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** por todas as oportunidades, inclusive a de realizar este sonho.

Ao Prof. **José Mauro Granjeiro** por ter “aberto as portas” para mim. Pelo apoio, confiança e carinho. Por toda a amizade e atenção dispensadas não somente a mim, mas a todas as pessoas que o cercam. Muito mais que o “orientador” ou um amigo: um ser humano em que eu me espelho.

À Prof<sup>a</sup> **Marília Afonso Rabelo Buzalaf** por todo o apoio. Pelo carinho e delicadeza tão particulares a sua pessoa.

À Prof<sup>a</sup>. **Maria Edwiges Hoffman** e toda sua equipe, **Cláudia, Denise, Maribel, Neusinha**. Por terem me acolhido com tanto carinho e paciência.

À Prof<sup>a</sup>. **Mari Cleide Sogayar** por toda a sua atenção e suporte para a realização deste trabalho.

Ao Prof. **Hiroshi Aoyama**, à Prof<sup>a</sup>. **Carmen Veríssimo** e a todos do Laboratório de Enzimologia pela amizade e pela força sempre presentes.

Ao Prof. **Rumio Taga** e ao Prof. **Gerson Francisco de Assis** pela disponibilidade e atenção em responder às minhas dúvidas.

Ao Prof. **Elliot Kitajima** pela disponibilização do seu laboratório, possibilitando a realização dos ensaios de microscopia eletrônica de varredura.

Aos **Professores e aos Funcionários do Departamento de Bioquímica da UNICAMP** pelo suporte técnico, intelectual e pela disponibilidade para realização deste trabalho.

À **Thelma** e ao **Ovídio** pela amizade e por toda a estrutura para que esse trabalho se realizasse.

À **Daniele** e **Tania** da Histologia (FOB-USP) pela imensa ajuda em todos os trabalhos de microscopia.

Aos meus pais **Mário** e **Toshie** por me apoiarem nas decisões mais difíceis e por não me deixarem desistir dos meus sonhos. As minhas irmãs **Evelyn, Julie** e **Anne** e ao meu cunhado **Leonardo** pela amizade, paciência e por estarem sempre presentes em minha vida.

À **Renata Viana** por ter me ajudado no início dessa caminhada na bioquímica, numa época de transição e muita dificuldade.

A todos os amigos da **Bioquímica (FOB-USP)** pela agradável convivência, pelos bons momentos, por fazerem do laboratório uma “casa”.

A **Ana Paula Bassetto**, **Eduardo Figueira**, **José Vítor Menezes**, **Katiúcia Paiva**, **Kellen Gasque**, **Rodrigo Cardoso de Oliveira**, **Tatiana Salles** pela convivência construtiva no grupo de “cultura de células” e por toda a colaboração neste trabalho.

À **Vanessa Eid Cardoso** pela amizade, atenção e preocupação comigo nos momentos difíceis. A sua família que sempre me recebeu com muito carinho.

À **Tatiana Salles** e à **Kellen Gasque** pelo auxílio na revisão deste trabalho, pelo apoio emocional nesta fase tão conturbada.

À **Cristina Sicca** e ao **Rodrigo Cardoso de Oliveira** pela amizade e ajuda em “todas as horas”.

Ao **Juliano Pessan** e ao **Willian Zambuzzi** pela amizade, atenção e disponibilidade sempre que solicitados.

Ao **Eduardo Figueira** pela amizade e colaboração nos momentos críticos. Pela dedicação e ajuda, sempre de maneira desprendida.

À **Ana Cláudia Demarchi** pelas agradáveis conversas, pelos conselhos sensatos, pelo ombro amigo e pelo carinho.

À **Giovana C. Canova** e à **Tatiana Furlani** por compartilhar um lar em Bauru.

À **SCPG em Biologia Funcional e Molecular (I B-UNI CAMP)** em nome da **Dra. Helena Coutinho Franco de Oliveira**.

À Faculdade de Odontologia de Bauru, em nome da sua Diretora **Professora Doutora Maria Fidela de Lima Navarro**.

À **CAPES**, **FAPESP**, **PRP (Pró-Reitoria de Pesquisa – USP)**, **CNPq** pelo suporte financeiro.

***“Há homens que lutam um dia e são bons,  
Há homens que lutam um ano e são melhores,  
Há aqueles que lutam muitos anos e são muito bons,  
Mas há aqueles que lutam toda a vida, e estes são os  
imprescindíveis”***

***Bertold Brecht***

# ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	xi
ABREVIATURAS	xiii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Biologia Óssea	1
1.2. Biomateriais auxiliares da regeneração óssea	5
1.3. Avaliação de biocompatibilidade	12
1.4. Testes de citotoxicidade	13
2. OBJETIVOS	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1. Soluções	20
3.2. Material	21
3.3. Métodos	23
3.3.1. Cultura de células	23
3.3.2. Obtenção do extrato	23
3.3.3. Ensaio de citotoxicidade	24
3.3.3.1. Análise da viabilidade celular	25
a. Contagem de células	25
b. Redução do MTT	25
c. Captação do vermelho neutro (VN)	26
3.3.3.2. Avaliação da morfologia	27
a. Microscopia de Luz	27
b. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	27
3.3.4. Análise Estatística	29

## ÍNDICE

4. RESULTADOS	30
4.1. Análise da viabilidade celular	30
4.1.1. Contagem de células	30
4.1.2. Redução do MTT	33
4.1.3. Captação do vermelho neutro (VN)	35
4.2. Avaliação da morfologia	38
4.2.1. Microscopia de Luz	38
4.2.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	40
5. DISCUSSÃO	46
6. CONSTATAÇÕES	56
7. CONCLUSÕES	57
8. PERSPECTIVAS	58
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
10. ANEXO	69

## LISTA DE FIGURAS

	PÁG	
<b>FIGURA 1</b>	<b>Representação gráfica do efeito dos extratos do OBM, GEN-OX<sup>®</sup> orgânico e inorgânico no número de células (Balb/ c 3T3).</b> A determinação do número de células foi realizada por contagem em câmara de Neubauer. Os resultados estão expressos em porcentagem relativa ao controle (sem extrato), considerado como 100%. Os dados representam a média de dois experimentos independentes em triplicata. As barras representam o desvio padrão da média.	32
<b>FIGURA 2</b>	<b>Representação gráfica do efeito dos extratos do OBM, GEN-OX<sup>®</sup> orgânico e inorgânico na capacidade de redução de MTT por fibroblastos da linhagem Balb/ c 3T3.</b> Os resultados estão expressos em porcentagem relativa ao controle (sem extrato), considerado como 100%. Os pontos experimentais representam a média de dois experimentos independentes em triplicata. As barras representam o desvio padrão da média.	34
<b>FIGURA 3</b>	<b>Representação gráfica do efeito dos extratos do OBM, GEN-OX<sup>®</sup> orgânico e inorgânico na captação de vermelho neutro por fibroblastos da linhagem Balb/ c 3T3.</b> Os resultados estão expressos em porcentagem relativa ao controle (sem extrato), considerado como 100%. Os pontos experimentais representam a média de dois experimentos independentes em triplicata. As barras representam o desvio padrão da média.	36
<b>FIGURA 4</b>	<b>Fotomicrografia dos fibroblastos Balb/ c 3T3 cultivados em lamínula, após tratamento por 24 h com diferentes diluições do extrato do OBM: 0 – controle (A); 20 (B); 25 (C); 75 (E) e 100 mg/mL (F).</b> As setas indicam células em mitose e as áreas circuladas, células com aspecto morfológico sugestivo de apoptose.	39

		PÁG
<b>FIGURA 5</b>	<b>Eletromicrografia de varredura. OBM não condicionado. Ausência de fibroblastos sobre o material. A seta indica possível exposição de fibras colágenas do material.</b>	42
<b>FIGURA 6</b>	<b>Eletromicrografia de varredura. OBM condicionado recoberto com colágeno de cauda de rato. Notar que o colágeno impede o contato célula material.</b>	43
<b>FIGURA 7</b>	<b>Eletromicrografia de varredura. Fibroblastos Balb/ c 3T3 cultivados em lamínula por 24 (A), 72 (C) e 120 h (E) e em lamínula mais colágeno por 24 (A), 72 (C) e 120 h (E).</b>	44
<b>FIGURA 8</b>	<b>Eletromicrografia de varredura. Fibroblastos Balb/ c 3T3 cultivados sobre o OBM, aderido à lamínula com colágeno de cauda de rato, após 24 (A-B), 72 (C-D) e 120 h (E-F).</b>	45

## ABREVIATURAS

$A_{(\lambda)}$ : absorvância no comprimento de onda (nm) especificado ( $\lambda$ )

ANSI: *American National Standards Institute*

ATCC: *American Type Culture Collection*

BMP: *bone morphogenetic protein* (proteína morfogenética óssea)

DMEM: meio de Eagle modificado por Dulbecco

EDTA: sal dissódico de ácido etilenodiamino tetraacético

FDA: *Food and Drug Administration*

HA: hidroxiapatita

ISO: *International Standardization for Organization*

MTT: brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2il]-2,5-difeniltetrazólio

MEV: microscopia eletrônica de varredura

OBM: Osso Bovino Misto

PBS-A: solução salina tamponada com fosfato

PBS- $\text{Ca}^{+2}$ : solução salina tamponada com fosfato, acrescida de cálcio

SFB: soro fetal bovino

VN: vermelho neutro (2-amino-3-metil-7dimetil-amino-cloreto de fenazina)

## Resumo

Dentre os biomateriais que visam auxiliar a regeneração óssea, destacam-se os de origem bovina. Têm sido avaliados diferentes protocolos de tratamento químico do osso bovino com a finalidade de preservar os componentes orgânicos (colágeno) e inorgânicos (hidroxiapatita), resultando no Osso Bovino Misto (OBM), a fim de aumentar a resistência mecânica do material. Apesar do OBM apresentar-se como um material promissor para uso na clínica médico-odontológica, por conciliar resistência e resiliência, deve-se certificar a ausência de efeitos tóxicos ou ativação do sistema imune do organismo, ou seja, sua biocompatibilidade. O objetivo deste trabalho foi avaliar a citocompatibilidade do OBM por meio de testes de citotoxicidade (Norma ISO 10993), análise morfológica e estudo da interação célula-material. Os ensaios de citotoxicidade consistiram de contagem de células, redução do MTT e captação do Vermelho Neutro. Nesses testes, células da linhagem Balb/c 3T3 foram incubadas com diferentes concentrações do extrato puro do OBM (100mg/mL), a 37°C, 24 h. Nesses ensaios, verificamos diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle (não tratado) e as concentrações superiores a 50 mg/mL ( $p < 0,01$ , Análise de Variância, teste de Tukey), similar à proporcionada pelo GEN-OX<sup>®</sup> orgânico e GEN-OX<sup>®</sup> inorgânico, comercialmente disponíveis. Estes resultados foram confirmados pela análise da morfologia das células tratadas nas diferentes condições, utilizando microscopia óptica de luz. A análise da interação célula-material (por microscopia eletrônica de varredura) somente foi possível após diálise do material (água deionizada) e condicionamento (72 h) em Meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) + 10% Soro Fetal Bovino (SFB). Concluímos que concentrações do extrato do OBM acima de 50 mg/mL diminuem significativamente o número de células, as funções mitocondrial e lisossomal. Provavelmente isto se deve à presença de resíduos do processamento do material, indicando a necessidade de otimização do processo.

## ABSTRACT

Biomaterials have been developed and investigated aiming to help bone regeneration. Xenografts of bovine origin stand out due to their biocompatibility, low cost and availability. Some protocols have been tested to develop a chemically treated material containing the anorganic (hydroxiapatite) and the organic (collagen) components of bovine boned: the mixed bovine bone (MBB). In spite of the MBB has been shown as a promising material for dental and medical applications, due to its resistance and resilience, it must be certified that this material is atoxic and do not activate the immunological system of the organism. The purpose of this investigation was to evaluate the MBB cytocompatibility by the use of cytotoxicity tests (ISO 10993), morphological analysis and cell-material interaction studies. The cytotoxicity assays consisted of cell number determination, MTT reduction and Neutral Red uptake. In these tests, Balb/c 3T3 cell lines were treated with different concentrations of MBB extract (100mg/mL, 37°C, 24h). Statistically significant differences were observed among control group (no treatment) and concentrations higher than 50 mg/mL ( $p < 0.01$ , ANOVA, Tukey's test), similar to results observed for organic and inorganic bovine bone (Gen-Ox<sup>®</sup>). Morphological analysis (optical microscopy) confirmed these results. Cell-material interaction (scanning electron microscopy) was studied only after material dialysis and 72 h conditioning (Dulbecco Modified Eagle Medium, DMEM, plus 10% Fetal Calf Serum, FCS). Fibroblast proliferation and cell adhesion to the material were observed. We conclude that concentrations of MBB extract higher than 50mg/mL decreased significantly the cell number, mitochondrial and lisosomal function. Probably toxic residues from manufacturing procedures remain in the material, indicating that process optimization should be considered.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Biologia óssea

O osso é uma forma altamente especializada de tecido conjuntivo, de origem mesenquimatosa, que apresenta sua matriz extracelular mineralizada, o que confere notável rigidez e força ao esqueleto, mantendo, ao mesmo tempo, certo grau de elasticidade. Além de desempenhar funções de suporte e proteção, participa ativamente na manutenção da homeostase de cálcio e de outros íons, como  $Mg^{+2}$ , no organismo (Marks e Hermey, 1996).

Apesar da sua rigidez, o osso não é um tecido estático e imutável. Na sua estrutura há canais e cavidades ocupadas por células, perfazendo cerca de 15% do tecido ósseo, que estão engajadas no incessante processo de remodelamento. Os processos de formação e reabsorção óssea são altamente regulados e responsáveis pela forma específica de cada osso, assim como pela sua manutenção na fase adulta (Delaissé *et al.*, 2000).

A composição do tecido ósseo varia com a espécie, a idade, o tipo estrutural e se este foi ou não acometido por alguma doença. O osso pode ser dividido macroscopicamente em cortical e medular, os quais são constituídos por células, matriz orgânica, matriz inorgânica e fatores solúveis de sinalização. (Seal *et al.*, 2001).

As características gerais tanto do osso cortical como do medular são similares. Ambos são matrizes sólidas, com pequenos canalículos, lacunas e células ósseas. Entretanto, o osso cortical é um tecido denso e compacto, com aspecto de massa sólida e contínua na qual somente os espaços vazios são preenchidos por vasos sanguíneos, células ósseas e osteócitos. A porção medular do osso possui uma matriz porosa e frouxamente organizada ocupada pela medula óssea. O osso cortical exerce, principalmente, função mecânica, possibilitando a locomoção e proteção dos órgãos vitais

e do tecido hematopoiético. Além de possuir maior quantidade de poros, o osso medular apresenta, ainda, maior volume de água e menor conteúdo mineral que o cortical (Spector *et al.*, 1999). Em síntese, o osso medular é formado por finas espículas interconectadas, enquanto o osso cortical é organizado através do sistema Haversiano (ou ósteons). O sistema Haversiano (ou de Havers) consiste de um canal que contém vasos sanguíneos, circundados por lamelas concêntricas e intersticiais (Yaszemski *et al.*, 1996).

A matriz orgânica óssea corresponde a cerca de 35% do peso seco. Aproximadamente 95% de seu conteúdo é formado por colágeno tipo I enquanto 5% é representado por proteoglicanas e proteínas não-colagênicas como a osteocalcina, osteopontina, osteonectina, sialoproteína óssea, proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) (Marks e Hermey, 1996).

Os sais depositados na matriz orgânica do osso, principalmente cálcio e fosfato, formam os cristais de hidroxiapatita, principais constituintes da matriz inorgânica que corresponde a cerca de 60 - 70% do tecido ósseo. O componente inorgânico é responsável pela homeostase de íons fundamentais para uma variedade de funções fisiológicas como condução do impulso nervoso, contração da musculatura, além de outras reações bioquímicas importantes. Do ponto de vista estrutural, as propriedades mecânicas da substância óssea resultam da impregnação da matriz orgânica, principalmente colágeno tipo I, com os cristais de hidroxiapatita (Lawrence e Rodan, 1999).

Além dos componentes orgânico e inorgânico, o tecido ósseo também é composto por células mesenquimais indiferenciadas, osteoblastos, osteoclastos, osteócitos e células ósseas de recobrimento, cujas funções são descritas a seguir (Marks e Hermey, 1996; Ducey *et al.*, 2000):

- Células Mesenquimais indiferenciadas: estão localizadas no estroma da medula óssea e já possuem certo grau de diferenciação, podendo dar origem a diferentes

células como osteoblastos, condrócitos e fibroblastos, assim como cardiomiócitos, mioblastos e neurônios. A diferenciação destas células dependerá do microambiente em que se encontrarem e, portanto, aos fatores de crescimento e de diferenciação a que estarão expostas;

- Osteoblastos: são células diferenciadas, responsáveis pela produção de matriz óssea. Secretam colágeno tipo I, proteínas não-colagênicas da matriz óssea e regulam o processo de mineralização e reabsorção óssea dessa matriz. A matriz óssea secretada, mas não mineralizada, forma o tecido osteóide, na superfície adjacente aos osteoblastos;
- Osteoclastos: são células multinucleadas formadas pela fusão de progenitoras mononucleares da família dos monócitos/macrófagos, cuja função é reabsorver o tecido ósseo. Após sua polarização forma-se a borda em escova justaposta à matriz óssea, seguida do transporte de vesículas ácidas para a lacuna de reabsorção, num evento similar a exocitose;
- Osteócitos: são osteoblastos localizados no interior da matriz óssea, responsáveis pela sua manutenção. Têm a capacidade de sintetizar e reabsorver a matriz numa área limitada. Cada osteócito ocupa uma lacuna na matriz óssea e seus prolongamentos se estendem promovendo o contato entre as células, permitindo a comunicação entre elas e destas com os vasos sanguíneos. Essas comunicações permitem difusão de nutrientes e metabólitos;
- Células ósseas de recobrimento: são células achatadas, alongadas e inativas que recobrem a superfície óssea. São precursoras dos osteoblastos.

O osso é uma estrutura dinâmica cujo remodelamento constante depende de uma regulação hormonal extremamente fina sobre osteoblastos e osteoclastos, controlando a formação e a reabsorção óssea. As leptinas, as prostaglandinas, os glicocorticóides e os esteróides sexuais, especialmente o estrógeno, controlam a diferenciação celular, a formação e a reabsorção óssea por mecanismos complexos (Blair *et al.*, 2002).

Em adultos jovens e saudáveis, a quantidade de osso formado está em equilíbrio com a de osso reabsorvido. Com a idade, entretanto, esse balanço muda a favor da reabsorção óssea, podendo levar a doenças como a osteoporose, caracterizada pela redução da massa bem como pela deterioração da arquitetura do tecido ósseo (Ducy *et al.*, 2000).

A maior causa de osteoporose em mulheres é o declínio dos níveis de estrogênio, que acompanha a menopausa, que, por sua vez, está associada ao aumento de citocinas que regulam a formação de osteoclastos (Rodan e Martin, 2000). Por outro lado, a osteoporose induzida por tratamento com glicocorticóides resulta da supressão da atividade dos osteoblastos e portanto, do decréscimo na formação óssea (Rodan e Martin, 2000).

A doença de Paget se caracteriza pelo aumento do número de osteoclastos. Entretanto, a intensa reabsorção é acompanhada por um aumento compensatório na formação e remodelamento ósseo, levando à formação de uma estrutura frágil e quebradiça (Rodan e Martin, 2000). Outros distúrbios do tecido ósseo, como câncer (tumores sólidos ou hematopoiéticos) e artrite reumatóide, são caracterizados pela produção de citocinas, responsáveis pelo aumento na formação e atividade osteoclástica (Rodan e Martin, 2000).

A osteopetrose, por outro lado, caracteriza-se por um notável aumento da massa óssea, causada por disfunção dos osteoclastos (Teitelbaum, 2000). Quando o aumento

da massa óssea deve-se à estimulação na atividade de osteoblastos, é conhecido como osteoesclerose (Teitelbaun, 2000).

O tecido ósseo, em função de sua composição e organização, alia características de resistência mecânica à compressão, à tensão, como também resiliência. Os componentes orgânico e inorgânico, bem como a organização das fibras colágenas, dos canais de Havers e do trabeculado ósseo, são responsáveis pela manutenção dessas características. Essa organização, por sua vez, dependerá das exigências mecânicas do tecido ósseo em questão (Grigoriadis *et al.*, 1996).

## **1.2. Biomateriais auxiliares da regeneração óssea**

Perdas ósseas significativas podem ocorrer em função de acidentes e/ou patologias como cistos ou tumores. Dependendo da extensão, da localização e das características da lesão, o organismo consegue regenerar o tecido ósseo. Entretanto, em defeitos ósseos extensos ou perenes, o organismo consegue apenas reparar o local com um tecido fibroso que não é compatível com a função do tecido ósseo (Misch *et al.* 1996; Ueda *et al.*, 2000)

Para auxiliar a regeneração óssea, vários tratamentos têm sido propostos. O enxerto autógeno é o material utilizado normalmente e com melhores resultados, sendo considerado como "gold standard". Nesse tipo de tratamento, obtém-se tecido ósseo do próprio paciente, tendo como área doadora, freqüentemente, a região da crista ilíaca e, em alguns casos de cirurgias orais, as regiões do túber da maxila, retromolar e mentoniana. Apresenta vantagens como ausência de resposta imune e a possibilidade de se levar células osteoprogenitoras, juntamente com fragmentos ósseo que atuam como condutores das células de reparo para o tecido lesado (Misch, 1998). Entretanto, existem desvantagens na utilização desse tratamento como a limitação da quantidade e qualidade

de tecido a ser removida, a necessidade de um segundo sítio cirúrgico, o pós-operatório desagradável, a morbidade, o custo da internação e possibilidade da ocorrência de seqüelas (Oreffo e Triffit, 1999).

Como alternativa ao enxerto com osso autógeno, têm-se utilizado os enxertos alógenos, obtidos de doadores da mesma espécie. Não possuem células osteoprogenitoras, mas têm capacidade de osteoindução e osteocondução. Podem ser encontrados em duas formas principais, o osso alógeno não-desmineralizado liofilizado (FDBA) e o osso alógeno desmineralizado liofilizado (DFDBA). Este material possui características próximas às do tecido do paciente a ser tratado, além de maior facilidade de obtenção que o enxerto autógeno, sem a necessidade de um segundo sítio cirúrgico. Porém, existe a possibilidade de resposta imune e transmissão de doenças como AIDS e hepatite, por exemplo, sendo necessário um controle rigoroso, além de um tratamento adequado desse tipo de enxerto (Rosenberg e Rose, 1998). A utilização de enxertos alógenos exige, ainda, a existência de um banco de ossos, cuja manutenção demanda um grande custo (Win *et al.*, 2000).

Diante dos inconvenientes apresentados tanto pelo enxerto autógeno como pelo enxerto alógeno, muitos cientistas pesquisam biomateriais alternativos e estratégias de tratamento que possam auxiliar à regeneração do tecido ósseo (Burg *et al.*, 2000; Hutmacher *et al.*, 2000).

Biomateriais para reparo ósseo são compostos naturais ou sintéticos utilizados nas clínicas médicas e odontológicas, que auxiliam a reparação óssea e apresentam biocompatibilidade, previsibilidade, aplicação clínica sem riscos trans-operatórios e seqüelas pós-operatórias mínimas, além de aceitação por parte do paciente (Taga, 1996). Os materiais para reconstrução óssea precisam apresentar propriedades mecânicas similares ao osso e dar suporte à regeneração óssea. Além disso, devem possibilitar a

adesão, a proliferação e a diferenciação celular (Seal *et al.*, 2001). Podem ser classificados em aloplásticos ou xenogênicos.

Os materiais aloplásticos são substitutos ósseos sintéticos disponíveis em texturas, tamanhos e formas variáveis (Misch, 1993; Yuehuei, 2000), como a hidroxiapatita (HA) o fosfato tricálcico, vidro e cerâmicas bioativas (Ducheyne e Qiu, 1999). Os polímeros sintéticos permitem um melhor controle dos riscos biológicos e das suas propriedades físico-químicas, entretanto, a maioria induz resposta imune/inflamatória após a sua implantação (Cancedda *et al.*, 2002). Normalmente, os materiais aloplásticos atuam no processo de reparo ósseo funcionando como um arcabouço para as células oriundas dos tecidos adjacentes proliferarem e, posteriormente, produzirem matriz óssea. Os materiais sintéticos, dependendo da sua composição e formato, podem ser totalmente absorvidos pelo organismo, sendo, então, substituídos pelo tecido ósseo neoformado (Willians, 2000).

Uma alternativa de tratamento é o emprego de xenoenxertos, ou seja, materiais obtidos de doador de outra espécie. Através de diferentes técnicas de processamento são produzidos biomateriais com propriedades físico-químicas similares ao osso humano. Além disso, a fonte é abundante e minimizam o risco de transmissão de doenças. Há dois principais materiais utilizados em clínica: os corais naturais e os de origem bovina (Aichelmann-Reidy e Yukna, 1998).

Os biomateriais de origem bovina têm sido estudados desde a década de 60 (Scopp *et al.*, 1966). Sua resistência biomecânica é muito similar à do osso humano e tratamentos adequados para a sua obtenção podem evitar respostas imunológicas ou inflamatórias adversas (Oliveira, 1999; Sicca, 2000; Sogal *et al.*, 1999; Wenz *et al.*, 2001).

Contudo, a despeito das propriedades adequadas dos materiais aloplásticos e xenogênicos, muitas vezes, as características do defeito, como extensão e localização, dificultam o reparo. A reconstrução óssea ideal depende, principalmente, do número e

atividade de células osteoprogenitoras (Oreffo e Triffit, 1999), que é dependente de estímulos, principalmente fatores de crescimento e BMPs.

As células constituem um fator essencial para a construção e remodelamento de qualquer tecido. Um tratamento baseado na utilização de células do próprio paciente, levadas ao sítio da lesão sobre um biomaterial, começou a se desenvolver (Luyten *et al.*, 2001).

Dessa maneira surgiu o campo da engenharia de tecidos como consequência da combinação dos princípios de engenharia, química e biologia, para o desenvolvimento de substitutos naturais que permitissem restaurar, manter ou melhorar a função dos tecidos (Nerem, 1992; Langer e Vacanti, 1993). As estratégias da engenharia de tecidos envolvem o uso de células isoladas para substituir funções específicas, substâncias que induzem a proliferação de células e tecidos (fatores de crescimento ou morfogenes como as BMPs), ambos combinados com matrizes que atuam como carreadoras para células ou proteínas (Ueda *et al.*, 2001).

O reparo de lesões ósseas, qualquer que seja o tratamento envolvido, pode ocorrer através de quatro mecanismos (Lane, 1995):

- Osteogênese: promove o crescimento ósseo pela transferência de osteoblastos com o enxerto;
- Osteoindução: possibilita formação de osso novo a partir de células osteoprogenitoras, derivadas de células mesenquimais indiferenciadas do locus receptor, sob o estímulo de uma ou mais substâncias indutoras liberadas do enxerto de matriz óssea, como a proteína morfogenética óssea;
- Osteocondução: proporciona crescimento ósseo a partir de células osteoprogenitoras que migraram do tecido circunjacente pela superfície do material

enxertado, dando origem a osteoblastos responsáveis pela neoformação óssea no local;

- Osteopromoção: isola o defeito da invasão de células de tecidos competidores com alta taxa de proliferação, limitando ou mesmo impedindo com isso, o fibrosamento de parte do sítio da lesão.

O tecido ósseo alia resiliência e resistência em função de suas características físico-químicas e biológicas particulares. Portanto, é desejável que os materiais osteosubstitutos apresentem propriedades mecânicas similares às do osso, além de fornecer suporte para a proliferação celular e regeneração tecidual (Suh *et al.*, 2001).

Muitos pesquisadores têm se proposto a estudar materiais que apresentem características próximas às do tecido ósseo. TenHuisen *et al.* (1995) estudaram um compósito formado pela associação de hidroxiapatita sintética e colágeno tipo I de tendão (Sigma®) na tentativa de se obter um material com características próximas às do tecido ósseo. O estudo da microestrutura por difração de raio-x e microscopia eletrônica de varredura (MEV), bem como das suas propriedades mecânicas, sugeriram que o compósito poderia ser adequado como ósteo-substituto.

Suh *et al.* (2001) estudaram materiais à base de uma cerâmica de carbonato de apatita (Cap) e colágeno tipo I, unidos por tratamentos ácidos. O objetivo da união desses dois materiais foi associar as características de uma apatita (Cap) com colágeno tipo I, criando um compósito de duas fases, orgânica e inorgânica, tal qual o tecido ósseo. Os autores observaram a citocompatibilidade dos materiais avaliados nos ensaios de citotoxicidade, adesão e proliferação. Na formação de compósitos, entretanto, não se observa o mesmo nível de interação entre os componentes orgânico e inorgânico, como aquela apresentada pelo tecido ósseo.

O osso de origem bovina apresenta naturalmente os componentes orgânicos e inorgânicos, representados principalmente por colágeno tipo I e hidroxiapatita (Baslé *et al.*, 1998). Entretanto, os processamentos físico-químicos utilizados para a obtenção do biomaterial normalmente utilizados, permitem a preservação dos componentes orgânicos ou dos inorgânicos.

Quando se deseja preservar o componente inorgânico, submete-se o osso bovino a altas temperaturas, ao redor de 1000° C, ao passo que a preservação do componente orgânico implica no tratamento do osso com álcalis e ácidos (Sogal *et al.*, 1999).

Bio-Oss<sup>®</sup> é um material inorgânico de origem bovina bastante utilizado na clínica odontológica (Artzi *et al.*, 2000). A partir do osso bovino tem se obtido também o colágeno tipo I, que apresenta boa biocompatibilidade, além de mostrar-se como substrato para o crescimento e proliferação celular (Goissis *et al.*, 2003), apesar de não ser adequado para áreas submetidas a carga (Rocha *et al.*, 2002).

O laboratório de Bioquímica da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo (FOB-USP) vem trabalhando desde 1990 no desenvolvimento de biomateriais obtidos a partir de ossos longos de bovinos. Dentre os compostos de origem bovina desenvolvidos, destacam-se o osso cortical ou medular inorgânico bovino, matriz orgânica bovina e pool de BMP's.

Vários desses materiais encontram-se na clínica médica e odontológica devido a sua biocompatibilidade e capacidade osteocondutora e osteoindutora. (Oliveira *et al.*, 1999; Sicca *et al.*, 2000; Herculiani *et al.*, 2000)

O Osso Bovino Misto (OBM) quimicamente tratado é um biomaterial de origem bovina que está sendo desenvolvido pela Baumer S.A., em colaboração com o laboratório de Bioquímica da FOB – USP. Este material ainda encontra-se na fase final de elaboração, não estando, portanto, no mercado médico-odontológico. O OBM permite a manutenção

dos componentes orgânico e inorgânico devido ao tratamento com álcalis, peróxido de hidrogênio e uréia. A presença desses dois componentes permite que o material alie características de resiliência e resistência mecânica.

Além das características químicas e físicas adequadas à sua proposição, um biomaterial não deve apresentar efeitos tóxicos e nem desencadear eventos imunológicos ao organismo, ou seja, deve ser biocompatível (Wataha, 2001).

### 1.3. Avaliação de Biocompatibilidade

Segundo Willians (1981), biocompatibilidade pode ser definida como a habilidade de um material de propiciar resposta biológica apropriada numa aplicação específica.

Existem organizações como a “American Dental Association” (ADA)/ “American National Standard Institute” (ANSI) e a “International Organization for Standardization” (ISO) preocupadas em padronizar testes para a avaliação da biocompatibilidade de biomateriais.

Segundo a ADA/ANSI, existem níveis para a avaliação de biocompatibilidade:

- 1) Inicial: constitui o primeiro nível de avaliação de um material. São realizados testes *in vitro*: ensaios de citotoxicidade, hemólise (lise de hemácias), mutagênese e carcinogênese em cultura celular.
- 2) Secundário: o material é testado *in vivo*, em animais de pequeno porte para avaliar o potencial imunogênico, como por exemplo, testes de irritação dérmica, implantação subcutânea e intra-óssea.
- 3) Aplicação: utilização no local a que se destina o material, primeiramente em animais de grande porte, seguida de testes em primatas não-humanos e finalmente em humanos, com a aprovação do Conselho Nacional de Saúde.

O objetivo dos testes de biocompatibilidade *in vitro* é mimetizar as condições biológicas para testar materiais simulando sua implantação nos tecidos do organismo ou sobre eles. Esses métodos visam promover redução do custo no desenvolvimento de novos materiais, minimizando a possibilidade de resultados inesperados quando da realização de testes em animais ou clínicos (Hanks *et al.*, 1996). A realização dos ensaios *in vitro* ainda permite a redução no número de animais utilizados na avaliação da biocompatibilidade de um biomaterial (ISO 10993-1).

A toxicidade é um evento complexo *in vivo*, podendo haver dano celular direto, efeitos fisiológicos sistêmicos tais como nefrotoxicidade e neurotoxicidade, entre outros, quase sempre desencadeando resposta inflamatória. Atualmente, ainda é difícil monitorar efeitos sistêmicos e fisiológicos *in vitro*, desta forma a maioria dos ensaios determina os efeitos em nível celular, em termos de citotoxicidade (Freshney, 2000).

#### **1.4. Testes de Citotoxicidade**

A ISO é uma organização internacional, composta de vários comitês, que visa a padronização de procedimentos. A ISO 10993 é uma combinação de vários documentos de padronização, cujo objetivo é estabelecer um guia para a avaliação da biocompatibilidade e respostas biológicas relevantes de materiais e dispositivos médicos.

O primeiro nível de testes, dentro da avaliação de biocompatibilidade (ISO 10993-5, 1999) é a determinação da citotoxicidade *in vitro*. Em comparação com as investigações *in vivo*, os estudos *in vitro* são mais facilmente controlados e apresentam melhor reprodutibilidade (Schmalz *et al.*, 1994; Freshney, 2000).

Há muitas vias metabólicas que podem ser avaliadas para se medir o efeito citotóxico de biomateriais que estarão em contato com os tecidos vivos. Ensaio padrão devem ser específicos o suficiente para verificar efeitos que são vitais para a função celular, mas ao mesmo tempo gerais e simples o suficiente para serem facilmente reproduzidos em outros laboratórios (Nassiri *et al.*, 1994).

O cultivo de células *in vitro* constitui-se numa valiosa ferramenta para se conhecer os mecanismos pelos quais biomateriais podem produzir reações adversas em nível celular (Wennberg, 1986; Hensten-Petersen, 1988). Assim, citólise e mudanças no crescimento e na permeabilidade da membrana celular podem ser verificadas *in vitro* (Lygre *et al.*, 1995).

Os ensaios de citotoxicidade fornecem informações a respeito da segurança do material estudado (Tang *et al.*, 1999), além de indicar se um material deve ser descartado ou objeto dos outros níveis de avaliação em estudos posteriores *in vivo* (Torabinejad *et al.*, 1996).

Esses estudos normalmente consistem no ordenamento, entre os materiais avaliados, estabelecendo assim uma escala quanto à citotoxicidade observada (Hanks *et al.*, 1996).

Keiser *et al.* (2000) comparam a citotoxicidade de um material que havia sido recentemente colocado no mercado odontológico, o agregado mineral trióxido (MTA), com o Super-EBA e o amálgama, materiais já utilizados em clínica, como retro-obturadores. O grau de toxicidade observada em fibroblastos de ligamento periodontal humano foi Super-EBA > amálgama > MTA, suportando o uso do MTA nos tratamentos de retro-obturações.

Os ensaios de citotoxicidade também podem ser utilizados na fase de desenvolvimento do produto, quando se deseja estabelecer a melhor proporção entre os componentes de um biomaterial (Ramires *et al.*, 2001) ou quando se modifica um material já existente (Griggs *et al.*, 2003).

Normalmente avalia-se a citotoxicidade basal, isto é, aquela que afeta estruturas e funções comuns a todas às células do organismo, como membrana celular, mitocôndria, ribossomos, cromossomos e lisossomos. Alterações nas funções basais geralmente afetam as específicas (Barile, 1994). Os estudos de citotoxicidade se baseiam, portanto, no estudo de parâmetros relacionados às funções celulares basais.

Existe um vasto número de testes *in vitro* sendo que cada um consiste basicamente de três componentes: (a) o sistema biológico; (b) o contato célula/material (c) o resultado a ser aferido ("endpoint"). Normalmente, o sistema biológico utilizado *in*

*in vitro* é o de cultura de células, podendo ser utilizadas células de linhagem permanente ou de cultura primária (Schmalz, 1994).

A ISO 10993-5 recomenda a utilização de células de linhagens permanentes para a realização de ensaios de citotoxicidade, visando-se padronizar os ensaios permitindo a sua reprodutibilidade. Esta norma da ISO recomenda algumas linhagens celulares permanentes da “American Type Culture Collection” (ATCC): L-929, Balb/c 3T3, MRC-5, WI-38, Vero, BHK-21 e V-79.

O preparo do material avaliado constitui um importante passo na tentativa de mimetizar as condições *in vivo*. A ISO 10993-5 sugere três protocolos para testes *in vitro* de materiais: contato direto, contato indireto e extrato do material em diferentes diluições.

No contato direto estuda-se a toxicidade do material, avaliando-se seu efeito nas células semeadas diretamente sobre ele (Ramires *et al.*, 2001; Viana *et al.*, 2003). O contato indireto implica na utilização de uma barreira entre o material e as células, podendo ser utilizados, por exemplo, filtro Milipore (Schuster *et al.*, 1996) e ágar (Vallittu *et al.*, 1999).

A escolha de uma ou mais categorias depende da natureza da amostra a ser avaliada, do local em que o material será utilizado e da finalidade desse uso (ISO 10993-12).

Ignatius *et al.* (2001) avaliaram a biocompatibilidade *in vitro*, por meio de ensaios de citotoxicidade, de quatro biomateriais osteosubstitutos na base de cerâmica. Os ensaios foram realizados utilizando células de linhagens imortalizadas L-929 e Balb/c 3T3. Concluíram que a citotoxicidade apresentada pelos biomateriais foi diretamente proporcional à solubilidade apresentada por eles.

Os tempos de exposição aos materiais testados podem ser de curta duração, envolvendo períodos de até 4 horas ou de longa duração, correspondendo a períodos de

24 horas ou mais (Barile, 1994). A citotoxicidade aguda é verificada no período de 24h (Hanks *et al.*, 1996).

A avaliação de citotoxicidade pode ser feita através de ensaios qualitativos ou quantitativos. Os ensaios qualitativos consistem na avaliação da morfologia através de descrição ou atribuição de escores. Os quantitativos caracterizam-se pela quantificação do número e atividade celulares após a exposição ao agente teste (ISO 10993-5).

Além da descrição da morfologia frente a um material potencialmente tóxico, diferentes “endpoints” podem ainda ser utilizados como indicadores de dano celular, tais como: efeitos em membrana, na atividade celular e na taxa de proliferação (Schmalz, 1994). Bouillaguet *et al.* (2002) estudaram a citotoxicidade de materiais resinosos, expondo células da linhagem Balb/c 3T3 aos extratos dos materiais por 24h. Após esse período, embora não se observasse alteração morfológica das células, já havia um comprometimento da atividade da enzima mitocondrial succinato desidrogenase (SDH).

As alterações morfológicas podem ser analisadas, comparando-se as células expostas ao material-teste com células não-expostas (Leyhausen *et al.*, 1998)

A exposição das células a agentes tóxicos pode levar à morte celular alterando, portanto, o número de células e a taxa de proliferação das mesmas. A contagem de células utilizando-se hemocitômetro é um método empregado para avaliar citotoxicidade (Costa *et al.*, 1999). Muitos autores utilizam a taxa de proliferação celular como parâmetro para avaliação de citotoxicidade (Koulaozidou *et al.*, 1998; Fricain *et al.*, 2002).

Mossman (1983) desenvolveu um método para avaliar viabilidade celular verificando a atividade de uma enzima mitocondrial, a succinato desidrogenase. Trata-se de um teste colorimétrico, baseado no uso do brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT), em que este é reduzido apenas por mitocôndrias viáveis. A redução do MTT, de cor amarelada, a azul de formazana ocorre apenas em células viáveis,

sendo sua intensidade diretamente proporcional ao número de células presentes (Denizot e Lang, 1986).

Outro teste de viabilidade celular utilizado é o da captação de vermelho neutro desenvolvido por Babich e Borenfreund (1990) que se baseia na captação do vermelho neutro, um corante fracamente catiônico, pelos lisossomos de células viáveis. Trata-se de um teste colorimétrico que avalia a intensidade de vermelho neutro incorporado e posteriormente extraído dos lisossomos viáveis, a qual é diretamente proporcional ao número de células viáveis (Repetto e Sans, 1993).

Os ensaios de redução do MTT e da incorporação de vermelho neutro têm sido utilizados para se comparar a viabilidade celular entre diferentes materiais utilizados na odontologia como cimentos de ionômero de vidro (Lonroth e Dahl, 2001) e compômeros (Sletten e Dahl, 2003).

Ramires *et al.* (2001) estudaram a citotoxicidade de compósitos à base de titânio e hidroxiapatita, desenvolvidos para atuarem como implantes ósseos, em fibroblastos da linhagem de Balb/c 3T3. Avaliaram os efeitos de extratos dos materiais na viabilidade e atividade mitocondrial por meio dos ensaios de captação do vermelho neutro e redução do MTT. Verificaram que mesmo as maiores concentrações dos extratos não demonstraram efeitos citotóxicos.

Os estudos da interação célula-material são também de grande importância para avaliar adesão e proliferação das células sobre o material, o que está diretamente relacionado com a citocompatibilidade do mesmo (Bogdanski *et al.*, 2002). A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) constitui-se num método adequado para verificar a interação das células com o material avaliado (Baslé *et al.*, 1998; Marques *et al.*, 2002).

Petronis *et al.* (2003) desenvolveram um modelo, constituído por uma rede interconectada de poros e canais de dimensões subcelulares com diferentes configurações

estruturais, para estudar se estas levavam a alterações nas características celulares. Pela MEV, pôde-se observar a proliferação dos fibroblastos sobre o modelo experimental ao longo de 5 dias, assim como analisar a morfologia das células.

A realização de um único ensaio não é suficiente para se avaliar a citocompatibilidade de um determinado material, sendo necessária a realização de um conjunto de ensaios para essa finalidade (Gomes *et al.*, 2001)

Na avaliação da citocompatibilidade ou biocompatibilidade *in vitro* de um determinado material pode-se analisar morfologia, viabilidade e função enzimática celular, além de estudar-se a interação da célula com o material.

Portanto, em razão do seu potencial clínico, a biocompatibilidade do Osso Bovino Misto (OBM) deve ser avaliada. A primeira fase dessa avaliação consiste dos ensaios *in vitro*.

Este trabalho se propõe a avaliar a citocompatibilidade do OBM, por meio de ensaios de citotoxicidade e de estudos da interação célula-material por MEV. Além disso, comparar-se-á a citotoxicidade observada no OBM com a do Osso Bovino Orgânico (GEN-OX<sup>®</sup> – Baumer) e com a do Osso Bovino Inorgânico (GEN-OX<sup>®</sup> – Baumer), materiais já utilizados em clínica médica e odontológica.

O Gen-ox<sup>®</sup> (Baumer S.A., São Paulo, Brasil) foi desenvolvido com tecnologia nacional, portanto apresentando menor custo e, assim como o Bio-Oss<sup>®</sup> (material similar importado) é constituído exclusivamente da matriz inorgânica do osso bovino. É indicado para o preenchimento de cavidade como substituto de enxerto ósseo e apresenta-se nas formas inorgânica e orgânica (cortical ou medular), em blocos ou grânulos.

A avaliação da citotoxicidade de biomateriais em desenvolvimento é normalmente realizada por comparação com outros que desempenhem funções similares (Imazato *et al.*, 2000).

## **2. OBJETIVOS**

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a citotoxicidade do Osso Bovino Misto quimicamente tratado (OBM).

### **2.1. Objetivos específicos**

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- ✓ determinar o número de células, após 24h de tratamento com diferentes concentrações do extrato do OBM, GEN-OX<sup>®</sup> orgânico e inorgânico;
- ✓ quantificar a redução do MTT e a captação do corante vermelho neutro nas culturas submetidas a diferentes concentrações do extrato do OBM, GEN-OX<sup>®</sup> orgânico e inorgânico;
- ✓ avaliar a morfologia celular por meio de microscopia de luz após tratamento com diferentes concentrações do extrato do OBM;
- ✓ analisar a interação célula-material por meio de microscopia eletrônica de varredura.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Soluções

- Meio de cultura – DMEM (Gibco Co.)

Meio de Eagle modificado por Dulbecco que corresponde a 13,45g/L do pó comercial (Gibco) acrescido de 1,2g/L de  $\text{NaHCO}_3$ , 0,025g/mL de ampicilina e 0,1g/mL de estreptomicina.

- Tampão Salino Fosfato – PBS-A

O tampão fosfato salina (pH 7,4) foi constituído por: 137 mM de cloreto de sódio, 2,68 mM de cloreto de potássio, 1,47 mM de fosfato diácido de potássio e 8,1 mM de fosfato monoácido de sódio. Para as soluções de  $\text{PBS-Ca}^{+2}$  foi acrescido 1 mM de cloreto de cálcio.

- Tripsina:

Solução de tripsina 0,25% (m/v) foi preparada em PBS-A contendo 1 mM de EDTA

- Fixador de Karnovsky modificado:

Glutaraldeído 2,5%, formaldeído 2,5%, em tampão cacodilato de sódio (0,05M), pH 7,2,  $\text{CaCl}_2$  0,001M

- Solução de ácido ósmico 1% :

Tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,05M pH 7,2

As soluções de  $\text{PBS-Ca}^{2+}$ , DMEM e tripsina foram esterilizadas por filtração em membrana Millipore (diâmetro = 0,22  $\mu\text{m}$ ). O tampão PBS-A foi esterilizado em autoclave a 120°C por 20 min. Todas as soluções foram armazenadas entre 4 e 5°C, com exceção da tripsina que foi estocada a -20°C .

### **3.2. Material**

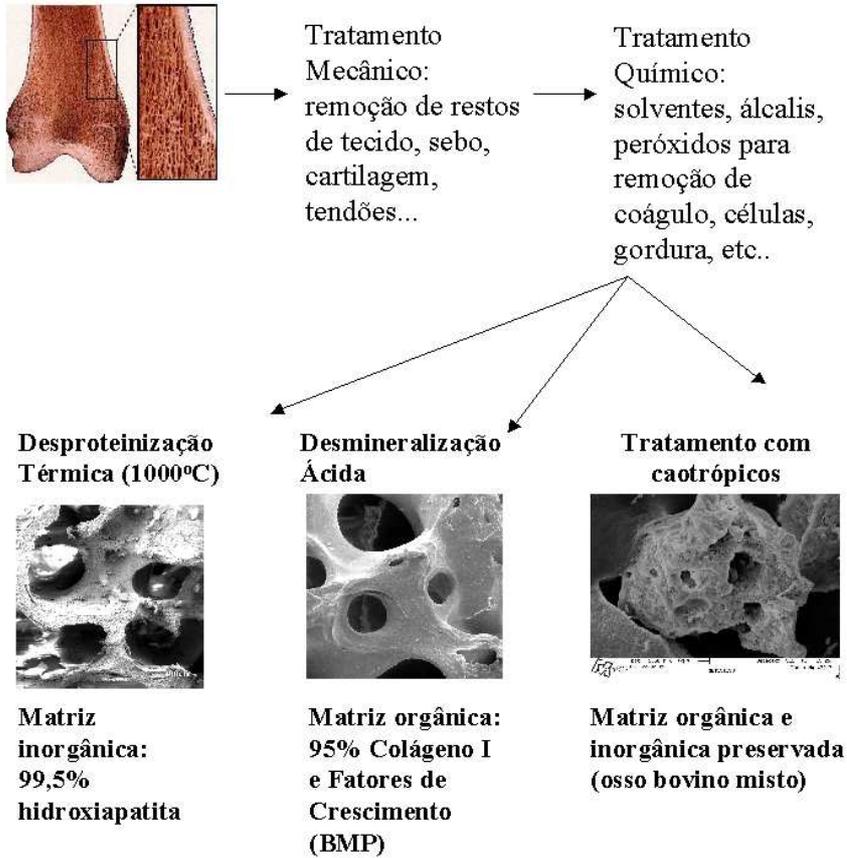
Os materiais utilizados neste estudo foram o osso bovino misto (OBM), o osso bovino inorgânico medular e osso bovino orgânico medular, ambos da linha Gen-Ox<sup>®</sup>, produzidos pela Baumer S.A., Mogi Mirim, São Paulo, Brasil, registrado no Ministério da Saúde sob o número 10345500001. As vias de processamento do osso bovino são resumidas no Esquema 1.

O osso bovino medular é submetido à limpeza mecânica e, posteriormente, a diferentes processamentos, químico ou térmico. Este processamento utiliza álcalis, solventes e peróxidos capazes de remover restos de células, sangue, coágulo, gordura e proteínas não aderidas ao osso.

Ao final do tratamento com caotrópicos obtém-se um material que conserva, ao menos parcialmente, a matriz orgânica bovina e o esqueleto de hidroxiapatita, denominado de osso bovino misto (OBM). O OBM na forma de grânulos foi liofilizado e esterilizado por radiação  $\gamma$ .

Com a finalidade de estabelecer um parâmetro de análise, o OBM foi comparado com dois materiais disponíveis no mercado nacional. A linha Genius da Baumer S.A. inclui o Gen-Ox<sup>®</sup> que existe em duas versões, o orgânico (somente o arcabouço de colágeno e traços de fatores de crescimento) e o inorgânico, exclusivamente hidroxiapatita calcinada a 950-1000 °C (Esquema 1).

## Vias de Processamento do Osso Bovino



**Esquema 1:** Fluxograma do procedimento para produção do osso bovino misto (OBM) do GEN-OX orgânico e inorgânico.

### **3.3. Método**

#### **3.3.1. Cultura de Células**

Fibroblastos da linhagem Balb/c 3T3 clone A31 (ATCC, USA) foram cultivados em Meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), contendo  $\text{NaHCO}_3$  (1,2g/L), ampicilina (0,025g/L), estreptomicina (0,1g/L), suplementado com 10% de soro fetal bovino. Foram mantidos a 37° C e à atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ .

#### **3.3.2. Obtenção do extrato**

Neste trabalho, o extrato puro dos materiais OBM, GEN-OX<sup>®</sup> orgânico e inorgânico foi obtido em meio de cultura DMEM sem SFB, na concentração de 100 mg/mL (material/meio de cultura DMEM), durante 24h, a 37° C em atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  (ISO 10993-12).

Preparo das diluições do extrato:

A partir do extrato puro foram realizadas diluições seriadas deste em meio de cultura DMEM + 10% SFB (Quadro 1). Nessas diluições foram estabelecidas proporções entre a massa do material / mL de DMEM + 10% SFB, considerando o extrato puro correspondente a 100 mg/mL (massa do OBM/ DMEM + 10% SFB).

Quadro 1. Correspondência entre as diluições do extrato puro dos materiais e as respectivas concentrações.

Proporção Extrato puro : DMEM + 10% SFB	Concentração correspondente massa do material (mg) / mL DMEM + 10% SFB
0	0
1: 1000	0,1
1:500	0,2
1:100	1
1:50	2
1:25	4
1:5	20
1:4	25
1:2	50
3:4	75
Puro	100

### 3.3.3. Ensaios de Citotoxicidade

Todos os ensaios de citotoxicidade foram realizados em placas de 24 poços, semeando-se células da linhagem Balb/c 3T3 na densidade de  $3 \times 10^4$  células/poço.

Após incubação por 48h, as células foram tratadas com as diferentes concentrações do extrato (0,1; 0,2; 1; 2; 4; 20; 25; 50, 75 e 100 mg/mL) em DMEM + 10% SFB. Após 24h, o meio de cultura contendo o extrato foi removido e as células, lavadas com PBS-A. Procedeu-se, então aos ensaios de citotoxicidade definidos abaixo. Cada ensaio foi repetido duas vezes e o tratamento com cada concentração do extrato foi feito em triplicata.

### **3.3.3.1. Análise da viabilidade celular**

#### **a) Contagem de células**

As células de cada poço foram removidas utilizando-se 200  $\mu$ L de tripsina 0,25%. Para a inativação da tripsina foram adicionados 400  $\mu$ L de DMEM + 10% SFB sendo este volume transferido para um microtubo. Em seguida, o poço foi lavado com 300  $\mu$ L de PBS. A para auxiliar na remoção de células, sendo transferidos para o respectivo microtubo, contendo 100  $\mu$ L de formol 37% filtrado para um volume final de 1000  $\mu$ L (Sogayar, 2002).

As células foram contadas utilizando a Câmara de Neubauer. O número de células correspondente a cada concentração do extrato foi calculado em relação ao grupo controle negativo (ausência de extrato), considerado como 100%.

#### **b) Redução do MTT**

Este ensaio, definido na literatura como apropriado para estimativa de citotoxicidade (Hansen *et al.*, 1989; Schweikl e Schmalz, 1996), baseia-se na capacidade que a enzima succinato desidrogenase (presente nas mitocôndrias de células viáveis) têm de converter o sal de tetrazolium (dimetiltiazol difenil tetrazolium, ou MTT), que é hidrossolúvel e de cor amarelada, em cristais de formazana, que são de cor azul escura. Esta capacidade que somente células vivas possuem, indica atividade mitocondrial e conseqüente viabilidade celular (Costa *et al.*, 1999; Sletten; Dahl, 1999).

A atividade mitocondrial foi avaliada, através da incubação das células numa solução de 0,5mg de MTT/ mL de DMEM sem SFB, por 4h, a 37°C; após a remoção da solução, o pigmento insolúvel reduzido intracelularmente foi extraído em 1mL de etanol/poço, sob agitação suave por 10 min à temperatura ambiente. Em seguida, a

absorbância do extrato alcoólico de cada poço foi mensurado a 570 nm (Ultrospec 2000 - Pharmacia).

A função mitocondrial das células viáveis correspondentes a cada concentração do extrato foi calculada em relação ao grupo controle (ausência de extrato), considerado 100%.

### **c) Captação do vermelho neutro (VN)**

Este ensaio se baseia na aplicação de um corante (vermelho neutro) que penetra a membrana celular de células vivas, difundindo-se e concentrando-se nos lisossomos. Este ensaio permite a distinção entre células viáveis, danificadas e mortas, baseado na capacidade que os lisossomos celulares têm de absorver o corante. (Borenfreund; Puener, 1984).

A partir de uma solução estoque de vermelho neutro 0,4% foi obtida uma solução de 50 µg/mL de vermelho neutro em DMEM. A solução obtida permaneceu em estufa 37°C, "overnight" para haver a precipitação de cristais, sendo então filtrada em filtro Millipore (0,22µ). As células foram tratadas com essa solução (50 µg/mL) e as placas incubadas por 3h, a 37°C, para permitir a captação do corante pelos lisossomos das células viáveis. Elas foram lavadas com PBS-Ca<sup>+2</sup> e o corante foi extraído numa solução de etanol 50 % e ácido acético 1 %, colocando-se 1 mL dessa solução/poço. Em seguida, determinou-se a absorbância dos extratos a 540 nm no espectrofotômetro (Ultrospec 2000 - Pharmacia).

A viabilidade celular correspondente a cada concentração do extrato foi calculada em relação ao grupo controle (ausência de extrato), considerado 100%.

### **3.3.3.2. Avaliação da Morfologia**

#### **a) Microscopia de Luz**

A determinação de efeitos citotóxicos pode ser feita pela análise microscópica descritiva das células. Devem ser relatados a morfologia geral das células, integridade da membrana, descolamento e lise celular (ISO 10993-5).

Utilizou-se uma placa de 24 poços, colocando-se uma lamínula redonda de 13 mm de diâmetro/poço. Foram semeadas  $3 \times 10^4$  células/poço. Após um período de incubação de 48h, as células foram tratadas com as diferentes concentrações do extrato do OBM em DMEM + 10% DE SFB durante 24h. Após o tratamento, as células foram lavadas com PBS-A e fixadas com formaldeído 3,7% (preparado em PBS), por 10 min a temperatura ambiente. Após a fixação, foram lavadas 2 vezes com PBS. Procedeu-se, então a coloração com Hematoxilina-Eosina (HE), montagem das lâminas e avaliação descritiva das mesmas.

#### **b) Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

Para o estudo da interação célula/material utilizando a MEV foram utilizadas lamínulas redondas de boro silicato com 13 mm de diâmetro. A fim de evitar o deslocamento dos grânulos de OBM foi utilizado colágeno hidratado tridimensional de cauda de rato tipo I (Maria e Wada, 1997). Os estudos foram realizados após 24, 72 e 120 h em 3 condições:

**A) lamínula**

**B) lamínula + Colágeno**

**C) lamínula + Colágeno + OBM**

O experimento foi realizado em duplicata para cada condição e tempo experimental.

As lamínulas da condição B receberam os reagentes para a polimerização do colágeno na seguinte ordem: 9  $\mu$ L de solução de bicarbonato 4%, 9  $\mu$ L de DMEM concentrado 10 vezes e 90  $\mu$ L de colágeno.

As lamínulas da condição C foram preparadas misturando-se o colágeno ao material. Foram utilizados aproximadamente 100mg do OBM/lamínula, incorporados a 200µL de colágeno de cauda de rato, 20 µL de bicarbonato de sódio e 20µL de DMEM concentrado 10 vezes.

As lamínulas preparadas como descrito acima foram levadas à estufa 37°C por meia hora para secagem do colágeno.

Todas as lamínulas preparadas com colágeno foram lavadas com meio de cultura DMEM + 10% SFB previamente à semeadura das células.

Decorridos os tempos experimentais, as lamínulas correspondentes a cada condição foram fixadas em Solução de Karnovsky modificada e pós-fixadas com tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato 0,05M, pH 7,2, por 1 hora a temperatura ambiente, na capela. As amostras foram lavadas com água destilada e submetidas a banhos, em soluções crescentes de álcool (30, 50, 70, 90 e 100%), permanecendo cerca de 10 minutos em cada uma e passadas 3 vezes na solução a 100%. As lamínulas foram desidratadas utilizando-se o aparelho de ponto crítico, metalizadas com ouro e analisadas no Microscópio Eletrônico de Varredura Zeiss® do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada (NAP/MEPA) da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ – USP - Prof. Elliot Watanabe Kitajima.

#### **3.3.4. Análise Estatística**

Todos os dados apresentados (média  $\pm$  desvio padrão) foram analisados segundo Análise de Variância (ANOVA), utilizando o software InStat<sup>®</sup>, com  $p < 0,05$  (Teste de Tukey).

## **4. RESULTADOS**

### **4.1. Análise da viabilidade celular**

#### **4.1.1. Contagem de células**

Células da linhagem Balb/c 3T3 foram expostas a diferentes diluições do extrato do OBM, do GEN-OX<sup>®</sup> orgânico e do GEN-OX<sup>®</sup> inorgânico durante 24 h. A contagem do número de células remanescentes permitiu detectar uma relação diretamente proporcional entre dose e efeito dessas diluições na proliferação celular (Figura 1).

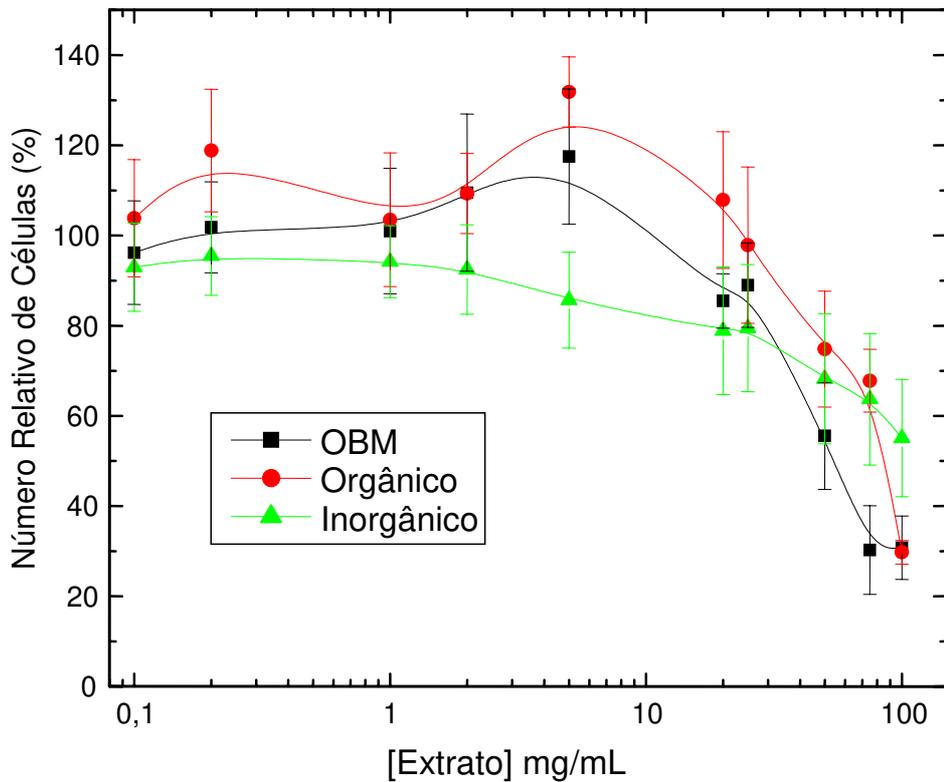
As células tratadas com o extrato do OBM, em relação ao controle, apresentaram redução estatisticamente significativa em seu número, nas concentrações superiores a 50 mg/mL ( $p < 0,01$ ).

Pudemos observar que o número de células diminuiu significativamente após a exposição a 4 ( $p < 0,01$ ), 50 ( $p < 0,05$ ), 75 ( $p < 0,01$ ) e 100 mg/mL ( $p < 0,001$ ) do GEN-OX<sup>®</sup> orgânico.

Na presença do extrato do GEN-OX<sup>®</sup> inorgânico, observamos redução estatisticamente significativa em relação ao controle, nas diluições de 20 ( $p < 0,05$ ), 25 ( $p < 0,05$ ), 50 ( $p < 0,01$ ), 75 ( $p < 0,01$ ) e 100 mg/mL ( $p < 0,01$ ).

Quando comparamos o OBM, um material ainda em desenvolvimento, com o osso orgânico e do inorgânico, na mesma diluição (75 mg/mL), verificamos que o efeito do extrato do OBM na redução do número de células é significativamente maior ( $p < 0,01$ ). Interessante destacar que o material inorgânico, mesmo na maior concentração testada, não promoveu a redução em 50% do número de células. A partir do gráfico, podemos extrapolar que essa redução em 50% ocorreu na concentração de 84,3 mg/mL para o orgânico e 53,8 mg/mL para o OBM. Na presença do extrato na concentração de 100

mg/mL do OBM e do Gen-Ox orgânico houve a redução em cerca de 69,3% do número de células, contra cerca de 45% do inorgânico (Figura 1).



**Figura 1. Representação gráfica do efeito dos extratos do OBM, GEN-OX<sup>®</sup> orgânico e inorgânico no número de células (Balb/ c 3T3).** A determinação do número de células foi realizada por contagem em câmara de Neubauer. Os resultados estão expressos em porcentagem relativa ao controle (sem extrato), considerado como 100%. Os pontos experimentais representam a média de dois experimentos independentes em triplicata. As barras representam o desvio padrão da média.

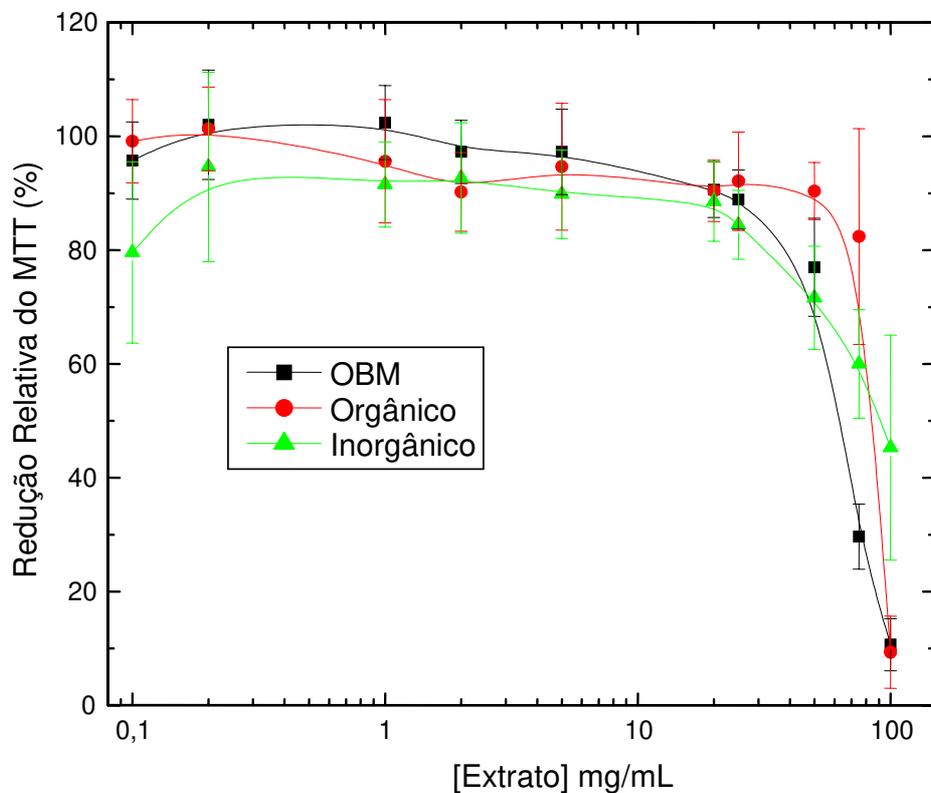
#### 4.1.2. Redução do MTT

Células da linhagem Balb/c 3T3 foram submetidas ao tratamento com diferentes diluições do extrato do OBM, do GEN-OX<sup>®</sup> orgânico e do GEN-OX<sup>®</sup> inorgânico durante 24h para determinação da função mitocondrial (Figura 2).

As células tratadas com o extrato do OBM apresentaram redução estatisticamente significativa em sua função mitodondrial, nas concentrações superiores a 25 mg/mL ( $p < 0,01$ ). Entretanto, o dobro do extrato de material inorgânico ( $p < 0,01$ ) e o triplo do orgânico ( $p < 0,05$ ) é necessário para se conseguir o mesmo efeito que o OBM. Nas três condições avaliadas pudemos perceber uma relação diretamente proporcional entre dose e efeito citotóxico.

Analisando a redução do MTT em função da concentração do extrato foi possível verificar que o perfil da curva é semelhante ao da Figura 1. O tratamento das células com o extrato do material inorgânico resultou na diminuição em 55% da capacidade mitocondrial de reduzir o MTT, coerente com a redução no número de células. Da mesma forma, os extratos do OBM e do orgânico diminuíram em cerca de 90% a redução do MTT.

Interessante destacar que na diluição a 75 mg/mL o efeito dos extratos na capacidade das células é significativamente diferente ( $p < 0,01$ ) entre o OBM, inorgânico e orgânico, respectivamente, cerca de 30, 60 e 82%.



**Figura 2. Representação gráfica do efeito dos extratos do OBM, GEN-OX<sup>®</sup> orgânico e inorgânico na capacidade de redução de MTT por fibroblastos da linhagem Balb/ c 3T3.** Os resultados estão expressos em porcentagem relativa ao controle (sem extrato), considerado como 100%. Os pontos experimentais representam a média de dois experimentos independentes em triplicata. As barras representam o desvio padrão da média .

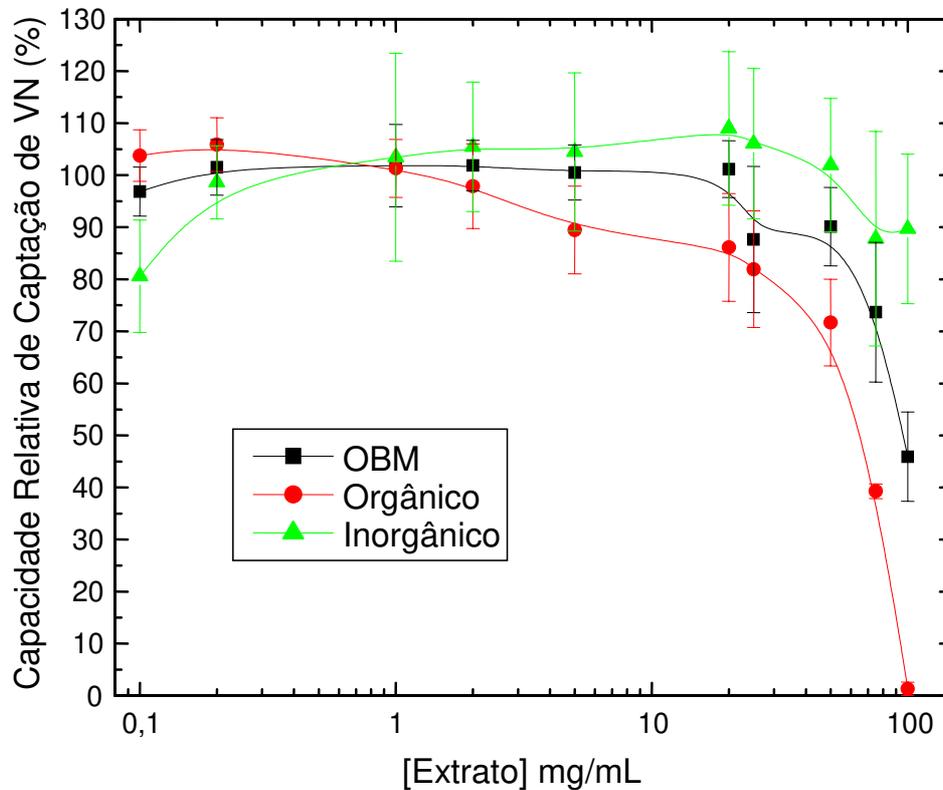
### 4.1.3. Captação do VN

Células da linhagem Balb/c 3T3 foram submetidas a tratamento com diferentes diluições do extrato do OBM, do GEN-OX<sup>®</sup> orgânico e do GEN-OX<sup>®</sup> inorgânico, durante 24h. Após esse período, foi verificada a viabilidade celular mensurando-se a captação do corante vermelho neutro pelos lisossomos das células viáveis (Figura 3).

Neste estudo, o material inorgânico não promoveu redução significativa da captação do VN. Por outro lado, o tratamento das células com o extrato do OBM promoveu redução estatisticamente significativa a partir da concentração de 75 mg/mL ( $p < 0,01$ ). Entretanto, para o material orgânico o efeito foi muito mais pronunciado, sendo a redução significativa nas concentrações superiores a 20 mg/mL ( $p < 0,01$ ).

É interessante observar no gráfico que o efeito em concentrações dos extratos superiores a 25 mg/mL, representado pela inclinação das retas (regressão linear dos pontos), mostra que o material orgânico promove uma diminuição da captação duas vezes maior que o OBM, o qual, por sua vez, é duas vezes mais potente que o inorgânico (Tabela I).

Nas concentrações de 75 e 100 mg/mL a diferença entre as captações relativas de VN nos diferentes extratos é significativamente diferente ( $p < 0,01$ ).



**Figura 3. Representação gráfica do efeito dos extratos do OBM, GEN-OX<sup>®</sup> orgânico e inorgânico na captação de VN por fibroblastos da linhagem Balb/ c 3T3.** Os resultados estão expressos em porcentagem relativa ao controle (sem extrato), considerado como 100%. Os pontos experimentais representam a média de dois experimentos independentes em triplicata. As barras representam o desvio padrão da média.

Tabela I. Efeito dos extratos de OBM, Gen-OX orgânico e inorgânico na captação de vermelho neutro.

Extrato (mg/mL)	Captação Relativa de Vermelho Neutro (%)		
	Orgânico	OBM	Inorgânico
25	81,9	87,6	106,1
50	71,7	90,1	101,9
75	39,3	73,7	87,8
100	1,3	45,9	89,7
Inclinação	-1,1	-0,57	-0,25
R	-0,97	-0,90	-0,91

## **4.2. Avaliação da Morfologia**

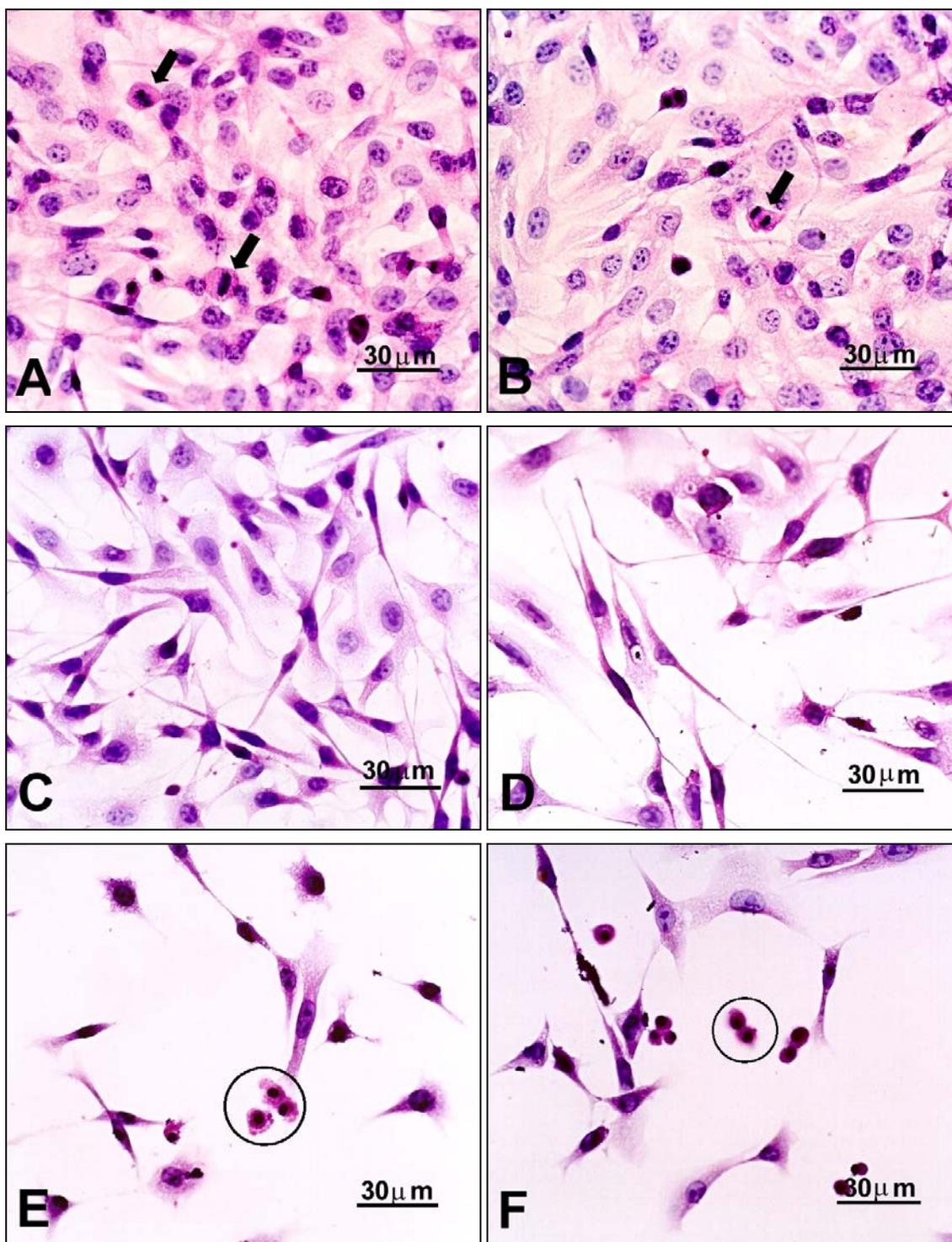
### **4.2.1. Microscopia de Luz**

A análise por microscopia de luz visou avaliar as características morfológicas normais das células, como integridade da membrana, descolamento e lise celular, tratadas com diferentes concentrações do extrato puro (100 mg/mL) do OBM. A análise descritiva dos achados foi realizada em relação ao grupo controle, não tratado com os extratos.

Podemos observar que as células do grupo controle estão homoganeamente distribuídas, apresentando aspecto alongado, com inúmeros prolongamentos citoplasmáticos e núcleos arredondados, às vezes elipsóides, ocupando grande parte do citoplasma. Podem ser observadas, ainda, mitoses dispersas (Figura 4A).

Os grupos tratados com concentração do extrato de 0,1 a 25 mg/mL já apresentam alterações morfológicas como diminuição do citoplasma e núcleo picnótico (Figura 4B e 4C).

O tratamento das células com extrato a 50 mg/mL já permite observar redução no número de células em relação ao grupo controle. Estas apresentam conteúdo citoplasmático reduzido, bem como diminuição do número de prolongamentos (Figura 4D). O tratamento com 75 mg/mL promove perceptível diminuição na densidade celular em relação ao grupo controle. As células remanescentes apresentam diminuição do citoplasma, bem como de seus prolongamentos, não se percebendo, inclusive, contato entre elas. Os núcleos apresentam-se, na sua maior parte, condensados e com menor volume. Algumas célula, ainda, apresentam núcleo picnótico sugestivo de apoptose (Figura 4E). Com 100 mg/mL há drástica diminuição na densidade celular e os núcleos celulares, em sua maior parte, apresentam-se picnóticos, sugerindo apoptose (Figura 4F).



**Figura 4. Fotomicrografia dos fibroblastos Balb/ c 3T3 cultivados em lamínula, após tratamento por 24 h com diferentes diluições do extrato do OBM: 0 (A); 20 (B); 25 (C); 50 (D); 75 (E) e 100 mg/mL (F). As setas indicam células em mitose e as áreas circuladas, células com aspecto morfológico sugestivo de apoptose.**

#### **4.2.2. Microscopia eletrônica de varredura**

Inicialmente, neste estudo, as células foram semeadas diretamente sobre o OBM. Contudo, não houve adesão dos fibroblastos sobre o material e foi intensa a morte celular. As poucas células que aderiram à placa sofreram citólise.

Visto que os estudos anteriores mostraram claro efeito citotóxico do OBM, o qual diminuía em função da diluição do extrato, aventamos a hipótese de que resíduos hidrossolúveis poderiam estar concorrendo para a morte celular (Figura 5).

Desta forma, o OBM foi dializado diversas vezes contra água deionizada estéril, e condicionado em DMEM + 10% SFB durante três dias, com 10 trocas de 50 mL. Na primeira troca observou-se a coloração amarelada da solução, indicativa de pH ácido, muito embora a medida no potenciômetro indicasse pH 7,2.

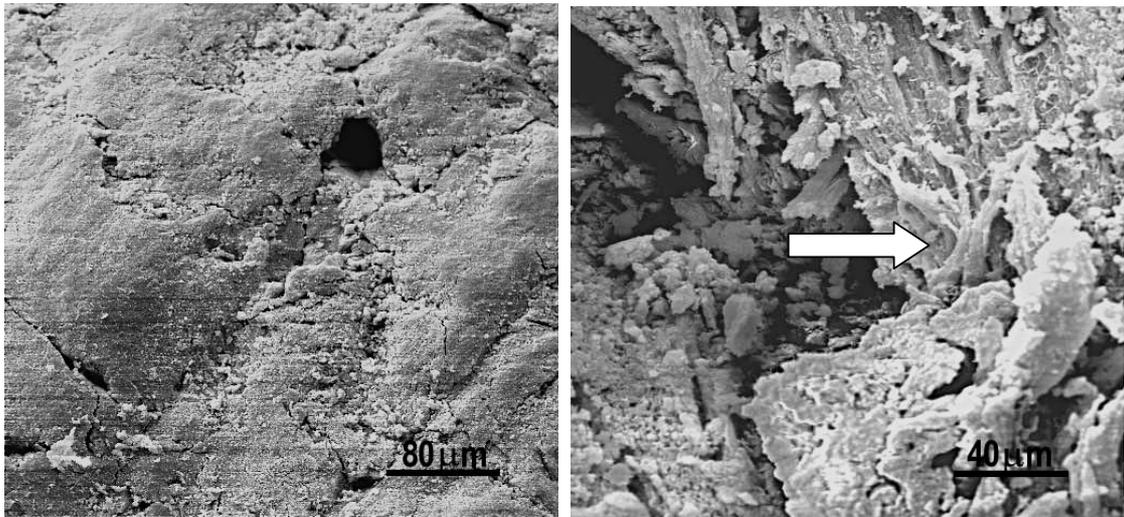
O colágeno de cauda de rato foi utilizado para estabilizar as partículas do OBM, evitando sua movimentação durante o experimento e os procedimentos de fixação e recobrimento intrínsecos da preparação para a MEV. Entretanto, houve o cuidado de utilizar o colágeno apenas como um adesivo, evitando que recobrisse o material o que poderia afetar o estudo (Figura 6).

Após o plaqueamento das células (24 h) pode-se observar no grupo A (lamínula apenas) células com prolongamentos aderidas ao material e mitoses (Figura 7A). Expressivo aumento na densidade de células foi observado 72 h pós-plaqueamento em relação ao período anterior, tendo as células praticamente recoberto toda a área da lamínula (Figura 7C). O recobrimento completo ocorreu 120 h depois (Figura 7E).

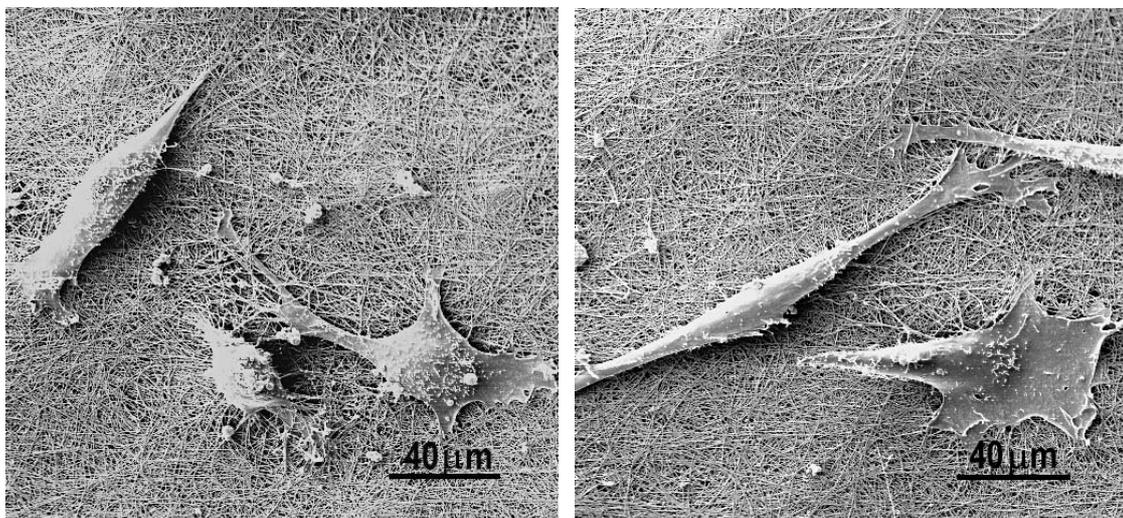
No grupo B (lamínula + colágeno) a densidade celular pareceu ser maior que a do grupo A, mesmo após 24 h indicando que as fibrilas de colágeno podem ter favorecido a adesão das células (Figura 7B). No período de 72 h, as células já estavam bem espalhadas sobre a rede de colágeno, interconectadas e apresentando mitoses. Podemos, ainda,

observar a rede de fibrilas de colágeno sobre a lamínula (Figura 7D). Após 120 h, a fotomicrografia (Figura 7F) sugere a confluência das células, ocupando toda a área da lamínula.

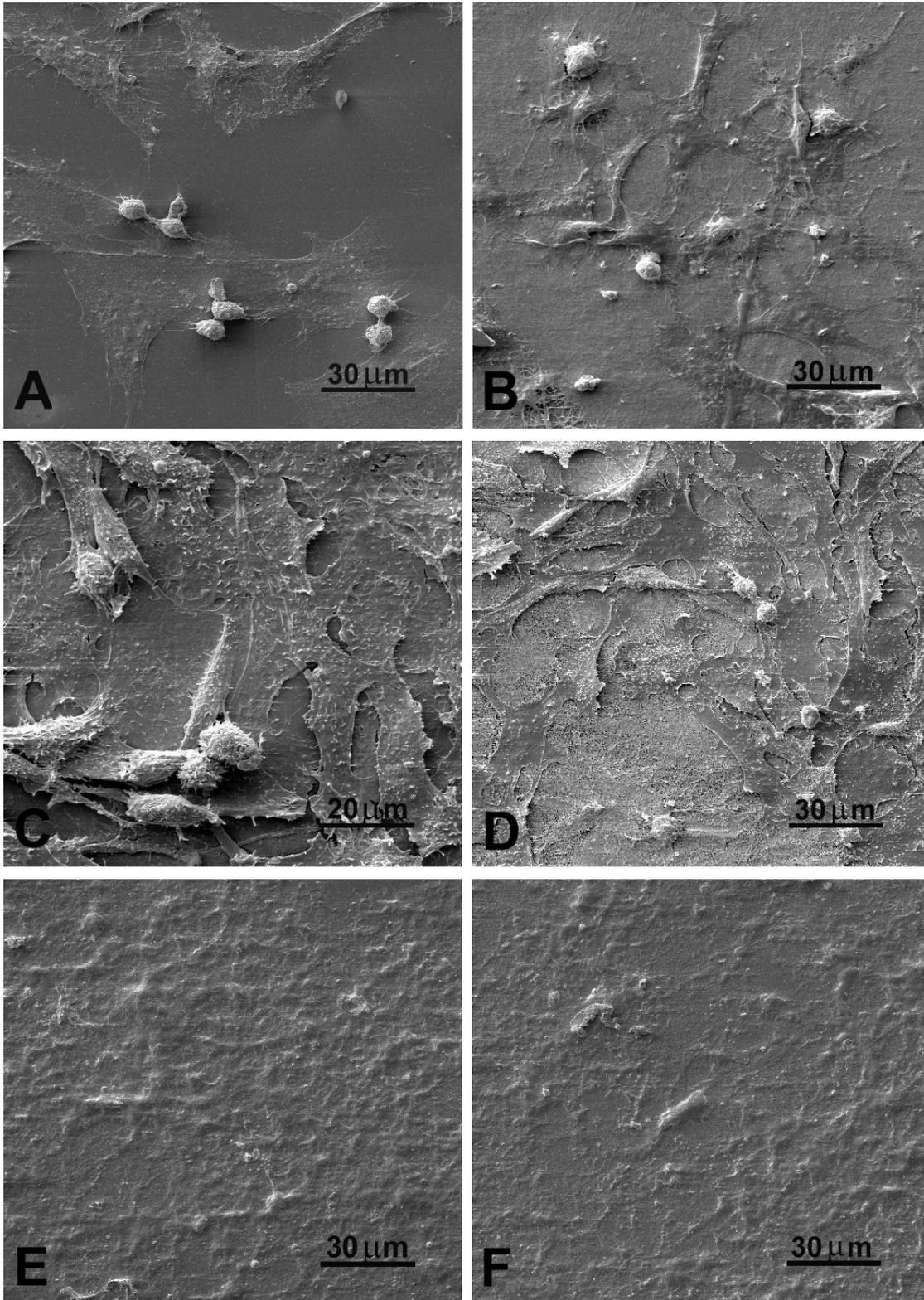
No grupo C, onde o OBM foi aderido à lamínula com uma fina camada de colágeno de cauda de rato, observamos após 24 h do plaqueamento, a adesão das células ao material e a emissão de prolongamentos celulares (Figura 8A e B). No período posterior (72 h), observamos a presença de fibroblastos com morfologia normal sobre o material, interconectados, em uma densidade superior ao período de 24 h (Figura 8C e D). Após 120 h, há um aumento ainda maior na densidade celular sobre o material (Figura 8E). Os fibroblastos apresentam-se aderidos e espalhados sobre o material, comunicando-se com as células vizinhas através de seus prolongamentos. Podemos ainda notar a ocorrência de células em mitose (Figura 8F).



**Figura 5. Eletromicrografia de varredura. OBM não condicionado. Ausência de fibroblastos sobre o material. A seta indica possível exposição de fibras colágenas do material.**



**Figura 6. Eletromicrografia de varredura. OBM condicionado recoberto com colágeno de cauda de rato. Notar que o colágeno impede o contato célula-material.**



**Figura 7. Eletromicrografia de varredura. Fibroblastos Balb/ c 3T3 cultivados em lamínula por 24 (A), 72 (C) e 120 (E) e em lamínula mais colágeno por 24 (B), 72 (D) e 120 h (F).**

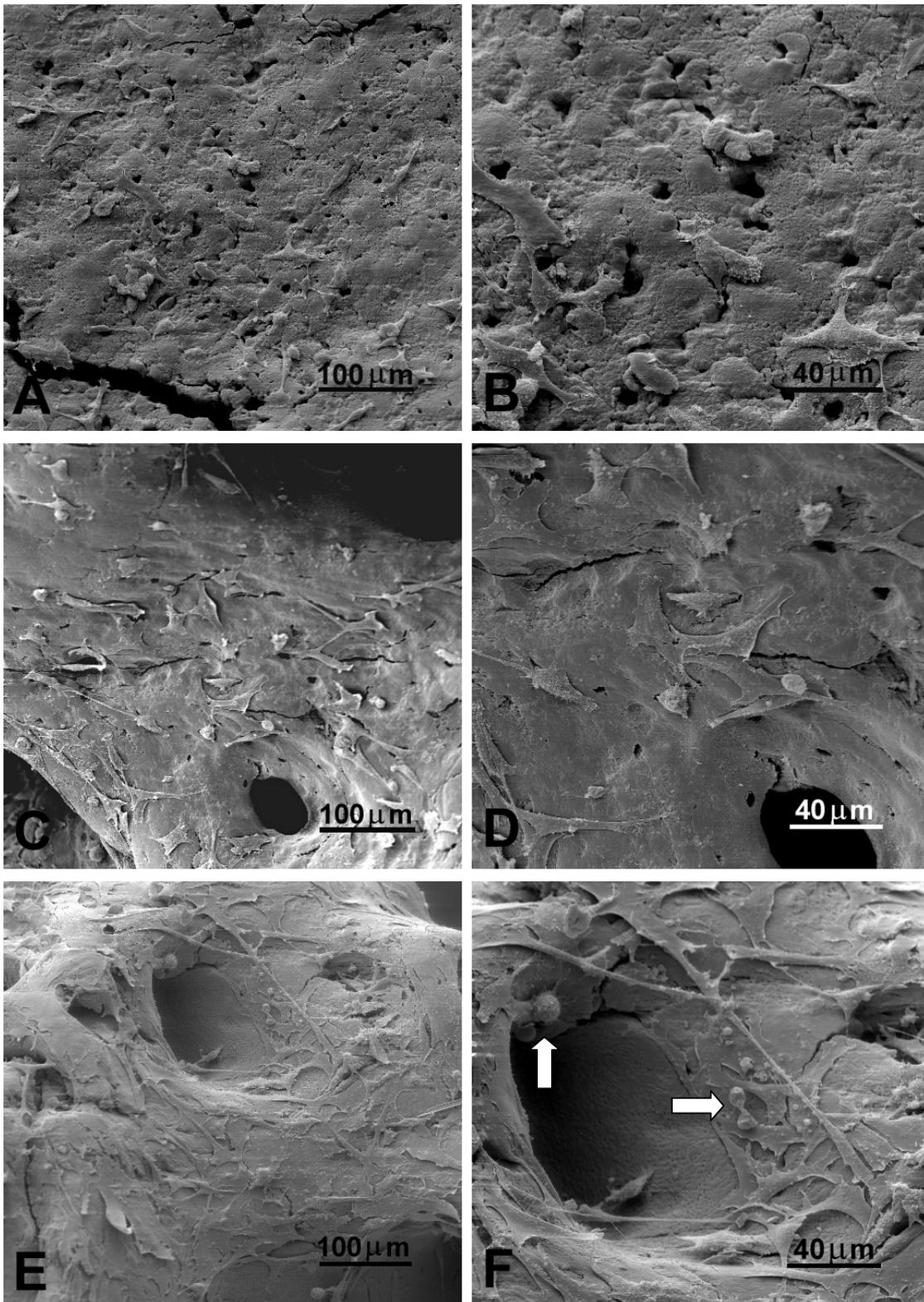


Figura 8. Eletromicrografia de varredura. Fibroblastos Balb/ c 3T3 cultivados sobre o OBM, aderidos à lamínula com colágeno de cauda de rato, após 24 (A-B), 72 (C-D) e 120h (E-F).

## 5. DISCUSSÃO

Perdas ósseas extensas ocasionadas por traumas, patologias e defeitos congênitos não são regeneradas completamente pelo organismo. Diante disso, vêm sendo desenvolvidos biomateriais que visam auxiliar nesse processo, dentre eles os de origem bovina, em função da sua boa performance clínica, do seu baixo custo, do controle de zoonoses e de se apresentarem como uma fonte praticamente inesgotável.

É preciso considerar que no Brasil há um grande rebanho de bovinos, vigilância sanitária rigorosa e um rígido controle de doenças. Outra vantagem é a possibilidade de obtenção de ossos de animais jovens cuja matriz óssea é potencialmente mais rica em fatores de crescimento.

O osso bovino, para ser utilizado como biomaterial, precisa ser submetido a cuidadoso processamento mecânico e químico. Esse processamento, numa primeira etapa, consiste na lavagem do osso, remoção de sangue e gordura. Em seguida, podem ser tomadas duas vias distintas e excludentes: desmineralização com ácidos, obtendo-se somente o componente orgânico; ou tratamento térmico o qual pode chegar à sinterização, isto é, o osso é submetido a temperaturas ao redor de 1000°C, resultando na eliminação do conteúdo protéico e manutenção do arcabouço de hidroxiapatita (Oliveira *et al.*, 1999).

Existe no mercado, atualmente, uma gama de materiais de origem bovina, com predomínio dos inorgânicos, ou seja, desproteinizados termicamente, como o GEN-OX<sup>®</sup> (Baumer S.A., Mogi Mirim, Brasil), Keil Bone<sup>™</sup> (Braun Milsungen, Milsungen, Alemanha), Bio-Oss<sup>™</sup> (Geistlich Pharma, Wolhusen, Suíça) e Surgibone<sup>™</sup> (Unilab Surgibone, Mississauga, Ontário, Canadá). Contudo, a calcinação do osso, eliminando o componente orgânico, torna esses materiais friáveis, contra-indicando seu uso onde resistência mecânica seja exigida, por exemplo, para a fixação de parafusos. Da mesma forma,

embora o enxerto bovino orgânico (desmineralizado) possua boa resiliência, apresenta pobre resistência mecânica. Além disso, os biomateriais orgânicos durante os procedimentos cirúrgicos, ao serem misturados com sangue, tornam-se difíceis de serem manipulados e alojados nas cavidades cirúrgicas.

Sabe-se que a resistência mecânica e resiliência do osso se devem ao complexo colágeno-hidroxiapatita (TenHuisen *et al.*, 1995; Suh *et al.*, 2001), mas, isoladamente, estas características são perdidas. Assim, buscou-se desenvolver um material que preservasse ambos os componentes, utilizando uma nova metodologia para o processamento do osso bovino de forma a evitar a desmineralização ou sinterização do material. Como resultado obteve-se um material contendo a estrutura de hidroxiapatita natural (sem sinterização) depositada sobre o colágeno tipo I, possivelmente contendo traços de fatores de crescimento. O processo envolve a limpeza mecânica e, posteriormente, o processamento químico do osso bovino com álcalis, solventes e peróxidos capazes de remover restos de células, sangue, coágulo, gordura e proteínas não aderidas ao osso.

Pelo fato do OBM apresentar-se como um material promissor para uso na clínica médico-odontológica, por conciliar resistência e resiliência, é preciso certificar-se de que ele não apresente efeitos tóxicos ou ative o sistema imunológico do organismo, isto é, que seja um material biocompatível (Wataha, 2001).

A avaliação da biocompatibilidade constitui-se num requerimento essencial para determinar a segurança do material a ser implantado *in vivo*, pois permite verificar se a resposta biológica será a desejável, sem que o mesmo seja imediatamente destruído ou encapsulado pelo organismo (Seal, 2001), comprometendo, assim, a sua função.

O primeiro nível de avaliação de biocompatibilidade de materiais, segundo a ISO 10993 e a ADA/ANSI, é a análise *in vitro*, sendo os testes de citotoxicidade adequados

para a determinação da toxicidade em nível celular. A avaliação da biocompatibilidade em experimentos *in vitro* com culturas de células pode, ainda, ser determinada através de microscopia de luz e eletrônica de varredura, analisando-se a morfologia, a adesão, bem como a proliferação celular sobre o material estudado (Ahmad *et al.*, 1999; Anselme, 2000; Bogdanski *et al.*, 2002). Vários trabalhos avaliam a biocompatibilidade *in vitro* de biomateriais, através de ensaios de citotoxicidade em consonância com a microscopia eletrônica de varredura (Acil *et al.*, 2000; Ramires *et al.*, 2001; Bosetti *et al.*, 2002).

Para a execução do presente estudo, escolheu-se a linhagem celular Balb/c 3T3 (clone A31) indicada pela ISO 10993-5 por se tratar de uma linhagem estabelecida, permitindo, assim, maior reprodutibilidade dos resultados (Hanks *et al.*, 1993; Wataha *et al.*, 1991). Além disso, estudos recentes da citocompatibilidade *in vitro* de biomateriais auxiliares ao reparo ósseo avaliaram a citotoxicidade destes, bem como a interação célula-material, através de MEV, utilizando fibroblastos de linhagens estabelecidas (Marques *et al.*, 2002; Timmer *et al.*, 2003). Osteoblastos poderiam, também, ser utilizados neste tipo de estudo. Entretanto, para teste iniciais de biocompatibilidade são utilizados menos freqüentemente devido às suas características intrínsecas como taxa de proliferação, mais lenta que fibroblastos, e funcionalidade biológica. Esta última reveste-se de grande importância visto que, face à presença de um novo material, pode não haver morte celular mas sim perda da capacidade de produzir e mineralizar a matriz óssea.

Tanto a ADA/ANSI como a ISO são concordantes na utilização de testes *in vitro* no primeiro nível de avaliação de um material. A ISO 10993 tem como objetivos a proteção do ser humano, além de assegurar o bem-estar dos animais, reduzir o seu número e a exposição a que são submetidos. A utilização de testes *in vitro* é indicada como etapa anterior aos testes em animais e humanos. Além disso, a avaliação de materiais em

cultura de células constitui um meio rápido, reproduzível para essa determinação (Freshney, 2000; Schmalz, 1994).

Os estudos de citotoxicidade têm se mostrado, ainda, como importante ferramenta na avaliação e comparação de materiais utilizados na clínica odontológica, como cimentos endodônticos (Koulazidou *et al.*, 1998; Ersev *et al.*, 1999), adesivos dentinários (Costa *et al.*, 1999; Demarco *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2003), resinas (Tang *et al.*, 1999), braquetes ortodônticos, materiais de implante (Bogdanski *et al.*, 2002), substitutos ósseos (Suh *et al.*, 2001) e carreadores para a engenharia de tecidos (Alsberg *et al.*, 2001).

Materiais sólidos são normalmente testados através de contato indireto com as células (Ikarashi *et al.*, 1992) ou através de “trans-well” (Babich & Sinensky, 2001) ou de seus extratos (Leyhausen *et al.*, 1999; Kopac *et al.*, 2002). Optou-se, neste trabalho, por utilizar-se o extrato do OBM por se tratar de um material sólido e permitir avaliar se resíduos tóxicos permaneceram no material após sua produção. Como o OBM, quando inserido no defeito ósseo, estará em contato com sangue e/ou fluidos corporais, escolheu-se o meio de cultura DMEM como veículo de extração.

A análise dos resultados de citotoxicidade de um material em desenvolvimento normalmente é feita através da comparação com materiais similares em uso clínico ou padrões positivos ou negativos reconhecidos (Schmalz, 1994, Keiser *et al.*, 2000; Imazato *et al.*, 2000). Neste trabalho, comparamos a citocompatibilidade do novo material em desenvolvimento, o OBM, com a do Osso Bovino Orgânico e Inorgânico (GEN-OX<sup>®</sup> orgânico e inorgânico), uma vez que estes materiais se encontram disponíveis no mercado odontológico e são utilizados nas mesmas situações clínicas.

Nos ensaios de contagem celular, redução do MTT e captação do Vermelho Neutro, o OBM apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao controle nas concentrações superiores a 50 mg/mL. Este comportamento foi semelhante ao exibido

pelo Gen-Ox® orgânico (Figura 1 e 2). Entretanto, é interessante perceber que o material inorgânico não afetou a captação do vermelho neutro em oposição ao que foi induzido pelo OBM e material orgânico (Figuras 3).

A citotoxicidade nessas concentrações do OBM pôde, ainda, ser confirmada pela MO (Figura 4) que evidencia a redução no número de células, núcleo e citoplasma alterado. Estes resultados confirmaram os estudos de viabilidade celular por contagem do número de células (Figura 1), redução do MTT (Figura 2) e captação do Vermelho Neutro (Figura 3), tendo, inclusive, os materiais exibido perfil semelhante, exceto para o inorgânico na captação do VN. Não houve, portanto, diferença no efeito citotóxico apresentado pelo OBM, o GEN-OX® orgânico e inorgânico.

Hofman *et al.* (1999) compararam dois materiais de origem bovina, Laddec® e Bio-oss®, semeando-se células osteoblásticas, obtidas a partir de calvária de rato, sobre eles. O Laddec® caracteriza-se pela presença da hidroxiapatita e do colágeno (os componentes inorgânico e orgânico, respectivamente) e o Bio-Oss é constituído pelo osso inorgânico bovino. Verificaram que a proliferação das células, determinando o conteúdo de proteínas, foi idêntica para os dois materiais. Além disso, as células apresentaram morfologia normal e se proliferaram sobre o material, indicando boa biocompatibilidade. Entretanto, eles não compararam a proliferação celular com um grupo não tratado, o que possibilitaria a determinação da citotoxicidade desses materiais em relação ao controle.

É preciso ressaltar que efeitos tóxicos *in vitro* não significam, necessariamente, toxicidade *in vivo*. No sistema *in vitro*, as células estão expostas diretamente ao agente agressor ou a seus produtos e o meio não se renova por cerca de 2 a 3 dias, concentrando possíveis componentes tóxicos. No sistema *in vivo*, a homeostase proporcionada pelos fluidos pode agir protegendo o organismo, removendo a toxina do sítio de implantação, se o fator em questão for solúvel.

No trabalho realizado por Imazato *et al.* (2000) comparou-se um material já utilizado na clínica odontológica com outro modificado, contendo um agente antimicrobiano a fim de melhorar sua performance clínica. Ambos demonstraram padrão de toxicidade similar, embora tenham levado à redução de 40% na taxa de proliferação celular em relação ao controle. Entretanto, apesar da toxicidade observada, não se descartou a utilização clínica do novo material, uma vez que o controle também demonstrara certo grau de citotoxicidade. Isto ocorreu devido ao fato de ambos possuírem a mesma composição química, exceto pela presença do agente antimicrobiano.

Dessa maneira, a despeito da extrapolação limitada dos resultados obtidos *in vitro* para o sistema *in vivo*, é importante estimar o grau de toxicidade do OBM, pois a despeito do efeito citotóxico do GEN-OX<sup>®</sup> orgânico e inorgânico, estudos em animais demonstraram a biocompatibilidade desses materiais. Foram realizados estudos criando-se defeitos críticos na calvária de ratos, os quais foram preenchidos com os materiais de origem bovina GEN-OX<sup>®</sup>. Verificou-se a biocompatibilidade do material, assim como seu poder osteocondutor, facilitando a regeneração óssea (Taga *et al.* 1997; Herculani *et al.*, 2000). Trabalhos em subcutâneo de ratos confirmam a biocompatibilidade *in vivo* desses materiais (Sicca *et al.*, 2000; Oliveira *et al.*, 2003).

Pudemos perceber nos ensaios de citotoxicidade do OBM uma relação diretamente proporcional entre dose e efeito, porém, em menores concentrações do extrato, não havendo diferença estatisticamente significativa com o controle. Estes resultados sugeriram a existência de resíduos do processamento do OBM liberados no extrato.

Ignatius *et al.* (2001) atribuíram a citotoxicidade apresentada por algumas cerâmicas de vidro, utilizadas como materiais osteossubstitutos, à liberação de componentes do material para o extrato. Marques *et al.* (2002) compararam a citocompatibilidade de polímeros e compósitos destes com hidroxiapatita. Os autores

atribuíram a diferença de citotoxicidade entre os materiais ao processamento a que foram submetidos. Os tratamentos a que são submetidos alguns polímeros, como aquecimentos e ciclos de extrusão, promovem a formação de fragmentos facilmente solubilizados durante a obtenção do extrato, o que aumenta, portanto, a citotoxicidade do material em relação àqueles que não sofrem tal processamento.

Essa evidência foi reforçada na análise morfológica por MEV (Figura 5). Semear as partículas do OBM com fibroblastos resultou na morte de praticamente todas as células. Exhaustivas diálises contra água deionizada e condicionamento com DMEM e soro resultaram na adesão e proliferação da célula sobre o material (Figura 8). Casabona *et al.* (1998) adotaram procedimentos semelhantes, lavando blocos de hidroxiapatita antes de receberem células sobre eles e posterior implantação em animais.

Além da possível remoção de resíduos tóxicos, o condicionamento com DMEM + 10% SFB ainda pode ter possibilitado a adsorção de proteínas do SFB, principalmente fibronectina, importante para os mecanismos de adesão celular (Ahmad *et al.*, 1999). Segundo Boyan (1996), um material, antes de sua implantação, sempre deve ser condicionado pelos componentes do fluido no qual será imerso, seja ele soro, saliva, fluido crevicular ou meio de cultura de células. Além disso, a natureza das biomoléculas condicionadoras e sua orientação sobre a superfície do material têm consequências diretas no recrutamento, adesão, proliferação e diferenciação das células (Boyan, 1996). O Soro Fetal Bovino utilizado como suplemento no meio de cultura em que condicionamos o OBM possui numerosas proteínas de adesão, tais como fibronectina. Essas proteínas favorecem a resposta celular inicial aos materiais implantados, facilitando sua adesão (Ahmad *et al.*, 1999)

Nos ensaios de citotoxicidade, os extratos mais concentrados do OBM levaram à diminuição no número de células, alterações na morfologia (Figura 4), além de diminuição

nas funções mitocondrial e lisossomal. Contudo, os estudos de citotoxicidade não podem ser os únicos determinantes na avaliação da biocompatibilidade *in vitro* de um material.

Ruano *et al.* (2000) estudaram a biocompatibilidade de uma hidroxiapatita cerâmica e uma hidroxiapatita não-cerâmica, avaliando viabilidade celular, morfologia e contato célula-material. Verificaram por MEV que as células cresceram em íntimo contato com ambos os materiais, não havendo diferença na síntese de procolágeno. Entretanto, na avaliação da viabilidade celular, a HA cerâmica apresentou uma diminuição estatisticamente significativa em relação ao grupo controle e ao grupo tratado com HA. Apesar das diferenças entre este material (HA sintética) e o GEN-OX inorgânico (HA natural sinterizada), ambos promoveram a diminuição do número de células. Contudo, os mecanismos responsáveis por essa diminuição não podem ser determinados com precisão, uma vez que no trabalho de Ruano *et al.* (2000) analisou-se o contato direto célula-material. Em nosso trabalho, o extrato hidrossolúvel foi responsável pela redução no número de células.

Gomes *et al.* (2001) avaliaram polímeros e compósitos destes com HA. Apesar de os compósitos terem apresentado maior citotoxicidade que os polímeros, os estudos de interação célula-material apontaram melhores resultados, isto é, maior adesão e proliferação nos materiais formados a partir de polímeros e HA. Segundo os autores, a citotoxicidade apresentada se deve ao processamento físico-químico para a união do polímero à HA.

Verificou-se, portanto, que os testes de citotoxicidade não podem ser conclusivos a respeito da biocompatibilidade de um determinado material.

Nos nossos estudos, verificamos através da MEV, adesão, proliferação e espalhamento dos fibroblastos Balb/c 3T3 sobre o OBM. Acil *et al.* (2000) também

verificaram esse comportamento celular sobre um biomaterial de origem bovina inorgânico, o Bio-Oss.

Rodriguez *et al.* (2003) caracterizaram um biomaterial composto de HA (sinterizada) e colágeno, ambos de origem bovina. A HA e o colágeno foram obtidos em processos distintos, sendo então misturados em diferentes proporções. A citotoxicidade foi avaliada de maneira indireta, com ágar, semeando-se fibroblastos de camundongo da linhagem C3H/NA do Banco de células do Rio de Janeiro (UFRJ – Brasil). Em nenhuma das proporções estudadas foi observada citotoxicidade. Nos estudos de adesão celular por MEV, foram semeados osteoblastos humanos sobre o material, observando-se raras células no quarto dia e um grande aumento do número de células no décimo primeiro dia pós-plaqueamento. O pequeno número de células nos tempos iniciais pós-plaqueamento foi atribuído pelos autores ao número de células utilizado, bem como a área do material a ser recoberta. É interessante destacar que, durante a preparação do compósito, soro humano foi adicionado ao material, favorecendo a formação de interface protéica, a qual, possivelmente, pode ter favorecido significativamente a proliferação celular. A aplicação clínica desta combinação é limitada em função do uso de soro humano. A eliminação do risco de ativação do sistema imunológico poderia ser obtido com o uso de fatores de crescimento recombinantes.

Faz-se necessário lembrar que a interação célula-material entre os fibroblastos e o OBM foi possível somente após lavagem e condicionamento do OBM. Esse fato nos reforça a idéia de que o processamento do material seja o responsável pela citotoxicidade apresentada, uma vez que produtos resultantes deste podem estar permanecendo sobre o material. Essa citotoxicidade foi muito semelhante à apresentada pelo GEN-OX<sup>®</sup> orgânico e inorgânico, conforme mostrado anteriormente. Como algumas etapas do processamento

desses materiais são comuns, podemos ainda acreditar que resíduos destes podem também estar permanecendo sobre estes materiais.

No trabalho realizado por Hoffman *et al.* (1999), foi verificada boa interação das células ao Laddec<sup>®</sup>. Além disso, observou-se maior expressão de fosfatase alcalina e formação de nódulos de mineralização dos osteoblastos em contato com o Laddec àqueles em contato com o Bio-Oss<sup>®</sup>. Deve-se considerar o fato de que o processamento do Laddec<sup>®</sup> envolve, além dos tratamentos químicos, uma lavagem do material a alta pressão, permitindo remoção dos resíduos decorrentes do processamento. O processamento do OBM não inclui a alta pressão no processo de lavagem, o que pode estar possibilitando a permanência de resíduos do processamento.

## 6. CONSTATAÇÕES

- Observamos uma relação diretamente proporcional entre dose e efeito na citotoxicidade apresentada pelo OBM, GEN-OX<sup>®</sup> orgânico e inorgânico;
- O OBM apresentou citotoxicidade semelhante ao GEN-OX<sup>®</sup> orgânico e inorgânico, embora este último não tenha proporcionado alteração na capacidade de captação de VN;
- A lavagem com água deionizada e o condicionamento do OBM em DMEM + 10% possibilitaram a adesão e proliferação dos fibroblastos Balb/c 3T3 ao material;
- As células aderidas ao material apresentaram morfologia normal, compatível com a observada no grupo controle

## 7. Conclusões

- O extrato do OBM apresenta efeito citotóxico em concentrações superiores a 50 mg/mL;
- O OBM possui fatores citotóxicos hidrossolúveis. A remoção dos mesmos será importante para a otimização dos efeitos biológicos

## 8. PERSPECTIVAS

Os estudos *in vitro* do OBM indicam que resíduos do seu processamento físico-químico permanecem sobre o mesmo. Dessa maneira, direcionamentos devem ser dados para modificação no processamento do material.

O OBM condicionado proporcionou a adesão e proliferação celular, verificada através da MEV, sugerindo o seu potencial como biomaterial, inclusive como carreador dentro da filosofia da engenharia de tecidos. Para tanto, são necessários novos estudos *in vitro*, utilizando-se células obtidas a partir de cultura primária de osteoblastos humanos, cujas características fenotípicas guardam maior semelhança com o tecido que estará em contato com o material. Em particular, a produção e mineralização da matriz óssea devem ser verificadas.

Para o uso clínico, entretanto, pelas normas da ISO e da ADA/ANSI, ainda são necessários estudos em animais experimentais para que ele possa ser avaliado numa etapa subsequente, em animais e humanos.

## 9. Referências Bibliográficas

- ACIL, Y.; TERHEYDEN, H.; DUNSCHE, A.; FLEINER, B., JEPSEN, S. (2000). Three-dimensional cultivation of human osteoblast-like cells on highly porous natural bone mineral. *J. Biomed. Mater. Res.*, Sep 15, **51(4)**:703-10.
- AHMAD, M.; MCCARTHY, M.B.; GRONOWICZ, G. (1999). An *in vitro* model for mineralization of human osteoblast-like cells on implant materials. *Biomaterials*. Feb., **20(3)**:211-20.
- AICHELMANN-REIDY, M.E. E YUKNA, R.A. (1998). Bone Replacement Grafts. *Advances in Periodontol.*, **42(3)**, p. 491-503.
- ALSBERG, E.; ANDERSON; K.W.; ALBEIRUTI, A.; FRANCESCHI R.T.; MOONEY, D.J. (2001). Cell-interactive alginate hydrogels for bone tissue engineering. *J. Dent. Res.* Nov, **80(11)**:2025-9.
- AN, Y.H.; WOOLF, S.K.; FRIEDMAN, R.J.; H.A. (2000). Pre-clinical *in vivo* evaluation of orthopaedic bioabsorbable devices. *Biomaterials*, **21**:2635-2652.
- ANSELME K. (2000). Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials*, Apr, **21(7)**:667-81.
- ARTZI, Z.; TAL, H.; DAYAN, D. (2000). Porous bovine bone mineral in healing of human extraction sockets. Part 1: histomorphometric evaluations at 9 months. *J. Periodontol.*, Jun, **71(6)**:1015-23
- ARTZI, Z.; TAL, H.; DAYAN, D. (2001). Porous bovine bone mineral in healing of human extraction sockets: 2. Histochemical observations at 9 months. *J. Periodontol.*, Feb, **72(2)**:152-9
- BABICH, H.; SINENSKY, M.C. (2001). Indirect cytotoxicity of dental materials: a study with Trans-well inserts and the neutral red uptake assay. *Altern. Lab. Anim.*, Jan-Feb, **29(1)**:9-13.
- BABICH, H.; BORENFREUND, E. (1990). Application of the neutral red cytotoxicity assay to *in vitro* toxicology. *ATLA*, **18**,129-44
- BARILE, F.A. Mechanisms of cytotoxicology. I.Introduction. In: \_\_\_\_\_. Introduction to *in vitro* cytotoxicology mechanisms of cytotoxicology. Mechanisms and Methods. Boca Raton, Editora CRC Press, 1994. Cap.2, p.27-45.

- BASLÉ, M.F.; GRIZON, F.; PASCARETTI, C.; LESOURD, M.; CHAPPARD, D. (1998). Shape and orientation of osteoblast-like cells (Saos-2) are influenced by collagen fibers in xenogenic bone biomaterial. *J. Biomed. Mater. Res.*, Jun 5, **40(3)**:350-7.
- BLAI, R.H.C.; ZAIDI, M.; SCHLESINGER, P.H. (2002). Mechanisms balancing skeletal matrix synthesis and degradation. *Biochem J.*, Jun 1, **364(Pt 2)**:329-41.
- BOGDANSKI, D.; KOLLER, M.; MULLER, D.; MUHR, G.; BRAM, M.; BUCHKREMER, H.P.; STOVER, D.; CHOI, J.; EPPLE, M. (2002). Easy assessment of the biocompatibility of Ni-Ti alloys by *in vitro* cell culture experiments on a functionally graded Ni-NiTi-Ti material. *Biomaterials*, Dec, **23(23)**:4549-55.
- BORENFREUND, E.; PUENER, J.A. (1984). A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90). *J. Tissue Cult. Meth.*, **9**:7-9.
- BOSETTI, M.; MASSE, A.; TOBIN, E.; CANNAS, M. (2002). Silver coated materials for external fixation devices: *in vitro* biocompatibility and genotoxicity. *Biomaterials*, Feb, **23(3)**:887-92.
- BOUILLAGUET, S.; SHAW, L.; GONZALEZ, L.; WATAHA, J.C.; KREJCI, I. (2002). Long-term cytotoxicity of resin-based dental restorative materials. *J. Oral Rehabil.*, Jan, **29(1)**:7-13.
- BOYAN, B.D.; HUMMERT, T.; DEAN, D.D.; SCHWARTZ, Z. (1996). Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. *Biomaterials*, **17**:137-146.
- BURG, K.J.; PORTER, S.; KELLAM, J.F. (2000). Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials*. Dec, **21(23)**:2347-59.
- CANCEDDA, R.; DOZIN, B.; GIANNONI, P.; QUARTZO, R. (2002). Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone. Elsevier Science. International society of matrix biology.
- CASABONA, F.; MARTIN, I.; MURAGLIA, A.; BERRINO, P.; SANTI, P.; CANCEDDA, R.; QUARTO, R. (1998). Prefabricated engineered bone flaps: an experimental model of tissue reconstruction in plastic surgery. *Plast Reconstr Surg*. Mar, **101(3)**:577-81.
- CHEN, R.S.; LIU, C.C.; TSENG, W.Y.; JENG, J.H.; LIN, C.P. (2003). Cytotoxicity of three dentin bonding agents on human dental pulp cells. *J Dent. Mar.*, **31(3)**:223-9.

- CORDEN, T.J.; JONES, I.A.; RUDD, C.D.; CHRISTIAN, P.; DOWNES, S.; MCDOUGALL, K.E. (2000). Physical and biocompatibility properties of poly-epsilon-caprolactone produced using in situ polymerisation: a novel manufacturing technique for long-fibre composite materials. *Biomaterials*, Apr, **21(7)**:713-24.
- COSTA, C.A.; HEBLING, J.; GARCIA-GODOY, F.; HANKS, C.T. (2003). *In vitro* cytotoxicity of five glass-ionomer cements. *Biomaterials*, Sep, **24(21)**:3853-8.
- DELAISSE, J.M.; ENGSIG, M.T.; EVERTS, V.; DEL CARMEN OVEJERO, M.; FERRERAS, M.; LUND, L.; VU T.H.; WERB, Z.; WINDING, B.; LOCHTER, A.; KARSDAL, M.A.; TROEN, T.; KIRKEGAARD, T.; LENHARD, T.; HEEGAARD, A.M.; NEFF, L.; BARON, R.; FOGED, N.T. (2000). Proteinases in bone resorption: obvious and less obvious roles. *Clin. Chim. Acta*. Feb 15, **291(2)**:223-34.
- DEMARCO, F.F.; TARQUÍNIO, S.B.; JAEGER, M.M.; DE ARAÚJO, V.C.; MATSON, E. (2001). Pulp response and cytotoxicity evaluation of 2 dentin bonding agents. *Quintessence Int.* **32(3)**:211-20.
- DENIZOT, F.; LANG, R. (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods*, May 22, **89(2)**:271-7.
- DUCY, P.; SCHINKE, T.; KARSENTY, G. (2000). The osteoblast: A Sophisticated Fibroblast under Central Surveillance. *Science*, **289**:1501-04.
- DUCHEYNE, P.; QIU, Q. (1999). Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function. *Biomaterials*, Dec, **20(23-24)**:2287-303.
- FRESHNEY, R.I. Culture of animal cells. A manual of basic technique. 4.ed. New York: Wiley-Liss.
- FRICAIN, J.C.; ALOUF, J.; BAREILLE, R.; ROUAIS, F.; ROUVILLAIN, J.L. (2002). Cytocompatibility study of organic matrix extracted from Caribbean coral porites astroides. *Biomaterials*, Feb, **23(3)**:673-9.
- GOISSIS, G.; DA SILVA MAGINADOR, S.V.; DA CONCEICAO AMARO MARTINS, V. (2003). Biomimetic mineralization of charged collagen matrices: *in vitro* and *in vivo* study. *Artif. Organs*, May, **27(5)**:437-43.
- GOMES, M.E.; REIS, R.L.; CUNHA, A.M.; BLITTERSWIJK, C.A.; DE BRUIJN, J.D. (2001). Cytocompatibility and response of osteoblastic-like cells to starch-based polymers: effect of several additives and processing conditions. *Biomaterials*, Jul, **22(13)**:1911-7.

- GRIGGS, J.A.; KISHEN, A.; LE, K.N. (2003). Mechanism of strength increase for a hydrothermal porcelain. *Dent. Mater.* Nov, **19(7)**:625-31.
- HANKS, C.T.; FAT, J.C.; CORCORAN, J.F. (1993). Cytotoxicity and dentin permeability of carbamide peroxide and hydrogen peroxide vital bleaching materials, *in vitro*. *J. of Dental Res.*, May, **72(5)**:931-38.
- HANKS, C.T.; WATAHA, J.C.; SUN, Z. (1996). *In vitro* models of biocompatibility: a review. *Dent. Mater.*, May, **12(3)**:186-93.
- HANSEN, M.B.; NIELSEN, S.E.; BERG, K. (1989). Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J. Immunol. Methods*, **119**:203-210
- HERCULANI, P.P.; CESTARI, T.M.; TAGA, E.M.; TAGA, R. (2000). Tratamento de defeito ósseo perene em calvária de cobaia com membrana de cortical óssea bovina liofilizada associada ou não a enxerto ósseo bovino desmineralizado. *Rev. Bras. Implant.*, Abr-Jun.
- HOFFMAN, S.; SIDQUI, M.; ABENSUR, D.; VALENTINI, P.; MISSIKA, P. (1999). Effects of Laddec on the formation of calcified bone matrix in rat calvariae cells culture. *Biomaterials*, Jul, **20(13)**:1155-66.
- HUTMACHER, D.W. (2000). Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*, Dec, **21(24)**:2529-43.
- IGNATIUS, A.A.; SCHMIDT, C.; KASPAR, D.; CLAES, L.E. (2001). *In vitro* biocompatibility of resorbable experimental glass ceramics for bone substitutes. *J. Biomed. Mater. Res.*, Jun 5, **55(3)**:285-94.
- IKARASHI, Y.; TOYODA, K.; OHSAWA, N.; UCHIMA, T.; TSUCHIYA, T.; KANIWA, M.; SATO, M.; TAKAHASHI, M.; NAKAMURA, A. (1992). Comparative studies by cell culture and *in vivo* implantation test on the toxicity of natural rubber latex materials. *J. Biomed. Mater. Res.*, Mar, **26(3)**:339-56.
- IMAZATO, S.; TARUMI, H.; EBI, N.; EBISU, S. (2000). Cytotoxic effects of composite restorations employing self-etching primers or experimental antibacterial primers. *J. Dent.*, Jan, **28(1)**:61-7.
- ISO 10993-1 (1992). Biological evaluation of medical devices. Part 1: Guidance on selection of tests. International Organization for Standardization. Geneva.
- ISO 10993-5 (1999). Biological evaluation of medical devices. Part 5: Tests for cytotoxicity: *In vitro* methods. International Organization for Standardization. Geneva.

- ISO 10993-12 (1996). Biological evaluation of medical devices. Part 12: Sample preparation and reference materials. International Organization for Standardization. Geneva.
- KEISER, K.; JOHNSON, C.C.; TIPTON, D.A. (2000). Cytotoxicity of Mineral Trioxide Aggregate Using Human Periodontal Ligament Fibroblasts. *J. Endodontics.*, **26(5)**: 288-291.
- KOPAC, I., BATISTA, U.; CVETKO, E.; MARION, L. (2002). Viability of fibroblasts in cell culture after treatment with different chemical retraction agents. *J. Oral Rehabil.*, Jan, **29(1)**:98-104
- KOULAOUZIDOU, E.A.; PAPAISIS, K.T.; BELTES, P.; GEROMICHALOS, G.D.; KORTSARIS, A.H. (1998). Cytotoxicity of three resin-based root canal sealers: an *in vitro* evaluation. *Endod. Dent. Traumatol.*, Aug, **14(4)**:182-5.
- LANE, J.M. (1995). Bone Graft Substitutes. *West. J. Med.*, **163(6)**:565-566.
- LANGER, R.; VACANTI, J. P. (1993). Tissue engineering. *Science*. **260(5110)**:920-926, May 14.
- LAWRENCE, G.R.; RODAN, G.A. (1999). Embriology and cellular biology of bone. In *Metabolic bone disease and clinically related disorders*. Third edition. Academic Press, California.
- LEE, C.H.; SINGLA, A.; LEE, Y. (2001). Biomedical applications of collagen. *Int. J. Pharmac.* **221**: 1-22.
- LUYTEN, F.P.; DELL'ACCIO, F.; DE BARI, C. (2001). Skeletal tissue engineering: opportunities and challenges. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, **15**:759-70.
- LEYHAUSEN, G.; ABTAHI, M.; KARBAKHSCH, M.; SAPOTNICK, A.; GEURTSSEN, W. (1998). Biocompatibility of various light-curing and one conventional glass-ionomer cement. *Biomaterials*, Mar, **19(6)**:559-64.
- LONPOTH, E.C. E DAHL, J.E. (2001). Cytotoxicity of dental glass ionomers evaluated using dimethylthiazol diphenyltetrazolium and neutral red tests. *Acta Odontol. Scand.*, **59**:34-39.
- LYGRE, H.; MOE, G.; SOLHEIM, E.; GJERDET, N.R. (1995). Biological testing of leachable aromatic compounds from denture base materials. *Acta Odontol. Scand.*, **53**: 397-401.

- MARIA, S.S. E WADA, M.L. (1997). Cytochemical analysis of Vero cells on type I collagen gels in long-term culture. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* **33(10)**: 748-50.
- MARKS, S.C.; HERMEY, D.C. The Structure and Development of Bone. In: BILEZIKIAN, J.P.; RAISZ, L.G.; RODA, G.A. *Principles of Bone Biology*. Califórnia (EUA), Academica Press, 1996. Cap. 1, p. 3-14.
- MARQUES, A.P.; REIS, R.L.; HUNT, J.A. (2002). The biocompatibility of novel starch-based polymers and composites: *in vitro* studies. *Biomaterials*, Mar, **23(6)**:1471-8.
- MISCH, C.E. E DIETSH, F. (1993). Bone-Grafting Materials in Implant Dentistry. *Implat. Dent.*, **2**:158-67.
- MOSMANN, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*. Dec 16, **65(1-2)**:55-63.
- NASSIRI, M.R.; HANKS, C.T.; CAMERON, M.J.; STRAWN, S.E.; CRAIG, R.G. (1994). Application of flow cytometry to determine the cytotoxicity of urethane dimethacrylate in human cells. *J. of Biomed. and Mater. Res.*, Feb, **28**: 153-58.
- NEREM, R.M. (1992). Tissue engineering in the USA. *Med. Biol. Eng. Comput.*, Jul, **30(4)**:CE8-12.
- OLIVEIRA, R.C.; SICCA, C.M. *et al.* (1999). Efeito da temperatura de desproteinização no preparo do osso cortical bovino microgranular. Avaliação microscópica e bioquímica da resposta celular em subcutâneos de ratos. *Rev FOB*. **7(3/4)**:85-93
- OLIVEIRA, R.C.; SICCA, C.M.; GRANJEIRO, J.M., *et al.* (2003). Avaliação histológica e bioquímica da resposta celular ao enxerto de osso cortical bovino previamente submetido a altas temperaturas. Efeito da temperatura no preparo do enxerto xenógeno. *Rev. Bras. Ortop.*, Sep, **38(9)**: 551-60.
- OREFFO, R.O.C.; TRIFFIT, J.T. (1999). Future potentials for using osteogenic stem cells and biomaterials in orthopedics. *Bone*, August, **25(2)**:5S-9S.
- PETRONIS, S.; CHRISTINA, G.; KASEMO, B.; GOLD, J. (2003). Model porous surfaces for systematic studies of material-cell interactions. *J. Biomed. Mater. Res.*, **66A**:702-721.
- RAISZ, L.G.; RODAN, G.A. (1998). Embriology and Cellular Biology of Bone. In: AVIOLI, L.V.; Krane, S.M. *Metabolic Bone Disease and Clinically Related Disorders*. Missouri (EUA), Academic Press, cap. 1, p. 2-17.

- RAMIRES, P.A.; ROMITO, A; COSENTINO, F.; MILELLA, E. (2001). The influence of titania/hydroxyapatite composite coatings on *in vitro* osteoblasts behaviour. *Biomaterials*, Jun, **22(12)**:1467-74.
- REPETTO, G.; SANZ, P. (1993). Neutral red uptake, cellular growth and lysosomal function: *in vitro* effects of 24 metals. *ATLA*. 21:501-7.
- ROCHA, L.B.; GOISSIS, G.; ROSSI, M.A. (2002). Biocompatibility of anionic collagen matrix as scaffold for bone healing. *Biomaterials*, Jan, **23(2)**:449-56.
- RODAN, G.A.; MARTIN, T.J. (2000). Therapeutic Approaches to Bone Diseases. *Science*, **289**:1508-14.
- RODRIGUEZ, C.V.M.; SERRICELA, P.; LINHARES, A.B.R.; GUERDS, R.M.; BOROJEVIC, R.; ROSSI, M.A.; DUARTE, M.E.L.; FARINA, M. (2003). Characterization of a bovine collagen-hydroxyapatite composite scaffold for bone tissue engineering. *Biomaterials*, **24**:4987-87.
- ROSENBERG, E. E ROSE, L.F. (1998). Biologic and Clinical Considerations for Autografts and Allografts in Periodontal Regeneration Therapy. *Advances in Periodontol.*, **42(3)**:467-89.
- RUANO R.; JAEGER R.G.; JAEGER, M.M. (2000). Effect of a ceramic and a non-ceramic hydroxyapatite on cell growth and procollagen synthesis of cultured human gingival fibroblasts. *J. Periodontol.* **71(4)**: 540-545.
- SCHMALZ, G.; BROWNE, R.M. (1995). The biological evaluation of medical devices used in dentistry. The influence of the European Union on the preclinical screening of dental materials. *Int Dent J.*, Aug, **45(4)**:275-8.
- SCHMALZ, G. (1998). The biocompatibility of non-amalgam dental filling materials. *Eur. J. Oral Sci.*, Apr, **06(2 Pt 2)**:696-706
- SCHMALZ, G.(1994). Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials- advantages and limitations. *J. Dent.*, **22 Suppl 2**:S6-11.
- SCHUSTER, G.S.; LEFEBVRE, C.A.; WATAHA, J.C.; WHITE, S.N. (1996). Biocompatibility of posterior restorative materials. *CDA Journal*, **24**:17-31.
- SCHWEIKL, H.; SCHMALZ, G. (1996). Toxicity parameters for cytotoxicity testing of dental materials in two different mammalian cell lines. *Eur. J. Oral Sci.* Jun, **104(3)**:292-9.
- SCOPP, I.W., KASSOUNY, D.Y., MORGAN, F.H. (1966). Bovine Bone (Boplant). *J. Periodontol*, **37**: 400-407

- SEAL, B.L.; OTERO, T.C.; PANITCH, A. (2001). Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration. *Materials Sci. and Eng.R.* **34**:147-230.
- SICCA, C.M., OLIVEIRA, R.C.; GRANJEIRO, J.M. (2000). Avaliação microscópica e bioquímica da resposta celular a enxertos de osso cortical bovino em subcutâneo de ratos. Efeito do tamanho da partícula. *Revista da Faculdade de Odontologia de Bauru.* **8(1/2)**:1-10.
- SLETTEN, G.B.G. E DAHL, J.E. (2003). Cytotoxicity effects of extract of compomers. *Acta Odontol. Scand.*, **57**:316-22.
- SOGAYAR, M.C.. Biologia molecular da transformação maligna. 122 f. *Manual do Curso Prático – Laboratório de Biologia Celular e Molecular*, Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.
- SPANGBERG, L.S. (1978). Correlation of *in vivo* and *in vitro* screening tests. *J. Endod.*, Oct, **4(10)**:296-9.
- SPECTOR, M. (1999). Basic Principles of tissue engineering. In: Lynch, S. E.; Genco, R. J.; Marx, R. E. Tissue engineering: applications in maxillofacial surgery and periodontics. Chicago, Quintessence, Cap. 1, p. 3-16
- SUH, H.; PARK, J.C.; HAN, D.W.; LEE, D.H.; HAN, C.D. (2001). A bone replaceable artificial bone substitute: cytotoxicity, cell adhesion, proliferation, and alkaline phosphatase activity. *Artif Organs.*, Jan, **25(1)**:14-21.
- TAGA, E.M. (1996). Biomateriais para uso em clínica médico-odontológica. *Revista Brasileira de Cirurgia e Implantodontia*, Jul/Ago, **3(1)**:59-69.
- TAKIKAWA, S.; BAUER, T.W.; KAMBIC, H.; TOGAWA, D. (2003). Comparative evaluation of the osteoinductivity of two formulations of human demineralized bone matrix. *J. Biomed. Mater. Res.*, Apr 1, **65A(1)**:37-42.
- TANG, T.H.A.; LIU, Y.; BJÖRKMAN, L.; EKSTRAND, J. (1999). *In vitro* cytotoxicity of orthodontic bonding resins on human oral fibroblasts. *Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.*, **116**:132-8.
- TEITELBAUM, S.L.(2000). Bone Resorption by Osteoclast. *Science*, **289**:1504-08.
- TENHUISEN, K.S.; MARTIN, R.I.; KLIMKIEWICZ, M.; BROWN, P.W. (1995). Formation and properties of a synthetic bone composite: hydroxyapatite-collagen. *J. Biomed. Mater. Res.*, Jul, **29(7)**:803-10.
- TIMMER, M.D.; SHIN, H.; HORCH, R.A.; AMBROSE, C.G.; MIKOS, A.G. (2003). *In vitro* Cytotoxicity of Injectable and Biodegradable Poly(propylene fumarate)-Based Networks:

- Unreacted Macromers, Cross-Linked Networks, and Degradation Products. *Biomacromolecules*, Jul-Aug, **4(4)**:1026-33.
- TORABINEJAD, M.; PITT FORD, T.R. (1996). Root end filling materials: a review. *Endod. Dent. Traumatol.*, Aug, **12(4)**:161-78.
- UEDA, M.; SUMI, Y.; MIZUNO, H.(2000). Tissue engineering: applications for maxillofacial surgery. *Materials Science and engineering*, **13**:7-14.
- UEDA, M.; TOHNAI, I.; NAKAI, H. (2001). Tissue Engineering research in oral implant surgery. *Artificial Organs*, **25(3)**:164–171, Blackwell Science, Inc. International Society for Artificial Organs.
- VALLITU, P.K. E EKSTRAND, K. (1999). *In vitro* cytotoxicity of fibre-polymethyl methacrylate composite used in dentures. *J. Oral Rehabilitation*, **26**:666-671.
- VIANA, R.I. (2003). Estudo *in vitro* da citocompatibilidade do pool de BMP conjugado à hidroxiapatita utilizado como ósseoindutor. Tese (mestrado em Biologia Funcional e Molecular) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, 79p.
- WATAHA, J.C.; CRAIG, R.G.; HANKS, C.T. (1992). Precision of and new methods for testing *in vitro* alloy cytotoxicity. *Dent. Mater.* Jan, **8(1)**:65-70.
- WATAHA, J.C. (2001). Principles of biocompatibility for dental practitioners. *J Prosthet Dent.*, Aug, **86(2)**:203-9.
- WENNBERG, A.; HASSELGREN. G.; TRONSTAD, L. (1979). A method for toxicity screening of biomaterials using cells cultured on millipore filters. *J. Biomed. Mater. Res.*, Jan, **13(1)**:109-20.
- WENZ, B.; OESCH, B.; HORST, M. (2001). Analysis of the risk of transmitting bovine spongiform encephalopathy through bone grafts derived from bovine bone. *Biomaterials*, Jun, 22(12):1599-606.
- WIEDMANN-AL-AHMAD, M.; Gutwald, R.; Lauer, G.; Hubner, U.; Schmelzeisen, R. (2002) How to optimize seeding and culturing of human osteoblast-like cells on various biomaterials. *Biomaterials*, Aug, **23(16)**:3319-28.
- WILLIAMS, D.F. (1981). Biomaterials and biocompatibility. In *Fundamentals aspects of biocompatibility vol. I*. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.
- WILLIAMS, D.F. (2000). Perspectives on the contributions of biomaterials and tissue engineering to bone repair, reconstruction, and regeneration. In *Bone Engineering*. Copyright. Toronto, Canada.
- WINN, S.R.; HU, Y., SFEIR, C.; HOLLINGER, J.O. (2000). Gene therapy approaches for

modulating bone regeneration. *Adv Drug Deliv Rev.*, **20(42)**:121-38.

YASZEMSKI, M.J.; PAYNE, R.G; HAYES, WC, LANGER R, MIKOS AG. (1996). Evolution of bone transplantation: molecular, cellular and tissue strategies to engineer human bone. *Biomaterials*, Jan, **17(2)**:175-85.

YUEHUEI, H.A.; SHANE, K.(2000). Pre-clinical *in vivo* evaluation of orthopaedic bioabsorbable devible devices. *Biomaterials*, **21**:2635-52.

## 10. ANEXO

Comunicações em Congressos referentes a este trabalho

- **Takamori, E.R. et al.** Cytotoxicity analysis of a fully processed bovine bone graft. Resumos da XXXII Reunião da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Caxambu, MG, H<sub>113</sub> – p.115.
- **Takamori, E.R. et al.** Biocompatibility assessment of a potential bone substitute: the fully processed bovine bone. *General Session of the IADR, 81<sup>st</sup> 2003 Göteborg, Sweden.* In: Journal Dental Research, Chicago v. 82, p. B-157, Res. 1164, June, 2003. Special Issue B.