

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

BIOCOMPATIBILIDADE DA VITROCÊRAMICA BIOATIVA
(BIOSILICATO[®]): ANÁLISES *IN VITRO* E *IN VIVO*

HUELITON WILIAN KIDO

SÃO CARLOS – SP

2011

HUELITON WILIAN KIDO

BIOCOMPATIBILIDADE DA VITROCÊRAMICA BIOATIVA
(BIOSILICATO[®]): ANÁLISES *IN VITRO* E *IN VIVO*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadores: Profa. Dra. Ana Cláudia Muniz Rennó
Prof. Dr. Oscar Peitl Filho

Co-orientador: Prof. Dr. Daniel Araki Ribeiro

SÃO CARLOS – SP

2011

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

K46bv

Kido, Hueliton Wilian.

Biocompatibilidade da vitrocêramica bioativa (Biosilicato[®])
: análises *in vitro* e *in vivo* / Hueliton Wilian Kido. -- São
Carlos : UFSCar, 2012.
73 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2011.

1. Biotecnologia. 2. Biocompatibilidade. 3. Resposta
tecidual. 4. Materiais bioativos. 5. Scaffold. 6. Biomateriais. I.
Título.

CDD: 660.6 (20^a)

Hueliton Wilian Kido

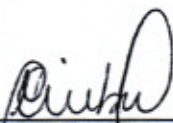
Dissertação de Mestrado submetida
à Coordenação do Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia,
da Universidade Federal de São
Carlos, como requisito parcial para
a obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia

Aprovado em: 29/08/2011

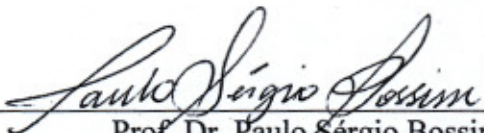
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Oscar Peitl Filho (Orientadora)
(UFSCar)



Prof.^a Dr.^a Fernanda de Freitas Anibal
(UFSCar)



Prof. Dr. Paulo Sérgio Bossini
(UNIFESP)

DEDICATÓRIA

A minha família, em especial aos meus pais, Kido e Roseli, exemplos de amor, humildade e honestidade, pelo incentivo e apoio durante toda a minha vida, não medindo esforços para que eu pudesse alcançar os meus objetivos, chegando algumas vezes a abdicar de seus sonhos para que eu pudesse realizar os meus. A vocês, a minha eterna gratidão e amor incondicional.

A minha noiva, Carina, pelo amor, compreensão e paciência. Amo você com todas as forças e todas as letras.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha orientadora, Professora Dra. Ana Cláudia Muniz Rennó, pela oportunidade concedida, pela confiança, amizade e ensinamentos que contribuíram para o meu crescimento profissional. A você, a minha gratidão, respeito e admiração.

Ao meu segundo orientador, Professor Dr. Oscar Peitl Filho, pela confiança, disponibilidade e auxílio durante a realização deste trabalho.

Ao meu co-orientador, Professor Dr. Daniel Araki Ribeiro, pela disponibilidade e contribuição para este estudo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas bênçãos concedidas.

Aos meus pais, Toshiyuki Kido e Roseli Stagliano Kido, por acreditarem e vivenciarem junto comigo todos os meus sonhos.

Aos meus avós, Admar e Gonçalina, pelo amor, carinho e conselhos que sempre fazem a diferença em minha vida.

Ao meu irmão Huilian e ao meu tio Carlim, pelo exemplo de honestidade, bondade e por toda a alegria que transmitem a mim.

Aos meus tios Alice e Tico, pelo carinho, apoio e ajuda.

A minha noiva, Carina Parisoto Colturato, por estar sempre ao meu lado, me aconselhando e me aturando em todos os momentos difíceis. Sem você eu não conseguiria chegar aonde cheguei.

Ao Professor Dr. Nivaldo Antonio Parizotto, pela confiança, disponibilidade e atenção nos momentos que precisei.

Às Professoras Dra. Raquel Agnelli Mesquita Ferrari e Dra. Kristianne Porta Santos Fernandes, pela disponibilidade, auxílio e ensinamentos essenciais para a realização deste trabalho.

Às Professoras Dra. Fernanda de Freitas Anibal e Dra. Ana Maria de Guzzi Plepis e ao Dr. Paulo Sérgio Bossini, pelas correções e sugestões que contribuíram para o enriquecimento deste estudo.

À Professora Dra. Patricia Driusso e ao meu amigo Cleber, pela atenção e auxílio na análise estatística dos dados.

À minha amiga Poliani, pelos conselhos, ensinamentos e pela contribuição efetiva para a realização deste trabalho.

Aos meus amigos, Anderson, Carla, Natália, Karina, Kelly, Rúbia e Fernanda, pelas contribuições diretas e indiretas para a realização deste trabalho, pelos ensinamentos que foram essenciais para o meu desenvolvimento profissional e pelos momentos agradáveis e divertidos proporcionados durante nossos encontros.

Ao meu grande amigo Paulo Bossini, pela confiança, ensinamentos e conselhos que foram importantes para a minha formação pessoal e profissional. A você, a minha eterna gratidão e admiração.

Ao Murilo do Laboratório de Materiais Vítreos, pela disponibilidade, atenção e desenvolvimento das amostras utilizadas neste trabalho científico.

Aos meus amigos da UFMS, Caio, Kexu, Erissoso, Gabi, Lucão e Luperini, que até hoje me auxiliam nos momentos que preciso.

À Maria, Wilter e Bruna, pela amizade, apoio e estadia durante a realização de parte deste estudo em São Paulo.

À Tabata e ao Jean, pela ajuda e amizade proporcionada durante a minha passagem pela Universidade Nove de Julho.

Aos meus amigos de Santa Fé do Sul, Rodrigo, Mônica, Pulha, Tainan e Boca, pela amizade, carinho e presença durante todas as fases difíceis da minha vida.

Ao Pedro, Mariana, Suely e Hamilton, pela amizade, apoio e alegria.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida.

A todas as pessoas que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.

Muito obrigado!

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original”.

(Albert Einstein)

RESUMO

Devido a limitada disponibilidade de osso autógeno e dos riscos associados ao uso de osso alógeno, novos materiais sintéticos vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de substituir o tecido ósseo perdido em decorrência de traumatismos ou processos patológicos. Os materiais bioativos na forma de *scaffolds* são materiais sintéticos promissores para enxertia óssea. Vários estudos sugerem que estes biomateriais são capazes de estimular a proliferação de osteoblastos e a osteogênese no local da fratura. No entanto, a viabilização destes biomateriais a uma aplicação clínica requer o emprego de testes que avaliem a sua biocompatibilidade. Dentro deste contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a biocompatibilidade do *scaffold* sintetizado a partir de uma vitrocerâmica bioativa totalmente cristalizada do sistema quaternário $P_2O_5-Na_2O-CaO-SiO_2$ (Biosilicato[®]), por meio da análise histopatológica do biomaterial implantado no tecido subcutâneo de ratos, e pelas análises de citotoxicidade e genotoxicidade do biomaterial em cultura de células da linhagem OSTEO-1 e L929. A análise histopatológica do biomaterial foi realizada utilizando 65 ratos machos da linhagem *Wistar* (210-260 g), distribuídos aleatoriamente em dois grupos, Controle (n = 3 animais por período) e Biosilicato (n = 10 animais por período), avaliados em períodos distintos de 7, 15, 30, 45 e 60 dias. Os animais do grupo Biosilicato foram submetidos a uma cirurgia no tecido subcutâneo e receberam um implante de *scaffold* de Biosilicato[®]. Os animais do grupo Controle foram submetidos à mesma cirurgia, mas não receberam o implante do biomaterial. A análise de citotoxicidade foi realizada para avaliar os efeitos dos produtos da lixiviação dos *scaffolds* de Biosilicato[®] (extratos) na proliferação celular pelo ensaio MTT. Os extratos foram avaliados em várias concentrações (100, 50, 25 e 12,5%) em períodos experimentais de 24, 72 e 120 horas, utilizando duas linhagens celulares (OSTEO-1 e L929). A análise de genotoxicidade (ensaio cometa) foi realizada para avaliar os danos no DNA de células OSTEO-1 e L929 cultivadas em contato com *scaffolds* de Biosilicato[®] em períodos distintos de 24, 72 e 96 horas. A análise estatística dos dados paramétricos foi realizada pelo teste de variância (ANOVA), seguido do *post-hoc* de Tukey, e a análise dos dados não paramétricos foi realizada pelo teste de Mann-Whitney. Ambos os testes estatísticos foram realizados com nível de significância de 5%. Os resultados da análise histopatológica demonstraram que os animais do grupo Controle não apresentaram processo inflamatório, tecido necrótico ou tecido fibroso. Já os animais do grupo Biosilicato apresentaram um tecido de granulação após 7 dias de implantação e nos demais períodos (15, 30, 45 e 60 dias) apresentaram um processo inflamatório crônico de corpo estranho, marcado pela presença de tecido fibroso e células gigantes multinucleadas. Em todos os animais avaliados não foi evidenciado foco de infecção ou tecido necrótico. Na análise de citotoxicidade foi observado que os extratos dos *scaffolds* de Biosilicato[®] não possuem efeito significativo na redução da proliferação de células OSTEO-1 e L929, e que as menores concentrações dos extratos (12,5 e 25%) estimularam a proliferação de ambas as células nos períodos de 72 e 120 horas. Na análise de genotoxicidade foi evidenciado que os *scaffolds* de Biosilicato[®] não induzem danos do DNA de células de ambas as linhagens testadas em todos os períodos experimentais. Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que os *scaffolds* de Biosilicato[®] apresentaram biocompatibilidade em experimentos *in vivo* e *in vitro*.

Palavras-Chave: biocompatibilidade, reposta tecidual, material bioativo, *scaffold*, biomaterial.

ABSTRACT

Due to limited availability of autogenous bone and of the risks associated with the use of bone allografts, new synthetic materials have been developed in order to replace the bone tissue lost due to trauma or pathological process. The bioactive materials in the form of scaffolds are synthetic materials promising for bone grafting. Several studies suggest that these biomaterials are able to stimulate the proliferation of osteoblasts and osteogenesis at the site of fracture. However, the feasibility of these biomaterials to a clinical application requires the investigation of their biocompatibility. In this context, this study aimed to evaluate the biocompatibility of a scaffold synthesized from a fully crystallized glass-ceramic bioactive quaternary system $P_2O_5-Na_2O-CaO-SiO_2$ (Biosilicate[®]), through histopathological analysis of the biomaterial implanted in the subcutaneous tissue of rats and the cytotoxicity and genotoxicity analysis of the biomaterial in cell cultures (OSTEO-1 and L929 cells). Histopathologic analysis of the biomaterial was performed using 65 Wistar rats male (210-260 g), randomly divided into two groups, Control group (n = 3 animals per period) and Biosilicate group (n = 10 animals per period), evaluated at 7, 15, 30, 45 and 60 days after surgery. The animals of Biosilicate group underwent surgery and received a subcutaneous implant of Biosilicate[®] scaffolds. The animals of Control group underwent surgery but did not receive any biomaterial implant. The cytotoxicity analysis was performed to assess the effect of products leaching from Biosilicate[®] scaffolds (extracts) on cellular proliferation (MTT). The extracts were evaluated in various concentrations (100, 50, 25 and 12.5%) in experimental periods of 24, 72 and 120 hours in two cell lines (OSTEO-1 and L929). The genotoxicity analysis (comet assay) was performed to assess DNA damage in cells OSTEO-1 and L929 grown in contact with the Biosilicate[®] scaffolds in different periods of 24, 72 and 96 horas. The statistical analysis of parametrics data was performed by analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey post-hoc and the analysis of nonparametrics data was performed by Mann-Whitney test. Both statistical tests were performed with a significance level of 5%. The results of histopathological analysis showed that the animals of the Control group did not present inflammation process, necrotic tissue and fibrous tissue. The animals of Biosilicato group showed a granulation tissue after 7 days of implantation. In the other periods (15, 30, 45 and 60 days) a chronic inflammation process of foreign body, marked by the presence of fibrous tissue and giant cells was observed. No infection or necrotic tissue was observed in any animal. In the analysis of cytotoxicity, it was observed that extracts of Biosilicato[®] scaffolds did not have any significant effect in reducing cell proliferation OSTEO-1 and L929, and that lower concentrations of the extracts (12.5 and 25%) stimulated the proliferation of both cells in periods of 72 and 120 hours. The analysis of genotoxicity showed that the Biosilicate[®] scaffolds did not induce DNA damage in the cell lines tested in all experimental periods. The results of this study showed that the Biosilicate[®] scaffolds presented biocompatibility *in vivo* and *in vitro*.

Key words: biocompatibility, tissue response, bioactive material, scaffold, biomaterial.

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ABNT	= Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANOVA	= Análise de variância
Ca	= Cálcio
Cl	= Cloro
cm	= Centímetro
DMEM	= <i>Dulbecco modified eagle's medium</i> (meio de eagle modificado por Dulbecco)
DMSO	= Dimetilsulfóxido
EDTA	= Ácido etileno diamino tetra-acético
g	= Grama
HE	= Hematoxilina e eosina
HCl	= Ácido clorídrico
kg	= Kilograma
LaMaV	= Laboratório de Materiais Vítreos
M	= Molar
mA	= Miliampere
mg	= Miligrama
mL	= Mililitro
mM	= Milimolar
mm	= Milímetro
MPa	= Megapascal
MTT	= Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5,-difeniltetrazólio
Na	= Sódio

NaOH	= Hidróxido de sódio
nm	= Nanômetro
O	= Oxigênio
°C	= Graus Celsius
P	= Fósforo
PBS	= <i>Phosphate buffer saline</i> (tampão salino fosfato)
pH	= Potencial hidrogeniônico
rpm	= Rotação por minuto
SFB	= Soro fetal bovino
Si	= Silício
UFSCar	= Universidade Federal de São Carlos
UNIFESP	= Universidade Federal de São Paulo
UNINOVE	= Universidade Nove de Julho
V	= Volts
V/cm	= Volts por centímetro
vs	= Versus
>	= Maior
%	= Porcentagem
≤	= Menor ou igual
μL	= Microlitro
μm	= Micrômetro

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** *Scaffold* de Biosilicato[®] 27
- Figura 2.** Procedimento cirúrgico para a realização da implantação dos *scaffolds* de Biosilicato[®] no tecido subcutâneo de ratos: (A) local do procedimento cirúrgico; (B) incisão e exposição do tecido subcutâneo; (C) divulsionamento do tecido subcutâneo; (D) confecção de um espaço no tecido; (E) implantação do biomaterial; (F) sutura da região operada..... 30
- Figura 3.** Imagem representativa de um cometa demonstrando a cabeça do cometa (CB) formada pela concentração de DNA nuclear e a cauda do cometa (CD) gerada após migração dos fragmentos de DNA por eletroforese..... 36
- Figura 4.** Fotomicrografia do tecido subcutâneo de ratos demonstrando a ausência de processo inflamatório no grupo Controle (A), presença de tecido de granulação (TG) vascularizado (V) após 7 dias de implantação (B), processo inflamatório crônico de corpo estranho após 15 (C), 30 (D), 45 (E) e 60 dias de implantação (F), caracterizado pela presença de tecido fibroso (▼), células gigantes multinucleadas (setas) isoladas e próximas ao biomaterial (*). Coloração H.E, ampliação 100X..... 51
- Figura 5.** Proliferação de células da linhagem OSTE0-1 (densidade óptica) cultivadas com soluções contendo diferentes concentrações de extrato dos *scaffolds* de Biosilicato[®] (12,5, 25, 50 e 100%) em períodos distintos de cultivo (24, 72 e 120 horas). *p≤ 0,05 vs Controle; †p≤ 0,05 vs 100%; #p≤ 0,05 vs 50%..... 53

Figura 6. Proliferação de células da linhagem L929 (densidade óptica) cultivadas com soluções contendo diferentes concentrações de extrato dos *scaffolds* de Biosilicato[®] (12,5, 25, 50 e 100%) em períodos distintos de cultivo (24, 72 e 120 horas). *p≤ 0,05 vs Controle; †p≤ 0,05 vs 100%; #p≤ 0,05 vs 50%..... 55

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Médias e desvios padrão referente aos danos no DNA (momento da cauda) de células da linhagem OSTE0-1 expostas aos *scaffolds* de Biosilicato[®] 56

Tabela 02. Médias e desvios padrão referente aos danos no DNA (momento da cauda) de células da linhagem L929 expostas aos *scaffolds* de Biosilicato[®] 56

APRESENTAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Esta dissertação foi estruturada na forma de artigo, dividida em três partes principais e redigida de acordo com as normas metodológicas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). A primeira parte é constituída de uma contextualização, objetivo e detalhamento da metodologia empregada. A segunda parte é composta de um artigo baseado fundamentalmente nas colocações expostas na primeira parte. O artigo intitulado: “*In vivo and in vitro evaluation of a highly bioactive glass-ceramic (Biosilicate®) for bone repair*”, foi desenvolvido e estruturado de acordo com as normas de publicação da revista “*Journal of Biomedical Materials Research Part A*”, na qual será submetido. A terceira parte é composta das considerações finais, referências bibliográficas e anexo.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

APRESENTAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

PARTE I

1. CONTEXTUALIZAÇÃO.....	21
2. OBJETIVO.....	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1. Síntese e caracterização dos <i>scaffolds</i> de Biosilicato®.....	26
3.2. Avaliação biológica: estudo <i>in vivo</i>	27
3.2.1. Animais de experimentação.....	28
3.2.2. Delineamento experimental.....	28
3.2.3. Procedimento cirúrgico.....	29
3.2.4. Eutanásia e coleta das amostras.....	31
3.2.5. Análise histopatológica.....	31
3.3. Avaliação biológica: estudo <i>in vitro</i>	31
3.3.1. Cultura de células.....	32
3.3.2. Análise de citotoxicidade (ensaio MTT).....	33
3.3.3. Análise de genotoxicidade (ensaio cometa).....	34
3.4. Análise estatística.....	37

PARTE II

4. ESTUDO.....	39
4.1. Resumo.....	39
4.2. Introdução.....	40
4.3. Materiais e métodos.....	41
4.3.1. Síntese e caracterização dos <i>scaffolds</i> de Biosilicato®	41
4.3.2. Avaliação biológica <i>in vivo</i>	42
4.3.2.1. Delineamento experimental e procedimento cirúrgico.....	42
4.3.2.2. Análise histopatológica.....	44
4.3.3. Avaliação biológica <i>in vitro</i>	44
4.3.3.1. Cultura de células.....	44
4.3.3.2. Análise de citotoxicidade (ensaio MTT).....	45
4.3.3.3. Análise de genotoxicidade (ensaio cometa).....	46
4.3.4. Análise estatística.....	48
4.4. Resultados.....	49
4.4.1. Avaliação biológica <i>in vivo</i>	49
4.4.1.1. Análise histopatológica.....	49
4.4.2. Avaliação biológica <i>in vitro</i>	52
4.4.2.1. Análise de citotoxicidade (ensaio MTT).....	52
4.4.2.2. Análise de genotoxicidade (ensaio Cometa).....	55
4.5. Discussão.....	56
4.6. Conclusão.....	61
4.7. Referências.....	61

PARTE III

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS..... 67

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 68

ANEXO..... 73

PARTE I

- 1. CONTEXTUALIZAÇÃO**
- 2. OBJETIVO**
- 3. MATERIAIS E MÉTODOS**

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

A substituição de tecido ósseo perdido em decorrência de traumatismos ou processos patológicos representa um importante desafio às clínicas médicas e odontológicas. Devido à limitada disponibilidade de osso autógeno (do próprio indivíduo) e dos riscos de transmissão de doenças infecciosas ou rejeição, associados ao uso de osso alógeno (de indivíduos da mesma espécie), novos materiais sintéticos vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de substituir o tecido ósseo (PULEO *et al.*, 1991). Esses materiais, denominados biomateriais, possuem alguns benefícios como maior disponibilidade, facilidade de esterilização, além de proporcionar reduzida morbidade (MOORE *et al.*, 2001).

Uma classe de biomateriais que vem se destacando entre os materiais ósseo-substitutos sintéticos são os materiais bioativos (XIN *et al.*, 2010). Esses biomateriais além de possuírem as vantagens dos materiais sintéticos, apresentam propriedades peculiares que os tornam promissores para enxertia óssea. Os materiais bioativos em contato com o tecido vivo, na presença de fluídos corpóreos, desenvolvem uma camada de hidroxicarbonatoapatita na sua superfície, promovendo uma ligação química extremamente forte entre o tecido e o implante, que imita o tipo de interface que é formada pelos processos naturais de reconstrução dos tecidos, além de ser química e estruturalmente equivalente à fase mineral do osso (HENCH; POLACK, 2002; HENCH *et al.*, 2000; XYNOS *et al.*, 2001).

Os vidros bioativos são biomateriais que possuem o maior índice de bioatividade (HENCH; WILSON, 1993). Pesquisas demonstram que os produtos iônicos desses biomateriais são capazes de estimular a expressão de genes relacionados aos processos de diferenciação e proliferação de células da linhagem osteoblástica (HENCH *et al.*, 2000; XYNOS *et al.*, 2001), podendo assim contribuir para a regeneração óssea. Devido a essas

características, os vidros bioativos são utilizados há cerca de 30 anos na forma de implantes em cirurgias cranio-maxilo-faciais e ortopédicas (HENCH; POLAK, 2002).

Apesar dos seus efeitos benéficos para a formação óssea, o uso dos vidros bioativos tem sido limitado em algumas aplicações devido às suas baixas propriedades mecânicas. Deste modo, algumas vitrocerâmicas, que são materiais obtidos pela cristalização controlada de certos vidros, foram desenvolvidas para a obtenção de propriedades mecânicas superiores aos vidros bioativos. Porém, a introdução de cristalinidade no material reduz drasticamente o nível de bioatividade (JAMES, 1995). Com isso, os pesquisadores Zanotto e Peitl, ambos do Laboratório de Materiais Vítreos (LaMaV) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), iniciaram investigações objetivando desenvolver uma vitrocerâmica que conservasse o elevado nível de bioatividade apresentado pelos vidros bioativos e ao mesmo tempo apresentasse propriedades mecânicas superiores. Esses pesquisadores obtiveram na década de 90 uma vitrocerâmica altamente bioativa com elevadas propriedades mecânicas, denominada Biosilicato[®] (ZANOTTO *et al.*, 2004).

Em estudo *in vitro*, Moura *et al.* (2007) demonstraram que o Biosilicato[®] possui um potencial remineralizador e é capaz de estimular a diferenciação e proliferação de osteoblastos, podendo com isso acelerar o processo de consolidação de fraturas. Estes autores observaram que o Biosilicato[®] teve um efeito superior ao vidro bioativo Bioglass[®] 45S5 (que atualmente é considerado o biomaterial com maior índice de bioatividade) na proliferação de células osteoblásticas, bem como na síntese de proteínas ligadas à maturação celular e deposição de matriz óssea.

A partir dessas observações, surgiu a hipótese de que o Biosilicato[®] seria eficaz na aceleração do processo de consolidação de fraturas e poderia servir como um substituto para o tecido ósseo. Com isso, em 2005, nosso grupo de pesquisa do Laboratório de Eletrotermofototerapia do Departamento de Fisioterapia da UFSCar iniciou um estudo *in vivo*

investigando os efeitos do Biosilicato[®] particulado utilizado em duas granulometrias (180-212 µm e 300-355 µm), na consolidação de defeitos ósseos induzidos em tíbias de ratos. Foi observado que 15 dias após a lesão, os defeitos ósseos preenchidos com partículas de Biosilicato[®] (180-212 µm de diâmetro) apresentavam propriedades mecânicas similares a de ossos não fraturados. Quando comparados a defeitos preenchidos com partículas de Bioglass[®] 45S5, as lesões ósseas com Biosilicato[®] apresentaram melhor reorganização tecidual, com maior quantidade de tecido ósseo e maior número de osteoblastos (GRANITO *et al.*, 2009). Bossini *et al.* (2011) associando o Biosilicato[®] particulado a uma terapia laser de baixa intensidade, observaram um aumento na formação óssea, aumento da angiogênese e uma maior deposição de colágeno em defeitos ósseos em tíbias de ratas osteoporóticas após um período de 15 dias.

Visando o uso clínico do Biosilicato[®] para favorecimento da regeneração óssea, especialmente em defeitos ósseos de grande extensão, várias pesquisas envolvendo a engenharia de tecidos têm preconizado o desenvolvimento e aplicação de implantes com estruturas porosas tri-dimensionais, denominados *scaffolds* (LEACH *et al.*, 2006).

Os *scaffolds* devem possuir propriedades mecânicas similares às do osso, degradarem em uma taxa compatível com a velocidade de remodelamento ósseo e também devem possuir uma adequada arquitetura, para que possam servir como molde para a interação celular, formação da matriz óssea extracelular e passagem de células e suprimento sanguíneo; eventos essenciais para a formação tecidual óssea (KARAGEORGIOU; KAPLAN, 2005). Além dessas características, é de suma importância que os *scaffolds* sejam biocompatíveis.

A biocompatibilidade é a capacidade de um material em desempenhar uma resposta apropriada em um hospedeiro por meio de uma aplicação específica (WILLIAMS, 1987). Dessa forma, o biomaterial não pode induzir nenhuma resposta indesejada dentro do organismo após a sua aplicação.

Considerando que os *scaffolds* de Biosilicato[®] permanecerão em íntimo contato com os tecidos biológicos em uma possível aplicação clínica, é de essencial importância que esses biomateriais apresentem biocompatibilidade, não produza resposta biológica adversa, não seja tóxico, carcinogênico ou mutagênico (ISO 10993-1).

Apesar das atuais pesquisas com o Biosilicato[®], pouco se sabe sobre os possíveis efeitos adversos que podem ser induzidos pelos *scaffolds* desse biomaterial. Por meio disso, e visando o uso clínico do biomaterial, nota-se a necessidade de estudos que possam comprovar a possível viabilidade dos *scaffolds* de Biosilicato[®] através de testes de avaliação biológica que analisem a sua biocompatibilidade.

2. OBJETIVO

Este estudo teve como objetivo avaliar a biocompatibilidade dos *scaffolds* de Biosilicato[®], por meio da análise histopatológica do biomaterial implantado no tecido subcutâneo de ratos e pelas análises de citotoxicidade e genotoxicidade do biomaterial em cultura de células da linhagem OSTEO-1 e L929.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Síntese e caracterização dos *scaffolds* de Biosilicato[®]

Os materiais utilizados nesse estudo foram produzidos e fornecidos pelo Laboratório de Materiais Vítreos da UFSCar, em colaboração com os professores Dr. Edgar Dutra Zanotto e Dr. Oscar Peitl Filho.

Foram utilizados *scaffolds* tri-dimensionais porosos com 8 mm de diâmetro e 2 mm de espessura, sintetizados a partir do Biosilicato[®] (Figura 1). O Biosilicato[®] é uma vitrocerâmica do sistema P_2O_5 - Na_2O - CaO - SiO_2 , altamente bioativa e totalmente cristalina (ZANOTTO *et al.*, 2004).

Os *scaffolds* foram sintetizados a partir da fusão dos componentes pesados e homogeneizados em forno elétrico a 1450°C. Após a homogeneização do fundido, o vidro resultante foi submetido a tratamentos térmicos até completa cristalização do material. Em seguida a amostra foi submetida a um processo de moagem, até a obtenção de um pó com granulometria média de 1,3 μ m.

Os *scaffolds* foram produzidos de acordo com o procedimento desenvolvido por Crovace (2009), onde foi preparada uma barbotina em álcool contendo o Biosilicato[®], aditivos e agentes porogênicos (negro de fumo). Após secagem da barbotina, o pó obtido foi inicialmente prensado a uma pressão de 20 MPa até obtenção de pastilhas. Posteriormente, as pastilhas foram novamente prensadas isostaticamente a uma pressão de 100 MPa. A queima das pastilhas foi realizada em três estágios: o primeiro para remoção do ligante (2 horas em forno a 375°C), o segundo para a remoção do agente porogênico (2 horas em forno a 610°C) e o terceiro para a sinterização dos *scaffolds* propriamente dita (5 horas em forno a 975°C).

Todos os *scaffolds* de Biosilicato[®] foram devidamente esterilizados em forno a 130°C durante 12 horas, antes da sua efetiva utilização. Esses materiais foram utilizados nos estudos de avaliação biológica *in vivo* e *in vitro*.



Figura 1. *Scaffold* de Biosilicato[®]

3.2. Avaliação biológica: estudo *in vivo*

A avaliação biológica *in vivo* foi realizada por meio de análise histopatológica do biomaterial implantado no tecido subcutâneo de ratos.

A parte experimental *in vivo* foi desenvolvida no Laboratório de Eletrotermofototerapia do Departamento de Fisioterapia da UFSCar, Campus São Carlos e a análise histopatológica foi realizada no Laboratório Multidisciplinar do Departamento de Biociências da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Campus da Baixada Santista. Este estudo foi conduzido de acordo com o Guia de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório e aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFSCar (Parecer 045/2009) (ANEXO).

3.2.1. Animais de experimentação

Neste trabalho foram utilizados 65 ratos machos albinos (*Rattus norvegicus*), da linhagem Wistar, com aproximadamente dois meses de idade e massa corporal variando de 210 a 260 gramas, provenientes do biotério central da UFSCar. Os animais permaneceram no biotério do Departamento de Fisioterapia, dentro de gaiolas de polipropileno padrão (dois animais por gaiola), mantidos em ambiente higienizado com iluminação em ciclo claro/escuro de 12 horas, recebendo água e ração balanceada à vontade.

3.2.2. Delineamento experimental

Os 65 animais utilizados neste estudo foram pesados e distribuídos aleatoriamente nos seguintes grupos:

Grupo Controle: os ratos desse grupo foram submetidos à cirurgia, mas não receberam o implante de Biosilicato[®].

Grupo Biosilicato: os ratos desse grupo foram submetidos à cirurgia e receberam implante na forma de *scaffolds* de Biosilicato[®].

O grupo Biosilicato foi dividido em cinco subgrupos, compostos por 10 animais cada, para a realização das análises em períodos experimentais distintos de 7, 15, 30, 45 e 60 dias. O grupo Controle também foi dividido e analisado nos mesmos períodos experimentais, mas com apenas 3 animais por período.

3.2.3. Procedimento cirúrgico

Os animais foram anestesiados com uma associação de Ketamina (80 mg/kg) e Xilazina (10 mg/kg), injetada por via intraperitoneal, utilizando-se uma seringa de insulina. Após, na região dorsal de cada animal, seguindo a linha sagital mediana a uma distância de 8 cm do crânio, foi realizada a tricotomia digital e a assepsia do local com gaze embebida com iodopovidona (Figura 2A). Neste local, foi realizada uma incisão reta de 2 cm de comprimento paralela a linha sagital mediana, expondo o tecido subcutâneo (Figura 2B). Foi realizado o divulsionamento do tecido subcutâneo (Figura 2C) para obtenção de um espaço (Figura 2D). Nos animais do grupo Biosilicato, após a confecção do espaço, foi introduzido um *scaffold* de Biosilicato[®] a aproximadamente 1 cm de distância da incisão (Figura 2E). Terminada esta etapa, as bordas da incisão foram aproximadas e suturadas com fio de nylon monofilamentar 4-0 (Shalon[®]) (Figura 2F). Nos animais do grupo Controle, logo após a obtenção do espaço no tecido subcutâneo (Figura 2D), as bordas da incisão foram suturadas com fio de nylon monofilamentar 4-0 (Shalon[®]) (Figura 2F). Ao término da sutura, foi realizada a assepsia pós-operatória com iodopovidona em todos os animais.

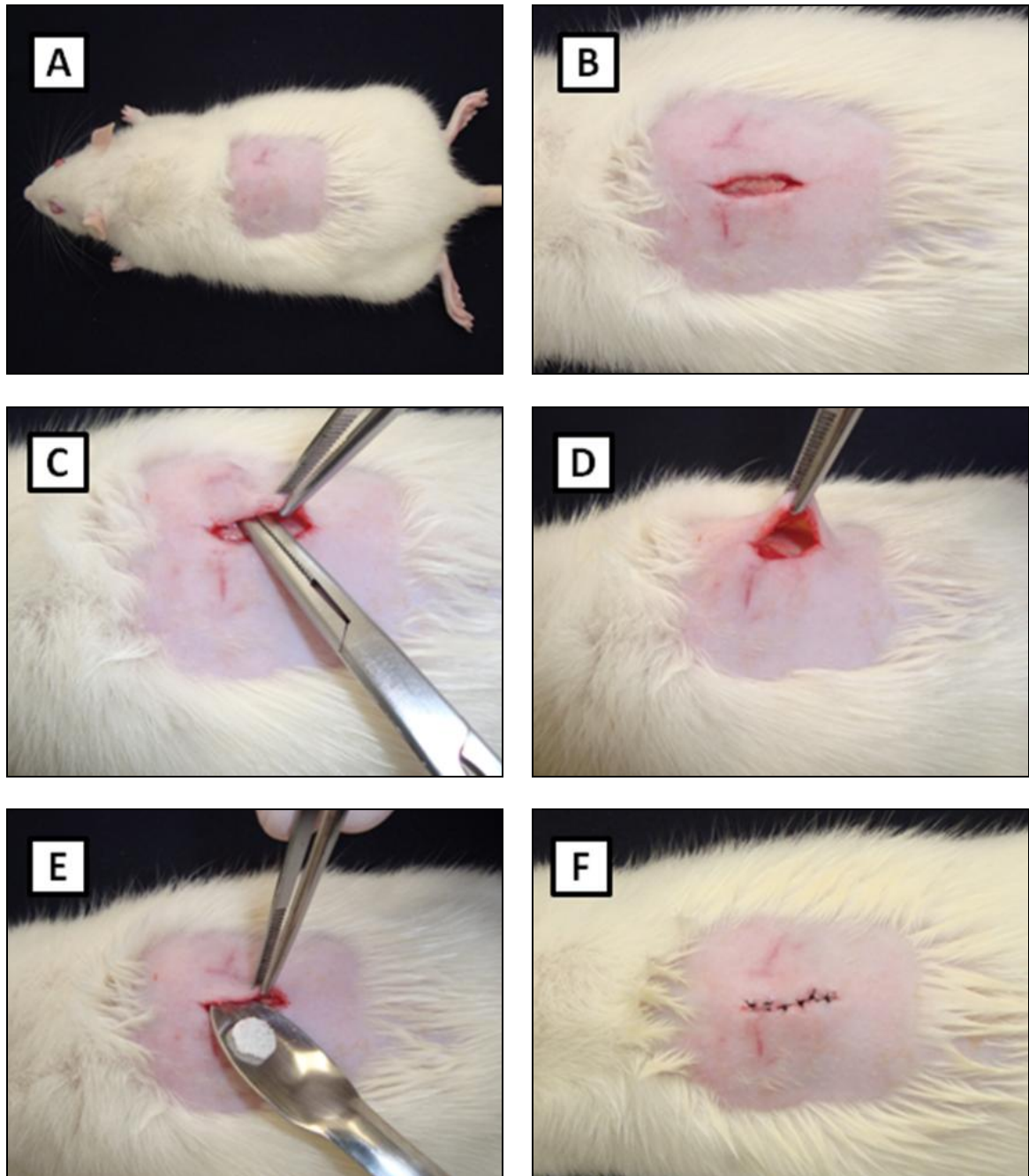


Figura 2. Procedimento cirúrgico para a realização da implantação dos *scaffolds* de Biosilicato[®] no tecido subcutâneo de ratos: (A) local do procedimento cirúrgico; (B) incisão e exposição do tecido subcutâneo; (C) divulsão do tecido subcutâneo; (D) confecção de um espaço no tecido; (E) implantação do biomaterial; (F) sutura da região operada.

3.2.4. Eutanásia e coleta das amostras

Os animais de ambos os grupos foram eutanasiados com uma dose letal de anestésicos (Ketamina/Xilazina) de acordo com cada período experimental. Imediatamente após a eutanásia, foi realizada a retirada cirúrgica do biomaterial juntamente com o tecido adjacente para processamento das lâminas utilizadas na análise histopatológica.

3.2.5. Análise histopatológica

Para a realização da análise histopatológica os espécimes foram fixados em formalina tamponada a 10% (Merck, Darmstadt, Germany) por 24 horas e incluídos em blocos de parafina. Na sequência, os blocos de parafina foram cortados transversalmente ao implante, com espessura de 5 μ m e montados em lâminas histológicas.

A análise qualitativa da região da lesão foi realizada por meio de lâminas coradas com hematoxilina e eosina (HE, stain, Merck). Para tal, foi utilizado um microscópio de luz (Olympus, Optical Co. Ltd, Tokyo, Japan) e foram observadas as seguintes alterações no local da lesão: processo inflamatório, áreas de fibrose, tecido de granulação, área de necrose e presença do biomaterial. Essa análise foi realizada sob a supervisão do Prof. Dr. Daniel Araki Ribeiro do Departamento de Biociências da UNIFESP, Campus da Baixada Santista.

3.3. Avaliação biológica: estudo *in vitro*

A avaliação biológica *in vitro* foi realizada por meio de análise de citotoxicidade e genotoxicidade do biomaterial.

A parte experimental e a análise de citotoxicidade foram realizadas no Laboratório do Departamento de Ciências da Reabilitação da Universidade Nove de Julho (UNINOVE), Campus Vergueiros, São Paulo, sob a supervisão da Profa. Dra. Raquel Agnelli Mesquita Ferrari e da Profa. Dra. Kristianne Porta Santos Fernandes e a análise de genotoxicidade foi desenvolvida no Laboratório Multidisciplinar do Departamento de Biociências da UNIFESP, Campus da Baixada Santista, sob a orientação do Prof. Dr. Daniel Araki Ribeiro.

3.3.1. Cultura de células

Para a realização das análises *in vitro* foram utilizadas células da linhagem OSTEO-1 (osteoblastos de calvária de ratos) gentilmente doadas pela Profa. Dra. Marcia Martins Marques da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, e células da linhagem L929 (fibroblastos murinos) adquiridas do laboratório Culticel, Instituto Adolpho Lutz, São Paulo. Estas linhagens foram escolhidas por permanecerem em íntimo contato com os *scaffolds* de Biosilicato[®] em uma possível aplicação terapêutica destes biomateriais. Além disso, as células L929 foram escolhidas por serem amplamente utilizadas em análises de biocompatibilidade *in vitro* (SERRANO *et al.*, 2008; NATH *et al.*, 2010; LIU; CHANG, 2011).

As células de ambas as linhagens foram cultivadas em garrafas de cultura utilizando meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM – *Dulbecco Modified Eagle's Medium*) (Vitrocell, Campinas, SP, Brasil), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB, Vitrocell) e 1% de solução antibiótica-antimicótica (Vitrocell) a 37°C em atmosfera úmida de 5% de CO₂. As células foram mantidas em densidades subconfluentes (quando ocupam 70% do frasco de cultura), sendo subcultivadas a cada 2-3 dias até a sua utilização. Ambas as linhagens foram utilizadas nas análises de citotoxicidade e genotoxicidade do biomaterial.

3.3.2. Análise de citotoxicidade (ensaio MTT)

A análise de citotoxicidade foi realizada para avaliar os efeitos dos produtos da lixiviação dos *scaffolds* de Biosilicato[®] na proliferação de células da linhagem OSTEO-1 e L929.

A proliferação celular foi realizada pelo método de Mossmann (1983), onde, a succinato desidrogenase, uma enzima do Ciclo de Krebs ativa em mitocôndrias de células viáveis, é capaz de converter o sal de tetrazolium (dimetiltiazol difenil tetrazolium, ou MTT), que é hidrossolúvel e de cor amarelada, em cristais de formazan, que são de cor escura. Esta capacidade que somente as células viáveis possuem indica a atividade mitocondrial e a quantidade relativa de células vivas.

Para realização do ensaio MTT, cada linhagem celular foi dividida em dois grupos, Controle e Biosilicato, analisados em períodos distintos de cultivo de 24, 72 e 120 horas. No grupo Controle as células foram cultivadas apenas com o meio DMEM suplementado. No grupo Biosilicato as células foram cultivadas com meio DMEM suplementado, contendo produtos da lixiviação dos *scaffolds* de Biosilicato[®] (extratos). Para a obtenção do meio com os extratos o biomaterial foi previamente condicionado em meio DMEM por 7 dias (1 *scaffold*/2 mL de meio DMEM). Após o período de condicionamento, o meio DMEM foi descartado e cada *scaffold* foi submerso em 2 mL de meio DMEM suplementado por 24 horas em condições estáticas a 37°C em atmosfera úmida de 5% de CO₂. O meio DMEM suplementado que esteve em contato com o biomaterial por 24 horas foi considerado meio concentrado 100%. Por meio deste, foram realizadas várias diluições (50, 25 e 12,5%) para avaliar a influência dessas diferentes concentrações na proliferação celular das duas linhagens testadas.

Para a realização da análise, as células das culturas subconfluentes foram contadas e distribuídas em placas de cultura de 96 poços. Foram adicionadas 1×10^3 células em 200 μL de meio DMEM suplementado em cada poço da placa de cultura. Nos grupos Biosilicato utilizou-se a mesma quantidade celular em 200 μL de meio DMEM suplementado, contendo as respectivas concentrações de extratos.

Após cada período experimental, os poços das placas de cultura foram lavados com 100 μL de Tampão Salino Fosfato (PBS – *Phosphate Buffer Saline*) e receberam 50 μL de solução com MTT (0,5 mg/ml) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). As placas foram incubadas por aproximadamente 3 horas em estufa de cultura a 37°C em atmosfera úmida de 5% de CO_2 , para que ocorresse a formação dos cristais de formazan. Decorrido o período de incubação, as placas foram retiradas da estufa e os cristais formados foram dissolvidos com 100 μL de isopropanol. A absorbância foi lida a 620 nm usando um leitor de microplacas (Anthos 2020, Anthos Labtec Instruments, Wals, Austria). Foram realizados três experimentos independentes sempre em quadruplicata.

3.3.3. Análise de genotoxicidade (ensaio cometa)

A análise de genotoxicidade foi realizada para avaliar os danos no DNA de células OSTEO-1 e L929 cultivadas com *scaffolds* de Biosilicato[®], por meio de um ensaio de eletroforese em células individualizadas em gel de agarose (ensaio cometa) (TICE *et al.*, 2000).

As células das culturas subconfluentes foram contadas e distribuídas em placas de cultura de 12 poços. Foram utilizadas 2×10^4 células em 2 mL de meio DMEM suplementado em cada poço da placa de cultura. Cada linhagem celular foi dividida em dois grupos (Controle e Biosilicato), avaliados em períodos distintos de 24, 72 e 96 horas. O grupo

Controle seguiu-se com o cultivo das células em meio DMEM suplementado. As células do Grupo Biosilicato foram cultivadas com meio DMEM suplementado, contendo 1 *scaffolds* de Biosilicato[®] por poço da placa de cultura, previamente condicionados por um período de 7 dias em meio DMEM suplementado (1 *scaffold*/2 mL de meio DMEM), durante todos os períodos experimentais. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Após cada período experimental, os poços das placas de cultura foram lavados com PBS, tripsinizados (adicionado solução de tripsina para desprender as células dos poços de cultura) e as células adicionadas em tubos de 50 mL. Os tubos foram centrifugados a 1200 rpm por 5 minutos. O meio DMEM foi descartado e as células ressuspensas com 1 mL de um novo meio DMEM suplementado. Depois de realizada esta etapa, um volume de 100 µL de meio DMEM com as respectivas células de cada grupo experimental foi adicionado a 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão à 37°C e depositado sobre lâminas histológicas recobertas com agarose de ponto de fusão normal à 0,5%. Após, as lâminas foram recobertas com lamínulas para a homogeneização adequada do material e posteriormente colocadas em solução de lise a 1% (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM tampão Tris-HCl, pH 10, 1% sarcosinato de sódio com 1% Triton X-100 e 10% DMSO), por aproximadamente 1 hora. Subsequentemente, as mesmas foram lavadas com PBS durante 5 minutos e colocadas em uma cuba de eletroforese contendo solução tampão alcalina, pH>13 (1 mM EDTA e 300 mM NaOH), até o líquido as cobrirem totalmente. Antes da eletroforese, as lâminas permaneceram por um período de descanso de 20 minutos, seguida por um período de eletroforese de 20 minutos à 25 V (0,86 V/cm) e 300 mA. Findada esta etapa, as lâminas foram lavadas com solução de neutralização (0,4 M Tris, pH 7,5), durante 5 minutos. Este procedimento foi repetido 3 vezes. Após a neutralização, as lâminas foram coradas com 100 µL brometo de etídio (50 µg/mL).

Um total de 50 cometas capturados aleatoriamente por tratamento/período (HARTMANN *et al.*, 2003) foram examinados cegamente por um especialista na ampliação 400X, utilizando um microscópio de fluorescência (Olympus, Orangeburg, USA) conectado através de uma câmera preto e branco a um sistema analisador de imagem (Comet Assay II, Perceptive Instruments, Suffolk, Haverhill, Reino Unido). Este software foi previamente calibrado de acordo com as instruções do fabricante. O sistema de análise de imagem computadorizado adquire as imagens, calcula os perfis de intensidade integrada para cada célula e avalia a gama de parâmetros derivados. Células não danificadas têm um núcleo intacto, sem uma cauda, e as células danificadas têm a aparência de um cometa (Figura 3). Para quantificar os danos no DNA, foi utilizado o momento da cauda. O momento da cauda foi calculado como o produto do comprimento da cauda pela fração de DNA contida nesta área. O momento da cauda do cometa é positivamente correlacionado com o nível de quebras no DNA em uma célula. O valor médio do momento da cauda em uma determinada amostra foi adotado como o índice de danos no seu DNA.

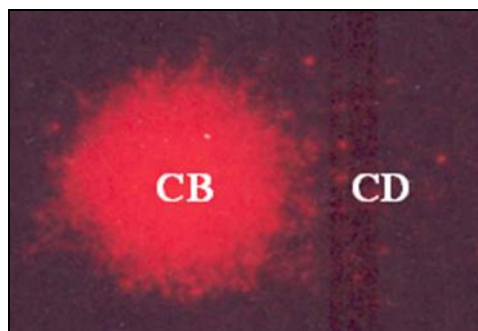


Figura 3. Imagem representativa de um cometa demonstrando a cabeça do cometa (CB) formada pela concentração de DNA nuclear e a cauda do cometa (CD) gerada após migração dos fragmentos de DNA por eletroforese.

3.4. Análise estatística

Os dados foram expressos em média de valores e desvios padrão (DP) para cada grupo de amostra. A normalidade da distribuição de todas as variáveis foi verificada usando o teste de Shapiro-Wilk's. Para amostras paramétricas foi utilizado o teste One-way ANOVA para avaliar a variância da comparação entre os grupos, e nos casos significantes, o teste de Tukey foi utilizado para discriminar as diferenças. Para amostras não paramétricas foi utilizado o teste de Mann-Whitney. As análises foram realizadas no programa EXCEL (2007) e no software STATISTICA (versão 7.0). Para todos os testes foi utilizado o nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

PARTE II

4. ESTUDO

4. ESTUDO

Avaliação *in vivo* e *in vitro* de uma vitrocerâmica altamente bioativa para reparo ósseo

H.W. Kido,¹ P. Oliveira,¹ N.A. Parizotto,¹ M.C. Crovace,² E.D. Zanotto,² O. Peitl-Filho,² K.P.S. Fernandes,³ R.A. Mesquita-Ferrari,³ D.A. Ribeiro,⁴ A.C.M. Rennó⁴

¹Departamento de Fisioterapia, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos, SP, Brasil

²Departamento de Engenharia de Materiais, Laboratório de Materiais Vítreos (LaMaV), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil

³Departamento de Ciências da Reabilitação, Universidade Nove de Julho (UNINOVE), São Paulo, SP, Brasil

⁴Departamento de Biociências, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Santos, SP, Brasil

4.1. Resumo: O objetivo deste estudo foi avaliar a biocompatibilidade do *scaffold* sintetizado a partir de uma vitrocerâmica bioativa (Biosilicato[®]), por meio da análise histopatológica do biomaterial implantado no tecido subcutâneo de ratos, e pelas análises de citotoxicidade e genotoxicidade do biomaterial em cultura de células da linhagem OSTEO-1 e L929. Para a análise histopatológica foram utilizados 65 ratos machos da linhagem Wistar (210-260 g), distribuídos aleatoriamente em dois grupos, Controle (n = 3 animais por período) e Biosilicato (n = 10 animais por período), avaliados em períodos distintos de 7, 15, 30, 45 e 60 dias. Os animais do grupo Biosilicato foram submetidos a uma cirurgia no tecido subcutâneo e receberam um implante de *scaffold* de Biosilicato[®]. Os animais do grupo Controle foram submetidos à mesma cirurgia, mas não receberam o implante do biomaterial. A análise de citotoxicidade foi realizada para avaliar os efeitos dos produtos da lixiviação dos *scaffolds* de Biosilicato[®] (extratos) na proliferação celular pelo ensaio MTT. Os extratos foram avaliados em várias concentrações (100, 50, 25 e 12,5%) em períodos experimentais de 24, 72 e 120 horas em duas linhagens celulares (OSTEO-1 e L929). A análise de genotoxicidade (ensaio cometa) foi realizada para avaliar os danos no DNA de células OSTEO-1 e L929 cultivadas com *scaffolds* de Biosilicato[®] em períodos distintos de 24, 72 e 96 horas. Os resultados da análise histopatológica mostraram que os animais do grupo Controle não apresentaram processo inflamatório, tecido necrótico e tecido fibroso. Já os animais do grupo Biosilicato apresentaram um tecido de granulação após 7 dias de implantação, e nos demais períodos experimentais (15, 30, 45 e 60 dias), apresentaram um processo inflamatório crônico de corpo estranho, marcado pela presença de tecido fibroso e células gigantes multinucleadas. Em todos os animais avaliados não foi evidenciado foco de infecção ou tecido necrótico. Na análise de citotoxicidade foi notado que os extratos de *scaffolds* de Biosilicato[®] não possuem efeito significativo na redução da proliferação de células OSTEO-1 e L929, e que as menores concentrações dos extratos (12,5 e 25%) estimularam a proliferação celular de ambas as linhagens nos períodos de 72 e 120 horas. Na análise de genotoxicidade foi evidenciado que os *scaffolds* de Biosilicato[®] não induzem danos do DNA de células de ambas as linhagens testadas em todos os períodos experimentais. Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que os *scaffolds* de Biosilicato[®] apresentaram biocompatibilidade em experimentos *in vivo* e *in vitro*.

Palavras chave: biocompatibilidade; resposta tecidual; material bioativo; *scaffold*; biomaterial

4.2. INTRODUÇÃO

Milhões de fraturas ósseas ocorrem a cada ano em todo o mundo. Dentre elas, 10-30% resultam em não-união óssea,¹ outras exibem atrasos na consolidação,² indicando que, em alguns casos, não ocorrem a regeneração do tecido pelo processo normal de reparação óssea.

Neste contexto, há uma grande necessidade de desenvolver tecnologias capazes de minimizar o tempo de consolidação óssea e diminuir as possibilidades de desenvolvimento de possíveis complicações resultantes do processo anormal de reparo ósseo.³ Um tratamento promissor é o uso de vidros bioativos, devido à sua capacidade de ligação ao osso pela formação de uma camada de apatita ativa ligada biologicamente na superfície do tecido.⁴ Devido a estas propriedades, muitos autores têm demonstrado que os vidros bioativos são capazes de induzir a osteogênese e estimular a consolidação da fratura.^{4,5}

Apesar dos efeitos estimulatórios dos vidros bioativos no metabolismo ósseo, o uso desses biomateriais tem sido restringido devido às suas propriedades mecânicas.^{5,6} Neste contexto, os pesquisadores Zanotto e Peitl, ambos do Laboratório de Materiais Vítreos (LaMaV) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), desenvolveram uma vitrocerâmica bioativa completamente cristalizada, do sistema quaternário $P_2O_5-Na_2O-CaO-SiO_2$, denominada Biosilicato[®].⁷ A cristalização completa do material pode levar a melhores propriedades mecânicas do material ou partículas menos acentuadas e abrasivas, quando o material é moído a pó. Um estudo *in vitro* demonstrou que o Biosilicato[®] foi capaz de aumentar a formação da matriz óssea em comparação ao Bioglass 45S5[®] em um sistema de cultura de células osteogênicas extraída de calvária de ratos.⁵ Comparando o crescimento das células osteogênicas em discos de Biosilicato[®] e Bioglass[®] 45S5 por um período de até 17 dias, constataram que, embora não foram detectadas diferenças significativas em termos de conteúdo de proteína total e atividade da fosfatase alcalina nos dias 11 e 17, o Biosilicato[®] induziu significativamente maiores áreas de matriz calcificada em 17 dias. Além disso, em um

trabalho experimental *in vivo*, Granito *et al.* (2011)⁸ constataram que o Biosilicato[®] foi capaz de aumentar as propriedades biomecânicas, a quantidade de tecido ósseo e o número de osteoblastos no local do calo ósseo de defeitos em tíbias em ratos quando comparado com o grupo tratado com Bioglass 45S5[®] (padrão ouro). Esses achados corroboram com os resultados de outros autores que também demonstraram os efeitos promissores do Biosilicato[®] na consolidação óssea em ratos saudáveis⁹ e ratas com osteoporose.¹⁰

Apesar dos efeitos positivos do Biosilicato[®] no tecido ósseo ter sido evidenciado em estudos *in vitro* e *in vivo*, o mecanismo pelo qual essa terapia atua no tecido ósseo não é totalmente compreendido. Antes deste biomaterial ser utilizado com confiança como uma modalidade terapêutica, é necessário investigar as características físicas e químicas, bem como todas as respostas biológicas deste biomaterial para determinar sua segurança e eficácia.¹¹ Neste contexto, e tendo em vista a aplicabilidade clínica desse novo biomaterial, este estudo teve como objetivo avaliar a biocompatibilidade *in vivo* e *in vitro* do Biosilicato[®].

4.3. MATERIAIS E MÉTODOS

4.3.1. Síntese e caracterização dos *scaffolds* de Biosilicato[®]

Os materiais utilizados nesse estudo foram produzidos e fornecidos pelo Laboratório de Materiais Vítreos da UFSCar, em colaboração com os professores Dr. Edgar Dutra Zanotto e Dr. Oscar Peitl Filho.

Foram utilizados *scaffolds* tri-dimensionais porosos com 8 mm de diâmetro e 2 mm de espessura sintetizados a partir do Biosilicato[®]. O Biosilicato[®] é uma vitrocerâmica do sistema P₂O₅-Na₂O-CaO-SiO₂, altamente bioativa e totalmente cristalina.⁷

Os *scaffolds* foram sintetizados a partir da fusão dos componentes pesados e homogeneizados em forno elétrico a 1450°C. Após a homogeneização do fundido, o vidro resultante foi submetido a tratamentos térmicos até completa cristalização do material. Em seguida a amostra foi submetida a um processo de moagem, até a obtenção de um pó com granulometria média de 1,3 µm.

Os *scaffolds* foram produzidos de acordo com o procedimento desenvolvido por Crovace (2009),¹² onde foi preparada uma barbotina em álcool contendo o Biosilicato[®], aditivos e agentes porogênicos (negro de fumo). Após secagem da barbotina, o pó obtido foi inicialmente prensado a uma pressão de 20 MPa até obtenção de pastilhas. Posteriormente, as pastilhas foram novamente prensadas isostaticamente a uma pressão de 100 MPa. A queima das pastilhas foi realizada em três estágios: o primeiro para remoção do ligante (2 horas em forno a 375°C), o segundo para a remoção do agente porogênico (2 horas em forno a 610°C) e o terceiro para a sinterização dos *scaffolds* propriamente dita (5 horas em forno a 975°C).

Todos os *scaffolds* de Biosilicato[®] foram devidamente esterilizados em forno a 130°C durante 12 horas, antes da sua efetiva utilização. Esses materiais foram utilizados nos estudos de avaliação biológica *in vivo* e *in vitro*.

4.3.2. Avaliação biológica *in vivo*

4.3.2.1. Delineamento experimental e procedimento cirúrgico

O teste de implantação subcutânea foi utilizado para avaliar a biocompatibilidade do biomaterial *in vivo*. Para isto, 65 ratos machos da linhagem Wistar (2 meses de idade com massa corporal de 210-260 g) foram usados neste estudo. Estes animais foram mantidos em condições controladas de temperatura (24±2°C), em períodos de claro-escuro de 12 horas,

com acesso livre à água e ração balanceada. Todos os procedimentos cirúrgicos e de manejo dos animais foram realizados de acordo com o Guia de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, Brasil (Parecer 045/2009).

Todos os animais foram pesados e divididos aleatoriamente em dois grupos, Controle (n = 3 animais por período) e Biosilicato (n = 10 animais por período). Os animais de ambos os grupos foram divididos em cinco subgrupos, para a realização das análises em diferentes períodos experimentais de 7, 15, 30, 45 e 60 dias.

Para a realização do procedimento cirúrgico os animais foram anestesiados com uma associação de Ketamina (80 mg/kg) e Xilazina (10 mg/kg). Após, na região dorsal de cada animal, seguindo a linha sagital mediana a uma distância de 8 cm do crânio, foi realizada a tricotomia digital e a assepsia do local com gaze embebida com iodopovidona. Neste local, foi realizada uma incisão reta de 2 cm de comprimento paralela a linha sagital mediana, expondo o tecido subcutâneo. Foi realizado o divulsionamento do tecido subcutâneo para obtenção de um espaço. Nos animais do grupo Biosilicato, após a confecção do espaço, foi introduzido um *scaffold* de Biosilicato[®] a aproximadamente 1 cm de distância da incisão. Terminada esta etapa, as bordas da incisão foram aproximadas e suturadas com fio de nylon monofilamentar 4-0 (Shalon[®]). Nos animais do grupo Controle, logo após a obtenção do espaço no tecido subcutâneo, as bordas da incisão foram suturadas com fio de nylon monofilamentar 4-0 (Shalon[®]). Ao término da sutura, foi realizada a assepsia pós-operatória com iodopovidona em todos os animais.

Após cada período experimental os animais do grupo Biosilicato e do grupo Controle foram eutanasiados com uma dose letal de anestésico (Ketamina/Xilazina). Após a eutanásia, foi realizada a retirada cirúrgica do biomaterial juntamente com o tecido adjacente para processamento das lâminas utilizadas na análise histopatológica.

4.3.2.2. Análise histopatológica

Para a realização da análise histopatológica os espécimes foram fixados em formalina tamponada a 10% (Merck, Darmstadt, Germany) por 24 horas e incluídos em blocos de parafina. Na sequência, os blocos de parafina foram cortados transversalmente ao implante, com espessura de 5 μm e montados em lâminas histológicas.

A análise qualitativa da região da lesão foi realizada por meio de lâminas coradas com hematoxilina e eosina (HE, stain, Merck). Para tal, foi utilizado um microscópio de luz (Olympus, Optical Co. Ltd, Tokyo, Japan) e foram observadas as seguintes alterações no local da lesão: processo inflamatório, áreas de fibrose, tecido de granulação, área de necrose e presença do biomaterial. Essa análise foi realizada sob a supervisão do Prof. Dr. Daniel Araki Ribeiro do Departamento de Biociências da UNIFESP, Campus da Baixada Santista.

4.3.3. Avaliação biológica *in vitro*

4.3.3.1. Cultura de células

Para a realização das análises *in vitro* foram utilizadas células da linhagem OSTEO-1 (osteoblastos de calvária de ratos) doadas pela Profa. Dra. Marcia Martins Marques da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, e células da linhagem L929 (fibroblastos murinos) adquiridas do laboratório Culticel, Instituto Adolpho Lutz, São Paulo. Estas linhagens foram escolhidas por ficarem em íntimo contato com os *scaffolds* de Biosilicato[®] em uma possível aplicação terapêutica destes biomateriais. Além disso, as células

L929 foram escolhidas por serem amplamente utilizadas em análises de biocompatibilidade *in vitro*.^{13,14,15}

As células de ambas as linhagens foram cultivadas em garrafas de cultura utilizando meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM – *Dulbecco Modified Eagle's Medium*) (Vitrocell, Campinas, SP, Brasil), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB, Vitrocell) e 1% de solução antibiótica-antimicótica (Vitrocell) a 37°C em atmosfera úmida de 5% de CO₂. As células foram mantidas em densidades subconfluentes e passadas a cada 2-3 dias até a sua utilização. Ambas as linhagens foram utilizadas para as análises de citotoxicidade e genotoxicidade do biomaterial.

4.3.3.2. Análise de citotoxicidade (ensaio MTT)

A análise de citotoxicidade foi realizada para avaliar os efeitos dos produtos da lixiviação dos *scaffolds* de Biosilicato[®] na proliferação de células da linhagem OSTEO-1 e L929.

A proliferação celular foi avaliada pelo ensaio MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5,-difetil-tetrazólio),¹⁶ onde cada linhagem celular foi dividida em dois grupos, Controle e Biosilicato, analisados em períodos distintos de cultivo de 24, 72 e 120 horas. No grupo Controle as células foram cultivadas apenas com o meio DMEM suplementado. No grupo Biosilicato as células foram cultivadas com meio DMEM suplementado, contendo produtos da lixiviação dos *scaffolds* de Biosilicato[®] (extratos). Para a obtenção do meio com extratos, o biomaterial foi previamente condicionado em meio DMEM por 7 dias (1 *scaffold*/2 mL de meio DMEM). Após o período de condicionamento, o meio DMEM foi descartado e cada *scaffold* foi submerso em 2 mL de meio DMEM suplementado por 24 horas em condições estáticas a 37°C. O meio DMEM que esteve em contato com o biomaterial por 24

horas foi considerado meio concentrado 100%. Por meio desse, foram realizadas várias diluições (50, 25 e 12,5%) para avaliar a influência dessas diferentes concentrações na proliferação celular das duas linhagens testadas.

Para a realização da análise, as células das culturas subconfluentes foram contadas e distribuídas em placas de cultura de 96 poços. Foram adicionadas 1×10^3 células em 200 μL de meio DMEM a 10% de SFB em cada poço da placa de cultura. Nos grupos Biosilicato utilizou-se a mesma quantidade celular em 200 μL de meio DMEM com as respectivas concentrações de extratos.

Após cada período experimental, os poços das placas de cultura foram lavados com 100 μL de Tampão Salino Fosfato (PBS – *Phosphate Buffer Saline*) e receberam 50 μL de solução com MTT (0,5 mg/ml) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). As placas foram incubadas por aproximadamente 3 horas em estufa de cultura a 37°C, para que ocorresse a formação dos cristais de formazan. Decorrido o período de incubação, as placas foram retiradas da estufa e os cristais formados foram dissolvidos com 100 μL de isopropanol. A absorbância foi lida a 620 nm usando um leitor de microplacas (Anthos 2020, Anthos Labtec Instruments, Wals, Austria). Foram realizados três experimentos independentes sempre em quadruplicata.

4.3.3.3. Análise de genotoxicidade (ensaio cometa)

A análise de genotoxicidade foi realizada para avaliar os danos no DNA de células OSTE0-1 e L929 cultivadas com *scaffolds* de Biosilicato[®], por meio de um ensaio de eletroforese em células individualizadas em gel de agarose (ensaio cometa).¹⁷

Para isto, as células das culturas subconfluentes foram contadas e distribuídas em placas de cultura de 12 poços. Foram utilizadas 2×10^4 células em 2 mL de meio DMEM a

10% de SFB em cada poço da placa de cultura. Cada linhagem celular foi dividida em dois grupos (Controle e Biosilicato), avaliados em períodos distintos de 24, 72 e 96 horas. O grupo Controle seguiu-se com o cultivo das células em meio DMEM suplementado com SFB. O Grupo Biosilicato foi cultivado em contato com *scaffolds* de Biosilicato[®] (1 *scaffold* por poço), previamente condicionados por um período de 7 dias em meio DMEM (1 *scaffold*/2 mL de meio DMEM), durante todos os períodos experimentais. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Após cada período experimental, os poços das placas de cultura foram lavados com PBS, tripsinizados e as células adicionadas em tubos de 50 mL. Os tubos foram centrifugados a 1200 rpm por um período de 5 minutos. O meio DMEM foi descartado e as células ressuspendidas com 1 mL de um novo meio DMEM. Depois de realizada esta etapa, um volume de 100 µL de meio DMEM com as respectivas células de cada grupo experimental foi adicionado a 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão à 37°C e depositado sobre lâminas histológicas recobertas com agarose de ponto de fusão normal à 0,5%. Após, as lâminas foram recobertas com lamínulas para a homogeneização adequada do material e posteriormente colocadas em solução de lise a 1% (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM tampão Tris-HCl, pH 10, 1% sarcosinato de sódio com 1% Triton X-100 e 10% DMSO), por aproximadamente 1 hora. Subsequentemente, as mesmas foram lavadas com PBS durante 5 minutos e colocadas em uma cuba de eletroforese contendo solução tampão alcalina, pH>13 (1 mM EDTA e 300 mM NaOH), até o líquido as cobrirem totalmente. Antes da eletroforese, as lâminas permaneceram por um período de descanso de 20 minutos, seguida por um período de eletroforese de 20 minutos à 25 V (0,86 V/cm) e 300 mA. Findada esta etapa, as lâminas foram lavadas com solução de neutralização (0,4 M Tris, pH 7,5), durante 5 minutos. Este procedimento foi repetido 3 vezes. Após a neutralização, as lâminas foram coradas com 100 µL brometo de etídio (50 µg/mL).

Um total de 50 cometas capturados aleatoriamente por tratamento/período¹⁸ foram examinados cegamente por um especialista na ampliação 400X, utilizando um microscópio de fluorescência (Olympus, Orangeburg, USA) conectado através de uma câmera preto e branco a um sistema analisador de imagem (Comet Assay II, Perceptive Instruments, Suffolk, Haverhill, Reino Unido). Este software foi previamente calibrado de acordo com as instruções do fabricante. O sistema de análise de imagem computadorizado adquire as imagens, calcula os perfis de intensidade integrada para cada célula e avalia a gama de parâmetros derivados. Células não danificadas têm um núcleo intacto, sem uma cauda, e as células danificadas têm a aparência de um cometa. Para quantificar os danos no DNA, foi utilizado o momento da cauda. O momento da cauda foi calculado como o produto do comprimento da cauda pela fração de DNA contida nesta área. O momento da cauda do cometa é positivamente correlacionado com o nível de quebras no DNA em uma célula. O valor médio do momento da cauda em uma determinada amostra foi adotado como o índice de danos no seu DNA.

4.3.4. Análise estatística

Os dados foram expressos em média de valores e desvios padrão (DP) para cada grupo de amostra. A normalidade da distribuição de todas as variáveis foi verificada usando o teste de Shapiro-Wilk's. Para amostras paramétricas foi utilizado o teste One-way ANOVA para avaliar a variância da comparação entre os grupos, e nos casos significantes, o teste de Tukey foi utilizado para discriminar as diferenças. Para amostras não paramétricas foi utilizado o teste de Mann-Whitney. As análises foram realizadas no programa EXCEL (2007) e no software STATISTICA (versão 7.0). Para todos os testes foi utilizado o nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

4.4. RESULTADOS

4.4.1. Avaliação biológica *in vivo*

4.4.1.1. Análise histopatológica

Durante o período experimental, os animais não apresentaram complicações pós-operatórias. Eles regressaram rapidamente a sua dieta normal e não demonstraram perda de massa corpórea. Além disso, nenhum animal morreu durante o experimento e não foi detectada a presença de infecção na área da lesão.

Os grupos Controles não apresentaram diferenças morfológicas evidentes quando comparados nos diferentes períodos experimentais. Em todas as amostras analisadas, não foi observada a presença de processo inflamatório, tecido necrótico ou tecido fibroso. Estes grupos foram representados por uma fotomicrografia do grupo Controle 7 dias (Figura 4A).

Após 7 dias de implantação dos *scaffolds* de Biosilicato[®], foi observada a presença de tecido de granulação vascularizado próximo ao biomaterial (Figura 4B). Em 15 dias de implantação do biomaterial, foi evidenciado um processo inflamatório crônico de corpo estranho, com a presença de tecido fibroso circunjacente ao implante e células gigantes multinucleadas isoladas ou próximas às partículas do biomaterial (Figura 4C). No período de 30 dias de implantação do biomaterial, foi observado o processo inflamatório de corpo estranho, com tecido fibroso instalado em torno dos *scaffolds* e uma maior presença de células gigantes multinucleadas próximas às partículas de diferentes tamanhos do biomaterial (Figura 4D). Após 45 dias de implantação do biomaterial, foi notado o processo inflamatório de corpo estranho com uma maior presença de um tecido fibroso e células gigantes multinucleadas em torno das partículas do biomaterial, em comparação ao grupo com

implantação de 30 dias (Figura 4E). Em 60 dias de implantação do biomaterial, ainda foi observado à presença de processo inflamatório crônico de corpo estranho, com camada de tecido fibroso mais espessa e uma maior presença de células gigantes multinucleadas em torno das partículas do biomaterial, em comparação ao grupo de 45 dias de implantação. Neste mesmo período, foi notada a presença de partículas menores do biomaterial comparado aos demais grupos experimentais (Figura 4F). Em todos os grupos analisados não foi evidenciada a presença de tecido necrótico ou infiltrado de células inflamatórias (Figura 4).

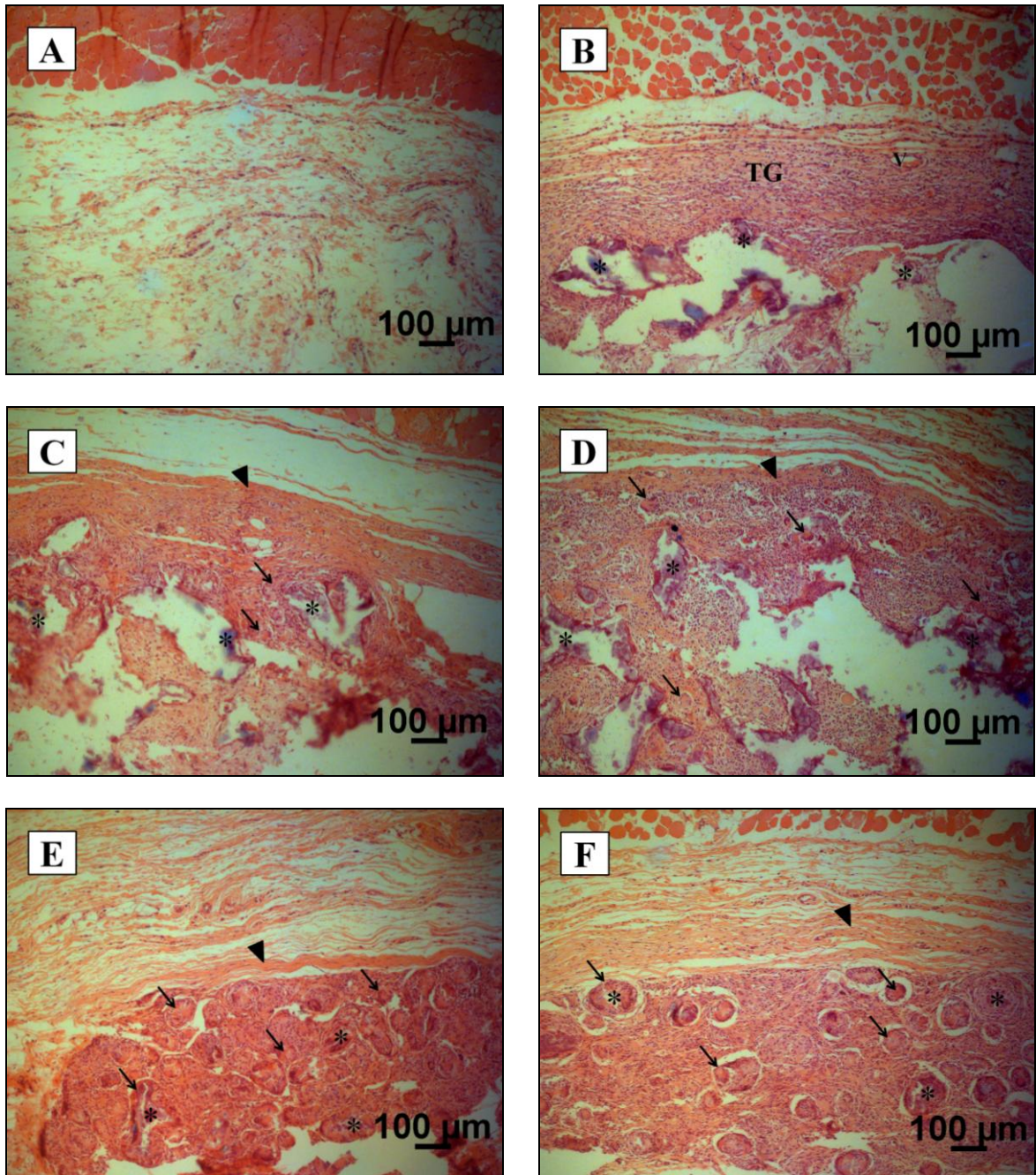


Figura 4. Fotomicrografia do tecido subcutâneo de ratos, demonstrando a ausência de processo inflamatório no grupo Controle (A), presença de tecido de granulação (TG) vascularizado (V) após 7 dias de implantação (B), processo inflamatório crônico de corpo estranho após 15 (C), 30 (D), 45 (E) e 60 dias de implantação (F), caracterizado pela presença de tecido fibroso (▼), células gigantes multinucleadas (setas) isoladas e próximas ao biomaterial (*). Coloração H.E, ampliação 100X.

4.4.2. Avaliação biológica *in vitro*

4.4.2.1. Análise de citotoxicidade (ensaio MTT)

A figura 5 demonstra os resultados obtidos na proliferação de células da linhagem OSTEO-1, expostas a diferentes concentrações de extrato dos *scaffolds* de Biosilicato[®] em períodos distintos de cultivo.

Após 24 horas de cultivo celular, não foi observada diferença estatisticamente significativa na proliferação celular do grupo Controle quando comparado aos demais grupos experimentais. Além disso, os grupos experimentais também não apresentaram diferença significativa quando comparados entre si (Figura 5).

Em 72 horas de cultivo, o grupo Controle apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparado aos grupos com as menores concentrações de extrato do biomaterial (12,5% e 25%). No entanto, quando comparamos o grupo Controle com o grupo com concentração de 50 e 100%, nenhuma diferença estatística foi observada. Ainda, os grupos com concentração de 12,5%, 25% e 50% apresentaram valores estatisticamente maiores quando comparados com o grupo com a maior concentração de extrato do biomaterial (100%). Nenhuma diferença estatística foi observada quando realizada a comparação entre os grupos 12,5, 25% e 50% (Figura 5).

No período de 120 horas de cultivo, o grupo Controle apresentou valores médios estatisticamente menores quando comparados com os grupos com concentração de 12,5, 25 e 50% de extrato do biomaterial. No entanto, quando comparados o grupo Controle com o grupo com concentração de 100%, este apresentou valores estatisticamente maiores. Os grupos com concentração de 12,5% e 25% apresentaram médias estatisticamente maiores

quando comparados aos grupos com concentração de 50 e 100%. Ainda, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos com concentração de 50 e 100% (Figura 5).

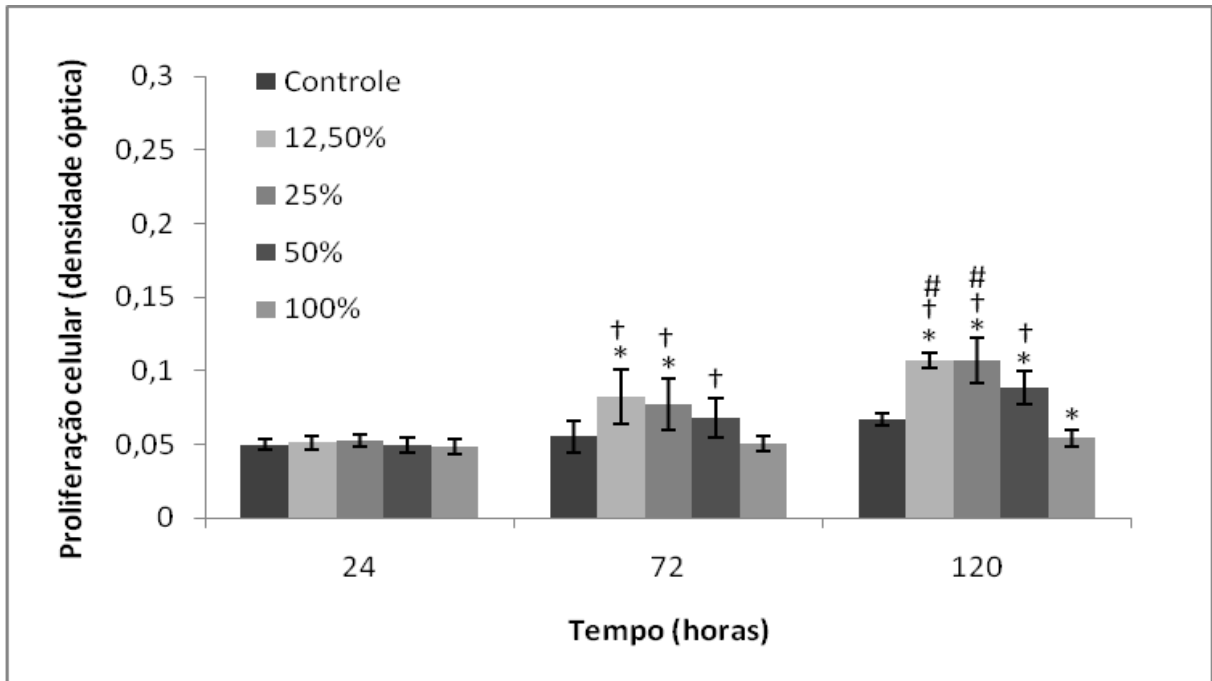


Figura 5. Proliferação de células da linhagem OSTEEO-1 (densidade óptica) cultivadas com soluções contendo diferentes concentrações de extrato dos *scaffolds* de Biosilicato[®] (12,5, 25, 50 e 100%) em períodos distintos de cultivo (24, 72 e 120 horas). * $p \leq 0,05$ vs Controle; † $p \leq 0,05$ vs 100%; # $p \leq 0,05$ vs 50%.

A figura 6 demonstra os resultados obtidos na proliferação de células da linhagem L929, expostas a diferentes concentrações de extrato dos *scaffolds* de Biosilicato[®] em períodos distintos de cultivo.

Após 24 horas de cultivo celular, não foi observada diferença estatisticamente significativa na proliferação celular do grupo Controle, quando comparado aos demais grupos experimentais. Além disso, os grupos experimentais também não apresentaram diferença significativa quando comparados entre si (Figura 6).

Em 72 horas de cultivo, pode ser observado que o grupo Controle apresentou valores médios estatisticamente menores quando comparados aos grupos 12,5, 25 e 50%. No entanto, quando comparado com o grupo 100%, não foi observada diferença significativa. Ainda, de acordo com a figura 6, pode ser observado que os grupos 12,5 e 25% apresentaram valores estatisticamente maiores quando comparados aos grupos 50% e 100%, mas não apresentaram diferença significativa quando comparados entre si. Além disso, o grupo 50% foi significativamente maior quando comparado ao grupo 100% (Figura 6).

No período de 120 horas de cultivo, o grupo Controle apresentou valores médios estatisticamente menores quando comparados com os grupos com concentração de 12,5, 25 e 50% de extrato do biomaterial. No entanto, quando comparados o grupo Controle com o grupo com concentração de 100%, não foi observada diferença estatisticamente significativa. Os grupos com concentração de 12,5% e 25% apresentaram médias estatisticamente maiores quando comparados aos grupos com concentração de 50 e 100%. Ainda, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos com concentração de 50 e 100% (Figura 6).

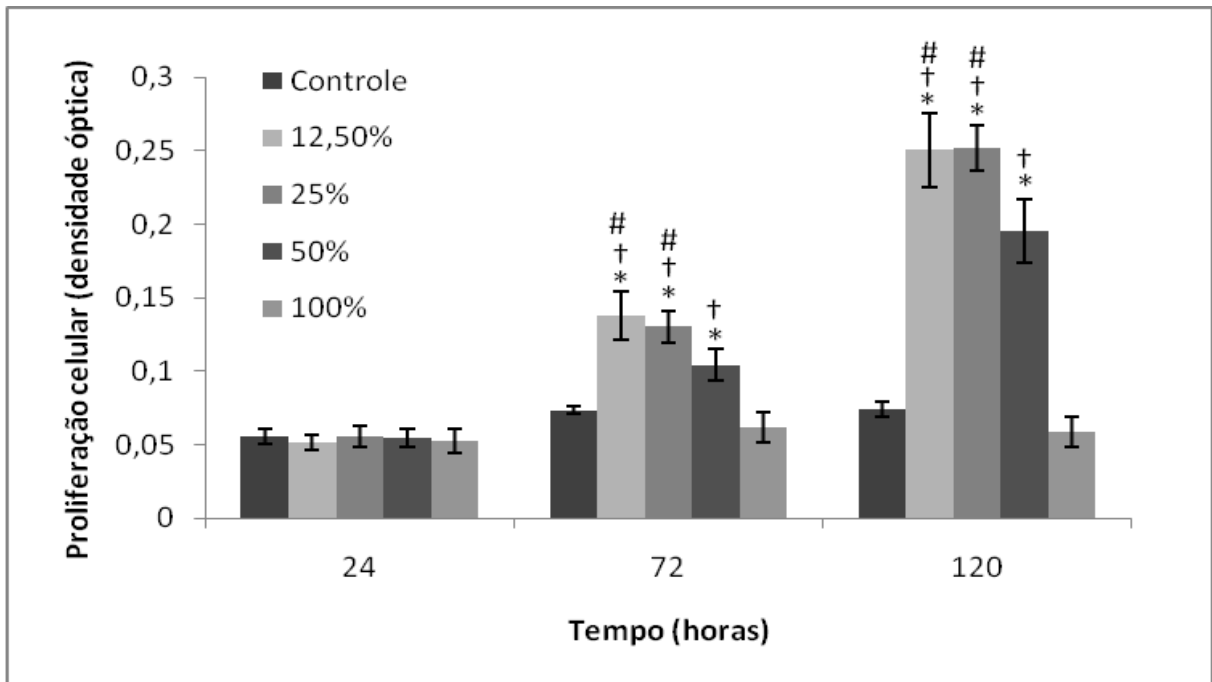


Figura 6. Proliferação de células da linhagem L929 (densidade óptica) cultivadas com soluções contendo diferentes concentrações de extrato dos *scaffolds* de Biosilicato[®] (12,5, 25, 50 e 100%) em períodos distintos de cultivo (24, 72 e 120 horas). * $p \leq 0,05$ vs Controle; † $p \leq 0,05$ vs 100%; # $p \leq 0,05$ vs 50%.

4.4.2.2. Análise de genotoxicidade

De acordo com a tabela 1 referente aos danos no DNA de células da linhagem OSTEO-1, não foi verificada diferença estatisticamente significativa quando comparados os valores médios do grupo Controle com os do grupo Biosilicato, em todos os períodos analisados. O mesmo pode ser observado ao avaliar os danos no DNA de células da linhagem L929 em contato com *scaffolds* de Biosilicato[®] (Tabela 2).

Tabela 1. Médias e desvios padrão referente aos danos no DNA (momento da cauda) de células da linhagem OSTE0-1 expostas aos *scaffolds* de Biosilicato®

Tempo (Horas)	Grupos experimentais	
	Controle ^a	Biosilicato
24	0,43±0,25	0,63±0,15
72	0,70±0,30	0,67±0,47
96	0,63±0,32	0,53±0,15

^aDMEM

Tabela 2. Médias e desvios padrão referente aos danos no DNA (momento da cauda) de células da linhagem L929 expostas aos *scaffolds* de Biosilicato®

Tempo (Horas)	Grupos experimentais	
	Controle ^a	Biosilicato
24	0,77±0,25	0,57±0,31
72	0,63±0,12	0,43±0,06
96	0,70±0,36	0,67±0,31

^aDMEM

4.5. DISCUSSÃO

Devido ao interesse em utilizar os *scaffolds* de Biosilicato® como implantes em tratamentos clínicos para reparo ósseo, esses devem ser avaliados quanto aos seus efeitos nos sistemas biológicos para verificar a sua biocompatibilidade. Neste estudo foram realizados os testes iniciais para verificar a biocompatibilidade dos *scaffolds* de Biosilicato®.

Os resultados referente a análise histopatológica demonstraram que em 7 dias de implantação dos *scaffolds* de Biosilicato® foi observada a presença de tecido de granulação seguida pela instalação de um processo inflamatório crônico com a presença de tecido fibroso e células gigante multinucleadas (período de 15 dias). Segundo Anderson e McNally (2011),¹⁹

este padrão morfológico apresentado após a introdução do biomaterial é denominado reação de corpo estranho. Esta reação ocorre na tentativa de reparar o tecido lesado, e é considerada uma resposta final do processo inflamatório para a cicatrização tecidual.²⁰ A reação de corpo estranho pode ser evidenciada com a utilização de outros implantes cerâmicos bioativos em subcutâneo de ratos. Lima *et al.* (2010)²¹ utilizando partículas de uma cerâmica bioativa (hidroxiapatita) enriquecida com átomos de zinco, observaram a presença da reação de corpo estranho após 7 dias de implantação do biomaterial. Cruz *et al.* (2006)²² também evidenciaram a reação de corpo estranho ao utilizarem partículas de uma hidroxiapatita sintética experimental em 15 dias de implantação, corroborando com os achados encontrados no presente estudo no mesmo período experimental.

A reação de corpo estranho foi observada durante os demais períodos experimentais (30, 45 e 60 dias), com uma maior presença de tecido fibroso e células gigantes multinucleadas no decorrer dos períodos. As características dos biomateriais podem ditar a intensidade da reação de corpo estranho. Biomateriais com maior área superficial, como por exemplo os biomateriais em forma de partículas ou *scaffolds*, contribuem para um maior recrutamento de macrófagos, células gigantes multinucleadas e desenvolvimento de tecido fibroso em relação aos materiais com menor área.¹⁹ Vogel *et al.* (2004)²³ verificaram uma maior concentração de células gigantes multinucleadas nos implantes com a composição química do vidro bioativo Bioglass[®] 45S5 em relação aos implantes com as outras composições de vidros testadas, mostrando que tal acontecimento se deve a maior taxa de dissolução desses materiais. Misra *et al.* (2010)²⁴ observaram que a degradação de um *scaffold* a base de polímero coberto com camada de vidro bioativo (Bioglass[®] 45S5), levaram a formação de partículas menores do biomaterial, induzindo o desenvolvimento da reação de corpo estranho. Por meio destes achados, sugerimos que a degradação dos *scaffolds* de

Biosilicato[®] no decorrer dos períodos experimentais contribuiu para uma maior presença de células gigantes multinucleadas e tecido fibroso.

Em resumo, os resultados obtidos na análise histopatológica demonstraram que os *scaffolds* de Biosilicato[®] não induziram necrose tecidual, não propiciaram o desenvolvimento de foco infeccioso, mas promoveram uma reação de corpo estranho, que também pode ser observada com a utilização de outros materiais biocompatíveis. Portanto, esses resultados indicam que os *scaffolds* de Biosilicato[®] são materiais biocompatíveis no cenário biológico avaliado.

Os resultados da análise de citotoxicidade mostraram que os extratos de Biosilicato[®] não influenciaram na proliferação celular das duas linhagens testadas (OSTEO-1 e L929) em 24 horas de cultivo, demonstrando assim, não possuir potencial citotóxico neste período experimental. Outros autores também evidenciaram que compostos contendo partículas de cerâmicas bioativas não apresentaram potencial citotóxico no mesmo período. Ferraz *et al.* (2000)²⁵ utilizando um compósito de liga de titânio revestido com camada de cerâmica bioativa (hidroxiapatita), observaram que esses materiais não apresentaram potencial citotóxico quando cultivados com células da linhagem MG-63 (osteossarcoma humano). Quan *et al.* (2008)²⁶ utilizando um compósito a base de zircônia/hidroxiapatita também evidenciaram que estes materiais não possuem potencial citotóxico após 24 horas de cultivo com células da linhagem L929. Esses achados corroboram com os encontrados no presente estudo.

Os resultados obtidos no período de 72 horas de cultivo demonstraram que os extratos dos *scaffolds* de Biosilicato[®] não inibiram a proliferação celular de ambas às linhagens testadas, evidenciando a citocompatibilidade do biomaterial, e que as concentrações de 12,5 e 25% e as concentrações de 12,5, 25 e 50% de extratos, estimularam a proliferação das células OSTEO-1 e L929, respectivamente. Xynos *et al.* (2000)²⁷ ao utilizarem produtos da lixiviação

do vidro bioativo Bioglass[®] 45S5, que possui uma composição química similar ao Biosilicato[®],²⁸ observaram que os produtos iônicos desse biomaterial foram capazes de estimular a diferenciação e proliferação de osteoblastos humanos após 96 horas de cultivo.

No presente estudo, este aumento na proliferação celular não foi observado no grupo com a concentração de 100% de extratos nas duas linhagens celulares testadas (OSTEO-1 e L929). Uma possível explicação para esses achados seria que as amostras com 100% de extrato podem ter oferecido um estímulo excessivo as células devido a maior concentração dos produtos da lixiviação do biomaterial, ou mesmo, pelo elevado pH do meio que é proporcionado pela maior concentração das partículas do Biosilicato[®].²⁸ Liu *et al.* (2009)²⁹ observaram que o pH pode ser um fator determinante na proliferação celular. Estes pesquisadores evidenciaram que a maior concentração de extratos (100%) de um *scaffold* de borossilicato vítrio bioativo, apresentou um meio de cultura com elevado pH elevado, e isto, induziu uma maior inibição na proliferação celular em comparação aos grupos com as menores concentrações que possuíam um menor pH.

Após 120 horas de cultivo com as células das duas linhagens avaliadas, foi observado um comportamento similar na proliferação celular evidenciado no período de 72 horas de cultivo. Os grupos com as menores concentrações de extrato (12,5, 25, e 50%) estimularam a proliferação celular em ambas as linhagens, sendo que as concentrações de 12,5 e 25% demonstraram uma maior proliferação celular. Esses grupos podem ter apresentado uma maior na proliferação celular em ambas as linhagens, levando em consideração que as células cultivadas com as menores concentrações poderiam sofrer menos com a possível atuação de um efeito inibitório atribuído ao excesso de estímulo ou pH elevado.

Ainda, no período de 120 horas de cultivo foi observado uma redução na proliferação das células OSTEO-1 cultivadas com 100% de extrato. Esta inibição pode ter ocorrido pela maior sensibilidade destas células à presença da elevada concentração de extrato. A diferença

na resposta celular entre as linhagens celulares com relação ao efeito de um mesmo biomaterial foi evidenciada por um estudo anterior.³⁰ Zhang *et al.* (2009)³¹ evidenciaram esta mesma redução na proliferação celular no período de 120 horas ao utilizarem *scaffolds* de uma vitrocerâmica bioativa (A/W) em cultura de células tronco mesenquimais. Entretanto, após 168 horas de cultivo não foi notada a redução na proliferação celular. Isto sugere que um período mais extenso de cultivo das células OSTEO-1 com a concentração de 100% de extrato de *scaffolds* de Biosilicato[®] pode conduzir a uma estabilidade nos níveis de proliferação celular.

Os resultados obtidos na análise de genotoxicidade evidenciaram que o ensaio de única célula em gel (cometa), nas condições experimentais utilizadas, não detectou a presença de danos no DNA de células OSTEO-1 e L929, após o cultivo com os *scaffolds* de Biosilicato[®] em todos os períodos testados. Estes resultados demonstraram que o biomaterial analisado não possui potencial genotóxico. O mesmo pode ser observado por outros autores ao investigarem a genotoxicidade *in vitro* de diferentes compostos cerâmicos. Noushad *et al.* (2009)³² utilizando uma porcelana dental, observaram que estes materiais não possuem potencial genotóxico quando cultivados com células L929, após o período de 24 horas. Ribeiro *et al.* (2005)³³ utilizando um agregado de trióxido mineral cultivados com células de linfoma de ratos por um período de 3 horas, também observaram que estes materiais não possuem potencial genotóxico, corroborando com o encontrado no presente estudo.

O emprego da implantação de biomateriais no subcutâneo de ratos foi escolhido pela comprovação de sua eficiência demonstrada pela literatura através de vários estudos.^{24,34,35} As metodologias *in vitro* empregadas neste estudo são adequadas para avaliar a citotoxicidade^{26,29,36} e genotoxicidade¹⁷ dos biomateriais. Estas informações das análises *in vitro*, juntamente com as informações histopatológicas, são importantes para o entendimento sobre o comportamento dos biomateriais nos sistemas biológicos. Embora a

biocompatibilidade dos *scaffolds* de Biosilicato[®] pode ser evidenciada neste presente estudo, outros trabalhos são necessários para verificar o comportamento destes biomateriais, em especial, estudos que se atenham a verificar este comportamento em períodos experimentais mais prolongados, ou mesmo, em outros modelos experimentais.

4.6. CONCLUSÃO

Em síntese, os resultados do presente estudo demonstraram que os *scaffolds* de Biosilicato[®] apresentaram biocompatibilidade tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Esses achados são promissores porque contribuem com informações importantes sobre o comportamento do biomaterial em diferentes sistemas biológicos e evidenciam a possível aplicação clínica dos *scaffolds* de Biosilicato[®].

4.7. REFERÊNCIAS

1. Zimmermann G, Müller U, Wentzensen A. The value of laboratory and imaging studies in the evaluation of long-bone non-unions. *Injury Int J Care Injured* 2007; 38S: S33-S37.
2. Claes L, Willie B. The enhancement of bone regeneration by ultrasound; *Prog Biophys Mol Biol* 2007; 93: 384-398.
3. Hadjiargyrou M, Mcleod K, Ryaby JP, Rubin C. Enhancement of fracture healing by low intensity ultrasound. *Clin Orthop Relat Res* 1998; 355: 216-229.
4. Hench LL, Polak JM. Third-generation biomedical materials. *Science* 2002; 295: 1014-7.
5. Moura J, Teixeira LN, Ravagnani C, Peitl O, Zanotto ED, Beloti MM, Panzeri H, Rosa AL, Oliveira PT. *In vitro* osteogenesis on a highly bioactive glassceramic (Biosilicato[®]). *J Biomed Mater Res A* 2007; 82: 545-57.

6. Dieudonné SC, Van den dolder J, De ruijter JE, Paldan H, Peltola T, Van't hof MA, Happonen RP, Jansen JA. Osteoblast differentiation of bone marrow stromal cells cultured on silica gel and sol-gel-derived titania. *Biomaterials* 2002; 14: 3041-3051.
7. Zanotto ED, *et al.* Process and compositions for preparing particulate, bioactive or resorbable biosilicates for use in the treatment of oral ailments. Fundação Universidade Federal de São Carlos; Universidade de São Paulo. Int. C. C03C10/00, 20 Feb. 2004, WO2004/074199.
8. Granito RN, Rennó AC, Ravagnani C, Bossini PS, Mochiuti D, Jorgetti V, Driusso P, Peitl O, Zanotto ED, Parizotto NA, Oishi J. In vivo biological performance of a novel highly bioactive glass-ceramic (Biosilicate[®]): A biomechanical and histomorphometric study in rat tibial defects. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2011; 97: 139-147.
9. Oliveira P, Ribeiro DA, Favaro-Pipi E, Driusso P, Parizotto NA, Renno ACM. Low level laser therapy does not modulate the outcomes of a highly bioactive glass–ceramic (Biosilicate[®]) on bone consolidation in rats. *J Mater Sci: Mater Med* 2010; 21: 1379-1384.
10. Bossini PS, Rennó AC, Ribeiro DA, Fangel R, Peitl O, Zanotto ED, Parizotto NA. Biosilicato[®] and low-level laser therapy improve bone repair in osteoporotic rats. *J Tissue Eng Regen Med* 2011; 5: 229-37.
11. Pearce AI, Richards RG, Milz S, Schineider E, Pearce SG. Animal models for implant biomaterial research in bone: A review. *Eur Cell and Mater* 2007; 13: 1-10.
12. Crovace, MC. Obtenção de estruturas porosas altamente bioativas via sinterização do Biosilicato[®]. 2009. 141f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

13. Serrano MC, Portolés MT, Pagani R, Guinoa JS, Ruiz-Hernández E, Arcos D, Vallet-Regí M. *In vitro* positive biocompatibility evaluation of glass–glass ceramic thermoseeds for hyperthermic treatment of bone tumors. *Tissue Eng Part A* 2008; 14: 617-627.
14. Nath S, Kalmodia S, Basu B. Densification, phase stability and *in vitro* biocompatibility property of hydroxyapatite-10 wt% silver composites. *J Mater Sci Mater Med* 2010; 21: 1273-1287.
15. Liu W, Chang J. Setting properties and biocompatibility of dicalcium silicate with varying additions of tricalcium aluminate. *J Biomater Appl* 2011; 0: 1-9.
16. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65: 55-63.
17. Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki Y.F. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 2000; 35: 206-21.
18. Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B, Clay P, Collins A, Smith A, Speit G, Thybaud V, Tice RR. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline comet assay. *Mutagenesis* 2003; 18: 45-51.
19. Anderson JM, McNally AK. Biocompatibility of implants: lymphocyte/macrophage interactions. *Semin Immunopathol* 2011; 33: 221-233.
20. Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT. Foreign body reaction to biomaterials. *Semin Immunol* 2008; 20: 86-100.
21. Lima IR, Alves GG, Fernandes GVO, Dias EP, Soares GA, Granjeiro JM. Evaluation of the *in vivo* biocompatibility of hydroxyapatite granules incorporated with zinc ions. *Mat Res* 2010; 13: 563-568.

22. Cruz ACC, Pochapski MT, Daher JB, Silva JCZ, Pilatti GL, Santos FA. Physico-chemical characterization and biocompatibility evaluation of hydroxyapatites. *J Oral Sci* 2006; 48: 219-226.
23. Vogel M, Voigt C, Knabe C, Radlanski RJ, Gross UM, Müller-Mai CM. Development of multinuclear giant cells during the degradation of Bioglass[®] particles in rabbits. *J Biomed Mater Res A* 2004; 70: 370-9.
24. Misra SK, Ansar TI, Valappil SP, Mohne D, Philip SE, Stark WJ, Roy I, Knowles JC, Salih V, Boccaccini AR. Poly(3-hydroxybutyrate) multifunctional composite scaffolds for tissue engineering applications. *Biomaterials* 2010; 31: 2806-2815.
25. Ferraz MP, Knowles JC, Olsen I, Monteiro FJ, Santos JD. Flow cytometry analysis of the effects of pre-immersion on the biocompatibility of glass-reinforced hydroxyapatite plasma-sprayed coatings. *Biomaterials* 2000; 21: 813-820.
26. Quan R, Yang D, Wu X, Hongbin W, Miao X, Li W. *In vitro* and *in vivo* biocompatibility of graded hydroxyapatite–zirconia composite bioceramic. *J Mater Sci: Mater Med* 2008; 19: 183-187.
27. Xynos ID, Edgar AJ, Buttery LDK, Hench LL, Polak JM. Ionic products of bioactive glass dissolution increase proliferation of human osteoblasts and induce insulin-like growth factor II mRNA expression and protein synthesis. *Biochem and Biophys Res Commun* 2000; 276: 461-465.
28. Siqueira RL, Zanotto ED. Biosilicato[®]: histórico de uma vitrocerâmica brasileira de elevada bioatividade. *Quim. Nova* 2011, XY: 1-11.
29. Liu X, Huang W, Fu H, Yao A, Wang D, Pan H, Lu WW, Jiang X, Zhang X. Bioactive borosilicate glass scaffolds: *in vitro* degradation and bioactivity behaviors. *J Mater Sci: Mater Med* 2009; 20: 1237-1243.

30. Ignjatovic N, Ninkov P, Kojic V, Bokuro VM, Srdic V, Krnojelac D, Selakovic S, Uskokovic D. Cytotoxicity and fibroblast properties during *in vitro* test of biphasic calcium phosphate/poly-dl-lactide-co-glycolide biocomposites and different phosphate materials. *Microsc Res Tech* 2006; 69: 976-982.
31. Zhang H, Ye XJ, Li JS. Preparation and biocompatibility evaluation of apatite/wollastonite-derived porous bioactive glass ceramic scaffolds. *Biomed Mater* 2009; 4: 045007.
32. Noushad M, Kannan TP, Husein A, Abdullah H, Ismail AR. Genotoxicity evaluation of locally produced dental porcelain – An *in vitro* study using the Ames and Comet assays. *Toxicol in Vitro* 2009; 23: 1145-1150.
33. Ribeiro DA, Matsumoto MA, Duarte MAH, Marques MEA, Salvadori DMF. *In vitro* biocompatibility tests of two commercial types of mineral trioxide aggregate. *Braz Oral Res* 2005; 19: 183-7.
34. Link DP, Van den dolder J, Van den beucken JJJP, Cuijpers VM, Wolke JGC, Mikos AG, Jansen JA. Evaluation of the biocompatibility of calcium phosphate cement/PLGA microparticle composites. *J Biomed Mater Res A* 2008; 87: 760-9.
35. Wang M, Li Y, Wu J, Xu F, Zuo Y, Jansen JA. *In vitro* and *in vivo* study to the biocompatibility and biodegradation of hydroxyapatite/poly(vinyl alcohol)/gelatin composite. *J Biomed Mater Res A* 2008; 85: 418-26.
36. Roualdes O, Duclos ME, Gutknecht D, Frappart L, Chevalier J, Hartmann DJ. *In vitro* and *in vivo* evaluation of an alumina–zirconia composite for arthroplasty applications. *Biomaterials* 2010; 31: 2043-2054.

PARTE III

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANEXO

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados obtidos neste estudo é possível considerar que o *scaffold* de Biosilicato[®] é um material biocompatível, por não apresentar uma resposta danosa em implantação subcutânea em ratos e não possuir um potencial tóxico e genotóxico *in vitro*, sendo assim, considerado um recurso promissor ao uso como implante ósseo-substituto.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, J.M.; MCNALLY, A.K. Biocompatibility of implants: lymphocyte/macrophage interactions. **Semin Immunopathol**, v. 33, p. 221-233, 2011.

ANDERSON, J.M.; RODRIGUEZ, A.; CHANG D.T. Foreign body reaction to biomaterials. **Semin Immunol**, v. 20, p. 86-100, 2008.

BOSSINI, P.S.; RENNÓ, A.C.; RIBEIRO, D.A.; FANGEL, R.; PEITL, O.; ZANOTTO, E.D.; PARIZOTTO, N.A. Biosilicato[®] and low-level laser therapy improve bone repair in osteoporotic rats. **J Tissue Eng Regen Med**, v. 5, p. 229-37, 2011.

CLAES, L.; WILLIE, B. The enhancement of bone regeneration by ultrasound. **Prog Biophys Mol Biol**, v. 93, p. 384-398, 2007.

CROVACE, M.C. **Obtenção de estruturas porosas altamente bioativas via sinterização do Biosilicato[®]**. 2009. 141f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

CRUZ, A.C.C.; POCHAPSKI, M.T.; DAHER, J.B.; SILVA, J.C.Z.; PILATTI, G.L.; SANTOS, F.A. Physico-chemical characterization and biocompatibility evaluation of hydroxyapatites. **J Oral Sci**, v. 48, p. 219-226, 2006.

DIEUDONNÉ, S.C.; VAN DEN DOLDER, J.; DE RUIJTER, J.E.; PALDAN, H.; PELTOLA, T.; VAN'T HOF, M.A.; HAPPONEN, R.P.; JANSEN, J.A. Osteoblast differentiation of bone marrow stromal cells cultured on silica gel and sol-gel-derived titania. **Biomaterials**, v. 14, p. 3041-3051, 2002.

FERRAZ, M.P.; KNOWLES, J.C.; OLSEN, I.; MONTEIRO, F.J.; SANTOS, J.D. Flow cytometry analysis of the effects of pre-immersion on the biocompatibility of glass-reinforced hydroxyapatite plasma-sprayed coatings. **Biomaterials**, v. 21, p. 813-820, 2000.

GRANITO R.N.; RIBEIRO D.A.; RENNÓ A.C.; RAVAGNANI C.; BOSSINI P.S.; PEITL-FILHO O.; ZANOTTO E.D.; PARIZOTTO N.A.; OISHI J. Effects of biosilicate and Bioglass 45S5[®] on tibial bone consolidation on rats: a biomechanical and a histological study. **J Mater Sci Mater Med**, v. 20, p. 2521-6, 2009.

GRANITO, R.N.; RENNÓ, A.C.; RAVAGNANI, C.; BOSSINI, P.S.; MOCHIUTI, D.; JORGETTI, V.; DRIUSSO, P.; PEITL, O.; ZANOTTO, E.D.; PARIZOTTO, N.A.; OISHI J. In vivo biological performance of a novel highly bioactive glass-ceramic (Biosilicate®): A biomechanical and histomorphometric study in rat tibial defects. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 97, p. 139-147, 2011.

HADJIARGYROU, M.; MCLEOD, K.; RYABY, J.P.; RUBIN, C. Enhancement of fracture healing by low intensity ultrasound. **Clin Orthop Relat Res**, (355 Suppl):S216-29. Review, 1998.

HARTMANN, A.; AGURELL, E.; BEEVERS, C.; BRENDLER-SCHWAAB, S.; BURLINSON, B.; CLAY, P.; COLLINS, A.; SMITH, A.; SPEIT, G.; THYBAUD, V.; TICE, R.R. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline comet assay. **Mutagenesis**, v. 18, p. 45-51, 2003.

HENCH, L.L.; POLAK, J.M. Third-generation biomedical materials. **Science**, Feb 8: v. 295, p. 1014-7. Review, 2002.

HENCH, L.L.; POLAK, J.M.; XYNOS, I.D.; BUTTERY, L.D.K. Bioactive materials to control cell cycle. **Mat Res Innovat**, v. 3, p. 313-323, 2000.

HENCH, L.L.; WILSON, J. An introduction to bioceramics. **Singapore: World Scientific**, p. 386, 1993.

IGNJATOVIC, N.; NINKOV, P.; KOJIC, V.; BOKUROV, M.; SRDIC, V.; KRNOJELAC, D.; SELAKOVIC, S.; USKOKOVIC, D. Cytotoxicity and fibroblast properties during *in vitro* test of biphasic calcium phosphate/poly-dl-lactide-co-glycolide biocomposites and different phosphate materials. **Microsc Res Tech**, v. 69, p. 976-982, 2006.

ISO document **10993-1**, Biological evaluation of medical devices – Guidance on selection of testes, Part 1, 1992.

JAMES, P.F. Glass ceramics: new compositions and uses. **J Non-Cryst Solids**, v. 181, p. 1-15, 1995.

KARAGEORGIU, V.; KAPLAN, D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. **Biomaterials**, v. 26, p. 5474-91, 2005.

LEACH, J.K.; KAIGLER, D.; WANG, Z.; KREBSBACH, P.H.; MOONEY, D.J. Coating of VEGF-releasing scaffolds with bioactive glass for angiogenesis and bone regeneration. **Biomaterials**, v. 27, p. 3249-55, 2006.

LIMA, I.R.; ALVES, G.G.; FERNANDES, G.V.O.; DIAS, E.P.; SOARES, G.A.; GRANJEIRO, J.M. Evaluation of the *in vivo* biocompatibility of hydroxyapatite granules incorporated with zinc ions. **Mat Res**, v. 13, p. 563-568, 2010.

LINK, D. P.; VAN DEN DOLDER, J.; VAN DEN BEUCKEN, J. J. J. P.; CUIJPERS, V. M.; WOLKE, J.G.C.; MIKOS, A.G.; JANSEN, J. A. Evaluation of the biocompatibility of calcium phosphate cement/PLGA microparticle composites. **J Biomed Mater Res A**, v. 87, p. 760-9, 2008.

LIU, W.; CHANG, J. Setting properties and biocompatibility of dicalcium silicate with varying additions of tricalcium aluminate. **J Biomater Appl**, v. 0, p. 1-9, 2011.

LIU, X.; HUANG, W.; FU, H.; YAO, A.; WANG, D.; PAN, H.; LU, W.W.; JIANG, X.; ZHANG, X. Bioactive borosilicate glass scaffolds: *in vitro* degradation and bioactivity behaviors. **J Mater Sci: Mater Med**, v. 20, p. 1237-1243, 2009.

MISRA, S.K.; ANSAR, T.I.; VALAPPIL S.P.; MOHNE, D.; PHILIP, S.E.; STARK, W.J.; ROY, I.; KNOWLES, J.C.; SALIH, V.; BOCCACCINI, A.R. Poly(3-hydroxybutyrate) multifunctional composite scaffolds for tissue engineering applications. **Biomaterials**, v. 31, p. 2806-2815, 2010.

MOORE, W.R.; GRAVES, S.E.; BAIN, G.I. Synthetic bone graft substitutes. **ANZ J Surg**, v. 71, p. 354-361, 2001.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MOURA, J.; TEIXEIRA, L.N.; RAVAGNANI, C.; PEITL-FILHO, O.; ZANOTTO, E.D.; BELOTI, M.M.; PANZERI, H.; ROSA, A.L.; OLIVEIRA, P.T. *In vitro* osteogenesis on a highly bioactive glassceramic (Biosilicato[®]). **J Biomed Mater Res A**, v. 82, p. 545-57, 2007.

NATH, S.; KALMODIA, S.; BASU, B. Densification, phase stability and *in vitro* biocompatibility property of hydroxyapatite-10 wt% silver composites. **J Mater Sci Mater Med**, v. 21, p. 1273-1287, 2010.

NOUSHAD, M.; KANNAN, T.P.; HUSEIN A.; ABDULLAH, H.; ISMAIL, A.R. Genotoxicity evaluation of locally produced dental porcelain – An *in vitro* study using the Ames and Comet assays. **Toxicol in Vitro**, v. 23, p. 1145-1150, 2009.

OLIVEIRA, P.; RIBEIRO, D.A.; FAVARO-PIPI, E.; DRIUSSO, P.; PARIZOTTO, N.A.; RENNO, A.C.M. Low level laser therapy does not modulate the outcomes of a highly bioactive glass–ceramic (Biosilicate[®]) on bone consolidation in rats. **J Mater Sci: Mater Med**, v. 21, p. 1379-1384, 2010.

PEARCE, A.I.; RICHARDS, R.G.; MILZ, S.; SCHNEIDER, E.; PEARCE, S.G. Animal models for implant biomaterial research in bone: A review. **Eur Cell and Mater**, v. 13, p. 1-10, 2007.

PULEO, D.A.; HOLLERAN, L.A.; DOREMUS, R.H.; BIZIOS, R. Osteoblast responses to orthopedic implant materials *in vitro*. **J Biomed Mater Res**, v. 25, p. 711-723, 1991.

QUAN, R.; YANG, D.; WU, X.; WANG, H.; MIAO, X.; LI, W. *In vitro* and *in vivo* biocompatibility of graded hydroxyapatite–zirconia composite bioceramic. **J Mater Sci: Mater Med**, v. 19, p. 183-187, 2008.

RIBEIRO, D.A.; MATSUMOTO, M.A.; DUARTE, M.A.H.; MARQUES, M.E.A.; SALVADORI, D.M.F. *In vitro* biocompatibility tests of two commercial types of mineral trioxide aggregate. **Braz Oral Res**, v. 19, p. 183-7, 2005.

ROUALDES, O.; DUCLOS, M.E.; GUTKNECHT, D.; FRAPPART, L.; CHEVALIER, J.; HARTMANN, D.J. *In vitro* and *in vivo* evaluation of an alumina–zirconia composite for arthroplasty applications. **Biomaterials**, v. 31, p. 2043-2054, 2010.

SERRANO, M.C.; PORTOLÉS, M.T.; PAGANI, R.; GUINOVA, J.S.; RUIZ-HERNÁNDEZ, E.; ARCOS, D.; VALLET-REGÍ, M. *In vitro* positive biocompatibility evaluation of glass–glass ceramic thermoseeds for hyperthermic treatment of bone tumors. **Tissue Eng Part A**, v. 14, p. 617-627, 2008.

SIQUEIRA, R.L.; ZANOTTO, E.D. Biosilicato[®]: histórico de uma vitrocerâmica brasileira de elevada bioatividade. **Quim Nova**, v. XY, p. 1-11, 2011.

TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.C.; SASAKI, Y.F. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. **Environ Mol Mutagen**, v. 35, p. 206-21, 2000.

VOGEL, M.; VOIGT, C.; KNABE, C.; RADLANSKI, R.J.; GROSS, U.M.; MÜLLER-MAI, C.M. Development of multinuclear giant cells during the degradation of Bioglass® particles in rabbits. **J Biomed Mater Res A**, v. 70, p. 370-9, 2004.

WANG, M.; LI, Y.; WU, J.; XU, F.; ZUO, Y.; JANSEN, J.A. *In vitro* and *in vivo* study to the biocompatibility and biodegradation of hydroxyapatite/poly(vinyl alcohol)/gelatin composite. **J Biomed Mater Res A**, v. 85, p. 418-26, 2008.

WILLIAMS, D.F. **Definitions in biomaterials**: proceedings of a consensus conference of the European Society for Biomaterials, Chester, England, March 3-5, 1986. Amsterdam: Elsevier, p. 38, 1987.

XIN, R.; ZHANG, Q.; GAO, J. Identification of the wollastonite phase in sintered 45S5 bioglass and its effect on *in vitro* bioactivity. **J Non Cryst Solids**, v. 356, p. 1180-1184, 2010.

XYNOS, I.D.; EDGAR, A.J.; BUTTERY, L.D.K.; HENCH, L.L.; POLAK, J.M. Ionic products of bioactive glass dissolution increase proliferation of human osteoblasts and induce insulin-like growth factor II mRNA expression and protein synthesis. **Biochem and Biophys Res Commun**, v. 276, p. 461-465, 2000.

XYNOS, I.D.; EDGAR, A.J.; BUTTERY, L.D.K.; HENCH, L.L.; POLAK, J.M. Gene-expression profiling of human osteoblasts following treatment with the ionic products of Bioglass 45S5 dissolution. **J Biomed Mater Res**, v. 55, p. 151-157, 2001.

ZANOTTO, E.D. *et al.* **Process and compositions for preparing particulate, bioactive or resorbable biosilicates for use in the treatment of oral ailments**. Fundação Universidade Federal de São Carlos; Universidade de São Paulo. Int. C. C03C10/00, 20, WO2004/074199, 2004.

ZHANG, H.; YE, X.J.; LI, J.S. Preparation and biocompatibility evaluation of apatite/wollastonite-derived porous bioactive glass ceramic scaffolds. **Biomed Mater**, v. 4, p. 045007, 2009.

ZIMMERMANN, G.; MÜLLER, U.; WENTZENSEN, A. The value of laboratory and imaging studies in the evaluation of long-bone non-unions. **Injury Int J Care Injured**, v. 38, p. S33-S37, 2007.

ANEXO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
Comissão de Ética em Experimentação Animal
Via Washington Luís, km. 235 - Caixa Postal 676
Fones: (016) 3351.8109 / 3351.8110
Fax: (016) 3361.3176
CEP 13560-970 - São Carlos - SP - Brasil
propg@power.ufscar.br - www.propg.ufscar.br

Parecer da Comissão de Ética em Experimentação Animal nº 043/2009

Protocolo nº 045/2009

A Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos – CEEA/UFSCar – na sua 36ª. Reunião, ocorrida em 20/10/2009, **APROVOU** o trabalho intitulado “**Biocompatibilidade da Vitrocerâmica Bioativa (Biosilicato®): Análises In vitro e In vivo**” apresentado por Ana Claudia Rennó, Nivaldo Antonio Parizotto, Daniel Araki Ribeiro, Oscar Peitl Filho e Hueliton Wilian Kido.

São Carlos, 19 de novembro de 2009.

Prof.ª. Dr.ª. Keico Okino Nonaka

Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal