

Vivian Della Torres Oliveira

**Cerâmicas de fosfato de cálcio em contato
com células mononucleares humanas – estudo
*in vitro***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Área de Concentração: Clínica Odontológica Integrada

Orientador: Prof. Dr. Denildo de Magalhães

Uberlândia – MG
2012

Vivian Della Torres Oliveira

**Cerâmicas de fosfato de cálcio em contato
com células mononucleares humanas – estudo *in
vitro***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Área de Concentração: Clínica Odontológica Integrada

Orientador: Prof. Dr. Denildo de Magalhães

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Denildo de Magalhães

Profa.Dra. Leticia Resende Davi

Profa. Dra. Vrigínia Oliveira Crema

Uberlândia – MG
2012

Comissão Julgadora

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Odontologia, em sessão pública realizada em 28 de Fevereiro de 2012, considerou a candidata Vivian Della Torres Oliveira aprovada.

1º Prof. Dr. Denildo de Magalhães (orientador) _____

2º Profa.Dra. Letícia Resende Davi (1ºtitular) _____

3º Profa. Dra. Vrigínia Oliveira Crema (2ºtitular) _____

DEDICATÓRIA

À **Deus e Nossa Senhora** que sempre iluminaram e guiaram meus caminhos.

À minha família que tanto amo; meu marido, **David**, que me incentiva a ser cada vez melhor sendo um exemplo de determinação. Ao meu filho, **Lucas** e minha pequena **filha** que nascerá em breve.

Aos meus pais, **Irineu e Inês**, que sempre estiveram dispostos a me ajudar, pela dedicação, carinho e exemplo de coragem. Um apoio incondicional. Minha gratidão e amor por vocês são imensuráveis.

Ao meu irmão **Diogo** e minha cunhada **Cristina**, pelo apoio e torcida constante.

Às minhas lindas sobrinhas e afilhadas, **Beatriz e Luiza**, que deixam meus dias mais alegres.

Às minhas famílias **Oliveira e Della Torres** de Uberlândia, em especial a tia Biga e tio Edson que me acolheram com muito carinho.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Denildo de Magalhães**, pela orientação, amizade e confiança. Pelos ensinamentos em Periondontia.

À **profa. Ms. Priscilla Barbosa Ferreira Soares**, sempre me deu força. Tenho por você uma grande admiração.

À **profa. Dra Camilla Christian Gomes Moura**, pelo seu dinamismo e contribuição na minha pesquisa.

Aos **amigos** do mestrado, em especial a Analice, pela amizade e agradável convivência.

À **secretária Graça**, pela grande colaboração, dedicação e disposição em ajudar.

À **Faculdade de Odontologia** da Universidade Federal de Uberlândia, pelo apoio constante à pesquisa, ensino e extensão.

SUMÁRIO

| | |
|-------------------------------|----|
| LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS | 07 |
| RESUMO | 08 |
| ABSTRACT | 10 |
| INTRODUÇÃO | 12 |
| REVISÃO DE LITERATURA | 16 |
| PROPOSIÇÃO | 24 |
| MATERIAIS E MÉTODOS | 28 |
| RESULTADOS | 31 |
| CONCLUSÃO | 34 |
| REFERÊNCIAS | 36 |
| ANEXO | 42 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PDGF: fator de crescimento derivado de plaqueta

GM CSF: fator estimulante de colônia de granulócitos e macrófagos

°C: grau Celsius

µm: micrômetro

g: gravidade

µl: microlitro

RESUMO

RESUMO

As biocerâmicas têm sido amplamente usadas na Odontologia para preenchimentos de defeitos ósseos. Com o objetivo de avaliar a viabilidade celular foi realizado um estudo *in vitro* onde foram utilizadas três tipos de biocerâmicas. O efeito citotóxico dos materiais foi avaliado de duas formas diferentes: células mononucleares do sangue periférico de adultos sadios plaqueadas por 24 horas em contato direto com hidroxiapatita sintética (HA), beta tricálcio fosfato sintético (BTCP) e uma associação de ambos os materiais composta por 60% hidroxiapatita sintética e 40% beta tricálcio fosfato sintético (HABTCP) e por diluição seriada. Após 24 horas, as placas passaram por teste de viabilidade celular por MTT-Formazan, com leitura a 570 nm. Para análise estatística, foi aplicado teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para análises múltiplas ($\alpha=0,05$). Em 24 horas, não foram detectadas diferenças significativas nos níveis de absorbância das células mononucleares cultivadas em contato com os três materiais em análise ($p>0.05$). Nos testes de diluição também não foram encontradas diferenças significativas quando os materiais foram comparados uns com os outros ou mesmo entre si nas diferentes diluições. Nenhum dos materiais mostrou-se significativamente diferente do controle positivo. Conclui-se que os biomateriais avaliados não interferiram na viabilidade celular.

PALAVRAS-CHAVE: biocerâmicas; células mononucleares; viabilidade celular.

ABSTRACT

ABSTRACT

The bioceramics has been widely used in Dentistry for fillings of bone defects. With the objective to evaluate the cell viability was performed an in vitro study where we used three types of bioceramics. The cytotoxic effect of the materials was evaluated in two different ways: peripheral blood mononuclear cells of healthy adults tagged for 24 hours in direct contact with synthetic hydroxyapatite (HA), beta tricalcium phosphate synthetic (BTCP), an association of both materials composed of 60% synthetic hydroxyapatite and 40% beta tricalcium phosphate synthetic (HABTCP) and by serial dilution. After 24 hours, the plates were test cell viability by MTT-Formazan Product, with reading at 570 nm. For statistical analysis, non-parametric test was applied Kruskal-wallis Test for multiple analyzes ($\alpha=0.05$). In 24 hours, no significant differences were found in the levels of absorbance of the mononuclear cells grown in contact with the three materials in analysis ($p>0.05$). In the tests of dilution also no significant differences were found when the materials were compared with each other or even among themselves in various dilutions. None of the materials was significantly different from the positive control. It appears that the biomaterials evaluated did not interfere with the cellular viability.

KEY WORDS: Bioceramics; mononuclear cells; cell viability.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Microscopicamente, o osso é um tipo de tecido conjuntivo altamente especializado. É um tecido mineralizado, que é composto por uma matriz orgânica reforçada por depósitos de cristais de fosfato de cálcio. A matriz orgânica é composta por fibras de colágeno tipo I (aproximadamente 95%), e de proteoglicanos e numerosas proteínas não colagenosas (5%). Esta matriz orgânica, calcificada pelos minerais de fosfato de cálcio, incorpora as células ósseas, que participam na manutenção e organização do osso, nomeadamente células osteoprogenitoras, osteoblastos, osteócitos e osteoclastos (Barrère F *et al.*, 2006).

Ao longo da vida há uma remodelação fisiológica e reposição óssea, que ocorrem mais ou menos no mesmo local, sem afetar a forma ou a densidade do osso, por meio de uma seqüência de eventos que incluem ativação dos osteoclastos, a reabsorção do osso, a ativação de osteoblastos, e formação de novo osso no local da reabsorção (Buckwalter *et al.*, 1996). Devido a essas propriedades remodelação, defeitos e fraturas são facilmente reparados até tamanhos chamados de defeitos críticos, definido como defeitos de um tamanho que não cicatrizam durante a vida do animal (Schmitz e Hollinger, 1986). Para defeitos maiores, intervenções humanas são necessárias a fim de ajudar ou estimular a cura.

Um dos problemas que mais desafiam as áreas médica e odontológica é a pesquisa de material para substituição óssea, sendo utilizados diversos materiais biológicos e sintéticos no tratamento de deformidades, em diferentes tipos de defeitos ósseos e em lesões osteopáticas. O ideal é que o material induza a osteogênese, seja biocompatível, atóxico, não-carcinogênico, de fácil obtenção no mercado e de baixo custo (Eleftheriadis E *et al.*, 2010).

Os enxertos ósseos se dividem em quatro categorias principais: autógenos, homógenos (alógenos), xenógenos e aloplásticos (sintéticos), sendo que o osso autógeno é considerado o “padrão ouro” na regeneração óssea, devido ao seu potencial osteogênico, de osteoindução e osteocondução (Rajan *et al.*, 2006). No entanto, o procedimento de coleta requer um segundo sítio cirúrgico, onde complicações são relatadas e a quantidade de osso colhida é limitada. Além disso, os enxertos de osso autógeno são altamente reabsorvidos e freqüentemente degradados antes do reparo ósseo estar completo (Rajan *et*

al., 2006; Zarate-Kalfopulos *et al.*, 2006, Fellaah *et al.*, 2007). Uma importante vantagem da utilização do osso autógeno é a ausência de rejeição pelo sistema imunológico, o que poderia ocorrer com a utilização de aloenxertos. Com estes últimos, há ainda o risco de transmissão de microorganismos (Mankin *et al.*, 2005). Os enxertos autógenos e os homogêneos (obtidos de doadores da mesma espécie do receptor) são os agentes osteoindutores mais usados na Implantodontia e ortopedia (Baptista *et al.*, 2003; Khan *et al.*, 2005). Já os xenoenxertos, em especial o osso bovino, também conhecido como osso mineral natural, são amplamente utilizados, consistindo de um arcabouço ósseo de estrutura tridimensional semelhante à matriz óssea mineralizada (Schwarz *et al.*, 2007).

Na tentativa de se encontrar um substituto ósseo ideal, diversos materiais aloplásticos têm sido pesquisados. Estes devem apresentar as seguintes propriedades físico-químicas: biocompatibilidade, reabsorbilidade, degradação controlada e substituição simultânea por novo osso formado, osteocondução e integridade mecânica a fim de suportar a cicatrização após os procedimentos de regeneração óssea guiada (Schwarz *et al.*, 2007).

Entre a geração de biomateriais criados para regeneração óssea, estão as cerâmicas de fosfato de cálcio: hidroxiapatita (HA), tricálcio fosfato (BTCP) e a mistura dessas duas fases chamada de cálcio bifásico fosfato (HABTCP). As cerâmicas de fosfato de cálcio são reconhecidamente biocompatíveis e possuem propriedades bioativas. Apresentam constituição química inorgânica semelhante à do osso natural, o que as torna substitutos ósseos promissores nos campos ortopédico e maxilofacial (Fellaah *et al.*, 2007). Existem várias marcas comerciais e as diferenças entre elas são devidas a algumas propriedades, tais como a proporção cálcio/fosfato, cristalinidade, temperatura de sinterização e outras características físicas. A hidroxiapatita (HA) $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ e o beta-tricálcio fosfato (BTCP) $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$ são cerâmicas fosfato de cálcio largamente utilizadas. Estes biomateriais são atóxicos, apresentam ótima atividade osteocondutiva e não desencadeiam respostas imuno-inflamatórias prejudiciais. Eles se diferem não apenas na composição, mas também na taxa de degradação (Manjubala *et al.*, 2002; Daculsi *et al.*, 2003). Os materiais à base de hidroxiapatita porosa e não porosa são pouco ou não reabsorvíveis, ao contrário do BTCP que é mais solúvel, sendo biodegradado ou bioreabsorvido mais prontamente,

embora de maneira imprevisível, podendo assim não oferecer um arcabouço adequado para o crescimento ósseo (Wang *et al.*, 2005). O conceito da BCP é baseado no ótimo equilíbrio entre a fase mais estável (HA) e a mais solúvel (BTCP). As cerâmicas BCP são gradualmente dissolvidas *in vivo*, contribuindo para a nova formação óssea, à medida que liberam íons cálcio e fosfato no microambiente (Legeros *et al.*, 2003; Daculsi *et al.*, 2003; Yuan *et al.*, 2006).

Para entender o mecanismo de ligação osso-biomaterial, os fenômenos atômicos e moleculares que ocorrem na superfície do material e seus efeitos nas vias de reação das células e tecidos deve ser esclarecidos. Um progresso considerável foi feito na compreensão dos mecanismos básicos na ligação da formação de osso / materiais bioativos e os efeitos desses materiais na formação óssea. Estes avanços resultaram, a partir de duas abordagens: uma focada em estudar a interface osso-biomaterial que foram desenvolvidas *in vivo* e a outra abordagem utilizada *in vitro* com imersões em fluidos fisiológicos simulados. Essas análises revelaram que as reações ocorreram nas superfícies de implantes de material, tais como dissolução, precipitação e troca iônica de compostos inorgânicos constituintes, seguido normalmente por adsorção e incorporação de proteínas e moléculas biológicas. Isso foi relatado pela presença de biomaterial em contato com tecidos *in vivo* que poderia levar à formação de um tecido interfacial o qual contém macrófagos e células gigantes. Nesses casos, os macrófagos foram mostrados para representar 60-80% da população celular local. Além disso, macrófagos tem sido considerado como uma das células-chave responsáveis por muitos dos eventos associados com osteólise (Silva SN *et al.*, 2003).

Entretanto, existem poucos estudos *in vitro* em relação a adesão e proliferação celular e diferenciação osteogênica com as biocerâmicas. A adesão celular é necessária para a proliferação de osteoblastos e seus precursores, experimentos *in vitro* para avaliar as biocerâmicas devem ser feitos antes dos estudos *in vivo* (Bernhardt A *et al.*, 2011).

REVISÃO DE LITERATURA

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Reparação óssea

O osso é um tecido dinâmico que muda ao longo da vida. Assim como outros tecidos conjuntivos do corpo, o osso é composto por células incorporadas em uma abundante matriz extracelular. No entanto, diferentemente da maioria dos outros tecidos conjuntivos a matriz extracelular é mineralizada para conceder sua função fisiológica. Como o principal elemento estrutural do esqueleto ósseo, fornece não só o apoio locomotor e proteção, mas também um dinâmico reservatório mineral e de proteína (Davies JE, 2007).

Remodelação óssea é alcançada através da reabsorção dos osteoclastos e da atividade de osteoblastos. O tecido ósseo é capaz de reparar fraturas ou defeitos locais por meio do processo de regeneração, com a formação de novo tecido com a mesma organização estrutural do tecido anterior, sem a formação de cicatriz, por meio de um controle endócrino, o qual possui um papel vital no equilíbrio de cálcio e fosfato nos fluidos corporais (Davies JE, 2007).

Após uma lesão óssea; seja por injúria, fratura ou procedimento cirúrgico; uma seqüência de eventos dinâmicos ocorre com o objetivo de restaurar a forma e a função do osso. Sendo um processo ativado pela liberação de fatores de crescimento e citocinas no local (Davies JE, 2003). Monócitos estão envolvidos em todo o processo de regeneração óssea. Eles podem permanecer no local da lesão por dias ou anos, constantemente secretando fatores de crescimento necessários para a regeneração. A partir das primeiras horas após a colocação do enxerto ósseo, o ambiente hipóxico faz com que os monócitos migrem para o sítio como o objetivo de matar as bactérias, remover detritos, ativar o sistema imunológico para amplificar seus efeitos, secretar fatores de crescimento como PDGF e GM-CSF para induzir a formação de vasos sanguíneos, e causar a liberação de células-tronco da medula óssea que vêm ao sítio para regenerar osso. No osso, os monócitos podem fundir-se para formar os osteoclastos que reabsorvem detritos e remodelam o osso (Soltan M *et al.*, 2012).

Os monócitos circulantes ao entrarem no tecidos transformam-se em macrófagos, os quais são células que produzem uma miríade de moléculas entre elas, citocinas e quimiocinas que podem atuar no recrutamento de células osteoprogenitoras induzindo a neoformação óssea, ou induzir a reabsorção óssea e as citocinas produzidas pelos macrófagos podem ter efeitos sobre

diferentes tipos celulares ou vários efeitos diferentes sobre o mesmo tipo celular, podendo inclusive produzir efeitos antagônicos simultaneamente (Yamada M *et al.*, 2000 e Davies JE, 2003).

2.2 Biocerâmicas

Albee, em 1920, reportou o primeiro sucesso na aplicação do fosfato de cálcio (descrito como fosfato de cálcio triplo) para reparo de defeito ósseo em humano. Após 50 anos, o uso clínico do “fosfato tricálcio” em defeitos periodontais de animais foi citado por Nery *et al.* e o uso da hidroxiapatita (HA) na raiz dental foi reportado Dennnissen. Já no início da década de 80, a HA sintética e o BTCP, tornaram-se comercialmente favoráveis como substitutos ósseos (Jarcho *et al.* 1981). O termo fosfato de cálcio bifásico foi utilizado pela primeira vez por Nery *et al.* em 1986 descrevendo ser uma mistura de HA com BTCP.

O BCTP é um fosfato tricálcio puro na fase beta, obtido a partir da manipulação do fosfato tricálcio em baixa temperatura, proporcionando maior estabilidade quando presente em meio aquoso. Esse material possui as propriedades de radiopacidade, osteocondução e absorção progressiva a medida que o novo osso é formado (Horch HH *et al.*, 2006).

A HA forma o componente principal do osso natural. A HA sintética pode ser em forma de cerâmica ou não como composto em blocos ou grânulos. Cerâmica refere-se ao fato de que os cristais de HA foram aquecidos entre 700 e 1300 °C para formar um grande estrutura cristalina (Moore *et al.*, 2001). Preparações de cerâmica de HA são resistentes à reabsorção *in vivo*, que ocorre em uma taxa de 1-2% por ano (Constantino PD *et al.*, 1994).

O HABTCP em diferentes proporções de HA e BTCP foi desenvolvido para tentar controlar a reabsorção do material e manter a propriedade de osteocondução (Manjubala *et al.*, 2002).

Fosfato de tricálcio (TCP) é disponível em forma de pó ou blocos, com resistência semelhante ao osso esponjoso. Tem diversas apresentações e suas propriedades osteointegradoras estão diretamente relacionadas com o tamanho e porosidade de suas partículas, bem como sua resistência mecânica. Existem muitas variedades de composição do TCP, como seus formatos α e β . Tem

biocompatibilidade aceita e nenhum relatório de toxicidade (Eleftheriadis *et al.*, 2010).

Os materiais à base de hidroxiapatita porosa e não porosa são pouco ou não reabsorvíveis, enquanto que a BTCP é mais solúvel, biodegradado ou bioreabsorvido, podendo assim não oferecer um arcabouço adequado para o crescimento ósseo. Com o intuito de se obter um melhor arcabouço para o ganho de volume ósseo e conseqüentemente, um melhor desempenho do que a HA e o BTCP isolados, as cerâmicas de fosfato de cálcio bifásico (HABTCP), que consistem de uma mistura de HA e BTCP foram desenvolvidas, que apresenta uma fase mais estável (HA) e mais solúvel (BTCP). As cerâmicas BTCP são lentamente dissolvidas *in vivo*, contribuindo para uma nova formação óssea, enquanto liberam íons cálcio e fosfato (Manjubala *et al.*, 2002; Daculsi *et al.*, 2003; Yuan *et al.*, 2006).

Os efeitos do preenchimento dos alvéolos dentais com BTCP contendo grânulos de 800 a 1200 µm, HA particulada e HA de micropartículas de 10 a 50 µm, por um período de 1, 2, 3 e 6 semanas foram comparados por Rosa *et al.*, em 1995. Os três materiais retardaram o reparo alveolar, quando comparados aos controles, uma vez que houve menor formação óssea durante todos os períodos analisados. BTCP e HA de micropartículas demonstraram maior volume de osso neoformado do que a HA particulada na terceira e sexta semanas.

Em um estudo realizado por Boeck *et al.*, em 1999, foram sacrificados aos 4, 7, 15, 24 e 60 dias após a exodontia e preenchimento dos alvéolos com HA. As análises histológicas mostraram que o atraso na cicatrização ocorreu quando os alvéolos foram preenchidos com hidroxiapatita. O material se mostrou compatível, foi parcialmente reabsorvido, embora aos 60 dias ainda houvesse presença de pequenas partículas de HA isoladas do tecido ósseo.

Um substituto ósseo injetável (IBS) de fosfato de cálcio bifásico (60% de HA e 40% de BTCP, com grânulos de 80 a 200 µm) foi desenvolvido por Daculsi *et al.*, em 1999, o qual implantaram em sítios ósseos e não ósseos, por um período de 1 a 78 semanas, em várias espécies animais (coelhos, ratos, porcos, cães e ovelhas). Observaram que nos sítios ósseos, após 1 e 20 semanas de implantação, uma diminuição na área de superfície do biomaterial foi observada, em conjunto com a organização de uma matriz de osso imaturo ao redor das

partículas maiores. Em coelhos, após 12 semanas de implantação, a área de superfície total ocupada por novo osso formado e pelos grânulos de HABTCP residuais foi de 79%. A mesma cinética de reabsorção e formação óssea foi observada nos outros experimentos animais. Nos sítios de implantação não ósseos (subcutâneos e intramusculares), os resultados mostraram ausência de reação de corpo estranho e de formação óssea ectópica. Concluíram que a eficiência do HABTCP estaria relacionada à sua capacidade de dissolução parcial, à longa estabilidade da HA e à bioatividade aumentada pelo BTCP, que é solúvel.

O processo de regeneração óssea em alvéolos dentais de cães Beagle, onde foram usados dois materiais de enxerto: BTCP e uma combinação do mesmo com plasma rico em plaquetas (PRP) foi investigado por Suba *et al.*, em 2004. O período de observação foi de 6, 12 e 24 semanas. Verificaram que os resultados histomorfométricos mostraram regeneração óssea mais intensa na fase inicial de cicatrização no grupo com aplicação tópica de PRP, o qual ainda apresentava alguma vantagem em termos de regeneração óssea sobre o controle, em 12 semanas. Após 24 semanas, não houve diferenças significantes entre os grupos.

O efeito de uma cerâmica HABTCP sobre a resposta óssea, em defeitos produzidos na calvária de ratos, por períodos de três e seis meses foi examinado por Develioglu *et al.*, em 2006. O material usado foi o Ceraform®, uma cerâmica composta por 65% de HA e 35% de TCP, cuja granulação varia de 900 a 1200 µm e o diâmetro dos poros de 100 a 300 µm. A análise histológica revelou presença de tecido conjuntivo fibroso e células gigantes semelhantes a osteoclastos envolvendo as partículas do biomaterial. Em relação à regeneração óssea, não houve diferença significativa entre defeitos preenchidos por coágulo sanguíneo e pelo biomaterial em nenhum período de observação. Apesar da biocompatibilidade, os resultados não mostraram atividade osteocondutiva para o material testado e a velocidade de reabsorção das partículas foi muito lenta.

Em uma outra investigação realizada por Jensen *et al.*, em 2007, em mandíbulas de mini-porcos foi avaliado histológica e histomorfometricamente, num período de 2, 4, 8 e 24 semanas, os efeitos de uma cerâmica HABTCP com 60% de HA e 40% de BTCP, comparando-a ao osso autógeno, à HA e ao BTCP

puros. Os defeitos criados foram cobertos por membranas de politetrafluoretileno expandido, ePTFE. Verificaram que todos os defeitos cicatrizaram com quantidades iguais de osso lamelar, mas a taxa de formação óssea foi desacelerada nas fases iniciais da cicatrização nos defeitos enxertados com as cerâmicas de fosfato de cálcio, quando comparados ao osso autógeno. A taxa de nova formação óssea foi diretamente proporcional ao conteúdo de TCP nos três materiais. Portanto, concluíram que HA e HA/BTCP mostraram padrões de reabsorção similares, enquanto o BTCP demonstrou degradação e substituição mais rápidas por osso neoformado.

Com o objetivo de avaliar o potencial osteocondutivo de alguns biomateriais, Fariña *et al.*, em 2008, implantaram duas cerâmicas HABTCP, com proporções de HA/BTCP variadas (HABTCP1: 85% HA e 15% BTCP e HABTCP2: 15% HA e 85% BTCP), em leitos criados em mandíbulas de cães Beagle, 3 meses após exodontia dos pré-molares. Os animais foram sacrificados após 4, 12 e 26 semanas e as análises histomorfométricas mostraram que mais osso foi formado em um período menor no HABTCP2, sugerindo-se que este material possuiu maior potencial osteocondutivo. Concluíram que a variação dos componentes da cerâmica HABTCP pode melhorar o potencial osteocondutivo do material.

Hiriota *et al.*, em 2009, sugeriram que BTCP foi o melhor arcabouço para regeneração óssea e sua absorção precoce foi reduzida quando usado em combinação com um material osteogênico.

Nos estudos de Blaguer *et al.*, em 2010, foi demonstrado que o coágulo associado com micropartículas de HABTCP seria um biomaterial moldável e osteoindutor que poderia ser utilizado para preenchimento de defeitos ósseos na cirurgia ortopédica e odontológica.

PROPOSIÇÃO

3. PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi analisar a viabilidade celular dos mononucleares humanos em contato com as biocerâmicas *in vitro*.

MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Biocerâmicas

Nesse estudo foram utilizadas três tipos de biocerâmicas com padrão similar de granulação, 350-500 μm , produzidas e comercializadas pela empresa

IFGL Bio Ceramics LTD (Kolkata, India). Foram avaliadas hidroxiapatita sintética - BioGraft® HA - (HA), beta tricálcio fosfato sintético - BioGraft® TCP - (BTCP), e uma associação de ambos os materiais composta por 60% hidroxiapatita sintética e 40% beta tricálcio fosfato sintético - BioGraft® HT - (HABTCP).

O efeito citotóxico dos materiais foi avaliado de duas formas diferentes: contato direto entre células e o material, e por diluição seriada. Para análise por diluição, poços de poliestireno com diâmetro de 12 mm, correspondente à placa de 24 poços, foram preenchidos com os três biomateriais. Buscando padronizar a quantidade depositada em cada poço, o material foi previamente pesado, com peso médio variando em função do tipo de material, 0.03123g de HA; 0.0371g de BTCP e 0.06123g de HABTCP. Em seguida foi depositado 1 ml do meio a 10% - 10 ml de soro fetal bovino inativado (Gibco, Grand Island, NY, USA), 90ml de Dubelcos Modificado (DMEM, 4500g glucose/l, sodium bicarbonate, pyridoxine hydrochloride; Sigma, USA) e 1 ml de penicilina (10.000 µg/ml, Hy Clone Laboratories, South Longan, Utah). As amostras foram transferidas para incubadora de CO₂ humidificada e deixadas na estufa a 37°C por 24h. O sobrenadante proveniente da incubação por 24 horas foi utilizados para tratamento das células, sendo preconizadas diluições deste sobrenadante de 1 (100 µl de sobrenadante de 24h), 1:1(50 µl de sobrenadante e 50 µl meio), 1:5 (20 µl de sobrenadante e 80 µl meio) e 1:10 (10 µl de sobrenadante e 90 µl meio).

Para análise por contato, estabeleceu-se o peso médio de 0.00583g (HA); 0.005573g (BTCP); 0.0049g (HABTCP) como o necessário para recobrimento do fundo do poço em placa de 96 poços. O material foi depositado sob condições estéreis, tampado e armazenado em luz ultravioleta até o plaqueamento celular. Esta placa foi utilizada para colocar células mononucleares em contato direto com as bicerâmicas. Aproveitando para fazer controle positivo (controle +), colocando apenas o meio descrito acima; e o controle negativo (controle -), utilizando-se fenol a 2%.

Cultura primária de células mononucleares obtidas de sangue periférico

Foram utilizadas células mononucleares obtidas a partir de sangue periférico, de quatro mulheres adultas e saudáveis, mediante termo de

consentimento previamente assinado e autorização do comitê de ética em pesquisa envolvendo seres humanos da Universidade Federal de Uberlândia (protocolo- 124/11).

Foram colhidos 30ml de sangue periférico de cada indivíduo , em tubos heparinizados (10 a 15 u/ml). Para obtenção das células mononucleares o sangue foi distribuído em tubos contendo Histopaque 1077 na densidade 1.0767 (Sigma Chemical Co, USA) e centrifugado a 200 g por 30 minutos à temperatura ambiente. Após a centrifugação, a nuvem celular contendo os mononucleares foi coletada e centrifugada a 1000g por 10 minutos a 4°C. Em seguida o sobrenadante foi descartado, e o sedimento celular ressuspendido em 3 ml de DMEM (Gibco-Life Technologies, GrandIsland, NY), e a viabilidade celular determinada por contagem em câmara hemocitométrica. A suspensão celular foi distribuída sobre os materiais (teste de contato) ou diretamente nos poços de cultura (teste de diluição). Em cada poço foi depositado 5×10^5 células/poço, com volume de 100 microlitros por poço e incubadas em estufa umidificada a 37°C, contendo ar a 5% de CO₂, por 24 horas. Decorrido este período, os sobrenadantes foram colhidos e armazenados a -70°C até utilização. O meio foi substituído e acrescido de MTT para realização dos ensaios de viabilidade.

Determinação da viabilidade celular

Depois de completado o período de 24h, foi realizado o ensaio de viabilidade utilizando o método colorimétrico MTT Formazan (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma, USA). De cada poço, foram removidos 100 µl de meio, adicionados 450 µl de meio novo e 50µl de substrato MTT na concentração de 5mg/ml. Em seguida as placas foram transferidas para a estufa de CO₂ onde permaneceram incubadas a 37°C por 4 horas tomando-se o cuidado de protegê-las da luminosidade. Após este período foi feita a dissolução dos cristais utilizando 100 µl de SDS (Dimetil Sulfóxido, Labsynth produtos para laboratório Ltda, Diadema, SP). As placas foram lidas em 570 nm (Asys UVM 340, Biochrom Ltd, Cambrige, UK).

Análise Estatística

Para análise estatística, foi aplicado teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para análises múltiplas ($\alpha = 0,05$).

RESULTADOS

5. RESULTADOS

A influência das biocerâmicas na viabilidade celular foi avaliada usando um ensaio colorimétrico baseado na atividade mitocondrial – MTT, e expressa como níveis de absorvância. Em 24 horas, não foram detectadas diferenças significativas nos níveis de absorvância das células mononucleares cultivadas em contato com os três materiais em análise ($p > 0,05$ – Fig. 1). Nos testes de diluição também não foram encontradas diferenças significativas quando os

materiais foram comparados uns com os outros (Fig. 2) ou mesmo entre si nas diferentes diluições (Tabela1). Nenhum dos materiais mostrou-se significativamente diferente do controle positivo.

Tabela 1 - Resultado estatístico dos materiais e diferentes diluições

| Biomateriais | | Valor de p |
|--------------|------------------------|------------|
| HA | | 0.7157 |
| BTCP | | 0.4769 |
| HABTCP | | 0.4720 |
| Diluições | Biocerâmicas puras (1) | 0.5109 |
| | 1:1 | 0.8401 |
| | 1:5 | 0.4044 |
| | 1:10 | 0.9086 |

Fig. 1- Níveis de absorbância das células mononucleares cultivadas nas diferentes biocerâmicas em 24 horas

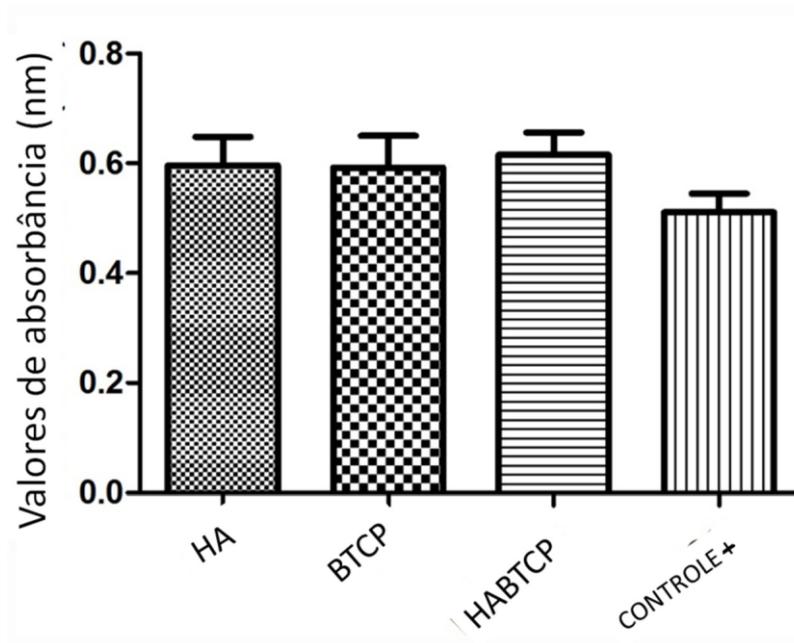
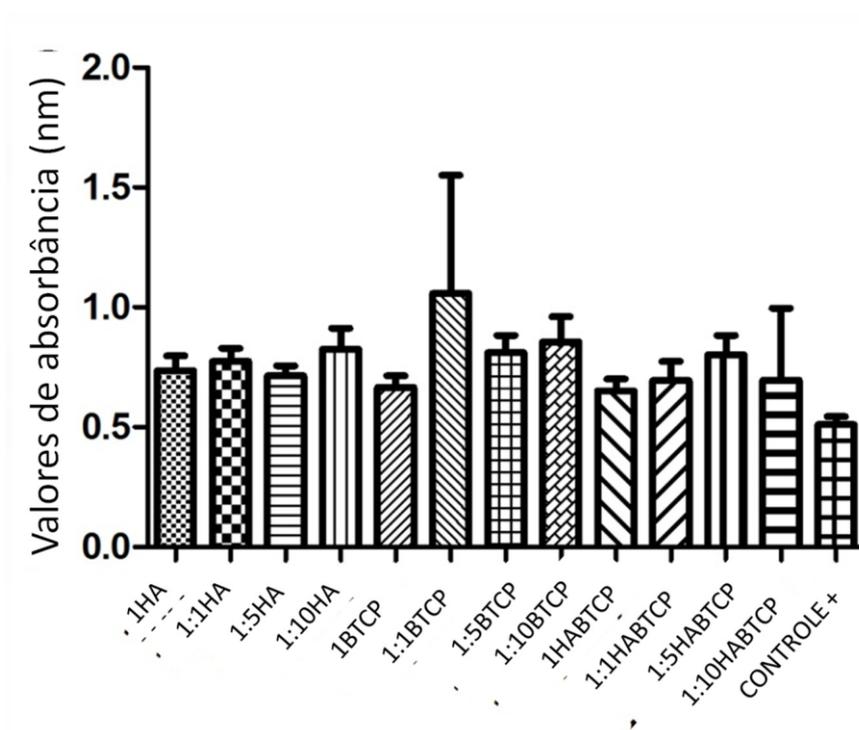


Fig. 2- Níveis de absorbância das células mononucleares cultivadas nas diferentes diluições das biocerâmicas em 24 horas



DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Células mononucleares de sangue periférico humano são imunocompetentes, ficam em estreito contato com o enxerto ósseo *in situ*, mediando reações imune local e sistêmica. São uma mistura de linfócitos B e T, células natural killer e monócitos. Muitas culturas de células que não são expostas aos implantes ósseos *in situ* ou não são de origem humana são utilizadas para testar biomateriais como enxerto ósseo (Johnson *et al.*, 1983; 1985). Além do apoio ético, sistemas *in vitro* são sensíveis e capazes de discriminar um material de outro em termos de seu potencial para causar danos às células e às suas funções (Pizzoferrato *et al.*, 1994).

Biocompatibilidade é o tema central para aplicações de biomateriais em seres humanos. Este termo significa não somente ausência de um efeito citotóxico, mas também efeitos positivos no sentido de promoção da diversidade biológica ou biofuncionalidade (Kirkpatrick CJ *et al.*, 1998), podendo comprometer o resultado do procedimento cirúrgico, o processo de cicatrização e a incorporação do osso substituindo o biomaterial.

No presente estudo *in vitro*, foi analisada a interação de células mononucleares do sangue periférico humano, principalmente monócitos/macrófagos, com três tipos de biocerâmicas. Estudos relacionando HA, BTCP e HABTCP com a viabilidade celular têm sido pouco explorado justificando assim o atual estudo.

Foram desenvolvidos alguns trabalhos para analisar relação dos macrófagos com as biocerâmicas. Entre eles, foi mostrado que o HABTCP quando em contato com macrófagos humanos *in vitro*, esses apresentam uma maior concentração de cálcio intracelular quando comparados com células que não se ligaram ao biomaterial. As que se ligaram, liberam fosfato de cálcio no meio criando uma zona de transição que permite a adesão de mais macrófagos (Silva *et al.*, 2003).

Em um trabalho *in vitro* foi estudado a viabilidade e resposta proliferativa de células mononucleares de doadores saudáveis na presença de três biomateriais, sendo dois aloplásticos (derivados de hidroxiapatita e fosfato de cálcio) e um xenógeno (bovino) por meio de teste imunológico. Mostrando que não induzem a proliferação de leucócitos humanos (Wanschitz *et al.*, 2005).

Foi investigado os efeitos da HA e BTCP em células monucleares de sangue periférico humano *in vitro*. A produção de citocinas pró-inflamatórias e

citocinas ligados ao osteoclasto e a diferenciação celular dendrítica foi determinada por ELISA. Depois de 6 e 18 h de incubação HA e BTCP causou uma indução muito semelhante de citocinas pró-inflamatórias. Em forte contraste com HA, BTCP causou menos indução de promover células dendríticas e da osteoclastogênese, posteriormente menor indução de inflamação e reabsorção óssea. Concluindo que a aplicação de cerâmica como biomateriais pode ser usada como substitutos ósseos, estando de acordo com os estudos de Lange *et al.* (2009). O mesmo autor e colaboradores, em 2011, verificou o potencial efeito citotóxico de diferentes tamanhos de partículas de BTCP (1, 3, 13, 32 e 40 µm) em contato com células mononucleares humanas. Sugerindo que partículas menores causaram menor efeito citotóxico.

Nosso estudo também está de acordo com aqueles feito *in vivo*. O efeito de uma cerâmica BCP sobre a resposta óssea, em defeitos produzidos na calvária de ratos, por períodos de três e seis meses foi examinado por Develioglu *et al.*, em 2006. Mostrando ser um material biocompatível. Zerbo *et al.* (2001) demonstraram que o uso de grânulos de fosfato tricálcio permitiu a formação de novo tecido ósseo em defeitos alveolares. Sugerindo que o fosfato tricálcio tenha tido ação osteoindutora, isto é, guiando células osteogênicas a partir do tecido ósso pré existente.

De acordo com a neoformação óssea, percebe-se que o BTCP é reabsorvível, mas sua reabsorção é reduzida quando associado com material osteogênico (Hirota *et al.*, 2009). Os materiais à base de hidroxiapatita porosa e não porosa são pouco ou não reabsorvíveis, ao contrário do BTCP que é mais solúvel, sendo biodegradado ou bioreabsorvido mais prontamente, embora de maneira imprevisível, podendo assim não oferecer um arcabouço adequado para o crescimento ósseo (Wang *et al.*, 2005). Nos estudos de Blaguer *et al.*, em 2010, foi demonstrado que o coágulo associado com micropartículas de HABTCP seria um biomaterial moldável e osteoindutor que poderia ser utilizado para preenchimento de defeitos ósseos na cirurgia ortopédica e odontológica.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos no presente estudo, pôde-se concluir que:

- Os biomateriais avaliados não interferiram na viabilidade celular em um período de 24h.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

1. Albee FH. Ann Surg. 1920; 71:32.
<https://doi.org/10.1097/00000658-192001000-00006>
2. Balaguer T, Boukhecha F, Clavé A, Bouvet-Gerbettaz S, Trojani C, Michiels JF, Laugier JP, Bouler JM, Carle GF, Scimeca JC, Rochet N. Biphasic calcium phosphate microparticles for bone formation: benefits of combination with blood clot. Tissue Engineering: Part A. 2010; 16(11): 3495-3505.
<https://doi.org/10.1089/ten.tea.2010.0227>
3. Baptista AD, Sornilha, A, Tormes TAM, Abdoune YA, Croci AT, Camargo, OP, Oliveira, CRGCM. Estudo histológico dos enxertos ósseos homólogos humanos. Acta Ortop Bras. 2003; 11(4):220-24.
<https://doi.org/10.1590/S1413-78522003000400004>
4. Barrère F, Blitterswijk CA, Groot K. Bone regeneration: molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics. International Journal of Nanomedicine 2006;1(3) 317–332.
5. Bernhardt A, Lade A, Peters F, Gelinsky M. Comparative evaluation of different calcium phosphate-based bone graft granules – an *in vitro* study with osteoblast-like cells. Clin Oral Imp Res. 2011; 00: 1-9.
6. Boeck EM, Pansani CA, Okamoto T, Goissis G, Boeck Neto RJ, Marcantonio Júnior E. Implante de hidroxiapatita em alvéolos dentais. Estudo histopatológico em ratos. Rev Odontol UNESP 1999;28(1):83-96.
7. Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, et al. 1996. Bone biology. II: Formation, form, modeling, remodeling, and regulation of cell function. Instr Course Lect, 45:387–99.
8. Constantino PD, Freidman CD. Synthetic bone graft substitutes. Otolaryngol. Clin. North Am. 1994; 27: 1037–73.
9. Daculsi G, Weiss P, Bouler JM, Gauthier O, Millot F, Aguado E. Biphasic calcium phosphate/hydrosoluble polymer composites: a new concept for bone and dental substitution biomaterials. Bone 1999; 25(2 Suppl):59S-61S.
[https://doi.org/10.1016/S8756-3282\(99\)00135-0](https://doi.org/10.1016/S8756-3282(99)00135-0)
10. Daculsi G. Current state of the art of biphasic calcium phosphate bioceramics. J Mat Science: Mat in Medicine. 2003 mar.; 14(3):195-200.
<https://doi.org/10.1023/A:1022842404495>
11. Davies JE. Bone bonding at natural and biomaterial surfaces. Biomaterials. 2007; 28: 5058–5067.
12. Davies JE. Understanding peri-implant endosseous healing. J Dent Educ

2003; 67(8): 932-49.

13. Develioglu H, Saraydin SU, Bolayir G, Dupoirieux L. Assessment of the effect of a biphasic ceramic on bone response in a rat calvarial defect model. *J Biomed Mater Res A*. 2006; 77(3): 627-31.

<https://doi.org/10.1002/jbm.a.30692>

14. Eleftheriadis E, Leventis MD, Tosios KI, Faratzis G, Titsinidis S, Eleftheriadi I, Dontas I. Osteogenic activity of β -tricalcium phosphate in hydroxyl sulphate matrix and demineralized bone matrix: a histological study in rabbit mandible. *Journal of Oral Science*. 2010; 52(3): 377-384.

<https://doi.org/10.2334/josnusd.52.377>

15. Ellinger RF, Nery EB, Lynch KL. *J Periodont Restor Dent*. 1986; 3: 223.

16. Fariña NM, Guzón FM, Peña ML, Cantalapiedra AG. In vivo behaviour of two different biphasic ceramic implanted in mandibular bone of dogs. *J Mater Sci Mater Med*. 2008;19(4):1565-73.

<https://doi.org/10.1007/s10856-008-3400-y>

17. Fellah BH, Josselin N. Inflammatory reaction in rats muscle after implantation of biphasic calcium phosphate micro particles. *J Mat Science: Materials in Medicine*. 2007 Feb.; 18 (2): 287-94.

<https://doi.org/10.1007/s10856-006-0691-8>

18. Hirota M, Matsui Y, Mizuki N, Kishi T, Watanuki K, Ozawa T, Fukui T, Shoji S, Adachi M, Monden Y, Iwpai T, Tohnai I. Combination with allogenic bone reduces early absorption of β -tricalcium phosphate (β -TCP) and enhances the role as a bone regeneration scaffold. Experimental animal study in rat mandibular bone defects. *Dent Mater J*. 2009; 28(2): 153–161.

<https://doi.org/10.4012/dmj.28.153>

19. Horch HH, Sader R, Pautke C, Neff A, Deppe H, Kolk A. Synthetic, pure-phase beta-tricalcium phosphate ceramic granules (Cerasorb) for bone regeneration in the reconstructive surgery of the jaws. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2006;35:708-13.

<https://doi.org/10.1016/j.ijom.2006.03.017>

20. Jarcho M. *Clin Orthop*. 1981; 157: 259.

21. Jensen L. *et al*. Evaluation of a novel biphasic calcium phosphate in standardized bone defects. A histology and histomorphometric study in the mandibles of minipigs. *Clinical Oral Implants Research*. 2007; 18(6): 752-60.

- <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2007.01417.x>
22. Johnson HJ, Northup SJ, Seagraves PA, Atallah M, Garvin PJ, Lin L, Darby TD. Biocompatibility test procedures for materials evaluation in vitro. II. Objective methods cytotoxicity assessment. *J Biom Mat Res.* 1985; 19: 89–508.
<https://doi.org/10.1002/jbm.820190503>
23. Johnson HJ, Northup SJ, Seagraves PA, Garvin PJ, Wallin RF. Biocompatibility test procedures for materials evaluation in vitro. I. Comparative test system sensitivity. *J Biomedical Mat Res.* 1983; 17: 571–86.
<https://doi.org/10.1002/jbm.820170403>
24. Khan SN, Cammisa-Jr. FP, Sandhu HS, Diwan AD, Girardi FP, Lane JM. The biology of bone grafting. *J Am Acad Orthop Surgeons.* 2005;13(1): 77-86.
<https://doi.org/10.5435/00124635-200501000-00010>
25. Kirkpatrick CJ, Bittinger F, Wagner M, Kohler H, van Kooten TG, Klein CL, Otto M. Current trends in biocompatibility testing Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers. Part H. *Journal of Engineering in Medicine.* 1998; 212: 75–84.
<https://doi.org/10.1243/0954411981533845>
26. Lange T, Schilling A, Peters F, Mujas J, Wicklein D, Amling M. Size dependent induction of proinflammatory cytokines and cytotoxicity of particulate beta-tricalciumphosphate in vitro. *Biomaterials.* 2011; 32: 4067-4075.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.02.039>
27. Lange T, Schilling AF, Peters F, Haag F. et al. Proinflammatory and osteoclastogenic effects of beta-tricalciumphosphate and hydroxyapatite particles on human mononuclear cells in vitro. *Biomaterials.* 2009, 30: 5312-18.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.06.023>
28. Legeros RZ, Lin S, Rohanizadeh R, Mijares D, Legeros JP. Biphasic calcium phosphate bioceramics: preparation, properties and applications. *J Mater Sci Mater Med* 2003;14(3):201-09.
<https://doi.org/10.1023/A:1022872421333>
29. Manjubala I, Sivakumar M, Sureshkumar RV, Sastry TP. Bioactivity and osseointegration study of calcium phosphate ceramic of different chemical composition. *J Biomed Mater Res.* 2002; 63:200-08.
<https://doi.org/10.1002/jbm.10128>
30. Mankin HJ, Hornicek FJ, Raskin KA. Infection in massive bone allografts. *Clinical orthopaedics and related research.* 2005; 432: 210-216.
<https://doi.org/10.1097/01.blo.0000150371.77314.52>

31. Nery EB, Lynch KL, Hlrthe WM. J Periodontal. 1975; 63: 729.
<https://doi.org/10.1902/jop.1992.63.9.729>
32. Pizzoferrato, A., Ciapetti, G., Stea, S., Cenni, E., Arciola, C.R., Granchi, D. & Savarino, L. Cell culture methods for testing biocompatibility. Clinical Materials. 1994; 15: 173–190.

[https://doi.org/10.1016/0267-6605\(94\)90081-7](https://doi.org/10.1016/0267-6605(94)90081-7)
33. Rajan GP *et al.* Cancellous allograft versus autologous bone grafting for repair of comminuted distal radius fractures: a prospective, randomized trial. The Journal of Trauma. 2006; 60 (6): 1322-1329.

<https://doi.org/10.1097/01.ta.0000195977.18035.40>
34. Rosa AL, Brentegani LG, Grandini SA. Hydroxylapatite and tricalcium phosphate implants in the dental alveolar of rats. A histometric study. Braz dent J 1995;6(2):103-09.
35. Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. Clin Orthop Relat. 1986; Res:299–308.
36. Schwarz F, Herten M, Ferrari D, Wieland M, Engelhardt J, Becker J. Guided bone regeneration at dehiscence-type defects using biphasic hydroxiapatite + beta tricalcium phosphate (Bone Ceramic®) or a collagen-coated natural bone mineral (BioOss Collagen®): an immunohistochemical study in dogs. Int J Oral Maxillofac Surg 2007; 36(12):1198-06.

<https://doi.org/10.1016/j.ijom.2007.07.014>
37. Soltan M, Rohrer MD, Prasad HS. Monocytes: Super Cells for Bone Regeneration. Implant Dentistry. 2012; 21(1): 13-20.

<https://doi.org/10.1097/ID.0b013e31823fcf85>
38. Suba Z, Takács D, Gyulai-Gaál S, Kovács K. Facilitation of β -tricalcium phosphate-induced alveolar bone regeneration by platelet-rich plasma in beagle dogs: a histologic and histomorphometric study. Int J Oral Maxillofac Implants 2004; 19(6); 832-38.
39. Wang HL *et al.* Periodontal Regeneration. J of Periodontol 2005; 76(9):1601-22.

<https://doi.org/10.1902/jop.2005.76.9.1601>
40. Wanschitz F, Nell A, Patruta S, Wagner A, Ewers R. Influence of three currently used bone replacing materials on the in vitro proliferation of human peripheral blood mononuclear cells. Clin. Oral Impl. Res. 2005; 16: 570-4.

<https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2005.01150.x>
41. Yamada M, Suzu S, Tanakadouzono M, Wakimoto N, Hatake K,

Hayasawa H, Motoyoshi K. Effect of cytokines on the proliferation/differentiation of stromal initiating cells. *J Cellular Physiology*. 2000 Sept.; 184: 351-5.

[https://doi.org/10.1002/1097-4652\(200009\)184:3<351::AID-JCP9>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/1097-4652(200009)184:3<351::AID-JCP9>3.0.CO;2-V)

42. Yoneda M, Terai H, Imai Y, Okada T, Nozaki K, Inoue H, Miyamoto S, Silva SN, Pereira MM, Goes AM, Leite MF. Effect of biphasic calcium phosphate on human macrophage functions in vitro. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2003; 65A (4): 475-81.

<https://doi.org/10.1002/jbm.a.10544>

43. Yuan H, Van Blitterswijk CA, De Groot K, De Bruijn J. Cross-species comparison of ectopic bone formation in biphasic calcium phosphate (BCP) and hydroxyapatite (HA) scaffolds. *Tissue Eng* 2006;12(6):1607-15.

<https://doi.org/10.1089/ten.2006.12.1607>

44. Zarate-kalfopulos B, Reyes-sanches A. Bone grafts in orthopedic surgery. *Cirurgia y Cirujanos*. 2006; 74 (3): 217-222.

45. Zerbo IR, Bronckers AL, De Lange GL, Vanbuk GJ, Burger EH. Histology of human alveolar bone regeneration with porous tricalcium phosphate. A report of two cases. *Clin Oral Implant Res*. 2001; 12(4). 379-384.

<https://doi.org/10.1034/j.1600-0501.2001.012004379.x>

ANEXO 1



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP
Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 – Bloco A – Sala 234 - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG –
CEP 35400-069 - FONE/FAX (34) 3239-4131; e-mail: cep@propp.ufu.br; www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº. 421/11 DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEP/UFU
124/11

Projeto Pesquisa: "Análise in vitro e in vivo de diferentes biocerâmicas utilizadas para preenchimento de defeitos ósseos".

Pesquisador Responsável: Darceony Zanetta Barbosa

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, o CEP manifesta-se pela aprovação do protocolo de pesquisa proposto.
O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas da pesquisa com seres humanos, nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

O CEP/UFU lembra que:

- a- segundo a Resolução 196/96, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito da pesquisa.
- b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.
- c- a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFU dá-se em decorrência do atendimento a Resolução 196/96/CNS, não implicando na qualidade científica do mesmo.

Entrega do Relatório Parcial: *julho de 2012*

Entrega do Relatório Final: *julho de 2013*.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO APROVADO

OBS.: O CEP/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEP PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 01 de julho de 2011.

Prof. Dra. Sandra Terezinha de Farias Furtado
Coordenadora do CEP/UFU

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

O48c
2012 Oliveira, Vivian Della Torres, 1985
Cerâmicas de fosfato de cálcio em contato com células mononucleares humanas – estudo in vitro / Vivian Della Torres Oliveira. - 2012.
42 p. : il.

Orientador: Denildo de Magalhães.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia.
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.53>
Inclui bibliografia.

1. Odontologia - Teses. 2. Cerâmica odontológica - Teses. 3. Ossos - Regeneração - Teses. 4. Transplante Ósseo - Teses. I. Magalhães, Denildo de. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. III. Título.

CDU: 616.314

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947