

LUCIANO TELES GEBRIM

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE ANTIBIÓTICOS NA PROLIFERAÇÃO E
DIFERENCIAÇÃO DE OSTEÓBLASTOS DERIVADOS DE CALVÁRIA
DE RATOS**

CAMPINAS

2008

LUCIANO TELES GEBRIM

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE ANTIBIÓTICOS NA PROLIFERAÇÃO E
DIFERENCIAÇÃO DE OSTEÓBLASTOS DERIVADOS DE CALVÁRIA
DE RATOS**

Tese apresentada ao Centro de Pós-Graduação / CPO São Leopoldo Mandic, para obtenção do grau de Doutor em Ciências Odontológicas.

Área de Concentração: Implantodontia

Orientadora: Profa. Dra. Patricia Ramos Cury

CAMPINAS

2008

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca "São Leopoldo Mandic"

G293a Gebrim, Luciano Teles.
Avaliação do efeito de antibióticos na proliferação e
diferenciação de osteoblastos derivados de calvária de ratos /
Luciano Teles Gebrim. - Campinas: [s.n.], 2008.
56f.: il.

Orientador: Patricia Ramos Cury.
Tese (Doutorado em Implantodontia) - C.P.O. São Leopoldo
Mandic - Centro de Pós-Graduação.

1. Agentes Antibacterianos. 2. Tetraciclina. 3. Implante
dentário. I. Cury, Patricia Ramos. II. C.P.O. São Leopoldo Mandic
– Centro de Pós-Graduação. III. Título.

**C.P.O. - CENTRO DE PESQUISAS ODONTOLÓGICAS
SÃO LEOPOLDO MANDIC**

Folha de Aprovação

A dissertação intitulada: “**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE ANTIBIÓTICOS NA PROLIFERAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DE OSTEÓBLASTOS DERIVADOS DE CALVÁRIA DE RATOS**” apresentada ao Centro de Pós-Graduação, para obtenção do grau de Mestre em Odontologia, área de concentração: Implantodontia em __/__/__, à comissão examinadora abaixo denominada, foi aprovada após liberação pelo orientador.

Prof. (a) Dr (a)
Orientador

Prof. (a) Dr (a)
1º Membro

Prof. (a) Dr (a)
2º Membro

Dedico este trabalho a meus familiares, e em especial, à minha esposa Ana Paula e à minha filha Rafaela, que me incentivaram em todos os momentos deste trajeto.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que colaboraram para a elaboração desse trabalho: as amigas Elizabeth, Aletéia, Verônica; os professores e a orientadora Prof^a.Dr^a Patrícia R. Cury.

O que for a profundidade do teu ser, assim será teu destino. O que for o teu desejo, assim será tua vontade. O que for a tua vontade, assim serão teus atos. O que forem teus atos, assim será teu destino.

“BrihadaranyakaUpanishad IV”

Presença

Ao nosso Senhor Jesus Cristo, sempre presente em minha vida, pela Sua imensa misericórdia e disposição em nos presentear com a vida eterna.

Aos meus queridos mestres da escola da vida: Edemar Locattele, Palmízio Noch e a meus pais pela paciência, carinho, amor e constante incentivo.

Ao colega e amigo Fábio Mizutani, que a meu lado, lutou com afinco para realização desse trabalho.

RESUMO

O presente estudo avaliou o efeito da rifamicina, tetraciclina e cloridrato de lincomicina (Frademicina®) em três diferentes concentrações na proliferação e diferenciação de células osteogênicas derivadas de calvária de ratos. As células foram isoladas por digestão enzimática seqüencial, com solução de tripsina e colagenase de fragmentos de calvárias de ratos Wistar recém-nascidos e foram plaqueadas em placas de 24 poços na densidade de 2×10^4 células/poço, cultivadas em meio essencial mínimo, modificação α , com L-glutamina, suplementadas com 10% de soro fetal bovino, β -glicerofosfato e ácido ascórbico. Tetraciclina (30, 60 e 80 $\mu\text{g/mL}$), rifamicina (12,5, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$), cloridrato de lincomicina ($0,75 \cdot 10^{-2}$, 0,375 e 0,75 $\mu\text{g/mL}$) ou gentamicina (100 $\mu\text{g/mL}$ no grupo controle) foram adicionados ao meio, e as células incubadas a 37°C em incubadora contendo 5% de CO_2 por 24, 48 horas ou sete dias. Células viáveis e não viáveis foram contadas utilizando-se Câmara de Neubauer. A expressão de osteonectina, osteopontina, osteocalcina e fosfatase alcalina foi avaliada por imunofluorescência, sendo os experimentos realizados em triplicata. Os resultados evidenciaram que o cloridrato de lincomicina foi a droga que induziu maior proliferação celular em qualquer período. A rifamicina, na concentração maior, foi a droga que induziu a segunda maior proliferação celular. Tanto o cloridrato de lincomicina, quanto a rifamicina, em sete dias, induziram maior proliferação, quanto maior fosse a concentração das drogas ($p < 0.05$). A tetraciclina induziu as menores proliferações. Por outro lado, a gentamicina empregada como controle, induziu menor proliferação que o cloridrato de lincomicina e rifamicina em 24 horas, entretanto, em 72 horas induziu maior proliferação que a rifamicina ($p < 0.05$). Independentemente da droga e dose, as células expressaram osteonectina, osteopontina, osteocalcina e fosfatase alcalina. Pode-se concluir que o cloridrato de lincomicina induz maior proliferação celular nas concentrações testadas, seguido da rifamicina e da tetraciclina. Nenhuma das drogas induziu diferenciação celular.

ABSTRACT

This study evaluated the effects of rifamycin, tetracycline and hydrochloride licomicina (Frademicin®) at different concentrations in the proliferation and differentiation of osteogenic cells. The cells were isolated for sequential enzyme digestion, in a solution of Trypsin and Collagenase, from calvarium of newborn Wistar rats. The cells were placed in a incubator of 24 tubes in the density of 2×10^4 cells/tube and were cultivated in a Essential Minimum Environment, modificação α , with L-Glutamine, supplemented with 10% of fetal bovine serum, β -glycerophosphate and ascorbic acid. Tetracycline (30, 60 e $80 \mu\text{g}/\mu\text{L}$), rifamycin (12.5, 25 and $50 \mu\text{g}/\text{mL}$) Frademicin® 10-2, 0,375 e $0,75 \mu\text{g}/\text{mL}$ (0,75, 1.5, $0.75 \mu\text{g}/\text{mL}$) or gentamicin (100% in the control group) were added to the medium and the cells were incubated at 37°C in a incubator containing 5% of CO_2 concentration for a period of 24 hours, 48 hours or seven days. Viable and non-viable cells were counted using the Neubauer camera and Osteonectin, osteopontin, osteocalcin and alkaline phosphatase expressions were analyzed by immunofluorescence. The experiments were conducted in triplicate. In the seven-day period, the duration of the experiment, both Frademicin® and rifamycin, induced greater proliferation, and even greater as drug concentration increases ($p < 0.05$). The tetracycline induced the smaller proliferations. On the other hand, the gentamicin used as the control drug induced smaller proliferation than the frademicin® and rifamycin in the 24-hour experiment, but if the period increases to 72 hours, than the gentamicin induced greater proliferation than the rifamycin ($p < 0.05$). Independently of the type of drug and the dosage used, the cells showed osteonectin, osteopontin, osteocalcin and alkaline phosphatase. We can conclude that frademicin® induces greater cell proliferation in the tested concentrations used in this experiment, followed by rifamycin and tetracycline. None of the drugs induced cell differentiation.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Efeito da tetraciclina na proliferação celular	43
Gráfico 2 - Efeito da rifamicina na proliferação celular – Barra de erro	44
Gráfico 3 - Efeito do cloridrato de lincomicina (frademicina®) na proliferação celular	45
Gráfico 4 - Efeito da tetraciclina, rifamicina e frademicina® na proliferação celular(células viáveis).....	47
Gráfico 5 - Efeito da tetraciclina, rifamicina e frademicina® na proliferação celular(células viáveis e inviáveis).....	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ratos wistar recém-nacidos 2 a 4 dias	36
Figura 2 - Calvária de rato Wistar.....	37
Figura 3 - Células fixadas em lamínulas de vidro 12mm com paraformaldeído a 4% após sete dias de crescimento (grupo controle).....	39
Figura 4 - A) Imunofluorescência em placa do grupo controle analisado com sete dias. O marcador utilizado foi o LF 52 <i>combinado</i> ; B) Imunofluorescência em placa do grupo controle analisado com sete dias.O marcador de núcleo celular utilizado foi a fosfatase alcalina; C) Imunofluorescência em placa do grupo das rifamicinas analisado com sete dias de cultura. O marcador utilizado foi o LF 32; D) Imunofluorescência em placa no grupo do cloridrato de lincomicina analisado com sete dias de cultura. O marcador de utilizado foi o LF 32; E) Imunofluorescência em placa no grupo das tetraciclinas analisado com sete dias de cultura. O marcador de núcleo celular utilizado foi <i>LF 52</i>	48

LISTA DE ABREVIATURAS

ALP	Atividade da fosfatase alcalina
BMP	Proteína Morfogenética do Osso
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
FGF2	Fator de crescimento de fibroblastos do tipo 2
GH	Hormônio do crescimento humano
MEN	Meio Essencial Mínimo
OBM	Osso bovino misto
PBS	Tampão fosfato salino
SFB	soro fetal bovino
TGF β	Fatores de crescimento transformante β

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1 Tecido Ósseo	16
2.2 Antibióticos - Odontologia.....	20
2.3 Efeitos dos Antibióticos sobre Osteoblastos em Cultura de Células	24
2.4 Efeitos Antibióticos sobre a Regeneração Óssea: Estudos Clínicos e Histológicos	32
3 PROPOSIÇÃO.....	35
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
4.1 Procedimentos.....	36
4.2 Imunofluorescência	40
4.3 Análise Estatística	41
5 RESULTADOS	43
5.1 Comparações entre as Diferentes Concentrações de Tetraciclina.....	43
5.2 Comparações entre as Diferentes Concentrações de Rifamicina	44
5.3 Comparações entre as Diferentes Concentrações de Cloridrato de Lincomicina(Frademicina®).....	45
5.4 Comparações entre as Diferentes Drogas	46
6 DISCUSSÃO.....	49
7 CONCLUSÃO.....	52
REFERÊNCIAS.....	53
ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética	56

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, os enxertos ósseos vêm ganhando espaço como meio de tratamento reconstrutivo na implantodontia e seqüelas cancerígenas, e também, como coadjuvante na reabilitação oral, com o intuito de proporcionar maior conforto, estética e eficiência mastigatória aos pacientes. Todavia, a falta de conhecimento no controle da infecção desses enxertos tem sido um grande problema no resultado estético-funcional.

O sucesso do procedimento de enxertia óssea depende de muitos fatores, sendo o primeiro, a atividade biológica do próprio enxerto, ou seja, o número de células vitais e seus produtos celulares, incluindo as proteínas de matriz extracelular. O segundo fator, é a capacidade do enxerto de induzir uma resposta osteogênica nos tecidos do leito receptor, e, o terceiro fator a ser considerado, seriam as propriedades físicas do enxerto que devem permitir a penetração de novos vasos a partir dos tecidos do leito receptor, e, ainda, ter tamanho e estrutura que permitam a fagocitose celular (Kahnberg, 2006). Em síntese, podemos afirmar que o sucesso dos enxertos depende de uma série de eventos celulares, bioquímicos e biomecânicos que seguem um padrão bastante previsível. A incorporação do enxerto não ocorrerá se houver algum problema em um destes eventos ou na seqüência da ocorrência dos mesmos.

A utilização de antibióticos tópicos associados a enxertos ósseos é largamente aplicada em odontologia, com o objetivo de minimizar a probabilidade de infecção.

O efeito dos antibióticos sobre osteoblastos em cultura de células foi avaliado em estudos prévios. Isefuku et al. (2001) demonstraram que ciprofloxacina e rifanpicina inibem a proliferação de células similares a osteoblastos *in vitro*, especialmente em altas concentrações (1300 µg/ml). Miclau et al. (1998) avaliaram os efeitos da ciprofloxacina na proliferação das células osteosarcômicas similares a osteoblastos humanos (MG-63) *in vitro*, demonstrando que a ciprofloxacina inibe a proliferação, sendo que a concentração dos antibióticos e o tempo de exposição das células também influenciaram nos resultados. Aos meios de cultura celular foram adicionados antibióticos nas seguintes concentrações de ciprofloxacina: 0, 10, 100, 200, e 1000 µg/ml para estabelecer uma curva de dose-resposta inicial. A média que contém a dose apropriada de ciprofloxacina foi alterada a cada 24 horas. O número de células e a incorporação de [3H] timidina por célula foi determinado em 0, 24, e 72 horas. Uma segunda curva de dose-resposta foi realizada em concentrações de 0, 10, 20, 40, e 80 µg/ml. Três experimentos, cada um, com quatro observações, foram realizados. Os resultados deste estudo demonstraram que a ciprofloxacina causou decréscimos significativos ($p < 0,05$) no número de células em 40 microg / ml em 24 horas e 20 microg / ml em 72 horas. A incorporação de [3H] timidina por célula diminuiu significativamente em níveis de 80 µg/ml em 24 horas e 20 µg/ml em 72 horas. Os autores concluíram que os níveis locais de ciprofloxacina utilizados *in vivo*, inibem a proliferação de células humanas semelhantes a osteoblastos *in vitro*.

Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito de três antibióticos, encontrados no mercado e comumente utilizados na prática odontológica no processo de enxertia óssea, em diferentes concentrações e tempos

de exposição na proliferação e na diferenciação de osteoblastos de calvária de ratos em cultura de células.

REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Tecido Ósseo

O osso é um tecido conjuntivo especializado, ricamente vascularizado, com uma intrínseca organização celular e responsável pela maior parte do esqueleto (Garg, 2001).

O tecido ósseo é dividido, didaticamente, em osso cortical e medular (Hing, 2004), e é revestido interna e externamente por membranas ricas em células com características fibroblásticas denominadas respectivamente de endóstio e perióstio. A função destas membranas relaciona-se à proteção celular e à manutenção da vitalidade do tecido em questão (Campos, 2007).

Os componentes celulares do tecido ósseo são: os osteoblastos, os osteoclastos e os osteócitos (Campos, 2007).

Segundo Kaabeche et al. (2005), os osteoblastos são células formadoras de osso que secretam uma matriz extracelular. Cristais de hidroxiapatita são então depositados na matriz para formar o osso.

Os osteoclastos são células multinucleadas (6 a 12 núcleos) formadas a partir da fusão de células osteoprogenitoras mononucleadas da linhagem dos monócitos/macrófagos; responsáveis pela reabsorção óssea e são encontrados em depressões da matriz óssea denominadas lacunas de Howship. São células altamente polarizadas, cujos núcleos, agregam em uma posição mais distante da área em que se dará o processo de reabsorção. Devido ao seu tamanho e à atividade metabólica, um único osteoclasto pode reabsorver a matriz óssea depositada por 100 osteoblastos (Carvalho, 2005).

Segundo Campos (2007), a atividade osteoclástica em osso intacto ocorre por meio de estímulos recebidos pelo hormônio para-tireoideano, por prostaglandinas e pela 1,25 dihidroxi-vitamina D₃. Sugere-se que o comportamento destas células possa estar relacionado à atividade hormonal de outro tipo celular e que a célula candidata seria o osteoblasto.

Para que os osteoblastos possam ativar a osteoclastose deve ocorrer a exposição de minerais pelos osteoblastos ao produzirem colagenase e o ativador tecidual do plaminogênio (Duplomb et al., 2007; Campos, 2007).

De acordo com Schwarzenberg (2000), depois de intensa produção de matriz, os osteoblastos são aprisionados pela mesma e transformam-se em osteócitos, posicionando-se em regiões mais internas denominadas lacunas. Tais células têm o poder de síntese bem reduzido, mas são de alta relevância para a vitalidade óssea e são atuantes no processo de homeostase. Após sua apoptose a matriz do local é imediatamente reabsorvida, iniciando-se um novo ciclo de remodelação.

Stein et al. (1996) estudaram o controle da transcrição do crescimento e da diferenciação do osteoblasto e relataram sobre os fatores e mediadores fisiológicos que interferem na diferenciação dos mesmos:

TGF- β , inibe a expressão de Cbfa-1, controlando o estado de diferenciação do osteoblasto (cultura).

FGF, atua precocemente na esqueletogênese; FGF-2 controla a diferenciação das células progenitoras mesenquimais em osteoblastos maduros.

GH, estimula o metabolismo ósseo em crianças e adultos e aumenta o número e a atividade dos osteoblastos

Fatores de transcrição regulam a atividade gênica dos osteoblastos, agindo diretamente nas interações DNA-proteínas ou proteínas - proteína. O fator mais conhecido é o Cbfa-1, que regula a expressão de osteocalcina por osteoblastos já diferenciados.

BMPs (proteínas ósseas morfogenéticas) mostraram-se capazes de regenerar tecido ósseo e de induzir neoformação óssea, tanto em animais quanto, em seres humanos.

Um fator crucial nesse tipo de tratamento é a via de administração. BMPs e outros fatores de crescimento, de possível interesse, são proteínas e, portanto, necessitam de um veículo para manterem-se como proteínas inativas durante um certo tempo, após a aplicação no tecido. O veículo ideal deve liberar as proteínas por intervalos, para, então, ser degradado rapidamente, provocando o mínimo possível de reação tecidual (Kahnberg, 2006).

Silva & Mazzonetto (2006) avaliaram clínica e histologicamente o comportamento da associação entre uma matriz óssea orgânica bovina (Gen-Oxri) e uma proteína óssea morfogenética (BMP) derivada de embrião bovino (Gen-Prori). Quando comparada com enxerto ósseo autógeno, em cirurgias para levantamento bilateral de seio maxilar, os autores observaram um padrão de neoformação óssea diferente com o osso autógeno, apresentando um aspecto mais organizado. Ao final do estudo concluíram que, clínica e histologicamente, o padrão de formação óssea das áreas enxertadas, com a associação de osso heterógeno bovino e proteína óssea morfogenética bovina, apresenta um trabeculado ósseo menos compacto e menos organizado do que o osso autógeno.

A seguir, alguns estudos que avaliam o processo de regeneração óssea.

Schenk (1977) estudou a cicatrização de orifícios ósseos na cortical da tíbia de coelhos com perfuração de 0,1mm. A cicatrização, tanto no fêmur, quanto na tíbia, se fez de forma centrípeta. Inicialmente, a cavidade foi preenchida por tecido de granulação, e, em seguida por proliferação óssea. Ao final de 12 semanas, a regeneração foi total.

Imazato et al. (2000), em cultura celular, compararam um material já utilizado na clínica odontológica, com outro modificado, contendo um agente antimicrobiano a fim de melhorar sua performance clínica. Ambos demonstraram padrão de toxicidade similar, embora tenham levado à redução de 40% na taxa de proliferação celular em relação ao controle. Entretanto, apesar da toxicidade observada, não se descartou a utilização clínica do novo material, uma vez que o controle também demonstrara certo grau de citotoxicidade. Isto ocorreu devido ao fato de ambos os materiais possuírem a mesma composição química, exceto pela presença do agente antimicrobiano. Dessa maneira, a despeito da extrapolação limitada dos resultados obtidos *in vitro* para o sistema *in vivo*, os autores afirmam ser importante estimar o grau de toxicidade do OBM (osso bovino misto), devido ao efeito citotóxico do osso bovino GEN-OX[®] orgânico e inorgânico, citando estudos em animais que demonstraram a biocompatibilidade desses materiais. Foram realizados estudos criando-se defeitos críticos na calvária de ratos, os quais foram preenchidos com os materiais de origem bovina GEN-OX[®]. Verificou-se a biocompatibilidade do material, assim como seu poder osteocondutor, facilitando a regeneração óssea. Trabalhos em subcutâneo de ratos confirmam a biocompatibilidade *in vivo* desses materiais.

Garcia & Barbosa (2002) avaliaram a capacidade de regeneração óssea de um enxerto ósseo desmineralizado e liofilizado de origem humana (DEMBONE[®])

em calvária de coelhos. Nove coelhos foram utilizados, sendo preparadas duas cavidades ósseas em cada calvária. As cavidades do lado esquerdo foram utilizadas como controle e preenchidas apenas com sangue do animal. As cavidades do lado direito foram preenchidas com o enxerto ósseo. Os animais foram sacrificados nos períodos pós-operatórios de 03, 07 e 15 semanas. A análise das amostras sob microscopia óptica revelou que a neoformação óssea foi favorecida no grupo de estudo.

1.2 Antibióticos - Odontologia

Segundo Montgomery (2001), os antibióticos devem ser tóxicos para os microorganismos invasores, mas não devem possuir nenhum efeito sobre as células do hospedeiro. O grau de toxicidade seletiva dos antibióticos é determinado principalmente pelo seu mecanismo de ação, e este ocorre de duas maneiras:

- a) o antibiótico bloqueia uma reação vital ao microorganismo invasor, mas não ao hospedeiro, ou;
- b) o antibiótico bloqueia uma reação vital tanto para a bactéria, quanto para o hospedeiro, sendo que os efeitos são sentidos em maior quantidade no microorganismo.

De acordo com Duarte et al. (2003), o antibiótico deve agir exclusivamente sobre o agente etiológico do quadro patológico em questão. Os efeitos colaterais do uso de antibióticos não se restringem àqueles diretos sobre a estrutura do hospedeiro, mas também sobre a microbiota anfibiótica de cada indivíduo, que é fundamental para um estado de equilíbrio. Nas conclusões do estudo, os referidos autores observam que:

- a) a terapêutica antibiótica é adjuvante no tratamento das infecções odontogênicas, periodontal e endodôntica, não devendo em hipótese alguma, ser utilizada como única forma de tratamento;
- b) o uso indiscriminado dos antibióticos fez aumentar muito, o número de espécies de microorganismos resistentes, sendo cada vez mais importante limitar o uso dos antibióticos às situações em que seja realmente indicado;
- c) quando da escolha de um antibiótico, é necessário considerarmos as suas propriedades, visando o sucesso da antibioticoterapia e diminuindo a possibilidade de ocorrência de reações adversas;
- d) quando diante de uma infecção que não involui, o profissional deve sempre considerar que possa ter ocorrido uma falha no tratamento realizado, não devendo haver uma precipitação na troca de antibiótico, como sendo esta, a causa de insucesso;
- e) quando não tiver certeza de qual antibiótico utilizar, procurar ajuda de outros colegas de trabalho, antes de prescrever indiscriminadamente um fármaco.

Os antibióticos são agrupados conforme o mecanismo de ação (Faco, 2006):

- a) que atuam na membrana celular (Azólicos, Nistatina, Polimixinas, Anfotericina B). A ruptura da membrana celular ou a alteração na sua permeabilidade resulta na inibição do crescimento ou morte da célula. Como as diferenças entre as membranas celulares dos mamíferos e as microbianas são sutis, os antibióticos que afetam estas estruturas,

exibem pequena toxicidade seletiva, sendo destrutivos para as células normais;

- b) inibidores da síntese de proteínas (Aminoglicosídeos, Cloranfenicol, Clindamicina, Macrolídeos, Tetraciclina). Isso ocorre através da ligação dos antibióticos aos ribossomos bacterianos. Geralmente, os antibióticos que impedem a síntese das proteínas exibem atividade bacteriostática, sendo bactericida no caso de alta concentração de aminoglicosídeo ou eritromicina (a ação bactericida dos aminoglicosídeos pode estar relacionada à lise da membrana celular mal formada por proteínas danificadas);
- c) inibidores da síntese da parede celular (Penicilina, Bacitracina, Vancomicina, Cefalosporina). Estes fármacos são eficazes apenas durante a fase do ciclo celular bacteriano em que está sendo produzido novo material da parede celular. Possuem toxicidade seletiva máxima, pois as células dos mamíferos não possuem parede celular. A eficácia dos antibióticos depende da sua atuação durante a formação da célula bacteriana e dos locais onde há diferença osmótica entre o meio e o microorganismo, pois em seu interior há hipertonicidade com ganho constante de água. Com a parede celular danificada ocorrerá lise dessa célula microbiana;
- d) inibidores da síntese dos ácidos nucleicos (Metronidazol, Rifampicina, Fluorquinolonas). Causam alterações estruturais em toda célula microbiana. As células normais dos mamíferos são inúmeras vezes menos sensíveis à ligação dos antibióticos às enzimas precursoras dos ácidos nucleicos;

- e) antimetabolismo (Sulfonamidas, Trimetropina). O antimetabólico pode ser definido como um substrato falso. Em virtude de sua semelhança com o substrato normal, compete pela ligação a uma enzima específica envolvida em determinada via metabólica. Não sendo funcional na formação do produto final, a via metabólica é inibida.

Em suma, o tratamento com antibióticos depende de vários fatores, dentre os quais destacam-se o hospedeiro, as bactérias e os fármacos.

Descrição técnica:

- a) Cloridrato de Lincomicina (Frademicina[®]) é um agente antibiótico da classe das lincosamidas. É indicado no tratamento de infecções graves causadas por bactérias aeróbias Gram-positivas, incluindo estreptococos, estafilococos (inclusive estafilococos produtores de penicilinase) e pneumococos. Não é ativa contra *Streptococcus faecalis*, leveduras ou bactérias Gram-negativas, como *N. gonorrhoeae* e *H. influenzae*, entre outros;
- b) Rifamicina: Antibiótico semi-sintético produzido de *Streptomyces mediterranei*. Tem um largo espectro antibacteriano, incluindo atividade contra várias formas de Mycobacterium. Em organismos suscetíveis, inibe a atividade da RNA polimerase dependente de DNA, formando um complexo estável com a enzima. Então, suprime a iniciação da síntese de RNA. A rifamicina é bactericida, e age tanto em organismos intracelulares quanto extracelulares.
- c) Tetraciclina: são inibidores específicos do ribossoma procariótico (bacteriano). Elas bloqueiam o receptor na subunidade 30S que se

liga ao t-RNA durante a tradução gênica. Como o ribossoma eucariota das células humanas é substancialmente diferente, não é afetado. A síntese de proteínas é portanto inibida na bactéria, impedindo a replicação e levando à morte celular. A tetraciclina é ativa contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, micoplasma, clamídia, rickettsia e também contra tricomonas em simbiose com bactérias. Está demonstrada a resistência cruzada entre a tetraciclina e seus vários derivados. O desenvolvimento de resistência por patógenos à tetraciclina durante a terapia ocorre apenas muito lentamente, se ocorrer de forma completa. Ao que parece, a ação das substâncias ativas desse produto possui efeito local, uma vez que elas não são absorvidas através da pele em quantidade suficiente para ação sistêmica.

- d) Gentamicina: é um antibiótico da classe dos aminoglicosídeos, produzido por um actinomiceto, a *Micromonospora purpurea*. Indicada para septicemia, meningite purulenta, pielonefrite, otite, infecções cutâneas, etc, causadas por *Pseudomonas aeruginosas*, *Proteus*, *Escherichia coli*, *Klesiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Salmonella*.

Seu mecanismo de ação consiste na inibição da síntese protéica.

1.3 Efeitos dos Antibioticos sobre Osteoblastos em Cultura de Células

Neste item, aprensetam-se alguns estudos prévios que avaliaram o efeito dos antibióticos sobre osteoblastos em cultura de células.

Naal et al. (2008) avaliaram os efeitos da clindamicina nos osteoblastos humanos *in vitro*. Foram avaliados, após antibiotico-terapia, osteoblastos coletados derivados de osso humano trabecular de quatro doadores saudáveis, com diferentes concentrações de clindamicina (0-500 µg/ml) em 24, 48 e 72 h. A proliferação diminuiu significativamente com uma terapia dependente de dosagem e alcançou 3.5% das amostras do grupo controle com 500 µg/ml em 72 h. A atividade LDH não foi afetada em concentrações inferiores, porém aumentou significativamente com 500 microg/ml em 48 e 72 h. A atividade de ALP aumentou significativamente com 10 microg/ml em 24 e 48 h e, então, diminuiu de forma dose- dependente com o tempo. A calcificação aumentou com 10 e 25 µg/ml, enquanto diminuiu ou não foi achada calcificação em concentrações de 50 microg/ml e superiores. Concluiu-se, portanto que a clindamicina em concentrações baixas estimulou o metabolismo celular dos osteoblastos humanos, e que níveis altos de clindamicina como o de 500 µg/ml teve efeito citotóxico. Os efeitos observados com altos níveis de clindamicina nos osteoblastos humanos destacaram uma alteração potencial no metabolismo ósseo *in vivo* e têm que ser levados em consideração na administração local de antibióticos, como nos cimentos ósseos impregnados com clindamicina, aonde esses níveis podem ser atingidos.

De acordo com Antoci et al. (2007), antibióticos de uso tópico causam toxicidade nas células esqueléticas *in vitro*.

Foram investigados os efeitos da dosagem e os tempos de tratamento após a exposição a três antibióticos usados comumente em ortopedia. Foi criado um teto para toxicidade dos osteoblastos e condrócitos após o tratamento com ciprofloxacina, vancomicina ou tobramicina. Para testar esta hipótese, foi pesquisado se o tratamento com antibióticos causava diferenças na morfologia celular. As

células expostas à ciprofloxacina mostraram alterações consideráveis no esfregaço, membrana celular e extensões. Posteriormente, pesquisou-se qual a dosagem de antibiótico causaria reduções no número de osteoblastos e condrócitos. Foi constatado que a Ciprofloxacina numa dosagem maior que 100 µg/mL e a vancomicina e a tobramicina em doses maiores que 2000 µg/mL diminuíram gravemente a proliferação celular. Finalmente, foi pesquisado se as quedas observadas nos números celulares foram resultantes de um aumento da toxicidade celular ou senescência. Os resultados obtidos demonstraram que as taxas de liberação de desidrogenase de lactato foram aumentadas nos osteoblastos, sugerindo que o balanço entre os efeitos nos alvos microbicidas e toxicidade celular do hospedeiro é crítico para a sobrevivência das células esqueléticas e para o seu funcionamento.

Gomes et al. (2007), avaliaram o efeito dos níveis terapêuticos da doxiciclina e minociclina na proliferação e diferenciação das células osteoblásticas da medula óssea, observando o comportamento das células osteoblásticas induzidas na medula óssea de humanos, com relação à proliferação e atividade funcional na presença de concentrações terapêuticas da doxiciclina e minociclina. A primeira coleta de células osteoblásticas de medula óssea humana foi feita com 35 dias em condições conhecidas pelo favorecimento da diferenciação osteoblástica. A doxiciclina (1–25 µg/ml) ou a minociclina (1–50 µg/ml) foram adicionadas continuamente ao meio de cultura, duas vezes por semana. As culturas foram caracterizadas em vários períodos de tempo para avaliação da proliferação celular e funcionalidade. Os resultados mostraram que 1 µg/ml de ambos os níveis de tetraciclina, tanto nível representante do que foi retido no plasma, quanto o fluido crevicular com a dosagem terapêutica padrão, aumentaram significativamente a

proliferação das células osteoblásticas da medula óssea humana, sem alterar os seus fenótipos específicos e atividade funcional. A exposição prolongada a essas TCs induziram um aumento significativo no número de células osteoblásticas ativas que renderam uma quantidade proporcional de matriz normal mineralizada, sugerindo que uma potencial aplicação terapêutica, alcança o objetivo de aumentar a formação óssea. A presença de níveis mais altos desses agentes causou um efeito deteriorante, dependente da dosagem sobre a cultura celular, retardando a proliferação celular e sua diferenciação.

Duewelhenke et al. (2007) avaliaram a influência nas mitocôndrias e a citotoxicidade de diferentes antibióticos administrados em altas concentrações nas células osteoblásticas primárias e linhas celulares. Demonstraram que as osteomielites, osteítes, espongiloses, artrite séptica e infecções de juntas protéticas ainda representam as piores complicações da cirurgia ortopédica e da traumatologia. Um tratamento bem sucedido requer, além de embasamento e sucesso cirúrgico, uma terapia antibiótica sistêmica de longo período e com altas concentrações locais de 100 µg/ml ou acima desta dosagem. Neste estudo investigou-se o efeito de 20 antibióticos nos osteoblastos humanos primários (PHO), a linhagem de células do osteosarcoma MG63 e a linha de células epiteliais HeLa. Altas concentrações de fluorquinolonas, macrolídeos, clindamicina, clorofenicol, rifampicinas, tetraciclinas e linezolidos durante 48h de incubação inibiram a proliferação e a atividade metabólica, entretanto, os aminoglicosídeos e inibidores da parede celular não o fizeram. Vinte por cento das concentrações inibitórias para a proliferação do PHO foram determinadas como sendo de 20 a 40 µg/ml por macrolídeos, clindamicina e rifampicina, 60 a 80 µg/ml para clorofenicol, tetraciclina e fluorquinolonas, e 240 µg/ml para o linezolideo. A proliferação das linhas celulares eram sempre menos

inibidas. Estabeleceu-se a medida de concentração de lactato extracelular como um indicador de glicosídeos usando inibidores para a cadeia respiratória (antimicina A, rotenona e azida de sódio) e glicólises (ácido ideoacético) como compostos de referência, considerando o aumento da inibição da cadeia respiratória e a diminuição da inibição das glicólises, a produção de lactatos foi diminuída. O mensuramento da concentração do lactato extracelular revelou que as fluorquinolonas, macrolídeos, clindamicina, rifampicina, tetraciclina e, especialmente, o clorofenicol e os linezolidos prejudicaram a energia mitocondrial em concentrações altas. Isto explica parcialmente a inibição da atividade metabólica e a proliferação nos experimentos humanos.

Isefuku et al. (2001), em seu estudo sobre efeito tóxico da rifampicina nas células humanas similares a osteoblastos examinaram os efeitos da rifampicina nos osteoblastos derivados de osso adulto *in vitro*. Osso esponjoso foi coletado durante operações ortopédicas eletivas e mantido em um meio livre de antibióticos. Foram medidos o DNA total, a incorporação de 3H-timidina e a fosfatase alcalina (ALP) após o período de 4 dias, em média, contendo concentrações de rifampicina variando de 0 a 1000 µ/ml. O DNA total foi diminuído com concentrações de 10 µ/ml nas culturas obtidas de quatro, dos cinco indivíduos, porém, essas diminuições foram significativas nas culturas de apenas dois indivíduos. Na metodologia clínica, as concentrações plasmáticas da rifampicina comumente excedem 10 µg/ml após administração sistêmica. Este estudo mostrou que a rifampicina, nessas concentrações, pode inibir a proliferação de células osteoblásticas *in vitro*. Futuros estudos devem ser realizados para avaliar se a rifampicina é prejudicial ao reparo ósseo *in vivo*.

Saad Neto et al. (1991) estudaram o reimplante imediato de incisivos de ratos tratados com antibióticos(estudo histológico) e concluíram que a solução antibiótica 'Rifocina M'75mg favorece a rápida proliferação de tecidos conjuntivo e neoformação óssea na área do ligamento periodontal.

Em estudo semelhante, Arcieri et al. (1996) concluíram que a 'Rifocina M'75mg não desorganiza o coágulo sangüíneo e favorece a proliferação conjuntiva e a neoformação óssea na área do ligamento periodontal, nos períodos iniciais.

Miclau et al. (1998) avaliaram efeitos da ciprofloxacina na proliferação das células osteosarcômicas similares a osteoblastos humanos (MG-63) *in vitro*, demonstrando que a ciprofloxacina inibe a proliferação das células osteoblásticas. Observaram, nestes estudo, que a concentração dos antibióticos e o tempo de exposição das células aos meios de cultura com antibióticos,também influenciaram nos resultados. A viabilidade celular e a incorporação de 3H-timedina por células diminuíram significativamente com a ciprofloxacina nas concentrações 100, 200 e 1000mg/ml. Com relação ao tempo nenhuma diminuição importante ocorreu em nenhum dos parâmetros de avaliação em 24 horas, porém em 72 horas houve uma diminuição significativa em ambos os parâmetros.

Oliveira et al. (2002) avaliaram histológica e bioquimicamente a resposta celular e absorção da membrana obtida de osso cortical bovino desmineralizado, impregnada ou não com tetraciclina, colocada em subcutâneo de ratos. Os períodos analisados foram de 1, 3, 7, 15, 30 e 60 dias após a colocação do material, usando um total de 120 animais. Os resultados histológicos, para ambas membranas, demonstraram uma resposta inflamatória de moderada à intensa nos períodos iniciais (1 e 3 dias); moderada, nos períodos de 7 e 15 dias, e uma diminuição nos dois períodos finais (30 e 60 dias). A reabsorção da membrana foi observada a partir

de 15 dias pós-implantação, sendo que após 60 dias, apenas resquícios foram detectados em alguns animais. Os resultados da atividade enzimática mostraram diferenças entre os dois grupos nos períodos iniciais (1, 3 e sete dias), indicando que a tetraciclina influenciou a resposta celular à membrana, modificando a atividade das enzimas lisossomais.

Holton et al. (2000) demonstraram os efeitos inibitórios dos antibióticos quinolonas, trovafloxacin, ciprofloxacina e levofloxacina nas células osteoblásticas *in vitro*. Todas as 3 quinolonas testadas inibiram o crescimento de células MC3T3-E1, similares aos osteoblastos. O efeito inibitório foi mais evidente para a trovafloxacina, com uma redução de 50% na viabilidade celular, verificado em baixa concentração da droga (0,5µg/ml) em 48 e 72 horas de exposição.

Isefuku et al. (2001) demonstraram que ciprofloxacina e rifampicina inibem a proliferação de células similares a osteoblastos *in vitro*, especialmente em altas concentrações.

Oliveira et al. (2002) concluíram que a tetraciclina estimula a proliferação osteoblástica e a neoformação óssea, além de aumentar a proliferação e a atividade de síntese protéica.

Smaha & Nicastrì (2002) desenvolveram um modelo experimental em que proporcionaram uma ressecção óssea seguida de enxerto ósseo autógeno e enxerto ósseo heterógeno. Doze ratos Wistar com peso aproximado de 200g foram divididos em quatro grupos. O primeiro grupo recebeu enxerto heterógeno e permaneceu 4 semanas sob observação. No segundo grupo, os ratos receberam enxerto ósseo homólogo e permaneceram 4 semanas sob observação. O terceiro grupo, recebeu enxerto heterólogo e o quarto grupo recebeu enxerto homólogo, sendo que ambos permaneceram por 8 semanas sob observação. Foi realizada incisão logo abaixo da

cabeça de fêmur, onde foi feito uma perfuração com uma broca cilíndrica, para colocação do enxerto ósseo, tanto no enxerto autógeno, quanto no heterógeno. Os referidos autores constataram que mesmo com a diversidade e proveniência de materiais: de origem autógena, heteróloga ou sintética, foi propiciada uma consolidação óssea satisfatória. Não houve também, nenhum índice de rejeição em todos os grupos.

Em outro trabalho, Isefuku et al. (2003), demonstraram a interferência da gentamicina sobre a proliferação celular. Este antibiótico quando utilizado em altas concentrações, inibiu a proliferação de células *in vitro* podendo ser prejudicial ao processo de regeneração óssea.

O estudo teve como objetivo investigar o efeito tóxico da gentamicina em altas concentrações que podem ser alcançadas pela administração local no tratamento da infecção óssea de células similares a osteoblastos humanos derivadas de osso esponjoso. As células foram coletadas de quatro pacientes adultos, sem doenças sistêmicas, durante uma cirurgia de reposição de quadril, e mantidas por 4 semanas sem antibióticos. O método utilizado foi o de cultura de células na modificação de Dulbecco do meio essencial mínimo de Eagle com suplementos de 37°C em ar CO₂. As células em cultura foram expostas ao meio contendo várias concentrações de gentamicina (0-1000 µg/mL) por 4 dias. Foram avaliadas a atividade de fosfatase alcalina, DNA total e a incorporação de 3H-timidina. Os resultados obtidos foram que a atividade da fosfatase alcalina diminuiu significativamente ($p < 0.05$) em todas as culturas com concentrações de gentamicina iguais ou superiores a 100 µg/mL. A incorporação de 3H-timidina também diminuiu ($p < 0.05$) em três ou quatro culturas com concentrações de 100 µg/mL e superiores a esta. O DNA total foi diminuído significativamente ($p < 0.05$)

com 700 µg/mL e acima desta. Os autores concluíram que a gentamicina em altas concentrações, como as alcançadas com o uso tópico, inibe a proliferação celular *in vitro* e, portanto, pode ser prejudicial ao processo de reparo *in vivo*.

Abla (2005) analisou o processo de reparo ósseo em cavidades ósseas experimentais realizadas em tíbias de coelho, quando implantadas partículas de enxerto ósseo homogêneo, tratadas com solução de tetraciclina. Os resultados mostraram que não houve, estatisticamente, diferenças significativas entre o grupo controle, onde não houve nenhuma implantação, e o grupo tratado utilizando a tetraciclina. O processo de reparo ocorreu de maneira similar em ambos os grupos. Não houve reabsorção completa dos fragmentos ósseos implantados, permanecendo até o período estudado, de 30 dias pós-operatório.

1.4 Efeitos Antibióticos sobre a Regeneração Óssea: Estudos Clínicos e Histológicos

Kim et al. (2004) analisaram o efeito da alta concentração local de antibióticos na osteoindução de osso desmineralizado em ratos. Foram usados setenta e dois ratos com três semanas de vida, pesando de 200g a 300g, divididos em quatro grupos: grupo controle (grupo 1), grupo de impregnação salina (grupo 2), grupo de impregnação com gentamicina (grupo 3) e grupo de impregnação com tetraciclina (grupo 4). Os ratos foram mortos com 3, 8 e 12 semanas após a cirurgia. Amostras foram coradas com hematoxilina e eosina, e analisadas histomorficamente. Os resultados revelaram diferenças significativas na formação óssea entre os grupos em todos os períodos de tempo. Comparando as diferenças entre grupos em cada momento, houve maior neoformação óssea no grupo 2, do que no grupo 1, em 3 semanas; maior no grupo 3, do que no grupo 1; maior no

grupo 2 que no grupo 4, em oito semanas; e maior no grupo 2, que nos outros grupos em 12 semanas. Em termos de período de tempo, houve uma formação óssea significativa em 8 semanas durante o período de 3 e 8 semanas, e em 12 semanas durante o período de 3 e 12 semanas.

Os autores, de acordo com os resultados, sugerem que os materiais para enxerto ósseo tornam-se mais efetivos quando misturados com solução salina para regeneração dos defeitos ósseos.

Davis et al. (2003) investigaram o efeito da irrigação com doxiciclina (tetraciclina de 3ª geração) na cicatrização de ferimentos e selamento apical de três materiais de preenchimento. Foram extraídos 220 dentes de coelhos que receberam tratamento endodôntico seguido pela ressecção radicular (2 mm) e preparo com ultrassom do final radicular (3 mm). Grupos de 20, foram irrigados com solução salina, ácido cítrico ou doxiciclina e preenchidos com amálgama, super EBA ou MTA. O Vazamento foi medido (mm) após a descalcificação e limpeza.

Um defeito foi irrigado com solução salina e o outro com ácido cítrico ou doxiciclina. Os animais foram mortos em grupos de 5 com 9 e 18 dias. Foram coradas secções de cada defeito com hematoxilina e eosina para avaliação da cicatrização óssea e preenchimento ósseo. O vazamento com super EBA e MTA foi significativamente menor que com amálgama, independente da irrigação. Não houve diferença do vazamento após a irrigação com doxiciclina comparado com o ácido cítrico ou solução salina do super EBA ou MTA, mas foi menor que com amálgama. Não houve diferença significativa na cicatrização óssea ou preenchimento ósseo entre os irrigantes com 9 ou 18 dias.

Alkan et al. (2002) tiveram como objetivo desenvolver uma técnica histomorfométrica supervisionada por computador para quantificar o tamanho da

regeneração óssea dentre os defeitos experimentais em diabéticos, já que a cicatrização óssea é prejudicada com o quadro de diabetes mellitus, particularmente devido ao aumento de colágeno.

Este estudo examinou os efeitos sistêmicos da administração da doxiciclina na cicatrização de defeitos ósseos na tíbia em ratos albinos saudáveis e em ratos induzidos a diabetes. Vinte ratos fêmeas albinos foram divididos em quatro grupos: diabéticos, diabéticos com doxiciclina(*tetraciclina de 3ª geração*), controle ou controle com doxiciclina. Os defeitos ósseos padronizados foram examinados histomorfometricamente em 10 e 30 dias após a cirurgia. A análise do total da neoformação óssea foi executada com o programa de análise Zeiss Vision KS 400 (Kontron Elektron GmbH, Eching, Alemanha).

Em 10 dias de cicatrização, o grupo diabético exibiu uma cicatrização inferior ao grupo controle, em termos de quantidade de formação óssea entre os defeitos. Entretanto, o efeito da administração da doxiciclina nos grupos de diabéticos e controle não foi estatisticamente diferente. Com 30 dias de cicatrização, não houve diferença estatística significativa com relação à quantidade de osso recém-formado em nenhum dos grupos.

Concluiu-se que a administração da doxiciclina não proporcionou alteração significativa na quantidade de osso recém- formado durante a cicatrização de defeitos ósseos no grupo controle e de diabéticos.

PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da tetraciclina, rifamicina e cloridrato de lincomicina em diferentes concentrações e tempos de exposição na proliferação e diferenciação de osteoblastos derivados de calvária de ratos Wistar.

MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo CEEA do CPO São Leopoldo Mandic sob o número 061325.

Para a realização deste estudo foram utilizados 10 ratos Wistar recém-nascidos, sacrificados de 2 a 4 dias após o nascimento, em cada um dos experimentos, que foram realizados em duplicata.



Figura 1 - Ratos wistar recém-nascidos 2 a 4 dias

1.5 Procedimentos

As células de fragmentos de calvárias de ratos foram isoladas por digestão enzimática seqüencial, com solução de tripsina e collagenase (Gibco, São Paulo-SP Brasil), seguindo o protocolo cedido pelo Dr. Paulo Tabasco de Oliveira.

Protocolo para obtenção das calvárias de ratos:



Figura 2 - Calvária de rato Wistar

Foram preparadas duas soluções: solução 1 e solução 2, um dia antes do experimento e armazenadas em geladeira.

Solução 1: 396 ml tampão fosfato salino (PBS- Sigma, São Paulo-SP, BR) adicionados a 10% (50mg/ml)

Solução 2: 180ml PBS adicionados a 2ml de gentamicina mais 18 ml MEN (Ivitrogen Carlsbad, Miami, EUA).

Os ratos wistar recém-nascidos foram decaptados entre 2 e 4 dias de vida, num total de 10 animais por experimento. Para tanto, foi realizado o embrocamento com povidine, divulsão da pele e removida a calvária.

As calvárias foram lavadas na solução 1 e imediatamente depois na solução 2. Estas soluções foram mantidas numa temperatura de 4°C.

As calvárias foram então colocadas em 10ml da solução 03, sob agitação, numa temperatura de 37°C durante 05 minutos. A partir desse momento trabalhou-se sempre em fluxo laminar. O sobrenadante foi desprezado.

A solução 03 foi preparada com 37,5ml de tripsina 0,25%+ 0,0375g collagenase tipo II, e mantida sob refrigeração a 3°C, para não perder o efeito.

Após os procedimentos supra-citados, as calvárias foram colocadas na solução 03 e agitadas por 15 minutos há uma temperatura de 37°C.

Colocou-se 1ml de PBS nas calvárias, que foram cortadas com tesoura de ponta romba em pequenos fragmentos. O sobrenadante foi removido e peletizado. Rapidamente coletou-se 1 ml que foi adicionado aos 10ml da solução 03 para peletizar tudo.

Enquanto aguardava-se a formação do *pellet*, foram colocados 10ml da solução 3 nas calvárias e mantidas sob agitação à temperatura de 37°C durante 25 minutos.

Do material peletizado, foi retirado o sobrenadante e colocado 5 ml da solução 04, até a ressuspensão e formação do *pellet*.

A solução 04 foi composta de: 360ml de MEM, 4ml de gentamicina (Sigma, São Paulo-SP,BR) 36ml de SFB e 4ml de glicerolfosfato (Sigma, São Paulo-SP,Brasil) mais ácido ascórbico (Sigma, São Paulo-SP,BR) (10ml de água deionizada: 5mg ácido ascórbico +2,16g de glicerofosfato).

Retirou-se o sobrenadante, e o mesmo foi ressuspendido em 2,5ml da solução 04. Deixou-se então em gelo 4°C para formar o *pellet*. Ressuspendeu-se em 5ml da solução 04 e formou-se o *pellet* novamente. Ressuspendeu-se em 5ml da solução 04 e retirou-se 2,5 ml.

Juntou-se 2,5ml com a solução que estava em gelo, e a solução foi homogeneizada e filtrada em poros de 25mm de diâmetro.

A contagem celular foi realizada com 100ml do meio de cultura mais 100ml de azul de tripan colocadas na Câmara de Neubauer e contadas em 09 quadrados.

As células colocadas em placas de 24 poços, na densidade de 2×10^4 células/poço, cultivadas por períodos de até sete dias em meio essencial mínimo, modificação α , com L-glutamina (α - MEM Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Invitrogen), 7 mM de β -glicerofosfato (Sigma, St Louis, MO, EUA), 5 μ g/L de ácido ascórbico (Sigma) a 37°C em incubadora contendo 5% de CO_2 .

O meio de cultura foi trocado a cada 2 dias e a progressão da cultura avaliada por microscopia de fase.

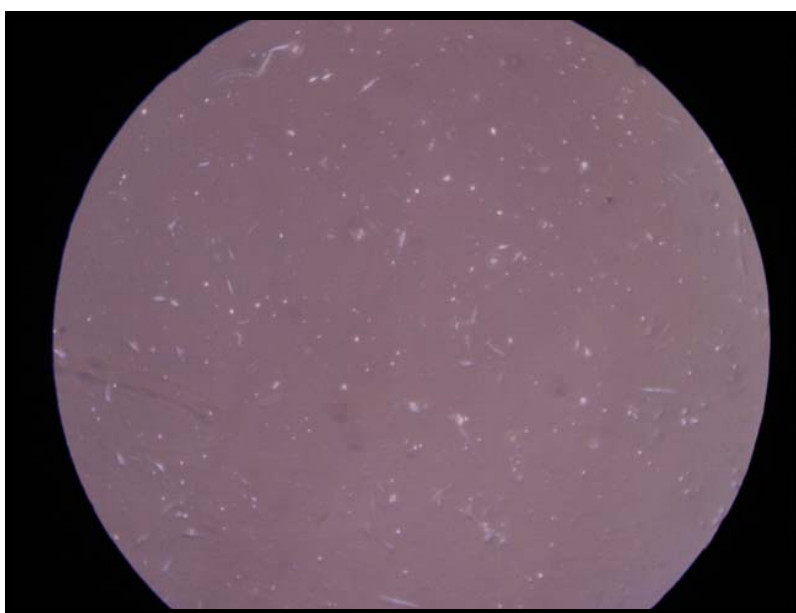


Figura 3 - Células fixadas em lâminulas de vidro 12mm com paraformaldeído a 4% após sete dias de crescimento (grupo controle).

Após 24 horas, 72 horas e sete dias, a proliferação celular foi avaliada, por meio de contagem de células viáveis e não viáveis, em Câmara de Neubauer, por dois avaliadores.

As drogas foram adicionadas em triplicata nas seguintes concentrações:

- a) Tetraciclina a 30, 60 e 80 µg/ml (EMS);
- b) Rifamicina(Rifocina[®]) a 12,5, 25 e 50 µg/ml (Merrell Lepetit);
- c) Cloridrato de Lincomicina (Frademicina[®]) a $0,75 \cdot 10^{-2}$, 0,375 e 0,75 µg/ml (Pfizer);

A gentamicina 0,1 mg/mL (Gibco) foi empregada como droga controle positivo.

1.6 Imunofluorescência

A expressão de osteonectina, osteopontina, osteocalcina e fosfatase alcalina foi avaliada por imunofluorescência.

Para tanto, as células foram plaqueadas em lamínulas de vidro de 12 mm, e fixadas em paraformaldeído a 4% em tampão fosfato a 0,1 M, pH 7,2 (PB), por 10 minutos a temperatura ambiente

A permeabilização foi feita com solução de Triton X-100 a 0,5% em PB por 10 minutos, seguida de bloqueio com leite desnatado a 5% em PB por 30 minutos. Anticorpos primários para osteopontina, osteonectina, fosfatase alcalina e osteocalcina (Gentilmente doados pelo Dr. Larry Fisher) foram utilizados, seguidos de incubação com anticorpo secundário conjugado com fluoróforo Alexa Flúor 594

(fluorescência vermelha; 1:200, Molecular Probes) em mesma solução de faloidina conjugada com Alexa Flúor 488 (fluorescência verde; 1:200, Molecular Probes).

Todas as incubações dos anticorpos foram feitas em atmosfera úmida por 60 minutos em temperatura ambiente. Entre cada incubação, as amostras foram lavadas três vezes (cinco minutos cada) em PB.

Antes da montagem para observação microscópica, as amostras foram lavadas rapidamente com água destilada e os núcleos celulares foram marcados com DAPI (Molecular Probes) a 300nm por cinco minutos.

As lamínulas foram montadas diretamente em lâminas de vidro com meio de montagem *anti-fade* (Vectashield, Vector Labs, EUA) e examinadas utilizando microscópio de fluorescência acoplado a uma câmara digital.

As imagens adquiridas foram analisadas com o programa Axio Vision (4) (Zeiss, Gottingen, Germany) quanto à intensidade de expressão das diferentes proteínas nos diferentes grupos.

Os resultados representativos de três culturas primárias distintas foram considerados neste estudo.

1.7 Análise Estatística

O Programa STATISTICA 6.0 - Stat Soft Inc; Tulsa, OK, EUA - foi utilizado para todas as análises. A significância estatística foi considerada para níveis de $p \leq 0,05$.

Para validação da contagem realizada pelos diferentes avaliadores do testes de proliferação, utilizou-se um Teste t ($p > 0.05$) para amostras pareadas. Não

foram observadas diferenças estatísticas significantes entre os avaliadores, possibilitando a utilização das médias das contagens em todas as análises.

O teste de Levene não indicou homogeneidade das variâncias para a maioria das variáveis, portanto, testes não-paramétricos foram empregados para análise das diferenças intra e inter-grupos.

O teste de Kruskal-Wallis *ANOVA* foi empregado e havendo diferença significativa entre os grupos ou intra-grupos, aplicou-se o teste de Mann Whitney para verificação da diferença entre os grupos dois a dois, como poderemos observar nos resultados a seguir.

RESULTADOS

1.8 Comparações entre as Diferentes Concentrações de Tetraciclina

A tetraciclina na maior concentração (80 µg/mL) induziu uma menor proliferação que na concentração intermediária (60 µg/mL), nas análises de 24 e 72 horas e sete dias ($p < 0.05$). Na concentração intermediária também houve maior proliferação celular que na menor concentração (30 µg/mL) em sete dias ($p = 0.05$).

A tetraciclina nas três doses induziu menor proliferação celular que a droga controle na análise de 72 horas e sete dias ($p = 0.05$).

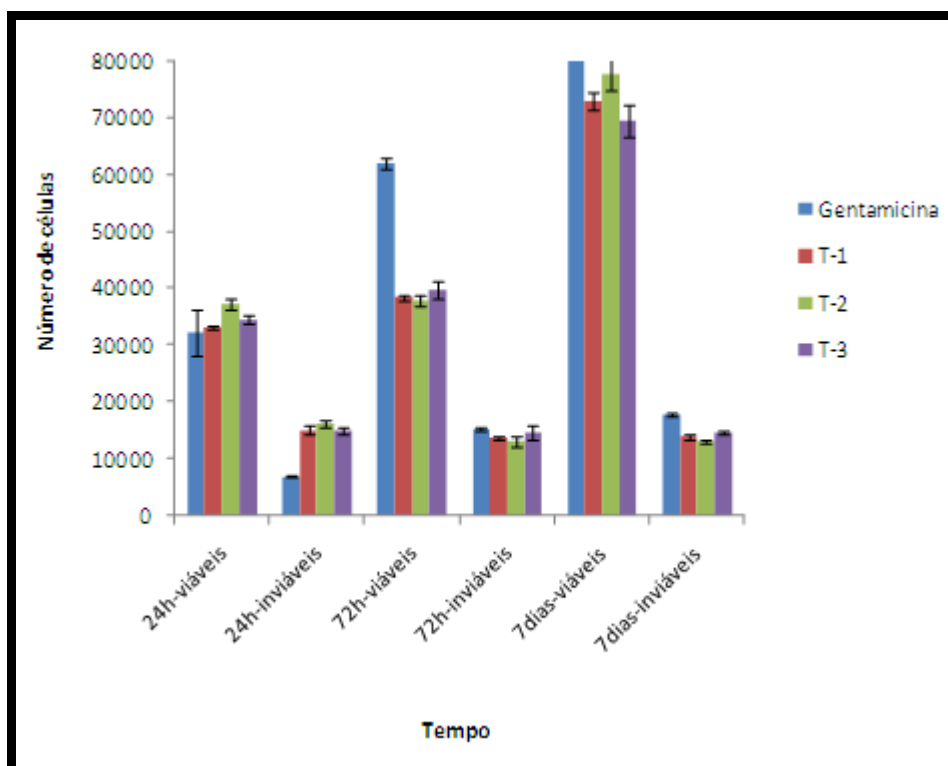


Gráfico 1 - Efeito da tetraciclina na proliferação celular

┐ Barra de erro

T1 Tetraciclina 30µg/ml

T2 Tetraciclina 60µg/ml

T3 Tetraciclina 80µg/ml

1.9 Comparações entre as Diferentes Concentrações de Rifamicina

Em 24 horas, com a maior concentração (50 µg/mL) de rifamicina observou-se maior proliferação celular do que com a menor (12,5 µg/mL) $p = 0.05$. No dia sete, aumentando-se a concentração da droga, observou-se um aumento significativo da proliferação celular. Mas também um aumento do número de células não-viáveis.

Com a rifamicina, nas três concentrações observou-se um maior número de células viáveis em 24 horas do que com a droga controle, enquanto que com a droga controle um maior número de células viáveis foi observado em 72 horas do que com as três concentrações da rifamicina ($p = 0.05$).

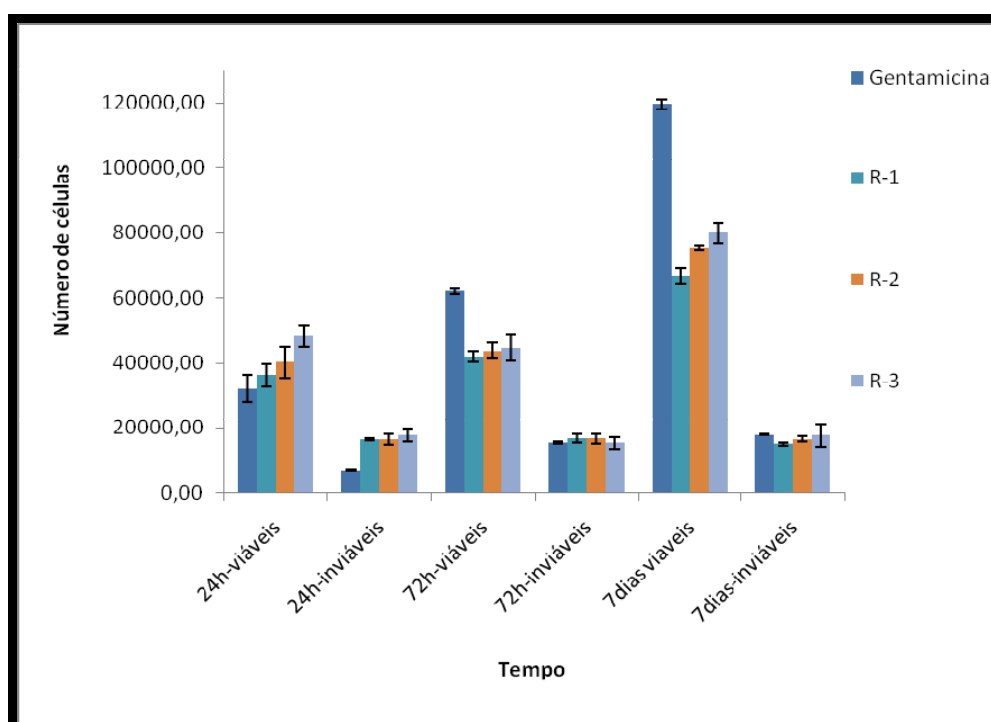


Gráfico 2 - Efeito da rifamicina na proliferação celular. Barra de erro

R1 Rifamicina 12µg/ml
 R2 Rifamicina 25µg/ml
 R3 Rifamicina 50µg/ml

1.10 Comparações entre as Diferentes Concentrações de Cloridrato de Lincomicina(Frademicina®)

Em 24 horas, observou-se maior proliferação celular e também mais células não-viáveis com a menor concentração da droga ($0,75 \cdot 10^{-2}$ ug/ml) do que com a maior (0,75 ug/ml) ($p = 0.05$). Em 72 horas, efeito oposto foi observado, ou seja, a maior proliferação foi constatada com a maior concentração do cloridrato de lincomicina ($p = 0.05$). Aos sete dias, houve um maior proliferação celular quanto maior a concentração da droga ($p = 0.05$).

Comparando-se o cloridrato de lincomicina com a droga controle, maior proliferação foi observada em 24 horas com a droga na menor concentração ($p = 0.05$). No entanto, houve uma tendência de maior proliferação com a droga controle em sete dias ($p = 0.08$).

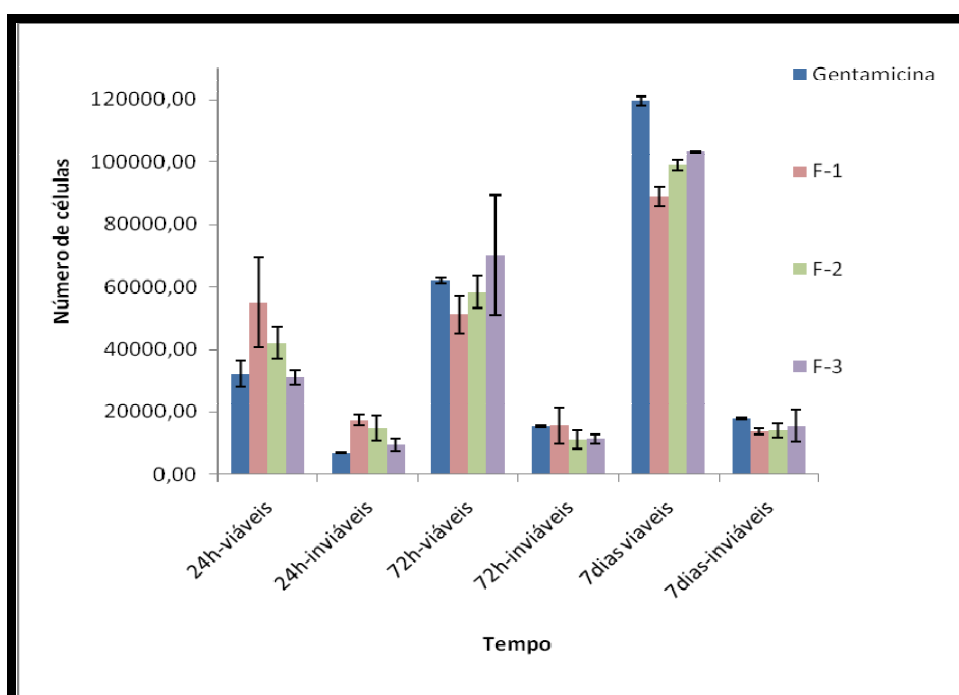


Gráfico 3 - Efeito do cloridrato de lincomicina (frademicina®) na proliferação celular

┴ Barra de erro
 F1 Frademicina® - 0.75×10^{-2} ug/mL
 F2 Frademicina® - 0.375ug/mL
 F3 Frademicina® - 0.75ug/mL

1.11 Comparações entre as Diferentes Drogas

O gráfico 4 ilustra o resultado da comparação entre as drogas.

Comparando-se a tetraciclina com a rifamicina, uma maior proliferação foi observada para a rifamicina (significâncias estatísticas indicadas na gráfico 4), com exceção da tetraciclina nas concentrações de 60ug/mL (em 72 horas e sete dias) e 30ug/mL (em todos os períodos) que resultaram numa maior proliferação que a menor dose de rifamicina (12ug/mL) ($p \leq 0.05$).

Quando a tetraciclina foi comparada com o cloridrato de lincomicina, uma menor proliferação celular foi constatada para a tetraciclina ($p \leq 0.05$) em 72 horas e em todas as concentrações de tetraciclina, quando comparadas a todas as concentrações de cloridrato de lincomicina.

Comparando-se o cloridrato de lincomicina com a rifamicina, a primeira droga promoveu maior proliferação celular contrastando-se todas as concentrações das duas drogas ($p \leq 0.05$), com exceção da concentração máxima do cloridrato de lincomicina versus intermediária e máxima da rifocina que promoveu menor proliferações em 24 horas ($p \leq 0.05$).

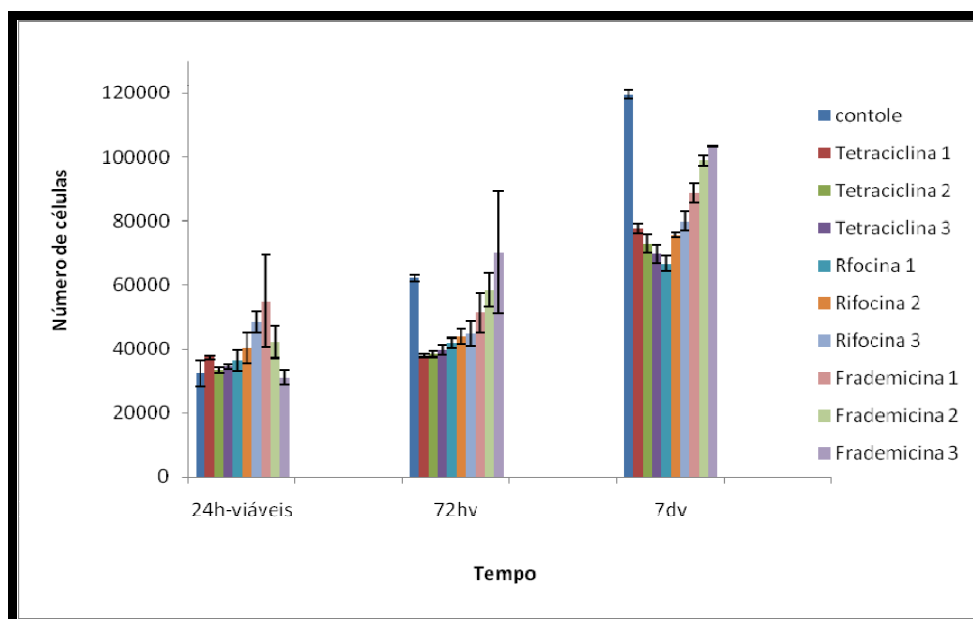


Gráfico 4 - Efeito da tetraciclina, rifamicina e frademicina® na proliferação celular(células viáveis).

┴ Barra de erro

T1 Tetraciclina 30µg/ml R1 Rifamicina 12µg/ml F1 Frademicina® -0.75x10⁻² ug/mL

T2 Tetraciclina 60µg/ml R2 Rifamicina 25µg/ml F2 Frademicina® -0.375ug/mL

T3 Tetraciclina 80µg/ml R3 Rifamicina 50µg/ml F3 Frademicina® - 0.75ug/mL

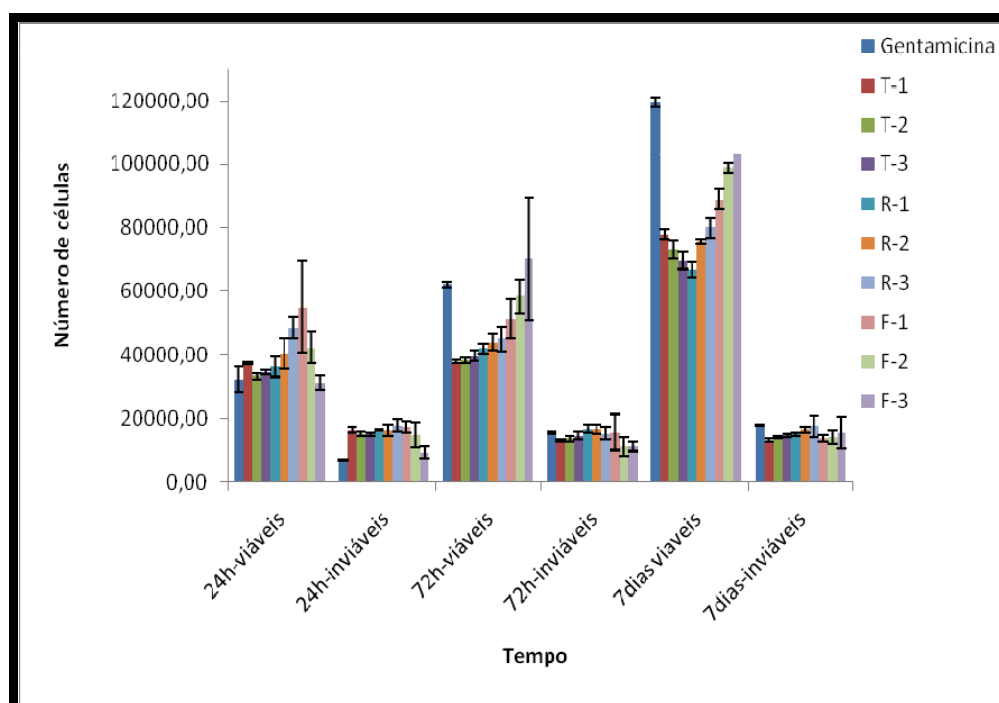


Gráfico 5 - Efeito da tetraciclina, rifamicina e frademicina® na proliferação celular(células viáveis e inviables).

┴ Barra de erro

T1 Tetraciclina 30µg/ml R1 Rifamicina 12µg/ml F1 Frademicina® -0.75x10⁻² ug/mL

T2 Tetraciclina 60µg/ml R2 Rifamicina 25µg/ml F2 Frademicina® -0.375ug/mL

T3 Tetraciclina 80µg/ml R3 Rifamicina 50µg/ml F3 Frademicina® - 0.75ug/mL

Independente da droga e dose, as células expressaram osteonectina, osteopontina, osteocalcina e fosfatase alcalina.

Prancha com fluorescência: marcadores utilizados: LF32, LF52, LF124 e boni(fosfatase alcalina) para a imunofluorescência.

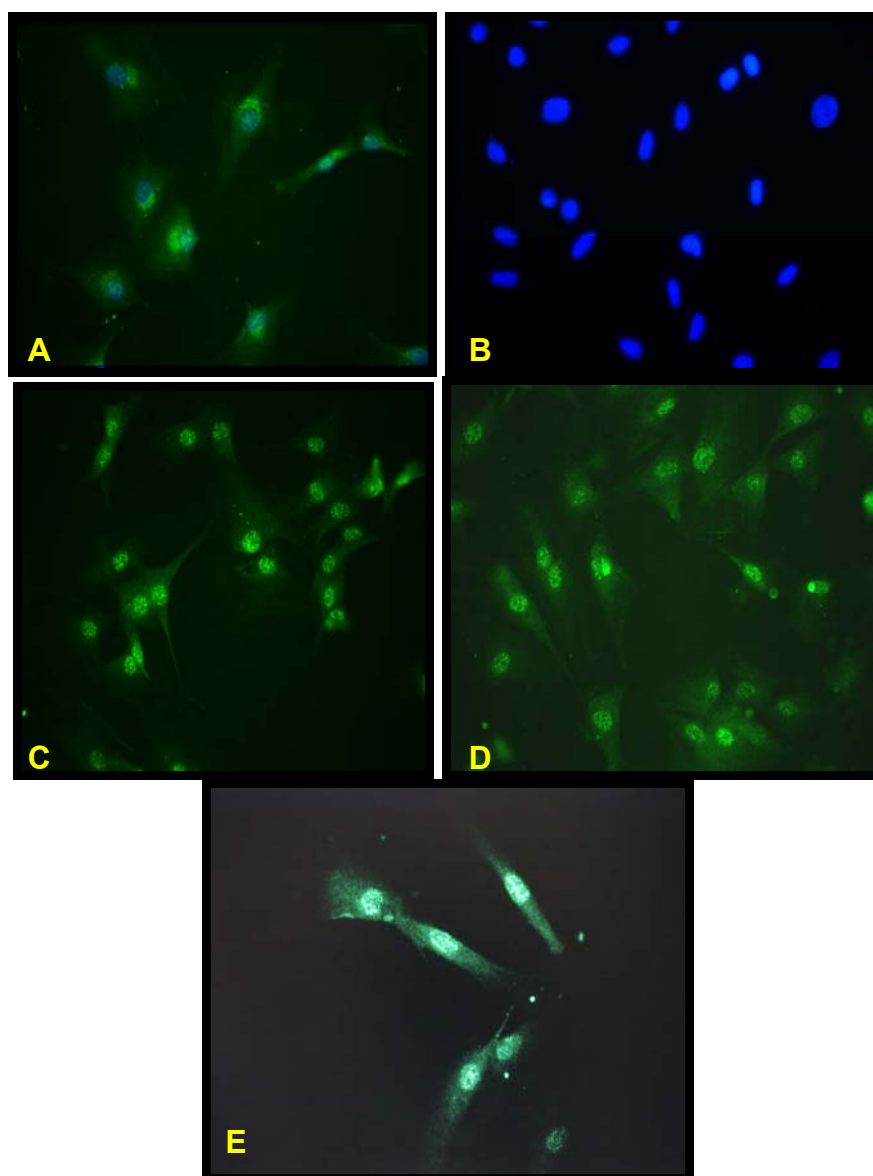


Figura 4 - A) Imunofluorescência em placa do grupo controle analisado com sete dias. O marcador utilizado foi o LF 52 *combinado*; B) Imunofluorescência em placa do grupo controle analisado com sete dias. O marcador de núcleo celular utilizado foi a fosfatase alcalina; C) Imunofluorescência em placa do grupo das rifamicinas analisado com sete dias de cultura. O marcador utilizado foi o LF 32; D) Imunofluorescência em placa no grupo do cloridrato de lincomicina analisado com sete dias de cultura. O marcador utilizado foi o LF 32; E) Imunofluorescência em placa no grupo das tetraciclinas analisado com sete dias de cultura. O marcador de núcleo celular utilizado foi LF 52

DISCUSSÃO

Os resultados demonstraram que a concentração dos antibióticos e o tempo de exposição influenciam a proliferação e a viabilidade celular, mas não a diferenciação celular. Primeiramente, o cloridrato de lincomicina foi a droga que induziu uma maior proliferação celular em qualquer dos períodos; a rifamicina, na concentração maior, foi a droga que induziu a segunda maior proliferação celular e a tetraciclina induziu as menores proliferações. Um segundo ponto importante, foi que tanto o cloridrato de lincomicina quanto a rifamicina, em sete dias, induziram maior proliferação, quanto maior fosse a concentração das drogas. Terceiro, a gentamicina empregada como controle induziu menor proliferação que o cloridrato de lincomicina e rifamicina em 24 horas, entretanto, em 72 horas, induziu maior proliferação que a rifamicina. Quarto, nenhuma das drogas ou doses resultaram em diferenciação celular.

Neste estudo, o cloridrato de lincomicina, na menor concentração ($0,75 \cdot 10^{-2}$ mg/ml), apresentou menor citotoxicidade em 24 horas, pois uma maior proliferação celular foi observada. A rifamicina, na maior concentração (50mg/ml), apresentou menor citotoxicidade em todos os períodos, enquanto a tetraciclina, na concentração intermediária, apresentou menor citotoxicidade em 24h e sete dias; sendo que em 72h, uma proliferação das células osteogênicas foi observada com a concentração mais elevada desta droga, o que demonstra que para uma determinada droga, uma concentração maior, pode ser menos citotóxica do que para outra droga, indicando um resultado inversamente proporcional, dependendo da concentração e do antibiótico utilizado.

Sobre a tetraciclina, Puramen (1966) em seu estudo em coelhos e Zaman et al. (1999) em estudo em humanos afirmaram que esta droga tem a capacidade de incorporar-se definitivamente ao osso neoformado no período em que estiver em circulação. Afirmações semelhantes são encontradas no estudo realizado por Oliveira et al. (2002).

Ainda sobre a tetraciclina, Gomes et al. (2007) demonstraram que 1 µg/ml de doxiciclina (1–25 µg/ml) ou a minociclina (1–50 µg/ml), ambas tetraciclinas, que o nível atingido no plasma e fluido crevicular com a dosagem terapêutica padrão, aumentou significativamente a proliferação das células osteoblásticas da medula óssea humana sem alterar os seus fenótipos específicos e atividade funcional. A exposição prolongada a essas tetraciclinas (TCs), induziu um aumento significativo no número de células osteoblásticas ativas que renderam uma quantidade proporcional de matriz normal mineralizada, sugerindo que uma aplicação potencializada na terapêutica, aumenta a formação óssea. A presença de níveis mais altos desses agentes levou a um efeito deteriorante, dependente de dosagem, sobre a cultura celular, retardando a proliferação celular e sua diferenciação.

Nos resultados da presente pesquisa, observação semelhante aos experimentos acima citados, foi alcançada, pois, quando houve variação da concentração da droga a citotoxicidade também variou com a tetraciclina.

De acordo com os resultados da presente pesquisa realizada, a rifamicina foi a única droga que na maior concentração apresentou menor citotoxicidade em todos os períodos, pois as demais drogas variaram de acordo com a concentração.

Sobre a rifamicina Saad Neto et al. (1991) e Arcieri et al. (1996), concluíram em seus estudos que a rifamicina favorece a rápida proliferação conjuntiva e a neoformação óssea na área do ligamento periodontal. Por outro lado,

em 2001, Isefuku et al. demonstraram que a ciprofloxacina e a rifamicina inibem a proliferação de células similares a osteoblastos *in vitro*, especialmente em altas concentrações

A gentamicina foi a droga de escolha para o grupo controle positivo, pois essa é a droga padrão utilizada pela maioria dos pesquisadores. É importante relatar ainda, que a não utilização de uma droga no grupo controle inviabilizaria o estudo, pois favorecia a formação de fungos nas amostra.

No presente estudo, observou-se que a gentamicina, empregada como controle na concentração padrão foi uma das droga mais citotóxicas. O estudo realizado por Isefuku et al. (2003) demonstraram que a gentamicina, quando utilizada em altas concentrações, inibe a proliferação de células *in vitro*, podendo ser prejudicial ao processo de proliferação osteoblástica e neoformação óssea.

Neste estudo, a proliferação foi observada quando a gentamicina, tetraciclina, rifamicina e cloridrato de lincomicina foram empregados. Independente do tipo da droga utilizada e da dose ministrada, as células expressaram osteonectina, osteopontina, osteocalcina e fosfatase alcalina.

Em síntese, observou-se que o cloridrato de lincomicina foi a droga menos citotóxica nas concentrações testadas, seguida da rifamicina e da tetraciclina. A gentamicina utilizada como a droga do grupo controle também apresentou citotoxicidade. Nenhuma das drogas provocou diferenciação celular.

CONCLUSÃO

Pode-se concluir que o cloridrato de lincomicina induziu maior proliferação celular nas concentrações testadas, seguida da rifamicina e da tetraciclina, independente do tempo de exposição às drogas. Nenhuma das drogas induziu diferenciação celular.

REFERÊNCIAS¹

- Abla MS. Avaliação do processo de reparo ósseo após enxerto ósseo autólogo tratado com Tetraciclina hidrocloreídica: estudo histomorfológico em tibia de coelhos [dissertação]. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista; 2005. 96p.
- Alkan A, Erdem E, Günhan O, Karasu C. Histomorphometric evaluation of the effect of doxycycline on the healing of bone defects in experimental diabetes mellitus: a pilot study. *J Oral Maxillofac Surg*. 2002 Aug;60(8):898-904.
- Amui RF, Poi WR, Carvalho PSP, Okamoto T. A influência da ciprofloxacina sobre o processo de reparo em alvéolo dental infectado. Estudo microscópico em ratos. *BCI* 2001 out-dez;8(32):281-6.
- Antoci Junior V, Adams CS, Hickok NJ, Shapiro IM, Parvizi J. Antibiotics for local delivery systems cause skeletal cell toxicity in vitro. *Clin Orthop Relat Res*. 2007 Sept;462:200-6.
- Araujo MAR, Armonia PL, Simone JL, Soares MS. O uso dos antibióticos em periodontia. *Rev Paul Odontol*. 2001 jan-fev;23(1):36-41.
- Arcieri RM, Saas Neto M. Estudo histológico do periodonto de incisivos de ratos, reimplantados após terem o canal radicular preenchido com hidróxido de cálcio ou antibiótico. *Rev Odontol UNESP*. 1996 jan-dez;25:19-29.
- Campos LEC. Análise físico-química e biológica de duas superfícies de implantes osteointegráveis de uso odontológico [dissertação]. Rio de Janeiro: Universidade Veiga de Almeida; 2007.
- Carvalho HF, Colares-Busato CB. Células uma abordagem multidisciplinar. São Paulo: Monole; 2005. cap. 5. p.50.
- Davis JL, Jeanson BG, Davenport WD, Gardiner D. The effect of irrigation with doxycycline or citric acid on leakage and osseous wound healing. *J Endod*. 2003 Jan;29(1):31-5.
- Duarte VA, Duarte VA, Elias R, Fadel F, Guitmann J. Farmacologia Aplicada na Odontologia - Antibiótico. julho de 2003 Disponível: <http://www.odontosites.com.br/odonto/default2.asp?s=artigos2.asp&id=37&titulo=Farmacologia%20Aplicada%20na%20Odontologia%20-%20Antibi%C3%B3tico>. Acesso em: [setembro 2007].
- Duewelhenke N, Krut O, Eysel P. Influence on mitochondria and cytotoxicity of different antibiotics administered in high concentrations on primary human osteoblasts and cell lines. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 Jan;51(1):54-63.
- Duplomb L, Dagouassat M, Jourdon P, Heymann D. Concise review: embryonic stem cells: a new tool to study osteoblast and osteoclast differentiation. *Stem Cells*. 2007 Mar;25(3):544-52.

¹ De acordo com o Manual de Normalização para Monografias da Faculdade de Odontologia São Leopoldo Mandic, baseado no estilo Vancouver de 2006, e abreviaturas dos títulos de periódicos em conformidade com Index Medicus.

Faco EFS. Terapêutica medicamentosa em odontologia: antibióticos [dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia de Araçatuba; 2006.

Garcia RR, Barbosa JRA. Capacidade de regeneração de um enxerto ósseo humano desmineralizado e liofilizado (Dembonedad) em calvária de coelhos. Análise histológica. Rev ABO Nac. 2002 fev-mar;10(1):18-22.

Garg AK. Pratical implant dentistry- Pratica da implantodontia. São Paulo: Premier; 2001. cap. 1. p.1-2.

Gomes PS, Fernandes MH. Effect of therapeutic levels of doxycycline and minocycline in the proliferation and differentiation of human bone marrow osteoblastic cells. Arch Oral Biol. 2007 Mar;52(3):251-9.

Hing KA. Bone repair in the twenty-first century: biology, chemistry or engineering? Philos Transact A Math Phys Eng Sci. 2004 Dec 15;362(1825):2821-50.

Holtom PD, Pavkovic SA, Bravos PD, Patzakis MJ, Shepherd LE, Frenkel B. Inhibitory effects of the quinolone antibiotics trovafloxacin, ciprofloxacin, and levofloxacin on osteoblastic cells in vitro. J Orthop Res. 2000 Sept;18(5):721-7.

Imazato S, Tarumi H, Ebi N, Ebisu S. Cytotoxic effects of composite restorations employing self-etching primers or experimental antibacterial primers. J Dent. 2000 Jan;28(1):61-7.

Isefuku S, Joyner CJ, Simpson AH. Gentamicin may have an adverse effect on osteogenesis. J Orthop Trauma. 2003 Mar;17(3):212-6.

Isefuku S, Joyner CJ, Simpson AH. Toxic effect of rifampicin on human osteoblast-like cells. J Orthop Res. 2001 Sept;19(5):950-4.

Kaabeche K, Guenou H, Bouvard D, Didelot N, Listrat A, Marie PJ. Cbl-mediated ubiquitination of alpha5 integrin subunit mediates fibronectin-dependent osteoblast detachment and apoptosis induced by FGFR2 activation. J Cell Sci. 2005 Mar 15;118(Pt 6):1223-32.

Kabasawa M, Ejiri S, Hanada K, Ozawa H. Efeito da Idade sobre o Osso alveolar em Rato Submetido à Pressão Mecânica e Fisiológica: um Estudo Histoquímico e Citológico. Int J Adult Orthod Orthognathic Surg. 1996 out-dez;11(4):313-327.

Kahnberg K. Enxertos ósseos para implantes na maxila. Porto Alegre: Artmed; 2006.

Katthagen BD, Mittelmeier H. Experimental animal investigation of bone regeneration with collagen-apatite. Arch Orthop Trauma Surg. 1984;103(5):291-302.

Kim SG, Chung TY, Kim MS, Lim SC. The effect of high local concentrations of antibiotics on demineralized bone induction in rats. J Oral Maxillofac Surg. 2004 June;62(6):708-13.

Miclau T, Edin ML, Lester GE, Lindsey RW, Dahners LE. Effect of ciprofloxacin on the proliferation of osteoblast-like MG-63 human osteosarcoma cells in vitro. J Orthop Res. 1998 July;16(4):509-12.

Montgomery EH. Antibióticos empregados em odontologia. In: Neidle EA, Kroeger DC, Yagiela JA. Farmacologia e terapêutica para dentistas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001. p.478-512.

Naal FD, Salzmann GM, von Knoch F, Tuebel J, Diehl P, Gradinger R et al. The effects of clindamycin on human osteoblasts in vitro. *J Arch Orthop Trauma Surg*. 2008 Mar;128(3):317-23.

Oliveira BDS, Souza ELB, Gaspar Júnior AA, Leite EBC, Ramos CG, Gusmão ES. Emprego do ácido cítrico E.D.T.A. e tetraciclina no condicionamento da superfície radicular, associado ao tratamento mecânico convencional. *Odontol Clín Cient*. 2002 set-dez;1(3):169-172.

Puramen J. Reorganization of fresh and preserved bone transplants. An experimental study in rabbits using tetracycline labeling. *Acta Orthop Scand*. 1966; (Suppl):92.

Ribeiro RF, Amstalden EMI, Izatto IC. Modelo experimental de regeneração óssea espontânea. *Rev Bras Ortop*. 1996 Nov;31(11):931-935.

Rompen EH, Goffinet GH, Nurgens B. Human periodontal ligament fibroblast behavior on chemically conditioned dentine: an in vitro study. *J Periodontol*. 1999 Oct;70(10):1144-52.

Saad Neto M, Pinto RS, Colliboatto MD. Reimplante imediato de incisivos de ratos tratados com antibiótico: estudo histológico. *Rev Odontol UNESP*. 1991;20(1):143-54.

Santos SSF, Jorge AOC. Sensibilidade "in vitro" de enterobacteriaceae e pseudomonadaceae isoladas da cavidade bucal humana à agentes antimicrobianos. *Rev Fac Odontol São José dos Campos*. 1999;2(1):41-5.

Schenk RK. Histologie der frakturheilung und der pseudarthrosen. *Bulletin offzielles organ der Schweizirischen arbeitgemeins - chaft für osteosynthesefragen*. [s.l.: s.n.]; 1977. 44p.

Schwartz Z, Lohmann CH, Wieland M, Cochran DL, Dean DD, Textor M et al. Osteoblast proliferation and differentiation on dentin slices are modulated by pretreatment of the surface with tetracycline or osteoclasts. *J Periodontol*. 2000 Apr;71(4):586-97.

Silva FMS, Mazzone R. Avaliação clínica e histológica da associação de enxerto ósseo bovino e proteína óssea morfogenética em levantamento de seio maxilar. *Implant News*. 2006 jul-ago;3(4):377-382.

Smaha F, Nicastrì AL. Estudo experimental sobre implante ósseo homólogo e heterólogo. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr*. 2002 jan-abr;2(1):20-3.

Stein GS, Lian JB, Stein JL, Van Wijnen AJ, Montecino M. Transcriptional control of osteoblast growth and differentiation. *Physiol Rev*. 1996 Apr;76(2):593-629.

Zaman KU, Sugaya T, Kato H. Effect of recombinant human platelet-derived growth factor-BB and bone morphogenetic protein-2 application to demineralized dentin on early periodontal ligament cell response. *J Periodontal Res*. 1999 July;34(5):244-50.

ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética



Aprovado pelo CEP

Campinas, 30 de Agosto de 2007.

A(o)

C. D. Luciano Teles Gebrim

Curso: Doutorando em Implantodontia

Prezado(a) Aluno(a):

O projeto de sua autoria **“ALVALIAÇÃO DO EFEITO DE ANTIBIÓTICOS NO CRESCIMENTO DE CÉLULAS DERIVADAS DE OSTEÓBLASTOS”**.

Orientado pelo(a) Prof(a) Dr(a) Patrícia Ramos Cury.

Entregue na Secretaria de Pós-graduação do CPO - São Leopoldo Mandic, no dia 09/08/2006, com número de protocolo nº 06/325, foi APROVADO pelo Comitê de Ética e Pesquisa instituído nesta Universidade de acordo com a resolução 196 /1.996 do CNS - Ministério da Saúde, em reunião realizada no dia 20/08/2006.

Cordialmente

A handwritten signature in dark ink, appearing to read "Thomaz Wassall", written over a light blue rectangular stamp.

Prof. Dr. Thomaz Wassall
Coordenador de Pós-Graduação