Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

Pedro Teixeira Garcia Coesta

**Efeito da desmineralização óssea superficial na
migração, adesão e diferenciação de pré-osteoblastos**

Bauru
2011

Pedro Teixeira Garcia Coesta

**Efeito da desmineralização óssea superficial na migração,
adesão e diferenciação de pré-osteoblastos**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Doutor em Odontologia, na área de concentração Reabilitação Oral.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Lúcia Rubo de Rezende

Versão Corrigida

Bauru
2011

Coesta, Pedro Teixeira Garcia

C679e Efeito da desmineralização óssea superficial na migração,
adesão e diferenciação de pré-osteoblastos / Pedro Teixeira
Garcia Coesta, - Bauru, 2011.

76p.:il. ; 31cm

Tese. (Doutorado) -- Faculdade de Odontologia de Bauru.
Universidade de São Paulo.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Lúcia Rubo de Rezende

Nota: A versão original desta tese encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

**Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a
reprodução total ou parcial desta tese, por processo fotocopiadores
e/ou meios eletrônicos.**

Assinatura do autor: _____

Data: _02_/_12_/_2011

Pedro Teixeira Garcia Coesta

12 de junho de 1974
Campinas – SP

Nascimento

1992 – 1995

Curso de Odontologia – Faculdade de
Odontologia de Bauru da
Universidade de São Paulo

1996 – 1997

Programa de Capacitação Profissional
em Periodontia, Disciplina de
Periodontia da Faculdade de
Odontologia de Bauru – USP

1999 – 2003

Curso de Pós-Graduação em
Periodontia na Faculdade de
Odontologia de Bauru – USP

Associações

ACDC – Associação dos Cirurgiões
Dentistas de Campinas

Agradeço a Deus pela oportunidade de viver

DEDICATÓRIA

À meus pais, **Pedro e Maria Cristina**, cujo amor e dedicação não deixaram de acalantar minha existência. Se hoje almejo alcançar maiores distâncias é pelo apoio de vocês.

À meus irmãos, **Maria Carolina e Rodrigo**, que torcem e zelam, a distância as vezes, indiferentes outras, por vezes ativamente.

À minha sobrinha, **Carlota**, luz que brilha zelosa sobre o futuro

Dedico as alegrias, o esforço, a vontade, o amor e dedicação à este trabalho, já que tudo isso são vocês.

AGRADECIMENTOS

A Professora Doutora **Maria Lúcia Rubo de Rezende** não só pelos ensinamentos transmitidos e zelosa orientação, mas também a dedicação e trato, a convivência fácil e amiga,

Sou grato

Aos Professores Doutores **Euloir Passanezzi, Sebastião Luiz Aguiar Greghi, Adriana Campos Passanezzi Sant'anna e Carla Andreotti Damante** pelos ensinamentos, pela inspiração e visão que possibilitaram este trabalho, pela convivência enriquecedora e experiência vasta, que não tardam a compartilhar

Sou grato

Ao Professor Doutor **Deoclécio Nahás**, cujo trabalho e dedicação à docência vive em seus alunos

Sou grato

À Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru, USP, na pessoa de seu coordenador, Prof. Dr. **Paulo César Rodrigues Conti**.

Ao Prof. Dr. **Alberto Consolaro** pelos conselhos que tanto enriqueceram este trabalho

Ao Prof. Dr. **Heitor Marques Honório** pela gentil e atenciosa atenção à análise estatística.

Ao Prof. Dr. **Enilson Antônio Sallum** e o biólogo **Adriano L. Martins** pela acolhida e orientação no laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura.

Ao Departamento de Dentística, na pessoa do Prof. Dr. **José Mondelli**, pela acolhida e onde nunca existiram portas.

Aos funcionários da Disciplina de Periodontia, **Ivânia, Edilaine e Marcos** que de um modo ou de outro me auxiliaram e acompanharam pela graduação, estágio, mestrado e pelo curso de doutorado.

Aos funcionários do Biotério, **Luiz, Erasmo, Richard e Wagner** e do departamento de Bioquímica, **Tânia e Ovídio**, cuja paciência e a forma prestativa que nos acolhem, possibilitaram a elaboração desse trabalho.

Aos bons amigos **Leonardo, Alcides, Carla e Renato**, pelo apoio, conselhos, conversas e por me agüentarem tão bravamente.

Aos colegas do curso de Pós-Graduação, Estágio e Graduação, pelo coleguismo, solidariedade e críticas sinceras.

Aos demais professores e funcionários da Faculdade de Odontologia de Bauru.

Resumo

RESUMO

Resultados de pesquisas prévias tem encontrado potencial aumentado para a consolidação de enxertos ósseos mediante desmineralização do material enxertado e/ou das superfícies de consolidação. Entretanto há carência de embasamento apoiado em evidências biológicas do benefício de tal procedimento. Para testar esta hipótese, o tecido ósseo da calvária de cobaias (*Cavia porcellus*) foi exposto ao condicionamento por ácido cítrico durante 15, 30, 90 e 180 segundos (grupos teste). Quarenta e cinco discos ósseos de três milímetros de diâmetro foram removidos dos animais, dos quais 36 foram condicionados com ácido cítrico pH 1 a 50% e nove não receberam condicionamento (grupo controle). Sobre nove discos de cada grupo foram cultivados pré-osteoblastos MC3T3-E1 durante 24, 48 e 72 horas (três discos de cada grupo em cada tempo). Análises da morfologia celular, do número de células aderidas sobre as superfícies e da área de cobertura destas superfícies por pré-osteoblastos foram realizadas à microscopia eletrônica de varredura. Observou-se aumento do número de células aderidas às superfícies com o tempo, independentemente de haver condicionamento ou de seu tempo de aplicação. Entretanto, essa diferença só foi estatisticamente significativa intragrupos ($p < 0,05$) e quando comparados os períodos de 24 e 72 horas de incubação. A área de cobertura das superfícies por células aumentou significativamente com o tempo somente nos grupos teste, também entre os períodos de incubação de 24 e 72 horas ($p < 0,01$). O grupo controle apresentou-se com 50% ou menos de área de cobertura superficial em relação aos demais. A duração de aplicação do ácido não interferiu significativamente nesse parâmetro de avaliação, mas nos grupos 15 e 30, a área de recobrimento ósseo mais do que triplicou às 72 horas em relação às 24 horas ($p < 0,01$), com cerca de 70% das superfícies cobertas por células, contra 30% no grupo controle. Conclui-se que a desmineralização óssea nos tempos de condicionamento estudados propicia um substrato sobre o qual as células pré-osteoblásticas adquirem morfologia compatível com estágio de diferenciação mais avançado, promovendo maior cobertura de área, o que aumenta o potencial para deposição de novo osso sobre essas superfícies em comparação ao tecido não condicionado.

Palavras-Chave: Cultura de células, condicionadores de tecido, ácido cítrico, enxerto ósseo, microscopia eletrônica de varredura, osteoblastos.

Abstract

ABSTRACT

Results of previous research has found increased potential for the consolidation of bone grafts by demineralization of the graft material and / or areas of consolidation. However there is a lack of foundation supported by biological evidence of benefits from such procedures. To test this hypothesis, the bone tissue of the calvaria of guinea pigs (*Cavia porcellus*) were exposed to conditioning by citric acid for 15, 30, 90 and 180 seconds (test group). Forty-five bone disks measuring three millimeters in diameter were removed from the animals, of which 36 were conditioned with citric acid pH 1 to 50% and nine did not receive conditioning (control group). About nine disks in each group were pre-cultured with MC3T3-E1 osteoblasts for 24, 48 and 72 hours (three discs of each group at each time point). Analysis of cell morphology, number of cells attached on the surface and the coverage area of these surfaces by pre-osteoblasts were performed on scanning electron microscopy. There was an increase in the number of cells attached to surfaces over time, regardless of conditioning or application time. However, this difference was not statistically significant intra-group ($p < 0.05$) when comparing the periods of 24 and 72 hours of incubation. The coverage area of the surfaces of cells increased significantly with time only in the test groups, also among the incubation periods of 24 and 72 hours ($p < 0.01$). The control group presented with 50% or less of surface area coverage compared to the other. The duration of application of the acid did not affect significantly this parameter of evaluation, but in groups 15 and 30, the bone area covered more than tripled from 24 to 72 hours ($p < 0.01$), with about 70 % of the area covered by cells, versus 30% in the control group. It was concluded that bone demineralization in the studied conditioning times provides a substrate on which cells acquire pre-osteoblastic morphology compatible with more advanced stage of differentiation, promoting greater coverage area, which increases the potential for deposition of new bone on these surfaces compared to the tissue-air basis.

Key words: cell culture, tissue conditioners, citric acid, bone graft, scanning electron microscopy, osteoblasts.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Obtenção das amostras ósseas. Em A, observa-se o tegumento da calvária após tricotomia e o formato da incisão para exposição da calota craniana; em B nota-se o descolamento do retalho de forma a não deixar fibras remanescentes sobre a superfície óssea, exposta totalmente em C, onde se nota o posicionamento da trefina; Em D nota-se a calvária com as amostras removidas; nota-se, em E, os limites definidos pela ação da broca trefina e a integridade da amostra; em F, notam-se as amostras ósseas depositadas em uma placa para cultura de células 38
Figura 2	Distribuição dos grupos experimentais na placa de 24 poços 40
Figura 3	Fotomicrografia eletrônica de varredura de um espécime com as regiões empregadas para as análises quantitativas destacadas em amarelo 42
Figura 4	Fotomicrografia eletrônica de varredura obtida de um espécime do Grupo 15, com 72 horas de incubação, área da imagem 01, representando o método empregado para a contagem de células. A divisão da fotografia em quatro campos possibilitou a contagem sistematizada, iniciando no campo superior esquerdo (do observador) e seguindo o sentido anti-horário dos campos. 43
Figura 5	Tela do programa Image J utilizado para avaliação da área de superfície óssea recoberta por células. A esquerda nota-se a janela onde estão listados os valores para a medidas da área total da imagem e das células. No centro, a imagem microscópica sem a legenda, com uma área de uma célula delimitada (destacada em linha contínua amarela). Sobre a imagem a barra de ferramentas e no topo da tela a barra de menus do programa Image J. 44
Figura 6	Gráfico 1 49
Figura 7	Gráfico 2..... 50
Figura 8	Espécimes representativos do grupo C às 24, 48 e 72 horas, nos quais se verificam as características morfológicas celulares..... 51

Figura 9	Espécimes representativos do grupo 15 às 24, 48 e 72 horas, nos quais se verificam as características morfológicas celulares.....	52
Figura 10	Espécimes representativos do grupo 30 às 24, 48 e 72 horas, nos quais se verificam as características morfológicas celulares.....	53
Figura 11	Espécimes representativos do grupo 90 às 24, 48 e 72 horas, nos quais se verificam as características morfológicas celulares.....	54
Figura 12	Espécimes representativos do grupo 180 às 24, 48 e 72 horas, nos quais se verificam as características morfológicas celulares.....	55
Figura 13	Espécimes representativos do grupo L às 24, 48 e 72 horas, nos quais se verificam características morfológicas celulares de viabilidade.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Valores médios da contagem das células por unidade de área	49
Tabela 2	Área média (%) de superfície óssea recoberta por células osteoblásticas cultivadas após os diferentes períodos de tempo entre os grupos de estudo.....	50

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1	Plausibilidade biológica da desmineralização de tecidos duros	23
2.2	Modificação da topografia superficial de tecidos mineralizados e de biomateriais e seus efeitos sobre osteoblastos	26
3	PROPOSIÇÃO.....	31
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1	Amostra.....	37
4.2	Procedimento Cirúrgico	37
4.3	Tratamento Ácido dos Discos Ósseos	38
4.4	Cultura de Células Pré-osteoblásticas.....	39
4.5	Microscopia Eletrônica de Varredura	41
4.5.1	Fixação das amostras	41
4.5.2	Desidratação das amostras	41
4.5.3	Metalização das amostras.....	41
4.5.4	Análise das imagens.....	42
4.5.4.1	Análise Quantitativa	43
4.5.4.1.1	Quantidade de células aderidas por unidade de área	43
4.5.4.1.2	Área da superfície óssea recoberta por células.....	44
4.5.4.2	Análise Morfológica	45
4.6	Análise dos resultados.....	45
5	RESULTADOS	47
5.1	Contagem de células por unidade de área	49
5.2	Análise da área de superfície recoberta por células.....	50
5.3	Análise Morfológica	51

5.3.1	Grupo Controle	51
5.3.2	Grupo 15.....	52
5.3.3	Grupo 30.....	53
5.3.4	Grupo 90.....	54
5.3.5	Grupo 180.....	55
5.3.6	Grupo L.....	56
6	DISCUSSÃO	57
7	CONCLUSÕES.....	65
	REFERÊNCIAS.....	69

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

O uso de substâncias ácidas em Odontologia não é recente. Há mais de meio século, o trabalho de Buonocore (1955) apresentou um método simples para aumentar a adesão da resina acrílica à superfície de esmalte, onde se verificou que essa adesão era maior quando o esmalte era desmineralizado com ácido fosfórico a 85% por 30 segundos, do que sem desmineralização. O fenômeno foi explicado pelo grande aumento da área de superfície após o condicionamento ácido, permitindo assim, contato íntimo da resina acrílica com o esmalte. Antes disso, Stewart, em 1889, na tentativa de eliminar bactérias de sítios periodontais, já preconizava o uso de ácido clorídrico ou sulfúrico na superfície radicular (STEWART, 1889) estabelecendo-se como um pioneiro para que outros estudos surgissem no campo da biomodificação de superfícies de dentina e cimento (SELVIG et al., 1981; BAL; EREN; BALOS, 1990; HERITIER, 1983; LABAHN et al., 1992; PITARU et al., 1984; SELVIG; HALS, 1977) e paralelamente, na desmineralização de enxertos alógenos (URIST, 1965; URIST et al., 1968; LEWANDROWSKI et al., 1997) com o objetivo de potencializar os processos reparativos em tratamentos cirúrgicos.

Em Periodontia, o condicionamento ácido de superfícies radiculares proporciona a remoção da smear-layer resultante da raspagem (REGISTER, 1973; REGISTER; BURDICK, 1975; BLOMLÖF et al., 2000; HERITIER, 1983.), descontaminação de superfície (BAL; EREN; BALOS, 1990), liberação de fatores que atuam na cicatrização dos tecidos periodontais (POLSON; PROYE, 1983) e criação de um substrato que privilegie a seleção de células nos eventos de reparação. (REGISTER, 1973; REGISTER; BURDICK, 1975; PITARU et al., 1984 a e b).

Vários trabalhos mostram que a reparação de tecidos duros (dentina e osso) inicia-se pela proliferação de células clásticas, que utilizam substâncias ácidas para eliminar a fase mineral dos tecidos, expondo o conteúdo proteico, após o quê, se inicia a fase de deposição de novo tecido. (HEATH et al., 1984; LEWANDROWSKI et al., 1997; LI; ZHANG; KIRNERS, 2003; LORENZO et al., 1992; POLSON; PROYE, 1983).

Com base nesse princípio biológico, Urist, em 1965, foi quem primeiro sugeriu que a exposição de proteínas da dentina por desmineralização induziria a formação de novo osso por autoindução, quando implantada ectopicamente (URIST et al., 1968). O tratamento ácido

também em tecido ósseo é empregado no processo de liofilização, que teoricamente facilitaria a liberação de proteínas ósseo-indutoras, embasando os princípios biológicos dos enxertos com osso liofilizado humano desmineralizado particulado (LEWANDROWSKI et al., 1997; LI; ZHANG; KIRNERS, 2003; ENNEKING; MINDELL, 1991).

O efeito benéfico da desmineralização do leito receptor ósseo e dental na consolidação de enxertos de tecidos duros e moles tem sido observado tanto em procedimentos de regeneração de defeitos periodontais, como de recobrimento de raízes (CLAFFEY et al., 1987; ADRIAENS; ADRIAENS, 2004; ALBAIR. COBB; KILLOY, 1982; BAKER et al., 2000; BLOMLÖF et al., 2000.). A desmineralização ácida também proporciona a liberação de enzimas proteolíticas chamadas metaloproteinases da matriz (MMPs) das quais a osteogênese e a remodelação óssea são dependentes, uma vez que osteoblastos e osteoclastos expressam MMPs (ACCORSI-MENDONÇA et al., 2008). A elas se atribui participação nos processos de formação e remodelação óssea, salientando que as MMPs-2 e -9, na forma ativa ou inativa, são expressas por células osteogênicas e do tecido conjuntivo durante as diferentes etapas da regeneração óssea alveolar, na substituição do coágulo sanguíneo por tecido conjuntivo, durante a formação, na maturação e na remodelação de novo osso. (ACCORSI-MENDONÇA et al., 2008; COOK et al., 1995).

A desmineralização do tecido ósseo expõe sua matriz orgânica, que contém os fatores responsáveis pela síntese de novo osso (URIST et al., 1968), os quais se constituem nos princípios biológicos da regeneração conseguida por meio do uso de osso liofilizado desmineralizado. Esses fatores, presentes exclusivamente na matriz orgânica do tecido ósseo, são fatores de crescimento próprios desse tecido, pertencentes à superfamília do fator de crescimento transformador (TGF), chamados de proteínas morfogenéticas ósseas (RIPAMONTI; REDDI, 1992). É de se supor que a desmineralização do tecido ósseo a ser enxertado e do leito receptor poderia expor fibras colágenas, favorecendo a incorporação do enxerto ao leito receptor, além de estimular a neo-osteogênese por expor as proteínas morfogenéticas ósseas.

Da mesma maneira que em raízes dentais, também tem sido aplicada a desmineralização em tecido ósseo com o objetivo de modificar as propriedades dos blocos de enxertos ósseos corticais, expondo proteínas e outros elementos da fase orgânica da matriz. O primeiro trabalho a empregar o princípio da desmineralização óssea *in situ* das superfícies de contato em enxertos ósseos em bloco *onlay* foi o realizado em cobaias por Rezende (2008)

que observou que nos espécimes tratados com ácido houve aumento da formação e densidade de novo osso na interface enxerto-leito, assim como da extensão das superfícies de consolidação óssea. A análise dos resultados permitiu a conclusão de que essa nova abordagem de tratamento do bloco e da superfície óssea receptora foi efetiva na promoção da osteogênese na interface e na aceleração da consolidação desses enxertos.

Os achados de Rezende (2008) motivaram a hipótese central deste trabalho, que objetiva buscar subsídios para o procedimento de desmineralização óssea, procurando esclarecer os fenômenos biológicos consequentes a esta ação. Para tal, foi realizado um estudo sobre o comportamento de células pré-osteoblásticas cultivadas sobre superfícies ósseas expostas à desmineralização em tempos diferentes por ácido cítrico pH 1.

2 Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Plausibilidade biológica da desmineralização de tecidos duros

A idéia de alterar superfícies sobre as quais células osteoprogenitoras possam migrar, se diferenciar e produzir tecido mineralizado não é recente, tornando-se a base a partir da qual se desenvolveram métodos destinados a modificar química e fisicamente superfícies de raízes dentais expostas à doença periodontal, tornando-as receptivas à adesão celular e otimizando a reparação dos tecidos periodontais. Entre esses métodos, os agentes desmineralizantes ácidos mostram-se mais efetivos e mais estudados.

Urist, em 1965 foi o primeiro autor a demonstrar que a matriz óssea desmineralizada (DBM) induz o desenvolvimento de osso em defeitos ósseos e em áreas extra-esqueléticas. Implantou, ectopicamente, em camundongos e ratos, matriz óssea derivada de osso cortical bovino, recém-preparada e desmineralizada em ácido clorídrico 0,6N. Seu experimento demonstrou formação óssea no interior do tecido muscular dos animais. A partir de análise microscópica e bioquímica, verificou que a DBM primeiro induz a formação de células cartilaginosas, que se submetem a uma sequência endocondral de diferenciação levando à formação de osso, tanto em áreas ósseas como em áreas de tecido mole. Concluiu que a DBM, e citocinas específicas isoladas a partir dela, às quais chamou de proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs), induzem a formação de osso em áreas ectópicas. Em 1970, Urist e colaboradores, vieram a confirmar que a desmineralização ácida do osso ou dentina induz a formação de osso quando implantados intramuscularmente e subcutaneamente e ainda sugeriu que o processo de desmineralização libera BMPs da matriz óssea, permitindo que estes fatores induzam células estromais dos tecidos adjacentes a se diferenciarem em osteoblastos. Também ficou demonstrado que as BMPs agem em células mesenquimais indiferenciadas para formar osso endocondral dentro de 21 dias depois da sua implantação, induzindo seu recrutamento, diferenciação em condroblastos, formação de cartilagem, penetração vascular e finalmente formação óssea. Um dado relevante apontado por Urist e Iwata, em 1973, é que as BMPs foram degradadas a 25° C dentro de 24 horas depois que o osso foi removido do corpo.

Além das propriedades citadas nesses estudos, segundo Wosney e colaboradores, em 1988, a DBM ainda apresenta difusibilidade de BMPs e de outras citocinas que interagem com células precursoras osteogênicas do leito hospedeiro e fazem com que elas se

diferenciem em elementos osteogênicos funcionalmente ativos, podendo alcançar distâncias significantes ao longo das superfícies de contato das células com a matriz óssea. Urist e colaboradores, em 1977, demonstraram em câmaras de difusão que estas distâncias eram de até 1000µm e Rabie e Lie Ken Jie, em 1996, encontraram ser essa difusibilidade de BMPs a partir da DBM, o fator contribuinte para as diferenças que encontraram entre enxertos endocondrais e os mesmos enxertos tratados com DBM. Estes autores preencheram defeitos críticos em crânio de coelhos com osso endocondral (EC), DBM, ou combinação de ambos. Após 2 semanas, nos enxertos EC a reparação ficou localizada na interface enxerto/leito, enquanto que nos enxertos combinados, a amalgamação do novo osso com EC/DBM progrediu através de toda a largura e profundidade do defeito, unindo o enxerto ao leito. A quantidade de novo osso formado foi significativamente maior (47%) no grupo composto do que no EC, levando-os a concluir que a DBM em pó aumenta a capacidade de indução do leito receptor e também do enxerto.

Além dos estudos sobre o potencial osteogênico das matrizes ósseas desmineralizadas, outros trabalhos preocuparam-se em testar a ação dos diferentes métodos de desmineralização de enxertos ósseos. O'Donnell e colaboradores, em 1996, com o objetivo de entender e melhorar o processo de osteogênese em enxertos autógenos e alógenos, desenvolveram modelo experimental usando discos ósseos da calvária de ratos preparados com desmineralização por HCl a 0,5M por 3 horas e perfuração a laser de érbio no modo pulsado com 2,94µm de comprimento de onda, com a produção de orifícios de 0,5mm de diâmetro. Foram analisados 4 tipos de discos ósseos: não tratados (tipo I), desmineralizados (tipo II), tratados a laser (tipo III) e tratados a laser e depois desmineralizados (tipo IV). Os discos foram transplantados para o ambiente subcutâneo de ratos adultos e acompanhados por 6 semanas. A análise histológica em intervalos semanais confirmou a presença de crescimento de novo osso nos discos tipo II e IV. A quantidade de novo osso em cada disco foi determinada pelo coeficiente de atenuação mineral por raio-X, que é proporcional à densidade mineral, a partir de radiografias digitalizadas dos discos. Os resultados mostraram que os processos de desmineralização e de perfuração a laser seguida de desmineralização foram eficientes em aumentar o crescimento de novo osso. Além disso, ressaltaram que a ablação a laser associada à desmineralização branda apresentou a vantagem de permitir a manutenção da integridade estrutural enquanto altera a geometria superficial de forma a promover o crescimento de novo osso dentro dos orifícios, sem alterar sua resistência.

Em 1997, Lewandrowski e colaboradores estudaram os efeitos da desmineralização parcial de enxertos alógenos com ácido clorídrico a 0,5M e da produção de perfurações de 0,33mm de diâmetro com laser pulsado de érbio com comprimento de onda de 2,94μm em osso cortical diafisal de tíbia de ratos. Seis tipos de enxertos foram analisados: não tratado (tipo I), desmineralizado a 25μm de profundidade (tipo II), desmineralizado a 150μm de profundidade (tipo III), perfurados a laser (tipo IV), perfurados a laser e depois desmineralizados a 25μm de profundidade (tipo V) e perfurados a laser e depois desmineralizados a 150μm de profundidade (tipo VI). Os enxertos foram ortotopicamente colocados na tíbia de ratos adultos e acompanhados por 4 meses. A avaliação microscópica realizada 1 e 4 meses após confirmou o crescimento de novo osso nos enxertos tipos II, III, V e VI. A quantidade de crescimento foi estimada pela comparação da densidade mineral antes da implantação com os valores obtidos depois da remoção do bloco. Os resultados demonstraram que os processos de desmineralização parcial extensa e perfuração a laser com desmineralização parcial mínima aumentaram significativamente o crescimento ósseo. O processo de crescimento ósseo para dentro do enxerto e na interface não foi observado nos espécimes controle não tratados, os quais, aos 16 dias de pós-operatório, estavam envolvidos apenas por tecido fibro-inflamatório. Nos enxertos que foram preparados apenas com perfurações a laser houve reabsorção nas perfurações, já que foi observado um alargamento subsequente das mesmas. A desmineralização mínima isolada resultou predominantemente em calo endocondral e formação óssea periosteal, enquanto que a desmineralização intensa produziu principalmente a formação de osso imaturo. A histomorfometria mostrou *turnover* ósseo mais avançado (reabsorção e formação) também nos espécimes tratados com desmineralização mais profunda (tipo III) e pela perfuração a laser associada à desmineralização profunda (tipo VI). Da mesma forma, a nova formação óssea na interface enxerto-leito ocorreu com mais frequência nesses dois tipos de enxertos. Argumentaram que o tratamento proposto de perfuração a laser e desmineralização parcial, ou ambos, além de eficientes na estimulação da osteogênese, podem manter a resistência original do osso.

Embora a implantação de BMPs da forma como empregada em todos esses estudos induza a formação óssea, foi defendido por Canter, Vargel e Mavili, em 2007, que, no uso terapêutico, os fatores de crescimento necessitam de um carreador que garanta a liberação local de BMPs, caso contrário, elas podem ser rapidamente absorvidas antes de instituir seu efeito. Por isso, preconizaram o uso de autoenxertos e aloenxertos medulares associados à matriz óssea desmineralizada para associar as propriedades osteoindutoras da DBM e seu

conteúdo de BMPs com as propriedades osteocondutoras dos enxertos. Alegaram que, embora os enxertos ósseos autógenos carreguem todos os elementos essenciais dos substitutos ósseos, como células-tronco osteogênicas, o enxerto não vascularizado depende da *creeping substitution* para regenerar novo osso. Explicaram que, assim que o enxerto ósseo autógeno é transplantado, a viabilidade dos osteócitos é inicialmente mantida por difusão de nutrientes do microambiente hospedeiro circundante. Ocorre necrose central e, a partir do hematoma da ferida, começa uma resposta inflamatória dentro dos primeiros dias, que pode persistir por um ano ou mais. Em casos clínicos nos quais a microcirculação está diminuída, a difusão de nutrientes é reduzida, podendo haver falência tecidual no centro do enxerto dependendo do seu tamanho e maior risco de fracasso. Apresentaram 3 casos clínicos nos quais reconstruções mandibulares foram feitas com enxerto não vascularizado de osso ilíaco misturado com DBM alógena como fonte de BMPs e obtiveram aumento da capacidade de reparação do autoenxerto.

Já a desmineralização da dentina, produziu efeitos na osteogênese e na estimulação da diferenciação de células mesenquimais em condroblastos, como demonstrado por Somerman e colaboradores, em 1987. Os autores verificaram, *in vitro*, que a dentina humana desmineralizada é osteoindutora e possui a capacidade de estimular a diferenciação de células não condrogênicas em condrócitos quando incubada com células mesenquimais indiferenciadas extraídas de músculo de embriões de ratos. Os autores sugeriram que durante a desmineralização são liberados e/ou ativados fatores estimulantes da resposta osteogênica dos osteoblastos.

2.2 Modificação da topografia superficial de tecidos mineralizados e de biomateriais e seus efeitos sobre osteoblastos

Com relação às características superficiais de biomateriais são abundantes os estudos que descreveram o comportamento de osteoblastos e células pré-osteoblásticas em cultura sobre superfícies de variadas composições e texturas. Esses estudos abordam, na sua maioria, superfícies metálicas de implantes e arcabouços para engenharia tecidual. Na literatura recente, não foram encontrados trabalhos sobre crescimento e diferenciação de osteoblastos sobre superfície óssea. Entretanto, os estudos selecionados apresentam aspectos

metodológicos e constatações sobre o comportamento celular importantes para o entendimento e discussão dos dados que estão sendo apresentados nesta tese.

A proliferação e diferenciação de osteoblastos sobre dentina desmineralizada puderam ser observadas por Schwartz et al. (2000) que aplicaram, três tipos de tratamento de superfície sobre fragmentos de dentina mecanicamente polidos: 1) desmineralização por tetraciclina hidrocloreada (TCN); 2) incubação com células de medula óssea de camundongo para criar uma superfície com cavidades de reabsorção produzidas por osteoclastos (OC) e 3) nenhum tratamento. Foram usados os métodos de perfilometria, espectroscopia eletrônica de raios-X (XPS) e microscopia eletrônica de varredura (SEM) para avaliar as 3 superfícies quando cultivadas com células osteoblásticas humanas MG63. Os eventos avaliados foram: proliferação (número de células) e diferenciação (atividade específica de fosfatase alcalina de células isoladas, de lisados de camadas de células e produção de osteocalcina); comparação da produção local de TGF- β 1 e PGE2 entre os tipos de tratamento. A perfilometria mostrou que as superfícies polidas e as tratadas com TCN estavam lisas e com valores de rugosidade superficial média (Ra) comparáveis, enquanto que as superfícies OC estavam levemente mais rugosas devido às cavidades de reabsorção que cobriam 3,7% da superfície total da dentina. As medidas de XPS mostraram que o tratamento por TCN reduziu por dissolução o conteúdo de Ca e P da superfície. A reabsorção osteoclástica também reduziu o conteúdo de Ca e P, mas em menor extensão. A proliferação de células MG63 sobre dentina polida e sobre poliestireno para cultura de tecido foi equivalente e menor do que as cultivadas nas superfícies tratadas por TCN e OC. Neste estudo, os autores encontraram que o comportamento das células frente a uma cavidade de reabsorção osteoclástica é semelhante ao manifestado após o tratamento com tetraciclina. Entretanto, como as cavidades reabsorptivas ocuparam somente 3,7% da superfície total, para haver esta equiparação foi necessária uma resposta mais intensa das células MG63 à superfície OC do que à tratada com tetraciclina. Todos os efeitos foram mais intensos na superfície TCN (maior diminuição na produção de osteocalcina, aumento na produção de TGF- β 1 e PGE2). Os autores comentaram que o aumento de TGF- β 1 pode ter sido responsável em parte pela marcada inibição da produção de osteocalcina, o que promoveu os eventos precoces da maturação de osteoblastos e inibiu a diferenciação terminal dessas células. De forma semelhante, os níveis de PGE2 produzidos pelas células MG63 sobre as superfícies tratadas por tetraciclina promoveram a expressão fenotípica dos osteoblastos. Frente a esses resultados, os autores concluíram que a desmineralização da superfície da dentina promove a proliferação de osteoblastos e eventos

de diferenciação precoce (como produção de fosfatase alcalina e de mediadores autócrinos como PGE2 e TGF- β 1) e diminuição de eventos de diferenciação tardia (como produção de osteocalcina). Sugeriram que resultados clínicos ótimos podem ser conseguidos com procedimentos que imitem a topografia física e química da superfície criada pela reabsorção osteoclástica normal.

Para estudar em que escala a produção de rugosidades superficial seriam benéficas para o comportamento celular, Guo et al (2007) realizaram culturas primárias de osteoblastos humanos (HOBs) sobre dois tipos de hidroxiapatita: uma de partículas manométricas e outra de partículas micrométricas. Depois de 90 minutos de incubação, a densidade celular sobre a superfície manométrica foi significativamente mais alta do que na micrométrica e na lamínula de vidro usada como controle. Depois de 7 e 14 dias, a mineralização também foi maior naquela superfície do que nas demais. A morfologia celular nos dois tipos de hidroxiapatita era tridimensional, enquanto que no vidro era achatada. Na superfície manométrica, mais rugosa, as células mostraram-se mais estreladas do que nas micrométricas denotando uma superfície mais propícia para inserção.

Também de Angelis et al (2008) estudaram a inserção, morfologia, proliferação atividade metabólica, diferenciação e mineralização de células osteoblásticas (SaOS-2) sobre uma cobertura bioativa para a superfície de implantes de titânio na qual foi depositada uma camada espessada de óxido com altos níveis de cálcio e fósforo simulando a fase mineral óssea recém-depositada. Após 6, 24 e 48 horas e de 4 dias do cultivo, as superfícies foram avaliadas à MEV. Verificaram que as células começaram a se aderir sobre os materiais pouco tempo depois de serem semeadas (6 horas) e de forma heterogênea, sendo algumas alongadas, outras poligonais ou arredondadas. Sua morfologia era típica de osteoblastos, com um núcleo central esférico com o citoplasma se estendendo para longe da área central em todas as direções e se aderindo às superfícies com protrusões filamentosas. Em comparação a superfícies de titânio sem tratamento ou tratadas por ataque ácido, a cobertura bioativa apresentou maior número de nódulos ósseos e maior área de mineralização, o que os levou a concluir que essa é uma boa superfície para inserção e proliferação de osteoblastos.

A zircônia como cobertura de superfícies de implantes passou a ser bastante estudada com o mesmo objetivo. Setzer et al (2009) acompanharam uma cultura primária de osteoblastos humanos (hFOB 1.19) por até 28 dias para detectar a resposta fenotípica dessas células a superfícies de materiais de diferentes rugosidades (titânio e zircônia). Observaram

que a proliferação celular foi reduzida em superfícies mais rugosas e não observaram diferenças na diferenciação dessas células em comparação a superfícies lisas. Os resultados aparentemente conflitantes com outros estudos foram explicados pela falta de uniformidade metodológica, já que cada estudo utiliza uma linhagem diferente de células.

Hempel et al. (2010) cultivaram células SAOS-2 em superfícies de titânio e de zircônia de diferentes topografias de superfície (jateada e jateada com ataque ácido) e observaram à MEV e microscopia fluorescente seu comportamento após 24 e 48 horas. Observaram espalhamento mais rápido e maior número de células aderidas após 24 sobre a zircônia do que sobre o titânio. As células foram vistas mantendo contato umas com as outras sobre a zircônia, enquanto que no titânio elas se espalharam, mas em menor extensão e a maioria delas permaneceram arredondadas e pequenas após 2 e 24 horas. A diferenciação celular e a atividade de fosfatase alcalina foram mais benéficamente influenciadas também pela zircônia.

Já San Miguel et al (2010) estudaram a atividade osteoblástica sobre superfícies de vidro bioativo. As superfícies foram incubadas com fluido corporal sérico comercialmente preparado durante 4 ou 8 dias, com o objetivo de depositar duas camadas de apatita semelhante ao osso, mas de topografias e rugosidades diferentes. Células pré-osteoblásticas MC3T3-E1 foram cultivadas sobre essas superfícies por 4 semanas. Às 24 horas, os autores verificaram em MEV, maior proliferação celular e morfologia celular mais circular e achatada nas superfícies não tratadas do vidro bioativo (lisas), enquanto que nas superfícies tratadas (tanto por 4 ou 8 dias), elas estavam mais alongadas, fusiformes, mais espessas, com processos celulares mais irregulares, cuja filopodia criava contatos individuais com a superfície e pontos de ancoragem para a adesão celular. Análises de maturação precoce (atividade de fosfatase alcalina) e tardia (deposição de cálcio) demonstraram que, depois de 1 semana, a atividade celular era duas vezes maior nas superfícies tratadas do que nas não tratadas. Os autores consideraram a hipótese de que as células empregadas são sensíveis a alterações de superfície, sendo que as superfícies rugosas promoveriam maturação maior e crescimento menor dessas células.

Trombelli et al (2010) investigaram os efeitos de três diferentes superfícies de hidroxiapatita (HA/BiostiteTM, SINTlifeTM e Bio-OssTM) sobre três tipos de culturas de osteoblastos humanos (hOBs, SaOS-2 e Hobit) cultivados por 4 dias nessas superfícies. À MEV, observaram que as células não se espalharam bem sobre as superfícies e não

estabeleceram contatos entre elas, mas cresceram mais na superfície HA/BiostiteTM, conforme verificado pelo cálculo da taxa de proliferação. Esse tipo de superfície também produziu maior diferenciação celular conforme demonstrado pela diminuição na atividade da fosfatase alcalina nessas células.

3 Proposição

3 PROPOSIÇÃO

O trabalho se justifica pela necessidade de caracterizar a morfologia da superfície óssea após o condicionamento com ácido cítrico e o comportamento de células pré-osteoblásticas frente a esse condicionamento.

Os objetivos deste trabalho foram:

- a. Descrever a morfologia celular após o condicionamento ósseo com ácido cítrico a 50%, pH 01 em 4 diferentes tempos de aplicação, através de imagens obtidas pela microscopia eletrônica de varredura (MEV);
 - b. Comparar a quantidade de células aderidas às superfícies ósseas desmineralizadas com as não desmineralizadas nos tempos de incubação de 24, 48 e 72 horas;
 - c. Comparar a área de superfície óssea recoberta por essas células nos mesmos períodos entre os grupos.
-

4 Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostra

Foram utilizados 09 cobaias adultos albinos (*Caviaporcellus*) de 500g aproximadamente de peso, criados e mantidos no Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.

4.2 Procedimento Cirúrgico

Após pré-anestesia com cloridrato de xilasina (Anasedan, Vetbrands, Jacareí/SP) a uma dose de 0,1ml/Kg de peso corporal, seguido por cloridrato de ketamina (Dopalen, Vetbrands, Jacareí/SP) a uma dose de 0,5 ml/Kg de peso, foi feita a tricotomia na região frontoparietal dos animais. Nesta região foi realizada antissepia com digluconato de clorexidina a 2% (Chlorohex, JohnsonDiversey, São Paulo) e realizada infiltração local de xilocaína a 2% com norepinefrina 1:50000 (MerrellLepetit Farmacêutica e Industrial, LTDA.) com o objetivo de promover vasoconstricção prévia à incisão e assim, diminuir o sangramento. Os animais foram cobertos com campos cirúrgicos estéreis descartáveis e a partir deste momento os procedimentos foram realizados de forma a manter a cadeia asséptica. O tegumento da linha média recebeu uma incisão semi-lunar com lâmina de bisturi no.15 (Lamedid Comercial e Serviços Ltda. Barueri, SP) até atingir o periósteo. A partir desta incisão, um retalho total foi levantado para exposição da cortical óssea da calota craniana da qual, com uma broca trefina de 3,0mm de diâmetro interno em baixa rotação e sob irrigação profusa com solução isotônica de cloreto de sódio a 0,9%, foram removidos 05 discos ósseos bicorticais (Figura 01) de cada animal, após o que, os animais sofreram eutanásia com sobredose de anestésico.

Figura 1 – Obtenção das amostras ósseas. Em A, observa-se o tegumento da calvária após tricotomia e o formato da incisão para exposição da calota craniana; em B nota-se o descolamento do retalho de forma a não deixar fibras remanescentes sobre a superfície óssea, exposta totalmente em C, onde se nota o posicionamento da trefina; Em D nota-se a calvária com as amostras removidas; nota-se, em E, os limites definidos pela ação da broca trefina e a integridade da amostra; em F, notam-se as amostras ósseas depositadas em uma placa para cultura de células

4.3 Tratamento Ácido dos Discos Ósseos

Imediatamente após sua obtenção, os 45 discos ósseos foram transferidos para placas de 24 poços empregando pinça estéril de forma a possibilitar a sua divisão nos seguintes grupos de tratamento:

Grupo C (controle positivo) – nove discos que receberam apenas lavagem com soro fisiológico;

Grupo 15 – nove discos que foram condicionados por ácido cítrico pH 1 a 50% por 15 segundos;

Grupo 30 – nove discos que foram condicionados por ácido cítrico pH 1 a 50% por 30 segundos;

Grupo 90 – nove discos que foram condicionados por ácido cítrico pH 1 a 50% por 90 segundos;

Grupo 180 – nove discos que foram condicionados por ácido cítrico pH 1 a 50% por 180 segundos.

Os espaços medulares entre as corticais de cada disco não puderam ser selados fisicamente com algum tipo de barreira (cera óssea, resina acrílica ou adesivo a base de cianocrilato) e o tecido foi coagulado pelo condicionamento ácido.

4.4 Cultura de Células Pré-osteoblásticas

As células utilizadas para o experimento foram pré-osteoblastos da linhagem MC3T3 – E1 (subclone 4 – CRL-2593) (ATCC – Manassas, Virginia, EUA) armazenados e estocados em nitrogênio líquido no Departamento de Bioquímica da FOB-USP. Todos os procedimentos laboratoriais foram realizados em uma capela de fluxo laminar acoplada a um sugador Nevoni de alta potência. As células foram incubadas em ambiente úmido a 37°C, numa atmosfera contendo 95 % de ar e 5 % de dióxido de carbono. Após o subcultivo para frascos de 75cm², as células foram armazenadas em estufa até atingirem nova subconfluência e serem utilizadas nos experimentos.

Os pré-osteoblastos foram cultivados em meio de cultura (MEM) adicionado de 10% de soro fetal bovino, 2% de solução antibiótica e antimicótica e 8 nucleosídeos (adenosine, cytidine, dioxycytidine, deoxycytidine, deoxyguanosine, guanosine, thynidine e viridine). Quando as células atingiram a subconfluência, foram utilizadas para o plaqueamento.

Foram plaqueadas 10⁴ células em cada poço das placas de cultura contendo um disco ósseo cada um (réplicas em triplicata). Foi utilizada uma placa para cada período

experimental de 24, 48 e 72h onde os discos foram organizados de forma a permitir a divisão (Figura 2):

- 1^a. Coluna – contendo os 3 discos do grupo C + células;
- 2^a. Coluna – contendo os 3 discos do grupo 15 + células;
- 3^a. Coluna – contendo os 3 discos do grupo 30+ células;
- 4^a. Coluna – contendo os 3 discos do grupo 90 + células;
- 5^a. Coluna – contendo os 3 discos do grupo 180 + células;
- 6^a. Coluna – controle negativo (grupo L), contendo 3 lamínulas de vidro +células.

Figura 2: Distribuição dos grupos experimentais na placa de 24 poços

Finalizados os períodos de incubação, os discos foram preparados para microscopia eletrônica de varredura.

4.5 Microscopia Eletrônica de Varredura

4.5.1 Fixação das amostras

Após os períodos de incubação, o meio de cultura foi removido dos poços e as amostras foram fixadas com solução de Karnovsky modificado, que consiste em glutaraldeído 2,5%, formaldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,05M, pH 7,2, CaCl_2 0,001M, com um volume de dez vezes o da amostra, aproximadamente 800 μL . Após o período de 1 hora, a solução foi removida e as amostras foram lavadas usando o cacodilato de sódio em três passagens de 10 minutos cada uma, novamente utilizando um volume dez vezes superior ao da amostra. Removido o tampão cacodilato, as amostras foram pós-fixadas imersas em solução de tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato 0,05M, pH 7,2, por 1 hora.

4.5.2 Desidratação das amostras

Após o final do período da pós-fixação, a solução de tetróxido de ósmio foi removida e as amostras foram submetidas a três lavagens em concentrações crescentes de álcool (30, 50, 70, 90, 96 e 100%), permanecendo no mínimo 10 minutos em cada passagem. Ao final da desidratação com o álcool as placas foram novamente seladas e encaminhadas ao Laboratório de Microscopia Eletrônica da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, UNICAMP, onde passaram por secagem ao ponto crítico.

4.5.3 Metalização das amostras

Estando as amostras fixadas e devidamente desidratadas foram preparadas para a metalização com ouro. As amostras que receberam a cultura de células foram separadas por grupo experimental (“C”, “15”, “30”, “90”, “180” e “L”) e foram coladas em “stubs” para microscopia eletrônica de varredura. Foram devidamente identificadas com fitas de carbono dupla face e acondicionadas no metalizador.

Após receberem a camada de ouro os “stubs” foram acondicionados em caixa vedada contendo sílica para controlar a umidade até o momento da análise ao microscópio.

4.5.4 Análise das imagens

As imagens da MEV foram obtidas em um microscópio JSM 5600 LV da JEOL (Tóquio, Japão), no setor de Microscopia Eletrônica de Varredura da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP. O microscópio foi regulado em 25 Kv, em um aumento de 400 vezes. Cada amostra recebeu leituras em cinco campos diferentes: quatro nas bordas e um no centro (Figura 3).

Figura 3 – Fotomicrografia eletrônica de varredura de um espécime com as regiões empregadas para as análises quantitativas destacadas em amarelo

As imagens foram capturadas pelo microscópio eletrônico de varredura e armazenadas em TIFF (Tagged Image File Format) da ampliação de 400 vezes no microcomputador acoplado ao equipamento.

4.5.4.1 Análise Quantitativa

4.5.4.1.1 Quantidade de células aderidas por unidade de área

Considerou-se unidade de área, o campo correspondente à imagem computadorizada obtida para o aumento de 400 vezes (640x 417 pixels, 8 bit) de cada um dos 5 campos por espécime referidos no item 4.5.4. Para a contagem de células, as imagens foram transferidas para apresentações em slides do programa Power Point para Mac, versão 12.0 (Microsoft Corporation, 2007). Cada imagem foi dividida em quatro campos (Figura 04) por unidade de área para facilitar a contagem, que foi realizada por um pesquisador cego ao experimento por três vezes, em tempos diferentes e em seqüências aleatórias. As médias das leituras das cinco imagens geradas para cada espécime foi considerada para cada um dos três espécimes de cada grupo e a média do grupo foi calculada entre esses três espécimes.

Os dados foram armazenados e tabulados para análise estatística.

Figura 4 – Fotomicrografia eletrônica de varredura obtida de um espécime do Grupo 15, com 72 horas de incubação, área da imagem 01, representando o método empregado para a contagem de células. A divisão da fotografia em quatro campos possibilitou a contagem sistematizada, iniciando no campo superior esquerdo (do observador) e seguindo o sentido anti-horário dos campos.

4.5.4.1.2 Área da superfície óssea recoberta por células

A área da superfície óssea dos discos recoberta por células foi obtida pela soma das áreas determinadas pela delimitação dos perímetros celulares em cada fotomicrografia (5 por espécime, em 3 espécimes por grupo), utilizando o programa Image J, versão 1.44o (National Institute of Health, USA) (Figura 5). Também esta avaliação foi feita por um pesquisador cego ao experimento da mesma forma que a análise da quantidade de células aderidas. Essa soma foi subtraída da área total correspondente ao campo da fotomicrografia no aumento de 400 vezes e, então, transformada em porcentagem de área óssea recoberta por células. Para efeitos de análise, foi considerada a área média obtida entre os três espécimes de cada grupo.

Figura 5 – Tela do programa Image J utilizado para avaliação da área de superfície óssea recoberta por células. A esquerda nota-se a janela onde estão listados os valores para a medidas da área total da imagem e das células. No centro, a imagem microscópica sem a legenda, com uma área de uma célula delimitada (destacada em linha contínua amarela). Sobre a imagem a barra de ferramentas e no topo da tela a barra de menus do programa Image J.

4.5.4.2 Análise Morfológica

As imagens foram analisadas por patologista experiente de modo a obter uma descrição da morfologia e possível conclusão sobre o comportamento celular, a partir das imagens obtidas das amostras que receberam o condicionamento ácido e a cultura de células.

4.6 Análise dos resultados

Para comparar os dados referentes à média da contagem de células por unidade de área em cada grupo foi aplicado o teste estatístico de análise de variância a dois critérios (ANOVA) e pós-testes de Tukey, ao nível de significância de 95%, empregando o programa Sigmaplot 12.0 (Systat Software Inc., 2011). Os dados referentes à análise da área de superfície recoberta por células foram comparados por análise de variância a dois critérios (ANOVA) com pós teste de Bonferroni com nível de significância de 99% utilizando o programa GraphPad Prism 5, (GraphPad Software Inc., San Diego, Califórnia, EUA).

5 Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Contagem de células por unidade de área

Após o agrupamento dos dados obtidos com a contagem das células foi possível observar a inexistência de diferença estatisticamente significativa entre a grupos experimentais nos períodos iniciais de incubação (24 e 48 horas), salientando que quando existente, mostra-se evidente entre o período de 24 e 72 horas de incubação. Pode-se salientar a uniformidade que os dados apresentam, ora com maior número em algum grupo, ora menor, mas mostrando-se crescente com o aumento do tempo de incubação, tendo o grupo 30 apresentado o maior número de células por unidade de área. Nota-se ainda que os valores do grupo lamínula acompanha os demais, mostrando a viabilidade celular ao longo dos tempos de incubação (Tabela 1 e Figura 6).

Tabela 1 – Valores médios da contagem das células por unidade de área

Tempo de Incubação	Grupos experimentais					
	C	15	30	90	180	L
24 h	7,6 ± 0,64 ^{ab}	7,80 ± 0,72 ^{ab}	11,40 ± 0,87 ^a	8,26 ± 3,10 ^{ab}	6,23 ± 0,25 ^b	8,26 ± 3,97 ^a
48 h	13,80 ± 1,80 ^{ab}	11,93 ± 1,85 ^{ab}	16,46 ± 0,75 ^a	13,46 ± 2,60 ^{ab}	10,73 ± 1,13 ^b	9,80 ± 0,28 ^b
72 h	18,53 ± 2,00 ^b	19,00 ± 3,11 ^b	20,20 ± 3,07 ^b	16,86 ± 3,36 ^b	17,55 ± 1,96 ^b	16,20 ± 4,23 ^b

Letras iguais na mesma linha ou coluna significam ausência de diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$)

Gráfico 1 - Quantidade média de células por unidade de área

Figura 6

5.2 Análise da área de superfície recoberta por células

A porcentagem da área de superfície óssea recoberta por células aumentou com o tempo em todos os grupos de desmineralização e significativamente, entre 24 e 72 horas na avaliação intragrupos. A duração de aplicação do ácido não interferiu significativamente nesse parâmetro de avaliação, mas nos grupos 15 e 30, a área de recobrimento ósseo mais do que triplicou às 72 horas em relação às 24 horas (Tabela 2 e Figura 7). O grupo C, não desmineralizado, não mostrou aumento significativo de área de cobertura óssea com o tempo e, em todos os períodos de cultura, manteve-se significativamente inferior aos demais grupos desmineralizados, mas com diferença estatisticamente significativa somente no período de incubação de 72 horas. Em relação aos grupos teste, a área de cobertura por células nas superfícies dos espécimes do grupo C foi de 50% ou menos, ao fim de 72 horas de incubação (Tabela 2 e Figura 7).

Tabela 2– Área média (%) de superfície óssea recoberta por células osteoblásticas cultivadas após os diferentes períodos de tempo entre os grupos de estudo

Tempo de incubação	Grupos experimentais				
	C	15	30	90	180
24 h	28,54 ^a	23,74 ^a	32,66 ^a	40,8 ^a	57,82 ^a
48 h	24,27 ^a	30,75 ^a	34,55 ^a	31,18 ^a	28,47 ^a
72 h	30,94 ^a	70,67 ^b	69,63 ^b	58,94 ^b	58,99 ^b

Letras iguais representam ausência de diferença estatística ($p > 0,01$)

Gráfico 2 - Área média de superfície óssea recoberta por células

Figura 7

5.3 Análise Morfológica

5.3.1 Grupo Controle

De forma geral, os espécimes deste grupo, depois de 24 horas em cultura com pré-osteoblastos, mostravam poucas células distribuídas de forma ora difusa, ora focal em sua superfície. Essas células exibiam aparência às vezes fusiforme, às vezes arredondada, produzindo imagem de relevo tridimensional, com poucos prolongamentos citoplasmáticos filamentosos que quase não faziam conexões com outras células. Essa aparência se repetiu às 48 e 72 horas, com a diferença de que as células pareceram se espalhar de forma um tanto quanto mais difusa na superfície, apresentando filopodia mais acentuada (Figura 8).

24 horas

48 horas

72 horas

Figura 8 – Espécimes representativos do grupo C às 24, 48 e 72 horas, nos quais se verificam as características morfológicas celulares

5.3.2 Grupo 15

A morfologia e distribuição celular nos espécimes do grupo 15 após 24 e 48 horas de incubação, apresentou-se muito semelhante à do grupo C. Contudo, às 72 horas, eram mais numerosas, sua aparência era mais achatada e os prolongamentos citoplasmáticos se comunicavam ao longo de toda a superfície, sendo raros os espaços onde ainda era possível distinguir superfície óssea desnuda (Figura 9).

24 horas

48 horas

72 horas

Figura 9 – Espécimes representativos do grupo 15 às 24, 48 e 72 horas, nos quais se verificam as características morfológicas celulares

5.3.3 Grupo 30

Neste grupo, os aspectos morfológicos celulares se assemelham aos do grupo 15 com distribuição mais uniforme em todos os períodos, apresentando espaços intercelulares ligeiramente mais amplos (Figura 10).

24 horas

48 horas

72 horas

Figura 10 - Espécimes representativos do grupo 30 às 24, 48 e 72 horas, nos quais se verificam as características morfológicas celulares

5.3.4 Grupo 90

As células neste grupo apresentavam-se em distribuição difusa, com aparência mais fusiforme em relação aos grupos 15 e 30, achatadas e com prolongamentos citoplasmáticos mais finos, em especial às 48 horas de incubação. Às 72 horas, sua aparência mudou para mais espalhadas e arredondadas com prolongamentos mais curtos, porém, recobrindo maior área de superfície (Figura 11).

24 horas

48 horas

72 horas

Figura 11 - Espécimes representativos do grupo 90 às 24, 48 e 72 horas, nos quais se verificam as características morfológicas celulares

5.3.5 Grupo 180

As características morfológicas celulares neste grupo não diferiram muito das do grupo 90, em qualquer dos períodos de incubação, mostrando-se uniformemente distribuídas pelas superfícies e com aparência fusiforme às 24 horas e mais estrelada às 48 horas. Às 72 horas, as células mantinham comunicação umas com as outras, através de seus prolongamentos citoplasmáticos. Neste período, nota-se maior achatamento das células às superfícies (Figura 12).

24 horas

48 horas

72 horas

Figura 12 - Espécimes representativos do grupo 180 às 24, 48 e 72 horas, nos quais se verificam as características morfológicas celulares

5.3.6 Grupo L

A análise da morfologia celular nas lamínulas permitiu verificar que as células preservaram a característica de viabilidade durante todos os períodos de incubação. Entretanto, sua morfologia não serve de parâmetro de comparação, por não ser essa a superfície padrão de comportamento celular para pré-osteoblastos (Figura 13).

24 horas

48 horas

72 horas

Figura 13 - Espécimes representativos do grupo L às 24, 48 e 72 horas, nos quais se verificam características morfológicas celulares de viabilidade

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

Os resultados desta pesquisa demonstraram que, independentemente do tempo de desmineralização óssea, todos os espécimes tratados por ácido cítrico mostraram área de cobertura por células significativamente maior do que os não tratados às 72 horas de cultura. O número de células presentes nas superfícies dos espécimes aumentou com o tempo, mas somente houve diferença estatística quando comparados os tempos de 24 e 72 horas para todos os grupos, quando o número de células praticamente dobrou. Apesar da falta de diferença significativa no número de células entre os grupos, ocorreu maior área de cobertura nos espécimes desmineralizados do que nos controles. Este resultado foi atribuído à alteração morfológica ocorrida nas células sobre os espécimes desmineralizados, que assumiram fenótipo mais espalhado e achatado, com prolongamentos citoplasmáticos mais projetados para se unirem a outras células do que o que foi verificado nos espécimes não desmineralizados, indicando, provavelmente um estágio de maturação mais adiantado daquelas células (SCHWARTZ et al., 2000).

A desmineralização de tecidos duros vem sendo usada em Periodontia para biomodificação radicular visando a inserção de fibras colágenas a raízes previamente contaminadas por endotoxinas bacterianas (BLOMLÖF et al., 2000; HERITIER, 1983; BAL et al., 1990; CLAFFEY et al., 1987; ADRIAENS; ADRIAENS, 2004; ALBAIR et al., 1982; BAKER et al., 2000) e em Dentística, para aumentar a área de superfície de adesão de materiais restauradores ao esmalte (BUONOCORE, 1955). A mesma intenção de aumentar a área de superfície através de tratamentos que causem rugosidades e porosidades tem norteado as pesquisas na busca por superfícies de implantes mais favoráveis à osseointegração (GUO et al., 2007; de ANGELIS et al., 2008; SETZER et al., 2009; HEMPEL et al., 2010; SAN MIGUEL et al., 2010; TROMBELLI et al., 2010).

A suposição de que rugosidades superficiais produzidas por desmineralização de tecidos duros poderiam ter efeito benéfico sobre o crescimento e diferenciação de células osteoblásticas foi testada por vários pesquisadores. Somerman et al. (1987) já haviam demonstrado *in vitro* que a dentina humana desmineralizada possui a capacidade de estimular a diferenciação de células não condrogênicas em condrócitos quando incubada com células mesenquimais indiferenciadas extraídas de músculo de embriões de ratos, sugerindo que a desmineralização libera ou ativa fatores estimulantes da resposta osteogênica dos

osteoblastos. Mas, de especial importância para o embasamento da hipótese central desta tese, são os achados de Schwartz et al. (2000). Estes autores verificaram maior proliferação e diferenciação mais adiantada de células MG63 em superfícies de dentina desmineralizada por tetraciclina ácida e pela ação de osteoclastos do que sobre superfícies lisas de poliestireno. A rugosidade de superfície produzida pela desmineralização em ambos os processos foi responsável pela produção de fatores de crescimento, entre os quais TGF- β 1 e PGE2, ficando evidente que a desmineralização ácida se assemelhou à naturalmente efetuada pelos osteoclastos.

De fato, a desmineralização pela produção local de ácidos é a primeira etapa da reabsorção fisiológica do tecido ósseo (MELCHER, 1976). Osteoclastos participam da reabsorção óssea produzindo ácido láctico e cítrico que dissolvem cristais minerais e lançando enzimas sobre a superfície óssea, entre as quais colagenases, que hidrolisam a matriz orgânica. (ROODMAN, 1991). Formam-se assim, cavitações na superfície óssea que logo são preenchidas por proteínas produzidas pelos próprios osteoclastos e que servem de inserção para células osteoprogenitoras, que aí se diferenciam em osteoblastos. (DODDS et al., 1995). Foi demonstrado que células precursoras osteoblásticas, sofrem diferenciação ao “reconhecerem” uma superfície como rugosa e sobre ela começam a depositar novo osso. (SCHWARTZ; BOYAN, 1994; KIESWETTER et al., 1996; ONG et al., 1997; SCHWARTZ et al., 2000).

A sugestão de medir a rugosidade superficial produzida pelos osteoclastos e buscar procedimentos que imitem a topografia física e química da superfície por eles produzida parece ser uma proposta interessante para trabalhos futuros.

Além da produção de topografias de superfície favoráveis à diferenciação celular, existe suficiente comprovação de que a desmineralização óssea tem aplicações em enxertos ósseos periodontais e craniofaciais. O emprego de matriz óssea desmineralizada (DBM) induz o desenvolvimento de osso em defeitos ósseos e em áreas extra-esqueléticas. (URIST, 1965; URIST et al. 1970). Esse princípio é aplicado no processamento de enxertos ósseos alógenos porque a desmineralização libera BMPs que induzem a diferenciação de osteoblastos (URIST et al., 1970), mas essas proteínas se degradam a 25°C dentro de 24 horas depois que o osso é removido do corpo (URIST; IWATA, 1973), o que obriga que elas sejam associadas a um carreador (CANTER; VARGEL; MAVILI, 2007) que garanta a liberação local de BMPs contidas em preparados comerciais de enxertos, caso contrário, elas podem ser rapidamente

absorvidas antes de instituir seu efeito. No caso da desmineralização tópica do osso hospedeiro, conforme sugerido nesta tese, a necessidade do carreador seria dispensada.

Outro aspecto que merece consideração é que a matriz óssea desmineralizada apresenta difusibilidade de BMPs e de outras citocinas que interagem com células precursoras osteogênicas da superfície óssea e fazem com que elas se diferenciem em elementos osteogênicos funcionalmente ativos, podendo alcançar distâncias de até 1000µm (URIST et al., 1977; WOSNEY et al., 1988).

Os resultados colhidos nesta tese encontram aplicação direta no preparo de leitos ósseos que vão receber enxertos em bloco e corroboram os achados de Rezende (2008) que verificou formação óssea antecipada e consolidação mais intensa na interface de enxertos autógenos em bloco quando as superfícies de contato foram desmineralizadas por ácido cítrico pH 1 por 3 minutos em comparação a interfaces não desmineralizadas. Neste trabalho foi possível verificar que um tempo de aplicação mais curto do ácido pode ser empregado, uma vez que 15 segundos já foram suficientes para que houvesse recobrimento de mais de 70% da superfície óssea por células contra os cerca de 30% apresentados pelos espécimes controle às 72 horas em cultura.

Outros autores já haviam verificado aumento do crescimento de novo osso quando blocos de enxerto ósseo autógeno e alógeno foram desmineralizados com objetivos comerciais, empregando formulações químicas e tempo de aplicação inviáveis na clínica. (O'DONNELL et al., 1996; LEWANDROWSKI et al. 1977). Esses estudos ressaltaram como vantagem da desmineralização, a possibilidade de alteração da geometria superficial do osso sem diminuir sua resistência.

Embora não tenha sido verificada diferença estatisticamente significativa entre os tempos de desmineralização, o tempo de 15 segundos apresentou maior área de cobertura óssea (70,67%) e o tempo de 30 segundos, o maior número de células por unidade de área ($20,2 \pm 3,07$). Estes resultados sugerem que entre 15 e 30 segundos possa ser um tempo de desmineralização em que os efeitos desejáveis de produção de rugosidades superficiais, exposição de colágeno e de fatores de crescimento produzam comportamento celular mais favorável para os eventos de reparação. Entretanto, outras análises são necessárias para comprovar esta hipótese, como avaliação da atividade de fosfatase alcalina, produção de osteocalcina, formação de nódulos de calcificação superficiais e caracterização de sua composição, entre outras.

Também em engenharia tecidual, tem sido dada ênfase ao estabelecimento de superfícies favoráveis para suportar o crescimento e diferenciação de osteoblastos sobre arcabouços e substitutos ósseos, o que envolve inserção e proliferação celular, maturação e mineralização da matriz (TSIGKOU et al., 2006; SETZER et al., 2000). Esse comportamento basicamente define as interações entre as células e o biomaterial e podem afetar a proliferação e a capacidade de diferenciação das células em cultura (SETZER et al., 2000; ANSELME, 2000).

Modelos de cultura de células são comumente usados para estudar os fenômenos celulares e para investigar as interações tecido-biomateriais (ANSELME, 2000). Diferentes tipos de osteoblastos e células osteoblásticas humanas, de ratos ou camundongos tem sido geralmente consideradas um bom modelo para o estudo do crescimento e diferenciação de osteoblastos. Várias evidências demonstraram que durante as interações osteoblasto-biomaterial, essas células são capazes de discriminar não somente propriedades físicas, químicas e estruturais do material, como também diferenças na rugosidade e topografia de superfície (BALL et al., 2008; HEMPEL et al., 2010). A linhagem de pré-osteoblastos MC3T3-E1 foram escolhidas neste estudo devido a apresentarem altos níveis de diferenciação osteoblástica e de deposição de matriz extracelular mineralizada, além de manifestarem comportamento semelhante ao de osteoblastos primários (MAEDA et al., 2004) e de serem sensíveis a alterações de superfície, sendo que as superfícies rugosas promovem maturação maior e crescimento menor dessas células. (ALBREKTSSON; WENNERBERG, 2004; SAN MIGUEL et al., 2010).

Entretanto, células de outras linhagens também têm demonstrado comportamento diferenciado quando cultivadas sobre superfícies lisas e rugosas, como as células SAOS-2 usadas por Hempel et al. (2010), que apresentaram espalhamento mais rápido e maior número de células aderidas após 24 horas sobre a zircônia do que sobre o titânio. A mesma linhagem foi empregada por de Angelis et al. (2008) que também verificaram que sobre superfícies rugosas, essas células produziram maior número de nódulos ósseos e maior área de mineralização em comparação a superfícies lisas.

Células em contato com uma superfície irão primeiramente se inserir, aderir e se espalhar e sabe-se que esta primeira fase afeta seu fenótipo em longo prazo (ANSELME, 2000; GOUGH et al., 2004). Os osteoblastos interagem com seu substrato, inicialmente através de integrinas presentes na membrana celular que se ligam a proteínas adsorvidas na

superfície do biomaterial (fibronectina no caso do osso) e, mais tarde, a proteínas da própria matriz extracelular que produzem. Após essa ligação com a superfície, as integrinas formam aglomerados e se associam com os citoesqueletos para formar adesões focais (GEIGER et al., 2001; CONSOLARO, 2005). A ancoragem de um osteoblasto a uma superfície é influenciada por sua rugosidade, provavelmente porque, com o aumento da área de superfície, há maior quantidade de fibronectina disponível proporcionando mais sinalização para a adesão de células, que se espalham mais facilmente e interagem umas com as outras através de seu citoesqueleto (PEARSON et al., 1988; WEISS et al., 1981; MARTIN et al., 1995). Por outro lado, em superfícies rugosas, a proliferação celular é reduzida em relação às lisas (SETZER et al., 2009).

Nesta tese, foi verificado que, ainda que não tenha havido diferença estatística entre nenhum dos grupos quanto ao número de células presentes nas superfícies dos espécimes, nos tratados com ácido, sua aparência era mais achatada, mais espalhada, recobrando maior área da superfície óssea, principalmente às 72 horas. Ressalte-se que, nos espécimes controle, essa morfologia era mais arredondada, com poucos prolongamentos e sua distribuição sobre as superfícies era mais difusa e às vezes, focal. Ainda que análises específicas não tenham sido realizadas, pode-se inferir que a morfologia celular apresentada pelas células que foram cultivadas sobre as superfícies desmineralizadas são compatíveis com estágios de maturação mais avançados.

Os resultados aqui apresentados sugerem que a desmineralização do tecido ósseo por até 3 minutos pode ser um coadjuvante vantajoso em procedimentos cirúrgicos regenerativos, tendo sido revelada uma leve superioridade de resultados quando o tempo de aplicação do ácido fica entre 15s e 30s. Estudos subsequentes complementares devem ser focalizados no tipo, concentração e pH da substância desmineralizante, assim como na composição e caracterização topográfica da superfície após desmineralização, no comportamento celular em nível molecular de interação com essas superfícies e na viabilidade óssea após a desmineralização, para que conclusões mais elaboradas possam vir a apoiar os achados aqui apresentados. Na eventualidade dessa nova abordagem terapêutica vir a ser confirmada em estudos clínicos, o benefício esperado é o do encurtamento do tempo de consolidação de enxertos em bloco antes que possam receber implantes dentais, da prevenção do seu destacamento no momento da inserção dos implantes e o da manutenção do volume desses enxertos, que correriam menor risco de serem reabsorvidos com o tempo.

7 Conclusões

7 CONCLUSÕES

As análises qualitativa e quantitativa das células pré-osteobásticas em cultura sobre fragmentos ósseos desmineralizados ou não desmineralizados por ácido cítrico permitiram concluir que:

- a. As células mantiveram-se vitais sobre todas as superfícies estudadas e responderam à desmineralização com morfologia compatível com estágios mais avançados de diferenciação do que a apresentada pelas células cultivadas sobre superfícies não desmineralizadas;
 - b. O número de células aderidas às superfícies ósseas condicionadas ou não com ácido cítrico aumentaram com o tempo de incubação, independentemente do tempo de desmineralização;
 - c. A área de recobrimento celular nas superfícies ósseas desmineralizadas foi no mínimo o dobro da encontrada nas superfícies não desmineralizadas ao final de 72 horas, sem diferenças significantes entre os tempos de aplicação do ácido, com leve superioridade para os tempos de 15s e 30s;
 - d. Os dados sugerem que a desmineralização como proposta nesta tese, independentemente do tempo de aplicação do ácido, pode se constituir em adjunto vantajoso nos procedimentos que visam à reparação óssea.
-

Referências

REFERÊNCIAS

- Accorsi-Mendonca T, Paiva KB, Zambuzzi WF, et al. Expression of matrix metalloproteinases-2 and -9 and RECK during alveolar bone regeneration in rat. *J Mol Histol* 2008; 39: 201-208.
- Adriaens PA, Adriaens LM. Effects of nonsurgical periodontal therapy on hard and soft tissues. *Periodontology* 2000. 2004; 36: 121-145.
- Albair WB, Cobb CM, Killoy WJ. Connective tissue attachment to periodontally diseased roots after citric acid demineralization. *J Periodontol*. 1982; 53: 515-526.
- Albrektsson T, Wennerberg A. Oral implant surfaces: Part 1 – Review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them. *Int J Prosthodont*. 2004; 17; 5: 536 - 543
- Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomater*. 2000; 21; 667-681
- Baker P, Rotch HA, Trombelli L, Wikesjö UME. An in vitro screening model to evaluate root conditioning protocols for periodontal regenerative procedures. *J Periodontol*. 2000; 71:1139-1143.
- Bal B, Eren K, Balos K. Effects of various root surface treatments on initial clot formation: a scanning electron microscope study. *J Nihon Univ Sch Dent*. 1990; 32(4); 281-93.
- Blomlöf, L.; Jonsson, B. A.; Blomlöf, J.; Lindskog, S. A clinical study of root surface conditioning with an EDTA gel. II. Surgical periodontal treatment. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2000; 20(6): 567-73.
- BUONOCORE, M. G. A simple method of increasing the adhesion of acrylic filling materials on enamel surfaces. *J Dent Res*. 1955; 34(6): 849-53.
-

- Canter HI, Vargel I, Mavili ME. Reconstruction of mandibular defects using autografts combined with demineralized bone matrix and cancellous allograft. *J Craniofac Surg*. 2007;18(1):95-100.
- Claffey N, Bogle G, Bjorvatn K, Selvig KA, Egelberg J. Topical application of tetracycline in regenerative periodontal surgery in beagles. *Acta OdontolScand*. 1987;45:141-146.
- Consolaro A. Reabsorções dentárias nas especialidades clínicas. Maringá: Dental Press Editora, 2005.
- Cook SD, Wolfe MW, Salkeld SL, Rueger DC. Effect of recombinant human osteogenic protein-1 on healing of segmental defects in non-human primates. *J Bone Joint Surg Am* 1995;77:734-750
- De Angelis E, Ravanetti F, Cacchiolo A, Corradi A, Giordano C, Candiani G, Chiesa R, Gabbi C, Borghetti P. Attachment, proliferation and osteogenic response of osteoblast-like cells cultured on titanium treated by a novel multiphase anodic spark deposition process. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater* 2009; 88 (1): 280-289.
- Dodds RA, Connor JR, James IE, Rykaczewski EL, Appelbaum E, Dul E, Gowen M. Human osteoclasts, not osteoblasts, deposit osteopontin onto resorption surfaces: an in vitro and ex vivo study of remodeling bone. *J Bone Miner Res*. 1995; 10(11):1666-80.
- Enneking WF; Mindell ER. Observations on massive retrieved human allografts. *J Bone Joint Surg*. 1991; 73(8): 1123-42.
- Gough JE, Notingher I, Hench LL. Osteoblast attachment and mineralized nodule formation on rough and smooth 45S5 bioactive glass monoliths. *J Biomed Mater Res. A* 2004;68:640-650.
- Guo X, Gough JE, Xiao P, Liu J, Shen Z. Fabrication of nanostructured hydroxyapatite and analysis of human osteoblastic cellular response. *J Biomed Mat Res. A* 2007; 1022-1032.
- Heath JK, Atkinson SJ, Meikle MC, Reynolds JJ. Mouse osteoblasts synthesize collagenase in response to bone resorbing agents. *Biochim Biophys Acta*. 1984; 802: 151-154.
-

Hempel U, Hefti T, Kalbacova M, Wolf-Branstetter C, Dierter P, Schlottig F. Response of osteoblast-like SAOS-2 cells to zircônia ceramics with different surfaca topographies. 2010; 21: 174-181.

Heritier M. Ultrastructural study of new connective tissue attachment following phosphoric acid application on human root dentin. J Periodontol. 1983; 54(9): 515-21.

Kieswetter K, Schwartz Z, Hummert TW, Cochran DL, Simpson J, Dean DD, et al. Surface roughness the local production of growth factors and cytokines by osteoblast-like MG63 cells. J Biomed Mater Res. 1996; 32(1):55-63.

Labahn R, Fahrenbach WH, Clark SM, Lie T, Adams DF. Root dentin morphology after diferent modes of citiric acid and tetracycline hydrochloride conditionig. J Periodontol. 1992; 63(4): 303-309.

Lewandrowski K-U, Tomford WW, Michaud NA, Schomacker KT, Deutsch TF. An electron microscopic study on the process of acid demineralization of cortical bone. Calcif Tissue Int. 1997a;61(4):294-7.

Lewandrowski K-U, Tomford WW, Schomacker KT, Deutsch TF, Mankin HJ. Improved osteoinduction of cortical bone allografts: a study of the effects of laser perforation and partial demineralization. J Orthop Res. 1997b;15(5):748-56.

Li J, Zhang YP, Kirners RS. Angiogenesis in wound repair: angiogenic growth factors and the extracellular matrix. Microsc Res Tech. 2003; 60: 107-114.

Lorenzo A. et al. Production of both 92- and 72-kDa gelatinases by bone cells. Matrix 1992; 12: 282-290.

Maeda T, Matsunuma A, Kurahashi I, Yanagawa T, Yoshida H, Horiuchi N. Induction of osteoblast differentiation indices by statins in MC3T3-E1cells. J Cell Biochem. 2004;92:458-471.

Martin JY, Schwartz Z, Hummert TW, Schraub DM, SimpsonJ, Lankford J Jr, et al. Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation and protein synthesis of huma osteoblast-like cells (MG63). J Biomed Mater Res. 1995;29(3):389-401.

Melcher AH. Biological processes in resorption, deposition and regeneration of bone. In: Stahl SS, editor. Periodontal surgery. Biologic basis and technique. Springfield: Charles C Thomas; 1976. p. 99-120.

O'Donnell RJ, Deutsch TF, Flotte TJ, Lorente CA, Tomford WW, Mankin HJ, Schomacker KT. Effect of Er:YAG laser holes on osteoinduction in demineralized rat calvarial allografts. J Onhop Res. 1996;14(1):108-13.

Ong JL, Carnes DL, Cardenas HL, Cavin R. Surface roughness of titanium on bone morphogenetic protein-2-treated osteoblast cells *in vitro*. Impl Dent. 1997;6(1):19-24.

Pearson BS, Klebe RJ, Boyan BD, Moskowicz D. Comments on the clinical application of fibronectin in dentistry. J Dent Res 1988;67(2):515-517.

Pitaru, J. E et al. The influence of the morphological and chemical nature of dental surfaces on the migration, attachment, and orientation of human gingival fibroblast *in vitro*. J Period Res. 1984; 19(4): 408-18.

Pitaru JE et al. Cell migration attachment and orientation *in vitro* are enhanced by partial demineralization of dentine and cementum and inhibited by bacterial endotoxin. J Period Res. 1984; 19(6); 661-665.

Polson MA, Proye MP. Fibrin linkage: a precursor for new attachment. J Periodontol. 1983; 54(3): 141-147.

Rabie ABM, Lie Ken Jie RKP. Integration of endochondral bone grafts in the presence of demineralized bone matrix. Int J Oral Maxillofac Surg. 1996;25(4):311-8.

Register AA. Bone and cementum induction by dentin demineralized *in situ*. J Periodontol. 1973;44(1):49-54.

Register AA, Burdick FA. Accelerated reattachment with cementogenesis to dentin demineralized *in situ*. I. Optimun range. J Periodontol. 1975;46(11):646-55.

Rezende MLR. Efeito da desmineralização das superfícies ósseas de contato na consolidação de enxertos autogenos em cobaias. [livre-docência Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2008.

Ripamonti U, Reddi AH. Growth and morphogenetic factors in bone induction: role of osteogenin and related bone morphogenetic proteins in craniofacial and periodontal bone repair. *Crit Rev Oral Biol Med* 1992;3:1-14.

Roodman GD. Cell biology of the osteoclast. *Exp Hematol*. 1999;27(8):1229-41.

San Miguel B, Kriauciunas R, Tosatti S, Ehrbar M, Ghayor C, Textor M, Weber FE. Enhanced osteoblastic activity and bone regeneration using surface-modified porous bioactive glass scaffolds. *J Biomed Mat Res A*. 2010; 94(4): 1023-1033.

Schwartz Z, Boyan BD. Underlying mechanisms at the bone-biomaterial interface. *J Cell Biochem*. 1994;56(3):340-7.

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

Selvig KA, Hals E. Periodontally diseased cementum studied by correlated microradiography, electron probe analysis and electron microscopy. *J Periodont Res*. 1977;12(6):419-29.

Selvig KA. The fine structure of human cementum. *Acta Odontol Scand*. 1965;23(4):423- 41.

Somerman MJ, Nathanson MA, Sauk JJ, Manson B. Human dentin matrix induces cartilage formation in vitro by mesenchymal cells derived from embryonic muscle. *J Dent Res*. 1987;66(10):1551-8.

Stewart UT. Partial removal of cementum and descalcification of thooth in the treatment of pyorrea alveolaris. *Dent. Cosmos* 1889; 41: 617-626.

Setzer B, Bächle M, Metzger MC, Kohal RJ. The gene expression an phenotypic response of hFOB 1.19 osteoblast to surface-modified titanium and zircônia. 2009; 30: 979-990.

Trombelli L, Penolazzi L, Torreggiani E, Farina R, Lambertini E, Vecchiatini R, Piva R. Effect of hydroxyapatite-based biomaterials on human osteoblast phenotype. 2010; 59: 103-115.

Tsigkou O, Hench LL, Boccaccini AR, Polak JM, Stevens MM. Enhanced differentiation and mineralization of human fetal osteoblasts on PDLA containing Bioglass VR composite ?lms in the absence of osteogenic supplements. J Biomed Mater Res A 2006;80:837-851.

Urist MR. Bone: formation by autoinduction. Science. 1965;150(698):893-9.

Urist MR, Dowell TA, Hay PH, Strates BS. Inductive substrates for bone formation. Clin Orthop Relat Res. 1968;59:59-96.

Urist MR, Iwata H. Preservation and biodegradation of the morphogenetic property of bone matrix. J Theor Biol. 1973;38(1): 155-67.

Urist MR, Jurist JM, Dubuc FL, Strates BS. Quantitation of new bone formation in intramuscular implants of bone matrix in rabbits. Clin Orthop. 1970;68:279-93.

Urist MR, Granstein R, Nogami H, Svenson L, Murphy R. Transmembrane bone morphogenesis across multiplewalled chambers: new evidence of a diffusible bone morphogenetic property. Arch Surg. 1977; 112(5): 612-619

Urist MR. Bone: formation by autoinduction. Science 1965; 150: 893-899.

Weiss RE, Reddi AH. Appearance of fibronectin during the differentiation of cartilage, bone, and bone marrow. J Cell Biol 1981;88(3):630-636.

Wozney JM, Rose V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kritz RW, et al. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. Science. 1988;242(4885):1528-34.