FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

MARIA ALEJANDRA MEDINA VALDÍVIA

**CULTURA E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS DA GRANULAÇÃO
ÓSSEA IN VITRO: EFEITOS PROLIFERATIVOS ESTIMULADOS POR
DIFERENTES BIOMATERIAIS**

BAURU
2013

MARIA ALEJANDRA MEDINA VALDÍVIA

**CULTURA E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS DA GRANULAÇÃO
ÓSSEA IN VITRO: EFEITOS PROLIFERATIVOS ESTIMULADOS POR
DIFERENTES BIOMATERIAIS**

Dissertação apresentada como Trabalho de Conclusão de Curso, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas Aplicadas, área de concentração reabilitação Oral linha de pesquisa Periodontia.

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Adriana C Passanezi Sant'Ana

**BAURU
2013**

FICHA TÉCNICA

Maria Alejandra Medina Valdívia: redação do texto, revisão bibliográfica, cirurgia para criação dos alvéolos, cultura de células

Adriana C. Passanezi Sant'Ana: concepção, orientação, análise estatística, redação do texto

Bruna Fidêncio Rahal Ferraz: cirurgia para criação dos alvéolos

Paula Stéphânia H Karam: auxílio no cultivo de células

Carla Andreotti Damante: cultura primária, subculturas, ensaios de viabilidade celular

Flávia Amadeu de Oliveira: Ensaios de atividade de fosfatase alcalina e de mineralização

Rodrigo Cardoso de Oliveira: responsável pelo laboratório de cultura de células

Fernanda de Almeida Barbosa: auxílio no estabelecimento de cultura primária e caracterização da curva de crescimento das células GO

Vinícius Pollo: auxílio na caracterização das células GO (atividade de fosfatase alcalina e de mineralização)

APOIO FINANCEIRO

- CNPQ (Conselho Nacional de Pesquisa Científica): bolsa de Mestrado na modalidade PEC-PG (Programa de Estudante Convênio de Pós-Graduação)
- CPG da FOB-USP (verba PROAP)
- CNPQ: bolsa de Iniciação Científica aos alunos Fernanda de Almeida Barbosa e Vinícius Pollo (PIBIC-CNPQ)

Maria Alejandra Medina Valdívia

V784c Cultura e caracterização de células da granulação óssea in vitro: efeitos proliferativos estimulados por diferentes biomateriais. / Maria Alejandra Medina Valdívia – Bauru, 2013.

119p.: il ; 30cm

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Adriana Campos Passanezi Sant'Ana

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, em reunião realizada em 31 de agosto de 2011. (Proc. CEP nº 049/2011).

DADOS CURRICULARES

MARIA ALEJANDRA MEDINA VALDÍVIA

Nascimento	08 de julho de 1984
Naturalidade	Arequipa, Peru
Filiação	Rommel Luis Medina Pasço Ana Maria Valdivia Nuñez
2001-2006	Curso de Odontologia – Universidad Católica de Santa Maria. Arequipa, Perú
2009-2011	Especialização em Periodontia – Faculdade de Odontologia de Bauru – USP
2010	Estágio de Capacitação Profissional em Periodontia – Faculdade de Odontologia de Bauru – USP
2011	Curso de Aperfeiçoamento em Implantes Osseointegrados – Fundação Bauruense de Estudos Odontológicos. Bauru, São Paulo.
2011-2013	Mestrado em Ciências Odontológicas Aplicadas, área de Concentração Reabilitação Oral, linha de pesquisa Periodontia. Faculdade de Odontologia de Bauru – USP. Bolsista PEC-PG.

DEDICATÓRIA

DEDICATÓRIA

A Deus,

Dedico este trabalho a Ele, pois sem a sua orientação, forças e sem o caminho que ele me guiou, talvez eu não tivesse chegado tão longe na vida.

À Odontologia,

Ela me fez conhecer um mundo novo, mudou minha vida, me fez conhecer pessoas fantásticas, exemplos de vida, exemplos que espero seguir...

A Odontologia fez de mim uma mulher diferente, cheia de riqueza profissional e humana.

Ao meu Irmão Juan Rommel,

Meu exemplo e meu maior orgulho, pois eu não teria chegado hoje a cumprir um sonho que só você sabe o quanto é importante para nós...

AGRADEDECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

A Deus! Muito obrigada pai, pois você é o dono dessa conquista.

À minha Mãe Ana Maria, obrigada pelo incentivo, pela confiança e pelo amor de cada dia. Te amo, essa conquista é só sua!

Ao meu pai Rommel, obrigada pela confiança, pelo carinho, pela parceria e amizade de sempre, Te Amo!

Ao meu Irmão Juan Rommel, obrigada irmãozinho por tudo, sem você essa experiência não teria sido tão perfeita! Agradeço cada conselho, sua companhia e sua ajuda! Levaria a minha vida inteira para te agradecer por tudo o que você fez por mim. Te amo!

À toda minha família, minha linda avó, meus tios e primos. Obrigada pelo apoio e pela parceria durante todo esse tempo. Amo todos vocês!

Ao meu namorado Carlos, obrigada meu amor por fazer parte da minha vida, por ter tido coragem de me acompanhar nessa conquista e por todo o amor que só você me dá para ser feliz. Te Amo!

A todos Meus Grandes e Verdadeiros amigos,

A todos aqueles que ficaram no Perú, e em especial para **Ângela e Hellen**.
Obrigada por todo o carinho e cumplicidade de todo esse tempo. Vocês são minhas
irmãs! Adoro vocês!

A todos aqueles que conviveram e fizeram minha vida em Bauru mais especial do
que ela é! Vocês chegaram aqui com o mesmo sonho e nós seremos colegas e
amigos para a vida toda. Sempre os terei no meu coração: **Roxana, Silvia, Karin,
July, Javier, Juan Fernando, Pablo, Carlos, Diego**.

**Aos meus companheiros da turma do Mestrado: Fabiola, Adelina, Emilia,
Paulinha e João**. Não poderia ter sido melhor essa etapa sem vocês! Obrigada pela
parceria e por todo o carinho! Adoro vocês!

Às Doutorandas da Periodontia, Roberta e Larissa, obrigada amigas por toda a
ajuda, todos os conselhos e o tempo para me orientar com o trabalho, vocês são
mais do que especiais. Adoro vocês!

E em geral a todos os doutorandos: Mônica, Bruna, Jorge e Samira, obrigada
por tudo sempre!

Flávia e Adriana, alunas da Bioquímica e companheiras do Mestrado, muito
obrigada pela ajuda com o desenvolvimento deste trabalho, pela sua paciência e
carinho. Muito obrigada mesmo meninas!

À Faculdade e aos meus Queridos Professores,

À minha orientadora, Profa. Dra. Adriana Campos Passanezi Sant'Ana, obrigada pela confiança, pelo apoio, pelos ensinamentos e por ser mais especial do que só minha professora. Você é um grande exemplo de mulher, de mãe e é um grande orgulho pra mim! Todo o meu agradecimento sempre!

À Profa. Carla Damante, obrigada por todo o apoio neste trabalho, sem você não teria sido igual. Agradeço sua confiança e amizade, muito obrigada mesmo!

Ao Prof. Sebastião e à Profa. Malu, obrigada pela amizade, pelo exemplo e pelos ensinamentos.

Ao Prof. Eulair Passanezi e ao Prof. Waldyr Janson por serem exemplos na Periodontia e por todos os seus ensinamentos.

A todos os professores do Departamento de Reabilitação Oral, Dentística e Cirurgia e a todos os professores da Faculdade de Odontologia de Bauru, exemplos de profissionais para a América-Latina e o resto do Mundo.

A todos os funcionários, em especial a Ivânia: você sabe que meu respeito, carinho e amizade não vão ter fim para você, pois tudo o que eu consegui até hoje foi também graças aos teus conselhos e carinho, Obrigada por tudo Ivy!

Edilaine, Marcos, Denise, Cleide, Josi e Débora obrigada sempre pelo apoio e carinho, sem vocês o Departamento não teria sido tão especial, obrigada de coração!

A todos os funcionários da FOB-USP, em especial aos da secretaria de Pós-Graduação, **Leila, Letícia, Fátima e Meg,** por toda ajuda nas minhas solicitações.

Aos alunos da graduação, por terem contribuído com o meu aprendizado e pela parceria e amizade.

Ao CnPq pela Bolsa PEC-PG, pelo apoio neste período, e ao Programa de Aperfeiçoamento em Ensino (PAE).

Obrigada Bauru-Brasil por ter me dado o melhor presente de desenvolvimento na minha vida, hoje eu me sinto metade Peruana e metade Brasileira.

Muchas Gracias!!!

RESUMO

RESUMO

O objetivo deste estudo foi estabelecer cultura primária de células derivadas da granulação óssea (GO) de seres humanos para determinar seu padrão de crescimento *in vitro* e determinar os efeitos biológicos de três membranas reabsorvíveis feitas de colágeno (BioGide®, GenDerm®, CollaTape®) em culturas de fibroblastos gengivais humanos (FGH) e células da granulação óssea (GO). Foram coletadas amostras de tecido ósseo presente no alvéolo de cicatrização de dois pacientes adultos saudáveis sistemicamente com indicação de cirurgia periodontal regenerativa pela técnica do enxerto ósseo em neoformação. Imediatamente após a coleta, as amostras foram transportadas ao laboratório de cultura de células para estabelecimento da cultura primária. As células foram cultivadas em atmosfera úmida, contendo 5% CO₂ a 37°C. A curva de crescimento das células foi determinada por meio de contagem de células viáveis. Após a caracterização da curva de crescimento, foram realizadas a caracterização da amostra por meio de determinação da atividade de fosfatase alcalina e de mineralização. Posteriormente, os efeitos de três diferentes tipos de membranas colágenas sobre a proliferação de células GO e FGH foram investigados por meio do teste MTT. As amostras foram divididas em oito grupos: (1) células FGH em meio DMEM (C-FGH); (2) células FGH em meio DMEM condicionado com membrana GenDerm (GD-FGH); (3) células FGH em meio DMEM condicionado com membrana BioGide (BG-FGH); (4) células FGH em meio DMEM condicionado com membrana CollaTape (CT-FGH); (5) células GO em meio DMEM (C-GO); (6) células GO em meio DMEM condicionado com membrana GenDerm (GD-GO); (7) células GO em meio DMEM condicionado com membrana BioGide (BG-GO); (8) células GO em meio DMEM condicionado com membrana CollaTape (CT-GO). O teste de proliferação celular mostrou que houve aumento significativo ($p < 0.05$; ANOVA para medidas repetidas) do número de células vitais presentes na cultura nos dias 3 (90,8%), 5 (132,50%), 7 (137,50%) e 10 (227,50%) em relação ao controle (dia 0). Foram observadas atividade de fosfatase alcalina e de mineralização *in vitro*. Houve aumento do número de células FGH e GO viáveis em todos os grupos ($p < 0.05$; ANOVA para medidas repetidas). Houve maior efeito proliferativo nas células FGH e

GO nos grupos GD e CT, com diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p < 0.05$; Mann Whitney) apenas no período de 96 horas. Esses achados sugerem que as células GO apresentam alta atividade de proliferação e síntese, sendo compatíveis com células de linhagem osteoblástica. Duas membranas colágenas testadas exerceram maior ação proliferativa tardia sobre osteoblastos, indicando sua eficácia na regeneração dos tecidos periodontais.

Palavras-chave: Fibroblastos. Osteoblastos. Membrana. Regeneração.

ABSTRACT

ABSTRACT

Culture and characterization of bone granulation cells in vitro: proliferative effects stimulated by different biomaterials

The aim of this study was to establish primary culture of cells derived from human bone granulation tissue (GO) in order to determine its growth pattern *in vitro* and the biological effects of three absorbable collagen membranes (BioGide®, GenDerm®, CollaTape®) in human gingival fibroblasts (FGH) and human bone granulation (GO) cell cultures. Samples of bone tissue present at healing sockets of two systemically healthy adults with indication of periodontal regenerative therapy by the newly forming bone were collected. Immediately after, samples were transported to the laboratory of cell culture to the establishment of primary cultures. Cells were cultivated in humid atmosphere with 95% CO₂ at 37°C. Cells growth pattern were determined by counting of viable cells. After characterization of growth pattern, samples were characterized according to alkaline phosphatase activity and mineralization detected by alizarin red. Afterwards, the effects of three different types of collagen membranes on GO and FGH cells were investigated by MTT test. Samples were divided into eight groups: (1) FGH cells in DMEM (C-FGH); (2) FGH in DMEM conditioned by GenDerm® membrane (GD-FGH); (3) FGH in DMEM conditioned with BioGide® (BG-FGH); (4) FGH in DMEM conditioned by CollaTape® (CT-FGH); (5) GO cells in DMEM (C-GO); (6) GO cells in DMEM conditioned by GenDerm® (GD-GO); (7) GO cells in DMEM conditioned by BioGide® (BG-GO); (8) GO cells in DMEM conditioned by CollaTape® (CT-GO). Cell proliferation test showed a significant ($p < 0.05$; ANOVA for repeated measures) increase in the number of vital cells present in the culture at days 3 (90.8%), 5 (132.50%), 7 (137.50%) and 10 (227.50%) compared to control (dia 0). It was observed alkaline phosphatase activity and mineralization in vitro. There was an increase in the number of FGH and GO viable cells at all groups ($p < 0.05$; ANOVA for repeated measures). Greater proliferative effect at FGH and GO cells at GD and CT groups, with significant differences between groups ($p < 0.05$; Mann Whitney) only at 96 hs. Two of the collagen membranes tested exerted greater late proliferative effects on osteoblasts, suggesting its efficacy in the regeneration of periodontal tissues.

Keywords: Fibroblasts. Osteoblasts. Membrane. Regeneration.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

Figura 1:	Distribuição das amostras em triplicata na placa de 24 poços para determinação da curva de crescimento das células GO	70
Figura 2:	Ensaio de atividade alcalina . Em (A) Distribuição das amostras de células GO em DMEM + 10% FBS + 50 µg/mL + β-glicerofosfato 10 mM na placa de 24 poços; (B) Remoção do meio de cultivo; (C) Adição da solução tampão de lise celular; (D) Lise celular com rodinho; (E) coleta do lisado celular; (F) Placa de 96 poços contendo as amostras para análise de atividade de fosfatase alcalina por meio de absorbância em espectofotometro.	72
Figura 3:	Ensaio de mineralização. (A) Plaqueamento das células GO em placa de 12 poços; (B) Após a aderência, o meio foi suplementado com ácido ascórbico e β-glicerofosfato para indução osteogênica; (C) Lavagem com PBS após remoção do sobrenadante nos períodos de 14, 21 e 28 dias após o cultivo; (D) Fixação das amostras com solução de formaldeído 4% durante 5 minutos; (E) Incubação com solução de alizarina durante 10 minutos; (F) Remoção do corante e lavagem com água deionizada pura.....	73
Figura 4:	Placa de 96 poços com as amostras de células GO para avaliação da atividade de mineralização por meio de análise de absorbância em espectofotômetro a 405 nm.	74
Figura 5:	Aspecto das células FGH e GO em cultura, observado em microscópio de fase invertido.	75
Figura 6:	Membranas comercialmente disponíveis utilizadas para o condicionamento do meio de cultura para realização do ensaio de proliferação celular	76
Figura 7:	Membranas recortadas em fragmentos de 20 mg.....	76
Figura 8:	Membranas recortadas e submersas em tubo contendo meio de cultura DMEM + 10% SFB + 1% solução antibiótica + 0.5% antimicótica (concentração final de 1mg/mL)	76
Figura 9:	Esquema da divisão dos grupos experimentais na placa de 96 poços [BK- blank (sem células)]	77
Figura 10:	Substituição dos meios nas placas por meio condicionado com os três tipos de membranas (grupos experimentais) e meio convencional não condicionado (grupos controles)	78

Figura 11:	Placa contendo solução de MTT sendo enrolada em papel alumínio.....	80
Figura 12:	Visualização dos cristais de formazan no interior das células nos períodos de 24h e 96h.	80
Figura 13:	Remoção do meio contendo solução de MTT para acréscimo de 200 µL de solução de DMSO.....	81
Figura 14:	Amostra de placa de 96 poços, permitindo leitura em espectrofotômetro a 550nm.	81

- GRÁFICOS

Gráfico 1:	Curva de crescimento das células GO, expresso em média $\pm$ desvio-padrão ($n \times 10^4$)	85
Gráfico 2:	Atividade de fosfatase alcalina das células GO cultivadas em meio não osteogênico constituído por DMEM + 10% SFB (legendas GO 7D, GO 14D e GO 21D) e em meio osteogênico (OSTEO) DMEM + 10% SFB + 50 µg/ml ácido ascórbico + 10mM β -glicerofosfato (legendas GO 7D OSTEO, GO 14D OSTEO e GO 21D OSTEO). Média $\pm$ desvio-padrão.....	86
Gráfico 3:	Atividade de mineralização das células GO cultivadas em meio não osteogênico constituído por DMEM + 10% SFB (legendas GO 7D, GO 14D e GO 21D) e em meio osteogênico (OSTEO) DMEM + 10% SFB + 50 µg/ml ácido ascórbico + 10mM β -glicerofosfato (legendas GO 7D OSTEO, GO 14D OSTEO e GO 21D OSTEO), marcada por <i>Alizarin Red S</i> e medida em densidade óptica. Média $\pm$ desvio-padrão.	87
Gráfico 4:	Taxa de proliferação celular (viabilidade celular) medida em densidade ótica por meio do ensaio de MTT nos diferentes grupos e períodos de tempo para as células FGH (média $\pm$ erro padrão)	88
Gráfico 5:	Taxa de proliferação celular (viabilidade celular) medida em densidade ótica por meio do ensaio de MTT nos diferentes grupos e períodos de tempo para as células GO (média $\pm$ erro padrão)	88
Gráfico 6:	Viabilidade celular (%) das células FGH nos grupos controle, GD, BG e CT (média $\pm$ erro padrão da média).....	90
Gráfico7:	Viabilidade celular (%) das células GO nos grupos controle, GD, BG e CT (média $\pm$ erro padrão da média).....	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Análise da viabilidade celular (%) nos diferentes grupos e períodos de tempo (média $\pm$ desvio-padrão).....	91
-----------------	---	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	41
2	REVISTA DA LITERATURA.....	47
2.1	Linhagens de células tronco ou células osteoprogenitoras derivadas do tecido ósseo alveolar	49
2.2	Características clínicas, histológicas e moleculares dos alvéolos de extração em reparação	51
2.3	Técnica do enxerto ósseo em neoformação.....	53
2.4	Membranas colágenas	56
2.4.1	BIOGIDE (Colágeno tipo I e tipo III, Geistlich Biomaterials, Switzerland)	56
2.4.2	GenDerm® (osso cortical bovino descalcificado; Baumer, Mogi Mirim, Brasil).....	58
2.4.3	CollaTape	59
3	PROPOSIÇÃO	61
4	MATERIAL E MÉTODOS	65
4.1	Seleção dos pacientes para coleta da granulação óssea.....	67
4.2	Criação do alvéolo cirúrgico	68
4.3	Estabelecimento de cultura primária de células derivadas da granulação óssea (células GO)	69
4.4	Determinação da curva de crescimento das células derivadas da granulação óssea	69
4.5	Ensaio da atividade de Fosfatase Alcalina (FAL)	71
4.6	Ensaio de mineralização (vermelho de alizarina)	72
4.7	Ensaio de proliferação celular em meio condicionado por membranas colágenas	74
4.8	Análise estatística.....	82

5	RESULTADOS.....	83
5.1	Curva de crescimento celular	85
5.2	Ensaio de atividade de fosfatase alcalina.....	85
5.3	Ensaio de atividade de mineralização	86
5.4	Ensaio de viabilidade celular	87
6	DISCUSSÃO	93
7	CONCLUSÕES	103
	REFERÊNCIAS.....	107
	ANEXO.....	117

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A regeneração dos tecidos periodontais requer a restauração completa dos tecidos perdidos com o processo de doença, tanto do ponto de vista ultraestrutural quanto funcional (MCCULLOCH, 1993). Vários métodos clínicos foram propostos com o objetivo de se conseguir a formação de novo osso, novo cimento e novo ligamento periodontal, incluindo diferentes técnicas de enxertos ósseos autógenos, alógenos, xenógenos, uso de materiais aloplásticos, regeneração tecidual guiada e condicionamento ácido radicular, mas nenhuma das técnicas apresenta boa previsibilidade. Além disso, embora estudos histológicos realizados em modelos animais e em seres humanos tenham demonstrado a capacidade regenerativa de diferentes biomateriais, o sucesso clínico não é claramente definido e, portanto, altamente subjetivo (McCLAIN; SCHALLHORN, 1999; SANT'ANA et al., 2007).

A regeneração tecidual (RTG) ou óssea (ROG) guiada é atualmente considerada um procedimento terapêutico essencial para o tratamento de defeitos periodontais, peri-implantares e para o aumento de volume do tecido ósseo previamente ou simultaneamente à instalação de implantes osseointegrados (ROTHAMEL et al., 2004). Inicialmente, as barreiras de membrana utilizadas na RTG eram de politetrafluoretileno expandido (ePTFE), as quais, embora sejam efetivas, requerem uma segunda abordagem cirúrgica para sua remoção (NYMAN et al., 1982; GOTTLOW et al., 1984, 1986; CAFFESSE et al., 1990;). Membranas não absorvíveis de ácido láctico, poliglicólico ou colágeno foram propostas para contrapor as desvantagens das membranas de ePTFE, que foram recentemente retiradas do mercado. As membranas colágenas de colágeno bovino ou porcino apresentam, clinicamente, resultados semelhantes àqueles obtidos com membranas não absorvíveis (CORTELLINI et al., 1996; CAFFESSE et al., 1997).

As membranas colágenas são reabsorvidas por atividade enzimática de macrófagos e leucócitos PMN (TATAKIS et al., 1999). Para prolongar seu tempo de reabsorção, várias técnicas de ligação cruzada são utilizadas, incluindo luz ultravioleta, glutaraldeído e difenilfosforilazida, entre outras (BUNYARATAVEJ; WANG, 2001). No entanto, a influência dessas ligações cruzadas na adesão e

proliferação de células com potencial regenerativo ainda é pouco conhecida (ROTHAMEL et al., 2004).

Poucos estudos investigaram a proliferação de células com diferentes tipos de membranas. Dessa forma, é importante determinar a citocompatibilidade de diferentes membranas colágenas utilizadas clinicamente para regeneração dos tecidos periodontais perdidos com o processo de doença.

A técnica do enxerto ósseo em neoformação foi proposta por Passanezi et al. (1989) em estudo clínico e histológico realizado em cães e em estudo de caso realizado em seres humanos. Consiste da criação de alvéolo por meio da extração de dentes condenados ou da perfuração do rebordo com broca esférica em baixa rotação e posterior coleta e transferência do material de granulação presente no interior do alvéolo para o tratamento de defeitos periodontais infraósseos 21 a 25 dias depois. Análise histológica demonstrou a formação de novo osso, novo cemento e novo ligamento periodontal funcionalmente inserido e coronal à base do defeito original, sugerindo plasticidade celular.

O tecido ósseo em reparação contido no interior dos alvéolos apresenta bom potencial regenerativo periodontal devido à presença de grande número de células indiferenciadas, com alta taxa de proliferação e grande potencial osteogênico nas fases iniciais da cicatrização (HALLIDAY 1969; SOEHREN; VAN SWOL, 1979; EVIAN et al. 1982; AMLER 1984). Estudos sugeriram que os alvéolos de extração são preenchidos com novo osso em aproximadamente 2/3 da sua extensão após 40 dias e com 100% da extensão em 10 semanas. (EVIAN et al. 1982).

A origem do tecido osteogênico que preenche o alvéolo após a extração dentária é controversa (DEVLIN; SLOAN, 2002), já que as células osteogênicas podem ser originárias do ligamento periodontal residual (KURU et al., 1999; WANG et al., 2011), periósteo, osso medular (FRIEDENSTEN et al., 1987) ou a partir dos pericitos associados aos vasos sanguíneos (DOHERTY et al., 1998). Após a extração do dente, remanescentes de ligamento periodontal no alvéolo se diferenciam em diferentes tipos celulares, incluindo fibroblastos, osteoblastos e osteoclastos (SOMERMAN et al. 1988; YAMASHITA et al. 1987).

Lin et al. (1994) encontraram que fibroblastos de ligamento periodontal proliferam ativamente após a extração dentária, migram para dentro do coágulo, formam tecido conjuntivo denso e se diferenciam em osteoblastos, resultando na formação de novo osso.

Poucos estudos investigaram a capacidade de proliferação e diferenciação das células derivadas da granulação óssea presente em alvéolos de extração ou cirurgicamente criados *in vitro*, assim como sua caracterização histoquímica e morfológica. A determinação desses aspectos é essencial para investigar a presença de células tronco, permitir a expansão celular *in vitro* e, conseqüentemente, permitir, futuramente, o uso dessas células para regeneração dos tecidos periodontais e peri-implantares.

2 REVISTA DA LITERATURA

2 REVISTA DA LITERATURA

2.1 Linhagens de células tronco ou células osteoprogenitoras derivadas do tecido ósseo alveolar

Diferentes tipos de células originárias do tecido ósseo tem sido utilizadas como fonte de células com potencial regenerativo, sendo este o objetivo deste subitem da revista de literatura.

Em 1987, Melcher et al. investigaram se a presença de fragmentos de dentes em cultura poderia modificar a expressão fenotípica por células derivadas de osso *in vitro*. Foram isoladas populações celulares da calvária de ratos e, como controle, foram utilizadas populações de células derivadas de ligamento periodontal e de fibroblastos gengivais obtidos de ratos. Os fragmentos de dentes eram de origem porcina e apresentavam aproximadamente 200 µm de espessura. O meio de cultura essencial mínimo recebeu a adição de β-glicerofosfato na concentração de 10mM. As observações de cultura de células simples permitiram concluir que as células marcadas com timidina nos canais vasculares do osso alveolar de ratos se comunicavam com o ligamento periodontal. Os nódulos mineralizados se formaram depois de 14 dias em cultura e mostraram marcação positiva para alizarina, indicando sua mineralização. No entanto, não foram observados nódulos semelhantes nas culturas de fibroblastos gengivais ou derivados de ligamento periodontal. Sob microscopia óptica, observou-se que os fragmentos dentários estavam cobertos e circundados por células, as quais produziram substância extra-celular de aspecto semelhante a osso ou cimento celular, com marcação positiva no teste de Von Kossa. Sob microscopia eletrônica, a estrutura mineral depositada era semelhante a cimento acelular ou afibrilar *in vivo* nas superfícies de corte dos fragmentos, enquanto que na periferia.

Devlin e Sloan (2002) utilizaram anticorpos monoclonais AML-3, SB-10 e SB-20 para localizar por métodos imunohistoquímicos, a população de células osteoprogenitoras em alvéolos duas semanas após a extração dentária de três pacientes. Houve expressão de Runx2 por osteoblastos na margem do alvéolo e ao redor dos espaços medulares. As células osteoprogenitoras, pré-osteoblastos e osteoblastos circundando as trabéculas ósseas recém-formadas expressaram antígenos reativos a SB-10 e SB-20. Observaram ainda a presença de ligamento periodontal residual direcionado ao centro do alvéolo, contendo restos epiteliais de Malassez e cementículos. Esses achados sugeriram que as células osteoprogenitoras presentes no ligamento periodontal residual e no osso medular podem contribuir para a regeneração após a extração dentária.

Zhou et al. em 2008 isolaram células do periodonto de 14 pacientes, incluindo osteoblastos alveolares, de ligamento periodontal e fibroblastos gengivais e investigaram seu potencial de diferenciação osteogênica e adipogênica, após expansão da cultura *in vitro*. Células nas passagens 2-3 foram utilizadas para caracterização por meio de citometria de fluxo utilizando diferentes anticorpos. Posteriormente, as células foram cultivadas em meio adipogênico e caracterizadas 4 semanas depois por meio da contagem de células coradas com alizarina vermelha. Em experimento paralelo, as células foram cultivadas em meio osteogênico e a presença de nódulos mineralizados foi realizada por meio de teste de von Kossa. Além disso, foram também investigadas atividade de fosfatase alcalina, acúmulo de cálcio e expressão de colágeno III, OPN, OCN, BSP, Osx, PPARY, LPL, Runx2 e GAPDH. Houve diferenças morfológicas entre os diferentes tipos celulares, com fibroblastos gengivais formando filópodes, fibroblastos de ligamento periodontal exibindo perfil triangular e células osteoblásticas exibindo formato estrelado, embora todas mostrassem expressão de antígenos de superfície semelhantes. Após a indução adipogênica, houve alteração da morfologia dos três tipos celulares investigados, com diferenciação de 10,7% das células osteoblásticas e 17,4% dos fibroblastos de ligamento periodontal. Células osteoblásticas e de ligamento periodontal mostraram formação de nódulos mineralizados *in vitro*, maior acúmulo de cálcio, especialmente nas células osteoblásticas, maior atividade de fosfatase alcalina após a indução osteogênica e expressão de marcadores osteogênicos (OPN, OCN, BSP e Osx). Células osteoblásticas mostraram alta expressão de CD29 e CD49a, enquanto que as células derivadas de ligamento periodontal mostraram expressão diferencial de baixos níveis de CD63 e CD73. As células osteoblásticas são aquelas que demonstraram maior potencial de indução osteogênica, seguida por fibroblastos de ligamento periodontal, sugerindo que ambas contêm células progenitoras osteogênicas e adipogênicas, indicando sua possível aplicação para a regeneração dos tecidos periodontais.

Wang et al. em 2011 isolaram células tronco derivadas de ligamento periodontal presentes nas paredes dos alvéolos de extração, observando alta capacidade proliferativa e maior potencial de diferenciação osteogênica e adipogênica do que células de ligamento periodontal isoladas da superfície radicular. Atividade de fosfatase alcalina e expressão de marcadores relacionados à mineralização foram maiores no ligamento derivado do alvéolo do que naquele derivado da raiz. Além disso, essas células foram capazes de regenerar osso e ligamento periodontal e reparar defeitos de tamanho crítico criados em calvária de camundongos imunossuprimidos.

Os recentes avanços tecnológicos permitiram o desenvolvimento de novo material para enxerto alógeno, removido de cadáveres. Para sua produção, o osso cortical é separado do osso medular, liofilizado e tratado quimicamente para remoção do conteúdo

mineral e de células que possam resultar em imunogenicidade, como células sanguíneas e linfócitos. Após esse processamento, o osso é adicionado ao osso medular, compondo uma matriz óssea medular enriquecida por células. Essa matriz óssea contém células tronco mesenquimais nativas e células osteoprogenitoras, com marcação positiva para CD105 e CD166 e negativa para CD45. O material foi utilizado para o ganho de volume ósseo em procedimentos de levantamento de seio maxilar, conforme relatado por McAllister et al. em 2009 e, posteriormente, para o tratamento de defeitos periodontais infra-ósseos e de furca, conforme relatado por McAllister em 2011, resultando em ganho de inserção, diminuição da profundidade de sondagem, diminuição do defeito ósseo e fechamento clínico e radiográfico da furca.

2.2 Características clínicas, histológicas e moleculares dos alvéolos de extração em reparação

Segundo Devlin e Sloan (2002), o alvéolo de extração é um tecido único em termos de defeito ósseo em cicatrização, pois contém remanescentes do ligamento periodontal aderidos à parede do alvéolo. Embora essas células tenham demonstrado potencial osteogênico *in vitro*, a origem das células que povoam o alvéolo de extração humano é ainda desconhecida. Ao utilizar os anticorpos monoclonais AML-3, SB-10 e SB-20 para imunolocalização de população de células osteoprogenitoras de alvéolos duas semanas após a extração dentária de três pacientes, demonstraram expressão de Runx2 por osteoblastos na margem do alvéolo e ao redor dos espaços medulares. As células osteoprogenitoras, pré-osteoblastos e osteoblastos circundando as trabéculas ósseas recém-formadas e expressaram antígenos reativos a SB-10 e SB-20. Duas semanas após a extração dentária, observou-se a presença de ligamento periodontal residual direcionado ao centro do alvéolo, contendo restos epiteliais de Malassez e cementículos. Esses achados sugeriram que as células osteoprogenitoras presentes no ligamento periodontal residual e no osso medular podem contribuir para a regeneração após a extração dentária.

Cardaropoli et al. demonstraram em 2003 que, após a extração de dentes de cães, o alvéolo é ocupado pelo coágulo, o qual posteriormente é substituído por novo osso. Depois de 14 dias da extração dentária, o alvéolo é ocupado em 48% por novo osso mineralizado, enquanto que aos 30 dias de observação, o alvéolo foi ocupado em 88% por novo osso mineralizado.

Posteriormente, em 2005, Cardaropoli et al. investigaram o padrão de reparação de alvéolos de extração e em defeitos cirurgicamente criados, enxertados ou não, no rebordo alveolar de cães utilizando metodologia semelhante. Foram criados alvéolos cirúrgicos por

meio de hemissecação e extração radicular, onde um dos alvéolos foi instrumentado para remoção dos remanescentes do ligamento periodontal. Depois de 3 meses, foram criados cirurgicamente alvéolos cilíndricos, apresentando 3.5mm de diâmetro e 8mm de profundidade. Em cada quadrante, um defeito foi enxertado com Bio-Oss Collagen® (Geistlich, Suíça), outro com esponja de colágeno e outro foi mantido sem enxerto. Os animais foram sacrificados 3 meses depois. Não houve diferenças entre as características morfológicas dos alvéolos com ou sem preservação de ligamento periodontal. Observou-se, apicalmente à ponte óssea neoformada, o predomínio de osso medular, com algumas trabéculas de osso lamelar presente. Os defeitos cirurgicamente criados não enxertados foram selados por ponte de tecido duro. Nas porções central e apical dos defeitos, osso medular ocupou cerca de 61% da área e o osso mineralizado cerca de 39% dos tecidos. A invaginação da superfície do osso crestal foi de 0.8 ± 0.3 mm. Os defeitos tratados com esponja de colágeno foi coberto por ponte de tecido duro, sendo que 38% do tecido dentro do defeito estava constituído de osso medular, enquanto os 62% remanescentes foram constituídos de osso mineralizado. A invaginação da ponte de tecido duro foi de 0.6 ± 0.1 mm. Os defeitos tratados com Bio-Oss Collagen mostraram ocupação de porção substancial do volume tecidual pelo biomaterial. Houve contato direto da periferia do material e osso neoformado em 85% da área analisada. Osso imaturo e medular ocuparam 47% e 26% do tecido neoformado. A invaginação da porção mais coronal do defeito foi de 0.1 ± 0.1 mm.

Ahn e Shin investigaram em 2008 a formação óssea pós-extração dentária ao longo do tempo em alvéolos de dentes extraídos por razões periodontais ou não. Biópsias de tecido em cicatrização foram obtidas no momento da instalação de implantes. Os espécimes foram analisados histomorfometricamente para medir as alterações dimensionais entre 3 tipos de tecidos: camada epitelial, área de tecido conjuntivo e área de novo osso. Cinquenta e cinco espécimes obtidos de sítios previamente afetados por doença periodontal avançada de 45 pacientes foram incluídos no grupo teste e 12 espécimes de alvéolos previamente saudáveis obtidos de 12 pacientes foram incluídos no grupo controle. O período pós-extração do grupo doente variou entre 2 e 42 semanas. Neste grupo, o tecido conjuntivo ocupou a maior parte do alvéolo nas quatro primeiras semanas. A proporção de área de novo osso excedeu a de tecido conjuntivo após 14 semanas. Depois de 20 semanas, a maioria dos alvéolos de extração no grupo doente demonstrou formação contínua de novo osso. O grupo controle apresentou cicatrização completa após 10 semanas, sem formação adicional de novo osso após 20 semanas. Esses achados sugeriram que a regeneração óssea aconteceu mais lentamente em alvéolos de extração de dentes condenados periodontalmente.

Heberer et al. em 2011 avaliaram o potencial osteogênico de células mesenquimais embebidas na matriz provisória de alvéolos de extração com ou sem enxerto de Bio-Oss Collagen 6 semanas após a extração. Vinte e cinco pacientes com 47 sítios de extração participaram do estudo. Após a extração do dente, os alvéolos de extração foram tratados com Bio-Oss Collagen ou não. No momento de instalação do implante, biópsias da área da extração foram coletadas e posteriormente analisadas por imunohistoquímica para avaliação do potencial osteogênico das células mesenquimais utilizando anticorpos contra Runx2, osteonectina e osteocalcina. Dos 47 alvéolos examinados, 17 demonstraram ossificação quase completa, permitindo a análise imunohistoquímica de 21 alvéolos não enxertados e 9 enxertados. Não houve evidências de inflamação aguda ou crônica nos espécimes. Não houve diferenças significantes na quantidade média de células positivas para Cbfa1/Runx2 (sítios não enxertados 73.2% vs. sítios enxertados 73.3%), OSN/SPARC (sítios não enxertados- 66.9% vs. sítios enxertados- 61.4%) e OC (sítios não enxertados- 23.4% vs. sítios enxertados- 20.1%) entre os dois grupos. A densidade celular não se correlacionou com a quantidade e células marcadas independente das proteínas usada. Esses achados sugeriram que a matriz provisória apresenta grande proporção de células apresentando maturação de células osteoprogenitoras maduras em osteoblastos. O enxerto com Bio-Oss não influencia a quantidade de células osteogênicas presentes no alvéolo de extração.

2.3 Técnica do enxerto ósseo em neoformação

A granulação óssea presente em alvéolos em cicatrização foi caracterizada pela primeira vez por Evian et al., em 1982. Amostras de tecido ósseo em cicatrização foram removidas de sítios de extração em intervalos de tempo de 4, 6, 8, 10, 12 e 16 semanas. Os resultados obtidos demonstraram que a proliferação de células e tecido conjuntivo dentro dos alvéolos ocorreu no período de 4 a 8 semanas, quando foi observada a formação de novo osso com material osteóide circundado por osteoblastos presente dentro do tecido conjuntivo. De 8 a 12 semanas, o material sofre maturação e forma padrão trabecular, com preservação de material osteóide em menor número. Observa-se maturação das trabéculas ósseas, com pouco material osteóide e osteoblastos no período compreendido entre 12 a 16 semanas, semelhantemente à morfologia do osso trabecular.

Em 1984, Amler considerou que o tecido ósseo medular apresenta maior tendência de formar osso quando transplantado no início de sua período regenerativo mais ativo do que quando amadurecido. Para testar esta hipótese, pequenos segmentos de esponja de polivinil foram implantadas em cavidades cirurgicamente criadas no fêmur de ratos, servindo como matriz para regeneração celular em procedimentos de enxerto. Houve formação de

novo osso em 16 de 22 casos (72,7%) quando material medular em regeneração foi usado para preenchimento do defeito, comparado com formação de osso em 4 de 23 casos (17,4%) quando foi utilizado tecido ósseo maduro ($p= 0.0002$). Não houve formação de novo osso quando se utilizou apenas as esponjas para enxerto (controle).

A técnica do enxerto ósseo em neoformação foi proposta na literatura em 1989 por Passanezi et al. No estudo pré-clínico, defeitos de furca foram criados cirurgicamente em molares superiores de 6 cães adultos. Simultaneamente, foram extraídos os incisivos inferiores dos cães, removendo-se os septos interproximais. Depois de 20 dias, os defeitos infra-ósseos nos molares maxilares foram tratados por meio da transferência do material de granulação óssea presente no interior dos alvéolos, até o nível ósseo preexistente, enquanto que os defeitos do grupo controle não receberam tratamento algum, sendo preenchido apenas pelo coágulo. Os animais foram sacrificados em períodos de 3 a 75 dias. Foram tratados ainda dois pacientes, os quais receberam tratamento periodontal regenerativo por meio de enxerto ósseo em neoformação obtido de alvéolos cirurgicamente criados em defeitos infra-ósseos profundos localizados na região de pré-molar inferior e molar inferior. A análise histológica dos espécimes demonstrou que os defeitos tratados com “enxerto ósseo em neoformação” foram preenchidos com tecido ósseo neoformado, novo cemento e novo ligamento periodontal funcionalmente inserido, enquanto que os sítios controle, tratados por meio de raspagem a campo aberto e posicionamento coronal do retalho, mostraram formação de novo cemento em área coronal ao defeito pré-existente, sem formação de novo osso ou novo ligamento periodontal. Os casos clínicos tratados por meio da técnica de “enxerto ósseo em neoformação” resultaram em diminuição da profundidade de sondagem, ganho de inserção clínica e fechamento radiográfico do defeito após 5 anos de observação.

A técnica do enxerto ósseo em neoformação foi posteriormente avaliada por Soares et al. em 2005, quando analisaram qualitativamente e quantitativamente o processo de reparação de defeitos de furca de classe II cirurgicamente criados em molares de cães e tratados com enxerto ósseo removido de alvéolos em reparação com adição de PDGF-BB e IGF-1 na concentração de 6 $\mu\text{g/ml}$ ao alvéolo de extração (grupo teste). O grupo controle recebeu como tratamento debridamento do defeito e posicionamento coronal do retalho. Cinco dias após a extração do segundo e terceiro pré-molares superiores, 24 defeitos (12 teste e 12 controle) de furca foram criados no segundo, terceiro e quarto pré-molares inferiores, recebendo o tratamento descrito para os grupos teste e controle. Os achados histológicos e histomorfométricos não mostraram diferenças entre os grupos. No entanto, neste estudo, os defeitos foram criados com brocas cirúrgicas e a cirurgia para tratamento dos defeitos foi realizada cinco dias após, permitindo ao organismo a reparação dos tecidos naturalmente. Embora não houvesse diferenças estatisticamente significantes entre os

grupos, os defeitos tratados com enxerto ósseo e fatores de crescimento mostrou redução ligeiramente maior da profundidade de sondagem, bem como formação ligeiramente maior de novo osso.

Penteado et al. (2005), considerando que o tecido em cicatrização nos alvéolos de extração são mais efetivos na indução da formação óssea que o osso maduro, caracterizaram o material coletado de alvéolos em cicatrização 4 semanas após a extração de 6 dentes em seres humanos e encontraram marcação positiva para colágeno tipo I, osteonectina e sialoproteína óssea, com maior taxa de proliferação celular nas porções mais coronais do alvéolo, independente da colocação ou não de barreira de membrana. Os achados imunohistoquímicos e em microscopia eletrônica de transmissão sugeriram que o material apresenta característica osteoblástica por natureza.

O enxerto ósseo em neoformação foi utilizado para tratamento de recessões gengivais extensas por Ferraz em 2009. Neste estudo, 15 pacientes apresentando recessão gengival classe I ou II de Miller com extensão apical $\geq 4\text{mm}$ foram tratados por meio do enxerto ósseo em neoformação, obtido de alvéolos cirurgicamente criados 21-25 dias antes do tratamento. Foram tratados 35 defeitos no grupo teste e 30 defeitos no grupo controle, os quais foram tratados por meio de enxerto de tecido conjuntivo subepitelial. Os pacientes foram clinicamente avaliados no exame inicial e nos períodos pós-operatórios de 1, 3, 6 e 9 meses quanto às medidas de profundidade de sondagem, nível de inserção clínica, índice de placa, índice de sangramento gengival, comprimento da faixa de gengiva ceratinizada e altura da recessão. Os resultados obtidos demonstraram que as duas técnicas são igualmente efetivas na redução da recessão gengival (teste: $-2,77 \pm 0,16$; controle: $-3,20 \pm 0,24$; $p = 0,14$). Os dois grupos mostraram melhora de todos os parâmetros clínicos investigados após o tratamento. Os sítios tratados com enxerto ósseo em neoformação mostraram maior redução da profundidade de sondagem (teste: $0,85 \pm 0,10$; controle: $0,24 \pm 0,12$; $p < 0,0001$), do sangramento à sondagem (teste: $-0,65 \pm 0,21$; controle: $0,00 \pm 0,13$; $p = 0,01$) e maior ganho de inserção clínica (teste: $-3,74 \pm 0,26$; $-2,95 \pm 0,10$; $p = 0,024$). O grupo controle apresentou maior aumento na faixa de gengiva ceratinizada (teste: $0,48 \pm 0,13$; controle: $1,43 \pm 0,17$; $p < 0,0001$). Esses resultados sugeriram que a técnica do enxerto ósseo em neoformação é efetiva para o tratamento de recessões gengivais extensas, permitindo o recobrimento parcial ou completo da recessão, bem como regeneração dos tecidos periodontais.

2.4 Membranas colágenas

O colágeno utilizado em dispositivos médicos é proveniente de fontes animais distintas, incluindo pele, tendões, intestino bovino e de carneiros. O isolamento e purificação de colágenos de origem animal podem ser feitos de duas maneiras: degradação enzimática de colágeno bovino ou extração química do colágeno fibrilar. Após esses procedimentos, o colágeno é processado de diferentes formas para produção de gel, esponjas, filamentos e membranas, dentre outros. O processamento mais comum é a ligação cruzada por tratamento com gluraldeído, embora outras substâncias químicas possam também ser empregadas (NAHÁS 2003). Esta ligação não é tóxica e diminui a absorção de água, solubilidade, suscetibilidade à degradação enzimática, aumento da força de tensão e diminuição da imunogenicidade (PACHENCE 1996). De forma geral, as membranas colágenas são degradadas primariamente por atividade enzimática de macrófagos infiltrantes e leucócitos polimorfonucleares (NAHÁS 2003).

As membranas colágenas apresentam algumas vantagens em relação às membranas sintéticas, tais como função hemostática, permitindo a estabilização precoce da ferida cirúrgica, propriedades quimiotáticas para fibroblastos e semipermabilidade, facilitando a transferência de nutrientes (ROTHAMEL et al. 2005; SCHWARZ et al. 2006; BECKER et al. 2009). A integração tecidual e a transferência de nutrientes foram particularmente observadas para membranas compostas por colágenos I e III, mostrando maior suporte à angiogênese transmembrônica precocemente e subsequentemente favorecendo a regeneração óssea em compartimento periférico de defeitos de deiscência (SCHWARZ et al. 2008).

Uma desvantagem importante das membranas de colágeno nativo é a rápida biodegradação por atividade enzimática de macrófagos, leucócitos polimorfonucleares e bactérias periodontopatogênicas, resultando em pobre resistência ao colapso (ROTHAMEL et al. 2005). Por isso, usualmente, as membranas de colágeno nativo são usadas com enxertos ósseos ou substitutos ósseos (BECKER et al. 2009).

2.4.1 BIOGIDE (Colágeno tipo I e tipo III, Geistlich Biomaterials, Switzerland)

A membrana BioGide, comercializada pela Geistlich Biomaterials, com sede na Suíça, é uma membrana de camada dupla constituída por colágeno porcino tipos I e III sem ligações cruzadas, com estrutura semelhante à membrana colágena humana (TAL et al. 2008; BECKER et al. 2009).

Em 2000, Alpar et al. avaliaram a citocompatibilidade de duas membranas absorvíveis e uma membrana não absorvível e seus efeitos na proliferação de fibroblastos

de ligamento periodontal e células osteoblásticas por meio do teste de atividade metabólica mitocondrial (XTT) e de sulfodamina B para avaliar o conteúdo celular proteico. As células foram também cultivadas sobre as membranas e avaliadas por meio de MEV. Não houve alterações nas culturas de fibroblastos e osteoblastos após incubação com a membrana colágena. Efeitos citotóxicos foram induzidos pela barreira de ácido polilático, as quais inibiram o metabolismo de fibroblastos periodontais. Reações citotóxicas moderadas foram observadas com a membrana de ePTFE não absorvível nos fibroblastos periodontais e células osteoblásticas. Hillman et al. em 2002 investigaram a adesão e proliferação de fibroblastos gengivais humanas em amostras de BioGide® e Ethisorb®. Várias concentrações de células foram cultivadas sobre as membranas em pratos de cultura celular com ou sem agitação por 4 semanas e posteriormente avaliadas por meio de microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura. Houve crescimento celular esparsos nas membranas BioGide revestidas ou não, enquanto que número significativamente maior de células foram observadas sobre as membranas Ethisorb, especialmente nas culturas estáticas (não agitadas), com distribuição mais homogênea e síntese de componentes da matriz extracelular, como colágeno tipo I, e expressaram genes implicados com a sinalização de BMPs.

Rothamel et al. em 2004 avaliaram a biocompatibilidade de quatro diferentes membranas colágenas em culturas de fibroblastos periodontais e células osteoblásticas (BioGide®, Biomend®, Ossix®, Tutodent®). Células cultivadas em pratos de cultura foram usadas como controle. Seis espécimes de cada membrana foram semeados com as culturas de fibroblastos e outras seis com as culturas de osteoblastos. Houve maior número de fibroblastos periodontais aderidos sobre a membrana BioGide e Ossix. A BioGide também apresentou maior número de osteoblastos aderidos. A análise em MEV demonstrou que os fibroblastos aderidos apresentavam formato fusiforme e achatado, enquanto que os osteoblastos aderidos apresentavam forma estrelada e achatada no prato de cultura e arredondada sobre as membranas. Esses achados sugerem que a BioGide promove a adesão e proliferação de fibroblastos periodontais e células osteoblásticas.

Posteriormente, os autores compararam a biodegradação de diferentes membranas colágenas de ligação cruzada em ratos, incluindo BioGide, BioMend, BioMendExtend, Ossix, TutoDent e VN. Houve melhor vascularização e integração tecidual com a BioGide, a qual apresentou, por consequência, biodegradação mais rápida. A membrana Ossix não foi vascularizada e biodegradada depois de 24 semanas. Esses achados sugeriram que a ligação cruzada de colágenos tipo I e III bovino e porcino estavam associados a período de biodegradação mais prolongada, diminuição da integração tecidual e vascularização e, em alguns casos, com reações do tipo corpo estranho.

Becker et al. em 2009 realizaram estudo clínico randomizado, prospectivo, controlado, duplo-cego e multicêntrico para avaliar a quantidade de preenchimento ósseo em defeitos de deiscência em implantes de titânio presentes em 54 pacientes. Os defeitos foram preenchidos com osso bovino mineralizado (BioOss, Geistlich) e recobertos com membrana VN (Geistlich) ou BioGide (Geistlich). Quatro pacientes foram excluídos do estudo devido à contaminação precoce da membrana, sendo 3VN e 1BG. Houve maior alteração na altura dos defeitos tratados com VN, com qualidade comparável àquela observada com BG. Porém, quando aconteceu exposição precoce da membrana, a ligação cruzada prejudicou a cicatrização de tecido mole ou causou infecções na ferida cirúrgica.

Em 2013, Miron et al. investigaram os efeitos do tratamento de membranas colágenas com BMP2 ou TGF- β 1 na adesão, proliferação e diferenciação de osteoblastos derivados de osso alveolar humano. Os resultados obtidos demonstraram que as membranas embebidas com BMP2 e TGF- β 1 aumentaram a proliferação de osteoblastos aos 3 ou 5 dias após a cultura comparativamente às membranas não tratadas. A administração de BMP2 aumentou a diferenciação de marcadores de osteoblastos, como osterix, colágeno tipo I, osteocalcina, assim como a mineralização óssea. A combinação de membrana colágena com os dois fatores de crescimento influenciou significativamente a adesão, proliferação e diferenciação de osteoblastos.

Naujoks et al. ainda neste ano investigaram a biocompatibilidade de células tronco somáticas humanas e osteoblastos humanos com diferentes tipos de membrana, incluindo BioGide, Gore-Tex, Genta-foil resorb, Resodont, BioMend, BioMend extend. Após a diferenciação osteogênica do meio de cultura por meio da adição de dexametasona, ácido ascórbico e β -glicerofosfato, as células foram cultivadas sobre as membranas e a adesão, proliferação, vitalidade celular, citotoxicidade e morfologia celular foram analisadas após 1, 3 e 7 dias. A maior taxa de adesão e proliferação foi observada para as membranas BioGide e Resodont, as quais também apresentaram maior vitalidade de células, sugerindo sua biocompatibilidade para a regeneração óssea baseada em células tronco.

2.4.2 GenDerm® (osso cortical bovino descalcificado; Baumer, Mogi Mirim, Brasil)

A membrana comercialmente conhecida como GenDerm® é constituída por osso cortical bovino, tendo sido inicialmente desenvolvida na Disciplina de Bioquímica da Faculdade de Odontologia de Bauru-USP. Posteriormente, o material passou a ser comercializado pela Baumer, com sede em Mogi Mirim, São Paulo e, por estas razões, seu uso é difundido no Brasil.

Em 2010, Pereira Neto analisou o comportamento de fibroblastos humanos obtidos através de cultura primária de tecido gengival cultivados sobre duas membranas de colágeno comercialmente disponíveis (GenDerm® e Osseoguard®) e duas membranas em desenvolvimento compostas de ácido poliglicólico e ácido poliglicólico associado a hidroxiapatita. Para determinar o efeito da presença das membranas na proliferação celular, foi realizada contagem de células em contador de células automatizado, observando-se diminuição do percentual de células em todos os períodos após o dia 2 nas membranas GenDerm. Para determinar a viabilidade celular nas membranas, foi utilizado o teste do ensaio colorimétrico do MTT, não se observando diferenças significantes entre os grupos.

Bernabé et al. em 2012 analisaram histologicamente os resultados do uso de osso bovino liofilizado (GenOx orgânico, Baumer, Mogi Mirim, Brasil) com ou sem a proteção de barreira de membrana constituída de osso bovino cortical descalcificado (GenDerm) para o tratamento de defeitos de tamanho crítico criados na tíbia de ratos. Os resultados permitiram observar que os defeitos tratados com associação do enxerto ósseo e membrana resultaram em cicatrização mais avançada aos 30 e 90 dias quando comparada com grupos tratados apenas por membrana ou apenas por enxerto ou ainda pelo coágulo.

2.4.3 CollaTape

A membrana CollaTape é fabricada com colágeno obtido do tendão flexor profundo bovino e foram usados para produzir tecido semelhante à mucosa palatina. Esse arcabouço produzido por meio de engenharia de tecido é comercializado como material biodegradável, estéril, livre de pirogênio, em dois tamanhos diferentes. Suas características físicas são: material poroso que se torna um gel quando exposto a fluidos (LUITAUD et al., 2007).

Imaizumi et al. em 2004, demonstraram que o cultivo de células em dupla camada de fibroblastos e ceratinócitos podem facilitar a cura do epitélio e prevenir a contração da ferida.

Análises estruturais e ultraestruturais demonstraram que fibroblastos gengivais e células epiteliais aderiram ao biomaterial e proliferaram, produzindo, aos 6 dias, tecido fabricado formando epitélio com várias camadas, incluindo células citoqueratina 16-positivas na camada suprabasal. Assim, essa membrana poderia contribuir para a reconstrução de defeitos de tecido mole secundários a trauma, defeitos congênitos e doenças adquiridas, segundo Luitaud et al. em 2007.

Mais recentemente, o uso da CollaTape foi proposto por Danesh-Meyer em 2008 para a proteção de alvéolos de extração enxertados, com o objetivo de preservar tecido ósseo e ganhar tecido mole para a posterior instalação de implantes osseointegrados.

3 PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

Os objetivos deste estudo são:

- Estabelecer e caracterizar cultura primária de células derivadas da granulação óssea obtida de seres humanos;
- Investigar os efeitos proliferativos e de biocompatibilidade de diferentes membranas colágenas sobre células derivadas da granulação óssea e fibroblastos gengivais humanos *in vitro*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção dos pacientes para coleta da granulação óssea

Após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Bauru-USP (processo # 049/2011 – Anexo I), foram convidados a contribuir com este estudo 2 pacientes adultos, clinicamente saudáveis, de ambos os sexos, não fumantes, em tratamento de rotina nas clínicas de Periodontia e Integrada Reabilitadora da Faculdade de Odontologia de Bauru. Os critérios de inclusão foram indicação de terapia periodontal regenerativa por meio da técnica de enxerto ósseo em neoformação para tratamento de defeitos infraósseos ou de recessão ≥ 4 mm. Como pré-requisito para a execução da técnica, o paciente deveria apresentar dentes condenados à extração ou rebordo desdentado, permitindo a criação do alvéolo cirúrgico.

Foram incluídos no estudo apenas aqueles indivíduos que livremente concordaram em participar do estudo, após tomar conhecimento de sua natureza verbalmente e por escrito. Se a remoção do material de enxerto para estabelecimento da cultura primária resultasse em prejuízo do tratamento, mesmo que o paciente tenha concordado em participar do estudo, foi garantido ao paciente que a coleta não seria realizada, dando-se prosseguimento ao tratamento cirúrgico indicado.

Os critérios de exclusão foram: fumo, gravidez, uso contínuo de drogas anti-convulsivantes e anti-hipertensivas, corticoesteróides ou medicamentos que interfiram com o metabolismo ósseo (ex.: alendronato), doenças sistêmicas pobremente controladas (ex.: diabetes; doenças cardiovasculares) e contra-indicações ao tratamento cirúrgico de forma geral (ex.: doenças psíquicas, incapacidade motora).

4.2 Criação do alvéolo cirúrgico

O alvéolo cirúrgico foi criado pela extração de dente condenado ou pela perfuração do rebordo desdentado com broca diamantada esférica, conforme descrito por Passanezi et al. (1989). Brevemente, após antissepsia e anestesia adequada da área doadora, foi descolado retalho total sobre o rebordo ósseo desdentado, expondo-se a crista óssea do rebordo. Com auxílio de broca cilíndrica em baixa rotação, sob irrigação constante com soro fisiológico, foi criado alvéolo cirúrgico com dimensões aproximadas de 10 mm de profundidade x 3,5 mm de diâmetro, respeitando-se as estruturas anatômicas nobres, como seio maxilar e nervo alveolar inferior. A área foi protegida com membrana de colágeno bovino (GenDerm®, Baumer, Brasil), prevenindo a invaginação de tecido mole. O retalho foi suturado com fio de seda 4-0 (Ethicon, Johnson & Johnson, São Paulo, Brasil).

Como cuidados pós-operatórios, foram prescritos antibiótico (amoxicilina 500 mg, t.i.d., 7 dias) e anti-inflamatórios não esteroidais (nimesulide 100 mg, b.i.d., 3 dias). Os pacientes foram instruídos a não realizar bochechos vigorosos nas primeiras 48 horas. As suturas foram removidas após 7 dias.

Após 21 dias, a área foi novamente operada para realização da cirurgia periodontal regenerativa por meio da técnica de enxerto ósseo em neoformação (Passanezi et al. 1989). Durante o procedimento, uma pequena porção da granulação foi removida com auxílio de curetas Lucas do terço médio do alvéolo criado, de forma a não prejudicar o preenchimento dos defeitos ósseos periodontais a serem tratados. As amostras foram imediatamente colocadas em frasco contendo meio de transporte constituído por DMEM contendo 20% de soro fetal bovino (SFB), 200 U/mL de penicilina G potássica, 200 mg/mL de sulfato de estreptomicina e 20 µg/mL de anfotericina B em pH 7.4 e levadas ao laboratório de cultura de células do Centro Integrado de Pesquisa I da FOB-USP.

4.3 Estabelecimento de cultura primária de células derivadas da granulação óssea (células GO)

As amostras foram removidas do frasco contendo o meio de transporte e colocadas em placas de Petri contendo solução tampão fosfato salina sem cálcio e sem magnésio (PBSA) com 2% de solução antibiótica-antimicótica, lavadas e dissecadas finamente. Os fragmentos teciduais foram colocados, após a dissecação, em tubo Falcon contendo 10ml de PBSA e centrifugados durante 3 minutos. O PBSA foi aspirado, o precipitado de células resultantes foi ressuscitado em 1ml de DMEM suplementado com FBS a 20% e solução antibiótica e antimicótica a 2%, sendo então transferidas para frascos de cultura de células de 25cm² e mantidos em estufa de 95% de CO₂, temperatura de 37°C.

Todos os procedimentos de cultivo celular foram realizados em capela de fluxo laminar, seguindo os protocolos de manutenção e esterilidade de materiais e soluções utilizadas (Freshney, 2010). O crescimento celular foi monitorado diariamente em microscópio de fase invertido. Assim que surgiram as primeiras células, 1 ml de meio de cultura foi adicionado a cada 2 dias até atingir 5ml. Depois disso, o meio foi trocado de 5 em 5 ml até que o crescimento se apresentasse como uma monocamada subconfluyente (70% da área cultivável recoberta por células), quando foram separadas por métodos enzimáticos (solução de tripsina-Cro 25%, EDTA 1mM em PBSA) e cultivadas em frascos progressivamente maiores até que atingissem número de células suficientes para a realização dos experimentos em estufa com atmosfera úmida contendo 5% CO₂ a 37°C. As células foram denominadas GO (granulação óssea).

4.4 Determinação da curva de crescimento das células derivadas da granulação óssea

Para esse experimento, foram plaqueadas 10⁴ células/poço, na 3ª passagem, em 15 poços de placa para cultivo celular. O número de células vitais presentes nos poços foi determinado nos períodos de 1, 3, 5, 7 e 10 dias, em triplicata (Figura 1).

Figura 1: Distribuição das amostras em triplicata na placa de 24 poços para determinação da curva de crescimento das células GO

O plaqueamento inicial foi realizado de acordo com a técnica descrita por Freshney (2010). A concentração de células viáveis presentes em cada período de tempo foi determinada pela média das três contagens realizadas em cada poço nos diferentes períodos de avaliação. A determinação da curva de crescimento foi feita pelo método simplificado de Armelin et al. (1984), conforme brevemente descrito a seguir:

1. O meio presente nos poços de cultura foi aspirado e, a seguir, as células foram lavadas duas vezes com PBS;
2. Foi acrescentado aos poços 400 μ l de tripsina para destacamento das células aderidas e, na sequência, 500 μ l de PBS foram adicionados aos poços com tripsina;
3. A solução contendo as células foi coletada e colocada em *ependorfs* contendo 100 μ l de formol a 37%;
4. As amostras foram colocadas em câmara de Neubauer para contagem de células viáveis em 4 campos. O número de células presentes em cada poço foi determinado de acordo com as equações:

$$a) \text{ NT} = \frac{N \times D \times 10^4}{Q}$$

Onde: NT- número total de células; N- número de células contadas; D- Diluição; Q- número de quadrados

$$b) \text{ VIABILIDADE CELULAR} = \frac{NV \times 100}{NT}$$

Onde: NV- número de células viáveis; NT- número total de células contadas

5. Para análise estatística, foi considerada a média das três contagens realizadas para cada poço. Os dados foram tabulados permitindo análise estatística e construção de gráfico de crescimento celular.

4.5 Ensaio da atividade de Fosfatase Alcalina (FAL)

Para avaliar a atividade da FAL, as células da GO foram plaqueadas em placas de 24 poços na densidade de 4×10^4 células/poço em meio DMEM com 10% SFB. Após a adesão, as células foram divididas em dois grupos: com e sem meio osteogênico. No grupo sem meio osteogênico, as células GO foram cultivadas em DMEM + 10% SFB e no grupo com meio osteogênico, as células foram cultivadas em DMEM + 10% SFB + ácido ascórbico (50 µg/ml) + 10 mM de β-glicerofosfato (Figura 2A). Após 7, 14 e 21 dias, o extrato proteico do lisado celular foi obtido por meio da adição de 200 µl de solução tampão contendo 10 mM de Tris pH 7,5, 0,5mM MgCl₂ e 0.1% Triton X-100 (Figura 2C). As células foram lavadas uma vez com solução de PBS, lisadas (Figura 2D) e coletadas (Figura 2E) para análise da atividade de FAL, a qual é dada pela conversão do pNPP (p-nitrofenilfosfato), substrato da enzima, a p-nitrofenol, produto de coloração amarela. Para tanto, o meio de reação (solução contendo tampão glicina (25mM, pH 9,4) acrescido de 2 mM de MgCl₂ e 1 mM de pNPP) foi adicionado em placa de 96 poços. Após incubação por 30 minutos a 37°C (tempo necessário para estabilização), 30 µl das amostras ressuspensas em 10mM Tris HCl pH7,5;

0,5mM MgCl₂; 0,1% Triton X-100 foram adicionadas aos poços. A placa foi mantida a 37° C durante 41 minutos. A reação foi paralisada com NaOH 1 M. O produto final (p-nitrofenol) foi quantificado a 405nm e os resultados foram expressos como atividade em $\mu\text{mol pNP/min} \times \text{mg proteína}$.

Figura 2: Ensaio de atividade alcalina . Em (A) Distribuição das amostras de células GO em DMEM + 10% FBS + 50 $\mu\text{g/mL}$ + β -glicerofosfato 10 mM na placa de 24 poços; (B) Remoção do meio de cultivo; (C) Adição da solução tampão de lise celular; (D) Lise celular com rodinho; (E) coleta do lisado celular; (F) Placa de 96 poços contendo as amostras para análise de atividade de fosfatase alcalina por meio de absorbância em espectrofotometro.

4.6 Ensaio de mineralização (vermelho de alizarina)

Para avaliar a capacidade de mineralização, células da GO foram submetidas ao estímulo osteogênico e a deposição de cálcio foi avaliada através da coloração com vermelho de alizarina. Para tanto, as células GO foram plaqueadas na densidade de 4×10^4 em placas de 12 poços (Figura 3A). Após a aderência, as células foram divididas em dois grupos. Em um dos grupos, as células GO foram cultivadas em DMEM + 10% SFB (meio não osteogênico) e no outro grupo, as células foram cultivadas em meio DMEM + 10% SFB + 50 $\mu\text{g/mL}$ ácido ascórbico + 10 mM β -glicerofosfato (meio osteogênico), conforme ilustrado na Figura 3B. A mineralização foi avaliada por coloração com *Alizarin Red S* (Sigma-Aldrich®, São

Paulo, Brazil).

Após 14, 21 e 28 dias de cultivo, o sobrenadante das células GO foi descartado e, em seguida, as células foram lavadas com PBS uma vez (Figura 3C) e fixadas com solução de formaldeído a 4% (Figura 3D) por 5 minutos em temperatura ambiente (TA). As células foram então incubadas com solução de alizarina a 2%, pH 4,2 durante 10 minutos à temperatura ambiente (Figura 3E), seguido de 3 lavagens com água deionizada ultra pura (Figura 3F). As placas foram fotografadas utilizando a câmera El Logic 100 Imaging System e analisadas pelo programa Kodak Molecular Imaging software v.4.5.

Figura 3: Ensaio de mineralização. (A) Plaqueamento das células GO em placa de 12 poços; (B) Após a aderência, o meio foi suplementado com ácido ascórbico e β -glicerofosfato para indução osteogênica; (C) Lavagem com PBS após remoção do sobrenadante nos períodos de 14, 21 e 28 dias após o cultivo; (D) Fixação das amostras com solução de formaldeído 4% durante 5 minutos; (E) Incubação com solução de alizarina durante 10 minutos; (F) Remoção do corante e lavagem com água deionizada pura.

A análise quantitativa da coloração foi avaliada pelo método colorimétrico segundo Silva et al (2011). Após as placas estarem totalmente secas, foram adicionados 280 μ l de ácido acético a 10% diretamente em cada poço corado com vermelho de alizarina. A placa foi submetida à agitação por 30 minutos à temperatura ambiente. O conteúdo de cada poço foi transferido para tubos *ependorf*, os quais foram aquecidos a 85° C por 10 minutos e depois mantidos em

gelo por 5 minutos. Os tubos foram centrifugados a 20.000g por 15 minutos e 100 µl do sobrenadante de cada tubo foi transferido para poços de placas com 96 poços. Posteriormente, adicionou-se 40 µl de hidróxido de amônia a 10% em cada poço para neutralização do ácido (Figura 4). A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 405 nm, sendo a formação de matriz mineralizada expressa como densidade óptica (D.O.).

Figura 4: Placa de 96 poços com as amostras de células GO para avaliação da atividade de mineralização por meio de análise de absorbância em espectrofotômetro a 405 nm.

4.7 Ensaio de proliferação celular em meio condicionado por membranas colágenas

Para esse ensaio, foram utilizados fibroblastos gengivais humanos (FGH) obtidos a partir de linhagem primária previamente estabelecida (OHIRA, 2012) e células de granulação óssea (GO). As células foram congeladas em alíquotas e mantidas em nitrogênio líquido na disciplina de Bioquímica da FOB até a realização dos experimentos. Para tanto, as alíquotas de células foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 1 minuto. Após a remoção do meio contendo DMSO, as células foram cultivadas em frascos para cultura de células contendo meio DMEM + 10% SFB + 1% solução antibiótica e 0,5% de solução antimicótica em estufa com atmosfera úmida a 37°C e 5% de tensão de CO² até atingir subconfluência. Todos

os procedimentos foram realizados em capela de fluxo laminar no Centro Integrado de Pesquisa- 1 da Faculdade de Odontologia de Bauru- USP. O crescimento celular foi monitorado em microscópio de fase invertida (Figura 5).

Figura 5: Aspecto das células FGH e GO em cultura, observado em microscópio de fase invertido.

Condicionamento do meio

Foram utilizadas nesse experimento três diferentes membranas comercialmente disponíveis (GenDerm^{*}, BioGide[†], CollaTape[‡]), conforme mostrado na Figura 6. O condicionamento do meio de cultura foi feito por meio da colocação das diferentes membranas no meio de cultura. Para tanto, as membranas utilizadas foram pesadas, recortadas em fragmentos de 20mg e mergulhadas em 20 mL do meio de cultura (Figura 7), como forma de padronização da amostra (1mg/mL). O meio contendo a membrana (Figura 8) foi incubado em estufa a 37°C em atmosfera de ar umidificado a 5% de CO₂ por 24 horas. Após esse período, o meio condicionado com os diferentes tipos de membrana foi removido e reservado para a realização do ensaio de proliferação celular.

^{*} Baumer, Mogi Mirim, São Paulo, Brasil

[†] Geistlich, Wolhusen, Suíça

[‡] Zimmer, Carlsbad, California, Estados Unidos

Figura 6: Membranas comercialmente disponíveis utilizadas para o condicionamento do meio de cultura para realização do ensaio de proliferação celular

Figura 7: Membranas recortadas em fragmentos de 20 mg

Figura 8: Membranas recortadas e submersas em tubo contendo meio de cultura DMEM + 10% SFB + 1% solução antibiótica + 0.5% antimicótica (concentração final de 1mg/mL)

Ensaio de viabilidade celular

No 1º dia de experimento foram plaqueadas 10^3 células em 4 placas de 96 poços correspondentes aos períodos de 24, 48, 72 e 96 horas, conforme exemplificado pela Figura 9. Para o plaqueamento, as células foram tripsinizadas e contadas em câmara de Newbauer, de acordo com a metodologia previamente descrita.

Figura 9: Esquema da divisão dos grupos experimentais na placa de 96 poços [BK- blank (sem células)]

No 2º dia, o meio de cultivo convencional foi removido e substituído pelos meios condicionados pelas membranas (grupos experimentais) ou não condicionados (grupos controle), conforme demonstrado na Figura 10.

Figura 10: Substituição dos meios nas placas por meio condicionado com os três tipos de membranas (grupos experimentais) e meio convencional não condicionado (grupos controles)

As amostras foram plaqueadas em sextuplicatas de acordo com os seguintes grupos:

- Grupo C-FGH: células FGH cultivadas em DMEM + 10% SFB + 1% solução antibiótica e antimicótica
- Grupo GD-FGH: células FGH cultivadas em DMEM condicionado com membrana GenDerm + 10% SFB + 1% solução antibiótica-antimicótica
- Grupo BG-FGH: células FGH cultivadas em DMEM condicionado com membrana BioGide + 10% SFB + 1% solução antibiótica-antimicótica
- Grupo CT-FGH: células FGH cultivadas em DMEM condicionado com membrana CollaTape + 10% SFB + 1% solução antibiótica-antimicótica
- Grupo C-GO: células GO cultivadas em DMEM + 10% SFB + 1% solução antibiótica e antimicótica
- Grupo GD-GO: células GO cultivadas em DMEM condicionado com membrana GenDerm + 10% SFB + 1% solução antibiótica-antimicótica
- Grupo BG-GO: células GO cultivadas em DMEM condicionado com membrana BioGide + 10% SFB + 1% solução antibiótica-antimicótica
- Grupo CT-GO: células GO cultivadas em DMEM condicionado com membrana CollaTape + 10% SFB + 1% solução antibiótica-antimicótica

Ensaio do MTT

A proliferação celular foi avaliada nos períodos de 24, 48, 72 e 96hs pelo teste da análise da atividade mitocondrial das células, método de redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazólio) (MOSSMAN, 1983). Esse teste quantifica a conversão do MTT, solúvel em água, em formazan insolúvel, de coloração azul púrpura. O formazan é então solubilizado e sua concentração é determinada pela densidade ótica em espectrofotômetro com filtro de 562nm.

No 3º dia de experimento foi realizado o ensaio colorimétrico do MTT para a placa de 24h e subsequentemente as outras placas até 96h, com o objetivo de determinar os padrões de proliferação celular. Essa análise se baseia no teste de atividade mitocondrial das células pelo método da redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5- difeniltetrazólio) (MOSSMAN, 1983). Esse teste quantifica

a conversão do MTT, que é solúvel em água, em um formazan insolúvel. O formazan, de cor azul purpúrea, é solubilizado e, então, sua concentração é determinada pela densidade óptica em espectrofotômetro com filtro de 562nm.

Para tanto, após aspiração do meio e lavagem das amostras duas vezes. A seguir, 110 μ l da solução de MTT (0,5mg de pó de MTT em 1ml de meio DMEM sem soro) foi acrescentada às amostras. A placa foi enrolada em papel alumínio (Figura 11) e mantida em estufa por 4 horas. Após esse período, é possível observar os cristais dentro das células (Figura 12). O meio é removido e são adicionados 200 μ l de DMSO em cada poço (Figura 13), agitando com a pipeta, permitindo a posterior leitura em espectrofotômetro a 550nm (Figura 14).

Figura 11: Placa contendo solução de MTT sendo enrolada em papel alumínio

Figura 12: Visualização dos cristais de formazan no interior das células nos períodos de 24h e 96h.

Figura 13: Remoção do meio contendo solução de MTT para acréscimo de 200 μ L de solução de DMSO

Figura 14: Amostra de placa de 96 poços, permitindo leitura em espectrofotômetro a 550nm.

4.8 Análise estatística

A análise estatística foi realizada no software GraphPrism 5.0 (GraphPad, CA, EUA).

As contagens para estabelecimento da curva de crescimento foram realizadas em triplicatas, sendo considerados para análise estatística os valores médios obtidos. Os resultados foram analisados por meio de análise de variância múltipla (ANOVA) para medidas repetidas complementada pelo teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

As análises de atividade de fosfatase alcalina e de mineralização foram investigadas por meio de ANOVA *post hoc* Tukey, com nível de significância de 5%.

Os resultados obtidos com o ensaio de MTT para avaliação da viabilidade celular foram analisados pelo teste de análise de variância múltipla para medidas repetidas, adotando-se como nível de significância de 5% ($\alpha=0.05$).

Para investigação dos efeitos do condicionamento do meio de cultivo com as diferentes membranas, o percentual de células viáveis foi determinado com base na análise de 24 horas, considerado como 100%. A comparação entre os grupos em cada período de tempo foi realizada pelo teste Mann Whitney, com nível de significância de 5%. A determinação de diferenças estatisticamente significantes entre os períodos de tempo em relação ao controle foi feita por meio de análise de variância múltipla complementado pelo método de Dunnet, com nível de significância de 5%. Além disso, a análise comparativa entre os grupos foi realizada pelo método não paramétrico de Kruskal Wallis *post hoc* Dunn e a análise comparativa intra-grupos para detecção de diferenças entre os períodos de 24, 48, 72 e 96 horas foi realizada pelo teste de Friedman *post hoc* Dunn, ambos com nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Curva de crescimento celular

O padrão de crescimento das células GO está demonstrado no Gráfico 1. Houve crescimento celular progressivo até o 10^o dia, tendo sido observado aumento do número de células viáveis de 4.5 vezes no dia 1, 9.08 vezes no dia 3, 13.25 vezes no dia 5, 13.75 no dia 7 e 22.75 vezes no dia 10. Diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$) foram observadas nos dias 3, 5, 7 e 10 em relação ao controle, segundo o teste ANOVA para medidas repetidas, complementado pelo método de Dunnet.

Gráfico 1: Curva de crescimento das células GO, expresso em média $\pm$ desvio-padrão ($n \times 10^4$)

5.2 Ensaio de atividade de fosfatase alcalina

As células GO mostraram atividade de fosfatase alcalina em meio osteogênico e convencional, sem diferenças estaticamente significantes ($p > 0.05$; ANOVA *post hoc* Tukey) entre ambos nos períodos de 7 dias (não osteogênico: 0.58 ± 0.13 vs. osteogênico: 0.63 ± 0.13), 14 dias (não osteogênico: 0.44 ± 0.09 vs. osteogênico: 0.41 ± 0.06) e 21 dias (não osteogênico: 0.29 ± 0.04 vs. osteogênico:

0.34 $\pm$ 0.06). Houve diferenças significantes entre os diferentes períodos de avaliação no grupo de células cultivadas em meio convencional ($p= 0.0007$; ANOVA para medidas repetidas *post hoc* Tukey) e osteogênico ($p= 0.0004$; ANOVA para medidas repetidas *post hoc* Tukey). Os resultados obtidos estão representados no Gráfico 2.

Gráfico 2: Atividade de fosfatase alcalina das células GO cultivadas em meio não osteogênico constituído por DMEM + 10% SFB (legendas GO 7D, GO 14D e GO 21D) e em meio osteogênico (OSTEO) DMEM + 10% SFB + 50 μ g/ml ácido ascórbico + 10mM β -glicerofosfato (legendas GO 7D OSTEO, GO 14D OSTEO e GO 21D OSTEO). Média $\pm$ desvio-padrão.

5.3 Ensaio de atividade de mineralização

As células GO apresentaram atividade de mineralização *in vitro*, medida por meio de densidade óptica, com diferenças entre os grupos cultivados em meio osteogênico e convencional ($p < 0.0001$; ANOVA *post hoc* Tukey) nos períodos de 14 (não osteogênico: 0.46 $\pm$ 0.08 vs. osteogênico: 0.73 $\pm$ 0.11) e 21 dias (não osteogênico: 0.34 $\pm$ 0.03 vs. osteogênico: 0.59 $\pm$ 0.08), porém sem diferenças significantes entre os grupos no período de 7 dias (não osteogênico: 0.26 $\pm$ 0.01 vs. osteogênico: 0.29 $\pm$ 0.03; $p > 0.05$). Houve diferenças significantes entre os diferentes períodos de avaliação no grupo de células cultivadas em meio

convencional ($p < 0.0001$; ANOVA para medidas repetidas *post hoc* Tukey) e osteogênico ($p < 0.0001$; ANOVA para medidas repetidas *post hoc* Tukey). Os resultados obtidos estão representados no Gráfico 3.

Gráfico 3: Atividade de mineralização das células GO cultivadas em meio não osteogênico constituído por DMEM + 10% SFB (legendas GO 7D, GO 14D e GO 21D) e em meio osteogênico (OSTEO) DMEM + 10% SFB + 50 $\mu\text{g/ml}$ ácido ascórbico + 10mM β -glicerofosfato (legendas GO 7D OSTEO, GO 14D OSTEO e GO 21D OSTEO), marcada por *Alizarin Red S* e medida em densidade óptica. Média $\pm$ desvio-padrão.

5.4 Ensaio de viabilidade celular

A taxa de proliferação das células FGH, medida por meio de absorbância segundo ensaio de MTT, é maior do que a taxa de proliferação celular das células GO. No gráfico 4, está representada a viabilidade celular em densidade ótica observada para as células FGH nos diferentes grupos e períodos de tempo, enquanto que no gráfico 5 está representada a viabilidade celular das células GO, em densidade ótica, medida nos diferentes grupos e períodos de tempo.

Gráfico 4: Taxa de proliferação celular (viabilidade celular) medida em densidade ótica por meio do ensaio de MTT nos diferentes grupos e períodos de tempo para as células FGH (média $\pm$ erro padrão)

Gráfico 5: Taxa de proliferação celular (viabilidade celular) medida em densidade ótica por meio do ensaio de MTT nos diferentes grupos e períodos de tempo para as células GO (média $\pm$ erro padrão)

A análise da viabilidade celular por meio do ensaio de MTT (atividade mitocondrial) demonstrou que a densidade ótica das células FGH aumentou de forma significativa ($p < 0.05$; ANOVA para medidas repetidas *post hoc* Tukey) em todos os períodos de tempo para todos os grupos avaliados. Não houve diferença entre as análises realizadas no período de 48 horas em relação ao período de 24 horas no grupo GD e entre os períodos de 72 vs. 96 horas ($p > 0.05$; ANOVA para medidas repetidas *post hoc* Tukey) para nenhum dos grupos (Gráfico 4).

Houve diferenças estatisticamente significantes entre todos os períodos de avaliação nos grupos GD-GO e CT-GO ($p < 0.05$; ANOVA para medidas repetidas *post hoc* Tukey). No grupo C-GO, houve diferenças significantes entre os todos os períodos de tempo, com exceção dos períodos de 24 vs. 48 horas e 72 vs. 96 horas ($p > 0.05$; ANOVA para medidas repetidas *post hoc* Tukey). No grupo BG-GO, não houve diferenças significantes ($p > 0.05$; ANOVA para medidas repetidas *post hoc* Tukey) apenas entre os períodos de 72 e 96 horas (Gráfico 5).

A análise comparativa entre o percentual de células viáveis nos grupos C-FGH e C-GO mostrou diferenças estatisticamente significantes nos períodos de 48 horas ($357.1\% \pm 61.79\%$ vs. $146.7\% \pm 14.40\%$; $p = 0.0087$; Mann Whitney), 72 horas ($683.20\% \pm 96.43\%$ vs. $369.7 \pm 29.66\%$; $p = 0.026$; Mann Whitney) e 96 horas ($745.6\% \pm 120.1\%$ vs. 378.3 ± 22.20 , respectivamente; $p = 0.0131$; Mann Whitney). Por outro lado, dentre as membranas, houve diferenças entre GD-FGH e GD-GO no período de 96 horas (respectivamente, $341.3\% \pm 38.76\%$; $p = 0.0087$; Mann Whitney) e entre os grupos CT-FGH e CT-GO no período de 96 horas (respectivamente $450.2\% \pm 117\%$ vs. $1163\% \pm 388.7\%$; $p = 0.0152$; Mann Whitney).

Houve diferenças significantes entre o percentual de células viáveis nos períodos de 48, 72 e 96 horas nos grupos C-FGH ($p < 0.0001$; ANOVA para medidas repetidas *post hoc* Dunnett), GD-FGH e BG-FGH ($p < 0.0001$; ANOVA para medidas repetidas *post hoc* Dunnett) e nos períodos de 72 e 96 horas no grupo CT-FGH ($p = 0.001$; ANOVA para medidas repetidas *post hoc* Dunnett), conforme ilustrado no gráfico 6.

Nos grupos C-GO, BG-GO e CT-GO houve diferenças significantes nos períodos de 72 e 96 hs comparativamente ao controle ($p < 0.0001$; ANOVA para medidas repetidas *post hoc* Dunnett). No grupo GD-GO, houve diferenças significantes nos períodos de 48, 72 e 96 hs comparativamente ao controle ($p <$

0.0001; ANOVA para medidas repetidas *post hoc* Dunnett), conforme ilustrado no gráfico 7.

Gráfico 6: Viabilidade celular (%) das células FGH nos grupos controle, GD, BG e CT (média ± erro padrão da média)

Gráfico 7: Viabilidade celular (%) das células GO nos grupos controle, GD, BG e CT (média ± erro padrão da média)

Na tabela 1, observa-se os dados relativos ao percentual de células viáveis presentes nos diferentes grupos nos períodos de 48, 72 e 96 horas de avaliação, considerando-se como base os valores de densidade ótica observados, nos diferentes grupos, no período de avaliação de 24 horas (100%). A análise entre os grupos por meio do teste Kruskal Wallis complementado por Dunn mostrou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos C-FGH e C-GO e entre os grupos C-GO e CT-GO no período de 48 horas. Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos no período de 72 horas enquanto que, no período de 96 horas, foram observadas diferenças significantes apenas entre os grupos BG-FGH e CT-GO.

Ainda na tabela 1, observa-se que a análise intra-grupos por meio do teste de Friedman *post hoc* Dunn mostrou diferenças significantes nos períodos de 72 e 96hs relativamente ao controle em todos os grupos. Os grupos GD-GO e CT-GO mostraram ainda diferenças significantes no período de 48hs comparativamente a 96hs.

Tabela 1- Análise da viabilidade celular (%) nos diferentes grupos e períodos de tempo (média $\pm$ desvio-padrão)

	FGH				GO			
	C	GD	BG	CT	C	GD	BG	CT
48	357.1 $\pm$ 151.4 ^{A*}	146.7 $\pm$ 35.26 ^A	202.8 $\pm$ 42.26 ^A	213.7 $\pm$ 51.16 ^A	204.1 $\pm$ 58.67 ^{a*}	190.6 $\pm$ 81.36 ^{a,b}	253.1 $\pm$ 166 ^{a,b}	568.3 $\pm$ 429.4 ^b
72	683.2 $\pm$ 236.2 ^A	369.7 $\pm$ 72.64 ^A	362.5 $\pm$ 106.4 ^A	424.2 $\pm$ 131.4 ^A	396.2 $\pm$ 133.9 ^a	334.1 $\pm$ 135.4 ^a	449.30 $\pm$ 286.5 ^a	853.8 $\pm$ 679.2 ^a
96	845.6 $\pm$ 294.1 ^A	378.3 $\pm$ 54.38 ^{A†}	341.3 $\pm$ 94.95 ^A	553.7 $\pm$ 146 ^A	365.9 $\pm$ 124.8 ^a	439.5 $\pm$ 136.2 ^a	450.2 $\pm$ 286.50 ^a	1163 $\pm$ 952.2 ^{a†}
P	< 0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001

Kruskal Wallis *post hoc* Dunn; letras maiúsculas diferentes nas linhas da coluna FGH indicam diferenças entre as diferentes membranas e controle das células FGH; letras minúsculas diferentes nas linhas da coluna GO indicam diferenças estatisticamente significantes entre as diferentes membranas e controle das células GO; símbolos iguais nas linhas representam diferenças estatisticamente significantes entre células FGH e células GO nos grupos controle, GD, BG ou CT; P-análise intra-grupo por meio do teste de Friedman *post hoc* Dunn: C-FGH: 24hs vs. 72 e 96 hs; GD-FGH: 24hs vs. 72 e 96 hs; BG-FGH: 24hs vs. 72 e 96 hs; CT-FGH: 24hs vs. 72 e 96 hs; C-GO: 24hs vs. 72 e 96 hs; GD-GO: 24hs vs. 72 e 96 hs, 48hs vs. 96 hs; BG-GO: 24hs vs. 72 e 96 hs; CT-GO: 24hs vs. 72 e 96 hs, 48hs vs. 96 hs

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

Esse estudo foi realizado com dois objetivos principais: caracterizar as propriedades das células da granulação óssea obtidas de seres humanos após estabelecimento de cultura primária e investigar os efeitos proliferativos de diferentes tipos de membranas colágenas sobre essas células comparativamente a células fibroblásticas. Foi possível o estabelecimento de linhagem de células da granulação óssea (GO), originalmente desenvolvida na Faculdade de Odontologia de Bauru-USP (PASSANEZI et al. 1989), demonstrando-se que, além da viabilidade celular, essas células apresentam efeitos proliferativos potentes, característicos de células com alta atividade metabólica.

O alvéolo em cicatrização contém em seu interior grande número de células indiferenciadas, apresentando potencial regenerativo superior àquele de células osteoblásticas maduras, sendo, portanto, considerado como uma ótima fonte para obtenção de enxertos ósseos autógenos em Periodontia (PENTEADO et al. 2005; HEBERER et al. 2011). As propriedades osteogênicas dos alvéolos em cicatrização foram comprovadas em trabalhos de pesquisa publicados previamente (EVIAN et al. 1982; AMLER, 1984; PASSANEZI et al. 1989; CARDAROPOLLI et al., 2003; PENTEADO et al., 2005; CARDAROPOLLI et al., 2005). Essas células apresentam marcação positiva para colágeno tipo I, sialoproteína óssea e osteonectina (PENTEADO et al. 2005), sugerindo seu fenótipo compatível com células de origem osteoblástica (EVIAN et al., 1982; PENTEADO et al., 2005).

Embora essas características tenham sido previamente estabelecidas, até onde se tenha conhecimento, este é o primeiro estudo a estabelecer cultura primária de células presentes em alvéolos em cicatrização. Assim, é necessária a caracterização de suas características *in vitro*. Os resultados obtidos demonstraram que as células da granulação óssea, denominadas GO, apresentam características proliferativas compatíveis com células osteoblásticas, com menor taxa de crescimento quando comparado a fibroblastos gengivais. As células de ligamento periodontal, que apresentam características de células fibroblásticas ou osteoblásticas em cultura, apresentam crescimento logarítmico até 5 dias após o plaqueamento, quando atingem um platô, similar ao observado no estudo com as

células GO. Esse evento pode ser explicado pelo início de atividade de síntese proteica (WIKESJÖ et al. 1991; WANG et al. 1994).

Além disso, as células GO apresentaram atividade de fosfatase alcalina após cultivo em meio osteogênico e também em meio convencional, não osteogênico, e ainda foram capazes de sintetizar nódulos mineralizados *in vitro*. Esses achados não apenas corroboram os resultados de investigações prévias (PENTEADO et al. 2005) como os complementam, visto que esses ensaios identificam células de linhagem osteoprogenitoras.

O alvéolo de extração apresenta algumas características peculiares envolvidas na regeneração dos tecidos periodontais e do tecido ósseo. A origem do tecido osteogênico que preenche o alvéolo após a extração dentária é controversa (DEVLIN; SLOAN, 2002), já que as células osteogênicas podem ser originárias do ligamento periodontal residual (KURU et al., 1999), periósteo, osso medular (FRIEDENSTEN et al., 1987) ou a partir dos pericitos associados aos vasos sanguíneos (DOHERTY et al., 1998; SCHOR et al. 1995). Após a extração do dente, remanescentes de ligamento periodontal no alvéolo se diferenciam em diferentes tipos celulares, incluindo fibroblastos, osteoblastos e osteoclastos (SOMERMAN et al. 1988; YAMASHITA et al. 1987). Lin et al. (1994) encontraram que fibroblastos de ligamento periodontal proliferam ativamente após a extração dentária, migram para dentro do coágulo, formam tecido conjuntivo denso e se diferenciam em osteoblastos, resultando na formação de novo osso. Células de ligamento periodontal extraídas da parede dos alvéolos após a extração dentária demonstraram alta capacidade proliferativa e potencial de diferenciação osteogênica e adipogênica, especialmente quando comparados a células de ligamento periodontal isoladas a partir da superfície radicular. Além disso, células de ligamento periodontal obtidas da parede dos alvéolos expressaram maior quantidade de fosfatase alcalina e marcadores de mineralização, sendo capazes de regenerar osso e ligamento periodontal e reparar defeitos de tamanho crítico criados em calvária de camundongos imunossuprimidos (WANG et al. 2011).

Esses achados foram posteriormente confirmados por Devlin e Sloan (2002), quando observaram, duas semanas depois da extração dentária, a presença de ligamento periodontal residual em direção ao centro do alvéolo, contendo restos teciduais de Malassez e cementículos e, na periferia, numerosas trabéculas de osso imaturo. Os osteócitos imaturos e osteoblastos revestindo a margem e adjacentes

aos espaços medulares expressaram Runx2, proteína envolvida na ativação de osteoblastos. Dessa forma, a utilização do tecido presente em alvéolos em reparação apresenta potencial osteogênico elevado, possivelmente também relacionado à presença de células tronco mesenquimais.

Outros estudos sugeriram que o tecido ósseo em reparação contido no interior dos alvéolos apresenta bom potencial regenerativo periodontal devido à presença de grande número de células indiferenciadas, com alta taxa de proliferação e grande potencial osteogênico nas fases iniciais da cicatrização (HALLIDAY 1969; SOEHREN, VAN SWOL 1979; EVIAN et al. 1982; AMLER 1984, 1993). Estes estudos sugeriram que os alvéolos de extração são preenchidos com novo osso em aproximadamente 2/3 da sua extensão após 40 dias e com 100% da extensão em 10 semanas. (EVIAN et al. 1982).

Esses achados justificam o emprego da técnica de enxerto ósseo em neoformação para a regeneração dos tecidos periodontais (PASSANEZI et al. 1989). Clinicamente, observa-se que a técnica de enxerto ósseo em neoformação resulta no fechamento clínico e radiográfico de defeitos infra-ósseos profundos, com diminuição da profundidade de sondagem, ganho de inserção e presença de lâmina dura, o que indica regeneração de osso alveolar próprio (PASSANEZI et al. 1989). Mais recentemente, a técnica de enxerto ósseo em neoformação foi usada para o recobrimento de raízes apresentando recessões profundas e amplas (SANT'ANA et al. 2012), também resultando em diminuição da profundidade de sondagem, ganho de inserção, diminuição do sangramento e recobrimento radicular semelhante àquele observado com o tratamento de recessões por meio da técnica de enxerto de tecido conjuntivo subepitelial (FERRAZ, 2009). Histologicamente, o enxerto ósseo em neoformação obtido de alvéolos cirurgicamente criados em cães resultou na formação de três tipos teciduais distintos (osso, cemento e ligamento periodontal), o que denota a característica de plasticidade celular.

Estudos *in vitro* de cultura de células apresentam algumas vantagens importantes em relação aos estudos *in vivo*. Dentre estas, destaca-se a capacidade de controle preciso do ambiente físico-químico (pH, temperatura, pressão osmótica, tensão de O₂ e CO₂) e das condições fisiológicas, que podem ser mantidas relativamente constantes mas não podem ser sempre definidas. A maioria das linhagens celulares requer suplementação do meio com soro ou outros constituintes,

influenciando no desenvolvimento das linhagens celulares em cultura (FRESHNEY, 2010).

Outra vantagem dos estudos com cultura de células é a possibilidade de se conseguir caracterização e homogeneidade da amostra. As amostras de tecido são invariavelmente heterogêneas e, após uma ou duas passagens, as linhagens celulares cultivadas assumem uma constituição mais uniforme, já que as células são aleatoriamente misturadas a cada passagem e a pressão seletiva das condições da cultura tende a produzir uma cultura mais homogênea do tipo celular mais forte. Sendo assim, a cada subcultura, as características da linhagem celular são idênticas e podem ser mantidas por várias gerações ou até mesmo indefinidamente, se as células forem mantidas em nitrogênio líquido (FRESHNEY, 2010). Desta forma, o estabelecimento de cultura primária de células derivadas da granulação óssea humana (GO) permitiu a caracterização básica das mesmas *in vitro*, possibilitando a investigação futura de diversas condições.

Após a primeira passagem, a linhagem celular é estabelecida e o componente tecidual que apresenta a maior capacidade de proliferação deverá predominar, enquanto que as células com baixa capacidade de proliferação devem desaparecer gradualmente. As culturas se tornam mais estáveis após a terceira passagem. Conforme as células se proliferam na cultura e são subcultivadas, há um processo de senescência no qual as características das células vão sendo gradualmente perdidas (FRESHNEY, 2010). Por este motivo, a caracterização das células GO no presente estudo foi realizada na 3ª passagem, quando existia uma cultura homogênea de células que ainda preservavam suas propriedades físico-químicas e estruturais.

Conforme mencionado anteriormente, as células GO expressaram atividade de fosfatase alcalina e de mineralização *in vitro*. Essas características são também apresentadas por células derivadas de ligamento periodontal *in vitro*, as quais também expressam diversas proteínas relacionadas ao tecido ósseo, como sialoproteína óssea, osteonectina, osteopontina e osteocalcina (LEKIC et al. 1996, 2001; IVANOVSKI et al. 2001; MURAKAMI et al. 2003; NOHUTCU et al. 1997; GROENEVELD et al. 1993; KURU et al. 1999; HIRAGA et al. 2009; SANT'ANA et al. 2002). Estudos prévios evidenciaram que as células presentes no tecido de granulação presente em alvéolos em cicatrização expressam alguns desses

marcadores (Penteado et al. 2005), comuns a células tronco mesenquimais presentes no ligamento periodontal (Seo et al. 2004).

Alguns estudos identificaram a expressão *in vitro* de tecido semelhante a osso por células derivadas de tecido ósseo (ESCAROT-CHARRIER et al. 1983; SUDO et al. 1983; WHITSON et al. 1983; BELLOWS et al. 1986). A formação dos nódulos mineralizados *in vitro* foi conseguida após a adição de ácido ascórbico e β -glicerofosfato ao meio de cultura e estes apresentaram características de tecido mineralizado, estando constituído principalmente por colágeno tipo I, com marcação positiva para osteonectina, atividade de fosfatase alcalina e presença de conteúdo mineral. Esses achados também foram encontrados no presente estudo, o qual também utilizou adição de β -glicerofosfato e ácido ascórbico para induzir a produção mineral e atividade de fosfatase alcalina *in vitro*.

Outro achado interessante foi que houve, neste estudo, maior atividade de fosfatase alcalina aos 7 dias e produção de nódulos minerais, evidenciado por meio de alizarina, aos 14 dias. Esses achados estão de acordo com estudos anteriores (MELCHER et al. 1987) demonstrando que populações derivadas da calvária de ratos cultivadas em meio essencial mínimo acrescido de β -glicerofosfato e condicionado com fragmentos dentários demonstraram formação de nódulos mineralizados após 14 dias, marcados com alizarina vermelha, indicando sua mineralização. No entanto, esses nódulos não foram observados nas culturas de fibroblastos gengivais ou periodontais, utilizadas como controle.

A regeneração periodontal envolve diferentes tipos de tecido, os quais apresentam diferentes papéis na regeneração de tecidos moles e duros, o que torna necessário conhecer os mecanismos básicos que orientam a regeneração periodontal. Daí a importância de se estudar possíveis fontes de células progenitoras capazes de dar origem aos diferentes tecidos periodontais. Células derivadas de osso alveolar humano expressaram antígenos de superfície CD29, CD63 e CD73 em maior intensidade do que fibroblastos gengivais e de ligamento periodontal. Além disso, essas células apresentaram maior expressão de CD90 e CD44, marcadores de células tronco mesenquimais. A cultura das células osteoblásticas e de ligamento periodontal em meio osteogênico levou à formação de nódulos mineralizados *in vitro* aos 14 e 28 dias após a indução, simultaneamente ao maior acúmulo de cálcio e atividade de fosfatase alcalina. Ainda, os dois tipos celulares mostraram expressão semelhante de marcadores osteogênicos, como osteopontina, osteonectina e

sialoproteína óssea, confirmando os achados do presente e de estudos prévios (PENTEADO et al. 2005) realizados para caracterizar as células presentes nos alvéolos em cicatrização.

Todas as membranas avaliadas exerceram efeitos proliferativos sobre as osteoblásticas (GO) e inibiram a proliferação de células fibroblásticas (FGH), em todos os períodos de tempo investigados comparativamente ao controle (percentual de viabilidade celular). Dentre as membranas, a CollaTape foi aquela que apresentou os maiores efeitos proliferativos, seguida da membrana GenDerm e BioGide, no entanto sem diferenças estatisticamente significantes entre os diferentes tipos de membrana.

Outros estudos também encontram diminuição da viabilidade de células fibroblásticas cultivadas em membrana GenDerm (Pereira Neto, 2010). Por outro lado, houve excelente citocompatibilidade de células osteoblásticas e fibroblastos de ligamento periodontal cultivadas sobre membrana BioGide e Gore-Tex (ALPAR et al. 2000). No presente estudo, todas as membranas foram biocompatíveis, visto que houve aumento progressivo do percentual de células viáveis em todos os grupos condicionados com membrana, bem como nos grupos controles, tanto para as células FGH quanto para as células GO. Ao se analisar o metabolismo mitocondrial por meio de densidade ótica, neste estudo observou-se aumento do metabolismo mitocondrial em todos os grupos ao longo dos períodos, tanto para as células GO quanto para as células FGH, indicando a ótima biocompatibilidade de todos os materiais investigados.

Payne et al. (1996) investigaram a migração de fibroblastos gengivais sobre membranas de ePTFE e ácido polilático e encontraram que as duas inibiram a migração e induziram morte celular. Esses achados podem implicar em dificuldade de integração tecidual dessas membranas com o tecido, possibilitando a exposição da membrana na cavidade bucal, o que reduz a efetividade das membranas na exclusão do tecido epitelial e gengival, além de favorecer a contaminação bacteriana. Como consequência, espera-se menor ganho de inserção quando esses eventos estiverem presentes (NOWZARI; SLOTS, 1994; YOSHINARI et al. 1998).

A membrana CollaTape, feita de tendão flexor bovino, foi recentemente lançada no mercado como um produto voltado à produção de mucosa semelhante à palatina. Sua ultraestrutura permite a adesão e proliferação de células epiteliais e fibroblastos gengivais, formando um tecido semelhante à mucosa palatina (LUITAUD

et al. 2007), sendo portanto considerada como um arcabouço adequado ao cultivo de fibroblastos gengivais. No entanto, no presente estudo, a membrana CollaTape estimulou, de forma significativa, atividade metabólica mitocondrial de células osteoblásticas derivadas da granulação óssea. Além disso, também se observou efeito proliferativo significativo sobre células fibroblásticas, reiterando os resultados de estudos anteriores (LUITAUD et al. 2007).

Esses resultados sugerem que as membranas testadas são biocompatíveis, seguras e podem ser utilizadas para a regeneração de tecidos moles e duros perdidos com o processo de doença periodontal.

Os resultados do presente estudo sugerem ainda que as células da granulação óssea humana apresentam características de células osteogênicas proliferativas. O estabelecimento da cultura primária e, posteriormente, de suas linhagens celulares permitirá a investigação do comportamento dessas células em passagens maiores, bem como seu uso para pesquisas futuras, permitindo investigar a presença de células tronco mesenquimais, bem como investigação de outras substâncias.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Dentro das limitações da metodologia desse estudo, foi possível concluir que:

- O estabelecimento de cultura primária de células derivadas do tecido de granulação presente em alvéolos em cicatrização é viável;
 - As células derivadas do tecido de granulação (células GO) apresentam características típicas de células de linhagens osteoblásticas, apresentando atividade de fosfatase alcalina e de mineralização *in vitro*;
 - A taxa de proliferação das células GO é inferior àquelas observadas em células fibroblásticas (FGH);
 - A atividade mitocondrial das células GO é estimulada especialmente pelas membranas GenDerm, composta por osso bovino descalcificado, e CollaTape, derivada do tendão de Achilles de bovinos;
 - As membranas colágenas testadas são biocompatíveis e seguras.
-

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

Ahn J-J, Shin H-I. Bone tissue formation in extraction sockets from sites with advanced periodontal disease: a histomorphometric study in humans. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2008; 23: 1133-1138.

Alpar B, Leyhausen G, Günay H, Geurtsen W. Compatibility of resorbable and nonresorbable guided tissue regeneration membranes in cultures of primary human periodontal ligament fibroblasts and human osteoblast-like cells. *Clin Oral Invest* 2000; 4: 219-225.

Amler MH. Age factor in human alveolar bone repair. *J Oral Implantol* 1993;19:138-142.

Amler MH. The effectiveness of regenerating versus mature marrow in physiologic autogenous transplants. *J Periodontol* 1984;55:268-272.

Armelin HA, Armelin MC, Kelly K, Stewart T, Leder P, Cochran BH, Stiles CD. Functional role for c-myc in mitogenic response to platelet-derived growth factor. *Nature* 1984 Aug 23-29; 310(5979): 655-660.

Becker J, Al-Nawas B, Klein MO, Schliephake H, Terheyden H, Schwarz F. Use of a new cross-linked collagen membrane for the treatment of dehiscence-type defects at titanium implants: a prospective, randomized-controlled double-blinded clinical multicenter study. *Clin Oral Impl Res.* 2009; 20: 742-749.

Bellows CG, Aubin JE, Heersche JNM, et al. Mineralized bone nodules formed in vitro from enzymatically-released rat calvaria cell populations. *Calcif Tissue Int* 1986; 38: 143.

Bernabé PFE, Melo LGN, Cintra LTA, Gomes-Filho JE, Dezan E Jr, Nagata MJH. Bone healing in critical-size defects treated with either bone graft, membrane, or a combination of both materials: a histological and histometric study in rat tibiae. *Clin Oral Impl Res.* 2012; 23: 384-388.

Bunyaratavej P, Wang HL. Collagen membranes: a review. *J Periodontol.* 2001; 72: 215-229.

Caffesse RG, Dominguez LE, Nasjleti CE, Castelli WA, Morrison EC, Smith BA. Furcation defects in dogs treated by guided tissue regeneration (GTR). *J Periodontol*. 1990; 61: 45–50.

Caffesse RG, Mota LF, Quinones CR, Morrison EC. Clinical comparison of resorbable and non-resorbable barriers for guided periodontal tissue regeneration. *J Clin Periodont*. 1997; 24: 747–752.

Cardaropoli G, Araújo M, Lindhe J. Dynamics of bone tissue formation in tooth extraction sites. *J Clin Periodontol* 2003;30:809–818.

Cardaropoli G, Araújo M, Hayacibara R, Sukekava F, Lindhe J. Healing of extraction sockets and surgically produced – augmented and non-augmented – defects in alveolar ridge. An experimental study in dogs. *J Clin Periodontol* 2005; 32: 435-440.

Cortellini P, Pini Prato G, Tonetti MS. Periodontal regeneration of human intrabony defects with bioresorbable membranes. A controlled clinical trial. *J Periodontol*. 1996; 67: 217–223.

Danesh-Meyer M. Management of the extraction socket: site preservation prior to implant placement. *Aust Dental Pract*. 2008; Mar./Apr. 150-158.

Devlin H, Sloan P. Early bone healing events in the human extraction socket. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2002;31: 641-645.

Doherty MJ, Ashton BA, Walsh S, Beresford JN, Grant ME, Canfield AE. Vascular pericytes express osteogenic potential in vitro and in vivo. *J Bone Mineral Res* 1998; 13: 828-838.

Evian CI, Rosenberg ES, Coslet JG, Corn H. The osteogenic activity of bone removed from healing extraction sockets in humans. *J Periodontol* 1982;53: 81-85.

Escarot-Charrier B, Glorieux FH, Van der Rest M, et al. Osteoblasts isolated from mouse calvaria initiate matrix mineralization in culture. *J Cell Biol* 1983; 96: 639

Ferraz BFR. Recobrimento radicular: avaliação clínica de nova abordagem terapêutica regenerativa em humanos. Acompanhamento longitudinal de 9 meses. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo. Bauru, 2009. 121p.

Freshney RI. Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications. 6.ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2010.

Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Gerasimov UV. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tissue Kinet* 1987; 20: 263-272.

Gottlow J, Nyman S, Karring T, Lindhe J. New attachment formation as the result of controlled tissue regeneration. *J Clin Periodont*. 1984; 11: 494–503.

Gottlow J, Nyman S, Lindhe J, Karring T, Wennstrom J. New attachment formation in the human periodontium by guided tissue regeneration. Case reports. *J Clin Periodont*. 1984; 13: 604–616.

Groeneveld MC, Everts V, Beertsen W. A quantitative enzyme histochemical analysis of the distribution of alkaline phosphatase activity in the periodontal ligament of the rat incisor. *J Dent Res* 1993; 72(9): 1344-1350.

Halliday DG. The grafting of newly formed autogenous bone in the treatment of osseous defects. *J Periodontol* 1969; 40: 511-514.

Heberer S, Wustlich A, Lage H, Nelson JJ, Nelson K. Osteogenic potential of mesenchymal cells embedded in the provisional matrix after a 6-week healing period in augmented and non-augmented extraction sockets: an immunohistochemical prospective pilot study in humans. *Clin Oral Implants Res*. 2012; 23(1): 19-27.

Hillmann G, Steinkamp-Zucht A, Geurtsen W, Gross G, Hoffmann A. Culture of primary human gingival fibroblasts on biodegradable membranes. *Biomaterials* 2002; 23: 1461-1469.

Hiraga T, Ninomiya T, Hosoya A, Takahashi M, Nakamura H. Formation of bone-like mineralized matrix by periodontal ligament cells in vivo: a morphological study in rats. *J Bone Miner Metab* 2009; 27: 149-157.

Imaizumi F, Asahina I, Moriyama T, Ishii M, Omura K. Cultured mucosal cell sheet with a double layer of keratinocytes and fibroblasts on a collagen membrane. *Tissue Engineer*. 2004; 2006: 657-664.

Ivanovski S, Haase HR, Bartold PM. Expression of bone matrix protein mRNAs by primary and cloned cultures of the regenerative phenotype of human periodontal fibroblasts. *J Dent Res* 2001; 80: 1665-1671.

Kuru L, Griffiths GS, Petrie A, Olsen I. Alkaline phosphatase activity is upregulated in regenerating human periodontal cells. *J Periodontal Res* 1999; 34: 123-127.

Lekic P, Rojas J, Birek C, Tenenbaum H, McCulloch CA. Phenotypic comparison of periodontal ligament cells in vivo and in vitro. *J Periodontal Res* 2001; : 71-79.

Lekic P, Sodek J, McCulloch CAG. Osteopontin and bone sialoprotein expression in regenerating rat periodontal ligament and alveolar bone. *Anat Rec* 1996; 244(1):50-58.

Lin WL, McCulloch CA, Cho MI. Differentiation of periodontal ligament fibroblasts into osteoblasts during socket healing after tooth extraction in the rat. *Anat Rec* 1994; 240: 492–506.

Luitaud C, Laflamme C, Semlali A, Saidi S, Grenier G, Zakrzewski A, Rouabhia M. Development of an engineering autologous palatal mucosa-like tissue for potential clinical applications. *J Biomed Mater Res. Part B: Appl Biomater.* 2007; 83B: 554-561.

Marchesan JT, Scanlon CS, Soehren S, Matsuo M, Kapila YL. Implications of cultured periodontal ligament cells for the clinical and experimental setting: a review. *Arch Oral Biol* 2011; 56(10): 933-943.

McAllister BS. Stem cell-containing allograft matrix enhances periodontal regeneration: case presentations. *Int J Periodontics Rest Dent* 2011; 31(2): 148-155.

McAllister BS, Haghighat K, Gonshor A. Histologic evaluation of a stem cell based sinus-augmentation procedure. *J Periodontol.* 2009; 80: 679–686.

McClain PK, Schallhorn RG. The use of combined periodontal regenerative techniques. *J Periodontol.* 1999; 70(1): 102-104.

McCulloch CAG. Basic considerations in periodontal wound healing to achieve regeneration. *Periodontology* 2000. 1993;1:16-25.

Melcher AH, McCulloch CAG, Cheong T, Nemeth E, Shiga A. Cells from bone synthesize cementum-like and bone-like tissue in vitro and may migrate into periodontal ligament in vivo. *J Periodontal Res* 1987;22:246-247.

Miron RJ, Saulacic N, Buser D, Iizuka T, Sculean A. Osteoblast proliferation and differentiation on a barrier membrane in combination with BMP2 and TGF β 1. Clin Oral Invest 2013; 17: 981-988.

Mossman T. Rapid Colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods. 1983;65:55-63.

Murakami Y, Kojima T, Nagasawa T, Dobayashi H, Ishikawa I. Novel isolation of alkaline phosphatase-positive subpopulation from periodontal ligament fibroblasts. J Periodontol 2003; 74: 780-786.

Nahás ALR. Tratamento regenerativo periodontal de defeitos intra-ósseos de duas ou três paredes realizados em animais e humanos, utilizando a membrana reabsorvível de osso cortical bovino (GEN-DERM), osso inorgânico bovino (GEN-OX) e ácido cítrico com tetraciclina. Tese (Doutorado). Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo. Bauru, 2003. 199p.

Naujoks C, Von Beck FP, Langenbach F, Henteschel M, Berr K, Hofer M, Depprich R, Kübler N, Handschel J. Biocompatibility of membranes with unrestricted somatic stem cells. In Vivo 2013; 27(1): 41-47.

Nohutcu RM, McCauley LK, Koh AJ, Somerman MJ. Expression of extracellular matrix proteins in human periodontal ligament cells during mineralization in vitro. J Periodontol 1997; 68(4): 320-327.

Nowzari H, Slots J. Microorganisms in polytetrafluoroethylene barrier membranes for guided tissue regeneration. J Clin Periodontol 1994; 21: 203–210.

Nyman S, Lindhe J, Karring T, Rylander H. New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. J Clin Periodont. 1982; 9: 290–296.

Ohira GOB. Avaliação comparativa da produção de fatores de crescimento TGF- β , IGF-1 e PDGF-AA por fibroblastos gengivais e periimplantares. Monografia (Especialização). Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Universidade de São Paulo. Bauru, 2012. 39p.

Pachence JM. Collagen-based devices for soft tissue repair. J Biomed Mater Res 1996; 33(1): 35-40.

Passanezi E, Janson WA, Nahás D, Campos Jr A. Newly forming bone autografts to treat periodontal infrabony pockets: clinical and histological events. Int J Periodontics Rest Dent. 1989; 9(2): 140-151.

Payne JM, Cobb CM, Rapley JW, Killoy WJ, Spencer P. Migration of human gingival fibroblasts over guided tissue regeneration barrier materials. *J Periodontol*. 1996; 67:236–244.

Penteado R, Romito GA, Pustiglioni FE, Marques MM. Morphological and proliferative analysis of the healing tissue in human alveolar sockets covered or not by an e-PTFE membrane: a preliminary immunohistochemical and ultrastructural study. *Braz J Oral Sci*. 2005;4:664-669.

Pereira Neto ARL. Análise do comportamento de fibroblastos gengivais cultivados sobre diferentes tipos de membranas reabsorvíveis. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2010. 69 p.

Rothamel D, Schwarz F, Sculean A, Herten M, Scherbaum W, Becker J. Biocompatibility of various collagen membranes in cultures of human PDL fibroblasts and human osteoblast-like cells. *Clin Oral Impl Res*. 2004; 15: 443-449.

Rothamel D, Schwarz F, Sager M, Herten M, Sculean A, Becker J. Biodegradation of differently cross-linked collagen membranes: an experimental study in the rat. *Clin Oral Implants Res* 2005; 16(3): 369-378.

Sant'Ana AC, Marques MM, Barroso EC, Passanezi E, de Rezende MLR. Effects of TGF-beta 1, PDGF-BBI, and IGF-1 on the rate of proliferation and adhesion of a periodontal ligament cell lineage in vitro. *J Periodontol* 2007; 78(10): 2007-2017.

Sant'Ana ACP, Marques MM, Barroso EC, Passanezi E. Culture and characterization of human derived periodontal ligament cells. *Rev Fac Odontol Bauru* 2002; 10(3): 134-140.

Schor AM, Canfield AE, Sutton AB, ARciniegas E, Allen TD. Pericyte differentiation. *Clin Orthop and Rel Res*. 1995; 313: 81-91.

Schwarz F, Rothamel D, Herten M, Sager M, Becker J. Angiogenesis pattern of native and cross-linked collagen membranes: an immunohistochemical study in the rat. *Clin Oral Implants Res* 2006; 17(4): 403-409.

Schwarz F, Rothamel D, Herten M, Wüstefeld M, Sager M, Ferrari D, Becker J. Immunohistochemical characterization of guided bone regeneration at a dehiscence-type defect using different barrier membranes: an experimental study in dogs. *Clin Oral Implants Res* 2008; 19(4): 402-415.

Seo B-M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, Young M, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 2004; 364: 149-155.

Silva APRD, Petri AD, Crippa GE, Stuari AS, Rosa AL, Stuari MBS. Effect of low-level laser therapy after rapid maxillary expansion on proliferation and differentiation of osteoblastic Cells, *Lasers Med Sci*, (2011), DOI 10.1007/s10103-011-0968-0.

Soares FP, Hayashi F, Yorioka CW, Pannuti CM, Gioso MA, Lima LAPA de, Romito GA, Pustiglioni FE. Repair of class II furcation defects after a reparative tissue graft obtained from extraction sockets treated with growth factors: a histologic and histometric study in dogs. *J Periodontol* 2005; 76: 1681-1689.

Soehren SE, Van Swol RL. The healing extraction site: A donor area for periodontal grafting material. *J Periodontol* 1979; 50:128-133.

Somerman MJ, Archer SY, Imm GR, Foster RA. A comparative study of human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts in vitro. *J Dent Res* 1988;67:66–70.

Sudo H, Kodama H, Amagai Y, et al. *In vitro* differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. *J Cell Biol* 1983; 96: 191.

Tal H, Kozlovsky A, Artzi Z, Nemcovsky CE, Moses O. Cross-linked and non-cross-linked collagen barrier membranes disintegrate following surgical exposure to the oral environment: a histological study in the cat. *Clin Oral Implants Res* 2008; 19(8): 760-766.

Tatakis DN, Promsudthi A, Wikesjo UM. Devices for periodontal regeneration. *Periodontology* 2000; 19: 59-73.

Wang HL, Pappert TD, Castelli WA, Chiego DJ Jr, Shyr Y, Smith BA. The effect of platelet-derived growth factor on the cellular response of the periodontium: an autoradiographic study on dogs. *J Periodontol* 1994; 65(5): 429-436.

Wang L, Shen H, Zheng W, Tang L, Yang Z, Gao Y, Yang Q, Wang C, Duan Y, Jin Y. Characterization of stem cells from alveolar periodontal ligament. *Tissue Eng. Part A*. 2011; 17(7-8): 1015-1026).

Whitson SW, Harrison W, Dunlap MK, et al. Foetal bovine cells synthesize one specific matrix proteins. J Cell Biol 1983; 99: 607.

Wikesjö U, Crigger M, Nilvéus R, Selvig KA. Early healing events at the dentin-connective tissue interface. Light and transmission electron microscopic observations. J Periodontol 1991; 62(1): 5-14.

Yamashita Y, Sato M, Noguchi T. Alkaline phosphatase in the periodontal ligament of the rabbit and macaque monkey. Arch Oral Biol 1987; 32: 677-678.

Yoshinari N, Tohya T, Mori A, Koide M, Kawase H, Takada T, Inagaki K, Noguchi T. Inflammatory cell population and bacterial contamination of membranes used for guided tissue regenerative procedures. J Periodontol 1998; 69: 460-469.

Zhou Y, Hutmacher DW, Sae-Lim W, Zhou Z, Woodruff M, Lim TM. Osteogenic and adipogenic induction potential of human periodontal cells. J Periodontol 2008; 79: 525-534.

ANEXO

Anexo I – Folha de Aprovação do CEP

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru
Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

Comitê de Ética em Pesquisa (14)3235-8356
mferrari@fob.usp.br

Processo nº 49/2011

Bauru, 1 de setembro de 2011.

Senhora Professora,

Informamos que após o envio da documentação solicitada, o projeto de pesquisa encaminhado a este Comitê de Ética em Pesquisa **Efeitos do PDGF-BB na taxa de proliferação e adesão de células derivadas da granulação óssea a fragmentos radiculares**, a ser desenvolvido pela aluna Alejandra Medina Valdivia e colaboração de Fernanda de Almeida Barbosa sob sua orientação, foi novamente analisado em reunião realizada no dia **31 de agosto de 2011**.

O CEP-FOB/USP considerou o projeto **APROVADO** lembrando que a condição de aprovação da pesquisa propriamente dita exige o que segue:

- que sejam encaminhados ao CEP-FOB/USP relatórios anuais sobre o andamento da pesquisa (parciais e finais), conforme o cronograma apresentado;
- que sejam notificados ao CEP-FOB/USP, com a devida justificativa, qualquer modificação na metodologia e/ou título e a inclusão ou exclusão de autores;
- na apresentação do relatório final, incluir todos os TCLEs e/ou termos de doação de dentes devidamente assinados e rubricados.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Flávio Augusto Cardoso de Faria
Coordenador

Profª Drª Adriana Campos Passanezi Sant'ana
Docente do Departamento de Prótese