UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

MARIA ALEJANDRA MEDINA VALDIVIA

**Efeitos do PDGF-BB na taxa de proliferação e na adesão de células
derivadas da granulação óssea a fragmentos radiculares**

BAURU
2017

MARIA ALEJANDRA MEDINA VALDIVIA

Efeitos do PDGF-BB na taxa de proliferação e na adesão de células derivadas da granulação óssea a fragmentos radiculares

Tese apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Periodontia.

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Campos Passanezi Sant'Ana

Versão Corrigida

BAURU

2017

M468e Medina Valdivia, Maria Alejandra
Efeitos do PDGF-BB na taxa de proliferação e na adesão de células derivadas da granulação óssea a fragmentos radiculares / Maria Alejandra Medina Valdivia - Bauru, 2017.

123 p. : il. ; 31cm.

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

Orientador: Profa. Dra. Adriana Campos Passanezi Sant'Ana

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

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

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: 49/2011
Data: 31/08/2011

FOLHA DE APROVAÇÃO

DEDICATÓRIA

*A Deus,
Poís sem ele nada teria acontecido, dedico esse trabalho a
ele, Deus pai, sem sua presença derramando força,
dedicação e perseverança eu não teria chegado tão longe na
minha vida.*

*Aos meus pais,
Por ter me dado tanto nessa vida, pelo seu apoio
incondicional, seu amor, e por esse olhar cheio de orgulho
por mim, esse trabalho é graças a vocês.*

*Ao meu Irmão Juan Rommel,
Incondicional nessa etapa da minha vida, dedico esse
trabalho a você meu maior orgulho e exemplo, você foi o
principal motivador para eu chegar até aqui, com seu amor
e confiança você me ajudou a lutar até o fim, esse trabalho é
para você.*

*A minha Avó Blanca Rosa,
Meu Anjo da guarda, essa conquista é toda sua, sei quanto
você me ama, e todo o orgulho que você sentia por mim, todo
o amor que você me deu sempre foi minha motivação para
cumprir minhas metas na vida, Te Amo.*

*Deus,
Está por cima de você para te abençoar,
Embaixo de você para te segurar,
Na frente de você para te orientar,
Atrás de você para te proteger,
E SEMPRE de teu lado...*

AGRADECIMENTOS

A Deus, sempre ele primeiro, pois sem sua presença e bênçãos as metas cumpridas não teriam sentido, Obrigada sempre Senhor por fazer parte da minha vida.

Aos meus Pais, agradecimento mais do que especial para eles, pois aquilo que hoje eu sou só tenho que agradecer a cada um, pelo seu amor incondicional, sua confiança e apoio em todo momento, obrigada por tudo!

Ao meu irmão Juan Rommel, quero que você saiba quanto importante você é na minha vida diária e profissional, deus não duvidou em me presentear com você como meu irmão, pois me deu um parceiro para todo, cúmplice, exemplo, amigo, pai, todo em uma pessoa só, obrigada por tudo, te amo.

Aos meus Avós, que desde o céu eles me abençoam e guiam meu caminhar, em especial a minha rainha Mamá Blanca, pois ela ficou comigo quase toda dessa etapa, agora desde o céu ela continua do meu lado guiando meus passos, obrigada Avó por ter sido um grande apoio e motivação e hoje essa conquista é mais sua que minha, meu mais grande obrigada para você, Te Amo.

A todos meus primos e tios, pelo grande apoio e confiança, em especial a vocês Pili, Renato, Ana Lucia, tia Yini e tio Lucho, minha segunda família, obrigada por todo o que vocês têm me dado, seu amor é tudo, sua confiança meu maior presente, Amo Vocês.

A todos meus grandes e verdadeiros Amigos Peruanos, Ângela, Hellen, Doris, Milí, Silvia, Roxana, Jacky, Ronny, Monito, Jean Pierre, sem vocês na minha vida nada teria sido igual, obrigada pelo carinho, apoio, confiança e por todos os bons momentos vívidos.

A todos meus amigos de Bauru, Amanda, Jussara, Antonela, Estefy, Melanie, Melissa, Sara, Estef, Aron, Alfredo, Mauro, Ricardo, Jerônimo, irmãos que fizeram minha estada em Bauru muito alegre, aprendendo muito um do outro, amigos para a vida toda! Meu muito obrigada para cada um.

A todos meus companheiros de Turma e do departamento de Períodontia, Paula, Joao, Fabíola, Ma. Alejandra, Erika, Giovana, Luísa, Michelle, Rafael, pela parceria, apoio e amizade, meu muito obrigada a cada um, levo a todos no meu coração. Em especial a Paula Karam e Ma. Alejandra Frias, pelo apoio e colaboração no desenvolvimento deste trabalho, pela sua paciência e dedicação, muito obrigada meninas.

À Faculdade e aos meus Queridos Professores,

À minha orientadora, Profa. Dra. Adriana Campos Passanezi Sant'Ana, por ter sido mais do que uma professora, amiga, mãe, obrigada pela confiança, pelo apoio, pelos ensinamentos, pela paciência e dedicação. Você é um grande exemplo de mulher é um grande orgulho para mim! Levarei sempre no meu coração. Todo o meu agradecimento e admiração por sempre!

À Profa. Carla Damante, obrigada por todo o apoio, pelos ensinamentos e amizade, sem você não teria sido igual. Agradeço de coração, muito obrigada mesmo!

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

Ao Prof. Euloir 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 e Edilaine: vocês sabem que meu respeito, carinho e amizade não vão ter fim para vocês, pois tudo o que eu consegui até hoje foi também graças aos seus conselhos e carinho, obrigada por tudo Meninas!

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

Ao Centro Integrado de Pesquisa (CIP), em especial ao Prof. Rodrigo e Marcelo pelo apoio e amizade, por toda sua ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Departamento de Biologia Oral, disciplinas de Bioquímica e Imunologia, pela ajuda e disposição no desenvolvimento deste trabalho, muito obrigada.

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, pelo carinho e amizade, muito obrigada.

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

A CAPES pela Bolsa de estudos.

Obrigada Bauru-Brasil por ter me dado o melhor presente de desenvolvimento na minha vida!!! MUITO OBRIGADA!

RESUMO

O objetivo deste estudo foi investigar o papel do fator de crescimento derivado de plaquetas-BB (PDGF-BB) na concentração de 300ng/ml na taxa de proliferação e adesão de células derivadas da granulação óssea humana a fragmentos radiculares periodontalmente comprometidos. Na primeira etapa do estudo, foi estabelecida cultura primária de células da granulação óssea de dois pacientes adultos, sistemicamente saudáveis, não fumantes. Após a expansão celular, as células foram caracterizadas para determinação do fenótipo por meio de ensaios de viabilidade celular, MTT, ensaio de atividade de fosfatase alcalina, ensaio de mineralização e caracterização imunohistoquímica por meio de citometria de fluxo (segunda etapa). Na terceira etapa do estudo, os efeitos da adição de PDGF-BB recombinante humano na concentração de 300ng/ml na taxa de proliferação e adesão de células derivadas da granulação óssea a superfícies radiculares periodontalmente comprometidas foram investigados. A taxa de proliferação celular estimulada pelo PDGF-BB (grupo teste) ou pelo meio de cultura (grupo controle) foi investigada por meio de contagem de células viáveis nos frascos de cultura após 1, 3, 5 e 7 dias do cultivo celular. Foram obtidos 30 fragmentos dentários a partir de dentes extraídos por razões periodontais. Os fragmentos foram raspados com curetas Gracey e condicionados com solução em gel de EDTA a 24% durante 3 minutos, lavados com solução de soro fisiológico, secos e posicionados em placas de 24 poços. Foram incubadas sobre os fragmentos tratados 1×10^4 células GO por 24 horas, seguido por fixação e preparo para análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV). O número de células aderidas sobre os fragmentos foi analisado nas fotomicrografias. O padrão de crescimento das células GO foi compatível com células ósseas, com modificação do padrão do crescimento com o aumento do número de passagens. Houve atividade de fosfatase alcalina em meio osteogênico e convencional, com pico máximo aos 7 dias e atividade de mineralização estimulada ou não por meio osteogênico, com pico máximo aos 21 dias. A análise por meio de citometria de fluxo demonstrou que as células GO não expressaram CD105 e CD166 na 14ª passagem, indicando sua diferenciação celular avançada nesse período. A adição de rhPDGF-BB resultou em mudança na taxa de proliferação celular, observando-se pico máximo de crescimento aos 7 dias, com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.005$; ANOVA post hoc Tukey) em

relação aos períodos de 1, 3 e 5 dias. O ensaio de MTT demonstrou maior viabilidade celular no período de 48 hs, comparativamente aos períodos de 24 e 72 horas, quando a densidade óptica celular diminuiu de forma significativa ($p < 0.05$; Friedman pós-teste Dunn). No ensaio de adesão celular, pode-se observar que a adição de rhPDGF-BB aumentou significativamente o número de células aderidas aos fragmentos dentários ($p < 0.05$; teste t não pareado com correção Welch), com alteração da morfologia celular. Esses resultados sugerem que as células GO tem características compatíveis com linhagem de células osteoblásticas, de fenótipo mais diferenciado após a 12ª passagem. A adição de rhPDGF-BB (300ng/ml) resulta em aumento da taxa de proliferação das células GO e do número de células aderidas a fragmentos radiculares, indicando que, nesta concentração, o fator de crescimento é citocompatível, favorecendo a proliferação e adesão celular.

PALAVRAS-CHAVE: PDGF-BB; osteoblastos; *in vitro*; ácido; regeneração.

ABSTRACT

Effects of PDGF-BB on the rate of proliferation and on the adhesion of human cells derived from bone granulation tissue to root fragments

The goal of this study was to investigate the effects of recombinant human platelet derived growth factor (rhPDGF-BB) at the concentration of 300ng/ml in the proliferation and adhesion of human bone granulation cells to periodontally diseased root fragments. At the first stage of the study, the granulation tissue existent in healing sockets (21 days after its creation) was collected from two systemically healthy non-smoking adults to the establishment of primary culture. The in vitro properties of bone granulation (BG) cell lineage were characterized by cell viability, MTT, alkaline phosphatase activity and mineralization assays. The effects of culture medium (control) and rhPGDF-BB 300ng/ml (test) in the proliferation and adhesion of BG cells were investigated. The rate of BG cells proliferation was investigated by the number of viable cells present at 1, 3, 5 and 7 days after platting. Thirty root fragments were obtained from teeth extracted for periodontal reasons. Root fragments were scaled and root planed, conditioned with EDTA 24% for 3 minutes, rinsed in saline solution, air-dried and positioned in 24-well plates. Each fragment was seeded with 10^4 BG cells, fixated after 24 hours and prepared for analysis in SEM. The number of cells adhered to the fragments was analysed in photomicrographies. BG cells growth pattern was compatible with osteogenic cell lineage, showing modification with the increasing number of cell passage. GO cells expressed alkaline phosphatase activity in conventional and osteogenic culture medium, with maximum peak at 7 days, as well as mineralization activity stimulated or not by osteogenic or non-osteogenic culture medium, with maximum peak at 21 days. The analysis by flow cytometer showed that BG cells have not expressed CD105 and CD106 at the 14th passage, indicating its advanced cell differentiation. The addition of rhPDGF-BB resulted in modification of proliferation rate, with maximum peak observed at 7 days, significantly different from 1-, 3- and 5-day periods ($p < 0.005$; ANOVA post hoc Tukey). MTT assay showed greater cell viability after 48 hours than after 24 and 72 hours, when optical density has significantly diminished ($p < 0.05$; Friedmann post hoc Dunn). At cell adhesion assay,

it could be observed that the adhesion of rhPDGF-BB has significantly increased the number of cells adhered to root fragments ($p < 0.05$; unpaired t test with Welch's correction), and alterations in cell morphology. These results suggest that BG cells present *in vitro* characteristics compatible with osteoblastic cell lineages, with a more differentiated phenotype after the 12th passage. The addition of rhPDGF-BB (300 ng/ml) results in increase of the rate of BG cell proliferation and in the number of cells adhered to root fragments, indicating that, at this concentration, the growth factor is compatible with BG cells and favors cells proliferation and adhesion.

Keywords: PDGF-BB; osteoblasts; *in vitro*; acid; regeneration

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

- Figura 1** - Corte microscópico de amostra de tecido de granulação marcado com anticorpo monoclonal CD34 conjugado, sem evidência de imunofluorescência (A- aumento de 20X; B- aumento de 40x) e com anticorpo monoclonal CD146 conjugado, sem evidência de imunofluorescência (C- aumento de 20X; D- aumento de 40x).....76
- Figura 2** - Fragmento de dente pertencente ao grupo controle (A) e ao grupo teste (B). Nas pontas das setas brancas, observe as células osteoblásticas emitindo longos prolongamentos citoplasmáticos80

- GRÁFICOS

- Gráfico 1** - Viabilidade das células GO e FGH, investigada por meio do ensaio de MTT, expresso em média $\pm$ erro-padrão (eixo y: densidade ótica)74
- Gráfico 2** - Viabilidade das células GO na 12ª passagem, investigada por meio do ensaio de MTT, expresso em média $\pm$ desvio-padrão (eixo y: densidade ótica).....75
- Gráfico 3** - Imunomarcagem das células GO (granulação óssea humana); FGH (fibroblastos gengivais humano) FLP (fibroblastos de ligamento periodontal humano) e FSD (fibroblastos gengivais de pacientes portadores de síndrome de Down) com anticorpos contra CD34, CD45, CD105, COLL1 (colagênio tipo 1) e CD166.....77
- Gráfico 4** - Ensaio de viabilidade celular ($\text{nx}10^4$). Letras diferentes nos diferentes períodos de tempo significam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$; ANOVA para medidas repetidas, pós-teste Tukey78
- Gráfico 5** - Ensaio de proliferação celular (MTT), expresso em densidade óptica. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes entre os períodos de análise ($p < 0.05$; Friedman pós-teste Dunn).....78
- Gráfico 6** - Número médio de células GO aderidas sobre fragmentos dentários dos grupos teste e controle (média $\pm$ desvio-padrão)79
-
-

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Escala de morfologia celular	80
--	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1	Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF).....	23
2.1.1	Estudos in vitro	24
2.1.2	Estudos em animais	32
2.1.3	Estudos em seres humanos	39
2.2	Enxerto ósseo em neoformação ou granulação óssea.....	47
3	PROPOSIÇÃO	53
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	57
4.1	Estabelecimento de cultura primária e caracterização inicial das células GO	59
4.1.1	Criação do alvéolo cirúrgico e coleta da granulação óssea.....	59
4.1.2	Estabelecimento de cultura primária das células da granulação óssea (células GO)	60
4.1.3	Determinação da curva de crescimento das células GO	61
4.1.4	Ensaio da atividade de Fosfatase Alcalina (FAL)	61
4.1.5	Ensaio de mineralização (vermelho de alizarina)	62
4.2	Teste de proliferação e caracterização de população de células tronco mesenquimais	63
4.2.1	Teste de proliferação	63
4.2.2	Análise imunohistoquímica para caracterização de populações de células tronco mesenquimais	64
4.2.3	Citometria de fluxo	65
4.3	Efeitos do rhPDGF-BB (300ng/ml) sobre células de linhagem osteoblástica (GO).....	66
4.3.1	Coleta dos dentes extraídos e preparo dos fragmentos para o teste de adesão celular	66

4.3.2	Preparo da solução de PDGF-BB recombinante humano	66
4.3.3	Ensaio de viabilidade celular	67
4.3.4	Ensaio de proliferação celular (MTT).....	67
4.3.5	Ensaio de adesão celular	67
4.3.6	Avaliação da morfologia celular.....	68
4.4	Análise estatística.....	69
5	RESULTADOS	71
5.1	Etapa 1	73
5.1.1	Curva de crescimento.....	73
5.1.2	Ensaio de atividade de fosfatase alcalina.....	73
5.1.3	Ensaio de mineralização.....	73
5.2	Etapa 2	74
5.2.1	Ensaio de proliferação celular	74
5.2.2	Curva de crescimento das células GO na passagem 12	74
5.2.3	Caracterização de populações de células tronco mesenquimais	75
5.2.3.1	Caracterização imuno-histoquímica.....	75
5.2.3.2	Citometria de fluxo.....	76
5.3	Etapa 3	77
5.3.1	Ensaio de viabilidade celular	77
5.3.2	Ensaio de proliferação celular	78
5.3.3	Ensaio de adesão celular	79
5.3.4	Morfologia celular	79
6	DISCUSSÃO	81
7	CONCLUSÕES	97
	REFERÊNCIAS	101
	ANEXOS	121

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O ideal terapêutico periodontal é a cura das feridas por meio da restauração completa dos tecidos periodontais perdidos com o processo de doença, o que requer interações celulares complexas devido à existência de diferentes tipos de tecidos no periodonto (McCulloch 1993). A natureza dos tipos celulares que repovoa a superfície radicular é determinante no processo de regeneração ou reparação dos tecidos periodontais. (Sant'Ana et al. 2007; Wikesjö, Selvig 1999; Oates et al. 2001; Nyman et al. 1982; Garret 1994; Gottlow, 1994; Graves, Cochran, 1984; McCulloch 1993; Melcher 1976; Terranova et al. 1989). Os eventos celulares que levam à regeneração são dependentes da proliferação, migração, diferenciação e síntese de matriz protéica por células viáveis presentes na área da ferida (Melcher 1976, McCulloch 1993, Sant'Ana et al. 2007) e parecem ser dependentes de sinalização bioquímica apropriada, mediada por diferentes fatores de crescimento e diferenciação celular (Terranova, Wikesjö 1987; Caffesse, Quiñones 1993; Graves, Cochran 1994; McCulloch 1995; Sant'Ana et al. 2007).

Fatores de crescimento são mediadores biológicos capazes de regular várias funções celulares (Graves, Cochran 1994). O fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) é um fator de crescimento secretado primariamente pelos alfa-grânulos plaquetários, macrófagos ativados e fibroblastos. Contém 2 cadeias polipeptídicas como homodímero (AA e BB) ou como heterodímero (AB), podendo estimular de forma significativa, especialmente o isotipo BB, a proliferação e síntese de colágeno em seres humanos (Oates et al. 1993; Lynch et al. 1989, 1991; Lynch, Giannobile, 1994; Dennison et al. 1994). Tem sido utilizado em estudos in vitro (Canalis et al. 1989; Mumford et al. 1991; Matsuda et al. 1992; Boyan et al. 1994; Dennison et al. 1994; Giannobile et al. 1996; Gamal et al. 1998, 2000; Belal et al 2006, 2007, 2012; Ojima et al. 2003; Okuda et al. 2003; Papadopoulos et al. 2003; Bateman et al. 2005; Chong et al. 2006; Sant'Ana et al. 2007; Chowdhary et al. 2013) e in vivo (Lee et al. 2000; Camelo et al. 2003; Nevins et al. 2003, 2005, 2012, 2014; Sarment et al. 2006; Snyder 2012; Thakare, Deo 2012; Funato et al. 2013; Mishra et al. 2013; Urban et al. 2013) na regeneração de tecidos periodontais e peri-implantares. Foi demonstrada sua influência nas atividades de migração, proliferação e síntese em

células de ligamento periodontal (Matsuda et al. 1992; Boyan et al. 1994; Dennison et al. 1994; Gamal, Mailhot 1998; Sant'Ana et al. 2007), bem como na adesão de células a superfícies radiculares periodontalmente comprometidas (Gamal, Mailhot 1998; Sant'Ana et al. 2007; Belal et al. 2007).

O PDGF-BB recombinante humano (rhPDGF-BB) é vendido comercialmente (GEM 21S®, Osteohealth, Estados Unidos) na concentração de 0,3 mg/ml, tendo como carreador β -TCP. Estudo multicêntrico realizado por Nevins et al. (2005) demonstrou que, nesta concentração, houve redução significativa da recessão, ganho de inserção e preenchimento ósseo de defeitos infra-ósseos tratados, sem diferenças em relação à concentração de 0,5 mg/ml.

Os efeitos do rhPDGF-BB sobre células osteoblásticas são pouco conhecidos. Estudos realizados in vitro (Papadopoulos et al. 2003; Vavouraki et al. 2003) demonstraram que a adição de PDGF-BB a 10 ng/ml a enxerto ósseo desmineralizado aumentou significativamente a taxa de proliferação de células de ligamento periodontal. Houve incorporação e lenta liberação de PDGF-BB e estímulo à proliferação de células osteoblásticas após o tratamento de matriz óssea bovina inorgânica com a substância (Jiang et al. 1999; Stephan et al. 2000; Bateman et al. 2005).

A técnica da granulação óssea ou enxerto ósseo em neoformação foi proposta em 1989 por Passanezi et al. e consiste na criação de alvéolo cirúrgico ou de extração do qual o tecido em reparação é removido de 21 a 25 dias depois. O tecido presente nos alvéolos em reparação em seus estágios iniciais é rico em células osteogênicas (Evian et al. 1982) e fatores de crescimento (Lalani et al. 2003). Recentemente, as características de células derivadas de alvéolos em reparação criados cirurgicamente em cães foram estabelecidas por Nakajima et al. (2014) e Luo et al. (2016), indicando que os alvéolos em reparação são uma fonte potencial de obtenção de células tronco mesenquimais para uso em procedimentos regenerativos craniofaciais. No entanto, os dois estudos foram realizados em modelos animais, restando ainda estabelecer essas características para alvéolos em reparação preparados em seres humanos.

Assim sendo, o objetivo geral deste estudo foi estabelecer cultura primária de células derivadas do tecido de granulação presente em alvéolos cirúrgicos criados em seres humanos, bem como caracterizar suas propriedades in vitro. Esta primeira etapa

foi realizada previamente (Valdívia 2013). Na segunda etapa deste estudo, foi realizada a caracterização fenotípica das células e, por fim, na terceira etapa deste estudo, foi investigada a influência do PDGF-BB recombinante humano em altas concentrações na proliferação e na adesão de células osteoblásticas a fragmentos radiculares periodontalmente comprometidos *in vitro*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

Os fatores de crescimento ou sinalizadores moleculares estão presentes em diversos tecidos, principalmente quando estão em fase de remodelação ou reparação, apresentando papel fundamental nos processos de proliferação celular, diferenciação, quimiotaxia e formação de matriz. (Howell, *et al.*, 1997).

2.1 Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF)

O fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) é uma proteína catiônica dimérica, armazenada principalmente nos grânulos alfa plaquetários (Lynch, *et al.*, 1991). Foi primeiramente descrita por KOHLER e LIPTON em 1974 e ROSS em 1989 como um potente mitógeno para células mesenquimais presentes no soro. Exerce seus efeitos sobre células alvo pela ativação dos receptores α e β , estruturalmente relacionados à proteína tirosina quinase, que expressam potentes sinais mitogênicos. A ativação destes receptores ocorre através da homodimerização ou heterodimerização dos mesmos, formando cadeias polipeptídicas A e B. O PDGF-BB tem igual afinidade para os receptores α e β , enquanto que o PDGF-AA tem afinidade exclusiva ao receptor α . Estes dois receptores induzem resposta mitogênica, mas só o β tem capacidade de estimulação quimiotática (Anitua, *et al.*, 1999).

Estudos *in vitro* têm demonstrado que, dentre as diferentes isoformas de PDGF, a isoforma PDGF-BB mostrou ser a mais efetiva em todos os parâmetros celulares, como mitogênese e quimiotaxia celular, sendo assim, a forma mais indicada para terapia reconstrutiva dos tecidos craniofaciais (Boyan et al 1994).

Desde que Lynch et al. (1989) demonstraram que o PDGF aumentou a regeneração dos tecidos periodontais, vários estudos foram realizados, confirmando esses resultados (Nevins et al. 2003, 2005; Lynch et al. 1991_{a,b}). O mecanismo de ação para que o PDGF promova neoformação tissular pode ser explicado pela ligação deste fator aos receptores específicos β presentes em células do ligamento

periodontal e células ósseas, estimulando efeitos na replicação do DNA celular e quimiotaxia destas células (Mumford et al. 2001).

2.1.1 Estudos *in vitro*

Em 1992, BARTOLD, NARAYANAN e PAGE demonstraram que a adição de PDGF à cultura de fibroblastos gengivais humanos foi capaz de reverter o efeito inibitório do LPS de *Salmonella*, especialmente na dose de 50 µl/ml, enquanto o maior estímulo proliferativo aos fibroblastos em cultura foi observado na dose de 5 ng/ml.

O ligamento periodontal de ratos apresenta receptores α e β de PDGF, conforme demonstrado por CHO et al. em 1994, portando apresentando afinidade para as três isoformas.

Dentre estas, a que apresenta maior efeito mitogênico sobre células de ligamento periodontal humano é a –BB, seguida da –AB e da –AA, segundo BOYAN et al. em 1994, com resposta estimulatória máxima observada a 10 ng/ml.

DENNISON et al., em 1994, avaliaram os efeitos da aplicação de 10 ng/ml de TGF- β 1 e/ou 20 ng/ml de PDGF em cultura de fibroblastos gengivais e de ligamento periodontal. A combinação dos fatores de crescimento resultou em resposta proliferativa máxima de células do ligamento periodontal depois de 24 horas, seguida pelo PDGF sozinho, TGF sozinho e controle. Por outro lado, o TGF- β 1 exerceu pouco efeito proliferativo sobre fibroblastos gengivais, cuja proliferação foi melhor estimulada pelo PDGF e pela combinação.

NISHIMURA e TERRANOVA, em 1996, demonstraram que tanto os fibroblastos de ligamento periodontal quanto de gengiva mostraram respostas migratórias dose-dependentes após o estímulo com PDGF, IGF-1, IGF-II, EGF e TGF-B. A migração específica foi observada apenas quando foi usado o meio de cultura das células de ligamento periodontal para estímulo quimiotático, inibindo a migração de fibroblastos gengivais. Quando se utilizou o meio condicionado por fibroblastos gengivais, houve estímulo migratório apenas aos fibroblastos gengivais.

Ainda em 1996, MAILHOT et al. demonstraram que o tratamento com PDGF-BB estimulou a proliferação de fibroblastos do ligamento periodontal em cultura de forma dependente da dose e do tempo de avaliação.

BARTOLD e RABEN em 1996 demonstraram em modelo de ferida cirúrgica em cultura que a adição de 10 ng/ml de PDGF-BB à cultura de fibroblastos de ligamento periodontal estimulou a migração e proliferação dessas células, observando-se também moderado estímulo à síntese de proteoglicanas.

GREEN et al. em 1997, em feridas experimentalmente criadas, encontraram marcação positiva para as cadeias A e B do PDGF no coágulo e na região incisada, não estando presente em regiões saudáveis. Depois de 3 dias, houve expressão do receptor B no tecido ferido, atingindo pico máximo aos 7 dias.

GAMAL et al. em 1998 observaram aumento na taxa de adesão de fibroblastos em fragmentos radiculares com doença periodontal prévia tratados por meio da aplicação de PDGF-BB combinado ou não com IGF-1.

Houve resposta proliferativa máxima de fibroblastos gengivais em cultura na presença de soro bovino fetal após a adição de 20 ng/ml de PDGF, enquanto que na ausência de soro a dose ótima foi de até 40 ng/ml. A resposta ao PDGF foi otimizada pela adição do TGF, segundo ANDERSON et al. em 1998.

A matriz bovina óssea inorgânica foi tratada por JIANG et al. em 1999 com PDGF-BB e IGF-1 radiomarcados para avaliar a absorção desses fatores à matriz. Posteriormente, as amostras foram incubadas em solução tampão por diferentes períodos de tempo e a quantidade de fator de crescimento remanescente na matriz foi medida, para identificar o quanto foi liberado. A atividade biológica foi testada em cultura de osteoblastos de ratos fetais utilizando-se as matrizes tratadas com os dois fatores de crescimento em diferentes concentrações. Os dois fatores adsorveram à matriz, tendo 10 vezes maior absorção para o IGF-1 do que o PDGF-BB. Aproximadamente 50% do PDGF-BB e 10% do IGF-1 foram liberados depois de 10 dias. A proliferação de células osteoblásticas foi estimulada apenas pelo PDGF-BB.

Estudo semelhante foi realizado por STEPHAN et al. em 2000, utilizando matriz inorgânica bovina embebida em PDGF-BB. Observou-se adsorção do PDGF-

BB à matriz mineralizada de forma concentração-dependente. Aproximadamente 30% do fator de crescimento foi liberado depois de 10 dias. As membranas favoreceram significativamente a proliferação de células osteoblásticas de ratos em comparação com o estímulo proporcionado pela membrana apenas.

GAMAL e MAILHOT em 2000 determinaram a concentração ótima do rhPDGF-BB no estímulo à adesão de células de ligamento periodontal a 80 fragmentos de dentina obtidos de raízes periodontalmente doentes, usando como controle 10 espécimes de dentina obtidos de dentes saudáveis. Os espécimes foram divididos em 9 grupos (n= 10), sendo o grupo 1 o controle doente e o grupo 2 o controle saudável. Nos demais, os fibroblastos de ligamento periodontal foram cultivados sobre os espécimes pré-tratados com concentrações de 5, 10, 20, 50, 100, 200 e 300 ng/ml de rhPDGF-BB por 24 hs. A análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV) demonstrou que o número de células aderidas nas concentrações de 5, 10 e 20 ng/ml não foram estatisticamente diferentes do controle doente. Nas concentrações de 50, 100, 200 e 300 ng/ml houve aumento significativo de células aderidas a raízes previamente doentes, com morfologia celular comparável ao controle saudável.

MUMFORD et al. em 2001 realizaram estudo para caracterizar os efeitos proliferativos e de preenchimento da ferida cirúrgica por meio da aplicação de PDGF-BB em modelo *in vitro* e comparar os efeitos específicos do fator de crescimento sobre fibroblastos gengivais (FG) e de ligamento periodontal (LP). Culturas primárias dos dois tipos celulares foram estabelecidas. Feridas cirúrgicas no prato de cultivo foram criadas mecanicamente, removendo 3 mm de camada de células ao redor do diâmetro dos poços. Estes foram incubados por 2, 6 e 9 dias em meio contendo FBS a 0.1% e diferentes concentrações de PDGF-BB. Houve maior resposta proliferativa do PDGF-BB no ligamento periodontal do que em fibroblastos gengivais ($p < 0.0001$). Os fibroblastos de ligamento periodontal apresentaram maior resposta proliferativa do que os fibroblastos gengivais em concentrações ≥ 10 ng/ml. Por outro lado, os fibroblastos gengivais não apresentaram resposta proliferativa após o estímulo com PDGF-BB em nenhuma das concentrações testadas. As respostas de preenchimento das feridas foram semelhantes entre os grupos, e aumentaram de forma concentração-dependente ao longo do tempo. Esses achados demonstraram os diferentes efeitos do PDGF-BB na proliferação de células de ligamento periodontal e fibroblastos gengivais, o que poderia influenciar o processo de cura das feridas.

Os efeitos do PDGF-BB na proliferação e síntese de colágeno de células de ligamento periodontal humano foram investigados por OJIMA et al. em 2003. Para o teste proliferativo, as células foram cultivadas em doses de 0.01 a 10 ng/ml de PDGF-BB por 12 ou 24 horas. Para o teste de síntese de colágeno, as células foram cultivadas nas mesmas concentrações de PDGF-BB por 1 a 24 horas. A proporção de conteúdo colágeno na proteína total foi avaliada, e a expressão de gene de colágeno tipo I foi avaliada quantitativamente por *Northern blotting*. Os resultados obtidos demonstraram que o PDGF-BB estimulou a proliferação celular de forma tempo- e dose-dependente, com efeito máximo observado na concentração de 10 ng/ml. A síntese de colágeno foi mais estimulada após 24 horas do tratamento na concentração de 1 ng/ml de PDGF-BB, que apresenta efeito dose-dependente inverso nas atividades de proliferação e síntese de matriz proteica.

Amostras de enxerto de osso liofilizado desmineralizado de osso cortical, de osso medular e enxerto de osso liofilizado mineralizado foram utilizadas sozinhas ou tratadas com PDGF-BB a 10 ng/ml por PAPADOPOULOS et al. em 2003 para investigar os efeitos mitogênicos em células do ligamento periodontal. Não houve diferenças significantes entre os grupos quando as matrizes ósseas foram utilizadas sozinhas, observando-se maior efeito proliferativo nas duas amostras de enxerto de osso liofilizado desmineralizado tratados por PDGF-BB. Houve diferença estatisticamente significativa na síntese de DNA estimulada pelo osso liofilizado mineralizado associado ao PDGF-BB. O PDGF-BB sozinho não estimulou de forma significativa a proliferação celular.

Em estudo similar realizado no mesmo ano, VAVOURAKI et al. observaram que a matriz óssea bovina desmineralizada mantém a taxa de proliferação celular quando usada sozinha e, quando associada com PDGF-BB, aumentou a taxa de proliferação celular. Esse efeito não foi observado quando se utilizou a rhBMP-2.

BATEMAN et al. em 2005 trataram β -TCP e CaSO_4 com PDGF-BB nas concentrações de 10^{-7} a 10^{-8}M , incubado por 1 a 120 minutos, marcando a proporção de 1:300 M do PDGF-BB com radioisótopo. Estudos de adsorção semelhantes foram realizados com diferentes concentrações de PDGF-BB incubados por 30 minutos. As amostras dos dois materiais incorporados ao PDGF-BB foram implantadas no subcutâneo de ratos e depois removidas para medir a radioatividade. A proliferação

de células osteoblásticas na presença de β -TCP e CaSO_4 tratados por PDGF-BB foi avaliada pela incorporação de timidina- ^3H . Os estudos de adsorção demonstraram que o PDGF-BB foi adsorvido ao β -TCP de forma tempo e concentração-dependente. Cerca de 45% do PDGF-BB adsorvido foi liberado depois de 10 dias. Em vivo, a liberação do PDGF-BB foi mais rápida do que *in vitro* nos dois materiais. Células osteoblásticas incubadas com as matrizes adsorvidas com PDGF-BB mostraram taxa de proliferação significativamente mais rápida do que a incubação apenas com as matrizes, sugerindo que o PDGF-BB favorece propriedades osteogênicas.

Um estudo *in vitro* foi realizado por BELAL et al. em 2006 para avaliar a efetividade do PDGF-BB aplicado em raízes periodontalmente comprometidas na proliferação e adesão de fibroblastos do ligamento periodontal. Foram selecionados 15 dentes extraídos em decorrência de doença periodontal em onze pacientes e 5 dentes extraídos por razões não periodontais. As amostras foram divididas em 4 grupos, contendo 10 espécimes cada: (1) saudável; (2) sem tratamento; (3) tratados por meio de raspagem e alisamento radicular (RAR); (4) tratamento por meio de RAR e aplicação de PDGF-BB na concentração de 50 ng/ml. Os fragmentos foram cultivados com fibroblastos de ligamento periodontal humano em triplicatas nos períodos de avaliação de 1, 3 e 7 dias. O espécime restante de cada grupo foi utilizado para análise por meio de microscopia eletrônica de varredura. Os resultados obtidos indicaram maior número de células aderidas às superfícies radiculares nos grupos I (27.7 ± 3.5) e IV (25.7 ± 4.5), após 3 dias de incubação, com diferenças significantes entre os dois grupos e os grupos II e III. Aos 7 dias de incubação, houve ligeira diminuição do número de células aderidas nos grupos I e IV, porém continuando a apresentar maior número de células aderidas do que nos grupos II (12.7 ± 2.1) e III (13.7 ± 1.5). Esses resultados sugeriram que a aplicação de PDGF-BB sobre as superfícies radiculares após a raspagem reverteu os efeitos negativos da contaminação bacteriana das superfícies radiculares comprometidas periodontalmente.

No ano seguinte, o mesmo grupo de autores avaliou a efetividade da combinação de rhPDGF-BB e aplicação de laser de Er:YAG na adesão de células de ligamento periodontal humano a fragmentos radiculares humanos saudáveis (controle negativo) ou periodontalmente doentes. Os resultados permitiram concluir que o uso

do laser sozinho ou combinado com rhPDGF-BB é uma terapia promissora para o condicionamento das superfícies radiculares, embora a combinação dos fatores seja ligeiramente mais efetiva.

SANT'ANA et al. em 2007 avaliaram os efeitos da aplicação de PDGF-BB, IGF-1, TGF- β 1 e sua combinação na proliferação de células cultivadas originadas do ligamento periodontal de humano. Além disso, analisou a adesão dessas células a fragmentos radiculares periodontalmente comprometidos tratados previamente ou não com ácido cítrico e tetraciclina associados após a raspagem. Para isso, foi estabelecida cultura primária de fibroblastos obtidos de terceiros molares retidos ou impactados extraídos de pacientes saudáveis. Para avaliar a taxa de proliferação celular, foram plaqueadas 72 placas petri contendo inicialmente 10^3 células divididas em 4 grupos que receberam a adição de PDGF-BB (grupo 1), IGF-1 (grupo 2), TGF- β 1 (grupo 3) ou em sua combinação (grupo 4) ao meio de cultura e 2 grupos controle (sem adição dos fatores de crescimento) e contadas em triplicatas após 1, 3, 5 e 7 dias. Ao mesmo tempo, foram obtidos 30 fragmentos de dentes extraídos de 14 pacientes com perda de inserção à sondagem ≥ 6 mm distribuídos aleatoriamente em 10 grupos de acordo com o tratamento: raspagem (grupo 1), raspagem e aplicação dos fatores de crescimento isolados ou em combinação (grupos 2-5), raspagem e condicionamento ácido (grupo 6) ou raspagem, condicionamento ácido e aplicação dos fatores de crescimento isolados ou em combinação (grupos 7-10). Os resultados demonstraram que o TGF- β 1 apresentou os melhores efeitos na proliferação de células do ligamento periodontal em cultura, enquanto que na adesão das células aos fragmentos a combinação dos três fatores apresentou resultados mais favoráveis, com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) em relação aos grupos tratados sem o condicionamento ácido radicular, com exceção do grupo tratado através da combinação. Esses dados sugeriram que a aplicação dos fatores de crescimento, especialmente do TGF- β 1 associado ou não ao PDGF-BB e IGF-1, poderia ser favorável à regeneração dos tecidos periodontais perdidos com o processo da doença periodontal.

Em 2012, BELAL et al., utilizando a metodologia descrita nos trabalhos anteriores realizados pelo grupo de pesquisa, demonstraram que o condicionamento radicular realizado com EDTA a 24% favorece mais a adesão de células de ligamento periodontal do que o tratamento apenas por meio de raspagem. O uso de rhPDGF-

BB (25 ng/ml) após a raspagem e condicionamento radicular com EDTA resultou em número significativamente maior de células aderidas, porém sem diferenças significantes em relação ao grupo tratado apenas por rhPDGF-BB.

CHOWDHARY et al. em 2013 avaliaram a influência do rhPDGF-BB na concentração de 50ng/ml na proliferação, morfologia e adesão de fibroblastos de ligamento periodontal humano a superfícies radiculares periodontalmente comprometidas ou saudáveis em dois períodos de tempo diferentes. Para isso, foram estabelecidas culturas primárias de ligamento periodontal. Foram preparados 11 *scaffolds* para os dentes saudáveis do grupo 1 (substrato saudável) e 33 no grupo periodontalmente doente, os quais foram subdivididos em grupo 2- substratos doentes; grupo 3- substratos submetidos à RAR; grupo 4- substratos submetidos à RAR+rhPDGF-BB (50 ng/ml). Os grupos foram ainda subdivididos em outros dois, contendo 5 substratos por grupo. As células foram cultivadas sobre os substratos por 3 e 7 dias, enquanto que os demais foram avaliados topograficamente. No dia 3, o grupo 1 apresentou o menor número de células inseridas, enquanto que o grupo 3 mostrou o maior número de células inseridas. No dia 7, os grupos 1 e 4 mostraram aumento no número de células, enquanto estas reduziram drasticamente nos grupos 2 e 3. Os grupos 3 e 4 mostraram melhor adesão e proliferação de fibroblastos de ligamento periodontal comparativamente aos grupos 1 e 2. Os grupos 3 e 4 mostraram células predominantemente espinhosas de aspecto achatado, enquanto o grupo 3 mostrou células estreladas e o grupo 2 células espinhosas predominantemente distorcidas. Esses achados sugeriram que o rhPDGF-BB exerce papel significativo como adjunto à terapia periodontal, influenciando a maturação, adesão e proliferação de fibroblastos do ligamento periodontal.

CHONG et al. em 2013 realizaram cultura primária de células de ligamento periodontal e investigaram a atividade de fosfatase alcalina. Linhagens celulares fenotipicamente diferentes foram incubadas por 1, 3, 6 e 10 dias em meio contendo soro bovino fetal a 0.2% contendo diferentes concentrações de proteína derivada do esmalte (EMD), PDGF-BB, EMD + PDGF-BB ou amelogenina + PDGF-BB, utilizando-se como controle negativo cultura com soro bovino fetal a 0,2%. A proliferação celular foi investigada com contador de Coulter e, posteriormente, modelo de ferida cirúrgica foi criado por meio de raspagem de área de 3 mm de largura, criando-se uma área

sem células ao redor do diâmetro do prato de cultura. A migração de células de LP para a área foi medida por meio de histomorfometria.

SILVA et al., ainda em 2013, avaliaram o uso de quitosan associado ou não a PDGF-BB na proliferação de fibroblastos gengivais humanos e observaram que a combinação entre os dois estimulou a viabilidade e proliferação celular e ainda ativou a via ERK 1/2 envolvida na proliferação celular.

TALAL et al. em 2013 investigaram os efeitos da proliferação e diferenciação de osteoblastos sobre compósito de ácido polilático (PLA) e nanohidroxiapatita (nHA) utilizadas como carreadores para fatores de crescimento. A bioatividade do compósito foi dependente da concentração do nHA nos filems, com mais apatita depositada em filmes contendo maior conteúdo de nHA. Houve boa proliferação de osteoblastos em amostras contendo baixo conteúdo de nHA e diferenciação em filmes contendo maior conteúdo de nHA. Os filmes compósitos foram capazes de fornecer PDGF, aumentando a taxa de proliferação celular em amostras pré-condicionadas com o fator de crescimento.

RAGHAVENDRAN et al. em 2016 avaliaram o potencial osteogênico de matrizes de ácido poli-l-lático/hidroxiapatita/colágeno (PLLA/Col/HA e PLLA/Col) suplementadas com PDGF-BB. Os níveis de osteocalcina, cálcio e mineralização foram significativamente maiores na matriz PLLA/Col/HA do que nas matrizes PLLA/Col. Alta expressão de fibronectina, molécula de adesão intracelular, caderina e colágeno 1 sugere que matrizes de PLLA/COL/HA e PLLA/HA tem maior osteocondutividade do que as matrizes de PLLA/Col. Adicionalmente, osteopontina, osteocalcina, osterix, Runx2 e BMP-2 eram maiores nas membranas PLLA/COL/HA, com sobre-regulação de Runx2, colágeno 1, integrina, osteonectina e proteína contendo ácido gama-carboxiglutamina, osteopontin e BMP2. A sobre-regulação desses genes foi ainda mais aumentada com suplementação de PDGF-BB, que age sinergisticamente com as membranas PLLA/Col/HA e PLLA/HA para favorecer o potencial de diferenciação osteogênica.

MISHRA et al. em 2016 avaliaram os efeitos do tratamento de matriz de poli (propileno fumarato) – PPF – com diferentes fatores de crescimento, incluindo FGF-2 (5 ng/ml), PDGF-BB (40 ng/ml) e EGF (20 ng/ml) na proliferação de células tronco

mesenquimais (CTMs) derivadas de medula óssea humana (BM-hMSCs). A diferenciação de osteoblastos secretores foi induzida por BMP-4 (50 ng/ml), 6 (50 ng/ml) e 7 (27 ng/ml) na presença de dexametasona, b-glicerofosfato e ácido ascórbico. A proliferação celular foi analisada por teste MTT e a diferenciação por meio de teste de alizarina vermelha, atividade de fosfatase alcalina e MEV. A combinação de EGF, PDGF-BB e FGF-2 nas concentrações ótimas por 1 semana exibiu maior número de células do que essas citocinas sem o EGF. O aumento da dose não teve efeito adicional significativo. A diferenciação das células BM-hMSC resultou em produção de fosfatase alcalina e aumento da deposição mineral do dia 14 ao dia 21 em todos os grupos contendo BMP e meio osteogênico, sendo significativamente maior para o grupo BMP-7.

2.1.2 Estudos em animais

LYNCH, COLVIN e ANTONIADES, em 1989, avaliaram os efeitos da aplicação tópica de diferentes concentrações (125-1500 ng/ml) de diferentes fatores de crescimento (PDGF, EGF, IGF-1, FGF, TGF- α e TGF- β) em feridas dérmicas criadas no dorso de porcos. A combinação entre PDGF e IGF resultou em aumento de 4 vezes na formação de novo tecido conjuntivo e de 2 vezes na espessura da derme e epiderme. O TGF- α também apresentou ação sinérgica com o PDGF, entretanto com aumento variável na espessura e diferenciação anormal do epitélio. O TGF- β teve os melhores resultados quando usado individualmente, estimulando a proliferação de fibroblastos e síntese de colágeno e resultando em diferenciação anormal das células epiteliais, as quais tiveram seu crescimento inibido pela substância.

LYNCH et al. em 1989 avaliaram os efeitos da aplicação de 1 μ g de PDGF e IGF-1 em 75 μ l de gel de metilcelulose no tratamento de defeitos ósseos horizontais presentes em cães beagle comparativamente ao tratamento apenas com o gel carreador, o qual mostrou formação de epitélio juncional longo, sem evidências de formação de novo osso ou cemento na análise histológica. O grupo teste mostrou, opostamente, formação de novo osso e novo cemento.

PIERCE et al. em 1989 realizaram aplicação única de PDGF-BB (2 µg/80 pmol) e TGF-β1 (20 µg/600 pmol) em incisões lineares criadas no dorso de ratos, observando-se aceleração no fechamento da ferida 212% acima do controle após 5 dias. Os dois fatores exerceram quimiotaxia para fibroblastos e macrófagos, sendo maior para o PDGF, com duração de até 7 semanas.

Em 1990, PFEILSCHIFTER et al. avaliaram os fatores PDGF, IGF-1 e TGF-β na taxa de aposição óssea, observando que as três substâncias dobraram a taxa de aposição óssea em 48 horas e reverteram o efeito inibitório exercido pelo paratormônio.

Para avaliar os efeitos da combinação de PDGF-BB e IGF-I na regeneração dos tecidos moles e duros periodontais, Lynch et al. em 1991 realizaram cirurgia periodontal convencional nos 4 quadrantes da boca de 13 cães beagle apresentando doença periodontal natural. Após a elevação do retalho, foi feito debridamento e raspagem dos pré-molares nos dois quadrantes de cada cão recebeu combinação de 3 µg de PDGF-BB e IGF-I em gel de metilcelulose, enquanto os pré-molares dos quadrantes contra-laterais receberam apenas o veículo. Adicionalmente, 4 outros animais receberam PDGF ou IGF radioativo para investigar mudanças no metabolismo ósseo. A quantidade de novo osso e novo cimento com fibras colágenas inseridas foram medidas. Os resultados obtidos demonstraram que a meia vida dos fatores de crescimento no sítio de aplicação foi de 3 horas para o IGF-1 e 4.2 horas para o PDGF-BB. A maioria das proteínas marcadas foram eliminadas por 96 horas, sem detecção de radioatividade após 2 semanas. Houve maior atividade metabólica no tecido ósseo nos sítios teste depois de 2 e 4 semanas de avaliação. As análises histológicas dos espécimes obtidos após 2 e 5 semanas do tratamento, mostraram de 5 a 10 vezes de aumento na quantidade de novo osso e cimento nos sítios teste do que no controle. A altura e área total de novo osso aumentou progressivamente de 2 a 5 semanas. O novo osso formado passou por processo de maturação normal, com formação de espaço do ligamento periodontal entre o novo osso e novo cimento.

No mesmo ano, esse grupo de autores demonstrou que a adição de IGF-1 combinado a PDGF-BB e PDGF-AA em defeitos periodontais criados em pré-molares de macacos resultou na formação de novo osso, cimento e ligamento periodontal

recobrando em média 50% da distância linear entre a base do defeito e a junção cimento-esmalte, sem diferenças entre os tipos de PDGF.

MATSUDA et al., em 1992, demonstraram que a associação entre PDGF-AB e IGF-1 teve efeito mitogênico potente sobre células de ligamento periodontal de ratos, enquanto o PDGF-BB teve a mais forte resposta quimiotática dentre os isótipos de PDGF, promovendo aumento da síntese de colágeno.

Utilizando metodologia semelhante, OATES, ROUSE e COCHRAN em 1993 mostraram aumento da atividade mitogênica dose-dependente sobre células de ligamento periodontal humano exercida pela aplicação de 1 - 50 µg de PDGF-AA e – BB, enquanto o TGF-β1 promoveu aumento significativo na taxa de proliferação das células, porém inferior e de forma mais lenta do que os PDGFs, na concentração ótima de 1ng/ml

A utilização de 10 µl/ml de PDGF sozinho ou combinado com membrana de politetrafluoretileno para tratamento de defeitos infraósseos cirurgicamente criados em cães aumentou a resposta proliferativa quando comparado ao grupo controle, tratados apenas por solução salina e membrana, segundo WANG et al. em 1994.

GIANNOBILE, FINKELMAN e LYNCH, em 1994, utilizaram a combinação de PDGF e IGF-1 para tratamento de defeitos periodontais naturais presentes em cães, comparando-os ao tratamento de defeitos cirurgicamente criados em macacos. Os resultados obtidos nos dois modelos de estudo foram consistentes, justificando sua metodologia.

PARK et al. em 1995 observaram resposta regenerativa mais rápida no tratamento de defeitos de furca classe II criados em pré-molares com aplicação de PDGF após o condicionamento radicular com ácido cítrico e seguido da colocação de membrana do que o tratamento apenas com ácido e membrana, depois de 4 a 8 semanas de observação.

CHO, LIN e GENCO, ainda em 1995, propuseram que o condicionamento ácido radicular realizado previamente à aplicação de fatores de crescimento favoreceria a absorção e lenta liberação dos mesmos, observando-se ganho de inserção mais acelerado nos espécimes tratados com ácido e fator de crescimento,

não sendo necessário o uso de barreira de membrana, decorrentes dos efeitos proliferativos e quimiotáticos para ligamento periodontal exercidos pelo PDGF.

GIANNOBILE et al. em 1996 avaliaram os efeitos do PDGF-BB sozinho ou associado ao IGF-1 (10 µg cada) na regeneração periodontal de defeitos cirurgicamente criados em macacos. Não houve benefício do uso de IGF-1 sozinho. O PDGF sozinho promoveu ganho de inserção e tendência de ganho em outros parâmetros, como preenchimento ósseo do defeito, enquanto a combinação dos fatores de crescimento resultou em aumento significativo do ganho de inserção e preenchimento ósseo do defeito.

LEE et al. em 2000 embeberam esponjas de quitosan-TCP em PDGF-BB radiomarcado. As esponjas contendo ou não PDGF-BB foram implantadas em defeitos de 8mm na calvária de ratos, os quais foram sacrificados depois de 2 e 4 semanas para análise histológica e histomorfométrica. O PDGF-BB foi liberado inicialmente em grande quantidade, seguido de período de 7 dias de liberação de pequena quantidade. Depois desse período, a liberação continuou em taxas menores até 21 dias após o início. No estudo em calvária de ratos, observou-se que o grupo controle (sem esponja/sem PDGF-BB) mostrou formação de tecido conjuntivo, enquanto os grupos tratados com quitosan e quitosan associado ao PDGF-BB mostraram formação óssea centrípeta a partir da periferia do defeito. Houve maior formação de novo osso nos defeitos tratados com a membrana de quitosan associada ao PDGF-BB, especialmente após 4 semanas.

LIOUBAVINA-HACK et al. em 2005 investigaram os efeitos da aplicação de rhPDGF-BB e Bio-Oss para o tratamento de defeitos ósseos criados no ramo posterior da mandíbula de ratos. Para o tratamento das perfurações criadas no osso, foram utilizadas cápsulas rígidas, não porosas, hemisféricas de 7 mm de diâmetros. Nos sítios teste, as cápsulas foram preenchidas com grânulos de Bio-Oss embebidos em solução de rhPDGF-BB (20 µg/ cápsula), enquanto nos sítios controle as cápsulas foram preenchidas com Bio-Oss embebido em sangue autólogo. Os animais foram sacrificados após 3 (n= 4) e 5 (n= 4) meses. As secções foram preparadas para análise microscópica, que revelou quantidade limitada de formação óssea. A maior parte do espaço abaixo das cápsulas estava ocupada por partículas de Bio-Oss circundadas por tecido conjuntivo fibrovascular. A quantidade de novo osso

mineralizado foi maior no grupo controle (20.8%) do que no grupo teste (6.7%); no entanto, depois de 5 meses, a quantidade de osso formado foi similar entre os grupos (23% no teste e 26% no controle).

Em 2006, SIMION et al. avaliaram os resultados de aumento de rebordo em defeitos cirurgicamente criados de forma padronizada em cães por meio do uso de rhPDGF-BB e bloco de osso bovino desproteínizado. Os defeitos criados na mandíbula dos cães apresentavam de 7 a 10 mm no sentido ápico-coronal e 30 mm no sentido méso-distal. Os defeitos foram tratados 3 meses depois de 3 formas diferentes: no grupo A (controle; n= 4), foi utilizado bloco de Bio-Oss (Geistlich, Suíça) em combinação com membrana reabsorvível de dupla camada de colágeno (Bio-Gide, Geistlich, Suíça); no grupo B (n= 4), o bloco de Bio-Oss foi infundido com rhPDGF-BB; no grupo C (n= 4), o bloco de Bio-Oss foi saturado com PDGF-BB e recoberto por membrana de colágeno reabsorvível. Os blocos foram fixados ao leito por meio da instalação de dois implantes de 3.3 x 10 mm. Depois de 4 meses, os animais foram sacrificados. A análise histológica demonstrou que no grupo B houve maior quantidade de osso neoformado, com maior percentual de contato osso-implante, com áreas de osso regenerado se estendendo sobre o parafuso de recobrimento. Esses achados demonstraram que o tratamento de defeitos de rebordo tratados por meio de Bio-Oss e PDGF-BB sem membrana tem potencial de regenerar quantidade significativa de osso em defeitos mandibulares severos. Ainda, esses resultados indicam a importância do periósteo como fonte de células osteoprogenitoras em procedimentos regenerativos mediados por fatores de crescimento.

Os efeitos da administração local de PDGF-BB durante cirurgia periodontal reconstrutiva nos níveis de PDGF-AB, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e telopeptídeo colágeno ósseo (ICTP) do fluido da ferida cirúrgica foi investigado por COOKE et al. e SARMENT et al. em 2006 em 16 pacientes apresentando defeitos ósseos periodontais localizados. Os defeitos foram randomizados em três grupos de tratamento (β -TCP, β -TCP + 0,3mg/ml de rhPDGF-BB ou β -TCP + 1.0 mg/ml de rhPDGF-BB) e foram acompanhados por 6 meses. Os dentes contralaterais serviram como controle. Níveis aumentados de VEGF foram observados em todos os grupos de tratamento, com o grupo de 1.0 mg/ml de rhPDGF-BB apresentando as maiores diferenças após 3 semanas na comparação com o controle. Os níveis de PDGF-AB

aumentaram no grupo do carreador apenas, em comparação com os grupos de rhPDGF-BB. O grupo de 0.3 mg/ml de rhPDGF-BB aumentou os níveis de ICTP de 3-5 dias de cicatrização, sugerindo promoção do turnover ósseo em estágios iniciais do processo de reparo.

ROCCHIETTA et al. em 2007 realizaram estudo para analisar e comparar o grau de mineralização e a composição proporcional de osso regenerado em relação ao osso nativo, em modelo descrito por Simion et al. (2006), por meio de microscopia eletrônica *backscattered* (BSE-SEM). Neste estudo foram investigados espécimes dos grupos B (bloco de Bio-Oss + rhPDGF-BB) e C (bloco de Bio-Oss + rhPDGF-BB + membrana colágena). Foi observado osso regenerado em múltiplos estágios de maturação, com partículas do xenoenxerto embebidas nas mesmas áreas, sem diferenças entre os grupos. A análise espectral revelou presença de muitos elementos normalmente encontrados no osso (carbono, magnésio, cálcio, fósforo, arsênio, nitrogênio e oxigênio). Também não houve diferenças entre osso regenerado proximal a implantes com tratamento de óxidos vs. de superfície lisa.

IROKAWA et al. em 2010 investigaram os efeitos do tamanho das partículas de β -TCP na regeneração dos tecidos periodontais induzida por PDGF-BB. Para isso, foram extraídos os 3º PM mandibulares dos cães 16 semanas antes do início do estudo. Doze semanas antes do início do estudo, defeitos infraósseos foram criados ao redor do 4º PM. Foram utilizadas soluções de PDGF-BB na concentração de 0.3 mg/ml em 65 mg of β -TCP de partículas de tamanho grande (tamanho dos microporos: 100-400 μ m; diâmetro das partículas: 1000-2000 μ m; porosidade de 60%) ou pequeno (tamanho dos microporos: 1-500 μ m; diâmetro das partículas: 300-500 μ m; porosidade de 77%). As partículas foram embebidas na solução de PDGF durante 5 minutos. No grupo controle, foi usado apenas o PDGF-BB. Seis sítios foram tratados em cada grupo. Após 2, 4 ou 8 semanas depois do tratamento, os animais foram sacrificados e os espécimes preparados para análise histológica, morfométrica, histométrica e por microscopia eletrônica de varredura. O grupo controle foi caracterizado por formação incompleta de osso neoformado. O grupo de partículas grandes mostrou aumento significativo da formação de novo osso e cemento comparativamente ao grupo de partículas pequenas, sugerindo que partículas maiores de β -TCP favorecem mais a formação de osso e cemento.

Em 2010, SCHWARZ et al. investigaram os efeitos do rhPDGF-BB na formação inicial de osso após aumentos lateral de rebordo com BCP combinado com membrana colágena em cães. Oito defeitos de espessura mandibulares foram criados em quatro cães foram aleatoriamente divididos em grupos teste e controle (BCP+CM). Depois de 3 semanas, os blocos removidos foram preparados para análise imunohistoquímica e histomorfométrica. A atividade biológica de BCP imerso em rhPDGF-BB foi determinada por meio de ensaio de fosfatase alcalina dehidrogenase lactato em cultura de células osteoblásticas. Os dois grupos mostraram padrão comparável de vasos sanguíneos e formação óssea originadas principalmente do osso alveolar adjacente. Entretanto, os sítios teste mostraram reatividade antigênica associada com maior área aumentada ($8.5 \pm 0.9 \text{ mm}^2$ vs. $7.1 \pm 1.1 \text{ mm}^2$) e de tecido mineralizado ($2.7 \pm 0.9 \text{ mm}^2$ vs. $1.7 \pm 0.8 \text{ mm}^2$) no grupo teste do que no grupo controle, sugerindo que a mistura de BCP+rhPDGF-BB tem potencial para dar suporte aos estágios iniciais da regeneração óssea guiada em defeitos de espessura de rebordo.

Em 2012, NEVINS et al. avaliaram o potencial regenerativo de defeitos de tamanho crítico com aplicação de rhPDGF-BB combinado com matriz equina particulada ou b-TCP. Foram criados defeitos de 2 paredes bilateralmente na superfície distal do 2º PM e mesial do 1º M em nove cães. Doze defeitos foram tratados com matriz equina + PDGF-BB, doze receberam o tratamento por meio de matriz bovina + rh PDGF-BB, e os outros doze foram utilizados como controle (cirurgia sem biomaterial). Os animais foram sacrificados após 10 semanas. A cicatrização foi boa, sem sinais de inflamação gengival. As análises histológicas e histomorfométricas mostraram maior formação de novo tecido ósseo no grupo tratado com material equino. Houve ainda maior formação de novo cimento no grupo tratado por meio de rhPDGF-BB/matriz equina ($4.8 \pm 1.3 \text{ mm}$) do que no grupo controle. Esses resultados sugeriram que tanto a matriz equina quanto o b-TCP tem potencial para resultar em novo aparelho de inserção periodontal.

CHANG et al., ainda em 2013, investigaram os efeitos da combinação e liberação sequencial de PDGF e sinvastatina na regeneração periodontal. As duas substâncias foram disponibilizadas em micro-esferas. Foram criados defeitos de tamanho crítico na maxila de ratos, os quais foram tratados por meio de microesferas contendo BSA (BB), PDGF no envólucro (XP), sinvastatina no centro e BSA no envólucro (SB), sinvastatina no centro e PDGF no envólucro (SP) ou não preenchidas

(XX). Houve rápida liberação de PDGF e lenta de sinvastatina no grupo SP, o qual demonstrou maior fração de volume ósseo e menor separação trabecular quando comparado ao grupo XX no dia 14, além de infiltrado de células inflamatórias mais suave e níveis elevados de fosfatase ácida tartarato-resistente aos 28 dias. As fibras estavam bem alinhadas e inseridas obliquamente à superfície radicular, similar ao ligamento periodontal natural, com sinais de cementogênese, indicando que a combinação e liberação sequencial de PDGF-sinvastatina acelera a regeneração periodontal.

AL-HAZMI et al., em 2013, realizaram estudo microtomográfico em cães para avaliar a eficácia da combinação de xenoenxerto associado ou não à membrana colágena e PDGF-BB para regeneração óssea guiada (ROG) ao redor de implantes com defeitos de deiscência. Os defeitos (6 x 3 mm) foram criados no osso vestibular e implantes imediatos foram instalados nos alvéolos distais de cada sítio após extração atraumática bilateral do 2º e 4º pré-molar em ambos os arcos de dez cães. Os animais foram divididos em três grupos: (1) xenoenxerto + rhPDGF + membrana colágena; (2) xenoenxerto + rhPDGF; (3) implantes imediatos + defeitos de deiscência (controle). Depois de 16 semanas, os animais foram sacrificados para análise histológica e histomorfométrica. Houve maior espessura e volume de osso vestibular, ganho de altura óssea e percentual de contato osso-implante (BIC) no grupo 2 do que nos demais grupos.

2.1.3 Estudos em seres humanos

O primeiro estudo clínico investigando os efeitos do tratamento de defeitos periodontais por meio da aplicação de PDGF-BB e IGF-1 recombinantes humanos foi descrito em 1997 por HOWELL et al. O objetivo primário do estudo foi investigar a segurança da aplicação das substâncias e o objetivo secundário foi investigar a dose terapêutica ideal dos fatores de crescimento testados. Foram incluídos no estudo 38 pacientes apresentando lesões periodontais bilaterais aleatoriamente alocadas em dois grupos de tratamento em modelo de boca dividida: aplicação de 50 pg/ml (baixa dose) ou 150 µg/ml (alta dose) de rhPDGF-BB e IGF-1 em gel de metilcelulose (teste) ou cirurgia a retalho seguida ou não da aplicação do veículo (controle). Não foram encontrados efeitos colaterais sistêmicos resultantes da aplicação dos fatores de

crescimento, sem desenvolvimento de anticorpos contra as proteínas. Não houve melhora significativa dos parâmetros periodontais em relação ao grupo controle no grupo tratado com baixa dose dos fatores de crescimento. No entanto, em pacientes tratados com altas doses, houve aumento significativo da formação de osso alveolar, conforme avaliado por cirurgia de reentrada aos 9 meses. Houve aumento de 2.08mm de altura óssea vertical e 42.3% de preenchimento do defeito comparado com 0.75 mm e 18.5%, respectivamente, no grupo controle. As lesões de furca, em menor número, responderam favoravelmente ao tratamento com 2.8 mm de preenchimento horizontal do defeito, denotando a eficácia e segurança de uso desses fatores de crescimento na regeneração periodontal.

NEVINS et al. em 2003 investigaram os efeitos do tratamento de lesões de furca classe II em 15 sítios de 9 pacientes por meio da aplicação de rhPDGF-BB nas concentrações de 0.5 mg/ml, 1.0 mg/ml e 5 mg/ml veiculados por enxerto de osso liofilizado desmineralizado. Ao mesmo tempo, 4 defeitos proximais foram tratados com osso bovino inorgânico e barreira de membrana de colágeno. Houve rápida cura da ferida que se caracterizou pela presença de gengiva rósea, firmemente aderida dentro de 7 a 10 dias da cirurgia. Não houve reações desfavoráveis ou efeitos colaterais negativos associados aos grupos de tratamento. Nos sítios tratados com rhPDGF-BB e DFDBA, houve redução da profundidade de sondagem dos defeitos proximais foi de 6.42 ± 1.69 mm e ganho de inserção de 6.17 ± 1.94 mm ($p < 0.01$). O preenchimento radiográfico dos defeitos foi de 2.14 ± 0.85 mm. Nos sítios tratados com osso bovino inorgânico apresentaram redução de profundidade de sondagem de 5.75 ± 0.5 mm e ganho de inserção de 5.25 ± 1.71 mm. Defeitos de furca tratados com DFDBA/rhPDGF-BB apresentaram redução média horizontal e vertical da furca de 3.40 ± 0.55 mm ($p < 0.001$) e 4.0 ± 1.58 mm ($p < 0.005$). O ganho de inserção nos defeitos de furca foi de 3.2 ± 2.17 mm ($p < 0.03$). A análise histológica demonstrou regeneração completa dos tecidos periodontais, coronalmente ao ponto de referência demarcado em 4/6 espécimes investigados, sendo este o primeiro estudo a comprovar histologicamente a regeneração periodontal conseguida com o uso do rhPDGF-BB. Não houve diferenças de resultados entre as diferentes concentrações de rhPDGF-BB utilizadas, sem efeitos colaterais adversos mesmo quando o produto foi usado em alta concentração (5 mg/ml).

CAMELO et al. no mesmo ano realizaram ensaio clínico para avaliar as respostas clínicas e histológicas do tratamento de lesões de furca classe II por meio de rhPDGF-BB veiculado por enxerto alógeno (DFDBA). Dois defeitos de furca receberam 0.5 mg/mL e dois receberam 1.0 mg/mL. Foram investadas as medidas de profundidade de sondagem e nível de inserção no exame inicial e 9 meses após o tratamento. Os resultados indicaram que as duas concentrações de rhPDGF-BB resultaram em diminuição significativa das profundidades de sondagem no sentido horizontal (média de 3.5 mm) e vertical (média de 4.25 mm) e ganho de inserção (3.75 mm). A análise histológica mostrou que houve formação de novo osso, cemento e ligamento periodontal coronal ao ponto de referência demarcado durante a cirurgia e ao nível da crista óssea. Houve inclusive formação de tecido calcificado e fibras de conjuntivo inseridas no mesmo sobre projeção de esmalte em um dos casos, indicando pela primeira vez regeneração tecidual completa pode ser alcançada em defeitos de classe II de furca.

Baseado nos estudos preliminares, em 2005 NEVINS et al. realizaram estudo de larga escala prospectivo, cego e randomizado para investigar a segurança e efetividade do rhPDGF-BB veiculado por b-TCP para o tratamento de defeitos ósseos periodontais aos 6 meses de cicatrização. Foram incluídos no estudo 11 centros de estudos diferentes, onde foram arrolados 180 pacientes necessitando de tratamento cirúrgico de defeitos periodontais infra-ósseos de 4mm ou mais de profundidade. Os pacientes foram alocados nos grupos: 1) b-TCP + 0.3 mg/ml rh PDGF-BB em solução tampão; 2) b-TCP + 1.0 mg/ml rhPDGF-BB em solução tampão; 3) b-TCP + tampão (controle ativo). Houve ganho de inserção significativamente maior aos 3 meses para o grupo 1 comparado ao grupo 3 (3.8 vs. 3.3 mm; $p=0.032$), embora aos 6 meses não houvessem diferenças significantes entre os grupos. A aceleração do ganho de inserção resultou em maior taxa de ganho de inserção entre o exame inicial e 6 meses p.o. do que o grupo 3. Os sítios tratados com rhPDGF-BB na concentração de 0.3 mg/ml apresentaram ganho ósseo linear (2.6 vs. 0.9 mm; $p<0.001$) e percentual de preenchimento do defeito (57% vs. 18%; $p<0.001$) do que o grupo controle. Houve menos recessão gengival aos 3 meses no grupo 1 comparativamente ao grupo 3 ($p=0.04$), que aos 6 meses se manteve estável, com ligeiro ganho de altura gengival no grupo 3. Não houve efeitos adversos graves em nenhum dos grupos. Esses achados indicaram que o uso de rhPDGF-BB é seguro e efetivo no tratamento de defeitos

ósseos periodontais, estimulando o ganho de inserção, redução da recessão aos 3 meses p.o. e preenchimento ósseo dos defeitos.

McGUIRE et al. em 2006 relataram o acompanhamento de 4 casos tratados durante o estudo multicêntrico publicado anteriormente (Nevins et al. 2005) durante 18 e 24 meses pós-operatório, quando foram observados manutenção do nível de inserção clínico em todos os casos, com exceção de um. Todos os casos demonstraram aumento substancial de ganho ósseo linear e percentual de preenchimento do defeito quando comparado aos resultados obtidos aos 6 meses de acompanhamento. As mudanças radiográficas substanciais no aspecto do preenchimento do defeito foram observadas para os dois grupos tratados por meio de rhPDGF-BB, consistindo de radiopacidade aumentada e trabeculação óssea, indicativa de processo aumentado de mineralização e maturação do osso do que aos 6 meses pós-operatório.

Posteriormente, em 2007, NEVINS et al. investigaram os efeitos do tratamento de defeitos ósseos interproximais severos em incisivos inferiores de dois pacientes por meio de rhPDGF-BB nas concentrações de 0.3 mg/ml (caso 1) ou 1.0 mg/ml (caso 2) e FDBA (osso alógeno liofilizado mineralizado), inseridos após raspagem e alisamento e condicionamento ácido da raiz com tetraciclina durante 4 minutos. O enxerto foi protegido com membrana colágena. Os pacientes foram acompanhados por 11 meses, quando se observou ótima cicatrização dos tecidos, com profundidade de sondagem de 3 mm, sem recessão tecidual marginal no caso 1 e com 3 mm de recessão no caso 2. O ganho de inserção clínica nos casos 1 e 2, respectivamente, foi de 7 mm e 2 mm, sem efeitos adversos relacionados às doses do rhPDGF-BB. Radiograficamente, foi observado preenchimento ósseo dos defeitos, comprovando que a utilização do FDBA associado a rhPDGF-BB representa uma efetiva alternativa de tratamento regenerativo de defeitos ósseos periodontais.

RIDGWAY et al. em 2008, utilizando rhPDGF-BB nas concentrações de 0.3 e 1.0 ng/ml para tratamento de 16 defeitos infra-ósseos em 8 pacientes adultos, observaram histologicamente a formação de novo osso, novo cemento e novo ligamento periodontal em 13 sítios.

McGUIRE et al. em 2009 avaliaram os resultados histológicos e microtomográficos (micro CT) do tratamento de defeitos de recessão gengival com tecido conjuntivo subepitelial ou 0.3 mg/ml de rhPDGF-BB+b-TCP. Os defeitos de recessão foram criados cirurgicamente em seis pré-molares indicados à extração por razões ortodônticas, apresentando não mais que 3 mm de gengiva ceratinizada, crista óssea 2 a 3 mm apical à margem gengival recém-criada e profundidade da recessão de pelo menos 3 mm. Os defeitos foram mantidos estáveis por 2 meses e, posteriormente, quatro defeitos foram enxertados com rhPDGF-BB + b-TCP e cimento cirúrgico, enquanto dois outros defeitos foram tratados por meio de ECS. Nove meses depois, foram obtidos cortes histológicos os quais mostraram fibras de tecido conjuntivo (fibras de Sharpey) perpendicularmente inseridas em cimento neoformado e osso alveolar. Em dois sítios tratados com ECS, foi observado epitélio juncional longo coronalmente à crista óssea e fibras de tecido conjuntivo correndo paralelamente às superfícies radiculares adjacentes, sem evidências de inserção no cimento ou osso e sem evidências de regeneração dos tecidos periodontais, o que só foi observado quando os sítios foram tratados com rhPDGF-BB.

MELLONIG et al. apresentaram em 2009 estudo histológico relatando os efeitos do tratamento de lesões de furca classe III em 4 pacientes com periodontite crônica avançadas com prognóstico desfavorável dos pontos de vista periodontais e protéticos por meio da aplicação de rhPDGF-BB. Os sítios foram acessados e uma demarcação foi criada através e ao longo da extensão apical do cálculo, definindo o ponto de referência para análise histológica. Os casos foram tratados com rhPDGF-BB+b-TCP e membrana colágena posicionadas nas superfícies vestibular e lingual. Depois de 6 meses, os dentes foram removidos em bloco para processamento histológico. Clinicamente, todos os casos mostraram aumento da recessão gengival e 3 furcas permaneceram como classe III. A mobilidade inicial de grau 1 passou para 0 em três dentes e permaneceu como grau 2 em 1 dente. Três superfícies radiculares mostraram regeneração, outras 3 superfícies mostraram nova inserção e 1 mostrou formação de epitélio juncional longo. Apenas uma das quatro lesões de fura mostrou melhora na classe III para classe II, evidenciando, histologicamente, regeneração parcial.

Em 2009, NEVINS et al. realizaram estudo piloto para avaliar se a matriz colágena mineralizada substituta de osso (MCBS) combinada com rhPDGF-BB (0.3

mg/ml) seria capaz de formar osso viável na parede vestibular de defeitos de extração, permitindo a instalação de implantes. Sete pacientes foram tratados, resultando em 8 espécimes disponíveis para avaliação, que mostraram boa qualidade e quantidade de osso neoformado dos pontos de vista clínico, radiográfico e histológico. Houve formação óssea robusta acompanhada por reabsorção parcial da matriz após 4 e 6 meses, sem o uso adjunto de barreiras de membrana.

JAYAKUMAR et al. em 2010 investigaram a eficácia e segurança do uso de rhPDGF-BB + b-TCP (n= 25) comparativamente ao uso do b-TCP (n= 25) em defeitos periodontais tratados por meio de cirurgia a retalho e condicionamento ácido radicular com tetraciclina ácida, seguido da colocação do biomaterial durante 10 minutos. Para tanto, foi realizado ensaio clínico controlado, randomizado, multicêntrico, duplo cego, prospectivo e paralelo envolvendo 50 pacientes. A extensão de crescimento linear de tecido ósseo e percentual de preenchimento ósseo aos 6 meses foram significativamente maiores no grupo teste do que no controle, resultando em maior área abaixo da curva de ganho de inserção clínica de 0-6 meses ($p < 0.01$), ganho de inserção e maior redução da profundidade de sondagem aos 3 e 6 meses.

Em 2011, ZADEH et al. apresentaram técnica minimamente invasiva para tratamento de recessões gengivais múltiplas e adjacentes na região anterior superior por incisão vesibular e túnel de acesso subperiosteal (VISTA) associando o posicionamento de membrana de colágeno reabsorvível saturada com PDGF-BB e deslize coronal do retalho. Os resultados obtidos foram esteticamente satisfatórios, com excelente mescla de cor com os tecidos adjacentes, recobrimento de múltiplas recessões simultaneamente e sem incisões relaxantes.

O recobrimento de defeitos de recessão $\geq 2\text{mm}$ por meio de matriz dérmica acelular com e sem rhPDGF-BB foi investigado em 2012 por CARNEY et al. em estudo de boca dividida. Foram incluídos 17 pacientes com 40 defeitos de recessão bilaterais, tratados por meio de MDA e retalho avançado coronalmente. No grupo controle, a matriz dérmica foi hidratada em soro fisiológico por 3 minutos enquanto que, no grupo teste, a matriz foi hidratada em 2ml de rhPDGF por ≥ 3 minutos. Foram investigados índice gengival, altura da recessão, profundidade de sondagem, nível de inserção clínica, faixa de gengiva ceratinizada, altura e comprimento da papila no exame inicial e nos períodos pós-operatórios de 3 e 6 meses. Os dois grupos mostraram

recobrimento radicular significativo, com o grupo teste apresentando 69% de recobrimento e o grupo controle apresentando 76,7%. Defeitos classificados como classe I e III de Miller tiveram também recobrimento significativo de raiz ao longo do estudo, sendo, respectivamente, de 84.1% e 51.5% no grupo teste e de 84.7% e 60.8% para o grupo controle. Uma semana após a cirurgia, o 35% do grupo teste mostrou melhor padrão de cura da ferida, comparado a 15% do grupo controle. Depois de um mês, 20% do grupo teste e 15% do controle mostraram melhor padrão de cicatrização, sugerindo ausência de diferenças estatísticas ou clínicas no percentual de recobrimento do defeito, faixa de gengiva ceratinizada, nível de inserção ou cicatrização quando os defeitos são tratados por meio de MDA com ou sem rhPDGF-BB.

THAKARE e DEO em 2012 realizaram estudo clínico randomizado para avaliar a efetividade de tratamento de defeitos periodontais infra ósseos por meio da aplicação de rhPDGF-BB + β -TCP ou HA + β -TCP. Foram tratados 18 defeitos interproximais em 18 pacientes com periodontite crônica. Aos 12 meses, os dois grupos apresentaram diminuição da profundidade de sondagem e ganho de inserção clínica. O ganho de inserção médio foi maior no grupo teste do que no grupo controle. O crescimento linear de osso observado em radiografias foi significativamente maior no grupo teste, assim como o preenchimento ósseo do defeito aos 12 meses.

SNYDER em 2012 utilizaram DFDBA associado a β -TCP e rhPDGF-BB para o tratamento de defeito ósseo amplo na região anterior inferior, permitindo a instalação de implantes osseointegrados.

MISHRA et al. em 2013 avaliaram a eficácia de técnica cirúrgica minimamente invasiva modificada (M-MIST) com liberação local de rhPDGF-BB no tratamento de defeitos intraósseos. Foram incluídos 24 pacientes saudáveis em estudo duplo cego, randomizado e controlado. O grupo teste foi tratado por M-MIST + rhPDGF-BB e o grupo controle por M-MIST apenas. Houve redução significativa da profundidade de sondagem, recessão gengival, distância da JCE à base do defeito, profundidade do defeito e distância da JCE à crista óssea alveolar, juntamente com ganho de inserção, nos dois grupos de tratamento aos 6 meses de acompanhamento, sem diferenças entre os grupos.

KÄMMERER et al. em 2013 avaliaram a influência de membrana colágena e do rhPDGF-BB no aumento vertical de tecido ósseo com matriz óssea bovina deproteinizada fixada à tíbia de 12 coelhos. Houve maior área de novo osso depois de 3 semanas no grupo rhPDGF-BB sem membrana. Depois de 6 semanas, houve maior área e altura de novo osso nos grupos onde a membrana foi utilizada, sugerindo que a adição de rhPDGF-BB aos blocos pode induzir precocemente o crescimento ósseo, enquanto que o uso da membrana favorece o volume e altura de formação de novo osso em maior extensão.

Também em 2013, FUNATO et al. publicaram relato de série de casos para apresentar os resultados clínicos e histológicos de aumento vertical de rebordo utilizando *titanium mesh*, membrana colágena reabsorvível e rhPDGF-BB em 19 pacientes, tratados por meio de enxerto autógeno misturado a partículas de osso bovino inorgânico, tratados por rhPDGF-BB. Houve ganho vertical de osso de 8.6 ± 4.0 mm com a técnica apresentada, podendo ser utilizada para ganho vertical de tecido ósseo visando a instalação de implantes.

URBAN et al. descreveram, em 2013, o sucesso do aumento horizontal de rebordo na região posterior de maxila obtido pelo uso conjunto de rhPDGF-BB, osso autógeno, osso bovino inorgânico e membrana, permitindo a instalação de 3 implantes os quais mantiveram seus níveis ósseos estáveis depois de 36 meses de função mastigatória.

Em 2013, RUBINS et al. realizaram um estudo prospectivo com uma série de casos apresentando o tratamento de defeitos de recessão de Miller classe I ou II ≥ 2 mm por meio da combinação de ECS e aplicação de rhPDGF-BB em 15 pacientes. Foram obtidas imagens fotográficas e radiografias intra-buciais no exame inicial e até 6 meses pós-operatórios. Os exames clínicos incluíram profundidade de sondagem no centro da face vestibular, profundidade e largura da recessão, nível de inserção clínica, largura da faixa de gengiva ceratinizada, índices de placa e cálculo. Durante a cirurgia, foi realizado condicionamento ácido radicular com EDTA a 24%. O ECS foi embebido com 5 ml de solução de rhPDGF-BB a 0.3 mg/ml (GEM-21S, Osteohealth, EUA) durante 15 minutos previamente ao seu posicionamento no leito receptor. Houve, após 6 meses, ganho significativo de inserção (de 4.3 ± 0.6 mm no exame inicial para 1.5 ± 0.5 mm no exame final; $p < 0.001$), diminuição da altura (2.9 ± 0.6 mm vs.

0.1±0.3; $p < 0.001$) e largura (3.7±0.8 vs. 0.6±1.2; $p < 0.001$) da recessão e aumento significativo da faixa de gengiva ceratinizada (1.3±0.8 mm vs. 3.9±1.4 mm; $p < 0.001$).

Em 2013, NEVINS et al. apresentaram o acompanhamento de 36 meses de 83 participantes do estudo clínico randomizado publicado anteriormente (2005). Embora não houvesse aumento significativo no ganho de inserção e crescimento linear de osso, houve aumento contínuo nestes parâmetros, além do percentual de preenchimento ósseo, sugerindo estabilidade da resposta regenerativa.

DESHPANDE et al. também investigaram, em 2014, a efetividade do tratamento de defeitos de recessão múltipla por meio de rhPDGF-BB + b-TCP + ECS, ECS + CAF ou CAF (posicionamento coronal de retalho) apenas em 36 pacientes. As medidas clínicas incluíram profundidade de sondagem, nível de inserção relativo e nível relativo da margem gengival no exame inicial e aos 6 meses pós-operatórios. Os resultados mostraram redução significativa da recessão gengival nos grupos PDGF e ECS de, respectivamente, 2.0±0.6 mm e 2.6±0.9 mm, enquanto que o grupo CAF foi de 1.7±0.9 mm. O grupo PDGF mostrou recobrimento radicular médio de 87.7%, enquanto o grupo ECS foi de 91.3% e o grupo CAF de 68.6% aos 6 meses pós-operatório. A combinação de rhPDGF-BB+b-TCP foi considerada como uma combinação efetiva para o tratamento de defeitos de recessão múltiplos adjacentes.

2.2 Enxerto ósseo em neoformação ou granulação óssea

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. A análise histológica dos espécimes demonstrou que defeitos de furca cirurgicamente criados em molares de cães e 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. Neste artigo, os autores ainda descreveram dois casos clínicos tratados por meio da técnica de “enxerto ósseo em neoformação”, os quais resultaram em diminuição da profundidade

de sondagem, ganho de inserção clínica e fechamento radiográfico do defeito após 5 anos de observação. Esses achados são compatíveis com as características de plasticidade celular descritas para as células tronco mesenquimais, visto que as células transferidas para tratamento dos defeitos periodontais foram coletadas do alvéolo em cicatrização e deram origem a pelo menos três tipos teciduais distintos: osso alveolar, cimento e ligamento periodontal.

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 (Amler et al. 1961; Halliday 1969; Soehren, Van Swol 1979; Amler 1981; Evian et al. 1982; Amler 1984; Amler 1993). 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. (Amler et al. 1961; Evian et al. 1982). CARDAROPOLI et al. (2003) demonstraram que o novo osso mineralizado ocupou 48% do alvéolo de extração de cães após 14 dias e 88% do alveólo após 30 dias.

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, 2012), 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 (Yamashita et al. 1987; Somerman et al. 1988).

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.

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.

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.

A técnica do enxerto ósseo em neoformação foi posteriormente avaliada por SOARES et al. (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 µg/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 testes e 12 controles) 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.

AHN e SHIN (2008) investigaram 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.

Mais recentemente, o enxerto ósseo em neoformação foi utilizado para tratamento de recessões gengivais extensas (Ferraz 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 (grupo teste; $n = 35$ defeitos) ou por meio de enxerto de tecido conjuntivo subepitelial (grupo controle; $n = 30$ defeitos). Os pacientes foram clinicamente avaliados no pré-operatório (baseline) e nos períodos de 1, 3, 6 e 9 meses pós-operatórios 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 sugerem 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.

HEBERER et al. em 2012 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.

Luo et al. em 2016, baseados na técnica do enxerto ósseo em neoformação e na hipótese de que o tecido presente em alvéolos em reparação é rico em células tronco, osteoblastos e fatores de crescimento, com potencial osteogênico avaliaram as propriedades osteogênicas in vivo e in vitro de células de alvéolo de extração de 2 semanas (ESEHT) e do osso alveolar próprio (PAB) do septo interdental de cães

beagle. No estudo in vitro, os dois tipos celulares foram co-cultivados, separadamente, com linhagens celulares derivadas da medula óssea de ratos (células st2). O efeito dos dois tipos celulares na migração, proliferação e diferenciação osteogênica das células st2 foi investigado. No estudo in vivo, 36 defeitos de fuca classe II foram criados cirurgicamente na mandíbula de cães bilateralmente para tratamento por meio de ESEHT ou PAB obtidos da maxila, duas semanas após a criação dos defeitos e dos alvéolos de extração. Os animais foram sacrificados depois de 8 semanas para análise histológica e histométrica. O estudo in vitro demonstrou que ESEHT e PAB promoveram de forma significativa a migração e proliferação celular, atividade de fosfatase alcalina, expressão de sialoproteína óssea, Runx2 em RNA mensageiro e níveis de proteína. Adicionalmente, observaram que ESEHT mostrou atividade mais forte que PAB, exceto na atividade quimiotática. O estudo in vivo mostrou que as duas células tem as mesmas propriedades de favorecer o percentual de cimento e osso regenerado, significativamente acima do controle negativo (sem enxerto).

3 PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

Os objetivos deste estudo são:

- Determinar as características fenotípicas das células da granulação óssea (GO) *in vitro*;
- Avaliar os efeitos do PDGF-BB na concentração de 300 ng/ml na taxa de proliferação e na adesão de células derivadas da granulação óssea a superfícies radiculares periodontalmente comprometidas.

Hipótese Nula

A adição do PDGF-BB não resulta em aumento significativo da taxa de proliferação e adesão de células derivadas da granulação óssea aos fragmentos radiculares.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Bauru sob o número 049/2011 (Anexo I). Contribuíram livremente com este estudo, após conhecimento de sua natureza verbalmente e por escrito, 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-USP. Para isso, os pacientes deveriam apresentar indicação de cirurgia periodontal regenerativa por meio da técnica de enxerto ósseo em neoformação e a presença de rebordo desdentado, permitindo a criação de alvéolo cirúrgico. Não foram considerados como voluntários fumantes, mulheres grávidas ou lactantes, usuários de medicamentos anticonvulsivantes, anti-hipertensivos, corticoesteroides ou outros que apresentassem a capacidade de interferir com o metabolismo ósseo (ex.: alendronato), portadores de desordens ou doenças sistêmicas pobremente controladas (ex.: diabetes, doenças cardiovasculares) e aqueles que apresentassem qualquer outra contraindicação ao tratamento cirúrgico.

4.1 Estabelecimento de cultura primária e caracterização inicial das células GO

A primeira etapa deste estudo consistiu no estabelecimento de cultura primária e caracterização das células de granulação óssea (GO) em cultura, descrita na Dissertação de Mestrado de Valdivia, em 2013. Esses procedimentos serão descritos brevemente neste estudo para melhor compreensão das características das células GO em cultura.

4.1.1 Criação do alvéolo cirúrgico e coleta da granulação óssea

O alvéolo foi criado cirurgicamente por meio da perfuração do rebordo desdentado com broca esférica diamantada, sob irrigação constante e abundante, após anestesia apropriada e descolamento total do retalho (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. O alvéolo criado apresentava as dimensões aproximadas de 10 mm de profundidade x 3,5 mm de diâmetro e foi protegido com membrana de colágeno bovino (GenDerm®, Baumer, Brasil), prevenindo a invaginação de tecido mole. Após 21 dias, a área foi reaberta para coleta do material de granulação presente no alvéolo em cicatrização para realização do tratamento periodontal regenerativo indicado para cada paciente. 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.

4.1.2 Estabelecimento de cultura primária das células 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 ressuspendido 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 subconfluente (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). Os procedimentos foram realizados no laboratório de cultura de células do Centro Integrado de Pesquisas, sob a responsabilidade dos Profs. Drs. Carla Andreotti Damante e Rodrigo Cardoso de Oliveira.

4.1.3 Determinação da curva de crescimento das células GO

Para esse experimento, descrito na Dissertação de Mestrado (Valdívia 2013), foram plaqueadas 10⁴ células/poço, na 5ª 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 triplicatas. A determinação da curva de crescimento foi feita pelo método simplificado de Armelin et al. (1984). Para tanto, o meio presente nos poços de cultura foi aspirado e, a seguir, as células foram lavadas duas vezes com PBS. Foi acrescentado aos poços 400 µl de tripsina para destacamento das células aderidas e, na sequência, 500 µl de PBS foram adicionados aos poços com tripsina. A solução contendo as células foi coletada e colocada em *eppendorfs* contendo 100µl de formol a 37%, 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) $NT = N \times D \times 10^4 / Q$ (NT- número total de células; N- número de células contadas; D- Diluição; Q- número de quadrados) e (b) $VIABILIDADE\ CELULAR = NV \times 100 / NT$ (NV- número de células viáveis: NT- número total de células contadas).

4.1.4 Ensaio da atividade de Fosfatase Alcalina (FAL)

Para avaliar a atividade da FAL, conforme descrito por Valdívia (2013), as células GO foram plaqueadas em placas de 24 poços na densidade de 4x10⁴ 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. 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. As células foram lavadas uma vez com solução de PBS, lisadas e coletadas 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 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 µmol pNP/min x mg proteína.

4.1.5 Ensaio de mineralização (vermelho de alizarina)

Para avaliar a capacidade de mineralização, conforme descrito por Valdívia (2013), as células 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 4x10⁴ em placas de 12 poços. 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 µg/ml ácido ascórbico + 10 mM β-glicerofosfato (meio osteogênico). 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 e fixadas com solução de formaldeído a 4% 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, seguido de 3 lavagens com água deionizada ultrapura. As placas foram fotografadas utilizando a

câmera El Logic 100 Imaging System e analisadas pelo programa Kodak Molecular Imaging software v.4.5.

A análise quantitativa da coloração foi avaliada pelo método colorimétrico segundo Silva et al (2012). Após as placas estarem totalmente secas, foram adicionados 280 µl 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 *eppendorf*, 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. A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 405 nm, sendo a formação de matriz mineralizada expressa como densidade óptica (D.O.).

4.2 Teste de proliferação e caracterização de população de células tronco mesenquimais

Nesta segunda etapa, a taxa de proliferação, as características imunohistoquímicas e citometria de fluxo das células GO foram investigadas comparativamente a fibroblastos gengivais humanos obtidas de pacientes saudáveis (FGH) e com síndrome de Down (FSD) e fibroblastos de ligamento periodontal humano (FLP).

4.2.1 Teste de proliferação

A taxa de crescimento das células GO foi comparada à taxa de crescimento de fibroblastos gengivais humanos obtidos a partir de linhagem primária previamente estabelecida (OHIRA 2012). Após o descongelamento, 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. A proliferação celular foi avaliada nos períodos de 24, 48 e 72hs por meio do 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.

O padrão proliferativo das células GO na passagem 12 foi também determinado de acordo com ensaio MTT. Para tanto, as células foram plaqueadas em sextuplicatas em placas de 96 poços contendo 10^3 células em cada poço/dia de experimento. O padrão de crescimento celular foi determinado por meio do teste de MTT, em densidade ótica, nos períodos de 1, 4, 6, 8 e 10 dias após o plaqueamento. O objetivo deste ensaio foi identificar se existe diferença no padrão de proliferação células em passagens mais tardias, indicando senescência das células.

4.2.2 Análise imunohistoquímica para caracterização de populações de células tronco mesenquimais

Para investigar se o tecido de granulação óssea removido de alvéolos em cicatrização apresenta populações de CTM, durante a coleta do tecido de granulação para estabelecimento da cultura primária, uma pequena porção da amostra foi utilizada para caracterização imunohistoquímica, permitindo a visualização das células como elas existem nos tecidos.

A amostra obtida foi incluída em parafina e secções de 3µm foram utilizadas para imunomarcagem com os anticorpos CD34, marcador de células tronco hematopoiéticas, endoteliais progenitoras e satélites musculares presentes na superfícies de células medulares ósseas, e CD 146, utilizada para marcar proteínas de superfície celular (superfamília das imunoglobulinas) encontradas em fibroblastos de osso medular que podem ser importantes na hematopoiese e uma subpopulação de células MUC-18+, precursoras mesenquimais. Os espécimes foram tratados para bloqueio da peroxidase endógena (Dako, Alemanha) por 5 minutos em temperatura ambiente. Os cortes foram incubados por 30 minutos com os anticorpos primários (BD

Pharmingen™, Estados Unidos) conjugados. A atividade de peroxidase foi visualizada utilizando diaminobenzidina (Dako, Alemanha), permitindo a marcação de coloração marrom. Esses procedimentos foram realizados em colaboração pelo aluno de Pós-Graduação João Paulo C. Barros no laboratório da Disciplina de Periodontia da *Herman Ostrow School of Dentistry, University of Southern California*, sob a supervisão do Prof. Dr. Homa Zadeh. As lâminas foram contra-coradas pela técnica hematoxilina-eosina.

4.2.3 Citometria de fluxo

A análise fenotípica das células GO foi realizada por meio de citometria de fluxo, conforme protocolo padrão. As células GO (10^6 células; passagem 14) foram lavadas e incubadas com soro de coelho normal diluído 2:10 em PBS por 45 minutos a 4°C para bloqueio de ligações inespecíficas. A imunomarcação foi realizada com anticorpos conjugados contra CD34, CD45, CD105, CD166 e colágeno tipo 1 humanos (BD Biosciences, San Diego, CA, USA), utilizando-se 1,5 µg de anticorpos, incubados por 30 minutos a 4°C. As amostras foram lavadas duas vezes com PBS, centrifugadas por 10 minutos e armazenadas em 100 µl de PBS formol a 4°C por 24 horas. A aquisição das células foi realizada em citômetro de fluxo FACSsort e a análise foi realizada utilizando *software* CellQuest (BD Biosciences), disponível no laboratório de Microbiologia e Imunologia, Departamento de Biologia Oral, da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP, sob a supervisão da Profa. Dra. Ana Paula Campanelli. Foram utilizadas como controles positivos para comparação dos resultados cultura de fibroblastos gengivais humanos (MARTINEZ, 2015. Aprovação pelo CEP processo CAAE: 32274414.9.0000.5417), fibroblastos gengivais obtidos de pacientes portadores de síndrome de Down (MICHEL 2016; processo CAAE: 49844715.0.0000.5417) e fibroblastos derivados de ligamento periodontal humano (PAULINO-CABA 2014; processo CAAE: 23098313.1.0000.5417).

4.3 Efeitos do rhPDGF-BB (300ng/ml) sobre células de linhagem osteoblástica (GO)

A terceira parte deste estudo foi avaliar os efeitos do tratamento de fragmentos radiculares periodontalmente comprometidos com rhPDGF-BB na taxa de proliferação e de adesão das células GO.

4.3.1 Coleta dos dentes extraídos e preparo dos fragmentos para o teste de adesão celular

Foram coletados 15 dentes unirradiculares extraídos por razões periodontais nas clínicas de Periodontia, Cirurgia e Integrada Reabilitadora da Faculdade de Odontologia de Bauru. Os dentes removidos foram armazenados em solução de soro fisiológico sob refrigeração até o processamento. Os fragmentos radiculares foram preparados por meio da separação da coroa e da raiz com broca diamantada tronco-cônica em alta rotação, sob refrigeração constante e abundante, na altura da junção cimento-esmalte. Posteriormente, a raiz foi seccionada em seu longo eixo e, finalmente, um corte confeccionado de 5 a 7 mm apicalmente à borda cervical dos fragmentos foi realizado, removendo-se as porções média e apical da raiz, obtendo-se 30 fragmentos trapezoidais.

Os fragmentos radiculares obtidos foram submetidos a procedimento de raspagem e alisamento radicular com curetas Gracey nº 5/6, aplicando-se 20 golpes de cureta para remoção dos remanescentes de placa, cálculo e restos teciduais, seguido de condicionamento da superfície com solução em gel de EDTA a 24% durante 3 minutos e lavagem abundante com soro fisiológico (Barros 2013).

4.3.2 Preparo da solução de PDGF-BB recombinante humano

O frasco de PDGF-BB recombinante humano (Sigma, Saint Louis, Missouri, EUA) foi preparado de acordo com as recomendações do fabricante. O frasco contendo 10 µg do produto em pó de coloração branca e 97% de pureza, foi reconstituído em DMEM contendo 10% soro bovino fetal e 1% solução antibiótica-antimicótica, resultando na concentração final de 300 ng/ml. Após a diluição, o PDGF

foi aliquotado em frascos de 1 ml e congelados até a realização de todos os procedimentos.

4.3.3 Ensaio de contagem celular

Foram plaqueadas 10^4 células/poço, na 12ª passagem, em 15 poços de placa para cultivo celular, em DMEM acrescido de rhPDGF-BB na concentração de 300 ng/ml. O número de células vitais presentes nos poços foi determinado nos períodos de 1, 3, 5, 7 e 10 dias, em triplicatas, segundo método simplificado de Armelin et al. (1984), conforme as equações: (a) $NT = N \times D \times 10^4 / Q$ (NT- número total de células; N- número de células contadas; D- Diluição; Q- número de quadrados) e (b) $VIABILIDADE\ CELULAR = NV \times 100 / NT$ (NV- número de células viáveis; NT- número total de células contadas).

4.3.4 Ensaio de viabilidade celular (MTT)

A mensuração da viabilidade e proliferação celular é a base de vários ensaios *in vitro* investigando a resposta de populações celulares a fatores externos. No ensaio de MTT, o tetrazólio amarelo (3-(4,5 dimetiltiazolil-2)-2, 5-bromida difeniltetrazólio) é reduzido por células metabolicamente ativas, como parte da ação de enzimas dehidrogenases, para gerar equivalentes reduzidos, como NADH e NADHP. O formazan roxo intracelular resultante pode ser solubilizado e quantificado por meio de espectrofotometria. Esse teste mediu a taxa de proliferação celular de células GO cultivadas em DMEM contendo soro bovino fetal, solução antibiótica-antimicótica e rhPDGF-BB na concentração de 300 ng/ml foram plaqueadas em sextuplicatas na densidade de 10^4 células em placa de 96 poços. A adição do reagente MTT foi realizada nos períodos de 24, 48 e 72 horas. A leitura das placas foi realizada em espectrofotômetro na faixa de 560 nm e expressa em densidade óptica, após correção do valor negativo (blank).

4.3.5 Ensaio de adesão celular

Para a realização do teste de adesão, os fragmentos dentários obtidos de dentes extraídos foram divididos aleatoriamente em dois grupos, contendo 15

fragmentos cada um. No grupo teste, após o tratamento dos fragmentos obtidos por meio de raspagem e alisamento radicular e condicionamento com gel de EDTA, os fragmentos foram posicionados em placa de 24 poços, com a superfície de cimento (tratada) voltada externamente. Sobre a superfície, foram plaqueadas 10^4 células GO em DMEM suplementado com 10% FBS, 1% solução antibiótica-antimicótica e 300 ng/ml de rhPDGF-BB no grupo teste (n= 15) e em DMEM suplementado com 10% FBS e 1% solução antibiótica-antimicótica no grupo controle (n= 15). As amostras foram mantidas em estufa de CO₂, em atmosfera úmida a 37°C, pH 7.4, por 24 horas. Após este período, o meio foi removido e as amostras foram fixadas com solução de Karnovsky e preparadas para análise em microscopia eletrônica de varredura. De cada espécime, foram obtidas duas fotomicrografias em aumento de 500x, sendo uma da área central e outra da área periférica, aleatoriamente escolhida, resultando em 30 imagens disponíveis para análise para cada grupo.

As imagens foram analisadas por examinador único, calibrado previamente, cegado em relação ao grupo de tratamento. A calibração foi realizada com 15 imagens aleatoriamente escolhidas, as quais foram analisadas em dois períodos separados por intervalo de 5 dias. Para a calibração, o número de células foi contado nas imagens inseridas em programa de apresentação de slides (PowerPoint, Microsoft), sem identificação das mesmas. Os dados foram anotados em tabela identificadas pelo número do slide. Para a realização da análise de concordância intra-examinador, cada imagem foi classificada em uma das seis categorias: (a) 0 a 15 células; (b) 16 a 30 células; (c) 31 a 50 células; (d) 51 a 75 células; (e) 76 a 90 células; (f) >90 células presentes. O índice Kappa foi considerado excelente ($K= 0.831$; $p< 0.001$).

4.3.6 Avaliação da morfologia celular

A morfologia das células nas imagens de MEV obtidas foram classificadas em escala de 1 a 5, conforme adaptado de Gamal e Mailhot (2000):

- Score 1 – células achatadas (bem aderidas)
 - Score 2 – combinação de células ovais, arredondadas e achatadas
 - Score 3 – células ovais
-

- Escore 4 – células arredondadas (pouco aderidas)
- Escore 5 – células ausentes

As imagens foram analisadas por examinador único, calibrado e cegado em relação aos grupos de tratamento, conforme descrito no item 4.3.5. Os dados obtidos foram tabulados para análise estatística comparativa entre os grupos.

4.4 Análise estatística

Na primeira etapa do estudo, 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%, em software GraphPad Prism 5.0 para Mac. 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%.

Na segunda etapa do estudo, a viabilidade celular foi analisada estatisticamente por meio de teste de análise de variância múltipla para medidas repetidas, com pós-teste Tukey, adotando-se como nível de significância de 5% ($\alpha=0.05$). Para análise estatística da proliferação celular nos diferentes grupos, foi adotado o método não paramétrico de Friedman, pós-teste Dunn, com nível de significância de 5%.

Na terceira etapa do estudo, a viabilidade celular foi analisada estatisticamente por meio de ANOVA, pós-teste Tukey. O ensaio de proliferação celular foi analisado estatisticamente pelo método de Friedman, pós-teste Dunn. O ensaio de adesão celular e morfologia celular foram analisados estatisticamente no *software* GraphPad Prism 7.0 para Mac por meio de teste Mann-Whitney, com nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Etapa 1

Os resultados da Etapa 1 de desenvolvimento dessa pesquisa foram descritos anteriormente (VALDIVIA, 2013) e serão apresentados resumidamente neste trabalho visando a melhor compreensão dos eventos investigados.

5.1.1 Curva de crescimento

As células GO apresentaram crescimento progressivo no período de observação de até 10 dias. Observou-se 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 vezes no dia 7 e 22,75 vezes no dia 10, com diferenças estatisticamente significantes em todos os períodos comparativamente ao plaqueamento inicial ($p < 0,05$; ANOVA pós-teste Dunnet).

5.1.2 Ensaio de atividade de fosfatase alcalina

Houve atividade alcalina pelas células GO em meio convencional e osteogênico, sem diferenças estatisticamente significantes entre os grupos nos períodos de 7, 14 e 21 dias ($p > 0,05$; ANOVA pós-teste Tukey), com pico de atividade observado aos 7 dias para os dois tipos de meio.

5.1.3 Ensaio de mineralização

As células GO apresentaram atividade de mineralização *in vitro*, com diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, a favor do meio osteogênico, nos períodos de 14 e 21 dias ($p < 0,0001$; ANOVA *post hoc* Tukey). O pico de atividade de mineralização foi observado aos 14 dias de acompanhamento.

5.2 Etapa 2

5.2.1 Ensaio de proliferação celular

No gráfico 1, observa-se o padrão de proliferação das células GO em comparação com o padrão de proliferação das células FGH, expresso em densidade ótica medida por espectrofotômetro no ensaio de MTT, que mede a atividade mitocondrial celular. Observa-se que as células FGH apresentaram maior atividade proliferativa do que as células GO nos períodos de 48 e 72 horas. As células GO apresentaram ligeira diminuição da viabilidade celular no período de 48 horas, seguido de aumento no período de 72 horas.

Gráfico 1: Viabilidade das células GO e FGH, investigada por meio do ensaio de MTT, expresso em média $\pm$ erro-padrão (eixo y: densidade ótica)

5.2.2 Curva de crescimento das células GO na passagem 12

A viabilidade celular das células GO na passagem 12 foi investigada por meio do ensaio MTT nos períodos de 1, 4, 6, 8 e 10 dias após o plaqueamento. A análise por meio de Kruskal Wallis detectou diferenças significantes entre os grupos ($p < 0.0001$). O pós-teste Tukey identificou que houve diferenças significantes entre a quantidade de células viáveis medida em densidade ótica nos períodos de 6, 8 e 10 dias em comparação ao período de 1 dia e nos períodos de 8 e 10 dias em comparação ao período de 4 dias, conforme ilustrado no Gráfico 2.

Gráfico 2: Viabilidade das células GO na 12ª passagem, investigada por meio do ensaio de MTT, expresso em média $\pm$ desvio-padrão (eixo y: densidade ótica)

5.2.3 Caracterização de populações de células tronco mesenquimais

5.2.3.1 Caracterização imunohistoquímica

A incubação dos espécimes com os anticorpos CD34 e CD146, marcadores de células tronco hematopoiéticas e MUC-18+ apresentaram resultados negativos (Figura 1), indicando que não existe na amostra células tronco de origem hematopoiética, conforme esperado.

Figura 1- Corte microscópico de amostra de tecido de granulação marcado com anticorpo monoclonal CD34 conjugado, sem evidência de imunofluorescência (A- aumento de 20X; B- aumento de 40x) e com anticorpo monoclonal CD146 conjugado, sem evidência de imunofluorescência (C- aumento de 20X; D- aumento de 40x)

5.2.3.2 Citometria de fluxo

No Gráfico 3, estão representadas as imunomarcações detectadas por meio de citometria de fluxo para as células GO, comparativamente aos controles constituídos de fibroblastos gengivais (FGH), fibroblastos gengivais de portadores de síndrome de Down (FSD) e fibroblastos de ligamento periodontal humano (FLP). As linhagens fibroblásticas (FGH, FLP e FSD) apresentaram marcação para CD45+CD34+ em maior percentual de células do que a cultura de células osteoblásticas (GO). Por outro lado, os marcadores CD105 e CD166 não foram expressos pelas células GO. As células FLP expressaram CD166 e CD34 em maior percentual de células do que FGH e FSD. Esses achados sugerem que as células GO cultivadas não expressaram marcadores de células-tronco mesenquimais.

Gráfico 3- Imunomarcacão das células GO (granulação óssea humana); FGH (fibroblastos gengivais humano) FLP (fibroblastos de ligamento periodontal humano) e FSD (fibroblastos gengivais de pacientes portadores de síndrome de Down) com anticorpos contra CD34, CD45, CD105, COLL1 (colageno tipo 1) e CD166

5.3 Etapa 3

5.3.1 Ensaio de contagem celular

No gráfico 4, observa-se a viabilidade celular das células GO incubadas com rhPDGF-BB durante 1, 3, 5, 7 e 10 dias. Diferenças estatisticamente significantes foram observadas no dia 1 vs. 5, 7 e 10, dia 3 dias vs. 7 e 10 dias e dia 5 dias vs. 7 ($p < 0.005$; ANOVA para medidas repetidas pós-teste Tukey).

Gráfico 4- Ensaio de viabilidade celular ($\text{nx}10^4$). Letras diferentes nos diferentes períodos de tempo significam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$; ANOVA para medidas repetidas, pós-teste Tukey)

5.3.2 Ensaio de viabilidade celular

No ensaio de proliferação celular por meio do método MTT, foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os períodos de 24 vs. 72 hs e entre os períodos de 48 vs. 72 hs ($p = 0.0087$; Friedman pós-teste Dunn), com pico proliferativo após 48 horas, conforme demonstrado no Gráfico 5.

Gráfico 5- Ensaio de proliferação celular (MTT), expresso em densidade óptica. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes entre os períodos de análise ($p < 0.05$; Friedman pós-teste Dunn)

5.3.3 Ensaio de adesão celular

No ensaio de adesão celular, as células GO foram cultivadas sobre fragmentos dentários humanos em meio contendo 300 ng/ml de PDGF-BB no grupo teste e em meio convencional no grupo controle. No gráfico 6, estão representados o número médio de células aderidas nos grupos teste e controle, observando-se diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, segundo o teste Mann Whitney ($p=0.011$).

Gráfico 6- Número médio de células GO aderidas sobre fragmentos dentários dos grupos teste e controle (média $\pm$ desvio-padrão)

5.3.4 Morfologia celular

Nas fotomicrografias de MEV pode-se observar que as células GO exibem aspecto ligeiramente trapezoidal e emitem longos prolongamentos citoplasmáticos que se conectam com outras células adjacentes (Figura 2A). Quando incubadas com rhPDGF-BB (Figura 2B), as células apresentaram alguma alteração na morfologia em alguns espécimes. Outros espécimes apresentaram, além de maior quantidade de células aderidas, menor área visível do fragmento dentário e aspecto morfológico mais complexo.

Figura 2- Fragmento de dente pertencente ao grupo controle (A) e ao grupo teste (B). Nas pontas das setas brancas, observe as células osteoblásticas emitindo longos prolongamentos citoplasmáticos

Análise da morfologia celular

Na Tabela 1, a seguir, está descrita a análise da morfologia celular, de acordo com a metodologia adaptada de Gamal e Mailhot (2000). Observou-se maior número de células bem aderidas (achatadas) no grupo teste do que no grupo controle, sem diferenças estatisticamente significantes entre os grupos.

Tabela 1- Escala de morfologia celular

	Mediana	Média	Desvio-padrão
Controle	1	2,03	1,69
Teste	1	1,26	0,52

p= 0.21 (Mann Whitney)

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 do rhPDGF-BB (300 ng/ml) na proliferação e adesão das mesmas a fragmentos radiculares periodontalmente comprometidos.

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, conforme descrito neste estudo resumidamente e com maior detalhamento anteriormente (Valdivia 2013).

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 do tecido presente em alvéolos em cicatrização foram anteriormente investigadas (Evian et al. 1982; Amler, 1984; Passanezi et al. 1989; Cardaropoli et al., 2003, 2005; Penteado et al. 2005), observando-se que expressam colágeno tipo I, sialoproteína óssea e osteonectina (Penteado et al. 2005), sugerindo seu fenótipo compatível com células de origem osteoblástica (Evian et al., 1982).

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, sendo necessária sua caracterização *in vitro*. Observou-se que as células cultivadas apresentam características proliferativas semelhante a células osteoblásticas, de crescimento mais lento do que fibroblastos gengivais e semelhante ao observado com fibroblastos de ligamento periodontal (Wikesjö et al. 1991; Wang et al. 1994; Sant'Ana et al. 2002). Adicionalmente, as células GO apresentaram atividade de fosfatase alcalina em meio

osteogênico e em meio convencional, e sintetizaram nódulos mineralizados *in vitro*, complementando achados anteriores (Penteado et al. 2005).

Aproximadamente 75% do alvéolo é preenchido por novo osso depois de 40 dias e 100% depois de 10 semanas (Evian et al. 1982). Nos 3 primeiros dias após a exodontia, o alvéolo é preenchido quase que completamente por coágulo. A partir de então, passa a ser substituído por matriz orgânica e osso imaturo (14 dias) até que 88% do volume do alvéolo é ocupado por tecido ósseo mineralizado aos 30 dias, quando passa então a ser remodelado (Cardaropoli et al. 2003).

Alvéolos de extração com e sem preservação do ligamento periodontal apresentam características de reparação praticamente idênticas. A despeito do selamento do alvéolo por ponte de tecido duro, os alvéolos de extração e cirurgicamente criados apresentam diferenças importantes no tecido localizado apicalmente à ponte. Enquanto os alvéolos de extração apresentaram tecido ósseo maduro formado por osso lamelar, os alvéolos criados cirurgicamente apresentaram a formação de tecido mineralizado e tecido ósseo imaturo que ocupou aproximadamente 70% do volume ósseo, com menor quantidade de medula óssea (Cardaropoli et al. 2005). Essas diferenças, entretanto, desaparecem com o passar do tempo (Frost 1983, 1989; Araújo et al. 1999; Stavropolous et al. 2001; Cardaropoli et al. 2005).

Algumas diferenças também podem ser observadas no tecido presente em alvéolos de extração de dentes saudáveis e periodontalmente doentes, os quais apresentaram, entre 2-42 semanas de acompanhamento, ocupação de grande parte do alvéolo por tecido conjuntivo nas quatro primeiras semanas após a exodontia, sendo que a área de novo osso foi proporcionalmente maior do que a de tecido conjuntivo depois de 14 semanas. Por outro lado, o grupo controle (dentes extraídos por razões não periodontais) apresentou cicatrização completa após 10 semanas, sem formação adicional de osso depois de 20 semanas (Ahn, Shin 2008). Portanto, neste estudo, optou-se pelo estabelecimento de cultura primária de células obtidas a partir do tecido em cicatrização presente em alvéolos cirurgicamente criados.

Esses achados justificaram o emprego da técnica de enxerto ósseo em neoformação para a regeneração dos tecidos periodontais utilizando a matriz óssea

presente em alvéolos de extração ou alvéolos cirurgicamente criados, 21-25 dias após sua confecção, observando-se histologicamente regeneração dos tecidos periodontais e clinicamente o fechamento dos defeitos (Passanezi et al. 1989). Mais recentemente, a técnica foi usada para o recobrimento de raízes apresentando recessões profundas e amplas, 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; Sant'Ana et al. 2012).

Estudos *in vitro* 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 constante, 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. 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 (Freshney 2010).

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 e, posteriormente, na 12ª passagem, observando-se diferenças nas propriedades proliferativas entre ambas, sugerindo a homogeneização da cultura por células fenotipicamente mais diferenciadas.

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 (Groeneveld et al. 1993; Lekic et al. 1996, 2001; Nohutcu et al. 1997; Kuru et al. 1999; Ivanovski et al. 2001; Sant'Ana et al. 2002; Murakami et al. 2003; Hiraga et al. 2009).

Alguns estudos identificaram a expressão *in vitro* de tecido semelhante a osso por células derivadas de tecido ósseo (Ecarot-Charrier et al. 1983; Sudo et al. 1983; Whitson et al. 1984; 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. 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*.

Populações de células osteoprogenitoras derivadas de calvária de ratos presentes em suspensões celulares simples formaram discretos nódulos tridimensionais de osso mineralizado quando cultivados na presença de ácido ascórbico e beta-glicerofosfato. Essas células (CFU-O) constituíram menos de 1% da população total de células sob condições normais de cultura e seu número aumentou na presença de dexametasona (Bellows et al. 1986). Conforme aumenta o número de passagens, na ausência de dexametasona, observa-se crescente diminuição no número de nódulos mineralizados produzidos, enquanto que, na presença de dexametasona, observa-se aumento do tamanho e do número de nódulos formados

(de 2x no controle até 4.5x na presença de 10nM de dexametasona). Os nódulos mineralizados estavam presentes até a 18ª passagem. Esses achados sugeriram que a dexametasona estimulou a proliferação de células osteoprogenitoras e que essas tiveram capacidade limitada de gerar células-filha capazes de expressar o fenótipo ósseo (Bellows et al. 1990).

Interessantemente, neste estudo, houve 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, com ausência de formação em 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. Para identificar se as células cultivadas expressam marcadores de células tronco, foram utilizados alguns marcadores em amostras frescas de tecido de granulação óssea, observando-se que as mesmas não expressaram marcadores de células-tronco hematopoiéticas (CD-34, CD146 e MUC-18+), conforme esperado. A análise por meio de citometria de fluxo realizada nas células na 14ª passagem mostrou que as células GO expressaram pequenos níveis de CD45+CD34+ e CD45+COLL1+, inferiores às células de linhagem fibroblástica utilizadas como controle (gengivais- FGH; de ligamento periodontal- FLP e gengivais obtidas de pacientes com síndrome de Down- FSD).

Os requerimentos mínimos para uma população de células ser classificada como células tronco mesenquimais são: (1) isolamento a partir de células mononucleares com base em sua aderência seletiva, em cultura, à superfície do plástico; (2) expressão de CD105, CD73 e CD90; (3) expressão negativa de CD34, CD45, CD44, CD11b, CD79 ou CD19 e HLA-DR ou expressão em menos de 5% das células na cultura; (4) diferenciação em osso, gordura e cartilagem (International

Society for Cellular Therapy Position Statement, 2005; Dominici et al. 2006). Os resultados do nosso estudo demonstraram expressão de pequenos níveis de CD34, CD45 e colágeno tipo 1 das células cultivadas. Além disso, as células GO apresentaram aderência ao plástico e características morfológicas e proliferativas semelhante a osteoblastos. Por outro lado, as células GO não expressaram CD105 e CD166, o que pode sugerir que, nesta passagem, as células apresentaram maior nível de diferenciação fenotípica.

As células tronco mesenquimais apresentam formato semelhante a fibroblastos: são fusiformes, apresentam um *lag* inicial e depois iniciam seu crescimento, formando inicialmente “colônias formadoras de unidade de fibroblastos – CFU-F”. Embora não sejam imortais, tem a capacidade de se expandir numerosas vezes em cultura, mantendo seu potencial de crescimento e pluripotencialidade, com tempo de duplicação dependente do doador do qual as células foram obtidas e da densidade do plaqueamento inicial. Apresentam inibição do crescimento ao atingir a confluência. Observa-se características de senescência quando derivadas de seres humanos depois da 12^a – 15^a passagem, levando à diminuição das taxas de proliferação celular e perda progressiva da multipotencialidade (Dominici et al. 2006; Bydlowski et al. 2009). Todas essas características foram observadas em nosso estudo, o que pode sugerir a presença de células tronco mesenquimais no tecido de granulação óssea, após a cultura tecidual.

CD34 é uma glicoproteína transmembrana expressa em todas as células progenitoras hematopoiéticas, endoteliais, fibroblastos embrionários e algumas células do tecido nervoso fetal e adulto. Cerca de 1% das células da medula óssea expressam o antígeno CD34. No sangue periférico, representa cerca de 0,05% do total de células mononucleares e, no sangue do cordão umbilical, varia entre 0.30 e 20%. Ocorre diminuição na expressão de CD34 nos capilares oculares em doadores de córnea mais idosos, podendo indicar perda na expressão da molécula dependente da idade (Sohn et al. 2014).

CD45 é um marcador expresso na superfície de todos os tipos de leucócitos. CD 105 (endoglina) é um marcador angiogênico e o CD166, também conhecido como Mel-CAM, MUC18, antígeno A32 é usado como marcador de células de linhagem

endotelial, não tendo sido expresso pelas células GO em cultura nem nas amostras frescas de tecido de granulação.

Diferentemente de células-tronco embrionárias e hematopoiéticas, não existe um marcador de superfície específico para as células-tronco mesenquimais, embora um grupo de epítomos esteja associado com células características de células tronco mesenquimais (CTMs), como expressão positiva de STRO-1, CD73, CD146 e CD106 e negativa para CD11b, CD45, CD34, CD31 e CD117 (Kolf et al. 2007; Khun et al. 2010; Tuan et al. 2011).

Sob condições apropriadas, as CTMs sofrem discreto processo de diferenciação em cultura, incluindo suplementação do meio com B-glicerofosfato (como realizado neste estudo), 1,25-dihidroxivitamina D3 e/ou BMPs. Esse processo é caracterizado pela expressão de marcadores específicos ou associados a osteoblastos, incluindo níveis elevados de Runx2, colágeno tipo I, fosfatase alcalina, sialoproteína óssea, osteopontina e osteocalcina (Tuan et al. 2011). Esses dados corroboram os achados do presente estudo, que demonstraram expressão de colágeno tipo I e atividade de fosfatase alcalina, além do estudo de Penteado et al. (2005), os quais identificaram expressão de colágeno tipo I, sialoproteína óssea, osteocalcina e atividade de fosfatase alcalina em amostras de tecido de granulação óssea, o que pode sugerir a presença CTMs, especialmente no tecido fresco obtido do alvéolo em cicatrização.

CTMs derivadas de osso alveolar removido de pacientes durante extração de dentes inclusos mostraram expansão em proporção de aproximadamente 70%. A taxa de sucesso diminuiu com o aumento da idade, provavelmente devido à diminuição do número e a capacidade proliferativa de CTMs de osso alveolar. Essas células se diferenciaram em osteoblastos sob condições osteogênicas em 21-28 dias (Matsubara et al. 2005). Em nosso estudo, observou-se expressão máxima de atividade de fosfatase alcalina após 7 dias e de mineralização após 14 dias. Neste período, os níveis de mRNA de osteocalcina, osteopontina e sialoproteína, em conjunto com os níveis de cálcio, foram semelhantes àqueles presentes na crista do íliaco. Por outro lado, diferentemente de CTMs derivadas da crista do íliaco, as CTMs alveolar mostraram pobre potencial condrogênico ou adipogênico (Matsubara et al. 2005).

Outra característica de CTMs em diferenciação osteoblástica é a mudança do fenótipo celular de formato fibroblástico para formato do tipo trapezoidal, compatível com células osteoblásticas, com subsequente mineralização da matriz (Tuan et al. 2011), o que também foi observado em nosso estudo.

Estudo in vitro de células derivadas de células tronco obtidas de osso trabecular humano por meio de uso de collagenase identificou a presença de CD73, STRO-1, CD105 e ausência de CD34, CD45 e CD144. Essas células, quando cultivadas da forma proposta, se caracterizam por fenótipo indiferenciado estável e pela capacidade de extensa proliferação enquanto ainda mantém o potencial de se diferenciar em células osteoblásticas, adipócitos e condrócitos (Tuli et al. 2003). Matrizes ósseas alógenas contendo células tronco disponíveis comercialmente no mercado norte-americano mostraram marcação positiva para CD105 e CD166 e negativa para CD166, características consideradas como compatíveis com CTMs (McAllister et al. 2009, 2011).

As células GO apresentaram algumas características compatíveis com a existência de células tronco (International Society of Stem Cell Therapy, 2005), tais como aderência ao plástico, perda das características de proliferação com o aumento do número de passagens, expressão negativa ou <5% das células dos anticorpos CD34, CD45 e MUC-18. No entanto, as células GO não apresentaram outras características essenciais das CTM, como marcação positiva para CD90 e CD105 (Tuli et al. 2003; International Society of Stem Cell Therapy 2005; Kolf et al. 2007; Bydlowski et al. 2009; Kuhn et al. 2010; Tuan et al. 2011), devendo-se novamente ressaltar que, entretanto, não foram cultivadas com meio de cultura para células tronco mesenquimais (Freshney 2010).

O PDGF é um fator de crescimento derivado de plaquetas que existe sob três isoformas diferentes: -AA, -AB e -BB, baseado em receptores de afinidade presentes nas superfícies de células-alvo (Sant'Ana et al. 2007). No ligamento periodontal de ratos, foram identificados receptores α e β , permitindo a ligação de afinidade do ligamento periodontal com as diferentes isoformas de PDGF (Cho et al. 1994). Dentre estas, observou-se maior resposta mitogênica sobre células do ligamento periodontal com o PDGF-BB, seguido do PDGF-AB e PDGF-AA, com resposta máxima obtida a 10 ng/ml (Boyan et al. 1994). Nessa concentração, em modelo de ferida cirúrgica

criado *in vitro*, observou-se maior proliferação de células do ligamento periodontal e fechamento do defeito criado no prato de cultura, com fechamento mais rápido da área do defeito (Bartold, Raben 1996; Mumford et al. 2001).

Diversos estudos investigaram os efeitos do PDG-BB sobre fibroblastos gengivais e de ligamento periodontal *in vitro*, observando-se diferentes respostas dependendo do tipo celular investigado, concentração e tempo de avaliação (Gamal, Mailhot 2000; Ojima et al. 2003).

Diferentes concentrações de PDGF-BB foram testadas nos diferentes estudos. Concentrações de 5, 10, 20, 50, 100, 200 e 300ng/ml foram testadas para investigar a adesão de fibroblastos de ligamento periodontal sobre raízes de dentes extraídos por razões periodontais. O pré-tratamento das superfícies dentinárias com PDGF-BB nas concentrações de 5, 10 e 20 ng/ml não resultou em adesão de células superior ao controle tratado apenas por raspagem. Porém, em concentrações de 50, 100, 200 e 300 ng/ml, observou-se aumento significativo de fibroblastos aderidos à superfície em comparação com o controle doente tratado por raspagem, sem alteração da morfologia celular. A concentração de 50ng/ml foi considerada como ótima sobre essas células devido à inexistência de diferenças significantes no número de células aderidas com as diferentes concentrações (Gamal, Mailhot 2000).

Segundo Ojima et al. (2003), a proliferação de células do ligamento periodontal estimulada pelo PDGF-BB ocorre de forma tempo- e dose-dependente, com efeito máximo observado a 10 ng/ml. Por outro lado, o efeito máximo na taxa de síntese de colágeno foi observado depois de 24hs, a 1 ng/ml, sugerindo efeitos inversos dose-dependentes na proliferação e síntese de proteína por células do ligamento periodontal (Ojima et al. 2003). A taxa de proliferação de células do ligamento periodontal foi significativamente maior do que o controle negativo após 3 e 5 dias quando estimulada por PDGF-BB na concentração de 50 ng/ml ou TGF- β 1 na concentração de 10 ng/ml. O PDGF-BB estimulou a proliferação de células do ligamento periodontal em taxas inferiores àsquelas observadas para o TGF- β 1 aos 3 dias de cultura e à combinação de PDGF-BB, TGF- β 1 e IGF-1 aos 7 dias de cultura. Porém, aos 5 dias de cultura, o PDGF-BB apresentou maior efeito proliferativo do que os demais fatores de crescimento, porém sem diferenças estatisticamente significantes (Sant'Ana et al. 2007). Isso sugere que a adição de PDGF-BB prolonga

o efeito mitogênico sobre as células do ligamento periodontal, retardando o início da fase de síntese proteica. As células do ligamento periodontal entram na fase de síntese proteica aproximadamente do 2º ao 4º dia, quando se observa diminuição sua taxa proliferativa (Wikesjö et al. 1986; Wang et al. 1994).

A presença de células viáveis baseada na análise de atividade mitocondrial por meio do teste MTT realizada após a adição do PDGF-BB à cultura de células GO foi semelhante ao padrão observado no tratamento de raízes periodontalmente doentes tratadas por meio de raspagem e alisamento radicular e adição de PDGF-BB na concentração de 50 ng/ml associado ou não ao uso de laser de Er:YAG a 60 mJ/pulso mostrou padrão de crescimento celular semelhante, com pico proliferativo observado após 3 dias (Belal et al. 2007). Nesta concentração, o PDGF-BB aplicado sobre raízes periodontalmente doentes tratadas por meio de raspagem resultou em aumento significativo do número de fibroblastos de ligamento periodontal aderidos (Belal et al. 2006; Chowdary et al. 2013).

O tratamento de superfícies radiculares tratadas por meio da aplicação de EDTA 24% 2-3 minutos seguida ou não de PDGF-BB na concentração de 25 ng/ml resultou em maior número de células de ligamento periodontal aderidas do que o tratamento realizado apenas por meio de raspagem ou da aplicação de EDTA 24%, porém não foi mais significativamente mais efetivo do que o uso do PDGF-BB sozinho (Belal et al. 2012), indicando que o PDGF é capaz de reverter os efeitos negativos das endotoxinas na proliferação de fibroblastos (Bartold et al. 1992).

Os efeitos mitogênicos do 10 ng/ml de PDGF-BB sobre fibroblastos de ligamento periodontal cultivados com DFDBA, osso medular (DFBA) e FBA foram investigados *in vitro*, não se observando, nesta concentração, diferenças significantes entre os grupos tratados apenas pelos aloenxertos. Adicionalmente, não houve estímulo à atividade mitogênica estimulada apenas para o PDGF-BB (Papadopoulos et al. 2003).

Poucos estudos investigaram os efeitos do PDGF-BB sobre linhagens de células osteogênicas *in vitro*. Células osteoblásticas neonatais de ratos foram cultivadas com matriz de osso bovino inorgânico adsorvidas com PDGF-BB favoreceu de forma significativa a proliferação celular comparativamente à matriz mineralizada,

com liberação de aproximadamente 50% do PDGF após 10 dias, embora o mesmo efeito não tenha sido observado com IGF-I, sugerindo que o PDGF-BB estimula as propriedades osteogênicas do osso bovino inorgânico (Jiang et al. 1999). Resultados semelhantes foram observados em outro estudo que investigou a interação entre PDGF-BB e matriz de osso bovino inorgânico, demonstrando-se a liberação de 30% do PDGF-BB incorporado em 10 dias. Houve também estímulo à proliferação de células osteoblásticas em cultura, quando comparado com a matriz inorgânica apenas (Stephan et al. 2000)

O tratamento de matrizes de fosfato tricálcico (B-TCP) e sulfato de cálcio (CaSO₄) com PDGF-BB resultou em adsorção concentração- e tempo-dependentes para as matrizes B-TCP, com liberação ativa de aproximadamente 45% da substância depois de 10 dias. A liberação in vivo da substância, porém, ocorre mais rapidamente do que a liberação in vitro. A incubação de células osteoblásticas obtidas a partir de biópsias removidas durante cirurgia de extração de 3º molares inclusos, com as matrizes tratadas por PDGF-BB resultou em maior proliferação de células comparativamente à incubação com matrizes não tratadas por PDGF-BB, o que demonstra os efeitos mitogênicos exercidos sobre células ósseas, conforme observado no presente estudo. A linhagem celular cultivada foi caracterizada como sendo de linhagem osteoblástica pela expressão de altos níveis de atividade de fosfatase alcalina, a qual foi ainda mais estimulada pela adição de 1,25-dihidroxitamina D3 ao meio de cultura e síntese de osteocalcina, marcador específico de osteoblastos (Bateman et al. 2005). Em nosso estudo, características semelhantes foram observadas com as células GO, sugerindo sua linhagem osteoblástica.

No presente estudo, a adição de PDGF-BB na concentração de 300 ng/ml resultou em aumento da taxa proliferativa de células osteoblásticas, as quais atingiram um platô ao redor de 3-5 dias, voltando a aumentar no 7º dia. A análise do padrão de crescimento das células osteoblásticas sem o estímulo do PDGF-BB mostrou que o platô na taxa de crescimento foi alcançado no período de 5-7 dias, o que indicaria que o PDGF-BB acelerou o processo mitogênico das células osteoblásticas.

A resposta celular à adição de PDGF-BB é dependente de sua origem: enquanto CTMs responderam negativamente ou não responderam ao tratamento por

PDGF-BB, células tronco adipocíticas exibiram atividade de mineralização em resposta a concentrações fisiológicas de PDGF-BB. CTMs derivadas da medula óssea e células derivadas de adipócitos (ASCs) cultivadas sob condições osteogênicas idênticas responderam de forma distinta à adição de PDGF-BB na concentração de 20ng/ml, não se observando atividade de mineralização aumentada em CTMs, enquanto as ASCs produziram maiores níveis de cálcio. Adicionalmente, as MSCs geralmente diminuíram a expressão de genes osteogênicos em resposta à adição de PDGF-BB, enquanto as ASCs aumentaram a expressão de genes osteogênicos. ASCs programadas para produzir PDGF-BB resultaram em maior quantidade de osso regenerado em defeitos de tamanho crítico produzidos em calvaria de roedores (Hung et al. 2015). Essa resposta negativa ou ausente de CTMs derivadas de osso medular poderia estar relacionada com a concentração do fator de crescimento, sendo importante testar, *in vitro*, os efeitos de diferentes concentrações da substância nas células de linhagem osteoblástica. Conforme observado neste estudo, observou-se aumento significativo na mitogênese e na adesão de células GO ao substrato estimulada por alta concentração de PDGF-BB. Vale ressaltar, entretanto, que alguns espécimes apresentaram modificação da morfologia celular comparativamente ao grupo, o que deve ser ainda melhor investigado, assim como atividade de mineralização e síntese de matriz proteica após o estímulo com PDGF-BB.

O presente estudo foi o primeiro a estabelecer linhagem primária de células derivadas da granulação óssea humana e o primeiro a investigar os efeitos mitogênicos e de adesão dessas células a fragmentos radiculares. Pode-se observar que as células cultivadas em meio DMEM suplementado com soro bovino fetal e solução antibiótica e antimicótica apresentam aderência ao plástico e taxa proliferativa compatível com células de linhagem osteogênica, com modificação das características de crescimento com o aumento do número de passagens realizadas. Sabe-se que o tecido presente em alvéolos cirurgicamente criados contém grande quantidade de osso imaturo (Cardaropoli et al. 2005), com grande capacidade osteogênica (Evian et al. 1982). Conforme previamente evidenciado em estudos histológico (Passanezi et al. 1989) e clínicos (Passanezi et al. 1989, Ferraz 2009; Sant'Ana et al. 2012; Ferraz 2013), a técnica do enxerto ósseo em neoformação (granulação óssea) resulta em regeneração dos tecidos periodontais, com formação de novo osso, cemento e ligamento (conforme evidenciado em cães), fechamento

clínico de defeitos periodontais infra-ósseos, ganho de inserção, redução de defeitos de recessão gengival e aceleração da osteogênese em procedimentos de levantamento de seio maxilar.

Os resultados sugerem que a adição de PDGF-BB em altas concentrações favorece a atividade mitogênica e a adesão à fragmentos radiculares obtidos de dentes com doença periodontal avançada, sem alterar significativamente a morfologia celular. Outros estudos são necessários para investigar o comportamento celular com diferentes concentrações da substância, determinando sua concentração ótima para investigação *in vitro* de eventos celulares básicos necessários à reconstituição dos tecidos periodontais *in vivo*.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Dentro da metodologia empregada neste estudo, pode-se concluir que:

- A linhagem primária de células GO apresenta características de linhagens osteoblásticas (taxa de proliferação, expressão de atividade de fosfatase alcalina e atividade de mineralização);
 - Não há evidências conclusivas da existência de células tronco mesenquimais presentes nas células GO cultivadas em passagens mais avançadas ($> 10^4$), sendo necessário outros estudos para melhor investigação da existência de CTMs na granulação óssea *in vivo* e *in vitro*, sob condições de cultura mais específicas;
 - A adição de rhPDGF-BB na concentração de 300ng/ml estimula a mitogênese e favorece a adesão de células osteoblásticas a superfícies radiculares periodontalmente comprometidas previamente tratadas por meio de raspagem e alisamento radicular e condicionamento com solução de EDTA 24% durante 3 minutos.
-
-

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(6):1133-8.

Al-Hazmi BA, Al-Hamdan KS, Al-Rasheed A, Babay N, Wang H-L, Al-Hezaimi K. Efficacy of using PDGF and xenograft with or without collagen membrane for bone regeneration around immediate implants with induced dehiscence-type defects: a microcomputed tomographic study in dogs. *J Periodontol.* 2013; 84(3):371-8.

Amler MH, Johnson PL, Salman I. Histological and histochemical investigation of human alveolar socket healing in undisturbed extraction wounds. *J Am Dent Assoc.* 1960; 61(1): 32–44.

Amler MH, Johnson PL. Transference of osteogenic tissue to the anterior eye chamber by means of polyvinyl plastic sponge grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1961; 14(7): 868-76.

Amler MH. The lag phase factor in bone healing and suggested application to marrow grafting. *J Periodontal Res.* 1981; 16(6):617-27.

Amler MH. The effectiveness of regenerating versus mature marrow in physiologic autogenous transplants. *J Periodontol.* 1984; 55(5):268-72.

Amler MH. Age factor in human alveolar bone repair. *J Oral Implantol* 1993; 19(2):138-42.

Anderson T.J. et al. Effects of transforming growth factor- β and platelet-derived growth factor on human gingival fibroblast grown in serum-containing and serum-free medium. *J. Clin. Periodont*, v.25, n.1, p.48-55, Jan.1998.

Anitua E. Plasma rich in growth factors: Preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1999; 14(4):529-35.

Araújo MG, Berglundh T, Albrektsson T, Lindhe J. Bone formation in furcation defects. An experimental study in the dog. *J Clin Periodontol.* 1999; 26(10):643-52.

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;310(5979): 655-60.

Barros JP. Efeitos do condicionamento ácido na descontaminação da superfície radicular e no recobrimento radicular: análise em MEV e estudo clínico randomizado. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Odontologia de Bauru – USP. Bauru, 2013. 152p.

Bartold PM; Narayanan AS, Page RC. Platelet-derived growth factor reduces the inhibitory effects of lipopolysaccharide on gingival fibroblast proliferation. *J. Periodontal Res*. 1992; 27(5):499-505.

Bartold PM, Raben A. Growth factor modulation of fibroblast in simulated wound healing. *J Periodontal Res*. 1996; 31(3): 205-16,

Bateman J, Intini G, Margarone III J, Goodloe III S, Bush P, Lynch SE, Dziak R. Platelet derived growth factor enhancement of two alloplastic bone matrices. *J Periodontol* 2005; 76(11): 1833-41.

Belal MH, Watanabe H, Ichinose S, Ishikawa I. A time-dependent effect of PDGF-BB on adhesion and growth of cultured fibroblast to root surfaces. *Oral Dis*. 2006;12(6): 543-52.

Belal MH, Watanabe H, Ichinose S, Ishikawa I. Effect of Er: YAG Laser combined with rhPDGF-BB on attachment of cultured fibroblasts to periodontally involved root surfaces. *J Periodontol*. 2007; 78(7): 1329-41.

Belal MH, Watanabe H, Ichinose S, Ishikawa I. Effect of PDGF-BB combined with EDTA gel on adhesion and proliferation to the root surface. *Odontology*. 2012; 100(2): 206-14.

Bellows CG, Aubin JE, Heersche JNM, Antosz ME. Mineralized bone nodules formed in vitro from enzymatically released rat calvaria cell population *Calcif Tissue Int*. 1986; 38(3):143-54.

Bellows CG, Heersche JNM, Aubin JE. Determination of the capacity for proliferation and differentiation of osteoprogenitor cells in the presence and absence of dexamethasone. *Dev Biol*. 1990; 140(1):132-8.

Boyan L.A. et al. Mitogenic and chemotactic responses of human periodontal ligament cells to the different isoforms of platelet-derived growth-factor. *J. dent. Res.*, v.73, n.10, p.1593-600, Oct.1994.

Bydlowski SP, Debes AA, Maselli LMF, Janz FL. Características biológicas das células tronco mesenquimais. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2009; 31(Supl 1):25-35.

Caba-Paulino CE. Efeito do protocolo de desmineralização por ácido cítrico na área de superfície radicular recoberta por fibroblastos do ligamento periodontal humano. Estudo à microscopia eletrônica de varredura. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo. Bauru, 2014. 95p.

Caffesse RG; Quiñones CR. Polypeptide growth factors an attachment proteins in periodontal wound healing and regeneration. *Periodontology* 2000 1993; 1(1):.69-79.

Camelo M, Nevins ML, Schenk RK, Lynch SE, Nevins M. Periodontal regeneration in human class II furcations using purified recombinant human platelet-derived growth factor-BB (rhPDGF-BB) with bone allograft. *Int J Periodontics Rest Dent.* 2003; 23(3): 213-25.

Canalis E, Centrella M, Burch W, McCarthy TL. Insulin-like growth factor I mediates selective anabolic effects of parathyroid hormone in bone cultures. *J Clin Invest.* 1989; 83(1):60–5.

Cardaropoli G, Araújo M, Lindhe J. Dynamics of bone tissue formation in tooth extraction sites. *J Clin Periodontol.* 2003; 30(9):809–18.

Cardaropoli G, Araújo M, Hayacibara R, Sukekava F, Lindhe J. Healing of extraction sockets and surgically produced - augmented and non-augmented - defects in the alveolar ridge. An experimental study in the dog. *J Clin Periodontol.* 2005; 32(5):435-40.

Carney CM, Rossman JA, Kerns DG, Cipher DJ, Rees TD, Solomon ES, et al. A comparative study of root defect coverage using an acellular dermal matrix with and without a recombinant human platelet derived growth factor. *J Periodontol.* 2012; 83(7):893-901.

Chang P.C, Dovban A.S, Lim L.P, Chong L.Y, Kuo M.Y, Wang C.H. Dual delivery of PDGF and simvastatin to accelerate periodontal regeneration in vivo. *Biomaterials* 2013; 34(38):9990-7.

Cho MI. Differential regulation of periodontal ligament cell activities by platelet-derived growth factor, insulin-like growth factor I and epidermal growth factor. In: Genco R. et al. *Molecular pathogenesis of periodontal disease.* Washington: ASM, 1994. p. 403-14.

Cho MI, Lin WL, Genco RJ. Platelet-derived growth factor-modulated guided tissue regenerative therapy. *J Periodontol* 1995; 66(6):522-30.

Chong CH, Carnes DL, Moritz AJ, Oates T, Ryu OH, Simmer J, Cochran DL. Human periodontal fibroblast response to enamel matrix derivative, amelogenin and platelet-derived growth factor-BB. *J Periodontol*. 2006, 77(7):1242-52.

Chong LY, Chien LY, Chung MC, Liang K, Lim JC, Fu JH, Wang CH, Chang PC. Controlling the proliferation and differentiation stages to initiate periodontal regeneration. *Connect Tissue Res*. 2013; 54(2):101-7.

Chowdhary KY, George JP, Gowda P, Rao JA. Human periodontal ligament fibroblast response to rhPDGF-BB application on periodontally diseased root surfaces in vitro. *Growth Factors* 2013; 31(4):130-8.

Cooke JW, Sarment DP, Whitesman LA, Miller SE, Jin Q, Lynch SE, Giannobile WN. Effect of rhPDGF-BB delivery on mediators of periodontal wound repair. *Tissue Eng*. 2006; 12(6):1441-50.

Dennison D. K. et al. Differential effect of TGF- β 1 and PDGF on proliferation of periodontal ligament cells and gingival fibroblasts. *J. Periodont.*, v.65, n.7, p.641-8, July 1994.

Deshpande A, Koudale SB, Bhongade ML. A comparative evaluation of rhPDGF-BB + b-TCP and subepithelial connective tissue graft for the treatment of multiple gingival recession defects in humans. *Int J Periodontics Rest Dent*. 2014; v.34(2): 241-9.

Devlin H, Sloan P. Early bone healing events in the human extraction socket. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2002, v.31, p.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(5):828-38.

Dominici MLBK, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8(4):315- 7.

Ecarot-Charrier B, Glorieux FH, Van der Rest M, Pereira G. Osteoblasts isolated from mouse calvaria initiate matrix mineralization in culture. *J Cell Biol*. 1983; 96(3): 639-43.

Evian CI, Rosenberg ES, Coslet JG, Corn H. The osteogenic activity of bone removed from healing extraction sockets in humans. *J Periodontol.* 1982; 53(2):81-85.

Ferraz BFR. Levantamento de seio maxilar com enxerto ósseo em neoformação associado a osso bovino inorgânico: avaliação clínica, histológica e histomorfométrica. Tese (Doutorado). Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo. Bauru, 2013. 175p.

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.

Friedensten AJ, Chailakhyan RK, Gerasimov UV. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tissue Kinet* 1987; 20(3):263-72.

Frost HM. The biology of fracture healing. An overview for clinicians. Part I. *Clin Orthop Relat Res.* 1989; 248:283-293. (a)

Frost HM. The biology of fracture healing. An overview for clinicians. Part II. *Clinical Orthop Relat Res.* 1989; 248:294-309. (b)

Frost HM. The regional acceleratory phenomenon: a review. *Henry Ford Hospital Medical Journal* 1983; 31(1):3-9.

Funato A, Ishikawa T, Kitajima H, Yamada M, Moroi H. A novel combined surgical approach to vertical alveolar ridge augmentation with titanium mesh, resorbable membrane, and rhPDGF-BB: a retrospective consecutive case series. *Int J Periodontics Rest Dent.* 2013;33(4):437-45.

Gamal AY, Mailhot JM, Garnick JJ, Newhouse R, Sharawy MM. Human Periodontal ligament fibroblast response to PDGF-BB and IGF-1 application on tetracycline HCl conditioned root surfaces. *J Clin Periodontol.* 1998;25(5):404-12.

Gamal A.Y., Mailhot JM. The effect of local delivery of PDGF-BB on attachment of human periodontal ligament fibroblasts to periodontitis-affected root surfaces--in vitro. *J Clin Periodontol.* 2000; 27(5):347-53.

Garret S. Early wound healing stability and its importance in periodontal regeneration. In: Polso A. M. Periodontal regeneration: current status and concepts. Chicago:Quintessence, 1994. p.41-52.

Giannobile WV, Finkelman RD, Lynch SE. Comparison of canine and non-human primate animal models for periodontal regenerative therapy: results following a single administration of PDGF/IGF-I. J Periodontol 1994; 65(12):1158-68.

Giannobile WV, Hernandez RA, Finkelman RD, Ryan S, Kiritsy CP, D'Andrea M, Lynch SE. Comparative effects of platelet-derived growth factor- BB and insulin-like growth factor-I, individually and in combination, on regeneration in Macaca Fascicularis. J Periodontal Res. 1996; 31(5): 301-12.

Gottlow J. Principles of regenerative therapy. In; Genco R. J. et al (eds). Molecular pathogenesis of Periodontal Disease. Washington: ASM Press, 1994. Cap. 31. p. 393-402.

Graves D.T.; Cochran D.L. Periodontal regeneration with polypeptide growth factors. In: Williams R. C.; Yukna, R.A.; Newman M.G. Current opinion Periodontology. 2 ed. Philadelphia: Current Science, 1994. Cap. 18, p.178-86.

Green RJ, Usui ML, Hart CE, Ammons WF, Narayanan AS. Immunolocalization of platelet-derived growth factors A and B chains and PDGF- α and β receptors in gingival wounds. J Periodontal Res. 1997; 32(2):209-14.

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):1344-50.

Halliday DG. The grafting of newly formed autogenous bone in the treatment of osseous defects. J Periodontol. 1969; 40(9):511-14.

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.

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(2):149-57.

Howell TH, Fiorellini JP, Paquette DW, Offenbacher S, Giannobile WV, Lynch SE. A phase I/II clinical trial to evaluate a combination of recombinant human platelet-

derived growth factor-BB and recombinant human insulin-like growth factor-I in patients with periodontal disease. *J Periodontol.* 1997; 68(12):1186-93.

Hung BP, Hutton DL, Kozielski KL, Bishop CJ, Naved B, Green JJ, Caplan AI, Gimble JM, Dorafshar AH, Grayson WL. Platelet-Derived Growth Factor BB Enhances Osteogenesis of Adipose-Derived But Not Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal/Stem Cells. *Stem Cells.* 2015; 33(9):2773-84.

Irokawa D, Ota M, Yamamoto S, Shibukawa Y, Yamada S. Effect of β tricalcium phosphate particle size on recombinant human platelet-derived growth factor-BB-induced regeneration of periodontal tissue in dog. *Dent Mat J* 2010; 29(6): 721-30.

Ivanovski S, Haase HR, Bartold PM. Isolation and characterization of fibroblasts derived from regenerating human periodontal defects. *Arch Oral Biol.* 2001; 46(8): 688-97.

Jayakumar A, Rajababu P, Ronini S, Butchi Babu K, Naveen A, et al. Multicentre randomized clinical trial on efficacy and safety of recombinant human platelet derived growth factor with b-tricalcium phosphate in human intra-osseous periodontal defects. *J Clin Periodontol* 2010; 38(2):163–72.

Jiang D, Dziak R, Lynch SE, Stephan EB. Modification of an osteoconductive anorganic bovine bone mineral matrix with growth factors. *J Periodontol.* 1999; 70(8): 834-9.

Kämmerer P.W, Palarie V, Schiegnitz E, Nacu V, Draenert F.G, Al-Nawas B. Influence of a collagen membrane and recombinant platelet-derived growth factor on vertical bone augmentation in implant-fixed deproteinized bovine bone – animal pilot study. *Clin Oral Impl Res.* 2013; 24(11):1222–30.

Kohler N.; Lipton A. Platelets as a source of fibroblasts growth-promoting activity. *Exp. Cell. Res.*, v.87, p. 297-301, 1974 *apud* Boyan et al., 1994. p. 1593.

Kolf CM, Cho E, Tuan RS. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res Ther.* 2007; 9(1):204.

Kuhn EN, Wu SM. Origin of cardiac progenitor cells in the developing and postnatal heart. *J Cell Physiol.* 2010; 225(2):321-5.

Kuru L, Griffiths GS, Petrie A, Olsen I. Alkaline phosphatase activity is upregulated in regenerating human periodontal cells. *J Periodontal Res.* 1999; 34(2):123-7.

Lee J., Staupoulos A., Susin C., Vif M. E Wikesjo. Periodontal Regeneration: Focus on Growth and Differentiation Factors. *Dent Clin North Am.* 2010; 54(1):93-111.

Lee Y.M, Park Y.J, Lee S.J, Ku Y, Han S.B, Klokkevold PR, Chung CP. The bone regenerative effect of platelet-derived growth factor-BB delivered with a chitosan/tricalcium phosphate sponge carrier. *J Periodontol* 2000; 71(3):418–24.

Lekic P, Sodek J, McCulloch CAG. Osteopontin and bone sialoprotein expression in regenerating rat periodontal ligament and alveolar bone. *Anat Rec* 1996; 244(1):50-8.

Lekic PC, Rajshankar D, Chen H, Tenenbaum H, McCulloch CAG. Transplantation of labeled periodontal ligament cells promotes regeneration of alveolar bone. *Anat Rec* 2001; 262(2):193-202.

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(4):492–506.

Lioubavina-Hack N, Carmagnola D, Lynch SE, Karring T. Effect of Bio-Oss with or without platelet-derived growth factor on bone formation by “guided tissue regeneration”: a pilot study in rats. *J Clin Periodontol.* 2005; 32(11):1254–60.

Luo J, Xu J, Cai J, Wang L, Sun Q, Yang P. The in vitro and in vivo osteogenic capability of the extraction socket-derived early healing tissue. *J Periodontol* 2016; 87(9):1057-66.

Lynch SE, Giannobile WV. Polypeptide growth factors: molecular mediators of tissue repair. In: Genco RJ. *Molecular pathogenesis of periodontal diseases.* Washington:ASM Pub., 1994. P.415

Lynch SE, Colvin RB, Antoniades HN. Growth factors in wound healing. Single and synergistic effects on partial thickness porcine skin wounds. *J Clin Invest.* 1989; 84(2): 641-5. (a)

Lynch SE, Williams RC, Polson AM, Howell TH, Reddy MS, Zappa UE, Antoniades HN. A combination of platelet-derived and insulin-like growth factors enhances periodontal regeneration. *J Clin Periodont.* 1989; 16(8):545-8. (b)

Lynch SE, de Castilla GR, Williams RC, Kiritsy CP, Howell TH, Reddy MS, Antoniades HN. The effects of short-term application of a combination of platelet-derived and insulin-like growth factors on periodontal wound healing. *J Periodontol.* 1991; 62(7): 458-67. (a)

Lynch SE, Buser D, Hernandez RA, Weber HP, Stich H, Fox CH, Williams RC. Effects of the platelet-derived growth factor/insulin-like growth factor-I combination on bone regeneration around titanium dental implants. Results of a pilot study in beagle dogs. *J Periodontol.* 1991; 62(11):710-6. (b)

Lynch SE, Wisner-Lynch L, Nevins M, Nevins ML. A new era in periodontal and periimplant regeneration: use of growth-factor enhanced matrices incorporating rhPDGF. *Compend Contin Educ Dent.* 2006. 27(12):672-8.

Mailhot JM, Sharawy MM, Galal M, Oldham AM, Russell CM.. Porous polysulfone coated with platelet-derived growth factor-BB stimulates proliferation of human periodontal ligament fibroblast. *J Periodontol.* 1996; 67(10): 981-5.

Martinez MAF. Adesão, proliferação e atividade de mineralização de células da granulação óssea e fibroblastos gengivais humanos em discos de titânio com diferentes superfícies de tratamento: análise in vitro. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo. Bauru, 2015. 139p.

Matsubara T, Suardita K, Ishii M, Sugiyama M, Igarashi A, Oda R, et al. Alveolar bone marrow as a cell source for regenerative medicine: differences between alveolar and iliac bone marrow stromal cells. *J Bone Miner Res* 2005; 20(3):399–409.

Matsuda N, Lin WL, Kumar NM, Cho MI, Genco RJ. Mitogenic, chemotatic and synthetic responses of rat periodontal ligament fibroblastic cells to polypeptide growth factors in vitro. *J Periodontol.* 1992; 63(6):515-25.

McAllister BS, Haghighat K, Gonshor A. Histologic evaluation of a stem cell based sinus-augmentation procedure. *J Periodontol.* 2009; 80(4):679–86.

McAllister BS. Stem cell-containing allograft matrix enhances periodontal regeneration: case presentations. *Int J Periodontics Rest Dent;* 2011; 31(2):148-55.

McCulloch C.A.G. Basic considerations in periodontal wound healing to achieve regeneration. *Periodontology* 2000. 1993; v.1, p.16-25.

McCulloch C.A.G. Origins and functions of cells essential for periodontal repair: The role of fibroblasts in tissue homeostasis. *Oral. Dis.*, v.1, n.4, p.271-8, Dec. 1995.

McGuire MK, Kao RT, Nevins M, Lynch SE. rhPDGF-BB promotes healing of periodontal defects: 24-month clinical and radiographic observations. *Int J Periodontics Rest Dent.* 2006; 26(3):223-31.

McGuire M.K., Scheyer T.E., Schupbach P. Growth factor-mediated treatment of recession defects a randomized controlled trial and histological and microcomputed tomography examination. *J Periodontol.* 2009; 8(4):550-64.

Melcher A. H. On the repair potential of periodontal tissues. *J. Periodontal*, v.47, n.5, p.256-70, May 1976.

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(3): 246-7.

Mellonig JT, Valderrama M del P, Cochran DL. Histological and clinical evaluation of recombinant human platelet-derived growth factor combined with beta tricalcium phosphate for the treatment of human class III furcation defects. *Int J Periodontics Rest Dent* 2009; 29(2):169-77

Michel RC. Efeitos da fotobiomodulação com laser e LED na proliferação e migração de fibroblastos gengivais de pacientes com e sem síndrome de Down. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo. Bauru, 2016. 100p.

Mishra A, Avula H, Pathakota KR, Avuis J. Efficacy of modified minimally invasive surgical technique in the treatment of human intrabony defects with or without use of rhPDGF-BB gel – a randomized controlled trial. *J Clin Periodontol.* 2013;40(1):172-79.

Mishra R, Sefcik R.S, Bishop T.J, Montelone S.M, Crouser N, Welter J.F, Caplan A.I, Dean D. Growth factor dose tuning for bone progenitor cell proliferation and differentiation on resorbable poly (propylene fumarate) scaffolds. *Tissue Engineering: Part C* 2016;22(9):904-13.

Mumford JH, Carnes DL, Cochran DL, Oates TW. The effects of platelet-derived growth factor-bb on periodontal cells in an in vitro wound model. *J Periodontol.* 2001; 72(3):331–40.

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(6):780-6.

Nevins M, Camelo M, Nevins ML, Schenk R, Lynch SE. Periodontal regeneration in humans using recombinant human platelet-derived growth factor BB (rhPDGF-BB) and allogenic bone. *J Periodontol.* 2003; 74(9):1282-92.

Nevins M, Giannobile WV, McGuire MK, Tao RT, Mellonig JT, Hinrichs JE, et al. Platelet-derived growth factor stimulates bone fill and rate of attachment level gain: results of a large multicenter randomized clinical trial. *J Periodontol.* 2005; 76(12): 2205-15.

Nevins M, Hanratty J, Lynch SE. Clinical results using recombinant human platelet-derived growth factor and mineralized freeze-dried bone allograft in periodontal defects. *Int J Periodontics Rest Dent.* 2007; 27(5):421-7.

Nevins ML, Camelo M, Schupbach P, Kim DM, Camelo JMB, Nevins M. Human histologic evaluation of mineralized collagen bone substitute and recombinant platelet-derived growth factor-BB to create bone for implant placement in extraction socket defects at 4 and 6 months: a case series. *Int J Periodontics Rest Dent.* 2009; 29(2):129-39.

Nevins M, Nevins ML, Karimbux N, Kim S-W, Schupbach P, Kim DM. The combination of purified recombinant human platelet-derived growth factor-BB and equine particulate bone graft for periodontal regeneration. *J Periodontol.* 2012; 83(5): 565-73.

Nevins M, Camelo M, Nevins ML, Schupbach P, Kim DM. Growth factor-mediated combination therapy to treat large local human alveolar ridge defects. *Int J Periodontics Rest Dent.* 2012; 32(3):263-71.

Nevins M, Kao RT, McGuire MK, McClain PK, Hinrichs JE, McAllister BS, et al. Platelet-derived growth factor promotes periodontal regeneration in localized osseous defects: 36-month extension results from a randomized, controlled, double-masked clinical trial. *J Periodontol.* 2013; 84(4):456-64.

Nevins ML, Reynolds MA, Camelo MC, Schupbach P, Kim DM, Nevins M. Recombinant human platelet-derived growth factor BB for reconstruction of human large extraction site defects. *Int J Periodontics Rest Dent.* 2014; 34(2):157-63.

Nishimura F., Terranova V.P. Comparative study of the chemotactic responses of periodontal ligament cells and gingival fibroblast to polypeptide growth factors. *J. Dent. Rest.*, v.75, n.4, p.986-92, Apr. 1996.

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):320-7.

Nyman S, Lindhe J, Karring T, Rylander H. New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. *J Clin Periodont.* 1982; 9(4):290–6.

Oates TW, Mumford JH, Carnes DL, Cochran DL. Characterization of proliferation and cellular wound fill in periodontal cells using an in vitro wound model. J Periodontol. 2001; 72(3): 324-30.

Oates TW, Rouse CA, Cochran DL. Mitogenic effects of growth factors on human periodontal ligament cells in vitro. J Periodontol. 1993; 64(2):142-8.

Ojima Y, Mizuno M, Kuboki Y, Komori T. In vitro effect of platelet-derived growth factor-BB on collagen synthesis and proliferation of human periodontal ligament cells. Oral Dis. 2003; 9(3):144-51.

Okuda K, Kawase T, Momose M, Murata M, Saito Y, Suzuki H, et al. Platelet rich plasma contains high levels of platelet-derived growth factor and transforming growth factor- β and modulates the proliferation of periodontally related cells in vitro. J Periodontol 2003; 74(6):849-57.

Papadopoulos CE, Dereka XE, Vavouraki EN, Vrotsos IA. In vitro evaluation of the mitogenic effect of platelet-derived growth factor-bb on human periodontal ligament cells cultured with various bone allografts. J Periodontol. 2003; 74(4):451-7.

Park JB, Matsuura M, Han KY, Norderyd O, Lin WL, Genco RJ, Cho MI. Periodontal regeneration in class III furcation defects of beagle dogs using guided tissue regenerative therapy with platelet-derived growth factor. J Periodontol. 1995; 66(6): 462-77.

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; v.9; n.2; p.140-151.

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(12):664-9.

Pfeilschifter J, Oechsner M, Naumann A, Gronwald RG, Minne HW, Ziegler R.. Stimulation of bone matrix apposition in vitro by local growth factors: a comparison between insulin-like growth factor-I, platelet-derived growth factor and transforming growth factor-B. Endocrinology. 1990; 127(1): 69-75.

Pierce GF, Mustoe TA, Linglebach J, Masakowski VR, Griffin GL, Senior RM, Deuel TF. Platelet-derived growth factor and transforming growth factor- β enhance tissue repair activities by unique mechanisms. J Cell Biol. 1989; 22(1):429-40.

Raghavendran H.R, Mohan S, Genasan K, Murali M.R, Naveen S.V, Talebian S, Mckean R, Kamarul T. Synergistic interaction of platelet derived growth factor (PDGF) with the surface of PLLA/Col/HA and PLLA/HA scaffolds produces rapid osteogenic differentiation. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2016; 1(139):68-78.

Ridgway HK, Mellonig JT, Cochran DL. Human histologic and clinical evaluation of recombinant human platelet-derived growth factor and beta-tricalcium phosphate for the treatment of periodontal intraosseous defects. *Int J Periodontics Rest Dent*. 2008; 28(2):171-79.

Rocchietta I, Dellavia C, Nevins M, Simion M. Bone regenerated via rhPDGF-bB and a deproteinized bovine bone matrix: backscattered electron microscopic element analysis. *Int J Periodontics Rest Dent*. 2007; 27(6):539-45.

Ross R. Platelet-derived growth factor. *Lancet*, v.1, n.8653, p.1179-82, 1989.

Rubins RP, Tolmie PN, Corsig KT, Kerr EN, Kim DM. Subepithelial connective tissue graft with growth factor for the treatment of maxillary gingival recession defects. *Int J Periodontics Rest Dent*. 2013; 33(1):43-9.

Sant'Ana ACP, Ferraz BFR, Rezende MLR, Gregghi SLA, Damante CA, Passanezi E. Newly forming bone graft: a novel surgical approach to the treatment of denuded roots. *J Appl Oral Sci*. 2012; 20(3): 392-8.

Sant'Ana ACP, 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):2007-17.

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): 134-40.

Sarment DP, Cooke JW, Miller SE, Jin Q, McGuire MK, Kao RT, McClain PK, McAllister BS, Lynch SE, Giannobile WV. Effect of rhPDGF-BB on bone turnover during periodontal repair. *J Clin Periodontol* 2006; 33(2):135–140.

Schwarz F, Ferrari D, Podolsky L, Mihatovic I, Becker J. Initial pattern of angiogenesis and bone formation following lateral ridge augmentation using rhPDGF and guided bone regeneration: an immunohistochemical study in dogs. *Clin Oral Implants Res* 2010; 21(1):90-9.

Schwarz F, Sager M, Ferrari D, Mihatovic I, Becker J. Influence of recombinant human platelet-derived growth factor on lateral ridge augmentation using biphasic

calcium phosphate and guided bone regeneration: a histomorphometric study in dogs. *J Periodontol* 2009; 80(8):1315-23.

Silva APRD, Petri AD, Crippa GE, Stuani AS, Rosa AL, Stuani MBS. Effect of low-level laser therapy after rapid maxillary expansion on proliferation and differentiation of osteoblastic Cells *Lasers Med Sci*. 2012; 27(4):777-3.

Silva D, Arancibia R, Tapia C, Acuña-Rougier C, Diaz-Dosque M, Cáceres M, Martínez J, Smith PC. Chitosan and platelet-derived growth factor synergistically stimulate cell proliferation in gingival fibroblasts. *J Periodontal Res* 2013; 48(6):677-86.

Simion M, Rochietta I, Fontana F, Dellavia C. Evaluation of reabsorbable collagen matrix infused with rhPDGF-BB in periimplant soft tissue augmentation: a preliminary report with 3.5 years of observation. *Int J Periodontics Rest Dent* 2012;32(2):273-82.

Simion M, Rochietta I, Kim D, Nevins M, Fiorellini J. Vertical ridge augmentation by means of deproteinized bovine bone block and recombinant human platelet-derived growth factor-BB: a histological study in a dog model. *Int J Periodontics Rest Dent*. 2006; 26(5):415-23.

Snyder MB. Treatment of a large postextraction buccal wall defect with mineralized allograft, β -TCP, and rhPDGF-BB: a growth factor-mediated bone regenerative approach. *Int J Periodontics Rest Dent*. 2012; 32(6):705-711.

Soares FP, Hayashi F, Yorioka CW, Pannuti CM, Gioso MA, Alves de Lima LAP, et al. 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*. 76(10):1681-9.

Soehren SE, Van Swol RL. The healing extraction site: A donor area for periodontal grafting material. *J Periodontol*. 1979; 50(3):128-33.

Sohn YA, Lee SI, Choi HJ, Kim HJ, Kim KH, Park TS, Han JY. The CCAAT element in the CIWI promoter regulates transcriptional initiation in chicken primordial germ cells. *Mol Reprod Dev*. 2014; 81(9):871-82.

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(1):.66–70.

Stavropoulos A, Kostopoulos L, Mardas N, Nyengaard JR, Karring T. Deproteinized bovine bone used as an adjunct to guided bone augmentation: an experimental study in the rat. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2001; 3(3):156-65.

Stephan E, Renjen R, Lynch S, Dziak R. Platelet-derived growth factor enhancement of a mineral-collagen bone substitute. *J. Periodontol.*, v.71, p.1887-1892, 2000.

Sudo H, Kodama H, Amagai Y, Yamamoto S, Kasai S. In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. *J Cell Biol* 1983;96(1):191-8.

Talal A, McKay IJ, Tanner KE, Hughes FJ. Effects of hydroxyapatite and PDGF concentrations on osteoblast growth in a nanohydroxyapatite-poly(lactic acid) (nHA-PLA) composite for guided tissue regeneration. *J. Mater Sci Mater Med*. 2013; 24(9): 2211-21.

Terranova VP, Jendresen M, Young F. Healing, regeneration and repair: prospectus for new dental treatment. *Adv Dent Rest*. 1989; 3(1):69-79.

Terranova VP, Wikesjö UME. Extracellular matrices and polypeptide growth factors as mediators of functions of cells of the periodontium. *J Periodontol*. 1987; 58(6): 371-80.

Thakare K, Deo V. Randomized controlled clinical study of rhPDGF-BB + β -TCP versus HA + β -TCP for the treatment of infrabony periodontal defects: clinical and radiographic results. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2012; 32(6):689-96.

The International Society for Cellular Therapy Position Statement. *Cytotherapy* 2005; 7(5):393-5.

Tuan RS. Role of adult stem/progenitor cells in osseointegration and implant loosening. *Int J Oral Maxillofac Impl* 2011; 26(Suppl):50-62.

Tuli R, Tuli S, Nandi S, Wang ML, Alexander PG, Haleem-Smith H, et al. Characterization of multipotential mesenchymal progenitor cells derived from human trabecular bone. *Stem Cells*. 2003;21(6):681-93.

Urban IA, Lozada JL, Jovanovic SA, Nagy K. Horizontal guided bone regeneration in the posterior maxilla using recombinant human platelet-derived growth factor: a case report. *Int J Periodontics Rest Dent*. 2013;33(4):421-5. (a)

Urban IA, Nagursky H, Lozada JL, Nagy K. Horizontal ridge augmentation with a collagen membrane and a combination of particulated autogenous bone and anorganic bovine bone-derived mineral: a prospective case series in 25 patients. *Int J Periodontics Rest Dent*. 2013;33(3):299–307. (b)

Urban I, Caplanis N, Lozada JL. Simultaneous vertical guided bone regeneration and guided tissue regeneration in the posterior maxilla using recombinant human platelet-derived growth factor: a case report. *J Oral Implantol*. 2009; 35(5):251-6.

Valdivia MAM. Cultura e caracterização de células da granulação óssea in vitro: efeitos proliferativos estimulados por diferentes biomateriais. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo. Bauru, 2013. 119p.

Vavouraki HN, Dereka XE, Vrotsos IA, Markopoulou CE. Ability of a bovine bone graft, alone or enriched with PDGF-BB or rhBMP-2, to promote human periodontal ligament (PDL) cells proliferation. A preliminary study. *Cell Tissue Bank*. 2003; 4(1): 17-23.

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 periodonum: an autoradiographic study on dogs. *J Periodontol*. 1994; 65(5):429-36.

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):1015-26.

Wang WJ, Zhao YM, Lin BC, Yang J, Ge LH. Identification of multipotent stem cells from adult dog periodontal ligament. *Eur J Oral Sci*. 2012;120(4):303-10.

Whitson SW, Harrison W, Dunlap MK, Bowers DE, Fisher LW, Robey PG, et al. Fetal bovine cells synthesize one specific matrix proteins. *J Cell Biol*. 1984; 99(2):607-14.

Wikesjö UM, Selvig KA. Periodontal wound healing and regeneration. *Periodontol* 2000.1999;19(1):21-39.

Wikesjö UME, Baker PJ, Christirsson LA, Genco RJ, Lyall RM, Hic S, et al. A biochemical approach to periodontal regeneration: tetracycline treatment conditions dentin surface. *J Periodontal Res*. 1986; 21(4):322-9.

Wikeshö UME, 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(9):677–8.

Zadeh H.H. Minimally invasive treatment of maxillary anterior gingival recession defects by vestibular incision subperiosteal tunnel access and platelet-derived growth factor BB. Int J Periodontics Rest Dent. 2011; 31(6):653-60.

ANEXOS

Anexo I – Folha de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP

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
mderran@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