

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA E TRAUMATOLOGIA
BUCCO-MAXILO-FACIAL**

**Osso autógeno associado a osso bovino inorgânico
(GenOx Inorg[®]) para aumento do soalho do seio
maxilar e instalação de implantes: análise
comparativa do potencial osteogênico de culturas
de células derivadas do sítio doador e do sítio de
implantação**

Willian Morais de Melo

Ribeirão Preto

2012

Willian Morais de Melo

**Osso autógeno associado a osso bovino inorgânico
(GenOx Inorg[®]) para aumento do soalho do seio maxilar e
instalação de implantes: análise comparativa do potencial
osteogênico de culturas de células derivadas do sítio
doador e do sítio de implantação**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial.

Orientador: Paulo Tambasco de Oliveira

Ribeirão Preto

2012

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

De Melo, Willian Morais

Osso autógeno associado a osso bovino inorgânico (GenOx Inorg[®]) para aumento do soalho do seio maxilar e instalação de implantes: análise comparativa do potencial osteogênico de culturas de células derivadas do sítio doador e do sítio de implantação.
Ribeirão Preto, 2012.

41p.: il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Área de concentração: Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial.

Orientador: De Oliveira, Paulo Tambasco

1. Aumento do seio maxilar. 2. Enxertos ósseos. 3. Osso bovino inorgânico. 4. Osso autógeno. 5. Osteoblastos. 6. Cultura de células.

Trabalho realizado no Laboratório de Cultura de Células da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, com recursos da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

FOLHA DE APROVAÇÃO

Willian Morais de Melo

Osso autógeno associado a osso bovino inorgânico (GenOx Inorg[®]) para aumento do soalho do seio maxilar e instalação de implantes: análise comparativa do potencial osteogênico de culturas de células derivadas do sítio doador e do sítio de implantação.

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial

Aprovado em: ____ / ____ / 2012

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Sérgio Luiz e Clélia Helena, grande parte desta conquista devo a vocês. É incomensurável a gratidão e o amor que tenho por vocês.

A minha irmã Ingrid, pelo companheirismo e amizade. Estamos sempre juntos. A toda minha inestimável família de que tenho a honra de fazer parte. Amo vocês!

À minha noiva Rangelly Araujo, pela lealdade, apoio, compreensão e carinho em todos esses anos. Amo você!

AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo e à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, representada pelo diretor Prof. Dr. Valdemar Mallet da Rocha Barros.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio à pesquisa concedido.

Ao Prof. Dr. Adalberto Luiz Rosa, da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, e ao Prof. Dr. Elcio Marcantonio júnior, da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP, pela importante e imprescindível colaboração neste trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Tambasco de Oliveira, grande pessoa, orientador e amigo. Fiquei muito honrado por ter trabalhado com um dos melhores pesquisadores deste país. Você me ensinou muito, mestre!

Aos docentes do curso de Mestrado em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, Prof. Dr. Adalberto Luiz Rosa, Prof. Dr. Alexandre Elias Trivellato, Prof. Dr. Cássio Edvard Sverzut, Prof. Dr. Luiz Antônio Salata, Prof. Dr. Samuel Porfírio Xavier, Prof. Dr. Valdemar Mallet da Rocha Barros, pelo grande aprendizado e pela boa convivência.

Aos amigos do curso de mestrado de Cirurgia: André Pepato, Antônio, Darklilson, Emanuela, Fernando Pando, Gustavo e Marcus Brêda; grandes profissionais e amigos que levarei para o resto da minha vida.

Ao Roger Rodrigo Fernandes, pela imensa e indispensável ajuda durante os experimentos no laboratório. Pessoa confiável, competente e honesta. Grande Amigo!

À Fabíola Singaretti de Oliveira, pela orientação e ajuda na realização dos experimentos no Laboratório de Biologia Molecular.

Aos professores da Faculdade de Odontologia de Alfenas – Unifal, especialmente Prof. Dr. Ronaldo Célio Mariano, pelos ensinamentos fundamentais em Cirurgia e incentivo inesgotável à carreira acadêmica.

Aos meus amigos de república em Ribeirão Preto, Marcos Yamaji, William Maximiano.

Aos meus grandes e inesquecíveis amigos da Faculdade de Odontologia de Alfenas- em especial ao Aécio, Marcelo e Glauciano (“Doidão”).

Aos meus grandes e fiéis amigos da cidade de Governador Valadares, esta conquista devo a vocês também.

Às secretárias do Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia da FORP-USP, Dulce Negretti e Tatiana Fernandes.

Aos demais funcionários da FORP-USP, que em algum momento me ajudaram na realização desse trabalho.

RESUMO

Objetivos: O objetivo desse estudo foi avaliar comparativamente o potencial osteogênico *in vitro* de células obtidas do ramo mandibular (RM, área doadora) e do seio maxilar enxertado com uma mistura de RM e osso bovino inorgânico (OBI), previamente à instalação de implantes de titânio (SM, sítio do seio maxilar enxertado). **Material e Métodos:** As células foram obtidas de três pacientes submetidos a procedimentos de aumento do soalho do seio maxilar com a proporção de 1:1 de RM e OBI (GenOx Inorg[®]). No momento da realização dos enxertos no seio maxilar e após 08 meses, antes da inserção dos implantes de titânio, fragmentos ósseos foram colhidos do RM e do SM, respectivamente, e submetidos à digestão enzimática com tripsina e colagenase para obtenção de células primárias. As células foram subcultivadas e crescidas sob condições osteogênicas por até 21 dias, tendo sido avaliados os seguintes parâmetros: proliferação/viabilidade celular, expressão gênica de marcadores osteoblásticos, atividade de fosfatase alcalina (ALP) e conteúdo de cálcio, por extração do vermelho de Alizarina. Culturas primárias derivadas do RM foram expostas ao GenOx Inorg[®] por 7 dias, quando se avaliou a atividade de ALP. Os resultados foram comparados por ANOVA *two-way*, seguido do teste de Tukey, ou pelo teste de Mann-Whitney. **Resultados:** Culturas do SM exibiram uma redução significativa do potencial osteogênico se comparado ao de culturas do RM, com um aumento progressivo na proliferação celular associado a uma redução da expressão dos marcadores osteoblásticos, da atividade de ALP e do conteúdo de cálcio. A exposição do GenOx Inorg[®] às células primárias derivadas do RM inibiram a atividade de ALP. **Conclusão:** Esses resultados sugerem que o uso do GenOx Inorg[®] em associação a fragmentos do RM para aumento do soalho do seio maxilar inibe a diferenciação de células osteoblásticas no sítio de inserção de implantes de titânio após 8 meses de enxertia.

ABSTRACT

Objectives: This study aimed to comparatively evaluate the *in vitro* osteogenic potential of cells obtained from the mandibular ramus (MR, autogenous bone donor site) and from the maxillary sinus bone grafted with a mixture of anorganic bovine bone (ABB) and MR prior to titanium implant placement (MS, grafted implant site).

Material and methods: Cells were obtained from three patients subjected to maxillary sinus floor augmentation with a 1:1 mixture of ABB (GenOx Inorg[®]) and MR. At the time of the sinus lift procedure and after 8 months, prior to implant placement, bone fragments were taken from MR and MS, respectively, and subjected to trypsin-collagenase digestion for primary cell culturing. Subcultured cells were grown under osteogenic condition for up to 21 days and assayed for proliferation/viability, osteoblast marker mRNA levels, alkaline phosphatase (ALP) activity and calcium content/Alizarin red staining. ALP activity was also determined in primary explant cultures exposed to GenOx Inorg[®] (1:1 with MR) for 7 days. Data were compared using the two-way ANOVA followed by the Tukey test; otherwise, the Mann-Whitney test was used. **Results:** MS cultures exhibited a significantly lower osteogenic potential compared with MR cultures, with a progressive increase in cell proliferation together with a downregulation of osteoblast markers, reduced ALP activity and calcium content. Exposure of MR-derived primary cultures to GenOx Inorg[®] inhibited ALP activity. **Conclusion:** These results suggest that the use of GenOx Inorg[®] in combination with MR fragments for maxillary sinus floor augmentation inhibits the osteoblast cell differentiation at the implant site in the long-term.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μm : micrometro

nm: nanometro

ng/mL: nanocrograma/mililitro

Real-time PCR: reação em cadeia de polimerase em tempo real

ALP: fosfatase alcalina

MTT: {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]}

OPN: osteopontina

OC: osteocalcina

COL I: colágeno tipo I

BSP: sialoproteína óssea

RUNX2: fator de transcrição relacionado ao *runt* tipo 2

RNA_m: ácido ribonucleico mensageiro

°C: grau Celsius

α -MEM: meio essencial mínimo, modificação α

mM: milimolar

$\mu\text{g/mL}$: micrograma/mililitro

CO₂: gás carbônico

M: molar

mg/mL: miligrama/mililitro

PBS: solução tampão salina de fosfato (*Phosphate buffered saline*)

mL: mililitro

μL : microlitro

HCl: ácido clorídrico

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

PB: solução tampão fosfato (*Phosphate buffered*)

nM: nanomolar

cDNA: ácido desoxirribonucleico complementar

µg: micrograma

ng: nanograma

Ct: ciclo limiar (*cycle threshold*)

Na₂CO₃: carbonato de sódio

NaOH: hidróxido de sódio

µM: micromolar

g: unidade de aceleração, aproximadamente igual a 9,8 m/s²

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 MATERIAL E MÉTODOS	17
2.1 Cirurgia para aumento do soalho do seio maxilar	17
2.2 Cultura de células	17
2.3 Proliferação celular	18
2.4 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (Real-time PCR).....	19
2.5 Avaliação da atividade de ALP.....	22
2.6 Extração do vermelho de Alizarina/Conteúdo de cálcio	22
2.7 Efeito <i>in vitro</i> do GenOx Inorg [®] na atividade de ALP	23
2.8 Análise estatística	23
3 RESULTADOS.....	25
3.1 Proliferação celular	25
3.2 Expressão gênica.....	26
3.3 Atividade de ALP.....	27
3.4 Extração do vermelho de Alizarina/Conteúdo de cálcio	28
3.5 Efeito <i>in vitro</i> do GenOx Inorg [®] na atividade de ALP	30
4 DISCUSSÃO	32
5 CONCLUSÃO	36
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A instalação de implantes dentários na região posterior de maxila edêntula é um grande desafio cirúrgico devido à quantidade de osso insuficiente e a pobre qualidade de estrutura óssea. Assim, a reabilitação funcional e estética na região posterior de maxila edêntula requer adequada reconstrução óssea para permitir estabilidade e taxas de sobrevivências dos implantes osseointegráveis por longos períodos (Nkenke & Stelzle 2009; Cho-Lee et al. 2010). Uma das estratégias para atingir essa meta é o procedimento de aumento de soalho do seio maxilar. Nesse procedimento, os enxertos de osso autógeno, alógeno, xenógeno, aloplásticos, ou as combinações desses materiais têm sido empregados para criar e manter um novo compartimento de tecido ósseo entre o soalho do seio maxilar e a membrana sinusal elevada, objetivando garantir adequados sítios para inserção de implantes de titânio (Del Fabbro et al. 2008; Sohn et al. 2010).

Um alto potencial osteogênico tem-se atribuído ao enxerto de osso autógeno devido aos seus efeitos osteocondutivo, osteoindutivo e osteogênico (Hausamen & Neukam 1992; Klijn et al. 2010). Contudo, a utilização do enxerto de ossos autógenos em combinação materiais de enxertia poderia reduzir a manipulação tecidual durante o procedimento cirúrgico da área doadora, assim limitando a morbidade cirúrgica ao paciente (Chaushu et al. 2009; Sbordone et al. 2009; Kahnberg et al. 2011). Um dos materiais de enxertia para essa aplicação é o osso bovino inorgânico (OBI), que apresenta as mesmas propriedades químicas e físicas do osso humano (Orsini et al. 2005). Adicionalmente agindo como material de preenchimento de cavidades, o OBI pode facilitar o reparo ósseo como demonstrado em análises histológicas, que mostra a formação de novo tecido ósseo em contato

direto com as partículas de OBI (Galindo-Moreno et al. 2010; Bernabé et al. 2012). De forma controversa, apesar destes efeitos favoráveis do osso bovino, um atraso no início da formação óssea em defeitos ósseos tem sido atribuído ao OBI (Carmagnola et al. 2000; Botticelli et al. 2004; Araújo et al. 2009). Dando mérito a isso, um número de estudos *in vitro* tem demonstrado efeitos negativos das partículas de OBI na adesão de células osteoblásticas, na proliferação, na expressão gênica, e na formação da matriz óssea mineralizada (Beloti et al. 2008; Herten et al. 2009; Bernhardt et al. 2011; Trubiani et al. 2010).

O objetivo do presente estudo *in vitro* foi de avaliar comparativamente o potencial osteogênico das células derivadas da área doadora e do sítio de instalação de implantes de titânio nos pacientes submetidos aos procedimentos de aumento do soalho do seio maxilar utilizando enxerto de osso autógeno em associação com partículas de OBI. A vantagem desse modelo experimental oferece a possibilidade de avaliar a expressão fenotípica de células isoladas do sítio de inserção dos implantes de titânio após um processo de reparação tecidual a longo período na presença de osso autógeno e partículas de OBI.

MATERIAL E MÉTODOS

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Cirurgia para aumento do soalho do seio maxilar

A cirurgia para elevação de seio maxilar, quando indicada, foi realizada na Clínica de Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP, Araraquara, sob a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa. Foram selecionados três pacientes adultos, saudáveis, do gênero masculino e feminino, não fumantes, que não estejam sob tratamento farmacológico. A cirurgia de elevação do seio maxilar foi realizada utilizando o enxerto autógeno *inlay* derivado da região de ramo da mandíbula associado às partículas de osso bovino inorgânico (GenOx Inorg®). Após a cirurgia, descartes de fragmentos ósseos da área doadora foram submetidos à digestão enzimática para obtenção das células para cultura conforme descrito a seguir.

Após 8 meses de cirurgia de elevação do soalho do seio maxilar, durante a intervenção cirúrgica para colocação dos implantes de titânio, biópsias foram retiradas das áreas de enxerto dos mesmos pacientes, por meio de uma broca trefina. Esses fragmentos também foram submetidos à digestão enzimática para obtenção das células para cultura.

2.2 Cultura de células

Para obtenção das células, os fragmentos triturados, foram submetidos à ação da colagenase (5 mL, 1 mg/mL, Gibco) sob agitação a 37 °C por 3 horas. A cada trinta minutos a colagenase foi retirada e reservada em um tubo Falcon contendo 5 mL do meio de cultura e outros 5 mL de solução de colagenase foram adicionados aos fragmentos ósseos até a completa digestão. Após a centrifugação o precipitado

foi resuspendido em 5 mL do meio de cultura e as células em cultura primária foram mantidas em frascos de 75 cm² (Corning Incorporated, EUA) contendo α -MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 50 μ g/mL de vancomicina (Acros Organics, Belgica), 0,3 μ g/mL de fungizona (Gibco), 50 μ g/mL de gentamicina (Gibco), 5 μ g/mL de ácido ascórbico (Gibco) e 7 mM de β -glicerofosfato (Sigma, EUA) e 100 nM de dexametasona (Sigma). Na subconfluência da cultura primária, o meio de cultura foi removido e adicionada solução de tripsina a 0,25% (Gibco) e EDTA a 1 mM (Gibco) para obtenção de suspensão de células. Em seguida, as células foram contadas em hemocítômetro e plaqueadas na densidade de 2×10^4 células/poço em placas de poliestireno de 24 poços (Corning). As culturas foram mantidas por períodos de até 17 dias e sua progressão foi avaliada por microscopia de fase invertida (Axiovert 25, Zeiss, Jena, Alemanha). O meio de cultura foi trocado a cada 2 ou 3 dias. Durante todo o tempo de cultivo as células foram mantidas a 37 °C e atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico. O estudo foi realizado em quintuplicata e foi repetido utilizando células de 3 doadores diferentes.

2.3 Proliferação celular

A proliferação celular foi determinada quantitativamente pelo ensaio colorimétrico MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]} (Sigma). O MTT é um sal que é reduzido em cristais de formazan (de cor púrpura) por proteinases mitocondriais, ativas apenas em células viáveis. (Mosmann 1983). Em 3, 7 e 10 dias, o meio de cultura foi removido e os poços foram lavados com salina tamponada com fosfato (PBS, Gibco) aquecida a 37 °C, preenchidos com 1 mL de meio de cultura contendo MTT à 10% (5 mg/mL) e incubados a 37 °C por 4 horas. A

seguir, os sobrenadantes serão aspirados e os cristais solubilizados utilizando 1 mL de uma solução de isopropanol ácido (HCl 0,04 N em isopropanol). As placas foram agitadas por 5 minutos e uma alíquota de 150 µL de cada poço foi transferida para uma placa de 96 poços. A absorbância foi avaliada por meio de um espectrofotômetro µQuant (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, EUA) utilizando o comprimento de onda de 570 nm. A proliferação celular foi expressa como absorbância.

2.4 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (Real-time PCR)

A expressão de marcadores do fenótipo osteoblástico foi avaliada por *Real-time* PCR, quantificando-se os seguintes genes: RUNX2, COL I, ALP, BSP, OPN e OC. Como controle, foi avaliada a expressão do gene constitutivo β-actina.

Aos 7 e 14 dias, foi realizada a extração do RNA total utilizando o kit *SV Total RNA Isolation System* (Promega, EUA) de acordo com especificações do fabricante. Em seguida, o RNA total foi quantificado em diferentes comprimentos de onda (260; 280; 230; 320 nm) no aparelho GeneQuant 1300 (GE Healthcare, Cardiff, Reino Unido).

As reações foram feitas com o sistema SYBR Green, no aparelho CFX 96 Bio-Rad (EUA). Após extração do RNA total, a fita de cDNA foi confeccionada no termociclador Mastercycle Gradient (Eppendorf, EUA) por uma reação de transcrição reversa utilizando-se o kit SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen, EUA). O cDNA sintetizado foi utilizado juntamente com o reagente SYBR Green, como determinado pelo fabricante. A reação de amplificação foi composta por 2 minutos a 50 °C, 10 minutos a 95 °C, quarenta ciclos de 15 segundos a 95 °C, 1 minuto a 60 °C. Um ciclo final de 20 minutos, com temperatura crescente de 60 °C a 95 °C, foi

empregado para a obtenção de uma curva de dissociação dos produtos da reação, utilizada para a análise da especificidade de amplificação. Os resultados foram analisados com base no valor de Ct (*cycle threshold* - ou ciclo limiar), sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos em que a amplificação das amostras atinge um limiar (determinado entre o nível de fluorescência dos controles negativos e a fase de amplificação exponencial das amostras), permitindo a análise quantitativa da expressão do fator avaliado. Todas as amostras foram submetidas a reações para a detecção de RNAm para a β -actina, que constituiu o controle positivo da reação de amplificação e foi utilizado para a normalização dos níveis de expressão dos genes alvo. Uma amostra negativa (água) foi submetida à reação com cada par das seqüências dos *primers* utilizados. Os resultados foram calculados usando o método $\Delta\Delta$ Ct (Livak & Schmittgen 2001). *Primers* adequados (Tabela 1) para tais reações foram desenhados no programa Primer Express 3 (Applied Biosystem).

Tabela 1 – Sequência de *primers* e características das reações

Gene	Sequência <i>primer sense</i>	TA (°C)	TM (°C)	bp
	Sequência <i>primer anti-sense</i>			
RUNX2	TATGGCACTTCGTCAGGATCC	61	83	110
	AATAGCGTGCTGCCATTTCG			
COL I	TGACGAGACCAAGAAGACTG	61	84	114
	CCATCCAAACCACTGAAACC			
ALP	ACGTGGCTAAGAATGTCATC	60	86	475
	CTGGTAGGCGATGTCCTTA			
BSP	AATCTGTGCCACTCACTGCCTT	58	79	201
	CCTCTATTTTGACTCTTCGATGCAA			
OPN	AGACACATATGATGGCCGAGG	60	79	154
	GGCCTTGTATGCACCATTCAA			
OC	CAAAGGTGCAGCCTTTGTGTC	62	85	150
	TCACAGTCCGGATTGAGCTCA			
β -actina	ATGTTTGAGACCTTCAACA	60	75	495
	CACGTCAGACTTCATGATGG			

RUNX2 – *runt-related transcription factor 2*; COL I – colágeno I; ALP - fosfatase alcalina; BSP - sialoproteína óssea; OPN - osteopontina; OC - osteocalcina; TA - temperatura de anelamento; TM - temperatura de dissociação; bp - tamanho do produto.

2.5 Avaliação da atividade de ALP

A atividade de ALP foi avaliada por meio da liberação de timolftaleína pela hidrólise do substrato de timolftaleína monofosfato, utilizando um kit comercial (Labtest Diagnostica SA, Belo Horizonte, MG, Brasil), seguindo as instruções do fabricante. Para isso foram utilizados tubos de ensaio branco, padrão e testes. Em todos os tubos foram adicionados 50 µL de substrato e 0,5 mL de tampão dietanolamina a 0,3 mmol/mL, pH 10,1. No tubo padrão foi acrescentado 50 µL da solução padrão. Os tubos foram mantidos a 37 °C por 2 minutos. Em seguida, foi adicionado, em cada tubo teste, 50 µL do lisado de células dos mesmos poços utilizados para medida da proteína total. Os tubos foram mantidos a 37 °C por 10 minutos. Após esse período foi adicionado em todos os tubos, branco, padrão e testes, 2 mL do reagente de cor (Na_2CO_3 0,09 µmol/mL e NaOH 0,25 µmol/mL) e em seguida a absorbância foi medida em um espectrofotômetro (Cecil) utilizando-se o comprimento de onda de 590 nm. A atividade de ALP, µmol de timoftaleína/h/mL, foi calculada a partir da medida do tubo padrão e normalizada pelo conteúdo de proteína total, que foi determinado pelo método de Lowry modificado (Lowry et al. 1951).

2.6 Extração do vermelho de Alizarina/Conteúdo de cálcio

Ao final de 17 e 21 dias, o meio de cultura foi removido, os poços lavados três vezes com PBS aquecida a 37 °C e preenchidos com formalina 10% por 2 horas. Em seguida, foram desidratados em série crescente de etanol e processados para coloração com vermelho de Alizarina (Sigma), que cora, em vermelho, áreas de mineralização ricas em cálcio. A quantificação da coloração foi avaliada por método colorimétrico (Gregory et al. 2004). Foram adicionados 280 µL de ácido acético a

10% a cada poço previamente corado com vermelho de Alizarina e a placa foi agitada por 30 minutos em temperatura ambiente. O conteúdo de cada poço foi transferido para tubos Eppendorf e, então, aquecidos a 85 °C por 10 minutos e em seguida mantidos em gelo por 5 minutos. Os tubos foram centrifugados a 20.000g por 15 minutos e 100 µL dos sobrenadantes foram transferidos para tubos novos. Então 40 µL de hidróxido de amônia a 10% foram adicionados a cada tubo para neutralizar o ácido, em seguida o conteúdo de cada tubo foi transferido para uma placa de 96 poços. A absorbância foi avaliada por meio de um espectrofotômetro µQuant (BioTek Instruments) utilizando o comprimento de onda de 405 nm. A formação de matriz mineralizada foi expressa como absorbância.

2.7 Efeito *in vitro* do GenOx Inorg[®] na atividade de ALP

Para avaliar o efeito do Genox Inorg[®] exposto às células osteogênicas, células de cultura primária derivadas de RM foram crescidas por 7 dias na presença de partículas de GenOx Inorg[®] (na proporção 1:1 de fragmentos ósseos de explantes de RM em relação às partículas de GenOx Inorg[®]). O meio de cultura foi trocado a cada 2 dias. No dia 7, foi avaliada a atividade de ALP das células primárias, como descrito previamente.

2.8 Análise estatística

Foi utilizado o teste paramétrico *two-way* ANOVA, para dados independentes, seguido do teste de Tukey, para comparações múltiplas, quando aplicável. Para comparações entre dois grupos, utilizou-se o teste de Mann-Whitney. O nível de significância considerado foi de 5%.

RESULTADOS

3 RESULTADOS

3.1 Proliferação celular

Diferenças estatisticamente significantes foram detectadas no perfil de proliferação celular entre culturas derivadas de RM e de SM. Enquanto que as células de RM apresentaram pico de proliferação celular no dia 7, as de SM exibiram um aumento progressivo de proliferação celular durante os períodos avaliados ($p < 0,05$; Figura 1).

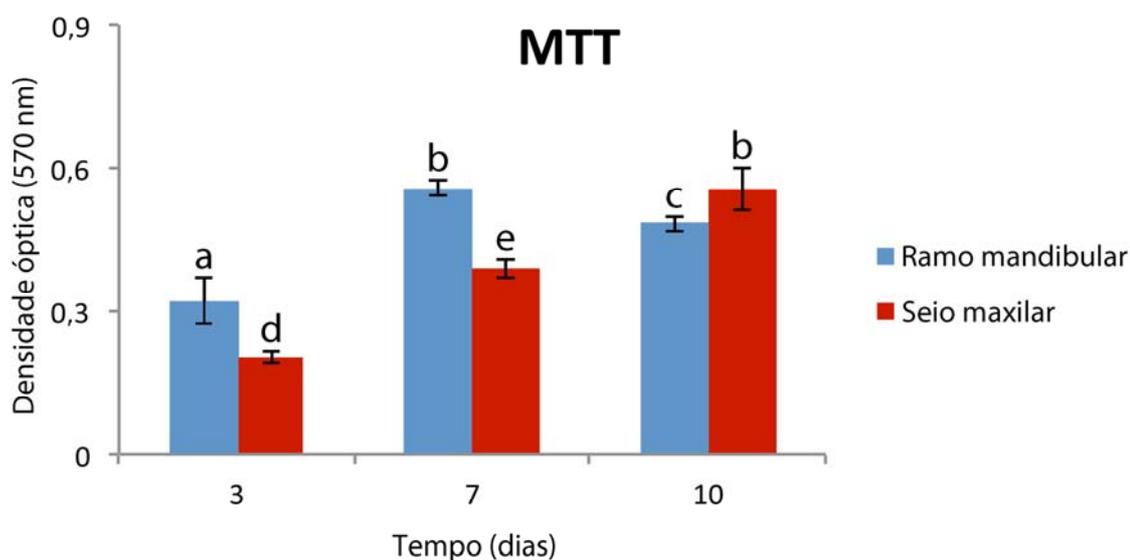


Figura 1. Proliferação celular (MTT, densidade óptica) das culturas de células derivadas do ramo mandibular e do seio maxilar crescidas sob condição osteogênica aos 3, 7, e 10 dias. Barras com letras iguais não apresentam diferenças estatisticamente significantes ($p > 0,05$).

3.2 Expressão gênica

Aos 7 e 14 dias, as culturas de células de SM mostraram uma significativa redução dos marcadores osteoblásticos comparados as culturas de RM, exceto para COL I no dia 14. Entre os dias 7 e 14, as culturas de SM não mostraram mudanças significantes de expressão gênica exceto para a COL I (apresentou redução aos 14 dias), considerando que as culturas de RM exibiram alta expressão gênica de BSP, OPN e OC, e uma redução de ALP e COL I aos 14 dias; a expressão de RUNX2 não foi alterada (Figura 2).

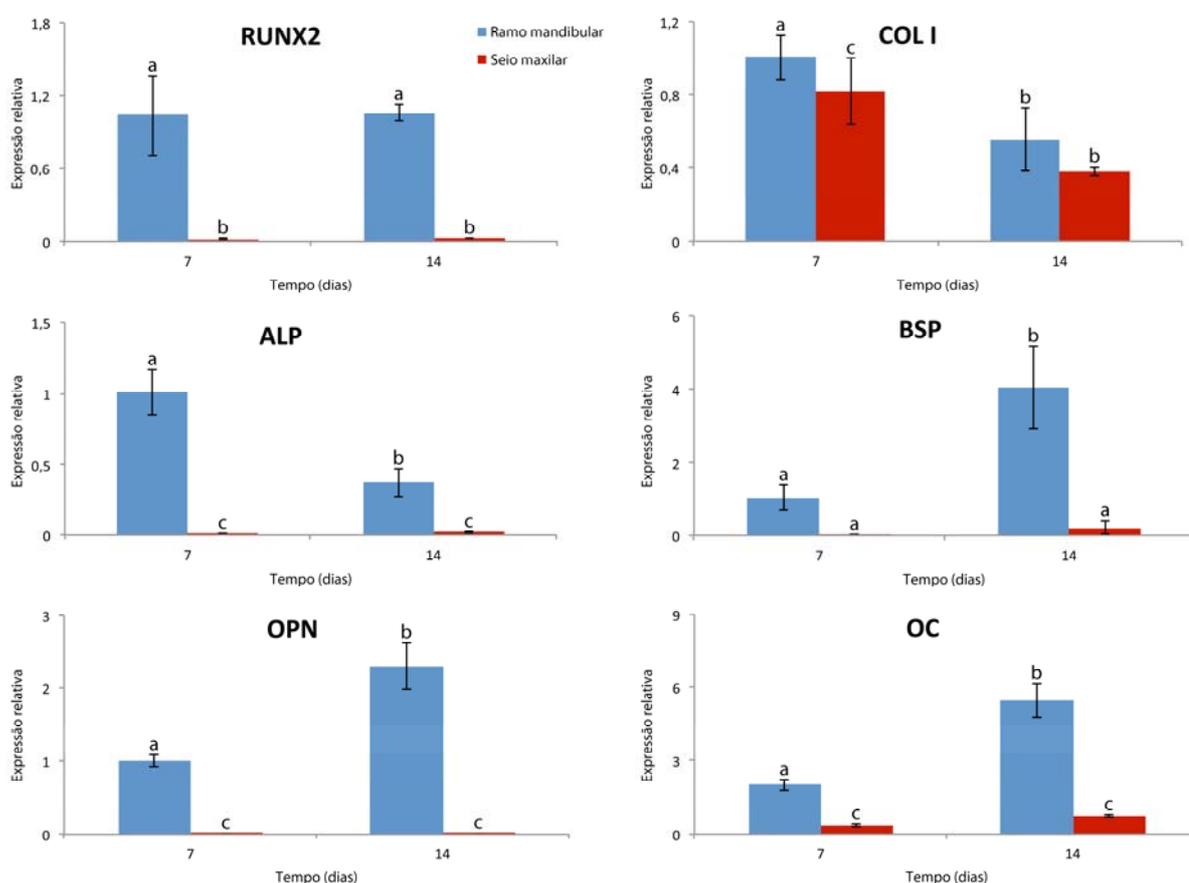


Figura 2. Expressão relativa dos níveis de RNAm de RUNX2, COL I, ALP, BSP, OPN, e OC das culturas de células derivadas do ramo mandibular e do seio maxilar crescidas sob condição osteogênica em 7 e 14 dias. Os resultados foram normalizados em relação aos níveis de RNAm de β -actina, e o valor 1 foi atribuído às culturas celulares derivadas do ramo mandibular aos 7 dias. Barras com letras iguais não apresentam diferenças estatisticamente significantes ($p > 0,05$).

3.3 Atividade de ALP

Existiram diferenças estatisticamente significantes na atividade de ALP entre as culturas de SM e RM. As culturas de SM exibiram uma significativa redução da atividade de ALP comparadas às culturas de RM nos 3 períodos avaliados, com pico de atividade aos 14 dias. Por outro lado, as culturas de RM apresentaram pico da atividade de ALP no dia 10 (Figura 3).

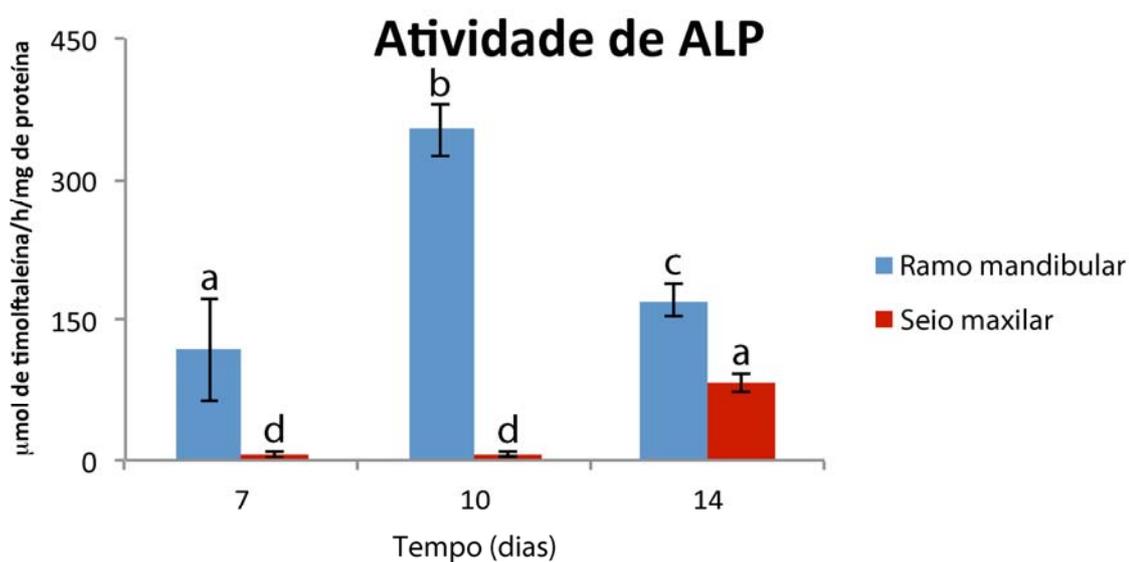


Figura 3. Atividade de ALP (μmol de timolftaleína/h/mg de proteína) das culturas celulares derivadas do ramo mandibular e do seio maxilar crescidas sob condição osteogênica aos 7, 10, e 14 dias. Barras com letras iguais não apresentam diferenças estatisticamente significantes ($p > 0,05$).

3.4 Extração do vermelho de Alizarina/Conteúdo de cálcio

A coloração de vermelho de Alizarina resultou em marcações diferentes entre as culturas de RM e SM nos dias 17 e 21. As culturas de RM exibiram áreas distribuídas com contorno irregular e com várias intensidades de vermelho, com padrão pontilhado, enquanto que culturas de SM exibiram áreas nodulares de coloração marrom claro e apenas pequenos pontos vermelhos focais (Figura 4).

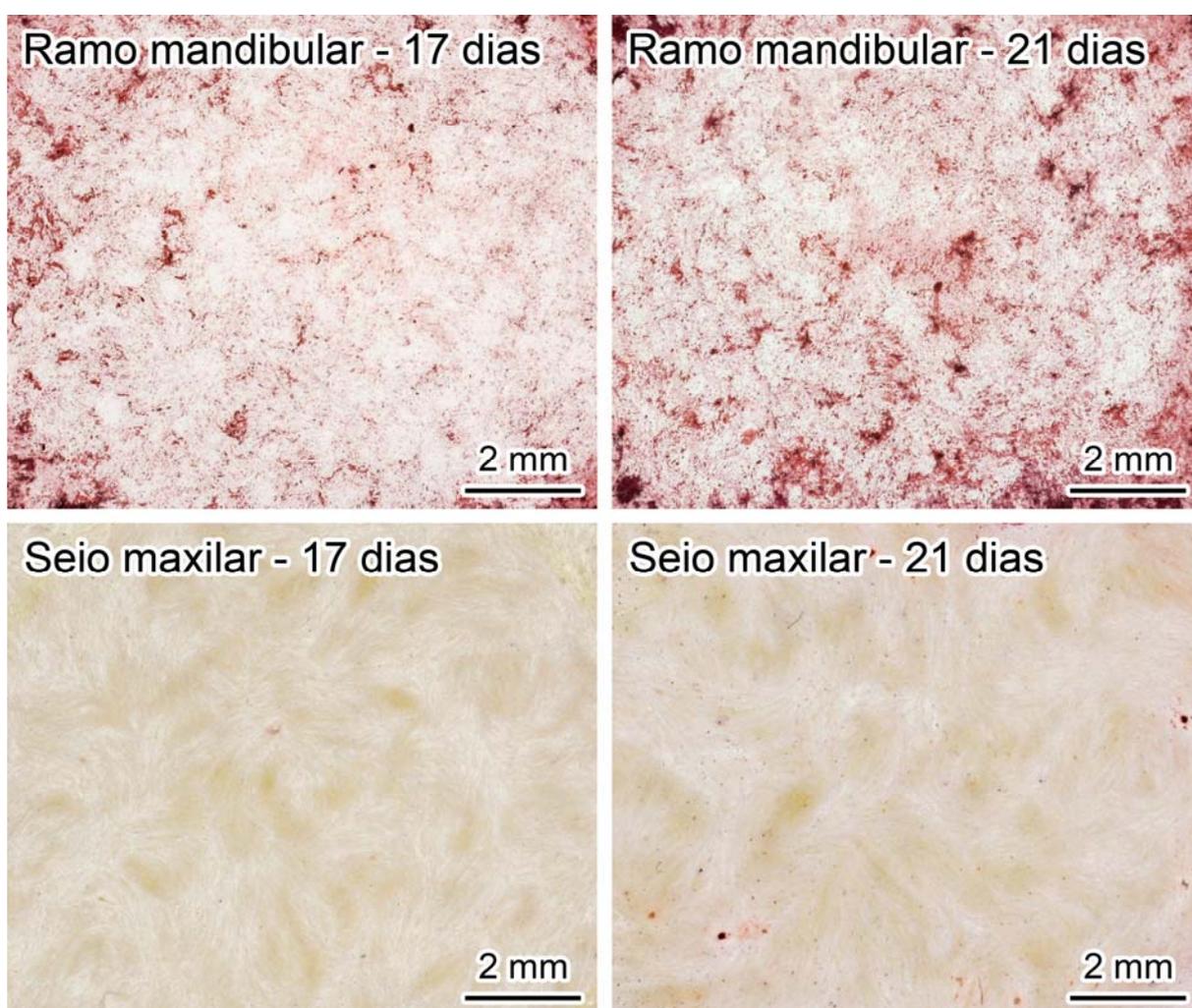


Figura 4. Imagens macroscópicas das culturas celulares derivadas do ramo mandibular e do seio maxilar crescidas sob condição osteogênica aos 17 e 21 dias. As culturas foram coradas com vermelho de Alizarina para detecção de depósitos de cálcio na matriz extracelular.

O conteúdo de cálcio nas culturas de SM foi significativamente reduzido aos 17 e 21 dias comparado com o de culturas de RM. Adicionalmente, os valores permaneceram os mesmos para as culturas de SM entre os dias 17 e 21. O conteúdo de cálcio mais elevado foi observado nas culturas de RM aos 21 dias (Figura 5).

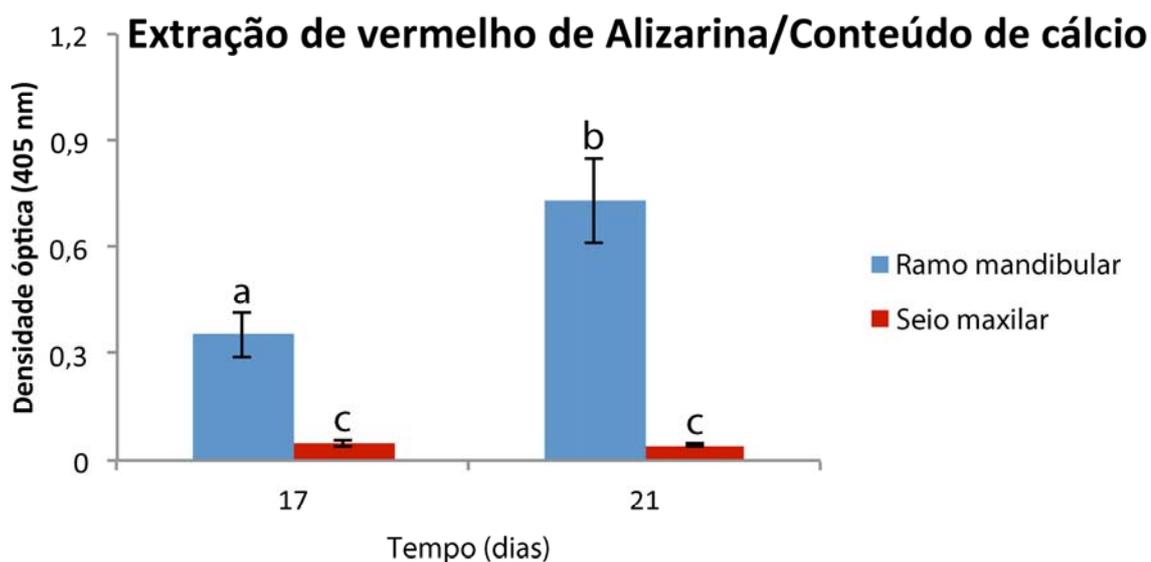


Figura 5. Extração do vermelho de Alizarina (conteúdo de cálcio, densidade óptica) das culturas celulares derivadas do ramo mandibular e do seio maxilar crescidas sob condição osteogênica aos 17 e 21 dias. Barras com letras iguais não apresentam diferenças estatisticamente significantes ($p > 0,05$).

3.5 Efeito *in vitro* do GenOx Inorg[®] na atividade de ALP

A atividade de ALP apresentou redução estatisticamente significativa nas culturas primárias de células expostas ao GenOx Inorg[®] comparadas a culturas não expostas (Figura 6).

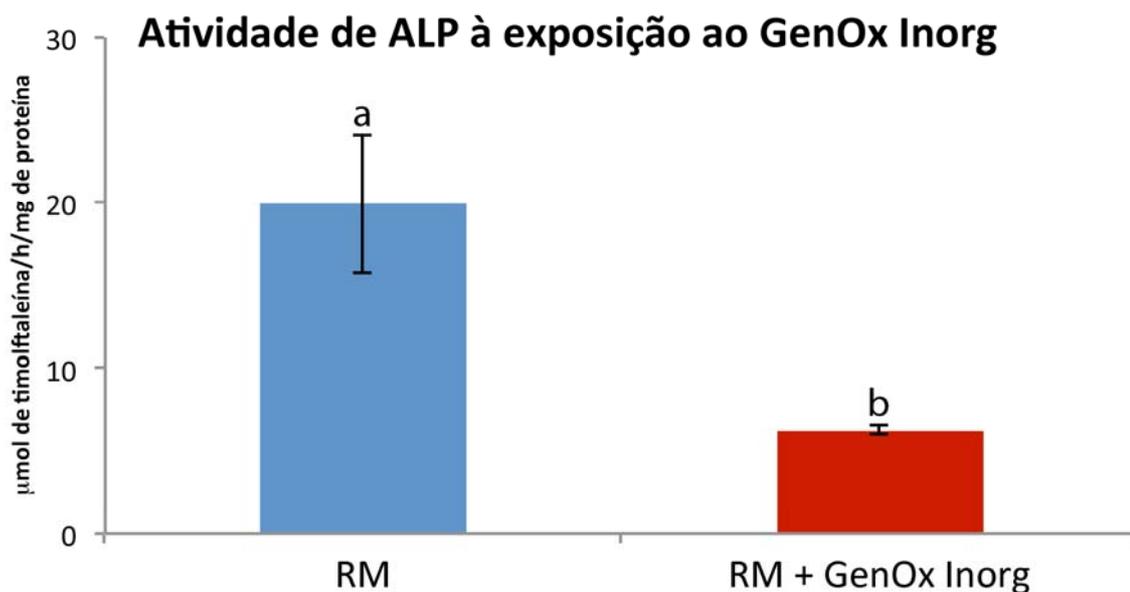


Figura 6. Efeito aos 7 dias da atividade de ALP (µmol de timolftaleína/h/mg de proteína) na exposição de GenOx Inorg[®] a culturas de células primárias derivadas do ramo mandibular. As letras a e b nas barras indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p < 0,05$).

DISCUSSÃO

4 DISCUSSÃO

O objetivo do presente estudo *in vitro* foi o de investigar os efeitos sobre a diferenciação osteoblástica de enxerto de osso autógeno associado com osso bovino inorgânico para aumento do soalho do seio maxilar, após 8 meses. Os resultados mostraram claramente uma redução significativa do potencial osteogênico de culturas de células derivadas dos sítios de implantação que receberam o enxerto quando comparadas àquelas derivadas de fragmentos ósseos da área doadora, do ramo mandibular. Com efeito, observou-se para culturas derivadas do seio maxilar uma inibição da expressão gênica de marcadores osteoblásticos, acompanhada de redução importante da atividade de ALP e do conteúdo de cálcio/mineralização. A maior viabilidade celular para essas culturas em 10 dias correspondia a características macroscópicas de aumento da população celular em formações nodulares sem evidências de mineralização em 17 e 21 dias. Adicionalmente, a exposição, por período de 7 dias, de células osteoblásticas primárias derivadas de fragmentos ósseos do ramo mandibular a partículas de osso bovino inorgânico, na mesma proporção usada para os procedimentos cirúrgicos, resultou na inibição da atividade de ALP.

No presente estudo, o procedimento para aumento do soalho do seio maxilar foi realizado utilizando enxerto ósseo constituído por uma mistura, em proporções iguais, de osso autógeno e de osso bovino inorgânico, com o objetivo de: 1) reduzir a morbidade cirúrgica do paciente (Klijn et al. 2010); 2) promover a neoformação óssea e osseocondução previamente à instalação de implantes de titânio (Berglundh & Lindhe 1997), e 3) manter as dimensões ósseas em altura e espessura por longos períodos (Kim et al. 2009). A opção pela proporção de 1:1 baseou-se em resultados

positivos para o processo de reparação óssea e para a estabilidade de implantes com o uso de osso autógeno e Bio-Oss[®] (Kim et al. 2009; Jensen et al. 2012a). No entanto, como osso bovino inorgânico particulado, optamos por utilizar GenOx Inorg[®], obtido por tratamento térmico com temperaturas variando entre 950 °C e 1000 °C, que proporcionam um aumento da cristalinidade do material com potencial impacto positivo em sua estabilidade dimensional *in vivo* (Tadic & Epple 2004; Accorsi-Mendonça et al. 2008). Estudos clínicos e em diferentes modelos animais mostram que o uso de GenOx Inorg[®] estimula a neoformação óssea em regeneração óssea guiada e em procedimentos para aumento do soalho do seio maxilar (Bernabé et al. 2005; Serra e Silva et al. 2006; Bernabé et al. 2012).

Avaliações clínicas, radiográficas e histológicas permitem detectar os efeitos positivos do uso combinado de osso autógeno e osso bovino inorgânico sobre a reparação óssea e os índices de sucesso de implantes osseointegráveis (Iezzi et al. 2008; Ferreira et al. 2009; Kim et al. 2009; Galindo-Moreno et al. 2010; Jensen et al. 2012b; Patel et al. 2012). Adicionalmente, métodos *in vitro* permitem avaliar aspectos morfológicos e moleculares da exposição de células a partículas de osso bovino inorgânico (Trubiani et al. 2010; Mladenovic et al. 2011), assim como o componente celular dos tecidos neoformados em contato com osso bovino inorgânico *in vivo* (Beloti et al. 2008). No presente estudo, a estratégia de cultivar células derivadas de fragmentos ósseos obtidos diretamente do sítio de implantação do seio maxilar após 8 meses de enxertia permitiu revelar, em diferentes períodos de progressão das culturas, aspectos celulares e moleculares que refletiam o desenvolvimento de um fenótipo predominantemente não osteogênico. Isso poderia ser devido não apenas à progressão de células osteoblásticas menos diferenciadas, como também a uma menor proporção de células osteoblásticas em uma população

predominantemente fibroblástica. Além disso, a redução da expressão de genes relacionados à síntese de moléculas da matriz extracelular colágena e não colágena poderia, também, traduzir uma redução da atividade osteoblástica nas culturas, como detectado naquelas expostas ao GenOx Inorg[®], com reduzida atividade de ALP. Resultados semelhantes foram observados em culturas de células osteoblásticas derivadas de osso do processo alveolar, expostas a coquetel de fatores de crescimento e proteínas semelhantes a preparações de plasma rico em plaquetas, com aumento da proliferação celular acompanhado de redução da expressão e atividade de ALP e ausência de mineralização da matriz extracelular (De Oliveira et al. 2008; De Oliva et al. 2009).

Não se pode descartar a possibilidade de a redução do potencial osteogênico das culturas derivadas do seio maxilar estar diretamente relacionada a uma menor população de células da linhagem osteoblástica presente nos sítios de enxertia no momento de instalação de implantes. Se isso se confirmasse, esse fenômeno tecidual poderia afetar negativamente o processo de formação óssea na região interfacial no período pós-implantação, assim como a remodelação óssea em períodos subsequentes, com potenciais repercussões clínicas, como, por exemplo, as de redução da altura óssea com progressiva pneumatização do seio maxilar (Hatano et al. 2004) e do contato osso-implante (Jensen et al. 2012a).

CONCLUSÃO

5 CONCLUSÃO

O enxerto de osso autógeno associado ao osso bovino inorgânico GenOx Inorg[®] para aumento do soalho do seio maxilar por período de 8 meses previamente à instalação de implantes de titânio permite a formação de um tecido cujas células, quando isoladas e cultivadas *in vitro*, exibem reduzida diferenciação osteoblástica mesmo crescidas em condições osteogênicas. Esses resultados, associados à inibição da atividade de ALP com a exposição direta de células osteogênicas ao GenOx Inorg[®], sugerem a necessidade de se modificarem os aspectos topográficos, de química e/ou energia de superfície desse material que favoreçam a diferenciação osteoblástica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Accorsi-Mendonça, T., Conz, M.B., Barros, T.C., de Sena, L.A., Soares, G. de A. & Granjeiro, J.M. (2008) Physicochemical characterization of two deproteinized bovine xenografts. *Brazilian Oral Research* **22**: 5-10.
- Araújo, M., Linder, E. & Lindhe, J. (2009) Effect of a xenograft on early bone formation in extraction sockets: an experimental study in dog. *Clinical Oral Implants Research* **20**: 1-6.
- Beloti, M.M., Martins, W. Jr., Xavier, S.P. & Rosa, A.L. (2008) In vitro osteogenesis induced by cells derived from sites submitted to sinus grafting with anorganic bovine bone. *Clinical Oral Implants Research* **19**: 48-54.
- Berglundh, T. & Lindhe, J. (1997) Healing around implants placed in bone defects treated with Bio-Oss. An experimental study in the dog. *Clinical Oral Implants Research* **8**: 117-124.
- Bernabé, P.F., Gomes-Filho, J.E., Cintra, L.T., Moretto, M.J., Lodi, C.S., Nery, M.J., Otoboni Filho, J.A. & Dezan, E. Jr. (2010) Histologic evaluation of the use of membrane, bone graft, and MTA in apical surgery. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontology* **109**: 309-314.
- Bernabé, P.F., Melo, L.G., Cintra, L.T., Gomes-Filho, J.E., Dezan, E. Jr. & Nagata, M.J. (2012) Bone healing in critical-size defects treated with either bone graft, membrane, or a combination of both materials: a histological and histometric study in rat tibiae. *Clinical Oral Implants Research* **23**: 384-388.
- Bernhardt, A., Lode, A., Peters, F. & Gelinsky, M. (2011) Novel ceramic bone replacement material Osbone[®] in a comparative *in vitro* study with osteoblasts. *Clinical Oral Implants Research* **22**: 651-657.
- Botticelli, D., Berglundh, T. & Lindhe, J. (2004) The influence of a biomaterial on the closure of a marginal hard tissue defect adjacent to implants. An experimental study in the dog. *Clinical Oral Implants Research* **15**: 285-292.
- Carmagnola, D., Berglundh, T., Araújo, M., Albrektsson, T. & Lindhe, J. (2000) Bone healing around implants placed in a jaw defect. Augmented with Bio-Oss. An experimental study in dogs. *Journal of Clinical Periodontology* **27**: 799-805.

- Chaushu, G., Mardinger, O., Calderon, S., Moses, O. & Nissan, J. (2009) The use of cancellous block allograft for sinus floor augmentation with simultaneous implant placement in the posterior atrophic maxilla. *Journal of Periodontology* **80**: 422-428.
- Cho-Lee, G.Y., Naval-Gias, L., Castrejon-Castrejon, S., Capote-Moreno, A.L., Gonzalez-Garcia, R., Sastre-Perez, J. & Munoz-Guerra, M.F. (2010) A 12-year retrospective analytic study of the implant survival rate in 177 consecutive maxillary sinus augmentation procedures. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **25**: 1019-1027.
- de Oliva, M.A., Maximiano, W.M., de Castro, L.M., da Silva, P.E. Jr., Fernandes, R.R., Ciancaglini, P., Beloti, M.M., Nanci, A., Rosa, A.L. & de Oliveira, P.T. (2009) Treatment with a growth factor-protein mixture inhibits formation of mineralized nodules in osteogenic cell cultures grown on titanium. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **57**: 265-276.
- de Oliveira, P.T., de Oliva, M.A., Maximiano, W.M., Sebastião, K.E., Crippa, G.E., Ciancaglini, P., Beloti, M.M., Nanci, A. & Rosa, A.L. (2008) Effects of a mixture of growth factors and proteins on the development of the osteogenic phenotype in human alveolar bone cell cultures. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **56**: 629-638.
- Del Fabbro, M., Testori, T., Francetti, L. & Weinstein, R. (2004) A systematic review of survival rates for implants placed in the grafted maxillary sinus. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry* **24**: 565-577.
- Ferreira, C.E., Novaes, A.B., Haraszthy, V.I., Bittencourt, M., Martinelli, C.B. & Luczyszyn, S.M. (2009) A clinical study of 406 sinus augmentations with 100% anorganic bovine bone. *Journal of Periodontology* **80**: 1920-1927.
- Galindo-Moreno, P., Moreno-Riestra, I., Avila, G., Fernández-Barbero, J.E., Mesa, F., Aguilar, M., Wang, H.L. & O'Valle, F. (2010) Histomorphometric comparison of maxillary pristine bone and composite bone graft biopsies obtained after sinus augmentation. *Clinical Oral Implants Research* **21**: 122-128.
- Gregory, C.A., Gunn, W.G., Peister, A. & Prockop, D.J. (2004) An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Analytical Biochemistry* **329**: 77-84.
- Hatano, M., Shimizu, Y. & Ooya, K. (2004) A clinical long-term radiographic evaluation of graft height changes after maxillary sinus floor augmentation with a 2:1 autogenous bone/xenograft mixture and simultaneous placement of dental implants. *Clinical Oral Implants Research* **15**: 339-345.

- Hausamen, J.E. & Neukam, F.W. (1992) Transplantation of bones. *European Archives of Otorhinolaryngology Supplement* **1**: 163-177.
- Herten, M., Rothamel, D., Schwartz, F., Friesen, K., Koegler, G. & Becker, J. (2009) Surface- and non-surface-dependent in vitro effects of bone substitutes on cell viability. *Clinical Oral Investigations* **13**: 149-155.
- Iezzi, G., Scarano, A., Mangano, C., Cirotti, B. & Piattelli, A. (2008) Histologic results from human implant retrieved due to fracture 5 years after insertion in a sinus augmented with anorganic bovine bone. *Journal of Periodontology* **79**: 192-198.
- Jensen, T., Schou, S., Gundersen, H.J.G., Forman, J.L., Terheyden, H. & Holmstrup, P. (2012a) Bone-to-implant contact after maxillary sinus floor augmentation with Bio-Oss and autogenous bone in different ratios in minipigs. *Clinical Oral Implants Research* **0**: 1-10. doi: 10.1111/j.1600-0501.2012.02438.x.
- Jensen, T., Schou, S., Stavropoulos, A., Terheyden, H. & Holmstrup, P. (2012b) Maxillary sinus floor augmentation with Bio-Oss or Bio-Oss mixed with autogenous bone as graft: a systematic review. *Clinical Oral Implants Research* **23**: 263-273.
- Kahnberg, K.E., Wallstrom, M. & Rasmusson, L. (2011) Local sinus lift for single-tooth implant. I. Clinical and radiographic follow-up. *Clinical Implant Dentistry and Related Research* **13**: 231-237.
- Kim, Y.K., Yun, P.Y., Kim, S.G., Kim, B.S. & Ong, J.L. (2009) Evaluation of sinus bone resorption and marginal bone loss after sinus bone grafting and implant placement. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontology* **107**: e21-e28.
- Klijn, R.J., Meijer, G.J., Bronkhorst, E.M. & Jansen, J.A. (2010) Sinus floor augmentation surgery using autologous bone grafts from various donor sites: a meta-analysis of the total bone volume. *Tissue Engineering Part B: Reviews* **16**: 295-303.
- Livak, K.L. & Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(t))} method. *Methods* **25**: 402-408.
- Lowry, O.H., Rosebrough N.J., Farr, A. & Randall R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* **193**: 265-275.

- Mladenovic, Z., Sahlin-Platt, A., Andersson, B., Johansson, A., Bjorn, E. & Ransjo, M. (2011) In vitro study of the biological interface of Bio-Oss: implications of the experimental setup. *Clinical Oral Implants Research* **0**: 1-7. doi:10.1111/j.1600-0501.2011.02334.x.
- Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* **65**: 55-63.
- Nkenke, E. & Stelzle, F. (2009) Clinical outcomes of sinus floor augmentation for implant placement using autogenous bone or bone substitutes: a systematic review. *Clinical Oral Implants Research* **20**(Suppl. 4): 124-133.
- Orsini, G., Traini, T., Scarano, A., Degidi, M., Perrotti, V., Piccirilli, M. & Piattelli, A. (2005) Maxillary sinus augmentation with Bio-Oss particles: a light, scanning, and transmission electron Microscopy study in man. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* **74**: 448-457.
- Patel, K., Mardas, N. & Donos, N. (2012) Radiographic and clinical outcomes of implants placed in ridge preserved sites: a 12-month post-loading follow-up. *Clinical Oral Implants Research* **0**: 1-7. doi: 10.1111/j.1600-0501.2012.02500.x.
- Sbordone, L., Toti, P., Menchini-Fabris, G., Sbordone, C. & Guidetti, F. (2009) Implant success in sinus-lifted maxillae and native bone: a 3-year clinical and computerized tomographic follow-up. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **24**: 316-324.
- Serra e Silva, F.M., Ricardo de Albergaria-Barbosa, J. & Mazzonetto, R. (2006) Clinical evaluation of association of bovine organic osseous matrix and bovine bone morphogenetic protein versus autogenous bone graft in sinus floor augmentation. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **64**: 931-935.
- Sohn, D.S., Kim, W.S., An, K.M., Song, K.J., Lee, J.M. & Mun, Y.S. (2010) Comparative histomorphometric analysis of maxillary sinus augmentation with and without bone grafting in rabbit. *Implant Dentistry* **19**: 259-270.
- Tadic, D. & Epple, M. (2004) A thorough physicochemical characterization of 14 calcium phosphate-based bone substitution materials in comparison to natural bone. *Biomaterials* **25**: 987-994.
- Trubiani, O., Fulle, S., Traini, T., Paludi, M., la Rovere, R., Orciani, M., Caputi, S. & Piattelli, A. (2010) Functional assay, expression of growth factors and proteins modulating bone-arrangement in human osteoblasts seeded on an anorganic bovine bone biomaterial. *European Cells & Materials* **20**: 72-83.