

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO EM PRÓTESE DENTÁRIA

DANIEL GONÇALVES BOECKEL

**ENSAIO DE CITOTOXICIDADE DO ÁCIDO HIALURÔNICO COMO VEÍCULO NO
COMPOSTO CELULAR AUTÓGENO PARA ENXERTIA ÓSSEA**

PORTO ALEGRE

2011

DANIEL GONÇALVES BOECKEL

**ENSAIO DE CITOTOXICIDADE DO ÁCIDO HIALURÔNICO COMO VEÍCULO NO
COMPOSTO CELULAR AUTÓGENO PARA ENXERTIA ÓSSEA**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Odontologia, na área de Prótese Dentária, pelo Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia, da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Linha de Pesquisa: Técnicas e Aparelhos em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Rolim Teixeira

PORTO ALEGRE

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

B669e Boeckel, Daniel Gonçalves

Ensaio de citotoxicidade do ácido hialurônico como veículo no composto celular autógeno para enxertia óssea. / Daniel Gonçalves Boeckel. – Porto Alegre, 2011. 72 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Prótese Dentária) – Faculdade de Odontologia, PUCRS. Orientação: Prof. Dr. Eduardo Rolim Teixeira.

1. Odontologia. 2. Materiais Dentários. 3. Citotoxicidade. 4. Ácido Hialurônico. 5. Regeneração Óssea. 6. Enxertos Ósseo. 7. Engenharia de Tecidos. I. Teixeira, Eduardo Rolim. II. Título.

CDD 617.692

Bibliotecária Responsável:

Cíntia Borges Greff - CRB 10/1437 – E-mail: norma.abnt@gmail.com

À minha profissão de odontólogo e à comunidade científica
dedico esta pesquisa.

AGRADECIMENTOS

A DEUS.

Pela minha vida, de meus familiares e de meus amigos.

À minha esposa, **Mariana Fürst**, que sempre acreditou na minha capacidade e sempre me incentivou nas horas difíceis.

À toda minha família, em especial, a minha irmã, **Mariana Boeckel**, que sempre foi um exemplo na docência universitária.

Ao meu grande amigo e colega de consultório e atendimento domiciliar, **Prof. Luiz Alberto De Lorenzi Arteche**. Nos momentos difíceis, sempre tive seu consolo e incentivo.

Agradeço meu orientador, **Prof. Dr. Eduardo Rolim Teixeira**, por sugerir um assunto pouco pesquisado na área de prótese dentária e abrir meus horizontes. Valeu!!!

À toda equipe do Laboratório de Diferenciação, Proliferação e Viabilidade Celular do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Principalmente à coordenadora deste departamento **Prof^a. Dr^a. Fátima Guma** e alunos do programa de pós-graduação **Sílvia Resende Terra** e **Leo Anderson Meira Martins**. Sem vocês esta dissertação não teria sido possível.

À Faculdade de Odontologia da PUCRS, na pessoa do seu diretor **Prof. Marcos Túlio Mazzini de Carvalho**, pela excelência do ensino.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da PUCRS, na pessoa de seu coordenador, **Prof. Dr. José Antonio Poli de Figueiredo**.

Ao CNPq por disponibilizar a oportunidade de realizar esta pesquisa e curso.

Ao Departamento de Histologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, ao ajudar a interpretar as imagens microscópicas celulares.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da PUCRS, principalmente à **Prof^a. Dra Rosemary Shinkai**, pelos seus ensinamentos e conhecimentos transmitidos.

Aos funcionários do programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da PUCRS.

Ao Instituto IDEA, pela orientação na obtenção das imagens microscópicas obtidas, principalmente ao **Sr. Arno**.

À bibliotecária **Cíntia Borges Greff**, por toda sua dedicação.

À minha professora de língua Inglesa **Profª. Elaine Schmitz**, pela sua excelência no ensino.

*Suba o primeiro degrau com fé. Não é necessário que você veja toda a escada.
Apenas dê o primeiro passo.*

Martin Luther King

RESUMO

A engenharia tecidual, dispondo de células, matrizes biocompatíveis e fatores de crescimento, pode exercer um grande papel na regeneração óssea. Através de biopsias de tecido vivo, pode-se obter células-tronco mesenquimais que, quando expandidas e cultivadas *in vitro*, são capazes de originar tecidos de diversos fenótipos. Desta maneira, é possível estabelecer uma alternativa aos enxertos ósseos, uma vez que a quantidade de material coletado é menor quando comparada aos enxertos ósseos convencionais. Essa pesquisa visou contribuir para a melhor escolha de uma matriz biocompatível, avaliando *in vitro*, de forma direta, a citotoxicidade do ácido hialurônico TEOSYAL® sobre as células da linhagem pré-osteoblástica de camundongos denominadas OFCOL II de forma quantitativa e qualitativa. Foram criados os seguintes grupos experimentais: A) células + Ácido hialurônico (AH) + Plasma rico em Plaquetas com Trombina (PRP) + Hidroxiapatita (HP); B) células + AH + PRP + HP; C) células + AH + HP; D) células + HP; E) células + AH; F) células + PRP com trombina; G) células + PRP e H) células + DMEM puro com 15% de soro bovino fetal, utilizado como controle. As células OFCOL II foram semeadas 24 horas antes dos experimentos e incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Após atingirem a semi-confluência, as células foram expostas aos diferentes estímulos conforme o grupo experimental por um período adicional de 48 horas nas mesmas condições de temperatura e umidade. A viabilidade celular foi avaliada através do teste MTT e comparada ao grupo controle H. Os valores numéricos, obtidos através de absorbância, foram submetidos à análise estatística ANOVA, complementados por TUKEY, com nível de significância $p < 0,05$ para comparação entre todos os grupos. Já para as comparações entre cada grupo experimental e o controle foi utilizado o Teste T. Na avaliação da morfologia celular, foi utilizada a microscopia óptica em aumento de 100x e 200x. Os resultados encontrados comprovaram uma diminuição na viabilidade celular nos grupos B (67% de viabilidade) e C (68% de viabilidade), diferindo do grupo D (99% de viabilidade). Ao comparar cada grupo experimental ao grupo controle, foi obtida uma diferença estatística ($p < 0,05$) para os grupos B, C e E. Portanto, foi observado, através destes resultados, uma diminuição da viabilidade celular nos grupos com a presença do ácido hialurônico TEOSYAL®. A adição do PRP ao ácido hialurônico aumentou a

viabilidade celular, já que foi obtida uma viabilidade de 79% (grupo A), porém, insuficiente para potencializá-la. Nas imagens, foram encontradas diferenças morfológicas entre os grupos experimentais e o grupo controle. Pode-se concluir que a presença do ácido hialurônico TEOSYAL® causou diminuição na viabilidade da linhagem celular OFCOL II.

Palavras-chave: Citotoxicidade. Ácido Hialurônico. Regeneração Óssea. Enxertos Ósseos. Engenharia de Tecidos. Plasma Rico em Plaquetas. Hidroxiapatita

ABSTRACT

Tissue engineering, using pluripotent cells, biocompatible matrixes and growth factors, may play a major role in bone regeneration. Through living tissue biopsy, it is possible to obtain mesenchymal stem cells that, when expanded and cultivated *in vitro*, can generate several types of tissues. Thus, it is possible to present an alternative to bone grafts, since the amount of material collected is smaller when compared to conventional bone grafts. The present research aimed to find a better biocompatible matrix, evaluating, *in vitro*, the cytotoxicity of TEOSYAL® hyaluronic acid directly onto pre-osteoblastic lineage mouse cells denominated OFCOL II, in a quantitative and qualitative way. The following experimental groups have been formed: A) Cells + Hyaluronic Acid (HA) + Platelet Rich Plasma with thrombin (PRP) + Hydroxyapatite (HP); B) Cells + HA + PRP + HP; C) Cells + HA + HP; D) Cells + HP; E) Cells + HA; F) Cells + PRP with thrombin; G) Cells + PRP and H) Pure DMEM with 15% of Fetal Bovine Serum (FBS), used as a positive control. The OFCOL II cells were seeded 24 hours before the experiments and incubated at 37°C with 5% CO₂. After reaching the semi-confluence, the cells were exposed to the experimental groups for an additional period of 48 hours under the same temperature and humidity conditions. The cellular viability was evaluated through MTT test and compared to the positive control group H. The numerical values, obtained in absorbance, were subjected to statistical analysis of variance (ANOVA), complemented by TUKEY test, with significance level $p < 0.05$ for comparison between all groups. As for comparisons between the control and each experimental group, the T test was used. In the cell morphology evaluation, it was used optical microscopy at magnification 100x. The results proved a decrease in cell viability in groups B (67% viability) and C (68% viability), differing from group D (99% viability). When comparing each experimental group to the positive control group, a statistical difference ($p < 0.05$) was obtained for groups B, C and E. Therefore, through these results, it was observed a decrease in cellular viability in the groups with the presence of TEOSYAL® hyaluronic acid. The addition of PRP to hyaluronic acid improved cell viability since it was possible to obtain a survival rate of 79% (group A), although this stimulus was insufficient to enhance it. Regarding image analysis, morphological changes were found in experimental groups and control group. It is possible to

conclude that the presence of TEOSYAL® hyaluronic acid exerted a decrease effect on the cell lineage OFCOL II viability.

Key words: Cytotoxicity. Hyaluronic Acid. Bone Regeneration. Bone Grafts. Tissue Engineering. Platelet Rich Plasma. Hydroxyapatite.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fórmula Molecular do ácido hialurônico formado pela cadeia de dissacarídeos	27
Figura 2: Capela de fluxo laminar vertical	38
Figura 3: Placa de 96 wells OFCOL II (5×10^3) em 21 μ l de DMEM 15%	39
Figura 4: Incubadora de CO ₂ , a qual mantém a temperatura de 37° C, com 5% de CO ₂ e 95% de O ₂	39
Figura 5: Gráfico da Curva de Concentração	41
Figura 6: Preparação PRP e Trombina Humana (1 ^a Centrifugação)	43
Figura 7: Preparação PRP e Trombina Humana (2 ^a Centrifugação)	43
Figura 8: Placa de 96 wells	45
Figura 9: Espectofotômetro para leitura MTT	47
Figura 10: Gráfico de Absorbância	50
Figura 11: Gráfico de Viabilidade Celular	52
Figura 12: Fotomicrografia dos grupos A, C, D, E, F e H (com aumento de 100x) ...	53
Figura 13: Fotomicrografia dos grupos A, F e H (com aumento de 200x)	55
Figura 14: Fotomicrografia do grupo C com cristais de <i>Formazan</i> intra-celulares	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Média e Desvio Padrão de Absorbância da Curva de Concentração.....	40
Tabela 2: Média e Desvio Padrão de Absorbância dos Grupos A, B, C, D, E, F, G e H.....	49
Tabela 3: Média e Desvio Padrão da Viabilidade Celular	51

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	porcentagem
®	marca registrada
°C	graus celsius
µg	micrograma
µl	microlitro
µm	micrômetro
AH	ácido hialurônico
ANOVA	análise de variância
BMP	proteínas ósseas morfogênicas
CAPSS	sistema separador avançado compacto de plaquetas
Céls	células
CMF-PBS	solução salina tamponada sem cálcio e sem magnésio
CO ₂	dióxido de carbono
CTM	células-tronco mesenquimais
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	<i>dimetil sulfóxido</i>
EUA	Estados Unidos da América
FBS	soro bovino fetal
g	força gravitacional
HP	hidroxiapatita
IGF-I	fator de crescimento similar à insulina
kDa	kilo Dalton
mg	miligrama
min	minutos
ml	mililitro

MSC-TA	células-tronco mesenquimal de tecido adiposo
MTT 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2il-tetrazólico	metil tetrazolium
nm	nanômetro
NY	Nova York
D.O	densidade óptica
O ₂	oxigênio
PBS	salina tamponada com fosfato
PDGF	fator de crescimento derivado de plaquetas
ph	potencial hidrogeniônico
PPP	plasma pobre em plaquetas
PRP	plasma rico em plaquetas
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
TCP	tricálcio fosfato
TGF-β	fator de crescimento transformador beta
UV	ultravioleta
Well	poço
β	beta
β-TCP	beta-tricálcio fosfato
α	alfa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 ENGENHARIA TECIDUAL.....	20
2.2 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS	23
2.3 ÁCIDO HIALURÔNICO.....	26
2.4 HIDROXIAPATITA	30
2.5 PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP).....	32
2.6 CITOTOXICIDADE DOS MATERIAIS.....	34
2.7 AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE ATRAVÉS DO MTT	34
3 OBJETIVOS.....	36
3.1 OBJETIVO GERAL	36
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
4 METODOLOGIA	37
4.1 DESENHO DO ESTUDO	37
4.2 ASPECTOS BIOÉTICOS	37
4.3 OBTENÇÃO DAS CÉLULAS PRÉ-OSTEOBLÁSTICAS DA LINHAGEM OFCOLII.....	37
4.4 APLICAÇÃO DO ÁCIDO HIALURÔNICO	40
4.5 OBTENÇÃO E PREPARO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS	42
4.6 APLICAÇÃO DA HIDROXIAPATITA.....	44
4.7 DISPOSIÇÃO DAS AMOSTRAS	44
4.8 ANÁLISE DO METABOLISMO CELULAR (MTT)	47
4.9 ANÁLISE DA MORFOLOGIA CELULAR ATRAVÉS DA MICROSCOPIA ÓPTICA.....	48
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	48
5 RESULTADOS.....	49

5.1 TESTE MTT	49
5.2 ANÁLISE DA MORFOLOGIA ATRAVÉS DA MICROSCOPIA OPTICA	52
6 DISCUSSÃO	57
7 CONCLUSÃO	61
REFERÊNCIAS.....	62
ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO CIENTÍFICA E DE ÉTICA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA PUCRS	71
ANEXO B – CARTA DO BANCO DE CÉLULAS OFCOL II.....	72

1 INTRODUÇÃO

A reposição de grandes perdas ósseas é um grande desafio clínico para os cirurgiões (MOORE; GRAVES; BAIN, 2001). Mais de 2,2 milhões de procedimentos de enxertos ósseos são realizados anualmente ao redor do mundo no campo odontológico, na neurocirurgia e na ortopedia (GIANNOUDIS; DINOPOULOS; TSIRIDIS, 2005). Seguindo esta tendência, a popularidade da utilização dos implantes dentais trouxe uma demanda ainda maior na reconstrução óssea da região dento-alveolar (KAO; SCOTT, 2007).

Tratando-se de enxertos ósseos, existem quatro grandes propriedades que o material ideal deve apresentar: osteointegração, habilidade do tecido ósseo aderir à superfície do material sem a formação de tecido fibroso; osteocondução, habilidade de suportar e orientar o crescimento ósseo sobre a superfície do material; osteoindução, capacidade de induzir células-tronco mesenquimais a se diferenciarem em células de fenótipo osteoblástico e; por último, a osteogênese, capacidade de formação de novo tecido ósseo através de células osteoblásticas, presentes no material do enxerto (MOORE; GRAVES; BAIN, 2001).

Um dos pré-requisitos para reabilitações orais que envolvam osseointegração é a presença de um processo alveolar remanescente, capaz de permitir a instalação de implantes dentais, suficiente para suportar uma prótese funcional por um longo período de tempo. Por essa razão, vários materiais têm sido testados nas alternativas para reconstrução óssea. Ao serem classificados estes enxertos conforme sua origem, têm-se os autógenos, os alógenos, os xenógenos e os sintéticos (BEAMAN et al, 2006; KAO; SCOTT, 2007; GIANNOUDIS; DINOPOULOS; TSIRIDIS, 2005).

Os enxertos alógenos são retirados de indivíduos da mesma espécie do hospedeiro, porém com diferente genótipo. O material alógeno retirado para enxertia sofre diferentes processos, visando permitir sua utilização clínica, tais como debridamento físico, lavagem ultrassônica, tratamento com óxido de etileno, lavagem com antibióticos e irradiação gama, visando à eliminação de esporos. Devido a esses processos, muitas das propriedades biológicas, mecânicas e osteoindutivas do material são perdidas e/ou significativamente reduzidas,

influenciando negativamente sua resposta clínica (GIANNOUDIS; DINOPOULOS; TSIRIDIS, 2005).

Já, os enxertos xenógenos possuem origem genética diferente do hospedeiro, sendo os de origem bovina os mais utilizados na clínica odontológica. Ainda, encontram-se disponíveis os materiais sintéticos biocerâmicos (KAO; SCOTT, 2007). Por último, temos os enxertos de origem autógena, ditos como os biomateriais de melhor resposta clínica quanto à quantidade de tecido neoformado (MOORE; GRAVES; BAIN, 2001), visto que possuem propriedades como osteogênese, osteoindução e osteointegração. A presença de células osteoprogenitoras, nos enxertos autógenos, proporciona a formação de tecido ósseo novo, uma vez que a presença de elementos medulares facilita a fusão com proteínas osteoindutivas, com células de potencial osteogênico e suporte sanguíneo local (GIANNOUDIS; DINOPOULOS; TSIRIDIS, 2005; MELLONIG, 1999; GREENWALD et al., 2001; BEAMAN et al., 2006). Entretanto, apesar da boa resposta clínica, os enxertos autógenos apresentam limitações em seu emprego clínico devido a fatores como morbidade do sítio doador e quantidade de material disponível (ITO et al., 2006; YAMADA et al., 2004a). Além disso, 8 a 20% dos enxertos autógenos estão associados a complicações pós-operatórias que incluem hematomas, perda sanguínea, injúria de nervos e vasos, formação de hérnias, infecções, fraturas e, também, algumas vezes, dor crônica no local doador (ROSS; TACCONI; MILES, 2000).

Como podemos observar, muitas desvantagens podem ocorrer no emprego dos biomateriais nas mais variadas técnicas em enxertia existentes até os dias de hoje. Após muitos anos de utilização de enxertos ósseos de forma convencional, a cultura de células *in vitro*, coletadas de seres vivos, tem como objetivo sua expansão e diferenciação *in vitro* em linhagem osteogênica, para aplicação em técnicas de engenharia tecidual. (UEDA et al., 2008).

A engenharia tecidual é a definição utilizada para descrever a produção de tecidos através da cultura de células semeadas em matrizes reabsorvíveis porosas. Diversos tipos de células, assim como as células ósseas, podem proliferar e manter seus fenótipos quando cultivados, primeiramente, em substratos bidimensionais, e em matrizes porosas ou géis tridimensionais *in vitro* (KAIGLER; MOONEY, 2001; SPECTOR, 1999).

Na tentativa de encontrar a matriz ideal em que ocorra a proliferação e a diferenciação celular, associados ou não a fatores indutores, diversos materiais já foram testados. Em pesquisas para a bioengenharia óssea surge a necessidade de um material que consiga manter as células-tronco mesenquimais no local a ser enxertado com ganho de volume (JAISWAL et al., 1997).

Em virtude da ausência de pesquisas no desempenho da utilização do ácido hialurônico como veículo aplicável às técnicas de enxertia envolvendo engenharia tecidual, o presente estudo objetiva avaliar a proliferação e a morfologia celular de células pré-osteoblásticas na presença deste material. Além disso, não existe na literatura atual um consenso na formulação ideal do ácido hialurônico, já que alguns estudos apontam uma diminuição na viabilidade celular (BODO et al., 1993; HARVIMA et al., 2006), enquanto outros indicam um aumento (YONEDA et al., 1988; KAWASAKI et al., 1999). Portanto a presente pesquisa avaliou, *in vitro*, um composto formado por células pré-osteoblásticas e uma matriz de ácido hialurônico como meio de proporcionar um aumento volumétrico sem a necessidade de busca de quantidade maior de tecido vivo para tal. Desta maneira, em um primeiro momento, foi realizada a avaliação da citotoxicidade da matriz de ácido hialurônico nestas citadas células de forma quantitativa e qualitativa.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ENGENHARIA TECIDUAL

Diversas pesquisas, tanto em animais, como em seres humanos foram desenvolvidas na tentativa de regenerar o tecido ósseo com a mínima invasão de tecidos, boa plasticidade e sem reações adversas, na busca de uma alternativa aos enxertos ósseos autógenos convencionais (UEDA et al., 2005). A engenharia tecidual, através de células vivas, matrizes celulares e fatores de crescimento proporciona a reposição de muitos tecidos perdidos por diversas causas (VACANTI J.; VACANTI C., 2000).

A engenharia tecidual como terapia aplicável na clínica odontológica apresenta-se como um tratamento potencial na reparação de diversos tecidos da cavidade oral, como tecido ósseo, cartilagem, pele, mucosa oral, dentina, polpa dental e glândulas salivares (KAIGLER; MOONEY, 2001). Relacionados aos avanços desta área, novas alternativas para os enxertos autógenos convencionais surgiram através de técnicas utilizando a manipulação celular ex vivo, conjugadas ou não ao emprego de fatores de crescimento (YAMADA et al., 2004b).

A estratégia comumente empregada em engenharia tecidual exige a biópsia de tecido vivo, que contenha células de interesse ao sítio receptor. A partir dessa coleta, desenvolveram-se culturas celulares em laboratório, as quais foram expandidas e semeadas em matrizes poliméricas para, posteriormente, serem reinseridas no organismo (KAIGLER; MOONEY, 2001). A tríade que compõe a engenharia de tecidos, com objetivo reparador, é formada por: matriz (géis, fibras, membranas), células progenitoras (células-tronco indiferenciadas ou com diferenciação induzida) e fatores de crescimento (BELL, 2000; LYNCH, 1999).

Diversas técnicas experimentais de engenharia tecidual foram testadas por diferentes pesquisadores (VACANTI, 2006), surgindo a técnica do osso injetável como possível alternativa às técnicas de enxertia óssea na regeneração dos defeitos crânio-faciais. A presente técnica desenvolveu-se a partir da aspiração de medula óssea com o intuito de se obter células-tronco mesenquimais, as quais foram posteriormente expandidas ex vivo e diferenciadas em células de fenótipo

osteoblástico. Adicionando-se a esse conteúdo celular plasma sanguíneo rico em plaquetas, obteve-se, logo após, a formação de um composto celular em estado de gel (HIBI et al., 2006a; UEDA et al., 2005; YAMADA et al., 2004b).

Na busca científica para o desenvolvimento do osso injetável, diversas pesquisas foram conduzidas e apresentaram resultados promissores. Entre elas, Yamada et al. (2004b) compararam a osteogênese entre três grupos: o do osso injetável com células tronco mesenquimais (CTM) associadas ao plasma rico em plaquetas, o grupo apenas com plasma rico em plaquetas (PRP) e o grupo contendo osso medular particulado autógeno. Entre estes, o que apresentou maior índice de osteogênese foi o grupo que aplicou a técnica de osso injetável.

Em outro estudo realizado por Ohya et al., (2005) com a duração de 8 semanas, em ratos, utilizando a técnica do osso injetável, foi constatado que o complexo de células-tronco mesenquimais (CTM) associadas a plasma rico em plaquetas proporcionou maior aumento de volume ósseo na 4^o e na 8^o semanas. Isto foi demonstrado, quando comparado ao complexo de osso cortical e medular particulado, também associado ao plasma rico em plaquetas no mesmo período de tempo. Com o objetivo de avaliar as propriedades mecânicas do osso injetável em cães, através do teste de dureza Vickers, Ito et al. (2005) obtiveram melhores resultados de dureza no grupo teste com células-tronco mesenquimais e plasma rico em plaquetas, quando comparado aos demais enxertos: osso autógeno, osso bovino (Bio-Oss®) e o grupo com apenas defeito ósseo (controle).

O sucesso da engenharia tecidual na reconstrução de tecidos ósseos não foi comprovado apenas nas pesquisas com animais. Recentemente, foi justificada a utilização do osso injetável com índice de sucesso de 100% dos implantes inseridos no osso neoformado. Os resultados clínicos deste estudo com 14 pacientes comprovaram a diminuição no tempo de osseointegração e a possibilidade da instalação simultânea dos implantes juntamente com o osso injetável (UEDA et al., 2008).

Várias estratégias têm sido adotadas para o aumento ósseo com a finalidade de instalação de implantes dentários. Dentre as estratégias propostas, também existe a distração osteogênica, método de alongamento pela modulação do calo ósseo, que pode ser associada à engenharia tecidual (PINTO et al., 2004). Através desta associação, Kinoshita et al. (2008) isolaram e cultivaram células-tronco mesenquimais autógenas de ratos. Este composto celular associado ao plasma rico

em plaquetas formou um material osteogênico aplicado logo após a distração osteogênica. Os resultados deste trabalho, através de análise radiológica e histomorfométrica, mostraram uma maior radiodensidade e maior volume de formação óssea nos tecidos que tiveram aplicação de material osteogênico quando comparado aos tecidos que tiveram apenas aplicação de PRP após a distração osteogênica prévia.

A regeneração óssea, através da engenharia tecidual, coadjuvante na cicatrização da distração osteogênica e formação do calo ósseo, também vem demonstrando resultados positivos em casos clínicos. Hibi et al. (2006a) no relato de caso clínico em que associou distração osteogênica com aplicação de material osteogênico autógeno conseguiram bons resultados. Através da aplicação do osso injetável para reconstrução da mandíbula com grande perda óssea, constataram formação óssea de forma tridimensional e diminuição no período de consolidação. Com o sucesso do tecido ósseo neoformado, após três meses, foi possível, no presente estudo, a instalação de 6 implantes de 18 mm de altura, com sua perfeita cicatrização para confecção da prótese dentária. Portanto, diversos estudos têm comprovado que células com potencial osteogênico, quando injetadas dentro do calo da distração diminuem o tempo de cicatrização, evitando defeitos ósseos (KINOSHITA et al., 2008; TSUBOTA et al., 1999; TAKAMINE et al., 2002).

A instalação de implantes, logo após extrações dentárias, vem sendo um desafio na odontologia, já que os alvéolos dentários, em muitas situações, apresentam defeitos ósseos. Na busca de soluções para estes defeitos, a bioengenharia óssea também vem sendo testada através de estudos com objetivo de instalar implantes um mês após a extração. Ito et al. (2005) apresentaram bons resultados com a instalação simultânea dos implantes e a aplicação da regeneração óssea através da técnica do osso injetável. Neste estudo, o grupo que utilizou células-tronco mesenquimais, plasma rico em plaquetas e fibrina mostrou melhores resultados em relação aos demais enxertos testados. Foram encontradas diferenças significativas por meio da avaliação histológica e histomorfométrica através do índice do contato existente entre o osso e o implante, com melhores desempenhos na técnica do osso injetável após um mês depois a extração.

A reabilitação da maxila severamente reabsorvida, através de implantes osteointegrados, é atualmente um desafio da implantodontia. Com o intuito de solucionar esta falta de tecido ósseo na região de maxila posterior, pode-se utilizar a

técnica do osso-injetável na elevação do seio maxilar, proporcionando uma diminuição no período de cicatrização e maior formação de tecido ósseo quando comparado com outros enxertos (UEDA et al., 2008; OHYA et al., 2005). Por último, também foi relatada a utilização da técnica do osso injetável na reconstrução de fendas maxilares, resultado de defeitos congênitos, com excelentes resultados na regeneração óssea (HIBI et al., 2006b).

2.2 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

Na atualidade, existe um grande interesse no desenvolvimento de técnicas para a manipulação de células-tronco, com o objetivo de proporcionar tratamentos restauradores de tecidos e órgãos (ZAGO, 2006). Terapias baseadas nestas células para reparação e regeneração de vários tecidos e órgãos proporcionam soluções terapêuticas para um grande número de casos em que ocorreram danos e perdas de tecidos (MIZUNO, 2009).

Existem dois grandes grupos de células-tronco potencialmente aplicáveis na engenharia de tecidos: as células-tronco embrionárias pluripotentes e as linhagens de células-tronco adultas unipotentes ou multipotentes, que residem nos tecidos diferenciados (ZUK et al., 2001). As células-tronco embrionárias encontradas no blastocisto e nas células germinativas primordiais possuem alta plasticidade, já que dão origem a todos os tipos de células (DRAPER; FOX, 2003). Por outro lado, células-tronco mesenquimais encontradas na medula óssea podem produzir osteócitos, condrócitos, adipócitos, tenócitos, mioblastos e células estromais (HORWITZ, 2003).

Apesar das células-tronco embrionárias darem origem a uma grande variedade de linhagens celulares e, teoricamente, serem muito benéficas na engenharia tecidual, há várias limitações para o seu uso devido à sua regularização, às considerações éticas e à manipulação genética (MIZUNO, 2009). Além disso, conforme aplicação das leis existe uma restrição no manuseio de células-tronco embrionárias, fazendo com que pesquisadores utilizem células-tronco adultas na regeneração e reconstrução de tecidos ósseos, pulpares e periodontais da região craniofacial (RISBUD; SHAPIRO, 2005). Neste sentido, células-tronco adultas são

mais facilmente disponibilizadas e não apresentam problemas éticos e imunorreativos, quando utilizadas de forma autógena (MIZUNO, 2009).

Mesmo apresentando diversas vantagens, a coleta das células-tronco mesenquimais da medula óssea está associada a consequências dolorosas no local de coleta e baixo rendimento no número de células coletadas. No entanto, células-tronco adultas originárias de tecido adiposo são igualmente capazes de se diferenciar em células e tecidos de origem mesodermal. Dessa forma, no paciente sob anestesia local, é possível fazer a coleta de grande quantidade dessas células com um alto potencial de diferenciação necessárias para a aplicação em terapias celulares e engenharia tecidual (MIZUNO, 2009).

Em adição a estas qualidades descritas anteriormente, as células-tronco mesenquimais são fáceis de ser isoladas e expandidas *in vitro*, possuem um alto potencial proliferativo, fácil armazenamento em condições de congelamento, não alterando seu potencial osteogênico e, fácil aderência a superfícies plásticas (LOGEART-AVRAMOGLOU et al., 2005). A indução à formação óssea destas células está diretamente relacionada à presença de proteínas ósseas morfogênicas pertencentes à família TGF- β (fator de crescimento transformador beta) e à quantidade de células viáveis para desencadear a cascata do desenvolvimento ósseo, como no processo de desenvolvimento embriológico (RIPAMONTI; HELIOTIS; FERRETTI, 2007). Quando cultivadas *in vitro*, podem ser colocadas previamente em meio de cultura, para induzir a osteogênese, como por exemplo, o meio composto por o meio de cultura DMEM (Meio Essencial Mínimo Modificado por Dulbecco) suplementado com soro fetal bovino, ácido ascórbico, dexametasona e β -glicerolfosfato (JAISWAL et al., 1997).

Mesmo sabendo que diversos estudos têm concentrado esforços em terapias celulares de tecido ósseo, inúmeras técnicas através engenharia tecidual também vêm sendo desenvolvidas para promover a regeneração periodontal. Com esse objetivo, Tobita et al (2008) comprovaram em ratos que a aplicação de células-tronco mesenquimais de origem adiposa, associadas a plasma rico em plaquetas e implantadas em defeitos periodontais, promoveram a regeneração do tecido ósseo e do cemento periodontal. Os melhores resultados desse estudo foram comprovados após 8 semanas, com a confirmação através das análises histológicas e imunohistoquímicas.

A medicina regenerativa também vem avaliando a possibilidade da utilização de células de origem adiposa, principalmente, em cirurgias ortopédicas, quando há grandes perdas ósseas devido a traumas, infecções, tumores e defeitos congênitos. Com esse intuito, Arrigoni et al. (2009), em seu experimento, isolaram, caracterizaram e analisaram a diferenciação de células-tronco de origem adiposa de coelhos, ratos e porcos. Após a exposição ao estímulo osteogênico, essas células apresentaram um aumento significativo na expressão dos marcadores ósseos, como fosfatase alcalina, depósito de cálcio extracelular, osteocalcina e osteonectina.

Em outra pesquisa, células-tronco mesenquimais de porcos foram isoladas, cultivadas em matriz de ácido poli-dl-láctico-coglicólico e incubadas por dez dias em meio osteogênico. Logo após este período, as amostras foram transplantadas para defeitos ósseos mandibulares induzidos cirurgicamente e, após seis semanas, foram realizadas análises histológicas, clínica e radiográfica. Observou-se que os defeitos ósseos foram preenchidos por um tecido denso semelhante ao osso, apresentando osteoblastos, osteócitos, vasos sanguíneos e osso trabeculado (ABUKAWA et al., 2004).

Diversas pesquisas confirmam a utilização, cada vez maior, de células-tronco mesenquimais humanas de origem adiposa, uma vez comprovada sua diferenciação em multilinhagens, como, por exemplo, células ósseas (COWAN et al., 2004), células cardíacas (MIYAHARA et al., 2006) e células neurais (KANG et al., 2003).

Conforme cresce o emprego de células-tronco mesenquimais adiposas como fonte celular para aplicação na bioengenharia, estudos adicionais para a sua coleta vêm se desenvolvendo. Por exemplo, Aksu et al. (2008) compararam o potencial osteogênico em relação ao sexo e à região anatômica de células adiposas coletadas da espécie humana. Com seus resultados, chegou-se à conclusão de que células-tronco adiposas coletadas da região abdominal superficial do sexo masculino são mais eficientes na busca da osteogênese.

Juntamente às células-tronco mesenquimais, também pode-se adicionar proteínas ósseas morfogênicas (BMPs). Sua aplicação na engenharia tecidual dos tecidos periodontais ficou comprovada no estudo de Ripamonti e Reddi (1997), através da regeneração do tecido ósseo, ligamento periodontal e cimento. Portanto, a proteína óssea (BMP-7), em conjunto com uma matriz carreadora, induz à cementogênese com a inserção das fibras de Sharpey's no novo cimento formado.

Um grande número de trabalhos com o objetivo de isolar, cultivar e armazenar células de diversas origens vem sendo realizado para uso em pesquisas. Balduino et al. (2005) dissecaram 30 camundongos, na Universidade Federal do Rio de Janeiro, com o intuito de isolar duas populações celulares distintas: reticulócitos (F-RET) e osteoblastos (OFCOL II) de fragmentos livres do periósteo do fêmur, através de duas etapas da digestão da colagenase. Essas duas linhagens celulares mesenquimais apresentaram marcadores osteogênicos: osteopontina, osteonectina, sialoproteína óssea e fosfatase alcalina.

2.3 ÁCIDO HIALURÔNICO

A matriz é essencial para a engenharia tecidual, porque é ela que fornece o arcabouço necessário para o transporte de nutrientes, oxigênio e resíduos metabólicos. Esse arcabouço deve ser biocompatível, não irritante e resistente. Além destas características básicas, a matriz, quando utilizada na engenharia tecidual, deve facilitar a aderência, a migração, a proliferação e a diferenciação das células-tronco mesenquimais (MUSCHLER; NAKAMOTO; GRIFFITH, 2004).

Várias matrizes e carreadores celulares têm sido testados como veículos capazes de recrutar um número suficiente de células, citocinas e fatores de crescimento no local do tecido a ser reparado/reconstituído. Nos dias atuais, dispõe-se de matrizes naturais e sintéticas que devem possuir propriedades como biocompatibilidade, biodegradabilidade e capacidade de incorporação de moléculas ou permitir a colonização celular dentro de sua estrutura. As características físicas, químicas e mecânicas dos carreadores celulares são de fundamental importância para a correta ligação com o tecido que se quer alcançar ou regenerar (SOLCHAGA et al., 1999). A regeneração de tecidos lesados requer a presença, no local da lesão, de células progenitoras com a habilidade de proliferar e diferenciar em fenótipos apropriados para restaurar o tecido faltante ou danificado. Quando essas células progenitoras estão ausentes, uma ferida reparativa é formada, restabelecendo a continuidade do tecido, mas de estrutura desorganizada e com características funcionais diferentes do tecido original (SOLCHAGA et al., 1999; SPECTOR, 1999).

Recentemente, o ácido hialurônico tem sido utilizado como um ótimo veículo de células-tronco mesenquimais, sendo que diversas modificações em sua estrutura podem ser realizadas, quando empregado na engenharia tecidual (PRESTWICH et al., 1998; BULPITT, AESCHLIMANN, 1999).

O ácido hialurônico é formado por uma cadeia de dissacarídeos repetidos contendo ácido glicurônico e n-acetilglicosamina. Possui função essencial na estrutura e na organização da matriz extracelular. Sua capacidade de hidratação permite a abertura de espaços nos tecidos, facilitando um processo de descolamento celular e conseqüentemente permitindo a migração celular (STERN et al., 1999). Sua forma nativa com elevado peso molecular ($> 2 \times 10^3$ kDa) é representada pela formulação abaixo, conforme Bulpitt e Aeschlimann (1999).

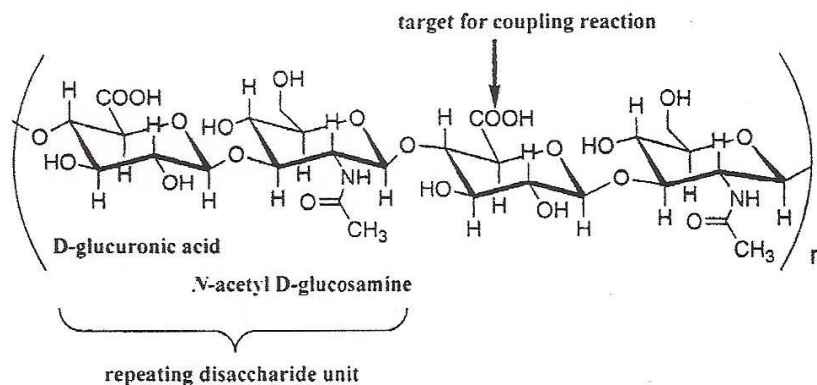


Figura 1: Fórmula Molecular do ácido hialurônico formado pela cadeia de dissacarídeos
Fonte: Bulpitt e Aeschlimann (1999).

Dessa forma, o ácido hialurônico é caracterizado como o principal componente da matriz extracelular e presente em todos os tecidos conectivos do corpo humano. Nos processos biológicos, envolvendo morfogênese, reparação cicatricial, inflamação e metástases através de receptores celulares, constata-se a presença do ácido hialurônico (KIM et al., 2007b). Este composto também é encontrado em altas concentrações nos tecidos em que ocorrem rápida regeneração e proliferação celular, principalmente, durante a embriogênese e as feridas cicatriciais. As células possuem receptores de superfície específicos para o ácido hialurônico, sendo o CD44 o mais importante (STERN et al., 1999), além de outros

receptores de superfície como o RHAMM (receptor de AH de motilidade), o LYVE-1 (endotélio linfático) e o HARE (endocitose) (GENASETTI et al., 2008).

O presente composto é um ótimo candidato para o desenvolvimento de um biomaterial condutor de células vivas e fatores bioativos devido às suas propriedades físico-químicas (BULPITT; AESCHLIMANN, 1999; LIEBERMAN; DALUISKI; EINHORN, 2002).

Em um estudo experimental *in vivo*, duas cavidades de 3 mm de diâmetro e profundidade foram criadas na tíbia de ratos para analisar a ação do ácido hialurônico. Uma das cavidades foi preenchida com ácido hialurônico e enxerto ósseo autógeno e a outra apenas com enxerto ósseo autógeno (grupo controle). Na avaliação, após 20, 30 e 40 dias, feita através de cortes histológicos, Aslan; Simsek e Dayi (2006) observaram melhores taxas de crescimento ósseo na presença do ácido hialurônico.

Em outro estudo experimental, em tecido ósseo femural de ratos, verificou-se que a composição de alto peso molecular do ácido hialurônico é capaz de acelerar a formação de novo tecido ósseo através da diferenciação das células mesenquimais nas feridas ósseas, ou, ainda, pode ser responsável pela manutenção dos fatores de crescimento (TGF- β) no local de cicatrização óssea (SASAKI; WATANABE, 1995).

Entretanto, em outro estudo em animais, utilizando o ácido hialurônico como veículo de fatores de crescimento ósseo (BMP) 2, notou-se atraso na osseointegração de implantes de titânio revestidos com hidroxiapatita, mas mostrando benefício no crescimento ósseo com a diminuição de possíveis *gaps* ao redor destes implantes (AEBLI et al., 2005).

Em um estudo humano, comparou-se a utilização do ácido hialurônico DBX® (DENTSPLY Tulsa Denatal Specialties, Oklahoma, EUA) associado a outros materiais como Bio-Oss® (Geistlich Sons Ltd, Wolhusen, Switzerland), beta-tricálcio fosfato (Synthes, Solothum, Switzerland) ou ainda aplicado sozinho na região do seio maxilar. Através da avaliação por meio de cortes histológicos e tomografia computadorizada concluiu-se que o ácido hialurônico, sozinho ou em combinação, pode ser usado com sucesso em procedimentos para levantamento do seio maxilar, devido as suas propriedades osteocondutoras (SCHWARTZ et al., 2007).

Pode-se ainda confirmar os resultados da utilização do ácido hialurônico em terapias periodontais regenerativas, com sua utilização na forma de gel Hyaloss® (Meta, Reggio Emilia, Italia), proporcionando correções ósseas através da mistura

entre enxerto autógeno e o gel (BALLINI et al., 2009). Nos tecidos peri-implantares, também comprovou-se benefícios na utilização do ácido hialurônico. No estudo piloto de Nobre, Cintra e Maló (2007) ao comparar sinais inflamatórios dos tecidos peri-implantares, quando aplicados gel de ácido hialurônico e clorexidine de forma tópica, obteve-se melhores resultados com o ácido nos meses iniciais. Nesse estudo, ficou comprovada a vantagem da utilização do ácido nos primeiros dois meses de tratamento, após esse período a clorexidine mostrou-se mais eficiente até o 6° mês de acompanhamento.

Diversas modificações podem ocorrer na fórmula do ácido hialurônico, alterando suas propriedades químicas e físicas; mas, na engenharia tecidual, é usado, predominantemente, na forma de hidrogel (PRESTWICH et al., 1998).

Alguns estudos *in vivo* já comprovaram a eficiência de hidrogéis de ácido hialurônico, quando utilizados como matrizes de células e fatores de crescimento para regeneração tecidual (KIM et al., 2007b). No entanto, nos dias atuais, diversas pesquisas *in vitro* estão analisando e comparando o comportamento das células-tronco mesenquimais na presença do ácido hialurônico para engenharia óssea tecidual (XU et al., 2009; CRISTINO et al., 2005).

Na busca de uma opção de um agente que proporcione aumento volumétrico do osso injetável, visando melhoria nas técnicas de enxertia, temos o ácido hialurônico dermatológico (TEOSYAL®, Teoxane, Geneva, Switzerland). Este material de origem não animal, obtido da fermentação bacteriana não patogênica (cepa de *Streptococcus*) apresenta propriedades de biocompatibilidade e resultados preliminares promissores, quando aplicado na região da face em reconstruções estéticas (FRIEDMAN et al., 2002). Por esta razão e por estar disponível no mercado nacional foi o material selecionado para nossa pesquisa.

A principal característica de um biomaterial é sua condição não imunogênica e não alergênica, condição esta que o TEOSYAL® disponibiliza já que sua origem em estado de gel é não animal (LARSEN et al., 1993; MICHEELS, 2001).

As propriedades físicas dos géis de ácido hialurônico dependem do peso molecular, concentração e nível de ligações cruzadas (BALAZS et al., 1991). As ligações cruzadas possíveis de serem estabelecidas entre as moléculas do TEOSYAL® são responsáveis pela formação de uma malha densa e uniforme (GAMINI et al., 2002). Portanto, o ácido utilizado na presente pesquisa apresenta

altos índices de ligações cruzadas, sendo ele o responsável pela formação de um composto com visco-elasticidade excelente (GOA; BENFIELD, 1994).

Além de todas as propriedades apresentadas e descritas anteriormente, o ácido hialurônico TEOSYAL® possui baixa sensibilidade aos radicais livres e, conseqüentemente, diminuição de sua taxa de degradação (YUI; OKANO; SAKURAI, 1992). Mesmo sendo um material absorvível (BERGERET-GALLEY, 2004) e biodegradável transforma-se progressivamente em CO₂ e água quando aplicado na pele humana (GOA; BENFIELD, 1994). Outra característica muito importante do TEOSYAL® é seu baixo índice de hipersensibilidade e reações inflamatórias adversas como hematomas, nódulos ou pápulas e vermelhidão quando aplicados *in vivo* na região facial (FRIEDMAN et al., 2002).

2.4 HIDROXIAPATITA

A necessidade de obtenção de novos materiais, para substituição de partes do corpo humano que foram destruídas ou danificadas, conduziu a ciência das mais diferentes áreas à investigação das biocerâmicas. As cerâmicas bioativas compreendem a maior família de enxertos aloplásticos usados para aumento de volume ósseo e incluem o fosfato de cálcio e a hidroxiapatita (HP) sintética (MISCH, 2000).

A HP é o principal componente inorgânico e natural do osso, possuindo ótimas características de biocompatibilidade e rápida ligação com tecidos duros e moles adjacentes (GARG, 1999). As propriedades físicas e químicas da hidroxiapatita disponível comercialmente afetam sua taxa de reabsorção. Grandes partículas de HP demoram mais tempo para serem reabsorvidas e permanecem por mais tempo no local enxertado, enquanto partículas mais porosas permitem um maior crescimento ósseo invasivo de sua estrutura, assim mais rapidamente reabsorvidas. Portanto, quanto mais cristalina for a hidroxiapatita disponível, menor será sua taxa de reabsorção (MISCH, 2000; GARG, 1999). Os sólidos e densos blocos de hidroxiapatita resistem a altas forças compressivas, mas são mais quebradiços e não permitem a invasão celular de tecido ósseo. (GARG, 1999).

Por outro lado, também há uma série de cerâmicas de fosfato de cálcio utilizadas em enxertos ósseos dentários, consideradas biocompatíveis, entre as quais está incluído o tricálcio fosfato, semelhante à hidroxiapatita; porém, este não é um componente natural do tecido ósseo. No corpo humano, o TCP (tricálcio fosfato) é convertido, em parte, em hidroxiapatita e sua taxa de reabsorção varia de acordo com sua estrutura química, sua porosidade e o tamanho de suas partículas. O TCP possui propriedades osteocondutivas e favorece a formação de uma matriz para a deposição de novo osso; desta forma, pode ser utilizado juntamente com outros materiais osteoindutivos para melhorar as características de manuseio durante a manipulação do material a ser enxertado (GARG, 1999).

Buscando um material cerâmico que satisfaça as exigências ideais para utilização em enxertia, Piattelli, Scarano e Mangano (1996) e Boix et al. (2004), utilizaram a mistura de hidroxiapatita cristalina com o tricálcio-fosfato (β -TCP), material que nesta pesquisa está representado pelo Straumann® BoneCeramic.

Através da utilização das biocerâmicas na odontologia atual e de trabalhos científicos que abordam o assunto, ficou comprovada sua capacidade osteocondutora em diversos estudos *in vitro* e *in vivo* (KASTEN et al., 2008; MOORE; GRAVES; BAIN, 2001). Porém, os resultados encontrados entre a interação da hidroxiapatita com osteoblastos são conflitantes. Dessa forma, alguns estudos *in vitro* vêm sendo desenvolvidos para avaliar este comportamento celular (HOFMANN et al., 2003).

Por exemplo, Lin, Chow e Leng (2009), através de cultura de células-tronco mesenquimais de ratos, testaram, *in vitro*, a osteoindução na presença da HP. Conforme esse trabalho, a HP testada apresentou resultados positivos em relação aos marcadores ósseos na cultura celular de células-tronco mesenquimais indiferenciadas, com a confirmação de marcadores da linhagem osteogênica, como, por exemplo, fosfatase alcalina, colágeno do tipo I e osteocalcina.

No contexto de matriz ideal, as cerâmicas bioativas são muito úteis para células da linhagem osteogênica e a combinação de estudos *in vivo* e *in vitro* levam a um melhor entendimento das reações superficiais que ocorrem nas cerâmicas bioativas e seus efeitos na formação óssea e na função celular (DUCHEYNE; QIU, 1999).

2.5 PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP)

O plasma rico em plaquetas (PRP) tem sido exaustivamente pesquisado na área odontológica, sendo empregado principalmente em pequenos enxertos ósseos na região alveolar para futuros implantes dentários, cirurgias periodontais e maxilo-faciais (WHITMAN; BERRY, 1998). Ultimamente, um número vasto de pesquisas científicas enfatizam a capacidade regenerativa do plasma rico em plaquetas (PRP), a partir dos vários fatores de crescimento. Tem sido utilizado para acelerar as fases da cicatrização da ferida cirúrgica por ser um produto autógeno, orgânico e biocompatível (LYNCH, 1999; ANITUA, 1999).

A composição bioquímica do PRP é constituída por plasma, leucócitos e plaquetas. As plaquetas representam o componente mais importante devido à sua capacidade de liberar fatores de crescimento. Esses fatores são mediadores naturais que possuem ações primordiais sobre processos de reparo e regeneração, uma vez que regulam diversos eventos celulares; como, por exemplo, quimiotaxia, citodiferenciação, síntese de DNA e a síntese da matriz (MARX, 1999).

Tendo em vista as plaquetas como nosso alvo de interesse, três principais fatores de crescimento derivados dos grânulos α -plaquetários devem ser relatados: fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento de transformação beta (TGF- β) e o fator de crescimento similar à insulina (IGF-I) (MARX, 1999).

O PDGF possui vários efeitos positivos em feridas cicatriciais, porque estimula a mitogênese celular, aumenta a quantidade de células responsáveis pela cicatrização, estimula a angiogênese e a regulação de outros fatores de crescimento. Todas essas propriedades do PDGF possibilitam o aumento da função e da diferenciação celular fibroblástica e osteoblástica (MARX, 1999).

Já, os fatores transformadores de crescimento beta (TGF- β 1 e TGF- β 2) não apenas iniciam a regeneração óssea, mas também se mantêm no local como responsáveis pela remodelação e maturação dos enxertos ósseos. A função mais importante desses dois fatores de crescimento é a capacidade de quimiotaxia, bem como a capacidade mitogênica de células osteoblásticas precursoras (MARX, 1999).

Por último, há o fator de crescimento similar à insulina (IGF-I) secretado pelos osteoblastos durante a formação óssea, que aumenta a osteogênese e acelera a deposição óssea (MARX, 1999; GIANNOBILE, 1999).

Estabelecer um método barato e eficiente de preparação do plasma rico em plaquetas e seus fatores de crescimento tem sido um grande desafio nos dias atuais. Diversas técnicas e protocolos vêm sendo descritos por diferentes pesquisadores. Há pelo menos de dois sistemas separadores celulares de plaquetas. O mais avançado e mais rápido é denominado de CAPSS (Sistema separador avançado compacto de plaquetas). Neste sistema, aproximadamente 150 ml de sangue são retirados do braço do paciente e a partir desse volume total apenas 15 ml de PRP são isolados (LYNCH, 1999). No segundo sistema, um técnico ou uma enfermeira bem treinados podem coletar o PRP em até 30 min através de duas centrifugações. Assim que o sangue é centrifugado, tem-se a separação em três gradientes: plasma pobre em plaquetas (PPP), plasma rico em plaquetas (PRP) e, por último, o mais denso, as células sanguíneas vermelhas (MARX, 1999). O gel final de PRP é obtido através da adição de trombina autógena e gluconato de cálcio ao PRP, que ativam o sistema de coagulação e as plaquetas (EFEUGLU; AKÇAY; ERTÜRK, 2004).

No intuito de exemplificar a ação do PRP Marx et al. (1998), dividiram em três grupos mandíbulas com defeitos ósseos acima de 5 cm para aplicação de enxertos: mandíbulas nativas, sem enxerto ósseo; mandíbulas com enxerto ósseo sem PRP e, por último, mandíbulas com enxerto ósseo acrescido de PRP. Através de histomorfometria, o grupo de mandíbulas enxertadas com PRP teve aumento médio de tecido ósseo trabecular de 74% contra 55% para o grupo de enxerto sem PRP. Além disso, regiões enxertadas com PRP, nesse estudo, entre o 4º e o 6º mês, apresentaram um sistema maduro de Havers (MARX et al., 1998).

Por último, podemos ainda mencionar o estudo experimental *in vitro* de Krasna et al. (2007) que através da cultura celular de fibroblastos humanos avaliaram a proliferação das células após a adição de PRP. Através de seus resultados ficou comprovado que a proliferação celular é dependente do PRP e também de sua concentração aplicada.

2.6 CITOTOXICIDADE DOS MATERIAIS

A necessidade de materiais biocompatíveis na odontologia tem requisitado ensaios de citotoxicidade que identificam possíveis efeitos danosos aos tecidos orais antes de serem utilizados na prática clínica. Citotoxicidade é o ensaio que mede a quantidade de morte celular causada pelo material ou seus extratos. A presença do material em contato com as células pode desencadear a cascata de eventos moleculares que interferem na síntese macromolecular, causando danos celulares funcionais e ou estruturais (MURRAY et al., 2000).

A avaliação *in vitro* dos materiais odontológicos tem como objetivo analisar a biocompatibilidade que é a capacidade do hospedeiro apresentar uma boa resposta frente ao novo material. Uma reação adversa pode ser resultante de toxicidade do material odontológico, podendo ser avaliado através de testes *in vitro*, experimentos com animais e ensaios clínicos. A cultura de células para testes *in vitro* de toxicidade é o método mais utilizado em materiais odontológicos (POLYZOIS, 1994).

O objetivo dos testes *in vitro* de biocompatibilidade é estimular reações biológicas do material, quando colocado sobre ou dentro dos tecidos. Este método é o mais vantajoso em relação aos custos, reduzindo surpresas negativas no uso de animais e em ensaios clínicos (HANKS; WATAHA; SUN, 1996).

A viabilidade celular pode ser avaliada através de vários métodos, no entanto fica indicado que a pesquisa utilize um método que exija um menor tempo com alto grau de precisão das amostras (MOSMANN, 1983).

2.7 AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE ATRAVÉS DO MTT

O teste MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina constitui-se em um modelo para avaliar a viabilidade celular, de forma rápida e objetiva, com base em uma reação colorimétrica. O MTT, quando incubado com células vivas, tem seu substrato quebrado por enzimas mitocondriais denominadas succinato desidrogenase, transformando um composto amarelo para um composto violeta (Formazan). A quantidade de cristais formados é diretamente proporcional ao

número de células viáveis. Assim, quanto mais escura a coloração, ao final da reação, maior é a viabilidade celular e a atividade da cadeia respiratória. A densidade óptica resultante do teste MTT é determinada em espectrofotômetro de absorvância (MOSMANN, 1983).

Revisando a literatura atual, constata-se que o ensaio de MTT vem sendo amplamente aplicado como um teste de citotoxicidade em culturas celulares e utilizado nos trabalhos científicos odontológicos (BEAN et al., 1995; OZDEMIR; YILMAZ H; YILMAZ S, 2009). Também pode ser empregado *in vivo*, como na avaliação da viabilidade celular do ligamento periodontal de ratos que tiveram seus molares extraídos e, posteriormente, reimplantados. Os achados histológicos nesse experimento foram coincidentes com o teste MTT. O presente ensaio foi uma ferramenta importante para a avaliação da viabilidade celular do ligamento periodontal da superfície de raízes (KIM et al., 2007a).

O teste MTT também pode ser empregado para avaliação de dano pós-preservação a frio de órgãos provenientes de cadáveres doadores. Diferentes concentrações de MTT, períodos de incubação e pesos de fragmentos foram testados em fragmentos corticais renais de ratos após preservação a frio (PERES et al., 2008).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar, *in vitro*, o potencial citotóxico do ácido hialurônico, do plasma rico em plaquetas e da hidroxiapatita, associados ou não, sobre células pré-osteoblásticas da linhagem OFCOL II.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a morfologia das células presentes no composto celular dos grupos teste e controle;
- Comparar a viabilidade das células em cultura, pertencentes aos grupos testes e controle;
- Avaliar o efeito do ácido hialurônico, do plasma rico em plaquetas e da hidroxiapatita, quando aplicados isoladamente ou em conjunto sobre as células pré-osteoblásticas da linhagem OFCOL II.

4 METODOLOGIA

4.1 DESENHO DO ESTUDO

Estudo analítico, experimental, *in vitro* e controlado. Foi realizado através da análise da citotoxicidade do ácido hialurônico em culturas *in vitro* das células pré-osteoblásticas da linhagem OFCOL II, através do teste colorimétrico de MTT, com a presença de grupo controle e grupos experimentais.

O trabalho proposto foi realizado no Laboratório de Diferenciação, Proliferação e Viabilidade Celular do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

4.2 ASPECTOS BIOÉTICOS

Esta pesquisa foi realizada após a aprovação da Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – protocolo n° 0023/10 (ANEXO A).

4.3 OBTENÇÃO DAS CÉLULAS PRÉ-OSTEOBLÁSTICAS DA LINHAGEM OFCOLII

As células para o experimento foram obtidas do banco de células da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), não utilizando para tal o emprego de animais. As células pré-osteoblásticas denominadas OFCOL II foram previamente isoladas do fêmur de camundongos Balb/c e congeladas (BALDUINO et al., 2005). (ANEXO B).

A ampola com a linhagem de células OFCOL II foi retirada do nitrogênio líquido, descongelada em banho-maria a 37° C e a suspensão celular foi transferida para um frasco de cultura contendo Meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM)

com 15% de soro fetal bovino e gentamicina 10µg/ml na capela de fluxo (Figura 2). Após a adesão das células ao frasco de cultura, o meio foi trocado para eliminação de resquícios de meio de congelamento e restos celulares com *Dimetil sulfóxido* (DMSO) (Henrifarma, São Paulo, São Paulo, Brasil). As culturas de OFCOL II foram incubadas e mantidas em estufa umidificada a 37°C, contendo 5% de CO₂ e 95% de ar para a manutenção do pH 7,4, próximo ao fisiológico (Figura 3 e 4). Ao atingirem a semi-confluência, as células foram lavadas com *Solução Salina Tamponada sem Cálcio e Magnésio* (CMF-PBS) (Henrifarma, São Paulo, São Paulo, Brasil), tripsinizadas, contadas em câmara de Neubauer e cultivadas em placa de 96 poços na densidade de 5x10³ células em um volume de 21µl de DMEM 15% em cada poço das quadruplicas dos grupos experimentais e do grupo controle (Figura 3). As células foram semeadas 24 horas anteriormente à colocação do ácido hialurônico e PRP, quando atingiram a semi-confluência (80% de crescimento). Para análise da proliferação celular foi utilizado o ensaio MTT após 48 horas de cultura celular expostas ao ácido hialurônico.



Figura 2: Capela de fluxo laminar vertical
Fonte: O autor (2010)



Figura 3: Placa de 96 wells OFCOL II (5×10^3) em 21 μ l de DMEM 15%
Fonte: O autor (2010)



Figura 4: Incubadora de CO₂, a qual mantém a temperatura de 37° C,
com 5% de CO₂ e 95% de O₂
Fonte: O autor (2010)

4.4 APLICAÇÃO DO ÁCIDO HIALURÔNICO

A matriz de ácido hialurônico Teosyal 30G Touch up® (Teoxane, Geneva, Suíça), em que cada 1ml do produto contém 25 mg de ácido hialurônico em pH de 7,3, foi colocada em cada poço 25 µl em quadruplicatas nos grupos A, B, C e E. Esta quantidade de ácido hialurônico foi determinada conforme curva de concentração previamente realizada através do teste MTT. O objetivo neste momento foi testar o volume necessário de meio de cultura DMEM 15% juntamente com 25 µl do ácido hialurônico sobre células-tronco mesenquimais de tecido adiposo (MSC-TA). Para realização desta curva de dose foram criados 2 grupos com quatro *wells* cada (quadruplicatas). O grupo controle com 2×10^3 células (MSC-TA) acrescido de DMEM 15% e o grupo teste com 2×10^3 células (MSC-TA) acrescido de DMEM 15% e 25 µl de ácido hialurônico. Dentro desses grupos testamos o volume de 50 µl, 100 µl e 150 µl em quadruplicatas de meio DMEM 15%, conforme tabela 1 e figura 5.

Tabela 1: Média e Desvio Padrão de Absorbância da Curva de Concentração

TRATAMENTO	MEIO DMEM 15%	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	N
AH + CÉLULA + DMEM	50	0,920	0,074	4
	100	1,017	0,254	4
	150	0,852	0,029	4
CÉLULA + DMEM	50	0,953	0,047	4
	100	1,053	0,043	4
	150	1,033	0,115	4

Fonte: O autor (2010)

Legenda:

- AH: Ácido Hialurônico
- DMEM 15%: Meio Essencial Mínimo Modificado por Dulbecco
- Célula: 2×10^3 (MSC-TA)

Conforme modelo ANOVA e a falta de homogeneidade de variâncias utilizou-se a transformação Rank, não havendo diferença estatística entre os grupos ($p=0,070$ e entre os volumes aplicados $p=1,000$).

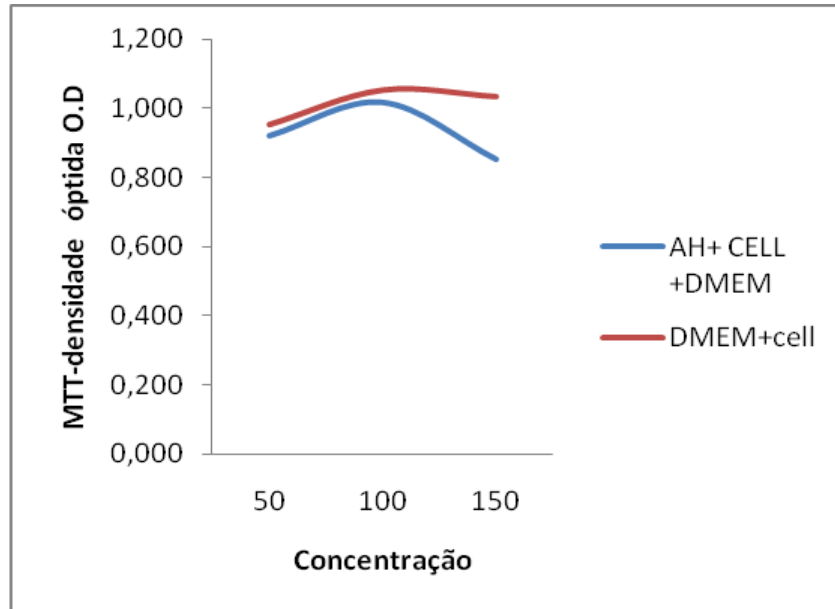


Figura 5: Gráfico da Curva de Concentração
Fonte: O autor (2010)

Legenda:

- AH: Ácido Hialurônico
- DMEM 15%: Meio Essencial Mínimo Modificado por Dulbecco
- Cell: 2×10^3 células (MSC-TA)

Mesmo não havendo diferença estatística no teste MTT para os volumes aplicados sobre as células-tronco mesenquimais, optou-se pelo volume de 100 μl de meio de cultura DMEM 15% em 25 μl de ácido hialurônico, uma vez que este apresentou maior viabilidade celular. Após a diluição inicial de 25 μl de Teosyal em 100 μl de DMEM 15%, obtivemos uma concentração final de 2,97 mg/ml de ácido hialurônico, sendo que o volume final total de cada poço foi de 210 μl .

4.5 OBTENÇÃO E PREPARO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS

Para o preparo do PRP (plasma rico em plaquetas), aproximadamente 15 ml de sangue humano foram colhidos em 3 tubos específicos de 5 ml contendo citrato de sódio a 3,2%, comercialmente disponível (BD Vacutainer / Buff Na. Citrate - ref.: 369714). Foram realizadas duas centrifugações, uma primeira a 400 g, por 10 min., para retirada do plasma sanguíneo (Figura 6). Após a centrifugação, o sobrenadante, até a interface com as hemácias, foi completamente retirado com o uso de pipeta sorológica. O sobrenadante foi colocado em um segundo tubo (do tipo Falcon) que passou pela segunda centrifugação (Figura 7). Esta foi realizada a 800 g, por 10 min, e teve a finalidade de concentrar as plaquetas. Após a centrifugação, o sobrenadante foi totalmente retirado e parte dele foi devolvida ao tubo, de forma que o material contido no tubo, ao final, foi 10% do material inicial coletado. O procedimento foi iniciado a partir de 15 ml de sangue, de maneira que, ao final, obtivemos 1,5 ml de PRP.

Para obtenção da trombina autóloga, transferimos 1,2 ml da parte superior da coluna de plasma com plaquetas, após a primeira centrifugação a 400 g por 10 min. para um tubo *Falcon* de 15 ml estéril. Neste 1,2 ml de plasma com plaquetas acrescentamos 0,3 ml de gluconato de cálcio a 10% e colocamos o tubo em banho-maria a 37°C durante 15 min. para ocorrer a geleificação do plasma. Logo após uma nova centrifugação de 800 g por 10 min foi realizada, resultando na separação de um líquido claro no tubo.

O gel de plasma rico em plaquetas foi finalmente obtido por meio da adição de 2,5 µl da trombina autóloga a 12,5 µl de plasma rico em plaquetas em uma proporção de 1:5. Após a mistura um período de 1 min foi necessário que o gel se formasse nos poços em quadruplicatas dos grupos testes A, B, F e G. O volume de 12,5 µl foi determinado conforme estudo de Krasna et al. (2007) em que foi aplicado 10 µl de PRP sobre as células fibroblásticas humanas. Através dos resultados obtidos, observou-se que o PRP *in vitro* estimula a proliferação celular e é dose dependente, quanto maior a dose no meio de cultura DMEM maior é a proliferação celular.

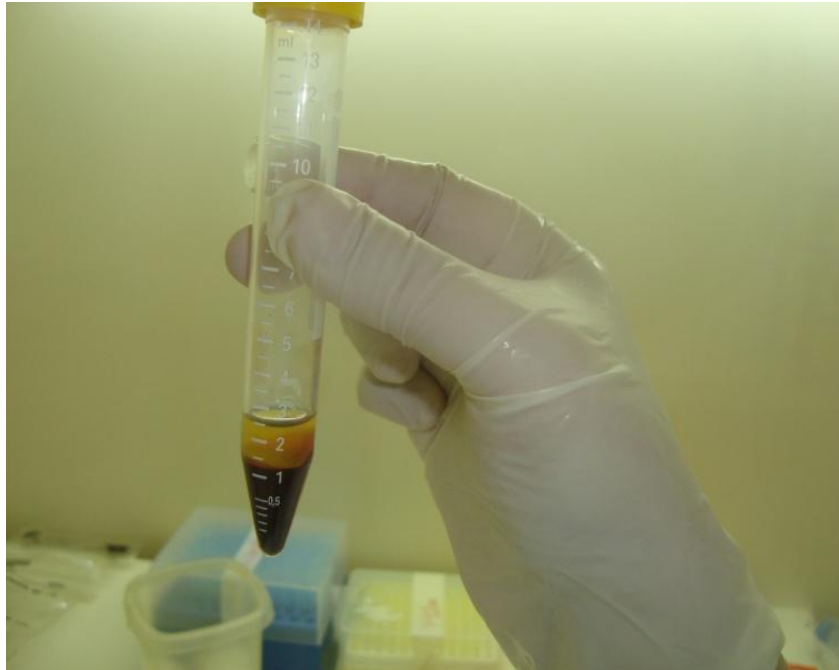


Figura 6: Preparação PRP e Trombina Humana (1ª Centrifugação)
Fonte: O autor (2010)

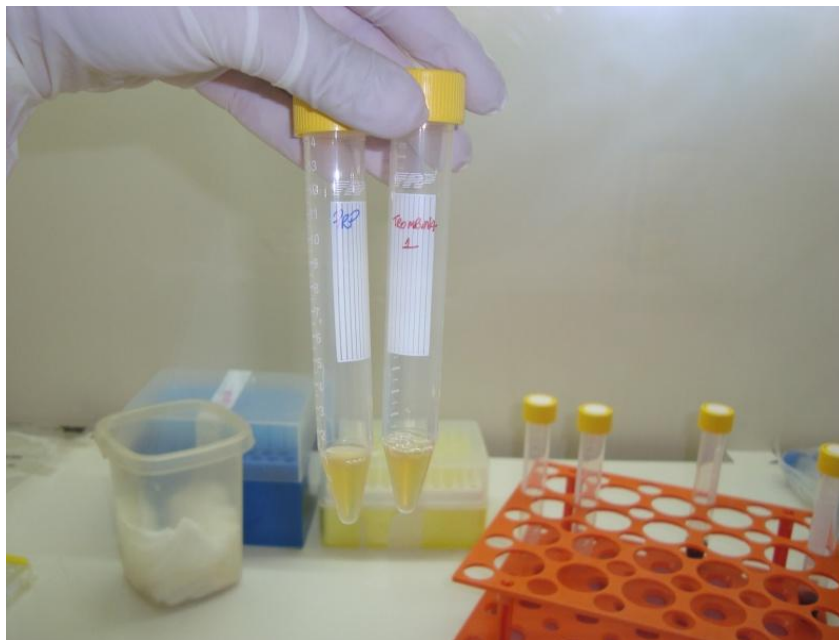


Figura 7: Preparação PRP e Trombina Humana (2ª Centrifugação)
Fonte: O autor (2010)

4.6 APLICAÇÃO DA HIDROXIAPATITA

O Straumann® BoneCeramic (BIORA AB, Malmo, Suíça), totalmente sintético, composto de uma mistura de 60% de hidroxiapatita (HP) e 40% de β -tricálcio fosfato (β -TCP) e porosidade de 90%, com poros interconectados de diâmetro de 100-500 μ m, foi pesado e colocado 4mg em cada poço do grupo teste A, B, C e D anteriormente ao experimento. Após pesado e colocado nos *wells* da placa de 96 *wells* (TPP, St. Louis, MO, EUA), a placa foi colocada na UV (ultra-violeta) para esterilizar a hidroxiapatita e guardada em embalagem estéril até o dia do experimento.

4.7 DISPOSIÇÃO DAS AMOSTRAS

Para avaliação do metabolismo e da morfologia celular em contato com o ácido hialurônico foram criados 7 grupos experimentais e 1 grupo controle em quadruplicatas. Os grupos experimentais e controle foram semeados em uma placa de 96 *wells* (TPP, St. Louis, MO, EUA) para análise de viabilidade celular através do teste MTT e divididos da seguinte maneira:

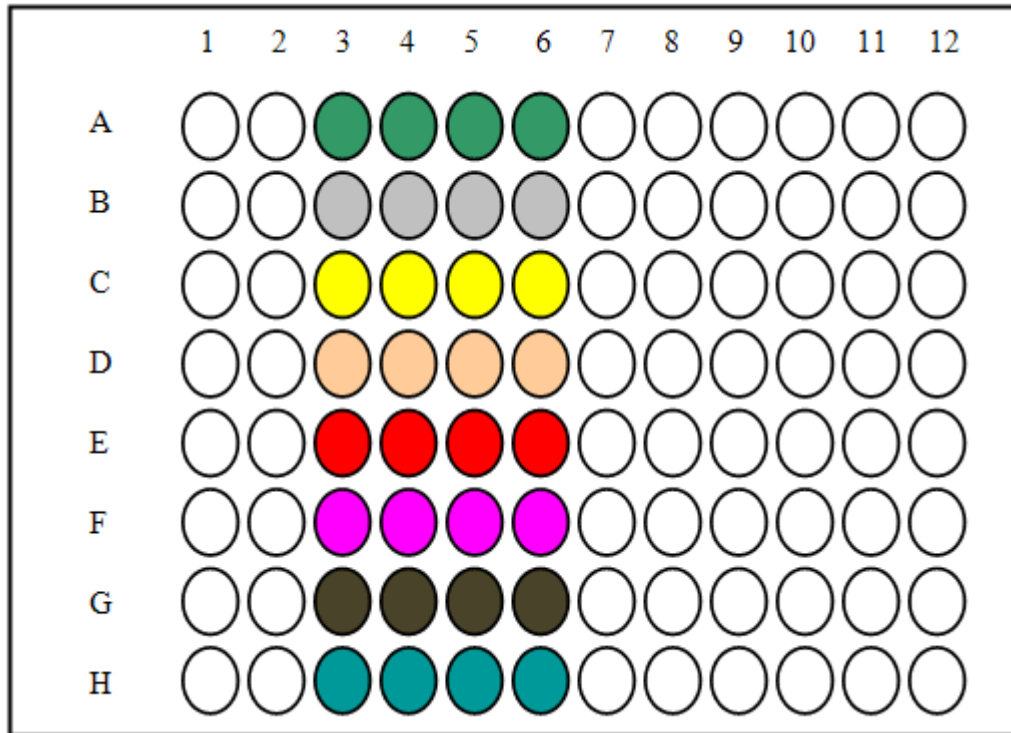


Figura 8: Placa de 96 wells

Fonte: O autor (2010)

Legenda:	
–	Grupo A: células + AH + PRP com trombina + HP
–	Grupo B: células + AH + PRP+ HP
–	Grupo C: células + AH + HP
–	Grupo D: células + HP
–	Grupo E: células + AH
–	Grupo F: células + PRP com trombina
–	Grupo G: células + PRP
–	Grupo H (controle): células + DMEM

O volume total de cada *well* de todos os grupos foi de 210 μ l. Para cada *well* das quadruplicatas de cada grupo experimental (A, B, C, D, E, F, G) e controle (H) foram aplicados os seguintes volumes finais:

GRUPO	VOLUMES APLICADOS					
	CÉLS	AH	PRP	HP	DMEM	TROMBINA
Grupo A	(21µl com 5x10 ³)	(25µl)	(12,5 µl)	(4mg)	(149µl)	(2,5 µl)
Grupo B	(21µl com 5x10 ³)	(25µl)	(12,5µl)	(4mg)	(151µl)	-
Grupo C	(21µl com 5x10 ³)	(25µl)	-	(4mg)	(164µl)	-
Grupo D	(21µl com 5x10 ³)	-	-	(4mg)	(189µl)	-
Grupo E	(21µl com 5x10 ³)	(25µl)	-	-	(164µl)	-
Grupo F	(21µl com 5x10 ³)	-	(12,5µl)	-	(174µl)	(2,5 µl)
Grupo G	(21µl com 5x10 ³)	-	(12,5µl)	-	(176 µl)	-
Grupo H (controle positivo)	(21µl com 5x10 ³)	-	-	-	(189 µl)	-

Quadro 1: Grupos e seus respectivos volumes de cada well

Fonte: O autor (2010)

Legenda:
- Céls: Células
- AH: Ácido Hialurônico
- PRP: Plasma Rico em Plaquetas
- HP: Hidroxiapatita

Em cada poço experimental, foram colocados 21 µl de *Meio Eagle Modificado por Dulbeco* (DMEM) (GIBCO, Grand Island, NY, EUA) suplementado com 15% de soro bovino fetal (FBS) (GIBCO, Grand Island, NY, EUA) e gentamicina 10µg/ml (GIBCO, Grand Island, NY, EUA), contendo 5x10³ células imortalizadas da linhagem cultivada. Essa placa foi mantida 24h em incubadora a 37°C, com 5% de CO₂ e 95% de ar (SANYO COM-15A, Japão) apenas com as células até atingir a semi-confluência de 80%. Quatro poços foram utilizados para cada grupo, as soluções experimentais foram incubadas em contato direto com as células pelo período adicional de 48 horas.

Os valores numéricos foram obtidos por meio de leitura de absorvância no comprimento de onda de 550nm menos a leitura de 630nm (microplate reader,

MOLECULAR DEVICES, SpectraMax® M5, EUA) suportado pelo programa Softmax Pro 5.2®. Para cada amostra foi determinada uma média da atividade mitocondrial (metabolismo celular) para a mesma (MOSMANN, 1983), sendo que este mesmo experimento foi repetido 3 vezes.

4.8 ANÁLISE DO METABOLISMO CELULAR (MTT)

O método de MTT foi utilizado para a avaliação de citotoxicidade e teve como princípio a determinação da habilidade de células vivas em reduzir brometo 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2il-tetrazólico (Across Organics, New Jersey, EUA), formando cristais insolúveis de *Formazan* de coloração violeta. Após o tratamento, 10% de uma solução de MTT (5 mg/ml) em PBS foi adicionado a cada poço. Em seguida, as culturas foram incubadas durante 2 horas a 37°C, ao abrigo da luz, até a observação da presença dos cristais violetas de *Formazan*. Para a solubilização dos cristais de *Formazan*, 100 µl de *Dimetil Sulfóxido* (DMSO) foram adicionados a cada *well*. Logo após, foi realizada a leitura espectrofotométrica da absorbância, em comprimento de onda de 570nm menos a leitura de 630nm (microplate reader, Molecular Devices, SpectraMax® M 5, EUA) suportado pelo programa Softmax Pro 5.2®.



Figura 9: Espectrofotômetro para leitura MTT
Fonte: O autor (2010)

4.9 ANÁLISE DA MORFOLOGIA CELULAR ATRAVÉS DA MICROSCOPIA ÓPTICA

Para análise da morfologia celular, repetiu-se o mesmo protocolo do experimento, porém as células foram semeadas em placas de 24 *wells* (TPP, St. Louis, MO, EUA) para melhor visualização e condições de foco. Os grupos experimentais e controle foram observados diretamente por um microscópio óptico invertido (Nikon-Eclipse, Te 300, Japão) com lentes objetiva de 10x para um aumento de 100x e objetiva 20x para um aumento de 200x. A aquisição das imagens para análise morfológica foi realizada através de uma lente ocular de 10x adaptada ao microscópio óptico e controlada pelo *software* Nis-Elements F. As imagens foram calibradas por uma escala micrométrica.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A viabilidade celular foi apresentada por média e desvio padrão, sendo que a normalidade dos dados foi testada através do Teste de Kolmogorov Smirnov. A comparação entre grupos em relação ao percentual médio de viabilidade foi testada pela Análise de Variância (ANOVA) complementada pelo Teste de Comparações Múltiplas de Tukey ($\alpha=0,05$).

A comparação entre a média das absorbâncias obtidas no controle em relação aos demais grupos experimentais foi através do Teste T.

A elaboração do banco de dados e das análises estatísticas foram através do *software* SPSS versão 17.0.

5 RESULTADOS

5.1 TESTE MTT

Os valores numéricos obtidos através da leitura espectrofotométrica de absorbância, em comprimento de onda de 570 nm menos a leitura de 630 nm para cada amostra determinaram uma média da atividade mitocondrial (metabolismo celular) para a mesma. O metabolismo celular frente à exposição direta a cada grupo experimental, quando comparado ao grupo controle, foi encontrada diminuição nos valores de absorbância (viabilidade celular) com diferença estatística nos grupos B, C e E ($p < 0,05$) conforme tabela 2 e figura 10.

Tabela 2: Média e Desvio Padrão de Absorbância dos Grupos A, B, C, D, E, F, G e H

Grupo Experimental	Absorbância		p
	Média	Desvio-padrão	
A	0,396	0,072	0,093
B	0,333	0,062	0,013
C	0,340	0,076	0,023
D	0,493	0,038	0,948
E	0,371	0,018	0,032
F	0,449	0,073	0,390
G	0,445	0,049	0,279
H (controle)	0,496	0,069	-

Fonte: O autor (2010)

p= nível mínimo de significância do Teste T

Legenda:

- Grupo A: células + AH + PRP com trombina + HP
- Grupo B: células + AH + PRP+ HP
- Grupo C: células + AH + HP
- Grupo D: células + HP
- Grupo E: células + AH
- Grupo F: células + PRP com trombina
- Grupo G: células + PRP
- Grupo H (controle): células + DMEM

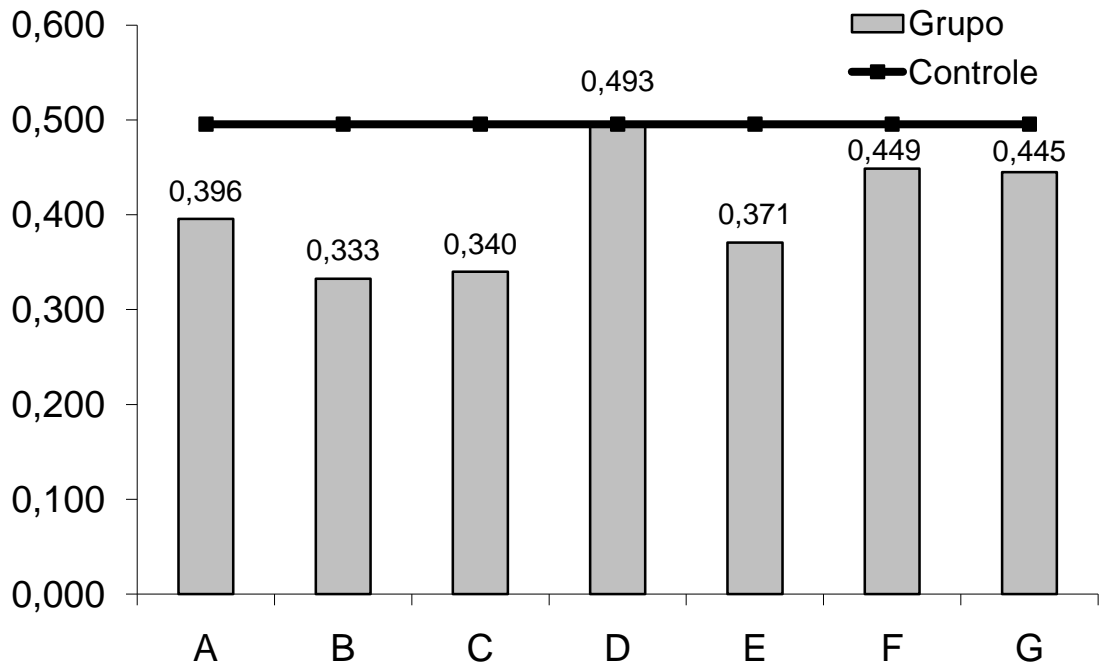


Figura 10: Gráfico de Absorbância
 Fonte: O autor (2010)

Legenda:	
-	Grupo A: células + AH + PRP com trombina + HP
-	Grupo B: células + AH + PRP+ HP
-	Grupo C: células + AH + HP
-	Grupo D: células + HP
-	Grupo E: células + AH
-	Grupo F: células + PRP com trombina
-	Grupo G: células + PRP
-	Grupo H (controle): células + DMEM

Ao compararmos todos os grupos entre si e considerarmos o grupo controle como 100% obtivemos a viabilidade celular de cada grupo experimental, conforme tabela 3 e figura 11. Podemos observar diferença entre os grupos B e C em relação ao grupo H e semelhança entre os grupos A, D, E, F e G em relação ao grupo H.

Tabela 3: Média e Desvio Padrão da Viabilidade Celular

Grupo Experimental	Viabilidade Celular (%)	
	Média	Desvio-padrão
A	79,9 ^{AB}	14,6
B	67,1 ^B	12,6
C	68,6 ^B	15,4
D	99,5 ^A	7,7
E	74,8 ^{AB}	3,6
F	90,6 ^{AB}	14,8
G	89,8 ^{AB}	10,0
H	100,0 ^A	0,0

Fonte: O autor (2010)

Legenda:

- Grupo A: células + AH + PRP com trombina + HP
- Grupo B: células + AH + PRP+ HP
- Grupo C: células + AH + HP
- Grupo D: células + HP
- Grupo E: células + AH
- Grupo F: células + PRP com trombina
- Grupo G: células + PRP
- Grupo H (controle): células + DMEM

Médias seguidas de letras distintas diferem significativamente através da Análise de Variância, complementada pelo Teste de Comparações Múltiplas de Tukey, ao nível de significância de 5%.

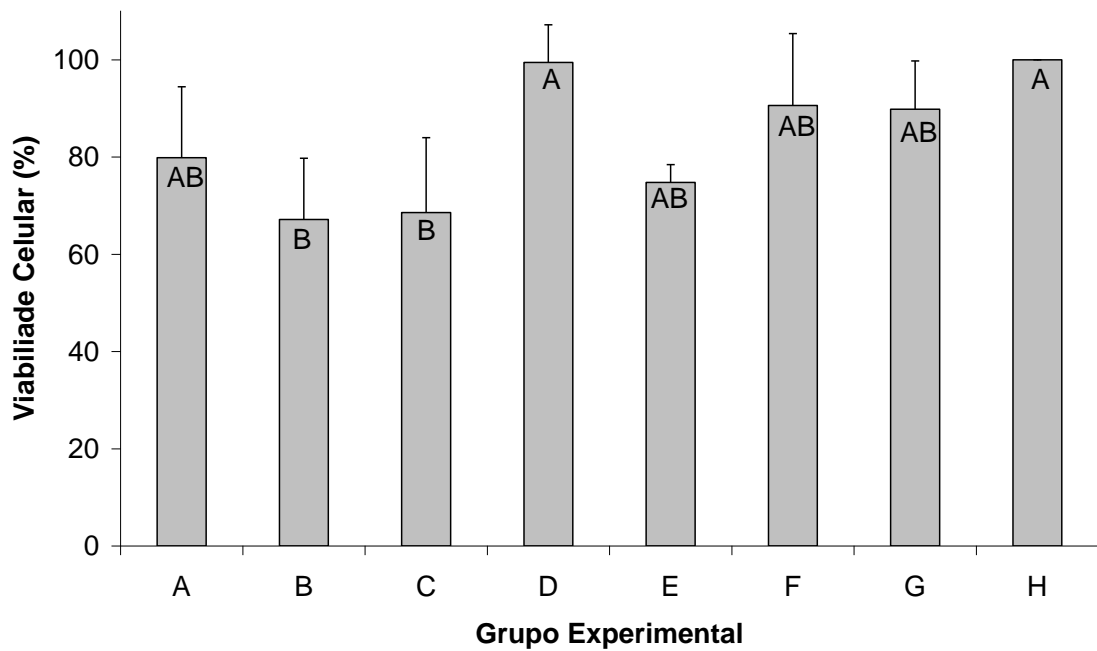


Figura 11: Gráfico de Viabilidade Celular

Fonte: O autor (2010)

Legenda:	
–	Grupo A: células + AH + PRP com trombina + HP
–	Grupo B: células + AH + PRP+ HP
–	Grupo C: células + AH + HP
–	Grupo D: células + HP
–	Grupo E: células + AH
–	Grupo F: células + PRP com trombina
–	Grupo G: células + PRP
–	Grupo H (controle): células + DMEM

5.2 ANÁLISE DA MORFOLOGIA ATRAVÉS DA MICROSCOPIA OPTICA

A figura 12 apresenta a fotomicrografia dos grupos experimentais A, C, D, E, F e controle H com as células após 48 horas de exposição direta ao ácido hialurônico, plasma rico em plaquetas com trombina e hidroxiapatita no aumento de 100x.

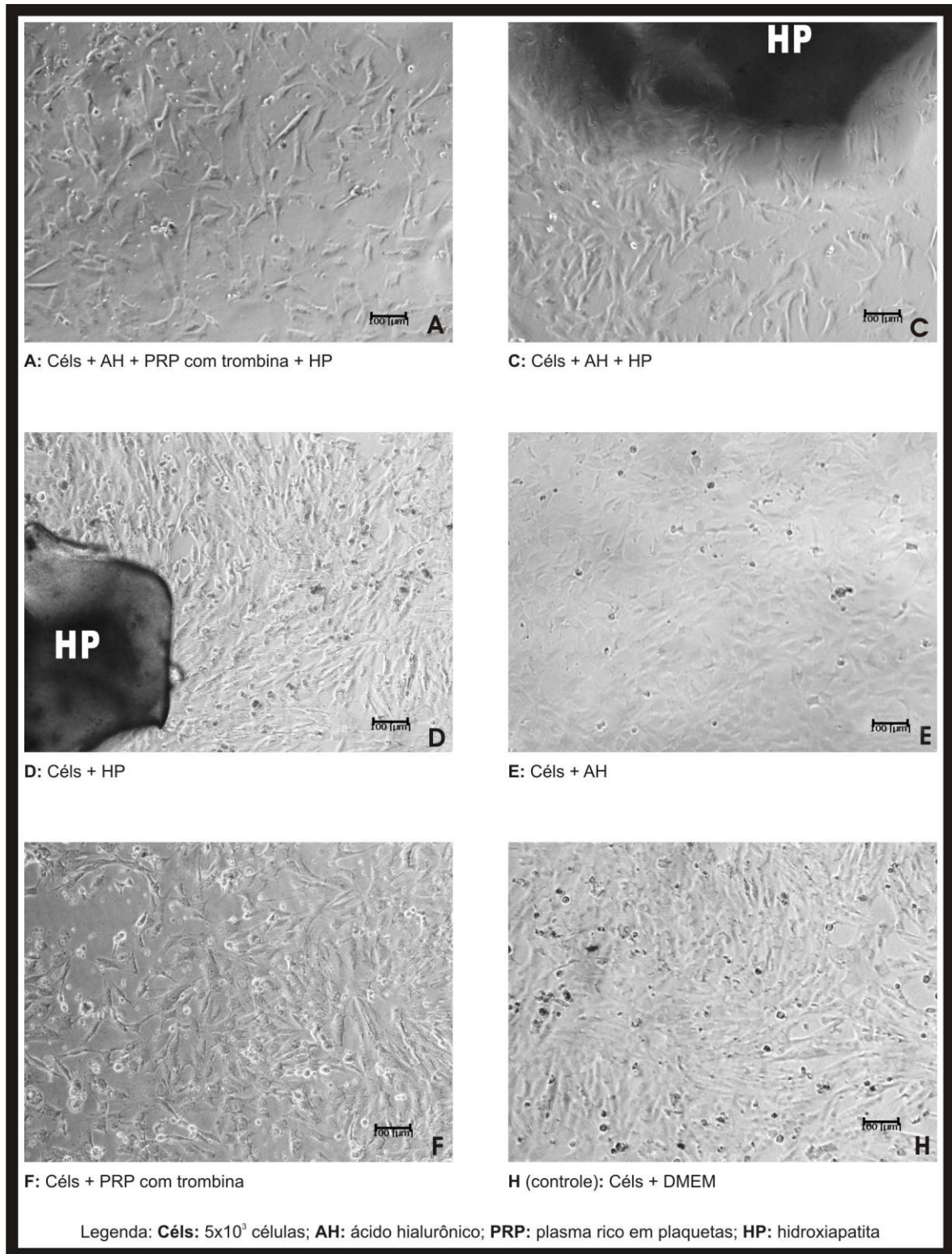
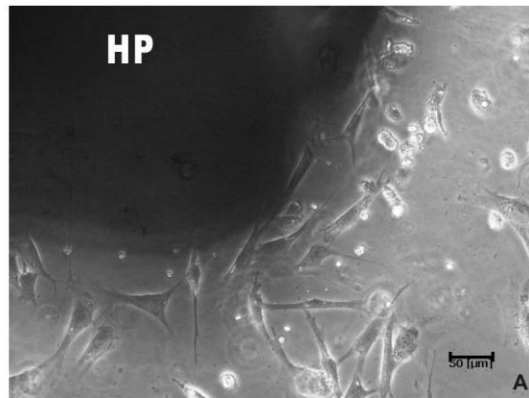


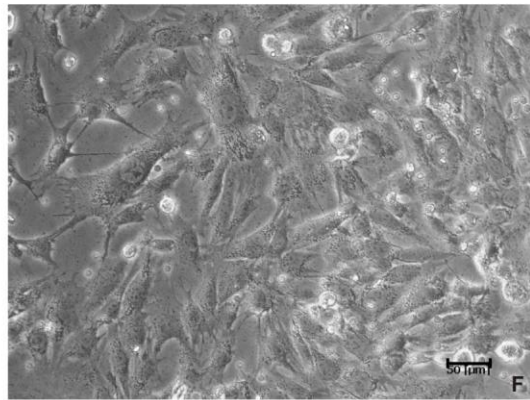
Figura 12: Fotomicrografia dos grupos A, C, D, E, F e H (com aumento de 100x)
 Fonte: O autor (2010)

Através destas imagens podemos observar uma tendência a diminuição na viabilidade celular nos grupos com a presença do ácido hialurônico (grupos A, C, E) e diferenças em sua morfologia, principalmente no grupo E. A densidade celular diferente encontrada nas imagens entre os grupos não está relacionada necessariamente ao tipo de tratamento. Nos grupos C e D observamos a partícula de hidroxiapatita (HP) com muitas células no seu contorno.

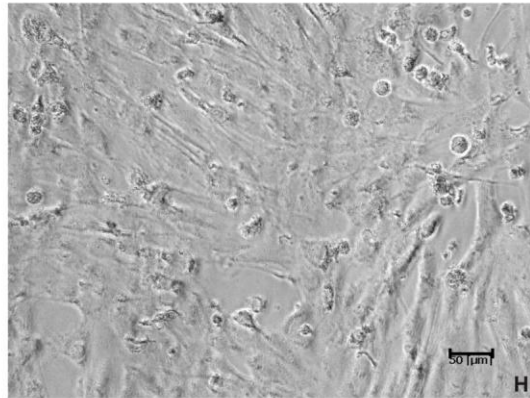
Já no aumento de 200x nos grupos A, F e H (controle) podemos observar nas três imagens muitas granulações escuras no interior celular, sugerindo organelas ou elevada síntese celular, representado na figura 13.



A: Célis + AH + PRP com trombina + HP



F: Célis + PRP com trombina



H (controle): Célis + DMEM

Legenda: **Célis**: 5×10^3 células; **AH**: ácido hialurônico; **PRP**: plasma rico em plaquetas; **HP**: hidroxiapatita

Figura 13: Fotomicrografia dos grupos A, F e H (com aumento de 200x)
Fonte: O autor (2010)

Podemos observar também a formação dos cristais de *Formazan* no interior das células após 2 horas de aplicação do MTT no aumento de 100x do grupo C, conforme figura 14.

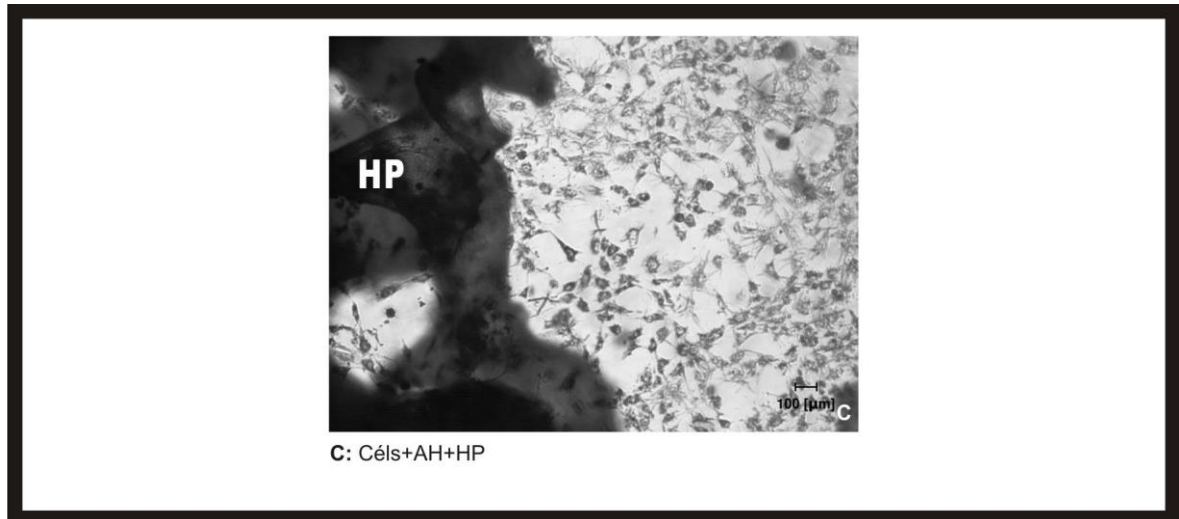


Figura 14: Fotomicrografia do grupo C com cristais de *Formazan* intra-celulares
Fonte: O autor (2010)

6 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos através do teste MTT nos 7 grupos experimentais comparados ao grupo H-controle (células + DEMEM) indicaram uma diminuição na viabilidade celular em todos os grupos com a presença do TEOSYAL®. No grupo B (células + AH + PRP + HP), no grupo C (células + AH + HP) e no grupo E (células+AH) tivemos diferença de absorbância comprovadas estatisticamente ($p < 0,05$). Já o grupo A (células + AH + PRP com trombina + HP) houve uma tendência similar, porém não estatisticamente significativa. Nos grupos D (células + HP), F (células + PRP com trombina) e G (células + PRP) não tivemos diferença estatística em relação ao grupo H, apesar da redução da viabilidade.

Através do mesmo teste MTT também foi possível comparar a viabilidade entre os grupos. Os grupos com o ácido hialurônico de menor viabilidade, o grupo B com 67% de viabilidade e o grupo C com 68% de viabilidade, foram semelhantes entre si, mas diferiram significativamente do grupo D (células + HP), o qual apresentou a maior viabilidade, com 99%. O grupo A (células + AH + PRP com trombina + HP) com 79% de viabilidade celular, o grupo E (células + AH) obteve viabilidade de 74%, o grupo F (células + PRP com trombina) com 90% e o grupo G com 89% (células + PRP) não diferiram estatisticamente entre si.

Após a breve descrição dos achados acima, faz-se importante analisar as possíveis influências do ácido hialurônico, do PRP, da trombina humana, da hidroxiapatita e da linhagem celular OFCOL II nos resultados finais.

Primeiramente, em relação ao PRP, quando encontrou-se uma viabilidade no grupo E (células + AH) de 74%, Kim et al. (2007b) também encontraram uma viabilidade de 72% das células-tronco mesenquimais humanas frente ao ácido hialurônico de alto peso molecular (170,000Da) no mesmo período de tempo. Porém, ao adicionarem BMP-2 no gel de ácido hialurônico, a viabilidade celular aumentou para 81%. Com este mesmo objetivo, neste ensaio foi adicionado PRP humano e obteve-se uma viabilidade celular aumentada para 79% no grupo A (células + AH + PRP com trombina + HP).

O objetivo de acrescentar PRP foi melhorar a resposta em relação a viabilidade celular, uma vez que o PRP apresenta, entre outros, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento de transformação

beta (TGF- β s) e o fator de crescimento similar à insulina (IGF-I) (MARX, 1999). A adição de trombina humana nos grupos A (células+AH+PRP com trombina + HP) e F (células + PRP com trombina) teve o objetivo a ativação plaquetária, sendo que ocorreu uma pequena melhora na viabilidade celular para os grupos com trombina como o grupo A (células +AH + PRP com trombina + HP) e F (células + PRP com trombina).

Krasna et al. (2007) testaram *in vitro* a aplicação do plasma rico em plaquetas na proliferação de células fibroblásticas humanas. Os autores testaram 5 diferentes concentrações de plasma rico em plaquetas (0, 0.2, 2, 10 e 20%) diluídos no meio de cultura. A maior concentração (20%) apresentou maior resposta ao teste MTT, comprovando que a estimulação celular pelo PRP é dose dependente. Portanto, o experimento de Krasna et al. (2007) foi importante na determinação do volume de PRP aplicado sobre as células OFCOL II.

Com este mesmo objetivo, ARPORNMAEKLONG et al. (2004) em um estudo *in vitro* aplicaram PRP em baixas e em altas concentrações sobre células pré-osteoblásticas de ratos e avaliaram proliferação e diferenciação celular. Através de seus resultados também tivemos uma maior proliferação celular nos grupos celulares com alta concentração de PRP, comprovando também sua dose dependência na proliferação celular.

No entanto, mesmo observando as vantagens do PRP quando aplicado sobre células em diversos estudos, neste ensaio, os grupos F (células + PRP com trombina) e G (células + PRP) tiveram alta viabilidade celular, mas o PRP não foi capaz de atuar como um agente potencializador de proliferação celular. Todos os grupos, com a presença do PRR, não superaram a viabilidade celular encontrada no grupo H-controle (células + DMEM).

Em relação ao ácido hialurônico TEOSYAL®, apresentado na formulação mais nativa dentre os ácidos hialurônicos existentes, testou-se neste primeiro momento a citotoxicidade sobre as células pré-osteoblásticas OFCOL II. Importante salientar que o termo citotoxicidade é utilizado para descrever a cascata de eventos moleculares que interferem na síntese molecular, causando disfunções celulares e danos estruturais (MURRAY et al., 2000).

A diminuição na viabilidade celular nos grupos com a presença do TEOSYAL® pode sugerir algumas novas hipóteses do efeito deste material. Mesmo sabendo que este estudo buscou no ácido hialurônico uma matriz biocompatível

(FRIEDMAN et al., 2002), de origem não animal não-alérgica e não imunogênica (LARSEN et al., 1993; MICHEELS, 2001), seu efeito foi inibitório sobre as células.

A primeira explicação para redução da viabilidade celular verificada, sendo um fator considerado muito relevante em vários outros estudos *in vitro* do ácido hialurônico frente a células osteoblásticas, é o peso molecular do ácido em questão (KUNZE et al., 2010; PILLONI; BERNARD, 1998; HUANG et al., 2003).

Na literatura atual há muita discussão em relação à capacidade proliferativa ou inibitória do ácido hialurônico de alto peso molecular. O ácido hialurônico de alto peso molecular e nas concentrações entre 50µg/ml e 1mg/ml tem revelado estímulo a proliferação de condrócitos (KAWASAKI et al., 1999), fibroblastos (YONEDA et al., 1988) e melanomas (AHRENS et al., 2001). Outros autores reportam que o ácido hialurônico de alto peso molecular inibe a proliferação de fibroblastos (BODO et al., 1993), queratinócitos (HARVIMA et al., 2006), células do ovário (DÜBE et al., 2001), células do tendão (WIIG; ABRAHAMSSON, 2000; WIIG; ABRAHAMSSON; LUNDBORG, 1996) e macrófagos (SHEEHAN et al., 2004).

Portanto, a diminuição da viabilidade celular pode ser especulada pela forma de apresentação deste ácido hialurônico, uma vez que o material testado apresenta alto peso molecular. Aproximando esta pesquisa a outros estudos *in vitro* que utilizaram células osteoblásticas e ácido hialurônico de alto peso molecular (> 1000kDa) ficou comprovada a inibição na proliferação celular enquanto que o ácido hialurônico de baixo peso molecular (< 50kDa) estimulou a proliferação celular (KUNZE et al., 2010; PILLONI; BERNARD, 1998). Frente aos resultados encontrados e relacionados aos demais achados por outros pesquisadores, podemos sugerir que a viabilidade celular frente ao ácido hialurônico *in vitro* pode estar relacionada com a concentração e o peso molecular do ácido utilizado. Nesta pesquisa a concentração utilizada foi 2,97 mg/ml, determinada conforme Curva de Concentração, portanto utilizou-se uma concentração três vezes maior que a recomendada por Kawasaki et al., 1999; Yoneda et al., 1988 e Ahrens et al., 2001. Desta maneira, a concentração utilizada também pode ter influenciado a diminuição da viabilidade celular OFCOL II observada nos resultados.

Outro fator ainda relacionado ao ácido hialurônico é a ausência da enzima hialuronidase neste estudo *in vitro*, visto que esta ausência pode aumentar a resistência à metabolização da molécula do ácido, permanecendo esta por mais tempo na sua forma mais natural. Com a possível degradação do presente ácido

pela hialuronidase teríamos moléculas menores. A vantagem da quebra da molécula do ácido hialurônico de alto peso molecular em moléculas menores é sua ação estimuladora celular, porém também pode desencadear a cascata de sinalização relacionada à resposta inflamatória (NOBLE, 2002).

Quanto ao comportamento da hidroxiapatita em relação às células, verificou-se um resultado positivo ao atingir uma viabilidade de 99% no grupo D (células + HP). No entanto, a hidroxiapatita não foi capaz de reverter o efeito inibitório do ácido hialurônico, já que o grupo C (células + AH + HP) apresentou uma das menores viabilidades celulares registradas neste experimento. Através das imagens também observou-se que as células aderiram-se nas partículas de hidroxiapatita, porém este material não influenciou a viabilidade celular.

Partindo para uma análise mais ampla, porém não menos importante, faz-se necessário reiterar que os presentes resultados foram obtidos em testes *in vitro*. Estes estudos *in vitro*, apesar de vários benefícios, apresentam certas limitações em relação aos estudos *in vivo*. Na engenharia tecidual os estudos *in vitro* não permitem a aplicação da força muscular provocada pelo sistema músculo-esquelético responsável pela indução fisiológica de formação de tecido ósseo (SPECTOR, 1999). Os achados de Kim et al. (2007b) tiveram resultados diferentes para o mesmo ácido hialurônico aplicado *in vitro* e *in vivo*, uma vez que os achados para os testes *in vivo* foram melhores em relação a formação de tecido ósseo.

Considerando que o presente estudo de forma quantitativa, através do teste colorimétrico MTT, mostrou uma viabilidade celular média com a presença do ácido hialurônico de 72% e de forma qualitativa, através da microscopia, indicou alta síntese celular, sugere-se estudos adicionais com o presente ácido hialurônico *in vitro* e *in vivo*. Ou ainda, sugere-se testar alterações na fórmula de ácido hialurônico, com modificações entre suas ligações como a adição de ésteres e quebra da molécula no intuito de melhorar suas características estruturais. Porém, lembrando de que toda e qualquer alteração na molécula do ácido hialurônico não deverá alterar suas propriedades quanto à viscoelasticidade e funções biológicas.

7 CONCLUSÃO

A partir dos resultados do presente estudo e nas condições em que foram obtidos é possível concluir que:

- A presença do ácido hialurônico TEOSYAL® diminuiu a viabilidade celular no ensaio de citotoxicidade;
- A adição de plasma rico em plaquetas aumentou a viabilidade na presença do ácido hialurônico, porém não foi capaz de potencializar a viabilidade de forma a equiparar-se com o grupo H (controle). A presença de trombina no PRP mostrou pequena melhora na viabilidade celular;
- A hidroxiapatita atuou simplesmente como um arcabouço celular, onde as células aderiram-se, no entanto, não teve influência indutora ou inibidora na viabilidade celular;
- Não podemos afirmar que o presente ácido hialurônico apresenta efeito citotóxico sobre as células, dada a viabilidade celular média de 72% encontrada.

REFERÊNCIAS

1. Abukawa H, Shin M, Williams WB, Vacanti JP, Kaban LB, Troulis MJ. Reconstruction of mandibular defects with autologous tissue-engineered bone. *J Oral Maxillofac Surg.* 2004 May;62(5):601-6.
2. Aebli N, Stich H, Schawalder P, Theis JC, Krebs J. Effects of bone morphogenetic protein-2 and hyaluronic acid on the osseointegration of hydroxyapatite-coated implants: an experimental study in sheep. *J Biomed Mater Res A.* 2005 Jun 1;73(3):295-302.
3. Ahrens T, Assmann V, Fieber C, Termeer C, Herrlich P, Hofmann M, Simon JC. CD44 is the principal mediator of hyaluronic-acid-induced melanoma cell proliferation. *J Invest Dermatol.* 2001 Jan;116(1):93-101.
4. Aksu AE, Rubin JP, Dudas JR, Marra KG. Role of gender and anatomical region on induction of osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells. *Ann Plast Surg.* 2008 Mar;60(3):306-22.
5. 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 Jul-Aug;14(4):529-35.
6. Arpornmaeklong P, Kochel M, Depprich R, Kübler NR, Würzler KK. Influence of platelet-rich plasma (PRP) on osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells. An *in vitro* study. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2004 Jan;33(1):60-70.
7. Arrigoni E, Lopa S, de Girolamo L, Stanco D, Brini AT. Isolation, characterization and osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells: from small to large animal models. *Cell Tissue Res.* 2009 Dec;338(3):401-11.
8. Aslan M, Simsek G, Dayi E. The effect of hyaluronic acid-supplemented bone graft in bone healing: experimental study in rabbits. *J Biomater Appl.* 2006 Jan;20(3):209-20.
9. Balazs EA, Bland PA, Denlinger JL, Goldman AI, Larsen NE, Leshchiner EA, Leshchiner A, Morales B. Matrix engineering. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 1991 Feb;2(1):173-8.
10. Balduino A, Hurtado SP, Frazão P, Takiya CM, Alves LM, Nasciutti LE, El-Cheikh MC, Borojevic R. Bone marrow subendosteal microenvironment harbours functionally distinct haemosupportive stromal cell populations. *Cell Tissue Res.* 2005 Feb;319(2):255-66.

11. Ballini A, Cantore S, Capodiferro S, Grassi FR. Esterified hyaluronic acid and autologous bone in the surgical correction of the infra-bone defects. *Int J Med Sci.* 2009;6(2):65-71.
12. Beaman FD, Bancroft LW, Peterson JJ, Kransdorf MJ. Bone graft materials and synthetic substitutes. *Radiol Clin North Am.* 2006 May;44(3):451-61.
13. Bean TA, Zhuang WC, Tong PY, Eick JD, Chappelow CC, Yourtee DM. Comparison of tetrazolium colorimetric and ⁵¹Cr release assays for cytotoxicity determination of dental biomaterials. *Dent Mater.* 1995 Sep;11(5):327-31.
14. Bell E. Tissue engineering in perspective. In: Lanza RP, Langer R, Vacanti J., editors. *Principles of tissue engineering.* 2. ed. San Diego: Academic Press, 2000. p. xxxv-xli.
15. Bergeret-Galley C. Comparison of resorbable soft tissue fillers. *Aesthet Surg J.* 2004 Jan-Feb;24(1):33-46.
16. Bodo M, Pezzetti F, Baroni T, Carinci F, Arena N, Nicoletti I, Becchetti E. Hyaluronic acid modulates growth, morphology and cytoskeleton in embryonic chick skin fibroblasts. *Int J Dev Biol.* 1993 Jun;37(2):349-52.
17. Boix D, Gauthier O, Guicheux J, Pilet P, Weiss P, Grimandi G, Daculsi G. Alveolar bone regeneration for immediate implant placement using an injectable bone substitute: an experimental study in dogs. *J Periodontol.* 2004 May;75(5):663-71.
18. Bulpitt P, Aeschlimann D. New strategy for chemical modification of hyaluronic acid: preparation of functionalized derivatives and their use in the formation of novel biocompatible hydrogels. *J Biomed Mater Res.* 1999 Nov;47(2):152-69.
19. Cowan CM, Shi YY, Aalami OO, Chou YF, Mari C, Thomas R, Quarto N, Contag CH, Wu B, Longaker MT. Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects. *Nat Biotechnol.* 2004 May;22(5):560-7. Epub 2004 Apr 11.
20. Cristino S, Grassi F, Toneguzzi S, Piacentini A, Grigolo B, Santi S, Riccio M, Tognana E, Facchini A, Lisignoli G. Analysis of mesenchymal stem cells grown on a three-dimensional HYAFF 11-based prototype ligament scaffold. *J Biomed Mater Res A.* 2005 Jun;73(3):275-83.
21. Draper JS, Fox V. Human embryonic stem cells: multilineage differentiation and mechanisms of self-renewal. *Arch Med Res.* 2003 Nov-Dec;34(6):558-64.
22. Dübe B, Lüke HJ, Aumailley M, Prehm P. Hyaluronan reduces migration and proliferation in CHO cells. *Biochim Biophys Acta.* 2001 Apr 23;1538(2-3):283-9.

23. Ducheyne P, Qiu Q. Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function. *Biomaterials*. 1999 Dec;20(23-24):2287-303.
24. Efeoglu C, Akçay YD, Ertürk S. A modified method for preparing platelet-rich plasma: an experimental study. *J Oral Maxillofac Surg*. 2004 Nov;62(11):1403-7.
25. Friedman PM, Mafong EA, Kauvar AN, Geronemus RG. Safety data of injectable nonanimal stabilized hyaluronic acid gel for soft tissue augmentation. *Dermatol Surg*. 2002 Jun;28(6):491-4.
26. Gamini A, Paoletti S, Toffanin R, Micali F, Michielin L, Bevilacqua C. Structural investigations of cross-linked hyaluronan. *Biomaterials*. 2002 Feb;23(4):1161-7.
27. Garg AK. Grafting materials in repair and restoration. In: Lynch SE, Genco RJ, Marx RE. *Tissue engineering: applications in maxillofacial surgery and periodontics*. Chicago: Quintessence; 1999. p. 83-101.
28. Genasetti A, Vigetti D, Viola M, Karousou E, Moretto P, Rizzi M, Bartolini B, Clerici M, Pallotti F, De Luca G, Passi A. Hyaluronan and human endothelial cell behavior. *Connect Tissue Res*. 2008;49(3):120-3.
29. Giannobile W. Periodontal tissue regeneration by polypeptide growth factors and gene transfer. In: Lynch SE, Genco RJ, Marx RE. *Tissue engineering applications in maxillofacial surgery and periodontics*. v. 1. Chicago: Quintessence; 1999. p. 231-43.
30. Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury*. 2005 Nov;36 Suppl 3:S20-7.
31. Goa KL, Benfield P. Hyaluronic acid. A review of its pharmacology and use as a surgical aid in ophthalmology, and its therapeutic potential in joint disease and wound healing. *Drugs*. 1994 Mar;47(3):536-66.
32. Greenwald AS, Boden SD, Goldberg VM, Khan Y, Laurencin CT, Rosier RN; American Academy of Orthopaedic Surgeons. The Committee on Biological Implants. Bone-graft substitutes: facts, fictions, and applications. *J Bone Joint Surg Am*. 2001;83-A Suppl 2 Pt 2:98-103.
33. Hanks CT, Wataha JC, Sun Z. *In vitro* models of biocompatibility: a review. *Dent Mater*. 1996 May;12(3):186-93.
34. Harvima IT, Heikura H, Hyttinen M, Naukkarinen A. Hyaluronic acid inhibits the adherence and growth of monolayer keratinocytes but does not affect the growth of keratinocyte epithelium. *Arch Dermatol Res*. 2006 Oct;298(5):207-19.

35. Hibi H, Yamada Y, Kagami H, Ueda M. Distraction osteogenesis assisted by tissue engineering in an irradiated mandible: a case report. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2006a Jan-Feb;21(1):141-7.
36. Hibi H, Yamada Y, Ueda M, Endo Y. Alveolar cleft osteoplasty using tissue-engineered osteogenic material. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2006b Jun;35(6):551-5.
37. Hofmann A, Konrad L, Gotzen L, Printz H, Ramaswamy A, Hofmann C. Bioengineered human bone tissue using autogenous osteoblasts cultured on different biomatrices. *J Biomed Mater Res A*. 2003 Oct 1;67(1):191-9.
38. Horwitz EM. Stem cell plasticity: the growing potential of cellular therapy. *Arch Med Res*. 2003 Nov-Dec;34(6):600-6.
39. Huang L, Cheng YY, Koo PL, Lee KM, Qin L, Cheng JC, Kumta SM. The effect of hyaluronan on osteoblast proliferation and differentiation in rat calvarial-derived cell cultures. *J Biomed Mater Res A*. 2003 Sep;66(4):880-4.
40. Ito K, Yamada Y, Nagasaka T, Baba S, Ueda M. Osteogenic potential of injectable tissue-engineered bone: a comparison among autogenous bone, bone substitute (Bio-oss), platelet-rich plasma, and tissue-engineered bone with respect to their mechanical properties and histological findings. *J Biomed Mater Res A*. 2005 Apr 1;73(1):63-72.
41. Ito K, Yamada Y, Naiki T, Ueda M. Simultaneous implant placement and bone regeneration around dental implants using tissue-engineered bone with fibrin glue, mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma. *Clin Oral Implants Res*. 2006 Oct;17(5):579-86.
42. Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells *in vitro*. *J Cell Biochem*. 1997 Feb;64(2):295-312.
43. Kaigler D, Mooney D. Tissue engineering's impact on dentistry. *J Dent Educ*. 2001 May;65(5):456-62.
44. Kang SK, Lee DH, Bae YC, Kim HK, Baik SY, Jung JS. Improvement of neurological deficits by intracerebral transplantation of human adipose tissue-derived stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Exp Neurol*. 2003 Oct;183(2):355-66.
45. Kao ST, Scott DD. A review of bone substitutes. *Oral Maxillofacial Surg Clin N Am*. 2007 Nov;19(4):513-21.
46. Kasten P, Vogel J, Beyen I, Weiss S, Niemeyer P, Leo A, Luginbuhl R. Effect of platelet-rich plasma on the *in vitro* proliferation and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells on distinct calcium phosphate scaffolds: the specific surface area makes a difference. *J Biomater Appl*. 2008 Sep;23(2):169-88.

47. Kawasaki K, Ochi M, Uchio Y, Adachi N, Matsusaki M. Hyaluronic acid enhances proliferation and chondroitin sulfate synthesis in cultured chondrocytes embedded in collagen gels. *J Cell Physiol.* 1999 May;179(2):142-8.
48. Kim E, Jeon IS, Kim JW, Kim J, Jung HS, Lee SJ. An MTT-based method for quantification of periodontal ligament cell viability. *Oral Dis.* 2007a Sep;13(5):495-9.
49. Kim J, Kim IS, Cho TH, Lee KB, Hwang SJ, Tae G, Noh I, Lee SH, Park Y, Sun K. Bone regeneration using hyaluronic acid-based hydrogel with bone morphogenic protein-2 and human mesenchymal stem cells. *Biomaterials.* 2007b Apr;28(10):1830-7.
50. Kinoshita K, Hibi H, Yamada Y, Ueda M. Promoted new bone formation in maxillary distraction osteogenesis using a tissue-engineered osteogenic material. *J Craniofac Surg.* 2008 Jan;19(1):80-7.
51. Krasna M, Domanović D, Tomsic A, Svajger U, Jeras M. Platelet gel stimulates proliferation of human dermal fibroblasts *in vitro*. *Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat.* 2007 Sep;16(3):105-10.
52. Kunze R, Rösler M, Möller S, Schnabelrauch M, Riemer T, Hempel U, Dieter P. Sulfated hyaluronan derivatives reduce the proliferation rate of primary rat calvarial osteoblasts. *Glycoconj J.* 2010 Jan;27(1):151-8.
53. Larsen NE, Pollak CT, Reiner K, Leshchiner E, Balazs EA. Hylan gel biomaterial: dermal and immunologic compatibility. *J Biomed Mater Res.* 1993 Sep;27(9):1129-34.
54. Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA. The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications. *J Bone Joint Surg Am.* 2002 Jun;84-A(6):1032-44. Review.
55. Lin L, Chow KL, Leng Y. Study of hydroxyapatite osteoinductivity with an osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Biomed Mater Res A.* 2009 May;89(2):326-35.
56. Logeart-Avramoglou D, Anagnostou F, Bizios R, Petite H. Engineering bone: challenges and obstacles. *J Cell Mol Med.* 2005 Jan-Mar;9(1):72-84. Review.
57. Lynch SE. Introduction. In: Lynch SE, Genco RJ, Marx RE. *Tissue engineering applications in maxillofacial surgery and periodontics.* Chicago: Quintessence; 1999. p. xi-xviii.
58. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998 Jun;85(6):638-46.

59. Marx RE. Platelet-rich plasma: a source of multiple autologous growth factors for bone grafts. In: Lynch SE, Genco RJ, Marx RE. Tissue engineering: applications in maxillofacial surgery and periodontics. Chicago: Quintessence; 1999. p. 71-82.
60. Mellonig JT. Freeze-dried bone allografts in periodontics. In: Lynch SE, Genco RJ, Marx RE. Tissue engineering: applications in maxillofacial surgery and periodontics. Chicago: Quintessence; 1999. p. 259-68.
61. Micheels P. Human anti-hyaluronic acid antibodies: is it possible? *Dermatol Surg.* 2001 Feb;27(2):185-91.
62. Misch CE. Aumento do osso para a inserção do implante: soluções para o enxerto ósseo. In: Misch CE. Implantes dentários contemporâneos. 2 ed. São Paulo: Santos, 2000. p. 451-67.
63. Miyahara Y, Nagaya N, Kataoka M, Yanagawa B, Tanaka K, Hao H, Ishino K, Ishida H, Shimizu T, Kangawa K, Sano S, Okano T, Kitamura S, Mori H. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nat Med.* 2006 Apr;12(4):459-65.
64. Mizuno H. Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: ten years of research and a literature review. *J Nippon Med Sch.* 2009 Apr;76(2):56-66.
65. Moore WR, Graves SE, Bain GI. Synthetic bone graft substitutes. *ANZ J Surg.* 2001 Jun;71(6):354-61.
66. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983 Dec 16;65(1-2):55-63.
67. Murray PE, Lumley PJ, Ross HF, Smith AJ. Tooth slice organ culture for cytotoxicity assessment of dental materials. *Biomaterials.* 2000 Aug;21(16):1711-21.
68. Muschler GF, Nakamoto C, Griffith LG. Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering. *J Bone Joint Surg Am.* 2004 Jul;86-A(7):1541-58. Review.
69. Noble PW. Hyaluronan and its catabolic products in tissue injury and repair. *Matrix Biol.* 2002 Jan;21(1):25-9.
70. Nobre MA, Cintra N, Maló P. Peri-implant maintenance of immediate function implants: a pilot study comparing hyaluronic acid and chlorhexidine. *Int J Dent Hyg.* 2007 May;5(2):87-94.
71. Ohya M, Yamada Y, Ozawa R, Ito K, Takahashi M, Ueda M. Sinus floor elevation applied tissue-engineered bone. Comparative study between mesenchymal stem cells/platelet-rich plasma (PRP) and autogenous bone with PRP complexes in rabbits. *Clin Oral Implants Res.* 2005 Oct;16(5):622-9.

72. Ozdemir KG, Yilmaz H, Yilmaz S. *In vitro* evaluation of cytotoxicity of soft lining materials on L929 cells by MTT assay. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2009 Jul;90(1):82-6.
73. Peres LAB, Delfino VDA, Mocelin AJ, Tutida LA, Favero ME, Matsuo T. Standardization of MTT-Assay in a Cold Preservation Models as a Toll for Assessment of Kidney Cell Viability. *J Bras Nefrol* 2008;30(1):48-53.
74. Piattelli A, Scarano A, Mangano C. Clinical and histologic aspects of biphasic calcium phosphate ceramic (BCP) used in connection with implant placement. *Biomaterials.* 1996 Sep;17(18):1767-70.
75. Pilloni A, Bernard GW. The effect of hyaluronan on mouse intramembranous osteogenesis *in vitro*. *Cell Tissue Res.* 1998 Nov;294(2):323-33.
76. Pinto AVS, Miyagusko JM, Soares MM, Joazeiro PP, Yamada AT, Pereira LAV. Distração osteogênica. In: *Implantes ósseo integrado*. In: Dinato JC, Polido WD. *Implantes osseointegrados: cirurgia e prótese*. São Paulo: Artes Medicas, 2004. p. 397-421.
77. Polyzois GL. *In vitro* evaluation of dental materials. *Clin Mater.* 1994;16(1):21-60. Review.
78. Prestwich GD, Marecak DM, Marecek JF, Vercruysse KP, Ziebell MR. Controlled chemical modification of hyaluronic acid: synthesis, applications, and biodegradation of hydrazide derivatives. *J Control Release.* 1998 Apr;53(1-3):93-103.
79. Ripamonti U, Heliotis M, Ferretti C. Bone morphogenetic proteins and the induction of bone formation: from laboratory to patients. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* 2007 Nov;19(4):575-89, vii. Review.
80. Ripamonti U, Reddi AH. Tissue engineering, morphogenesis, and regeneration of the periodontal tissues by bone morphogenetic proteins. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1997;8(2):154-63. Review.
81. Risbud MV, Shapiro IM. Stem cells in craniofacial and dental tissue engineering. *Orthod Craniofac Res.* 2005 May;8(2):54-9.
82. Ross N, Tacconi L, Miles JB. Heterotopic bone formation causing recurrent donor site pain following iliac crest bone harvesting. *Br J Neurosurg.* 2000 Oct;14(5):476-9.
83. Sasaki T, Watanabe C. Stimulation of osteoinduction in bone wound healing by high-molecular hyaluronic acid. *Bone.* 1995 Jan;16(1):9-15.
84. Schwartz Z, Goldstein M, Raviv E, Hirsch A, Ranly DM, Boyan BD. Clinical evaluation of demineralized bone allograft in a hyaluronic acid carrier for sinus lift

augmentation in humans: a computed tomography and histomorphometric study. *Clin Oral Implants Res.* 2007 Apr;18(2):204-11.

85. Sheehan KM, DeLott LB, West RA, Bonnema JD, DeHeer DH. Hyaluronic acid of high molecular weight inhibits proliferation and induces cell death in U937 macrophage cells. *Life Sci.* 2004 Nov 12;75(26):3087-102.

86. Solchaga LA, Dennis JE, Goldberg VM, Caplan AI. Hyaluronic acid-based polymers as cell carriers for tissue-engineered repair of bone and cartilage. *J Orthop Res.* 1999 Mar;17(2):205-13.

87. Spector M. Basic principles of tissue engineering. In: Lynch SE, Genco RJ, Marx RE. *Tissue engineering applications in maxillofacial surgery and periodontics.* Chicago: Quintessence; 1999. p. 3-16.

88. Stern M, Longaker MT, Adzick S, Kaban LB. Wound healing and regeneration in a fetal cleft lip model. In: Lynch SE, Genco RJ, Marx RE. *Tissue engineering applications in maxillofacial surgery and periodontics.* Chicago: Quintessence, 1999. p. 55-68.

89. Takamine Y, Tsuchiya H, Kitakoji T, Kurita K, Ono Y, Ohshima Y, Kitoh H, Ishiguro N, Iwata H. Distraction osteogenesis enhanced by osteoblastlike cells and collagen gel. *Clin Orthop Relat Res.* 2002 Jun;(399):240-6.

90. Tobita M, Uysal AC, Ogawa R, Hyakusoku H, Mizuno H. Periodontal tissue regeneration with adipose-derived stem cells. *Tissue Eng Part A.* 2008 Jun;14(6):945-53.

91. Tsubota S, Tsuchiya H, Shinokawa Y, Tomita K, Minato H. Transplantation of osteoblast-like cells to the distracted callus in rabbits. *J Bone Joint Surg Br.* 1999 Jan;81(1):125-9.

92. Ueda M, Yamada Y, Kagami H, Hibi H. Injectable bone applied for ridge augmentation and dental implant placement: human progress study. *Implant Dent.* 2008 Mar;17(1):82-90.

93. Ueda M, Yamada Y, Ozawa R, Okazaki Y. Clinical case reports of injectable tissue-engineered bone for alveolar augmentation with simultaneous implant placement. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2005 Apr;25(2):129-37.

94. Vacanti CA. The history of tissue engineering. *J Cell Mol Med.* 2006 Jul-Sep;10(3):569-76.

95. Vacanti JP; Vacanti CA. The history and scope of tissue engineering. In: Lanza RP, Langer R, Vacanti J., editors. *Principles of tissue engineering.* 2. ed. San Diego: Academic Press, 2000. p. 3-7.

96. Whitman DH, Berry RL. A technique for improving the handling of particulate cancellous bone and marrow grafts using platelet gel. *J Oral Maxillofac Surg.* 1998 Oct;56(10):1217-8.
97. Wiig M, Abrahamsson SO, Lundborg G. Effects of hyaluronan on cell proliferation and collagen synthesis: a study of rabbit flexor tendons *in vitro*. *J Hand Surg Am.* 1996 Jul;21(4):599-604.
98. Wiig M, Abrahamsson SO. Hyaluronic acid modulates cell proliferation unequally in intrasynovial and extrasynovial rabbit tendons *in vitro*. *J Hand Surg Br.* 2000 Apr;25(2):183-7.
99. Xu C, Wang Y, Yu X, Chen X, Li X, Yang X, Li S, Zhang X, Xiang AP. Evaluation of human mesenchymal stem cells response to biomimetic bioglass-collagen-hyaluronic acid-phosphatidylserine composite scaffolds for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res A.* 2009 Jan;88(1):264-73.
100. Yamada Y, Ueda M, Hibi H, Baba S. A novel approach to periodontal tissue regeneration with mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma using tissue engineering technology: A clinical case report. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2006 Aug;26(4):363-9.
101. Yamada Y, Ueda M, Hibi H, Nagasaka T. Translational research for injectable tissue-engineered bone regeneration using mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma: from basic research to clinical case study. *Cell Transplant.* 2004a;13(4):343-55.
102. Yamada Y, Ueda M, Naiki T, Nagasaka T. Tissue-engineered injectable bone regeneration for osseointegrated dental implants. *Clin Oral Implants Res.* 2004b Oct;15(5):589-97.
103. Yoneda M, Yamagata M, Suzuki S, Kimata K. Hyaluronic acid modulates proliferation of mouse dermal fibroblasts in culture. *J Cell Sci.* 1988 Jun;90 (Pt 2):265-73.
104. Yui N, Okano T, Sakurai Y. Inflammation responsive degradation of crosslinked hyaluronic acid gels. *J Control Release* 1992 Oct 22(2):105-16.
105. Zago MA. Células-tronco: origens e propriedades. In: Zago MA, Covas DT, editores. *Células-tronco: a nova fronteira da medicina.* São Paulo: Atheneu. 2006. p. 3-20.
106. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 2001 Apr;7(2):211-28.

**ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO CIENTÍFICA E DE ÉTICA
DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA PUCRS**



*Comissão Científica e de Ética
Faculdade da Odontologia da PUCRS*

Porto Alegre 11 de Agosto de 2010

O Projeto de: Dissertação

Protocolado sob n°: 0023/10
Intitulado: Ensaio de citotoxicidade do ácido hialurônico como veículo
no composto celular autógeno para enxertia óssea
Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Eduardo Rolim Teixeira
Pesquisadores Associados Daniel Gonçalves Boeckel
Nível: Dissertação / Mestrado

Foi **aprovado** pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS
em 11 de Agosto de 2010.

Profa. Dra. Ana Maria Spohr
Presidente da Comissão Científica e de Ética da
Faculdade de Odontologia da PUCRS

ANEXO B – CARTA DO BANCO DE CÉLULAS OFCOL II

Página Rio de Janeiro - Cell Banke

1 de 1



RJCB Collection

Rio de Janeiro - Cell Bank

[Home Page](#)

Results of Search

BCRJ: HB0261
Cell Line: OFCOL II
Tissue: HEMATOPOIETIC
Organ: BONE MARROW
Cell Type:
Morphology: FIBROBLAST-LIKE
Pathology: NORMAL
Scientific Name: MUS MUSCULUS
Vulgar Name: MOUSE BALBC
Sex:
Miscellaneous Info: Cell Type Osteoblast
Virus
Susceptibility:
Virus Resistance:
Tumor Formation:
Products:
Dependency
Isoenzymes:
Culture Medium: Dulbecco's medium 85%, fetal bovine serum 15% . Subculture procedure: standard trypsinization techniques. A split ratio 1:4 to 1:8 is recommended.
Consigner: Alex Balduino, Histologia e Embriologia Universidade Federal do Rio de Janeiro
Reference:
Additional Info: Growth Properties: adherent
ATCC:
Biosafety: 01

© 2000 Rio de Janeiro - Cell Bank / UFRJ
 Conectada à INTERNET através da [RedeRio](#) de computadores
[Webmaster RJCB](#)