



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

Curso de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas

**Dissertação de Mestrado**

**“Análise do Comportamento de Cementoblastos  
de Ratos em Contato com o Produto  
Iônico da Dissolução de Vidros Bioativos”**

**Autora: Sandhra Maria de Carvalho**

**Orientadora: Profa. Marivalda de Magalhães Pereira**

**Co-Orientadora: Profa. Maria de Fátima Leite**

**Fevereiro 2010**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
Curso de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas

Sandhra Maria de Carvalho

**ANÁLISE DO COMPORTAMENTO DE CEMENTOBLASTOS  
DE RATOS EM CONTATO COM O PRODUTO  
IÔNICO DA DISSOLUÇÃO DE VIDROS BIOATIVOS**

Dissertação de pesquisa de mestrado apresentada ao curso de Pós-Graduação em:  
Engenharia Metalúrgica e de Minas da Universidade Federal de Minas Gerais

Área de Concentração: Ciência dos Materiais

Orientadora: Profa. Marivalda de Magalhães Pereira, Phd

Co-Orientadora: Profa. Maria de Fátima Leite, Phd

**Belo Horizonte**  
**Escola de Engenharia da UFMG**  
**2010**

## AGRADECIMENTOS

- Dedico esse trabalho a Deus que sempre me orienta no que faço.
- Aos meus pais Protilde ‘*In Memoriam*’ e José pelo apoio e amor que sempre me deram.
- Ao meu marido Cícero pelo amor e compreensão. Obrigada por me apoiar em tudo que faço!
- À minha sogra Filomena ‘*In Memoriam*’. Obrigada por ter sido minha segunda mãe.
- À minha orientadora Marivalda de Magalhães Pereira pela confiança, oportunidade e acima de tudo pela amizade.
- À minha co-orientadora Maria de Fátima Leite pelos ensinamentos, conselhos e principalmente pelo apoio e amizade.
- Às minhas amigas inspiradoras Patrícia Valério e Lorenza Carvalhaes.
- A todos os meus amigos do laboratório de sinalização de Cálcio especialmente Vanessa e Camila (minhas filhotas do coração), Michele, Carolina (Carolchita), Cláudia, Lídia e Viviane Andrade.
- A todos os meus amigos da Engenharia Metalúrgica, especialmente Agda e Magda (minhas irmãs de coração), Iaci, Alexandra , Viviane Gomide, Dickson e Luísa.
- À minha querida cunhada Cláudia, meu amigo Rodrigo Neiva e aos meus queridos cunhados Otávio e Portugal pelo incentivo.
- Aos professores do Instituto de Ciências Biológicas, que me ajudaram nesse trabalho me cedendo equipamentos para meus experimentos, especialmente ao Prof. Alfredo Góes.
- Ao apoio financeiro da CAPES.

*“As perguntas mais simples são as mais profundas.*

*Pense sobre isso, de vez em quando, e  
observe as suas respostas se modificarem”*

*(Richard Bach, escritor Americano)*

## SUMÁRIO

<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>VI</b>
<b>ÍNDICE DE TABELAS.....</b>	<b>VII</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>VIII</b>
<b>RESUMO</b>	<b>XI</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>XII</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>7</b>
2.1 Objetivo Geral.....	7
2.2 Objetivos Específicos .....	7
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>10</b>
3.1. O Cimento .....	10
Componentes do Cimento .....	11
Classificação do Cimento.....	11
3.2 Cementogênese .....	12
3.2.1 Fatores Associados com o Desenvolvimento e a Regeneração do Cimento .	14
3.2.2 Fatores Específicos do Cimento .....	17
3.3. A Engenharia de Tecidos na Regeneração do Cimento .....	19
3.4. Biocerâmicas e Vidros Bioativos.....	22
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>26</b>
4.1. Isolamento e Caracterização de Cementoblastos.....	26
4.1.1. Isolamento e Cultura de cementoblastos .....	26
4.1.2. Cultura de Fibroblastos Gengivais de Ratos Adultos para Controle .....	27
4.1.3. Caracterização das Populações Celulares .....	27
4.1.4. RT-PCR para F-Spondin de Cementoblastos .....	28
4.1.5. Extração de RNA de Fibroblastos Gengivais para Controle da Expressão de F-Spondin.....	31
4.1.6. Ensaio de Western Blot para Verificação da Expressão de F-Spondin.....	32
4.1.7. Imunofluorescência para Análise da expressão de F-Spondin .....	33

4.2. Análise do Comportamento das Populações Celulares em Contato com o Produto Iônico da Dissolução de Vidro Bioativo.....	33
4.2.1. Síntese de Vidro Bioativo Microparticulado.....	34
4.2.2. Preparação do Meio com o Produto Iônico da Dissolução de VB60S.....	35
4.2.3. Viabilidade de Populações Celulares Tratadas com VB60S Utilizando Azul de Trypan.....	35
4.2.4. Proliferação Celular por MTT.....	35
4.2.5. Proliferação Celular por (BrdU).....	36
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>39</b>
5.1. Isolamento e caracterização de cementoblastos.....	39
5.1.1. Morfologia e crescimento celular .....	39
5.1.2. RT-PCR Qualitativo para F-Spondin nas Populações Celulares 3CD, 4CD e 5CD. .....	40
5.1.3. Western Blot .....	42
5.1.4. Imunofluorescência.....	43
5.2. Análise do Comportamento das Populações Celulares em Contato com o Produto Iônico da Dissolução de Vidro Bioativo.....	44
5.2.1 Viabilidade Celular por Azul de Trypan.....	44
5.2.2. Proliferação e Viabilidade Celular por MTT.....	45
5.2.3. Proliferação Celular por BrdU.....	46
<b>6. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS .....</b>	<b>49</b>
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>55</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>57</b>
<b>APÊNDICE</b>	
<b>ANEXO</b>	

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Esquema de regeneração de tecidos utilizando a engenharia de tecidos.....	3
Figura 3.1: Estruturas do órgão dentário .....	11
Figura 3.2: Esquema de possíveis fontes doadoras de células.....	20
Figura 4.1. Esquema do alinhamento de F-Spondin.....	29
Figura 4.2: Programas de RT-PCR.....	31
Figura 5.1. Proliferação celular medida pelo ensaio Azul de Trypan.....	39
Figura 5.2: Morfologia das populações celulares 3CD, 4CD e 5CD.....	40
Figura 5.3: RT-PCR para F-Spondin.....	40
Figura 5.4. RT-PCR para COL I, ALP, BSP e OCN.....	41
Figura 5.5. RT-PCR para F-Spondin em cementoblastos e fibroblastos gengivais.....	42
Figura 5.6. Western Blot.....	43
Figura 5.7. Imunofluorescência .....	44
Figura 5.8. Viabilidade celular através do ensaio de Azul de Trypan .....	45
Figura 5.9: Viabilidade celular através do ensaio de MTT.....	46
Figura 5.10. Proliferação celular através do ensaio de BrdU.....	47

**ÍNDICE DE TABELAS**

Tabela 4.1: Concentração de RNA das populações celulares.....	29
Tabela 4.2: Oligonucleotídeos primers RT-PCR para o gen F-Spondin, COL I, ALP, OCN, ACTIN e BSP. ....	30
Tabela 4.3: Concentração de RNA das populações celulares.....	31



**LISTA DE ABREVIATURAS**

Polivinilidina (PVDF)  
Proteína morfogenética óssea (BMP)  
Matriz Derivada do Esmalte (EMD)  
Sialoproteína óssea (BSP)  
Meio mínimo essencial Dulbecco (DMEM)  
Proteína de ligação do cimento (CAP)  
Proteína derivada do cimento (CP23)  
Células da terceira digestão (3CD)  
Células da quarta digestão (4CD)  
Células da quinta digestão (5CD)  
Vidro bioativo com 60% de sílica (VB60S)  
Colágeno tipo I (COL I)  
Osteopontina (OPN)  
Osteocalcina (OCN)  
Fosfatase alcalina (ALP)  
Fibronectina (FN)  
Vitronectina (VN)  
Matriz extracelular (ECM)  
Microscopia eletrônica de varredura (MEV)  
Hidroxiapatita (HA)  
Hidroxiapatita carbonatada (HCA)  
Soro albumina bovina (BSA)  
Fosfato bifásico de cálcio (BCP)  
Bromodeoxiuridina (BrdU)  
Grama(s) por litro g/L)  
Miligra(s) (mg)  
Mililitro (mL)  
Milimolar (Mm)  
Micrograma(s) por mililitro ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

Micro litro(s) ( $\mu\text{L}$ )

Micrômetro(s) ( $\mu\text{m}$ )

Micromolar ( $\mu\text{M}$ )

Nanômetros (nm)

Nanomolar (nM)

Peso/volume (p/v)

Ultravioleta (UV)

Watt(s) (W)

Gravidade(s) força (g)

Fibroblastos gengivais (FG)

Soro fetal bovino (SFB)

Produto iônico (PI)

Vidro Bioativo (VB)

# Resumo

---

## RESUMO

O cimento é um tecido mineralizado que recobre toda a superfície da raiz do elemento dentário e possui muitas similaridades com o tecido ósseo. O cimento é essencial para regeneração das estruturas que compõem o tecido periodontal, entretanto detalhes sobre a proliferação e diferenciação do seu tipo celular, os cementoblastos, ainda continuam obscuros. O objetivo desse estudo foi primeiro isolar e caracterizar cementoblastos derivados de dentes de ratos para em uma segunda etapa avaliar a resposta destas células ao produto iônico da dissolução de vidro bioativo com 60% de sílica. Nesse estudo foi hipotetizado que um gene embrionário chamado F-Spondin é um possível marcador de cementoblastos e através da análise por RT-PCR qualitativo foi demonstrada a sua expressão nas três populações de células denominadas de células da terceira digestão (3CD), células da quarta digestão (4CD) e células da quinta digestão (5CD) isoladas de raiz de molares de ratos adultos machos. A expressão de F-Spondin foi confirmada por ensaios de Western Blot e imunofluorescência utilizando anticorpos específicos para F-Spondin nas três populações. Foi verificada também a expressão de colágeno tipo I (COL I), sialoproteína óssea (BSP), osteocalcina (OCN) e fosfatase alcalina (ALP) através de RT-PCR qualitativo nas populações 3CD, 4CD e 5CD. Fibroblastos gengivais quando comparados com as três populações não expressaram F-Spondin. Após a caracterização celular, foram avaliados os efeitos do produto iônico de vidro bioativo em contato com as populações celulares. Na análise da viabilidade celular por ensaio de Azul de Trypan e MTT as populações celulares apresentaram um aumento da viabilidade celular em contato com o produto iônico da dissolução de vidro bioativo comparadas com o grupo controle. O aumento da proliferação e viabilidade celular foi confirmada pelo ensaio de BrdU. Esses resultados sugerem que é possível estabelecer uma cultura celular primária a partir de células de raízes dentárias de molares de ratos adultos e que F-Spondin pode ser um possível marcador de cementoblastos. Além disso, o efeito observado do vidro bioativo sobre os cementoblastos demonstra ser uma interessante alternativa para ser usada em projetos futuros de engenharia de tecidos visando à regeneração tecidual do cimento dentário.

Palavras chave: *Cementoblastos, F-Spondin, Vidro Bioativo.*

## ABSTRACT

Cementum is a mineralized tissue that covers the surface of the tooth root and has many similarities with bone tissue. Cementum is essential for periodontal tissue regeneration, however details on the proliferation and differentiation of its cell type, ‘cementoblasts’, are still unclear. The aim of this study was to isolate and characterize cementoblasts derived from rat teeth and to evaluate the response of these cells to the ionic products from the dissolution of bioactive glass with 60% silica. In this study it was hypothesized that an embryonic gene called F-Spondin is a possible marker of cementoblasts. Its expression was demonstrated through analysis by qualitative RT-PCR in three populations called cells of the third digestion (3CD), cells of the fourth digestion (4CD) and cells of the fifth digestion (5CD) isolated from the roots of molars of adult male rats. The expression of F-Spondin was confirmed by Western blot assays and immunofluorescence using antibodies specific for F-Spondin. It was also demonstrated the expression of collagen type I (COL I), bone sialoprotein (BSP), osteocalcin (OCN) and alkaline phosphatase (ALP) by qualitative RT-PCR in populations 3CD, 4CD and 5CD. Gingival fibroblasts when compared with these three populations did not express F-Spondin. After cell characterization, we evaluated the effects of the ionic products of bioactive glass in contact with the cell populations. In the cell viability analysis by Trypan blue and MTT assays cell populations showed an increase in cell viability in contact with the ionic products from bioactive glass dissolution compared with the control group. The increased proliferation and cell viability was confirmed by BrdU assay. These results suggest that it is possible to establish a primary cell culture from molar tooth roots of adult rats and that F-Spondin is a possible marker for cementoblasts. Moreover, the observed effect of bioactive glass on cementoblasts shows that this material is an interesting alternative to be used in future projects for cementum regeneration through tissue engineering.

Keywords: *Cementoblasts, F-Spondin, Bioactive Glass*

# Introdução

---

## 1. INTRODUÇÃO

A doença periodontal acomete grande parte da população mundial. Uma das características da periodontite é a destruição dos tecidos de suporte do dente: cemento radicular; ligamento periodontal propriamente dito e osso alveolar, observada clinicamente por perda de inserção e formação de bolsa periodontal. A evolução da doença periodontal com frequência leva a perda do elemento dentário [1].

A terapia ideal para a doença periodontal seria aquela que regenerasse o tecido perdido devolvendo a saúde e as funções do ligamento periodontal, ou seja, através do emprego da engenharia de tecidos [2]. A engenharia tecidual, termo definido em 1987 durante o congresso de Bioengenharia de Washington, estabeleceu um campo multidisciplinar de estudos que engloba principalmente conhecimentos de engenharia de materiais e ciências biomédicas. Apesar de ser uma ciência que envolve diversas áreas do conhecimento, a engenharia de tecidos tem como sua base estrutural o cultivo celular, as biomoléculas e os biomateriais [3]. Portanto é imperativo o conhecimento dos mecanismos celulares e moleculares dos elementos que compõem o periodonto para que a sua regeneração seja efetiva. Uma das estruturas afetadas pela doença periodontal é o cemento. O cemento devido à sua função de unir as fibras do ligamento periodontal ao dente é essencial para a plena regeneração dos tecidos periodontais.

O cemento é um tecido mineralizado que recobre toda a raiz do elemento dentário e junto com o osso alveolar e o ligamento periodontal compõe o periodonto de sustentação [4]. Diferente do tecido ósseo, o cemento não possui inervação e nem vascularização própria e ao contrário do osso não sofre remodelagem; porém, ele se forma durante toda a vida do elemento dentário. Apesar da sua importância para a regeneração do tecido periodontal, um ponto em relação ao cemento ainda continua obscuro; a possível regeneração do seu tipo celular, o cementoblasto [5]. Quando ocorre uma injúria do tecido periodontal, duas vias de cicatrização podem ocorrer: a regeneração verdadeira, em que tecido e funções são restabelecidas, e o reparo, em que há uma regeneração incompleta, ou seja, o tecido lesionado é substituído por outro tecido. Infelizmente, a via mais comum de cicatrização no tecido periodontal é o reparo.

No caso da cicatrização do cimento em lesões periodontais, geralmente o cimento que se forma é o acelular, ou seja, sem a presença de cementoblastos [6].

Uma alternativa para se obter a regeneração periodontal é tentar mimetizar os eventos que acontecem durante a cementogênese. Portanto é fundamental o entendimento sobre os mecanismos biomoleculares e também dos fatores que regulam a formação de cementoblastos durante o seu desenvolvimento, visando a sua regeneração [7]. Detalhes do fenótipo celular de cementoblastos não estão bem definidos, dificultando a distinção dos mesmos dos outros tipos celulares que formam o tecido periodontal [8]MCCULLOCH *et al* em 1987 demonstraram que células progenitoras de cementoblastos, fibroblastos do ligamento periodontal e osteoblastos existentes nos espaços medulares podem migrar do osso alveolar até o tecido periodontal, através de canais vasculares presentes no ligamento periodontal [9]. Esses estudos sugerem que o ligamento periodontal consiste de diferentes células em estágios variados e que essas células quando necessário, podem se diferenciar em cementoblastos, osteoblastos ou fibroblastos do ligamento periodontal. Portanto, o estudo das propriedades e características de cementoblastos utilizando um modelo celular é muito importante para o entendimento dos mecanismos da regeneração periodontal [10].

O cimento assim como o tecido ósseo possui colágeno do tipo I (COL I) e também proteínas não colágenas como; sialoproteína óssea (BSP); osteopontina (OPN); osteocalcina (OC); vitronectina (VN); fibronectina (FN) entre outras [11]. A matriz extracelular (ECM) tem um papel crítico no controle de muitos eventos fisiológicos e patológicos incluindo a diferenciação celular, porém muitos componentes da ECM responsáveis pela diferenciação precisam de estudos mais detalhados [12]. Possíveis candidatos incluem proteínas de ligação celular e receptores de superfície celular. Entretanto os mecanismos envolvidos e a ordem cronológica requerida para a regulação da expressão da adesão e diferenciação celulares ainda continuam obscuras [13].

Estudos demonstraram alguns possíveis marcadores de cimento como: proteína de adesão do cimento (CAP) [14]; proteína derivada do cimento (CP-23), [15]; e o gene F-Spondin [16]. Porém o mecanismo de ação dessas moléculas na diferenciação de cementoblastos ainda precisa de mais esclarecimentos.



A engenharia de tecidos é uma área de pesquisa de grande importância, que utiliza biomateriais como matrizes para dar suporte a culturas de células de maneira a desenvolver tecidos vivos. Um biomaterial provê as bases para o tecido em crescimento, promovendo o reparo, a proliferação e a regeneração do tecido natural, reconstruindo e substituindo tecidos danificados. Assim, tecidos podem ser reparados a partir de culturas realizadas das próprias células do paciente, eventualmente sem deixar resíduos do material artificial pela utilização de materiais biodegradáveis [17]. Desta maneira, respostas celulares que normalmente só ocorrem naturalmente, podem ser induzidas, acelerando os processos de cura e regeneração. As estratégias da engenharia tecidual, através do cultivo celular humano para aplicação clínica estão sendo desenvolvidas em diferentes especialidades médicas para reposição de cartilagens, ossos, componentes cardiovasculares, pele, entre outras [18]. A Figura 1.1 representa esquematicamente as etapas de regeneração pela engenharia de tecidos.

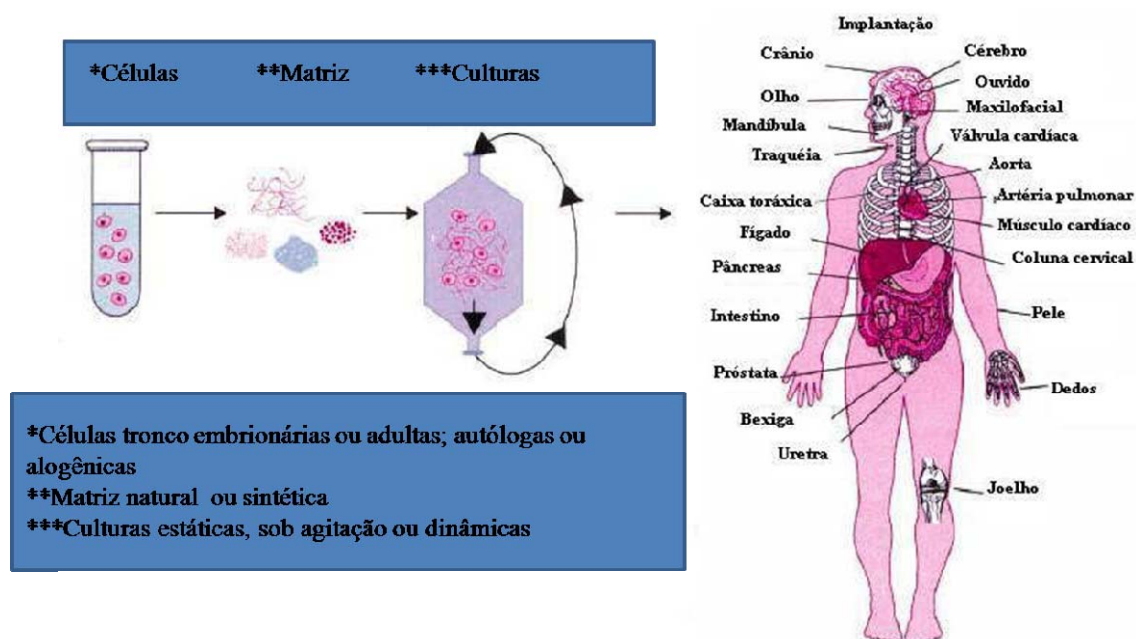


Figura 1.1: Esquema de regeneração de tecidos utilizando a engenharia de tecidos

(Adaptado de LANGER, 2004).

Para criar um tecido substituto vivo, células colhidas do paciente são cultivadas em laboratório. Estas células são então expandidas em uma matriz tridimensional porosa, natural ou sintética, na presença de fatores de crescimento e diferenciação. Se providas com as condições e sinais adequados, as células irão secretar vários componentes de matriz

extracelular para criar um tecido vivo que será implantado no sítio defeituoso no paciente. A matriz tridimensional se degradará e será substituída pelo tecido sadio [19].

A área odontológica vem desenvolvendo inúmeros projetos na engenharia de tecidos principalmente utilizando células-tronco e o desenvolvimento de biomateriais. Isso se justifica já que a perda do elemento dentário pode acarretar problemas como movimento dos dentes remanescentes, dificuldade na fonação, dificuldade na mastigação, desequilíbrio na musculatura, comprometimento da estética, que pode levar a perda da auto estima pelo indivíduo [20]. Nesse contexto, os vidros bioativos desenvolvidos nas últimas décadas têm apresentado interessantes propriedades principalmente quando aplicados como alternativa para reparo de partes de tecidos mineralizados do sistema esquelético [21; 22]. Vidros bioativos são diversamente utilizados, tanto experimentalmente quanto clinicamente em reconstituições de defeitos ósseos e têm demonstrado estimular a osteogênese [23]. Estudos '*In Vitro*' indicam que os vidros bioativos são biocompatíveis e bioativos. '*In Vivo*' sua habilidade em se unir ao tecido ósseo é atribuída à formação de uma camada de hidroxiapatita carbonatada sobre a superfície do vidro em contato com fluidos corpóreos e durante a cristalização dessa camada pode ocorrer a mineralização de fibras colágenas, promovendo dessa forma uma firme união entre a interface osso e biomaterial [24;25].

Uma importante característica dos vidros bioativos é que quando em contato com fluidos corpóreos ou em soluções fisiológicas eles rapidamente liberam sílica, devido a trocas iônicas com  $H^+$  e  $H_3O^+$ , causando alcalinização do meio. A alteração na concentração de  $H^+$  pode influenciar profundamente o metabolismo celular, pois ocorre um aumento do pH do meio, o que no caso dos osteoblastos parece ser favorável, pois recentes pesquisas demonstraram aumento da proliferação celular [26]. É sabido que a produção de colágeno tipo I é aumentada em meios alcalinos. Além disso, outra importante descoberta foi que produtos da dissolução dos vidros bioativos exercem um controle genético sobre o ciclo celular dos osteoblastos e uma rápida expressão de genes que regulam a osteogênese e produção de fatores de crescimento [27]. Estudos recentes demonstraram que produtos iônicos provenientes da dissolução de vidro bioativo com a composição de  $60\%SiO_2 - 36\%CaO - 4\%P_2O_5$  aumentaram a proliferação e a secreção de colágeno em osteoblastos [28].

Considerando a importância do conhecimento de detalhes do fenótipo dos cementoblastos para a regeneração do cimento, nesse trabalho em uma primeira etapa foram realizadas a extração, o isolamento e caracterização de cementoblastos a partir de células do tecido periodontal de dentes de ratos adultos através de ensaios biomoleculares: RT-PCR, Western blot, imunofluorescência e microscopia óptica confocal.

Em uma segunda etapa foi analisado o comportamento da referida cultura celular em contato com o produto iônico da dissolução de vidro bioativo com composição 60% SiO<sub>2</sub>-36%- CaO- 4% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (VB60S) produzidos pela rota sol-gel. Foram utilizados nessa etapa os ensaios de Azul de Trypan, MTT e BrdU para caracterizarmos as células da linhagem cementoblástica em contato com o produto iônico da dissolução do VB60S. Os resultados deste estudo constituem um modelo preliminar a ser utilizado como base para pesquisas futuras visando a regeneração do cimento, nos quais membranas compósitas de polímeros reforçadas com vidro bioativo serão usadas como suporte para a cultura de cementoblastos.

# Objetivos

---

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

- Extração e caracterizações biomoleculares de cementoblastos conseguidos a partir de células mesenquimais de ligamento periodontal de ratos adultos e posterior análise do comportamento dessas células quando em contato com o produto iônico da dissolução de vidro bioativo com 60% de sílica (VB60S)

### **2.2 Objetivos Específicos**

- O isolamento e a caracterização de uma célula pouco pesquisada, o cementoblasto, com a criação de um modelo de estudo de grande importância para a regeneração de tecidos periodontais.
- Estabelecimento de protocolo próprio de cultura de cementoblastos a partir de células mesenquimais de ligamento periodontal de ratos adultos, criando assim um modelo de estudo animal para posterior aplicação em modelo humano.
- Análise do comportamento da cultura estabelecida de cementoblastos quando em contato com o produto iônico da dissolução de partículas de VB60S, criando assim um modelo de estudo para posterior aplicação em engenharia de tecidos.

# Revisão

# Bibliográfica

---

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. O Cimento

O cimento foi descrito primeiramente em 1835 e várias pesquisas ao longo dos anos têm demonstrado que esse tecido é único em características histológicas, mas possuindo muitas propriedades similares a outros tecidos mineralizados, particularmente o tecido ósseo [29]. O cimento é um tecido mineralizado, avascular que cobre toda a superfície radicular unindo o dente ao osso alveolar através das fibras do ligamento periodontal e ao contrário do tecido ósseo não possui inervação e nem potencial de remodelagem [30]. O cimento varia em espessura em diferentes níveis da raiz, apresentando camadas mais espessas no ápice radicular e na área inter-radicular de dentes multiradiculares e mais delgadas na região cervical [31]. O cimento é um dos constituintes do tecido periodontal; um tecido que é formado por estruturas que dão sustentação e proteção ao elemento dentário. O periodonto é classificado de acordo com características morfofuncionais: o periodonto de proteção que compreende o tecido gengival epitelial e conjuntivo; periodonto de sustentação formado pelo tecido ósseo chamado de osso alveolar; ligamento periodontal formado por fibras colágenas em diferentes direções e o cimento [32] (Figura. 3.1).

O cimento possui como principal função fornecer inserção às fibras colágenas do ligamento periodontal e apesar de não possuir a capacidade de remodelagem como o tecido ósseo, ele apresenta-se reacional durante toda a vida do elemento dentário. O cimento mantém a integridade da raiz ajudando na sustentação do elemento dentário em posição funcional na cavidade oral e estando envolvido na regeneração dentária [33]. O cimento radicular é formado lentamente ao longo da vida do elemento dentário permitindo a contínua reinserção das fibras do ligamento periodontal e contínuo crescimento em espessura [34]. Das estruturas periodontais, o cimento é a que mais permanece desconhecido apesar de várias pesquisas terem sido realizadas desde o descobrimento do cimento em 1835 [35]. Seu tipo celular, os cementoblastos microscopicamente apresentam núcleos excêntricos, irregulares com um ou dois nucléolos, mitocôndrias abundantes e complexos de Golgi bem desenvolvidos [36].

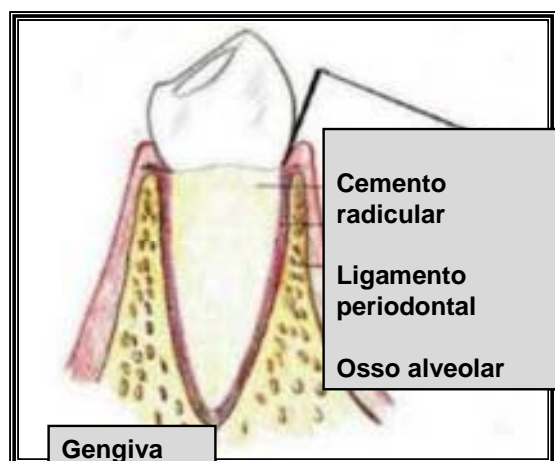


Figura 3.1: Estruturas do órgão dentário  
(adaptado de saudável. Blogs. sapo)

### Componentes do Cimento

O cimento é um tecido mineral que não tem uniformidade isto é, possui diferenças na sua composição química de acordo com os vários tipos de cimento. Entretanto existe uma composição geral de 65% de material inorgânico, 23% de material orgânico e 12% em água. O principal componente inorgânico é a hidroxiapatita, formada por cristais finos com média de 55nm de largura e 8nm de espessura [37].

### Classificação do Cimento

O cimento é dividido de acordo com três fatores:

- - Presença ou ausência de células: cimento celular e cimento acelular.
- - Tipo de fibras: fibras intrínsecas e fibras extrínsecas
- Época da formação: cimento primário e cimento secundário [38]; [39].



### 3.2 Cementogênese

A cementogênese segue a dentinogênese durante o desenvolvimento da raiz dentária. Após a formação da coroa dentária uma bainha epitelial formada dentro e fora do epitélio do esmalte chamada de bainha epitelial de Hertwig induz a formação da raiz dentária e dos tecidos periodontais, mas a origem dos cementoblastos continua controversa [40-42].

De acordo com a teoria clássica, a formação radicular se inicia quando o órgão do esmalte atinge seu tamanho final e células da camada interna e externa do epitélio do esmalte proliferam para a região cervical e iniciam a formação da bainha epitelial de Hertwig (BERH). A proliferação celular continua agora no sentido apical e leva a um crescimento desta dupla camada de células [43]. A camada celular interna e externa da BERH é circundada por uma membrana basal e similarmente a interação ectomesenquimal que ocorre durante a formação da coroa, as células da BERH induzem as células da papila dentária a se diferenciarem em odontoblastos da região radicular [44].

Quando a primeira matriz de dentina radicular é formada pela maturação dos odontoblastos e antes da mineralização da matriz de dentina alcançar as células epiteliais internas, a BERH torna-se descontínua. As células da BERH podem neste momento formar grupos de células circundadas por membrana basal e persistir desta maneira dentro do ligamento periodontal (LP) maduro sendo denominadas de restos epiteliais de Malassez [45]; [46]. Sua existência no LP por toda a vida pode representar mais que um simples vestígio estrutural. Sua função, entretanto, continua a ser desconhecida [47]. As células da BERH produzem uma membrana basal contendo proteínas quimiotáticas que irão direcionar a migração de pré-cementoblastos e irão induzir à diferenciação de cementoblastos [48;49]

Pré-cementoblastos recrutados se alinham sobre a superfície de dentina e começam a secretar colágeno ocorrendo um desenvolvimento subsequente do cimento acelular que aumenta em espessura e estabelece uma continuidade entre as fibras colágenas do LP com aquelas do tecido da superfície da dentina radicular e a mineralização lenta e contínua do colágeno. Os fibroblastos adjacentes ao LP expressam fosfatase alcalina

que parece desempenhar um papel importante na mineralização. A cementogênese ocorre ritmicamente com períodos de atividade se alternando com períodos de quiescência [50]. Da mesma forma que no desenvolvimento do osso, a fase inicial da cementogênese provém da secreção pelos cementoblastos de várias proteínas não colágenas como a sialoproteína do osso, osteocalcina e osteopontina, mas os papéis exatos de tais proteínas carecem de maior esclarecimento, supõe-se que estejam envolvidas em processos como a quimioatração, ligação entre células, a diferenciação celular e a mineralização [51]; [52].

Na segunda fase da cementogênese, quando o dente atinge a oclusão e o cemento celular é formado, a proliferação das células da BERH é reduzida e algumas células são aprisionadas na camada mineral formada. Este cemento é menos mineralizado e formado pelos próprios cementoblastos que acabaram de surgir [53]. Após a perda de continuidade da bainha epitelial radicular, células grandes e basófilas parecem se diferenciar e formar uma camada mais evidente de cementoblastos adjacentes à superfície radicular, estes cementoblastos secretam colágeno e formam as fibras intrínsecas do cemento celular secundário gerando fibras que são orientadas paralelamente à superfície radicular [54].

Da mesma forma que o osso, a secreção da matriz pelos cementoblastos vai resultar em células que se tornarão incorporada à matriz em formação originando assim os cementócitos. A incorporação de cementócitos à semelhança dos osteócitos faz com que seja necessária a formação de novos cementoblastos a partir de células primordiais dentro do LP [55]. Tem sido postulado que existem diferentes tipos de cementoblastos: aqueles que se originaram das células da BERH sob transformação do epitélio mesenquimal, e que formam o cemento acelular; e aqueles que são derivados do folículo dental, que formam o cemento celular [56]; [57]. Além disso, parece que os cementoblastos do cemento acelular demonstram diferenças fenotípicas em relação aos cementoblastos de cemento celular [58].

Estudos demonstraram a presença de células progenitoras de cementoblastos, osteoblastos e fibroblastos periodontais nas regiões perivasculares do ligamento periodontal (LP) e essas células teriam a capacidade de se diferenciarem em qualquer célula do LP quando recrutadas [59]. Esses estudos sugerem que o LP possui células

diferentes em vários estágios de diferenciação. Entretanto ainda não se sabe se existe um precursor comum para células do LP, osteoblastos e cementoblastos ou se a célula precursora é individual. Essa observação é interessante já que as células do folículo dental originam fibroblastos do LP, osteoblastos do osso alveolar e cementoblastos e que todas são originadas a partir da crista neural [60] [61; 62].

### **3.2.1 Fatores Associados com o Desenvolvimento e a Regeneração do Cimento**

É necessário definir a diferença entre os fatores que são requeridos para o desenvolvimento do cimento e os que são requeridos para a regeneração tecidual. A regeneração tecidual é na verdade uma recapitulação do desenvolvimento, porém são eventos diferenciados pela presença de alguns fatores que só são encontrados na regeneração. Por exemplo, na regeneração existe uma resposta inflamatória que irá resultar na liberação de vários fatores que não estão presentes no desenvolvimento do cimento. Porém existem fatores que são comuns aos dois eventos. Agentes ideais para a regeneração tecidual são aqueles que promovem migração e adesão celular adequada em locais de cicatrização permitindo posteriormente a diferenciação celular de fibroblastos periodontais, osteoblastos e cementoblastos [63-65].

O exame histológico do tecido periodontal sadio demonstra vários tipos de células mesenquimais importantes para a manutenção do periodonto. Entre as células incluímos fibroblastos do ligamento periodontal responsáveis em assegurar a funcionalidade do ligamento periodontal; osteoblastos responsáveis pela preservação do osso alveolar e cementoblastos que apesar de sua específica função de unir o ligamento ao dente, pode quando necessário atuar na cicatrização tecidual, porém esse aspecto precisa de mais investigações [66].

No nível de desenvolvimento, células ectomesênquimais do folículo dental e papila dentária têm a capacidade de se diferenciarem em fibroblasto periodontal, osteoblasto ou cementoblasto. Porém quando se trata de regeneração ainda não sabemos claramente como essa função é cumprida principalmente pelos cementoblastos [67-70]. Alguns autores sugerem que pequenas populações celulares indiferenciadas nas regiões

perivasculares do ligamento periodontal maduro têm a capacidade de se diferenciarem em cementoblastos ou osteoblastos que são tecidos mineralizados [13]; [71]; [72].

Por outro lado os fibroblastos do ligamento periodontal atuam inibindo a mineralização e esses dois processos são dependentes de fatores que são disparados de acordo com sinais específicos. É necessária uma melhor definição de quais fatores e sinais controlam essas atividades, para compreendermos melhor a regeneração do ligamento periodontal e do cimento [68].

Vários fatores de crescimento são responsáveis por sinais intracelulares estimuladores de: migração, proliferação, adesão e diferenciação celular durante a regeneração ou reparo do tecido periodontal. Expressão de TGF- $\beta$ 1 (fator de crescimento transformador beta1) foi notada dentro de células do ligamento periodontal e também na matriz extracelular dessas células. TGF- $\beta$ 1 é um membro de uma superfamília de proteínas TGF- $\beta$  produzidas por uma grande variedade de células embrionárias e em tecidos adultos também [73]. Estas proteínas são responsáveis por múltiplas funções, incluindo regulação da proliferação celular, modulação de síntese de matriz extracelular e diferenciação morfogênica durante a embriogênese e também durante o desenvolvimento pós natal. TGF- $\beta$ 1 está implicada no processo da odontogênese e cementogênese e parece ter um papel crítico na indução de proliferação de fibroblastos humanos '*In vitro*' [74].

A osteonectina uma glicoproteína de 40 KDa expressa durante o desenvolvimento e em eventos de cicatrização, parece modular a migração, proliferação e síntese de matriz de metaloproteinases (MMP) em alguns tecidos. Estudos prévios demonstraram que TGF- $\beta$ 1 aumenta o nível de expressão da osteonectina em fibroblastos e osteoblastos. TGF- $\beta$ 1 aumenta também a produção de colágeno tipo I em culturas de fibroblastos da derme, osteoblastos de calvária de ratos neonatos e de células de ligamento periodontal de ratos [75; 76]. Outra pequena leucina rica em proteoglicanos a fibromodulina, uma proteína de 59 KDa que se liga ao colágeno, foi isolada de tecido periodontal de bovinos e humanos. Essa proteína parece ter envolvimento com ligamento periodontal de dentes humanos nos mecanismos que influenciam a fibrillogênese de tecidos conectivos. Sua principal função é manter a estrutura das fibras colágenas. '*In Vivo*' alguns experimentos sugerem que esta proteína está envolvida em adesão, divisão,

diferenciação, migração celular e também parece ser responsável pela regulação da organização de matriz extracelular na cementogênese [77; 78].

A sialoproteína óssea (BSP) tem uma alta especificidade de expressão em tecidos mineralizados sendo responsável pela regulação do processo inicial de mineralização, ligando-se fortemente a matriz de colágeno e hidroxiapatita atuando como uma nucleadora de hidroxiapatita '*In vitro*'. Essas observações junto com as propriedades estruturais da BSP como, por exemplo, vários prolongamentos de ácido poliglutâmico dão suporte ao papel de nucleadora de hidroxiapatita pela sialoproteína óssea [79]. Na fase de maturação de tecido mineralizado ocorre um decréscimo da expressão de BSP [80].

Considerável atenção tem sido dada às células do folículo dentário por causa do seu papel importante no desenvolvimento do tecido periodontal, estudos sugerem que essas células são responsáveis na regulação da diferenciação dos precursores mesenquimais de cementoblastos durante o desenvolvimento periodontal. [81]Slavkin *et al* em 1989 hipotetizaram que moléculas da bainha epitelial de Hertwig estão envolvidas nesse processo.

A Matriz Derivada do Esmalte (EMD) é um extrato de esmalte imaturo de dentes, que tem sido usado em terapias periodontais. A EMD é essencialmente composta pela amelogenina, uma proteína secretada por células de origem epitelial e possivelmente responsável pela interação de células mesenquimais na cementogênese mediando a mineralização sem interferir na proliferação celular. Estudos recentes confirmaram que a amelogenina pode alterar genes associados com cementoblastos, diminuindo a expressão de osteocalcina e aumentando a de osteopontina [82]. Esses dois genes estão associados com a maturação fenotípica de osteoblastos e de cementoblastos, além de serem reguladores do crescimento dos cristais de hidroxiapatita [83]; [84]. EMD regula a atividade da fosfatase alcalina e a mineralização na matriz de células de tecido periodontal e de osteoblastos de humanos e de roedores [85].

As proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) têm sido investigadas por suas funções de expressão genética e diferenciação celular no folículo dentário e em células do ligamento periodontal. '*In vitro*' as BMPs podem regular a expressão de proteínas

osteogénicas, incluindo a osteocalcina, osteopontina, a sialoproteína óssea e a fosfatase alcalina. Resultados de experimentos em animais e dados clínicos indicam que as BMPs têm habilidade para estimular a regeneração óssea do tecido periodontal incluindo o cimento acelular [86]; [87]; [88].

### 3.2.2 Fatores Específicos do Cimento

O cimento tem um papel muito importante na regeneração do ligamento periodontal, portanto é muito importante o estudo de detalhes dos mecanismos de proliferação e diferenciação dos cementoblastos para o entendimento da fisiologia e das patologias que afetam o tecido periodontal. Por isso nos últimos anos tem se pesquisado e procurado um marcador para o cimento [89]; [90]; [91]; [92]. O marcador ideal em uma célula é aquela proteína ou gene que só se expressa nessa determinada célula. Recentes estudos de marcadores de cementoblastos chamaram atenção para duas proteínas e um gene:

- Proteína derivada do cimento, denominada de proteína de adesão do cimento (CAP) foi identificada, purificada e parcialmente caracterizada [93]. A CAP é uma proteína de 56KDa que já foi purificada de cimento humano e bovino. CAP parece ter afinidade específica e saturável por fibronectina, hidroxiapatita, dentina e cimento, porém essa afinidade não ocorre em regiões de dentina e cimento desmineralizados. A existência dessa proteína com propriedades específicas de ligação por vários componentes da matriz extracelular do cimento aumenta a possibilidade dessa proteína ter um papel importante na cementogênese e participar da regeneração periodontal. A CAP parece ter um efeito diferencial na migração e adesão de células derivadas das três estruturas que compõem o tecido periodontal e dentre elas a expressão foi maior no cimento [94; 95].
- Proteína de ligação derivada do cimento, denominada de CP 23 [96; 97]. Essa proteína parece ser encontrada em cementoblastos, em células do ligamento periodontal e também em células posicionadas em regiões perivasculares do

ligamento periodontal. A expressão de CP 23 foi obtida de células derivadas de um Cementoblastoma humano. A imunolocalização da proteína CP 23 em células derivadas de Cementoblastoma demonstraram intensa imunoreação no citoplasma e no núcleo. Em células derivadas de osso alveolar humano e de fibroblastos gengivais humanos não houve imunoreação. A imunolocalização de CP 23 em células de tecido periodontal humano revelaram uma expressão específica na fase cementóide acelular e no cimento celular. CP 23 não tem características de proteína colágena do tipo I já que anticorpos contra colágeno tipo I não apresentaram reação, porém houve marcação contra anticorpos contra colágeno tipo X. Isso abre uma possibilidade de CP23 ter uma função durante o processo de mineralização já que esse tipo de colágeno é responsável pela ossificação endocondral. A alta expressão na camada de cementoblastos e de células de ligamento periodontal sugere que CP 23 pode ter um papel como regulador local do metabolismo do tecido periodontal e do cimento [98; 99].

- F-Spondin, um gene que expressa uma proteína de mesmo nome, demonstrou uma alta expressão em células de linhagem cementoblástica humana '*In vitro*'. [100]KITAGAWA *et al* em 2006 demonstraram que F-Spondin parece ter um importante papel na diferenciação de cementoblastos, através da transfecção de plasmídeo retro viral codificado com Cdna de F-Spondin em células de folículo dentário. F-Spondin é um dos membros de um subgrupo de moléculas da classe de trombospondin do tipo 1 (TSR). F-Spondin tem a função de guiar a interação entre matriz extracelular (ECM) e célula através de domínios de TRS do tipo 1 em vertebrados [101]. A superfamília TSR possui várias funções como regular a organização de matriz extracelular, interações celulares, orientação de proliferação, crescimento celular e possivelmente diferenciação celular. Análises em culturas celulares sugerem que F-Spondin pode ter um papel nos desenvolvimentos neurais e de câncer de ovário. F-Spondin foi originalmente isolado de assoalho de placa neural de ratos, de um grupo de células requeridas para sinalizar o desenvolvimento da corda espinal embrionária [102]. A expressão padrão de genes F-Spondin em vertebrados ocorre no assoalho da placa neural embrionária [103]. Evidências sugerem que F-Spondin pode regenerar a função dos axos em nervos injuriados em adultos [104]; [105]]. Em

células de ovário humano uma super expressão de um homólogo humano de F-Spondin foi observada em carcinomas ovarianos, mas não em células de epitélio normal de ovário relacionando a função de F-Spondin com câncer ovariano [106]. A expressão de F-Spondin parece ocorrer somente em cementoblastos, mas não em osteoblastos e nem em fibroblastos periodontais. Isso sugere que F-Spondin pode ser uma molécula específica para cementoblastos em relação às outras células do tecido periodontal [107].

### **3.3. A Engenharia de Tecidos na Regeneração do Cimento**

A engenharia de tecidos compõe uma área de pesquisa de grande importância que consiste na utilização de biomateriais como matrizes para dar suporte às culturas de células de maneira a desenvolver tecidos vivos [108]. Na engenharia de tecidos são utilizadas três principais estratégias para o tratamento e regeneração de tecidos lesionados utilizando culturas celulares:

- Injeção e implantação de células do próprio indivíduo ou de um doador compatível, na região lesionada.
- Implantação de um tecido vivo que cresceu anteriormente '*In vitro*' em uma matriz de biomaterial e depois é implantada no sítio lesionado.
- Implantação de matriz de biomaterial degradável com células diretamente no sítio lesionado, que estimulam as células do indivíduo a se repararem.

A fonte de células pode ser o próprio indivíduo (autóloga), de um doador (alógena) ou de indivíduos de espécies diferentes (xenogênica) (Figura 3.4).



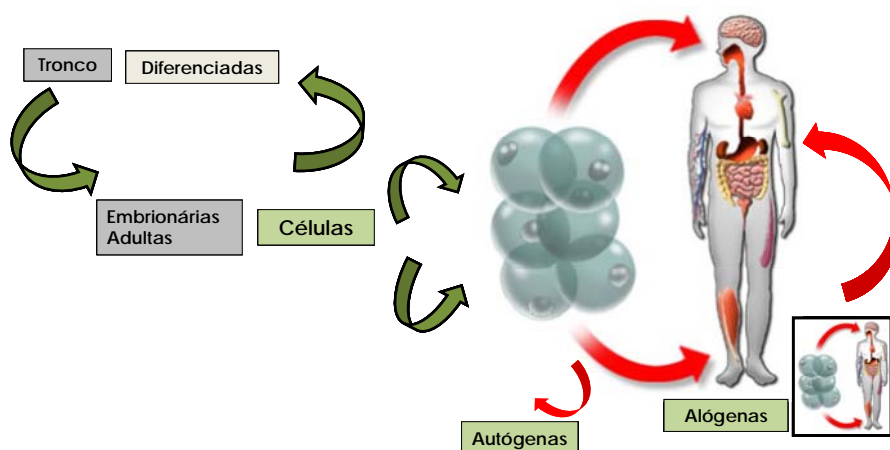


Figura 3.2: Esquema de possíveis fontes doadoras de células.

A medicina regenerativa dentária resulta da integração de várias áreas apropriadas como biologia celular, genética molecular e engenharia química [109]; [110]. Recentes avanços na engenharia de tecidos dentários, ciências dos materiais e cultura de células sugerem que num futuro bem próximo a regeneração total dos dentes deixará de ser uma utopia para se tornar uma realidade [111].

Em 2000 [112; 113] PINI PRATO relatou o caso de um paciente que necessitou de procedimento cirúrgico periodontal para reposição de mucosa ceratinizada previamente à reabilitação protética. Essa deficiência foi tratada por meio de técnicas de engenharia tecidual, que compreenderam o cultivo primário de fibroblastos gengivais, a partir da remoção cirúrgica de uma biópsia gengival de aproximadamente  $2\text{mm}^2$ . Esses fibroblastos foram cultivados em uma membrana de ácido hialurônico que foi transportada para o sítio receptor do paciente. Os autores conseguiram êxito na obtenção de mucosa ceratinizada, confirmada através da análise macroscópica e histológica.

Dentro deste contexto a engenharia de tecidos vem trazendo também, novas perspectivas de regeneração das estruturas de sustentação do ligamento periodontal, dentre elas o cimento. Uma das vertentes de pesquisa dessa área é coletar células do LP, cultivá-las *In vitro*, semear essas células num biofilme e recolocá-las sobre a raiz exposta e através de fatores de crescimento tecidual criar um biocompósito formado por células e um biomaterial [114]. A regeneração de tecidos é baseada no trinômio: cultura de células, fatores biomoleculares e um biomaterial adequado [115].

Vários materiais naturais e sintéticos têm sido pesquisados para o uso adequado em engenharia de tecidos. Entretanto nenhum material pode ser considerado ideal para todos os tipos de tecido, células que crescem em biomateriais frequentemente apresentam diferenças quando comparadas com células crescendo em ambiente natural. Vários princípios devem ser respeitados no projeto e elaboração de construtos para engenharia de tecidos como: biocompatibilidade, degradabilidade do material, adesão celular, propriedades físicas e mecânicas do biomaterial, desenho e forma do biomaterial, enfim todos os parâmetros que possam influenciar a regeneração tecidual [116]; [117]; [118]; [119].

Biomateriais quando em contato com tecidos corpóreos estimulam uma resposta entre material e tecido. Essa interação ocorre através das células via proteínas transmembrânicas. A maioria dessas proteínas é caracterizada por sítios sinalizadores e reguladores. Quando ocorre ativação do sítio ligante acontece uma mudança conformacional dos receptores que apresentam afinidades por várias moléculas e a partir daí se inicia uma cascata de eventos mediados por enzimas levando ao processo chamado transdução [120]. Esse processo é altamente dinâmico e responsável por várias funções celulares como; proliferação, migração e diferenciação celular, entre outros [121].

Existem dois receptores essenciais para os biomateriais; os fatores de crescimento que são importantes para o equilíbrio homeostático dos tecidos e a matriz extracelular (ECM) que é um agregado de proteínas, proteoglicanos e polissacarídeos com várias funções celulares como adesão celular, interação molecular entre outras [122]. Os receptores mais importantes para ECM são as chamadas integrinas que são proteínas compostas por duas subunidades que formam pares com variadas combinações entre as cadeias. O domínio citoplasmático das integrinas parece ser responsável pela transdução.

### 3.4. Biocerâmicas e Vidros Bioativos

Nos últimos 40 anos tem havido um grande avanço no desenvolvimento de materiais médicos feitos com cerâmicas. Este interesse se alicerça nas vantagens deste material incluindo sua resistência á compressão, sua resistência ao desgaste, por ser isolante térmica, entre outras [123].

A partir de 1926 quando Jong e colaboradores observaram através de difração de raios-X semelhanças entre o osso mineral e a hidroxiapatita, uma série de estudos que tiveram seu ápice em 1960 revelaram para o mundo várias características da hidroxiapatita, a partir daí esse material tem sido exaustivamente pesquisado [124]; [125].

Na década de 90, Hench *et al* demonstraram que a adesão, estabilidade e resistência óssea variam de acordo com a composição e microestrutura dos biomateriais, nessa década também surge uma nova classe de biomateriais os '*Bioativos*' que são materiais que reagem biologicamente com a superfície dos tecidos onde são implantados criando uma interface extremamente complexa [126].

Cerâmicas usadas para reparar ou reconstruir tecidos lesados são chamadas de '*Biocerâmicas*' [127]. Cerâmicas e vidros são usados há muitos anos em várias indústrias e em produtos da área biomédica como: lentes de contato, fibra óptica de endoscópios, termômetros e também na odontologia como restaurações chamadas de cerâmicas dentárias [128; 129].

As biocerâmicas são em geral classificadas quanto à resposta dos tecidos ao material: como bioinertes, reabsorvíveis ou bioativas. Os materiais inertes são caracterizados pela formação de uma membrana de tecido fibroso ao redor do implante, como é o caso da alumina e zircônia. As cerâmicas reabsorvíveis são biodegradáveis [21]; [130]. Exemplos de cerâmicas biodegradáveis são alguns vidros e o fosfato tricálcio. Os materiais bioativos apresentam a característica de formar uma ligação com o tecido ósseo e, em alguns casos, com outros tecidos moles. A ligação com o osso está associada com a formação de uma camada de hidroxiapatita carbonatada (HAC) na superfície do material bioativo. A fase de HAC formada é similar em composição e estrutura à fase mineral do osso e é esta equivalência que é responsável pela ligação

interfacial. São materiais bioativos: vidros do sistema  $\text{SiO}_2$  – $\text{CaO}$ , vidrocerâmicos e fosfatos de cálcio, como a hidroxiapatita (HA) [21; 131-134].

Os vidros bioativos por causa das suas interessantes propriedades do ponto de vista biológico têm sido amplamente pesquisados e relacionados com a cultura de células do tecido ósseo, os osteoblastos [135]; [136]. Um aspecto que os torna diferentes de outras biocerâmicas é a possibilidade de se controlar suas propriedades químicas e suas ligações com os tecidos, sendo possível obter vidros com propriedades específicas para uma aplicação particular. Isso também pode ser obtido em algumas vitro cerâmicas, mas sua microestrutura heterogênea restringe sua versatilidade. Os componentes básicos da maioria dos vidros bioativos são  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{Na}_2\text{O}$ ,  $\text{CaO}$  e  $\text{P}_2\text{O}_5$  [21].

Existem dois tipos de vidro bioativo um produzido pela rota tradicional de fusão de precursores do vidro e outro produzido pela rota sol-gel. Vidros bioativos produzidos pela rota sol-gel tendem a ser mais bioativos já que parâmetros do processamento são controlados mais facilmente [137]; [138].

O processo sol-gel (SG) consiste num método físico-químico de síntese de óxidos cerâmicos em que ocorre a evolução de um sol (dispersão líquida de partículas coloidais que são partículas sólidas de diâmetro inferior a 100nm) para um material poroso, onde partículas maiores interconectam-se para formar uma rede sólida semelhante a uma esponja. Esse processo diferencia-se em relação aos demais pela possibilidade de preparação de géis com o mesmo grau de homogeneidade da solução inicial. Outra vantagem que contribui para o crescente interesse do método SG é a facilidade de modelar os géis, permitindo a obtenção de corpos cerâmicos com formato pré-definido [139; 140].

Vidros bioativos possuem boa aplicação como matriz para engenharia de tecidos, em especial para engenharia de tecidos mineralizados. Quando implantados no corpo suscitam uma resposta biológica específica na interface do material, que resulta na formação de uma ligação entre o tecido e o material [141]. Essa união com o tecido ósseo se dá a partir da formação de uma camada de hidroxiapatita carbonatada na superfície do vidro em contato com fluidos corpóreos. A composição e estrutura da camada de HCA são similar ao tecido mineral ósseo o que acarreta uma forte união

entre ambos [142]. Além disso, estudos recentes relatam que o produto iônico da dissolução de vidro bioativo exerce um controle genético sobre o ciclo celular dos osteoblastos e uma rápida expressão de genes que regulam a osteogênese e produção de fatores de crescimento [143-145].

Recentemente Valério e colaboradores investigaram o comportamento de osteoblastos de cultura primária quando em contato com produtos iônicos da dissolução de biovidro com 60% de sílica em comparação com fosfato bifásico de cálcio (BCP). Os resultados indicaram um aumento da viabilidade osteoblástica com o uso de vidro bioativo em comparação com o grupo controle e em relação ao BCP [146].

# Metodologia

---

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. Isolamento e Caracterização de Cementoblastos**

O protocolo de N° 169/08 para esse estudo foi analisado e aprovado pelo COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS.

#### **4.1.1. Isolamento e Cultura de cementoblastos**

Foram realizados experimentos utilizando três grupos de 10 ratos Wistar adultos machos. Os animais foram sacrificados em câmara de CO<sub>2</sub> e todos os seus dentes molares no total de 12 de cada animal foram extraídos. Para evitar contaminação de tecidos gengivais livres essa área foi cuidadosamente curetada utilizando curetas n° 2 e 3 (Duflex, BR), após a curetagem os dentes foram luxados utilizando instrumental hollenback n° 3 e cuidadosamente extraídos utilizando pinça dente de rato. Os dentes extraídos foram lavados uma vez em solução Dulbecco's phosphate-buffered saline sem cálcio e magnésio (PBS) (GibcoBRL, NY, USA). Depois foram imersos em 4mL de solução digestiva contendo: 2 mg/mL de colagenase tipo II (Gibco-Invitrogen Corporation, NY, USA), 0,25% de tripsina (DIFCO Laboratories, MI, USA) em 20 mL de Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco BRL, NY, USA) por 30 minutos em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida foram feitas mais quatro digestões de 20 minutos cada, em estufa nas mesmas condições citadas anteriormente.

As duas primeiras digestões foram descartadas, pois possuíam alto conteúdo de hemácias, as três últimas digestões foram centrifugadas em 1000g (1440 rpm) por cinco minutos cada. Após a centrifugação as células foram ressuspensas em frascos de cultura T25 (Nunc products, Naperville) criando assim três populações celulares que foram chamadas de células da terceira digestão (3CD), células da quarta digestão (4CD) e células da quinta digestão (5CD). As células foram cultivadas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultura celular utilizado foi o DMEM com 10% de soro fetal bovino (Gibco BRL, NY, USA) complementado com 1% de PSA (Penicilina, Estreptolisina e

Antimicótico) (Gibco BRL, NY, USA) e foi trocado a cada três dias de cultura. Quando as caixas de cultura atingiram confluência na faixa de 90%, foram tripsinizadas, repicadas e passadas para caixas de cultura T75 criando assim mais três populações de células da primeira passagem. Os experimentos foram realizados em células da terceira até sexta passagem. As células não utilizadas foram congeladas e armazenadas em freezer de -80°C.

#### **4.1.2. Cultura de Fibroblastos Gengivais de Ratos Adultos para Controle**

Do mesmo grupo de 10 ratos sacrificados, a gengiva livre foi cuidadosamente curetada e utilizada para cultura de fibroblastos gengivais que foram utilizados em alguns ensaios, como controle em comparação aos cementoblastos.

A cultura de fibroblastos gengivais foi feita da seguinte maneira: os pedaços de gengiva livre foram primeiro deceratinizados para eliminação de células epiteliais e depois cortados com bisturi reto em pedaços de no máximo 2 mm/ 2 mm e colocados 03 pedaços em cada poço de placas de 06 poços. Esses pedaços foram cobertos com meio celular contendo DMEM contendo 10% de soro fetal bovino. Após a fixação das células nos fundos dos poços da placa, os pedaços de gengiva livre foram retirados com troca de meio a cada 03 dias até que os fibroblastos gengivais atingiram a confluência de 90%, sendo assim tripsinizados e transferidos para caixas de cultura T<sub>25</sub>. A partir desse ponto quando atingiram confluência de 90% as células foram tripsinizadas e repicadas criando assim várias passagens. Os experimentos foram feitos em células da terceira até sexta passagem.

#### **4.1.3. Caracterização das Populações Celulares**

##### **Morfologia e crescimento celular**

O aspecto morfológico das populações 3CD, 4CD e 5CD foram monitorados durante todo experimento em microscópio óptico (Nikon, Japão).



Para determinar a taxa de crescimento das células das populações 3CD, 4CD e 5CD se utilizou a técnica de exclusão de células não vitais coradas por azul de Trypan (Sigma, Co, USA). As populações de células da terceira passagem, foram plaqueadas inicialmente com  $1 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> por poço em placas de 24 poços e foram normalizadas por 24 horas com meio DMEM sem soro fetal bovino. Após esse tempo as células receberam meio com soro.

O experimento foi realizado em triplicatas e as contagens realizadas após 24, 48 e 72 horas da troca de meio de cultura, permitindo estabelecer o crescimento das populações celulares. As células foram tripsinizadas e contadas. Para a contagem, foi utilizado 1µL da suspensão celular que, por sua vez, foi adicionado a 1µL de azul de Trypan e 8µL de PBS. Esta suspensão celular foi transferida para a câmara de Neubauer com auxílio de pipeta e as células foram contadas, excluindo-se aquelas que se apresentaram coradas de azul (células não viáveis). Para o cálculo do número de células no frasco foi utilizada a seguinte equação matemática:  $NC \times D \times 10^4 / \#Q$ , onde NC= número de células vitais contadas; D= diluição da amostra (10) e #Q= número de quadrados da câmara de Neubauer (=4) usados para contagem das células. Os dados foram analisados utilizando o programa PRISM (One way /ANOVA/ Bonferroni).

#### **4.1.4. RT-PCR para F-Spondin de Cementoblastos**

O RNA total de células das populações 3CD, 4CD e 5CD foram extraídos utilizando o reagente Trizol (Invitrogen) e o método desenvolvido por CHOMCZYNSKI e SACCHI em 1987, quantificado por espectrofotometria a 260nm (Thermo Spectronic) e armazenado a -20°C até seu uso. A concentração do RNA foi estimada pela fórmula:  $[RNA] \mu\text{g}/\mu\text{L} = (A_{260} \times f \times 40 / 1000)$ , onde f é o fator de diluição (=75) e 40 é o fator de conversão (Tabela 4.1).

Tabela 4.1: Concentração de RNA das populações celulares.

População celular	260 nm	[RNA]
3CD	0,186 nm	0,558 µg/µL
4CD	0,173 nm	0,519 µg/µL
5CD	0,189 nm	0,567 µg/µL

O cDNA foi produzido com o kit First-Strand Cdna Syntesis (Fermentas) de acordo com especificações do fabricante. Foram primeiro misturados 2µg de RNA de cada população mais 1µL de oligo (dT) primer e completado o volume para 11 µL de água tratada DEPC. Essa mistura foi incubada por 5 min a 65°C. Após esse tempo foram adicionados os seguintes componentes: 4 µL de tampão da reação [5X], 1µL de RiboLock RNase inibidor [20u/µL], 2µL de dNTP mix [10mM], 2µL de Transcriptase Reversa [20u/µL]; o volume total foi de 20 µL por amostra. As amostras foram incubadas por 60 minutos a 37°C, após esse tempo as amostras ficaram 10 minutos a 70° C para desnaturação enzimática. As amostras foram estocadas a - 20°C. Oligonucleotídeos primers RT-PCR para o gen F-Spondin (alinhamento demonstrado na Figura 4.1), Colágeno tipo I, Fosfatase Alcalina, Osteocalcina, Sialoproteína óssea e Actina foram fabricados para utilização neste protocolo (Prodimol Biotecnologia S/A; MG, Brasil). (Tabela 4.2).

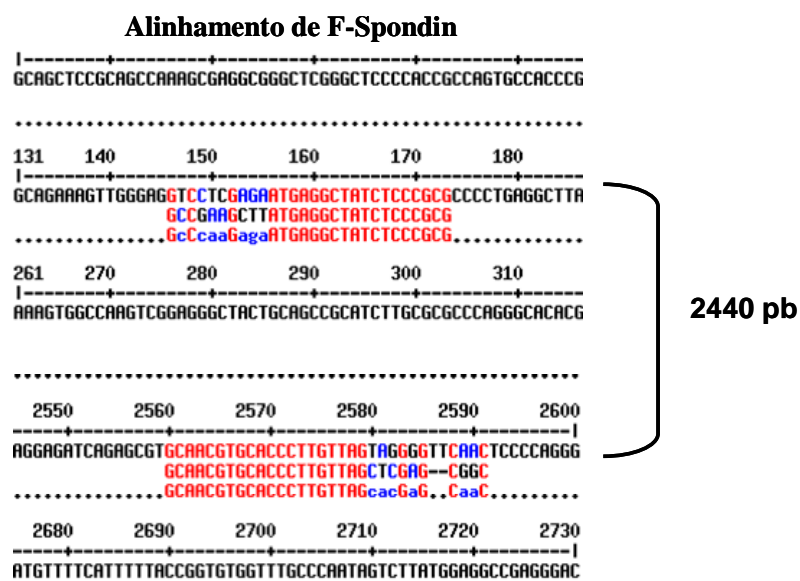


Figura 4.1. Esquema do alinhamento de F-Spondin

Tabela 4.2: Oligonucleotídeos primers RT-PCR para o gen F-Spondin, COL I, ALP, OCN, ACTIN e BSP.

<b>Primer</b>	<b>Sequência</b>	<b>Pares de base</b>
<b>F-Spondin (rat)</b>	F 5'- gccgaagcttatgaggctatctcccgcg-3' R 5'- gccgctcgagctaacaagggtgcacgttg-3'	2440
<b>Actina</b>	F 5'- cccctcaacccaaaggtcaacag- 3' R 5 '- ggaatctctctgcccgaattgtg- 3'	280
<b>COL I</b>	F 5'-ctgaccttctgcgcctgatgtcc-3' R 5'-gtctggggcaccacgtccaaggg-3'	300
<b>ALP</b>	F 5'-aggcaggattgaccacgg-3' R 5'-tgtagttctgctcatgga-3	440
<b>OCN</b>	F 5'-cagccccctaccagat-3' R 5'-gaaagtatggacggcaca-3'	232
<b>BSP</b>	F 5'-cactcaattgctctctccag-3' R 5'-ctgagagtgtggcgttgtgt-3'	385

A reação de PCR foi realizada com o termociclador PTC-100 (MJ Research, Watermown, MA) utilizando 0.5µL de cDNA, 0.2mM de dNTPs, 2,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2mL de Taq DNA polimerase e 0.4M de cada um dos primers específicos citados na tabela anterior para um volume final de 20µL completados com água DEPC. Foi utilizada a técnica de amplificação da Actina como seqüência de amplificação controle em relação aos genes propostos nesse trabalho. As temperaturas de anelamento foram estabelecidas conforme os programas abaixo: (Figura 4.2)

**F-Spondin**  
**1- 94°C 5 minutos.**  
**2- 94°C 1 minuto.**  
**3- 74°C 1 minuto.**  
**4- 72°C 1 minuto.**  
**5- 30 Ciclos.**  
**6- 72°C 10 minutos.**  
**7- 4°C 2 horas.**  
**8- Fim.**

**COL I**  
**1- 94°C 5 minutos.**  
**2- 94°C 1 minuto.**  
**3- 55°C 1 minuto.**  
**4- 72°C 1 minuto.**  
**5- 30 Ciclos.**  
**6- 72°C 10 minutos.**  
**7- 4°C 2 horas.**  
**8- Fim.**

**BSP**  
**1- 94°C 5 minutos.**  
**2- 94°C 1 minuto.**  
**3- 57°C 1 minuto.**  
**4- 72°C 1 minuto.**  
**5- 30 Ciclos.**  
**6- 72°C 10 minutos.**  
**7- 4°C 2 horas.**  
**8- Fim.**

<p><b><u>ALP</u></b>  <b>1- 94°C 5 minutos.</b>  <b>2- 94°C 1 minuto.</b>  <b>3- 56°C 1 minuto.</b>  <b>4- 72°C 1 minuto.</b>  <b>5- 30 Ciclos.</b>  <b>6- 72°C 10 minutos.</b>  <b>7- 4°C 2 horas.</b>  <b>8- Fim.</b></p>	<p><b><u>OCN</u></b>  <b>1- 94°C 5 minutos.</b>  <b>2- 94°C 1 minuto.</b>  <b>3- 57°C 1 minuto.</b>  <b>4- 72°C 1 minuto.</b>  <b>5- 30 Ciclos.</b>  <b>6- 72°C 10 minutos.</b>  <b>7- 4°C 2 horas.</b>  <b>8- Fim.</b></p>	<p><b><u>ACTINA</u></b>  <b>1- 94°C 5 minutos.</b>  <b>2- 94°C 1 minuto.</b>  <b>3- 60°C 1 minuto.</b>  <b>4- 72°C 1 minuto.</b>  <b>5- 30 Ciclos.</b>  <b>6- 72°C 10 minutos.</b>  <b>7- 4°C 2 horas.</b>  <b>8- Fim.</b></p>
---	---	--

Figura 4.2: Programas de RT-PCR.

Na figura acima se observa os programas que foram utilizados para mensuração das temperaturas de anelamento dos *primers* de F-Spondin, COL I, BSP, ALP, OCN e Actina.

Os produtos da reação de amplificação foram corridos em gel de agarose a 1% contendo 0.4µg/mL de SyBR safe DNA gel stain numa voltagem de 80v, observados sob iluminação ultra violeta (UV) e fotografados para posterior análise.

#### 4.1.5. Extração de RNA de Fibroblastos Gengivais para Controle da Expressão de F-Spondin

A extração de RNA total dos fibroblastos gengivais seguiu o mesmo protocolo citado anteriormente para extração de RNA de células da raiz de dentes de ratos adultos. Os oligonucleotídeos primers para F-Spondin foram os mesmos citados acima. A amplificação do cDNA também seguiu o mesmo protocolo. Antes foi realizado um teste de integridade do RNA total de três populações celulares de fibroblastos gengivais e somente 2 dessas populações foram escolhidas. As amostras foram quantificadas e a concentração do RNA foi estimada pela fórmula:  $[RNA] \mu\text{g}/\mu\text{L} = (A_{260} \cdot f \cdot 40/1000)$ , onde  $f$  é o fator de diluição ( $=75$ ) e 40 é o fator de conversão (Tabela 4.3).

Tabela 4.3: Concentração de RNA das populações celulares.

População celular	260nm	[RNA]
FG	0,161nm	0,483 µg/µL
FG	0,180nm	0,540 µg/µL

Foi utilizada a técnica de amplificação da Actina como seqüência de controle em relação ao gene F-Spondin. Os produtos da reação de amplificação foram corridos em gel de agarose a 1% contendo 0.4 µg/mL de SyBR safe DNA gel stain numa voltagem de 80v, observados sob iluminação ultra violeta (UV) e fotografados para posterior análise.

#### **4.1.6. Ensaio de Western Blot para Verificação da Expressão de F-Spondin**

Proteínas extraídas das populações celulares 3CD, 4CD e 5CD foram quantificadas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) e foram utilizadas 30µg em tampão de amostra (4X tris HCl/SDS pH=6.8, 3% Glicerol, 1% SDS, 0.6% β-mercaptoetanol, azul de Bromofenol, todos esses reagentes foram obtidos da Amersham (Buckinghamshire, UK) para separação em gel de SDS-PAGE (sódio dodecil lauril sulfato-poliacrilamida) na concentração de 10%. Em seguida as proteínas foram transferidas para uma membrana de polivinilidina (PVDF) obtida da Bio-Rad (Philadelphia, PA).

A qualidade da transferência foi monitorada através da coloração da membrana com solução de Ponceau obtida da Amersham Biosciences (Buckinghamshire, UK). Em seguida a membrana foi lavada em água destilada e colocada por 1 hora em solução de bloqueio (Tampão salino de Tris-Tween 20 com 5% de leite em pó desnatado). Após o bloqueio, as membranas foram incubadas, por 12 horas em uma temperatura de 4°C, com o anticorpo primário específico para F-Spondin anti-SPON1 (1:2000) polyclonal antibody (ProSci, Flint Place Poway, CA) e anti-β-actina (1:5000), obtido da Sigma (St. Louis, MO), dissolvido em PBS contendo 5% de leite em pó desnatado. Em seguida, as membranas foram lavadas com tampão salina de Tris-Tween 20, obtido da Sigma (St. Louis, MO), contendo 0.2% de Tween 20 (TBST, 15 minutos por quatro vezes) e incubadas com o anticorpo secundário conjugado peroxidase-coupled goat anti-IgY Fc anticorpo (ProSci) e anticorpo secundário conjugado a peroxidase (HRP) (Goat anti-mouse IgG-HRP (Sigma ; St. Louis, MO). As membranas foram novamente lavadas em TBST (15 minutos por quatro vezes). As bandas protéicas foram detectadas por reação de quimioluminescência (ECL plus) obtido da Amersham Biotechnology

(Buckinghamshire, UK) e a intensidade das mesmas foi avaliada por análise densitométrica através do software ImageJ.

#### **4.1.7. Imunofluorescência para Análise da expressão de F-Spondin**

Nesse experimento somente células da população 4CD foram analisadas. Para a realização dos experimentos de imunofluorescência foram plaqueadas  $1 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> sob lamínulas em caixa de cultura de 06 poços. Quando essas lamínulas estavam com confluência de 60%, as células sobre as lamínulas foram rapidamente lavadas com PBS [1X] e posteriormente fixadas em solução de paraformaldeído 4% diluído em PBS, durante 15 minutos, permeabilizadas com solução de triton X, [0,5%] diluído em PBS. As células foram incubadas com solução de bloqueio (PBS contendo 1% de BSA, 0,5% triton X-100, 5% de soro de cabra) por 1 hora. Após o bloqueio, as células foram incubadas por 2 horas em PBS 1% BSA contendo o anticorpo primário específico para F-Spondin anti-SPON1 [1:200] polyclonal antibody (ProSci, Flint Place Poway, CA) por 12 horas á 4°C. Posteriormente as células foram lavadas três vezes (5 minutos cada) em PBS e incubadas por 1 hora em PBS 1% BSA contendo anticorpo secundário conjugado Alexa 488 (hospedeiro Galinha) [1:500], Cell Signaling (Boston, MA).

Controles negativos foram incubados apenas com anticorpo secundário. As células foram lavadas novamente com PBS e as lamínulas foram montadas com Hydromount. As imagens foram obtidas em microscópio confocal Zeiss LSM 510 meta usando a objetiva de imersão á óleo com aumento de 63X (1,4 AN). Foi usado o laser argon 488 para excitar, e a emissão foi coletada entre 505 e 530nm para detectar Alexa 488.

#### **4.2. Análise do Comportamento das Populações Celulares em Contato com o Produto Iônico da Dissolução de Vidro Bioativo**

Após a caracterização celular as populações 3CD, 4CD e 5CD foram analisadas quando em contato com o produto iônico da dissolução de VB60S.

#### 4.2.1. Síntese de Vidro Bioativo Microparticulado

Procedimento da síntese de vidro bioativo com 60% de sílica:

##### Composição molar do VB60S

<b>P2O5</b>	<b>CaO</b>	<b>SiO2</b>
4%	36%	60%

##### Composição da mistura

<b>Reagente</b>	<b>Quantidade</b>	<b>½ receita</b>
TEOS	133,8 ml	66,9 ml
TEP	13,6 ml	6,8 ml
Nitrato de cálcio	85,01 g	42,5 g
Água	97,9 ml	49,0 ml
Ac nítrico 2N	16,3 ml	8,1 ml

A síntese do vidro bioativo seguiu o método sol-gel, rota alcóxido. TEP e TEOS foram dispersos em solução de água e ácido nítrico e a mistura foi mantida sob agitação por 1 hora. O nitrato de cálcio  $[Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O]$  foi adicionado aos poucos à mistura, deixando solubilizar por 30 minutos. O sol resultante foi colocado em recipientes de Teflon mantidos em estufa para a gelificação e envelhecimento a 60 °C por 72 horas e subsequente secagem a uma taxa de aquecimento de 10 °C por dia, até a temperatura de 120 °C. O sólido obtido foi triturado e submetido a um tratamento térmico de 700°C por 180 minutos, com taxa de

#### **4.2.2. Preparação do Meio com o Produto Iônico da Dissolução de VB60S**

Foi adicionado em meio de cultura DMEM a 0,5g em 50mL por 5 horas sob agitação a 37°C. Em seguida o meio foi filtrados duas vezes, a primeira vez em filtro com membrana 0.45µm e a segunda filtragem com membrana de 0,22µm. Em seguida o meio contendo vidro bioativo teve seu pH ajustado para 7,34 e suplementado com 10% de soro fetal bovino.

#### **4.2.3. Viabilidade de Populações Celulares Tratadas com VB60S Utilizando Azul de Trypan**

As populações de células da terceira passagem de populações aleatórias (3CD ou 4CD ou 5CD) foram tripsinizadas e plaqueadas com  $1 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> por poço em placas de 24 poços. As populações celulares foram normalizadas com meio sem soro durante 24 horas, após esse período o meio foi aspirado e trocado por meio contendo o produto iônico (PI) da dissolução de VB60S com 10% de soro fetal bovino (SFB). Foram utilizados controles com células e meio DMEM com 10% DE SFB, controles com células e meio DMEM sem SFB e foram utilizados também controles com as células e o produto iônico da dissolução do vidro bioativo sem o SFB. O experimento foi realizado em triplicatas. Após 72 horas as células foram contadas com Azul de Trypan cujo protocolo foi o mesmo usado para o ensaio de crescimento celular.

Os resultados foram analisados estatisticamente através de One way/ ANOVA/ Bonferroni com a ajuda do programa PRISM (GraphPad, San Diego, Ca).

#### **4.2.4. Proliferação Celular por MTT**

As populações de células da terceira passagem de populações aleatórias (3CD ou 4CD ou 5CD) foram tripsinizadas e plaqueadas com  $1 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> por poço em placas de 24 poços. As populações celulares foram normalizadas com meio sem soro durante



24 horas, após esse período o meio foi aspirado e trocado por meio contendo o produto iônico da dissolução de VB60S com 10% de soro fetal bovino (SFB). Foram utilizados controles com células e meio DMEM com 10% DE SFB, controles com células e meio DMEM sem SFB e foram utilizados também controles com as células e o biomaterial sem o SFB.

Após 72 horas todo o meio foi aspirado sendo colocado 210 $\mu$ L de meio de cultura com soro em cada poço. Foram acrescentados 170 $\mu$ L de MTT (5mg/mL) em cada poço e incubadas as placas por 4 horas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período as placas foram observadas em microscópio óptico para visualização dos cristais de formazan. Em seguida foram colocados 210 $\mu$ L de solução de isopropanol / 4% HCL. Após 10 minutos foram retirados 100 $\mu$ L de cada poço e transferidos para placa de 96 poços plana e a quantificação foi feita em espectrofotômetro (ADAP 1.6, Anthos Labtec Instruments) com filtro de 595nm. Os experimentos foram realizados com n=8 e os dados analisados com a ajuda do programa PRISM; One Way/ ANOVA/ Bonferroni (GraphPad, San Diego, CA).

#### **4.2.5. Proliferação Celular por (BrdU)**

As populações de células da terceira à quinta passagem de populações aleatórias (3CD ou 4CD ou 5CD) foram tripsinizadas e plaqueadas com 1 X10<sup>3</sup> células/cm<sup>2</sup> por poço em placas de 96 poços. As populações celulares foram normalizadas com meio sem soro durante 24 horas, após esse período o meio foi aspirado e trocado por meio contendo o produto iônico da dissolução de VB60S com 10% de soro fetal bovino (SFB). Foram utilizados controles com células e meio DMEM com 10% de SFB, controles com células e meio DMEM sem SFB e foram utilizados também controles com as células e o biomaterial sem o SFB. Após 72 horas as células foram marcadas com 10 $\mu$ L de BrdU (Kit III, Roche) por poço e incubadas por 2 horas a 37°C. Após esse tempo as células foram fixadas por trinta minutos e depois incubadas com 100 $\mu$ L de nucleases por poço, por trinta minutos a 37°C . Em seguida foram adicionados 100 $\mu$ L de anti-BrdU por poço, por trinta minutos e após foram adicionados 100 $\mu$ L por poço de substrato de

peroxidase até atingir a cor de fundo verde. Após a incorporação do substrato colorimétrico as amostras foram quantificadas em intervalos de 10 minutos por duas vezes usando o leitor ELISA (ADAP 1.6, Anthos Labtec Instruments) com filtro de 405nm. Os experimentos foram realizados com n=6 e foram analisados estatisticamente com ajuda do programa PRISM; One Way/ ANOVA/ Bonferroni (GraphPad, San Diego, CA).

# Resultados

---

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Isolamento e caracterização de cementoblastos

#### 5.1.1. Morfologia e crescimento celular

A medida pelo ensaio de Azul de Trypan das populações 3CD, 4CD e 5CD após 24 horas, apresentou um crescimento logarítmico e uma taxa de crescimento celular muito semelhante. As populações 3CD, 4CD e 5CD sem soro após as 24 horas apresentaram crescimento celular mínimo e constante (Figura 5.1).

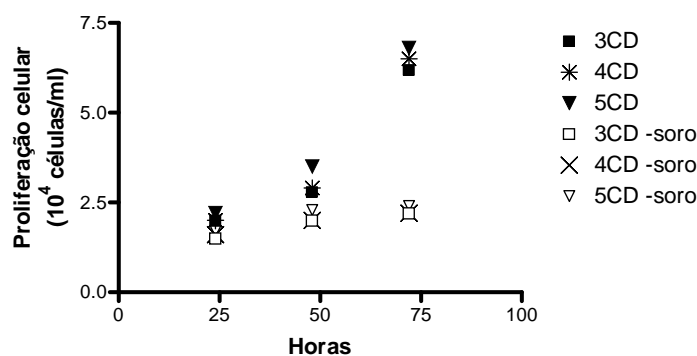


Figura 5.1. Proliferação celular medida pelo ensaio Azul de Trypan

A figura acima apresenta os resultados da proliferação celular medida pelo ensaio de Azul de Trypan para as três populações celulares. Observa-se o crescimento logarítmico das populações 3CD, 4CD e 5CD.

Morfológicamente observadas sob microscopia óptica as células das três populações apresentaram aspecto semelhante; células poligonais alongadas e unidas através de prolongamentos (Figura 5.2). O aspecto morfológico observado nas populações celulares condiz com cementoblastos humanos e de ratos descritos por KITAGAWA *et al* em 2006.

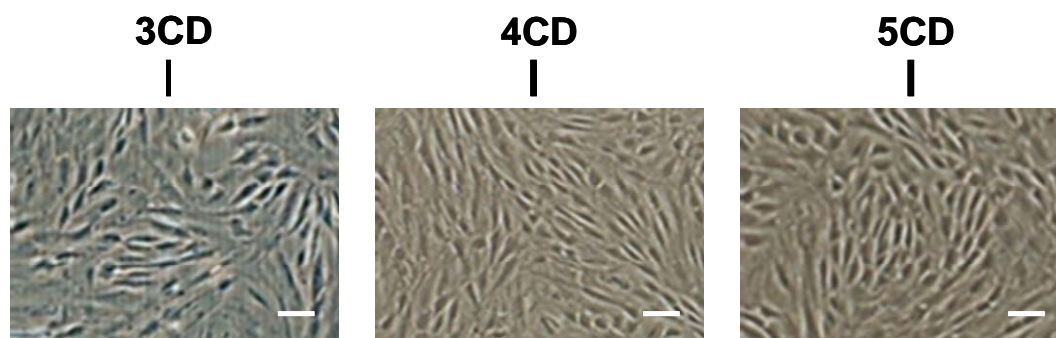


Figura 5.2: Morfologia das populações celulares 3CD, 4CD e 5CD.

Observa-se na figura acima células com morfologia semelhante nas três populações, de aspecto poligonal alongado (20X, Escala de barra= 10 $\mu$ m).

### 5.1.2. RT-PCR Qualitativo para F-Spondin nas Populações Celulares 3CD, 4CD e 5CD.

Kitagawa *et al* em 2006 identificaram o gene F-Spondin como possível responsável na diferenciação de cementoblastos em humanos. No presente estudo trabalhou-se com a hipótese de F-Spondin ser um possível marcador de cementoblastos. Após a extração do RNA das populações celulares foram feitos controles da integridade do RNA total das populações 3CD, 4CD e 5CD (Figura 5.3.a). Através de RT-PCR qualitativo pode se observar a expressão de F-Spondin nas três populações acima citadas. Foi utilizada como banda controle de amplificação a Actina (Figura 5.3.).

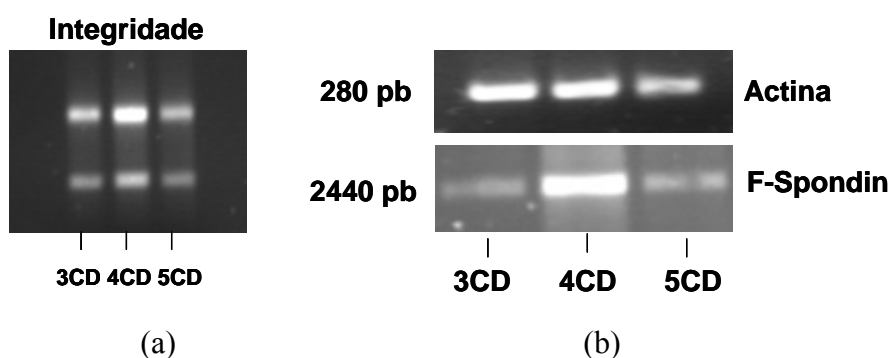


Figura 5.3: RT-PCR para F-Spondin.

Na figura acima se pode observar em (a) a integridade do RNA das populações 3CD, 4CD e 5CD e em (b) a expressão de F-Spondin através de RT-PCR qualitativo nas populações celulares 3CD, 4CD e 5CD. Em (b) também se observa expressão da banda controle de Actina para cada população celular.

Para caracterizar as populações celulares como possíveis células de tecido mineralizado foram analisados genes próprios de cultura celular de tecidos mineralizados. Ocorreram expressões de COL I, OCN, ALP e BSP nas populações 3CD, 4CD e 5CD. A Actina foi utilizada como banda controle (Figura 5.4).

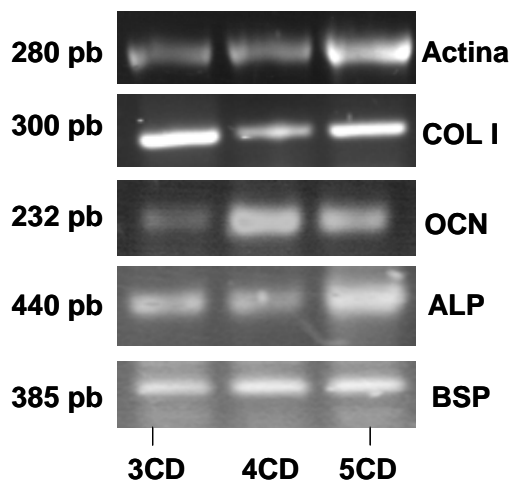


Figura 5.4. RT-PCR para COL I, ALP, BSP e OCN.

Na figura acima se observa expressão de COL I, ALP, BSP, OCN através de RT-PCR qualitativo nas populações celulares 3CD, 4CD e 5CD. A expressão da banda controle de Actina também é observada na figura.

Para verificar se há expressão de F-Spondin em células de outro tecido da cavidade bucal, foram utilizados fibroblastos gengivais extraídos dos mesmos animais utilizados para a extração de dentes molares. Por análise de RT-PCR qualitativo houve ausência de expressão de F-Spondin nas duas populações de fibroblastos gengivais (FG) utilizadas nesse ensaio (Figura 5.5).

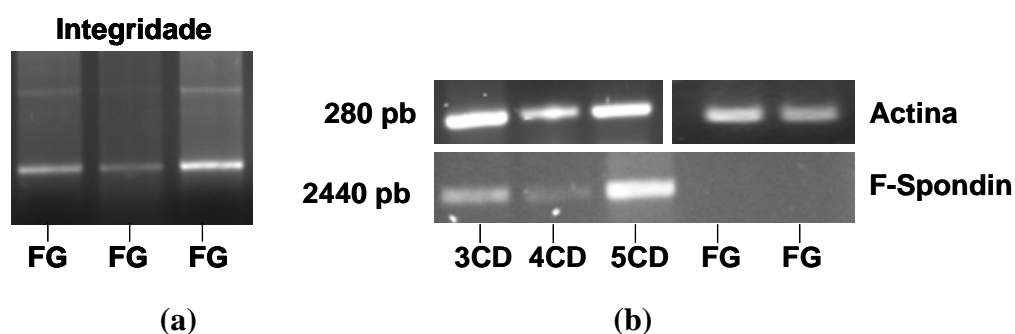


Figura 5.5. RT-PCR para F-Spondin em cementoblastos e fibroblastos gengivais

Na figura acima em (a) se observa integridade do RNA das duas populações de fibroblastos gengivais e em (b) a fotografia do RT-PCR qualitativo demonstra a ausência de expressão de F-Spondin nas populações FG em comparação com as populações 3CD, 4CD e 5CD, observa-se também expressão da banda controle de Actina.

### 5.1.3. Western Blot

Para confirmar a expressão protéica de F-Spondin nas populações 3CD, 4CD e 5CD foram feitos ensaios utilizando anticorpo específico. As três populações celulares apresentaram expressão de F-Spondin. A expressão de Actina foi utilizada como banda controle do ensaio. O valor relativo da densidade óptica em porcentagem, das populações 3CD e 4CD foram aproximadamente de 10% em relação à banda controle. A banda da população 5CD apresentou uma densidade relativa percentual de 7,6% em relação à banda controle de Actina (Figura 5.6.). Os valores de densitometria óptica desse ensaio foram obtidos e analisados com a ajuda do programa (ImageJ, <http://rbs.info.nih.gov/ij/>) e o dados plotados com ajuda do programa PRISM; (GraphPad, San Diego, CA)

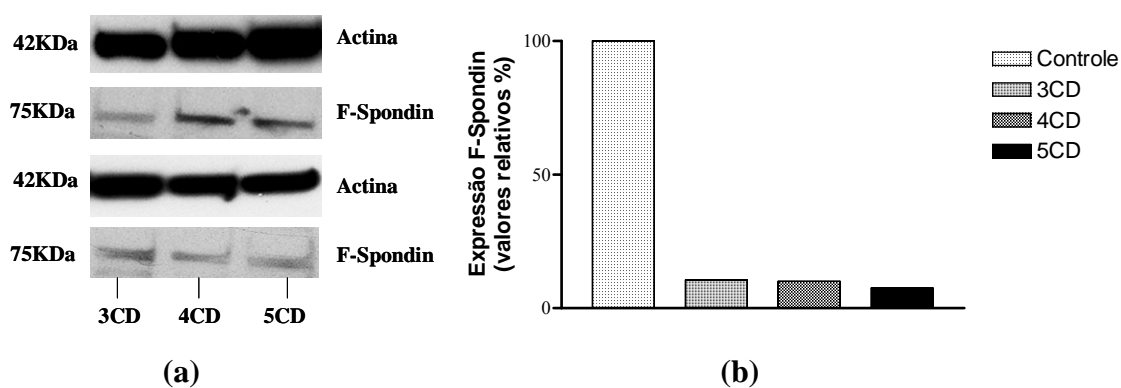


Figura 5.6. Western Blot

Na figura acima em (a) se observa expressão de F-Spondin nas populações 3CD, 4CD e 5CD no ensaio de Western Blot e se observa também expressão de Actina que foi utilizada como banda controle. Em (b) se observa representação gráfica da diferença percentual relativa de expressão de F-Spondin nas populações 3CD, 4CD e 5CD em relação à banda controle de Actina.

#### 5.1.4. Imunofluorescência

Nos ensaios anteriores de RT-PCR e de Western Blot para análise de expressão de F-Spondin nas populações celulares 3CD, 4CD e 5CD foi constatada a presença de F-Spondin nas três populações celulares. Por esse motivo somente uma das populações, nesse caso a 4CD foi utilizada nesse ensaio. A expressão de F-Spondin foi confirmada nessa população celular com a localização preferencial na região nuclear (Figura 5.7).



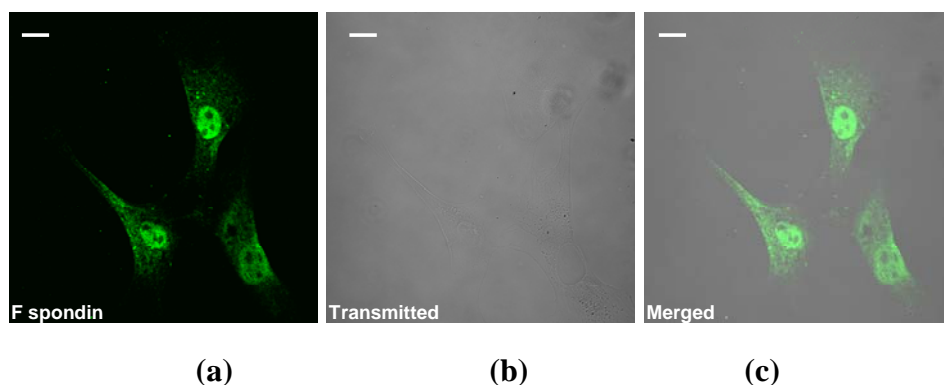


Figura 5.7. Imunofluorescência

Na figura acima em (a) se observa na imagem a localização de F-Spondin preferencialmente na região nuclear da população 4CD. Em (b) se observa a imagem transmitida e em (c) a imagem sobreposta (escala de barra= 10  $\mu\text{m}$ .).

## **5.2. Análise do Comportamento das Populações Celulares em Contato com o Produto Iônico da Dissolução de Vidro Bioativo**

### **5.2.1 Viabilidade Celular por Azul de Trypan**

O teste de exclusão do Azul de Trypan é considerado o primeiro teste a ser feito na escala de ensaios de viabilidade celular. O Azul de Trypan, um corante de cor azulada penetra nas células através das membranas lesadas, corando com uma tonalidade azul brilhante as células mortas, processo não observado nas células vivas e íntegras que permanecem incolores. Após 72 horas o grupo tratado com o VB60S com SFB teve um aumento de cerca de 10% em relação ao controle (Figura 5.8).

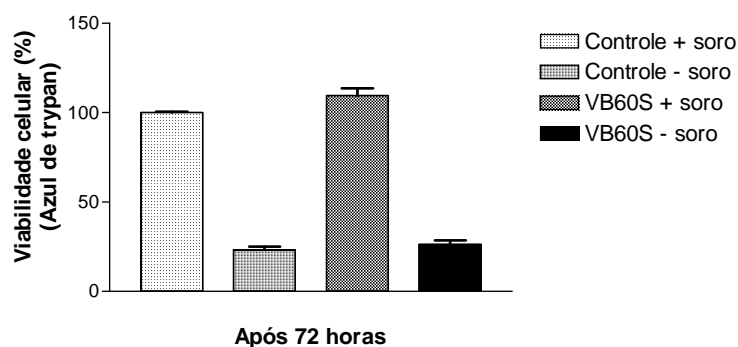


Figura 5.8. Viabilidade celular através do ensaio de Azul de Trypan

Na figura acima se observa a viabilidade celular após 72 horas de tratamento com VB60S em relação ao grupo controle de células não tratadas. Observa-se no gráfico a diferença percentual de aproximadamente 10% do grupo tratado com VB60S em relação ao grupo controle ( $p > 0,05$  análise estatística: One way/ANOVA/Bonferroni/ GraphPad Prism).

### 5.2.2. Proliferação e Viabilidade Celular por MTT

O ensaio de MTT analisa quantitativamente a redução do sal de tetrazolium (MTT) pelo complexo enzimático piruvato desidrogenase presente nas mitocôndrias com a formação de um produto final de cristais de formazan que são mensurados em espectrofotômetro a 595nm. Esse ensaio é usado especificamente para a funcionalidade mitocondrial e proliferação celular. As populações celulares quando tratadas com VB60S apresentaram um aumento de 24% da viabilidade celular em relação ao grupo controle (Figura 5.9).

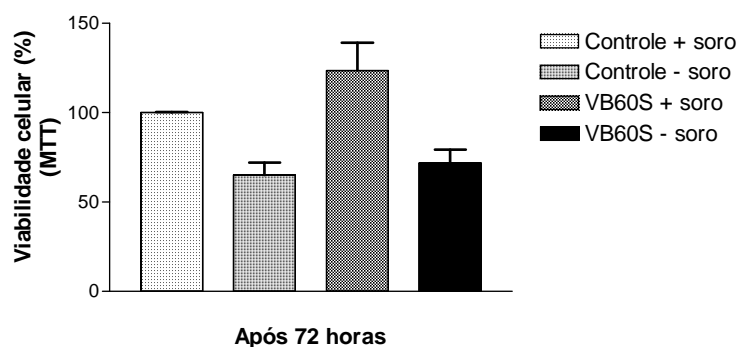


Figura 5.9: Viabilidade celular através do ensaio de MTT.

Na figura acima se observa o gráfico comparativo da viabilidade celular das populações celulares tratadas com VB60S em relação ao grupo controle utilizando a técnica do MTT. Observa-se no gráfico que as populações celulares tratadas com VB60S tiveram um aumento de aproximadamente 24% quando comparadas com o grupo controle no ensaio de MTT ( $p > 0,05$  análise estatística- One way/ANOVA/Bonferroni/ GraphPad Prism)

### 5.2.3. Proliferação Celular por BrdU

A técnica de BrdU se baseia no uso de anticorpos contra bromodeoxiuridina (BrdU) uma base sintética análoga a timidina natural. Com esse método de incorporação de BrdU sintético durante a fase S da mitose pode ser realmente detectada com o uso de anticorpos específicos anti BrdU. Nesse estudo a quantificação de células BrdU positivas foi feita utilizando espectrofotômetro (leitor ELISA). Após 72 horas de tratamento com vidro bioativo as células tratadas com B60S tiveram um aumento um aumento de 13% (Figura 5. 10).

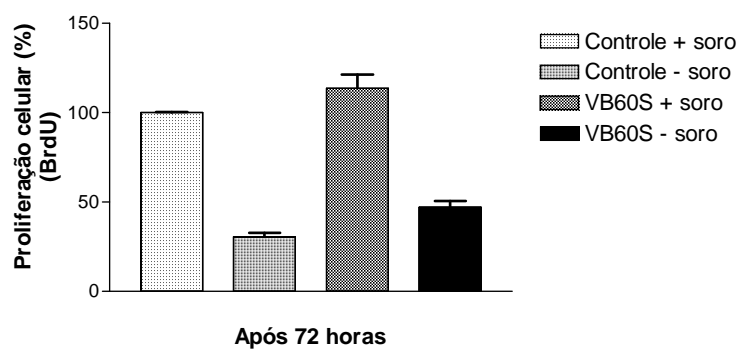


Figura 5.10. Proliferação celular através do ensaio de BrdU.

Na figura acima se observa o gráfico comparativo entre as populações celulares tratadas com VB60S que tiveram um aumento de aproximadamente 13% quando comparadas com o grupo controle no ensaio de BrdU. (Análise estatística  $p > 0,05$ ; One way/ANOVA/Bonferroni/ GraphPad Prism).

# Discussão

---

## 6. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Apesar da sua importância para a regeneração do tecido periodontal, um ponto em relação ao cemento ainda continua obscuro; a possível regeneração do seu tipo celular, ‘cementoblastos’. Detalhes do fenótipo celular de cementoblastos não estão bem definidos, dificultando a distinção dos mesmos dos outros tipos celulares que formam o tecido periodontal. Desta forma é muito importante distinguir cementoblastos de osteoblastos e fibroblastos periodontais visando posteriormente à criação de um modelo de estudo para a regeneração de tecidos utilizando biomateriais.

Para realizar essa distinção é essencial o estabelecimento de uma cultura celular primária de cementoblastos com posterior caracterização biomolecular para tornar viável o uso de um possível marcador específico para cementoblastos. [147]Kitagawa *et al* em 2006 pesquisaram um gene de origem embrionária chamado F-Spondin e através da inoculação de plasmídeo retroviral contendo cDNA desse gene em células indiferenciadas de folículo dentário conseguiram a diferenciação dessas células com fenótipo de cementoblastos. Além disso, em sua pesquisa eles demonstraram que células de linhagem osteoblástica não expressavam esse gene. Esse trabalho foi baseado na hipótese de F-Spondin ser um possível marcador de cementoblastos.

Primeiro foi necessário o estabelecimento de um protocolo próprio de cultura celular que foi criado a partir da modificação do protocolo de [148]Kaneda *et al*, 2003. Nesse trabalho foram criadas três populações celulares a partir da extração de dentes molares de ratos adultos machos. Essas populações foram resultantes das três últimas de um total de cinco digestões celulares utilizando colagenase e tripsina. As duas primeiras digestões foram descartadas diminuindo o risco de contaminação com hemácias, osteoblastos ou fibroblastos periodontais, criando assim a possibilidade de um maior número de cementoblastos nessas populações.

Após o isolamento das culturas a próxima etapa foi verificar através de ensaios biomoleculares se essas populações celulares realmente expressavam F-Spondin. As populações 3CD, 4CD e 5CD quando analisadas por RT-PCR qualitativo apresentaram

expressão de F-Spondin (figura 5.3). Essa expressão foi confirmada por ensaio de Western Blot nas três populações (figura 5.6.a). A análise relativa quantitativa das três populações apresentou valores próximos de 10% quando comparadas com a banda controle de Actina (figura 5.6.b), o que pode significar que as três populações são formadas por células semelhantes. Além disso, elas apresentaram características morfológicas parecidas entre si e com dados apresentados na literatura ([149]KITAGAWA, *et al*, 2006) quando acompanhadas por microscopia óptica (figura 5.2) e também em relação à curva de crescimento celular que foi semelhante para as três populações (figura 5.1).

O próximo passo foi analisar a localização de F-Spondin nas células, isto foi feito por ensaio de imunofluorescência utilizando anticorpo específico para F-Spondin (figura 5.7). A localização de F-Spondin foi demonstrada na região nuclear. Isso poderia explicar porque [150]Kitagawa *et al* em seu trabalho com plasmídeo retroviral conseguiu criar o fenótipo de cementoblastos em células indiferenciadas do folículo dentário. A expressão na região nuclear pode estar ligada à capacidade de F-Spondin em sinalizar para células progenitoras de cementoblastos (pré-cementoblastos) se diferenciarem em cementoblastos. Os resultados em relação à expressão de F-Spondin reforçam a importância desse gene na diferenciação de cementoblastos.

A próxima etapa foi verificar se essas populações celulares expressavam genes comuns de tecidos mineralizados. A análise foi feita utilizando RT-PCR qualitativo para genes de tecidos mineralizados como fosfatase alcalina, osteocalcina, sialoproteína óssea e colágeno tipo I. As três populações celulares expressaram os quatro genes (figura 5.4). Proteínas não colágenas ósseas têm múltiplas funções relacionadas com a formação, equilíbrio e reparo de tecidos mineralizados. Estudos têm demonstrado que essas proteínas estão presentes no tecido periodontal e dentário. Evidências indicam que a osteocalcina é expressa quase exclusivamente em tecidos mineralizados, isto é, no cimento, nos ossos e dentes com a função de regular o crescimento dos cristais de hidroxiapatita.

A sialoproteína óssea tem um significativo papel no início da mineralização por causa da sua habilidade em nuclear a hidroxiapatita e promover a deposição de cristais ‘*In Vitro*’. ‘*In Vivo*’ BSP é expressa em células da raiz dentária e não expressa em fibroblastos periodontais, por isso se acredita que ela tenha um papel como iniciadora da cementogênese. A atividade da fosfatase alcalina é requerida para gerar fosfato inorgânico a partir da hidrólise de pirofosfato inorgânico extracelular que é necessário para a cristalização da hidroxiapatita ([151]CHUN *et al*, 2005). Portanto a expressão desses genes nessas populações celulares pode significar o envolvimento deles na formação de tecidos mineralizados, nesse caso o cimento.

O próximo passo foi verificar se F-Spondin expressa em outro tipo celular da cavidade oral. [152]KITAGWA *et al* em 2006, já haviam comparado em seus estudos células da linhagem osteoblástica e não haviam encontrado expressão de F-Spondin nos mesmos. Nesse estudo, foram extraídos e cultivados fibroblastos gengivais a partir dos mesmos animais utilizados para a extração dos dentes. Utilizando RT-PCR qualitativo em comparação com as populações 3CD, 4CD e 5CD os fibroblastos gengivais não expressaram F-Spondin (figura 5.5).

Se a hipótese de F-Spondin ser o marcador específico de cementoblastos for viável, possivelmente nas populações 3CD, 4CD e 5CD haverá a presença de cementoblastos. Futuramente será necessário o estabelecimento de cultura de osteoblastos alveolares para análise comparativa da expressão de F-Spondin com as populações celulares 3CD, 4CD e 5CD para uma confirmação da especificidade de F-Spondin em cementoblastos.

A próxima etapa da pesquisa foi baseada em estudos já realizados com osteoblastos e vidro bioativo com 60% de sílica. Recentemente Valério e colaboradores investigaram o comportamento de osteoblastos de cultura primária quando em contato com produtos iônicos da dissolução de biovidro com 60% de sílica em comparação com fosfato bifásico de cálcio (BCP). Os resultados indicaram um aumento da viabilidade osteoblástica com o uso de vidro bioativo em comparação com o grupo controle e em relação ao BCP [153]VALÉRIO *et al*, 2004).



Nesta etapa foi analisado o comportamento dos cementoblastos quando tratados com o produto iônico de vidro bioativo com 60% de sílica. Para determinar a taxa de crescimento e a viabilidade das células a primeira técnica utilizada foi a de exclusão de células não vitais coradas por azul de Trypan. Nesse ensaio de viabilidade as populações celulares tratadas com o produto iônico da dissolução de VB60S apresentaram 10% a mais de viabilidade quando comparadas com o grupo controle (figura 5.8).

A segunda técnica utilizada foi a de redução do sal de tetrazolium (MTT) pela desidrogenase mitocondrial presente nas células com a formação de um produto final de cristais de formazan que são mensurados quantitativamente em espectrofotômetro a 595nm. Houve um aumento da viabilidade nas células tratadas com VB60S de 24% em relação ao grupo controle (figura 5.9). Esse ensaio é específico para análise quantitativa de uma única organela celular, a mitocôndria. As células geralmente apresentam número variável de mitocôndrias, sendo proporcional à atividade metabólica de cada célula, podendo variar de quinhentas até dez mil por célula. Portanto, o resultado acima pode significar um aumento da atividade enzimática por um número menor de células do que realmente o gráfico demonstra. A realização de um outro tipo de ensaio foi necessária para evidenciar a replicação do DNA celular.

Foi também utilizado o ensaio de BrdU. Essa técnica se baseia no uso de anticorpos contra bromodeoxiuridina (BrdU) uma base sintética análoga a timidina natural. Esse método de incorporação de BrdU sintético durante a fase S da mitose pode realmente detectar a replicação do DNA e conseqüentemente a proliferação celular, com o uso de anticorpos específicos anti BrdU e subseqüente quantificação de células BrdU positivas utilizando leitor ELISA. O resultado apresentado pelas células tratadas com VB60S foi de 13% a mais na proliferação celular quando comparado com o grupo controle. (figura 5.10). Esse resultado pode significar uma proliferação real dos cementoblastos, por detectar a replicação do DNA na fase de síntese da mitose celular.

Esses resultados confirmam que provavelmente cementoblastos tenham uma resposta parecida à de osteoblastos. Cementoblastos assim como os osteoblastos expressam genes como osteocalcina e sialoproteína óssea que regulam a nucleação e o crescimento

de hidroxiapatita. Foi relatado recentemente por [154]Xynos *et al* que o vidro bioativo parece exercer um controle sobre os genes que regulam tecidos mineralizados, além disso, exercem um controle sobre o ciclo celular e a produção de fatores de crescimento. Entretanto, estudos mais detalhados sobre proliferação celular e controle sobre o ciclo celular na fase de síntese relacionada com o uso de vidro bioativo e cementoblastos precisam ser feitos.

# Conclusões

---

## 7. CONCLUSÕES

Foi estabelecida uma cultura primária estável de células a partir de raízes de dentes molares de ratos adultos com a criação de três populações celulares chamadas de: células da terceira digestão (3CD), células da quarta digestão (4CD) e células da quinta digestão (5CD).

As populações celulares foram caracterizadas utilizando ensaios biomoleculares de: RT-PCR qualitativo para expressão de F-Spondin, Western blot quantitativo para confirmação de expressão de F-Spondin, imunofluorescência com anticorpo específico anti-F-Spondin, RT-PCR qualitativo para expressão de osteocalcina, fosfatase alcalina, sialoproteína óssea, colágeno tipo I. A partir dessa caracterização e trabalhando com a hipótese de F-Spondin ser o marcador específico de cementoblastos se pode sugerir que as populações 3CD, 4CD e 5CD são formadas principalmente por cementoblastos.

Foi possível criar um modelo celular que pode ser utilizado em ensaios de biocompatibilidade em engenharia de tecidos visando à regeneração de tecidos periodontais como o cimento.

Pode-se concluir que o comportamento das populações celulares compostas de cementoblastos foi muito parecido com o de osteoblastos quando tratados com o produto iônico da dissolução de vidro bioativo com 60% de sílica demonstrando um aumento da viabilidade e da proliferação celulares.

**Referências**

**Bibliográficas**

---

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Seo BM, Miura M, Gronthos S et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 2004; **364**: 149-155.
2. Chun YH, Foster BL, Lukasavage PA et al. Bisphosphonate modulates cementoblast behavior in vitro. *J Periodontol* 2005; **76**: 1890-1900.
3. Langer R, Tirrell DA. Designing materials for biology and medicine. *Nature* 2004; **428**: 487-492.
4. Yamamoto T, Domon T, Takahashi S et al. Determination of two different types of cellular cementogenesis in rat molars: a histological and immunohistochemical study. *Matrix Biol* 2005; **24**: 295-305.
5. Bosshardt DD. Are cementoblasts a subpopulation of osteoblasts or a unique phenotype? *J Dent Res* 2005; **84**: 390-406.
6. Saygin NE, Tokiyasu Y, Giannobile WV, Somerman MJ. Growth factors regulate expression of mineral associated genes in cementoblasts. *J Periodontol* 2000; **71**: 1591-1600.
7. Zhao M, Xiao G, Berry JE, Franceschi RT, Reddi A, Somerman MJ. Bone morphogenetic protein 2 induces dental follicle cells to differentiate toward a cementoblast/osteoblast phenotype. *J Bone Miner Res* 2002; **17**: 1441-1451.

8. McCulloch CA, Nemeth E, Lowenberg B, Melcher AH. Paravascular cells in endosteal spaces of alveolar bone contribute to periodontal ligament cell populations. *Anat Rec* 1987; **219**: 233-242.
9. McCulloch CA, Nemeth E, Lowenberg B, Melcher AH. Paravascular cells in endosteal spaces of alveolar bone contribute to periodontal ligament cell populations. *Anat Rec* 1987; **219**: 233-242.
10. Gronthos S, Mrozik K, Shi S, Bartold PM. Ovine periodontal ligament stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Calcif Tissue Int* 2006; **79**: 310-317.
11. Kaneda T, Miyauchi M, Takekoshi T et al. Characteristics of periodontal ligament subpopulations obtained by sequential enzymatic digestion of rat molar periodontal ligament. *Bone* 2006; **38**: 420-426.
12. Handa K, Saito M, Yamauchi M et al. Cementum matrix formation in vivo by cultured dental follicle cells. *Bone* 2002; **31**: 606-611.
13. Berry JE, Zhao M, Jin Q, Foster BL, Viswanathan H, Somerman MJ. Exploring the origins of cementoblasts and their trigger factors. *Connect Tissue Res* 2003; **44 Suppl 1**: 97-102.
14. Arzate H, Jimenez-Garcia LF, Alvarez-Perez MA, Landa A, Bar-Kana I, Pitaru S. Immunolocalization of a human cementoblastoma-conditioned medium-derived protein. *J Dent Res* 2002; **81**: 541-546.

15. Alvarez-Perez MA, Narayanan S, Zeichner-David M, Rodriguez CB, Arzate H. Molecular cloning, expression and immunolocalization of a novel human cementum-derived protein (CP-23). *Bone* 2006; **38**: 409-419.
16. Kitagawa M, Kudo Y, Iizuka S et al. Effect of F-spondin on cementoblastic differentiation of human periodontal ligament cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; **349**: 1050-1056.
17. Langer R, Tirrell DA. Designing materials for biology and medicine. *Nature* 2004; **428**: 487-492.
18. Lenza RF, Vasconcelos WL, Jones JR, Hench LL. Surface-modified 3D scaffolds for tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med* 2002; **13**: 837-842.
19. Langer R, Tirrell DA. Designing materials for biology and medicine. *Nature* 2004; **428**: 487-492.
20. Saygin NE, Tokiyasu Y, Giannobile WV, Somerman MJ. Growth factors regulate expression of mineral associated genes in cementoblasts. *J Periodontol* 2000; **71**: 1591-1600.
21. Hench LL. Bioactive ceramics. *Ann N Y Acad Sci* 1988; **523**: 54-71.
22. Hench LL. The story of Bioglass. *J Mater Sci Mater Med* 2006; **17**: 967-978.
23. Xynos ID, Edgar AJ, Buttery LD, Hench LL, Polak JM. Gene-expression profiling of human osteoblasts following treatment with the ionic products of Bioglass 45S5 dissolution. *J Biomed Mater Res* 2001; **55**: 151-157.



24. Hench LL. Bioactive materials: the potential for tissue regeneration. *J Biomed Mater Res* 1998; **41**: 511-518.
25. Hench LL, Polak JM. Third-generation biomedical materials. *Science* 2002; **295**: 1014-1017.
26. Hench LL. Bioactive materials: the potential for tissue regeneration. *J Biomed Mater Res* 1998; **41**: 511-518.
27. Reffitt DM, Ogston N, Jugdaohsingh R et al. Orthosilicic acid stimulates collagen type 1 synthesis and osteoblastic differentiation in human osteoblast-like cells in vitro. *Bone* 2003; **32**: 127-135.
28. Valerio P, Pereira MM, Goes AM, Leite MF. The effect of ionic products from bioactive glass dissolution on osteoblast proliferation and collagen production. *Biomaterials* 2004; **25**: 2941-2948.
29. Saygin NE, Tokiyasu Y, Giannobile WV, Somerman MJ. Growth factors regulate expression of mineral associated genes in cementoblasts. *J Periodontol* 2000; **71**: 1591-1600.
30. D'Errico JA, Ouyang H, Berry JE et al. Immortalized cementoblasts and periodontal ligament cells in culture. *Bone* 1999; **25**: 39-47.
31. Berkovitz BK. Periodontal ligament: structural and clinical correlates. *Dent Update* 2004; **31**: 46-50, 52, 54.

32. Yamamoto T, Domon T, Takahashi S et al. Determination of two different types of cellular cementogenesis in rat molars: a histological and immunohistochemical study. *Matrix Biol* 2005; **24**: 295-305.
33. Yamamoto T, Domon T, Takahashi S et al. Determination of two different types of cellular cementogenesis in rat molars: a histological and immunohistochemical study. *Matrix Biol* 2005; **24**: 295-305.
34. Berkovitz BK. Periodontal ligament: structural and clinical correlates. *Dent Update* 2004; **31**: 46-50, 52, 54.
35. Saygin NE, Tokiyasu Y, Giannobile WV, Somerman MJ. Growth factors regulate expression of mineral associated genes in cementoblasts. *J Periodontol* 2000; **71**: 1591-1600.
36. Alvarez-Perez MA, Alvarez-Fregoso O, Ortiz-Lopez J, Arzate H. X-ray microanalysis of human cementum. *Microsc Microanal* 2005; **11**: 313-318.
37. Berkovitz BK. Periodontal ligament: structural and clinical correlates. *Dent Update* 2004; **31**: 46-50, 52, 54.
38. Saygin NE, Tokiyasu Y, Giannobile WV, Somerman MJ. Growth factors regulate expression of mineral associated genes in cementoblasts. *J Periodontol* 2000; **71**: 1591-1600.
39. Berkovitz BK. Periodontal ligament: structural and clinical correlates. *Dent Update* 2004; **31**: 46-50, 52, 54.

40. Bosshardt DD, Sculean A, Windisch P, Pjetursson BE, Lang NP. Effects of enamel matrix proteins on tissue formation along the roots of human teeth. *J Periodontal Res* 2005; **40**: 158-167.
41. Bosshardt DD, Degen T, Lang NP. Sequence of protein expression of bone sialoprotein and osteopontin at the developing interface between repair cementum and dentin in human deciduous teeth. *Cell Tissue Res* 2005; **320**: 399-407.
42. Bosshardt DD. Are cementoblasts a subpopulation of osteoblasts or a unique phenotype? *J Dent Res* 2005; **84**: 390-406.
43. Rincon JC, Xiao Y, Young WG, Bartold PM. Production of osteopontin by cultured porcine epithelial cell rests of Malassez. *J Periodontal Res* 2005; **40**: 417-426.
44. Foster BL, Nociti FH, Jr., Swanson EC et al. Regulation of cementoblast gene expression by inorganic phosphate in vitro. *Calcif Tissue Int* 2006; **78**: 103-112.
45. Cerri PS, Katchburian E. Apoptosis in the epithelial cells of the rests of Malassez of the periodontium of rat molars. *J Periodontal Res* 2005; **40**: 365-372.
46. Rincon JC, Xiao Y, Young WG, Bartold PM. Production of osteopontin by cultured porcine epithelial cell rests of Malassez. *J Periodontal Res* 2005; **40**: 417-426.
47. Cerri PS, Katchburian E. Apoptosis in the epithelial cells of the rests of Malassez of the periodontium of rat molars. *J Periodontal Res* 2005; **40**: 365-372.
48. Slavkin HC, Bessem C, Fincham AG et al. Human and mouse cementum proteins immunologically related to enamel proteins. *Biochim Biophys Acta* 1989; **991**: 12-18.

49. Slavkin HC, Bringas P, Jr., Bessem C et al. Hertwig's epithelial root sheath differentiation and initial cementum and bone formation during long-term organ culture of mouse mandibular first molars using serumless, chemically-defined medium. *J Periodontal Res* 1989; **24**: 28-40.
50. Berkovitz BK. Periodontal ligament: structural and clinical correlates. *Dent Update* 2004; **31**: 46-50, 52, 54.
51. D'Errico JA, Ouyang H, Berry JE et al. Immortalized cementoblasts and periodontal ligament cells in culture. *Bone* 1999; **25**: 39-47.
52. Fatherazi S, Matsa-Dunn D, Foster BL, Rutherford RB, Somerman MJ, Presland RB. Phosphate regulates osteopontin gene transcription. *J Dent Res* 2009; **88**: 39-44.
53. Bosshardt DD, Sculean A, Windisch P, Pjetursson BE, Lang NP. Effects of enamel matrix proteins on tissue formation along the roots of human teeth. *J Periodontal Res* 2005; **40**: 158-167.
54. Cerri PS, Katchburian E. Apoptosis in the epithelial cells of the rests of Malassez of the periodontium of rat molars. *J Periodontal Res* 2005; **40**: 365-372.
55. Berkovitz BK. Periodontal ligament: structural and clinical correlates. *Dent Update* 2004; **31**: 46-50, 52, 54.
56. Chen SC, Marino V, Gronthos S, Bartold PM. Location of putative stem cells in human periodontal ligament. *J Periodontal Res* 2006; **41**: 547-553.

57. Bosshardt DD, Nanci A. Hertwig's epithelial root sheath, enamel matrix proteins, and initiation of cementogenesis in porcine teeth. *J Clin Periodontol* 2004; **31**: 184-192.
58. Bosshardt DD, Sculean A, Windisch P, Pjetursson BE, Lang NP. Effects of enamel matrix proteins on tissue formation along the roots of human teeth. *J Periodontal Res* 2005; **40**: 158-167.
59. McCulloch CA, Nemeth E, Lowenberg B, Melcher AH. Paravascular cells in endosteal spaces of alveolar bone contribute to periodontal ligament cell populations. *Anat Rec* 1987; **219**: 233-242.
60. Swanson EC, Fong HK, Foster BL et al. Amelogenins regulate expression of genes associated with cementoblasts in vitro. *Eur J Oral Sci* 2006; **114 Suppl 1**: 239-243.
61. Diekwisch TG. The developmental biology of cementum. *Int J Dev Biol* 2001; **45**: 695-706.
62. Diekwisch TG. Pathways and fate of migratory cells during late tooth organogenesis. *Connect Tissue Res* 2002; **43**: 245-256.
63. Saito M, Iwase M, Maslan S et al. Expression of cementum-derived attachment protein in bovine tooth germ during cementogenesis. *Bone* 2001; **29**: 242-248.
64. Saito M, Handa K, Kiyono T et al. Immortalization of cementoblast progenitor cells with Bmi-1 and TERT. *J Bone Miner Res* 2005; **20**: 50-57.

65. Saito M, Nishida E, Sasaki T, Yoneda T, Shimizu N. The KK-Periome database for transcripts of periodontal ligament development. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 2009; **312B**: 495-502.
66. Boabaid F, Gibson CW, Kuehl MA et al. Leucine-rich amelogenin peptide: a candidate signaling molecule during cementogenesis. *J Periodontol* 2004; **75**: 1126-1136.
67. Duailibi MT, Duailibi SE, Young CS, Bartlett JD, Vacanti JP, Yelick PC. Bioengineered teeth from cultured rat tooth bud cells. *J Dent Res* 2004; **83**: 523-528.
68. Duailibi SE, Duailibi MT, Vacanti JP, Yelick PC. Prospects for tooth regeneration. *Periodontol 2000* 2006; **41**: 177-187.
69. Duailibi SE, Duailibi MT, Vacanti JP, Yelick PC. Prospects for tooth regeneration. *Periodontol 2000* 2006; **41**: 177-187.
70. Duailibi MT, Duailibi SE, Young CS, Bartlett JD, Vacanti JP, Yelick PC. Bioengineered teeth from cultured rat tooth bud cells. *J Dent Res* 2004; **83**: 523-528.
71. Chen SC, Marino V, Gronthos S, Bartold PM. Location of putative stem cells in human periodontal ligament. *J Periodontal Res* 2006; **41**: 547-553.
72. Bartold PM, Shi S, Gronthos S. Stem cells and periodontal regeneration. *Periodontol 2000* 2006; **40**: 164-172.

73. Ripamonti U, Petit JC. Bone morphogenetic proteins, cementogenesis, myoblastic stem cells and the induction of periodontal tissue regeneration. *Cytokine Growth Factor Rev* 2009; **20**: 489-499.
74. Popowics T, Foster BL, Swanson EC, Fong H, Somerman MJ. Defining the roots of cementum formation. *Cells Tissues Organs* 2005; **181**: 248-257.
75. Raghow R, Kang AH, Pidikiti D. Phenotypic plasticity of extracellular matrix gene expression in cultured hamster lung fibroblasts. Regulation of type I procollagen and fibronectin synthesis. *J Biol Chem* 1987; **262**: 8409-8415.
76. Raghow R, Postlethwaite AE, Keski-Oja J, Moses HL, Kang AH. Transforming growth factor-beta increases steady state levels of type I procollagen and fibronectin messenger RNAs posttranscriptionally in cultured human dermal fibroblasts. *J Clin Invest* 1987; **79**: 1285-1288.
77. Matias MA, Li H, Young WG, Bartold PM. Immunohistochemical localisation of extracellular matrix proteins in the periodontium during cementogenesis in the rat molar. *Arch Oral Biol* 2003; **48**: 709-716.
78. Matias MA, Li H, Young WG, Bartold PM. Immunohistochemical localization of fibromodulin in the periodontium during cementogenesis and root formation in the rat molar. *J Periodontal Res* 2003; **38**: 502-507.
79. Wazen RM, Tye CE, Goldberg HA, Hunter GK, Smith CE, Nanci A. In vivo functional analysis of polyglutamic acid domains in recombinant bone sialoprotein. *J Histochem Cytochem* 2007; **55**: 35-42.

80. Chen SC, Marino V, Gronthos S, Bartold PM. Location of putative stem cells in human periodontal ligament. *J Periodontol Res* 2006; **41**: 547-553.
81. Slavkin HC, Bringas P, Jr., Bessem C et al. Hertwig's epithelial root sheath differentiation and initial cementum and bone formation during long-term organ culture of mouse mandibular first molars using serumless, chemically-defined medium. *J Periodontol Res* 1989; **24**: 28-40.
82. Diekwisch TG, Jin T, Wang X et al. Amelogenin evolution and tetrapod enamel structure. *Front Oral Biol* 2009; **13**: 74-79.
83. Viswanathan HL, Berry JE, Foster BL et al. Amelogenin: a potential regulator of cementum-associated genes. *J Periodontol* 2003; **74**: 1423-1431.
84. Boabaid F, Gibson CW, Kuehl MA et al. Leucine-rich amelogenin peptide: a candidate signaling molecule during cementogenesis. *J Periodontol* 2004; **75**: 1126-1136.
85. Van der Pauw MT, Van den BT, Everts V, Beertsen W. Enamel matrix-derived protein stimulates attachment of periodontal ligament fibroblasts and enhances alkaline phosphatase activity and transforming growth factor beta1 release of periodontal ligament and gingival fibroblasts. *J Periodontol* 2000; **71**: 31-43.
86. Kaneko H, Arakawa T, Mano H et al. Direct stimulation of osteoclastic bone resorption by bone morphogenetic protein (BMP)-2 and expression of BMP receptors in mature osteoclasts. *Bone* 2000; **27**: 479-486.



87. Zhao M, Berry JE, Somerman MJ. Bone morphogenetic protein-2 inhibits differentiation and mineralization of cementoblasts in vitro. *J Dent Res* 2003; **82**: 23-27.
88. Ripamonti U, Petit JC. Bone morphogenetic proteins, cementogenesis, myoblastic stem cells and the induction of periodontal tissue regeneration. *Cytokine Growth Factor Rev* 2009; **20**: 489-499.
89. Arzate H, Jimenez-Garcia LF, Alvarez-Perez MA, Landa A, Bar-Kana I, Pitaru S. Immunolocalization of a human cementoblastoma-conditioned medium-derived protein. *J Dent Res* 2002; **81**: 541-546.
90. Saito M, Iwase M, Maslan S et al. Expression of cementum-derived attachment protein in bovine tooth germ during cementogenesis. *Bone* 2001; **29**: 242-248.
91. Handa K, Saito M, Yamauchi M et al. Cementum matrix formation in vivo by cultured dental follicle cells. *Bone* 2002; **31**: 606-611.
92. Alvarez-Perez MA, Narayanan S, Zeichner-David M, Rodriguez CB, Arzate H. Molecular cloning, expression and immunolocalization of a novel human cementum-derived protein (CP-23). *Bone* 2006; **38**: 409-419.
93. Arzate H, Jimenez-Garcia LF, Alvarez-Perez MA, Landa A, Bar-Kana I, Pitaru S. Immunolocalization of a human cementoblastoma-conditioned medium-derived protein. *J Dent Res* 2002; **81**: 541-546.

94. Pitaru S, Savion N, Hekmati H, Olson S, Narayanan SA. Molecular and cellular interactions of a cementum attachment protein with periodontal cells and cementum matrix components. *J Periodontal Res* 1993; **28**: 560-562.
95. Pitaru S, Narayanan SA, Olson S et al. Specific cementum attachment protein enhances selectively the attachment and migration of periodontal cells to root surfaces. *J Periodontal Res* 1995; **30**: 360-368.
96. Alvarez-Perez MA, Narayanan S, Zeichner-David M, Rodriguez CB, Arzate H. Molecular cloning, expression and immunolocalization of a novel human cementum-derived protein (CP-23). *Bone* 2006; **38**: 409-419.
97. Alvarez Perez MA, Pitaru S, Alvarez FO, Reyes GJ, Arzate H. Anti-cementoblastoma-derived protein antibody partially inhibits mineralization on a cementoblastic cell line. *J Struct Biol* 2003; **143**: 1-13.
98. Alvarez-Perez MA, Narayanan S, Zeichner-David M, Rodriguez CB, Arzate H. Molecular cloning, expression and immunolocalization of a novel human cementum-derived protein (CP-23). *Bone* 2006; **38**: 409-419.
99. Alvarez Perez MA, Pitaru S, Alvarez FO, Reyes GJ, Arzate H. Anti-cementoblastoma-derived protein antibody partially inhibits mineralization on a cementoblastic cell line. *J Struct Biol* 2003; **143**: 1-13.
100. Kitagawa M, Kudo Y, Iizuka S et al. Effect of F-spondin on cementoblastic differentiation of human periodontal ligament cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; **349**: 1050-1056.

101. Feinstein Y, Klar A. The neuronal class 2 TSR proteins F-spondin and Mindin: a small family with divergent biological activities. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; **36**: 975-980.
102. Klar A, Baldassare M, Jessell TM. F-spondin: a gene expressed at high levels in the floor plate encodes a secreted protein that promotes neural cell adhesion and neurite extension. *Cell* 1992; **69**: 95-110.
103. Tucker RP. The thrombospondin type 1 repeat superfamily. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; **36**: 969-974.
104. Burstyn-Cohen T, Frumkin A, Xu YT, Scherer SS, Klar A. Accumulation of F-spondin in injured peripheral nerve promotes the outgrowth of sensory axons. *J Neurosci* 1998; **18**: 8875-8885.
105. Feinstein Y, Klar A. The neuronal class 2 TSR proteins F-spondin and Mindin: a small family with divergent biological activities. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; **36**: 975-980.
106. Pyle-Chenault RA, Stolk JA, Molesh DA et al. VSGP/F-spondin: a new ovarian cancer marker. *Tumour Biol* 2005; **26**: 245-257.
107. Kitagawa M, Kudo Y, Iizuka S et al. Effect of F-spondin on cementoblastic differentiation of human periodontal ligament cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; **349**: 1050-1056.
108. Hench LL. Biomaterials. *Science* 1980; **208**: 826-831.

109. Bohl KS, Shon J, Rutherford B, Mooney DJ. Role of synthetic extracellular matrix in development of engineered dental pulp. *J Biomater Sci Polym Ed* 1998; **9**: 749-764.
110. Kaigler D, Mooney D. Tissue engineering's impact on dentistry. *J Dent Educ* 2001; **65**: 456-462.
111. Young MP, Quayle AA, Sloan P, Carter DH. A survey of clinical members of the Association of Dental Implantology in the United Kingdom. Part III. The use of augmentation techniques in dental implant surgery. *Implant Dent* 2001; **10**: 291-298.
112. Pini PG, Baccetti T, Giorgetti R, Agudio G, Cortellini P. Mucogingival interceptive surgery of buccally-erupted premolars in patients scheduled for orthodontic treatment. II. Surgically treated versus nonsurgically treated cases. *J Periodontol* 2000; **71**: 182-187.
113. Pini PG, Baccetti T, Magnani C, Agudio G, Cortellini P. Mucogingival interceptive surgery of buccally-erupted premolars in patients scheduled for orthodontic treatment. I. A 7-year longitudinal study. *J Periodontol* 2000; **71**: 172-181.
114. Pereira MM, Jones JR, Orefice RL, Hench LL. Preparation of bioactive glass-polyvinyl alcohol hybrid foams by the sol-gel method. *J Mater Sci Mater Med* 2005; **16**: 1045-1050.
115. Pereira MM, Jones JR, Orefice RL, Hench LL. Preparation of bioactive glass-polyvinyl alcohol hybrid foams by the sol-gel method. *J Mater Sci Mater Med* 2005; **16**: 1045-1050.

116. Curtis A, Riehle M. Tissue engineering: the biophysical background. *Phys Med Biol* 2001; **46**: R47-R65.
117. Gronthos S, Akintoye SO, Wang CY, Shi S. Bone marrow stromal stem cells for tissue engineering. *Periodontol 2000* 2006; **41**: 188-195.
118. Wong CT, Chen QZ, Lu WW et al. Ultrastructural study of mineralization of a strontium-containing hydroxyapatite (Sr-HA) cement in vivo. *J Biomed Mater Res A* 2004; **70**: 428-435.
119. Schwarz F, Sculean A, Georg T, Becker J. Clinical evaluation of the Er:YAG laser in combination with an enamel matrix protein derivative for the treatment of intrabony periodontal defects: a pilot study. *J Clin Periodontol* 2003; **30**: 975-981.
120. Wilson J, Clark AE, Hall M, Hench LL. Tissue response to Bioglass endosseous ridge maintenance implants. *J Oral Implantol* 1993; **19**: 295-302.
121. Weber HP, Fiorellini JP. The biology and morphology of the implant-tissue interface. *Alpha Omegan* 1992; **85**: 61-64.
122. Hersel U, Dahmen C, Kessler H. RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials* 2003; **24**: 4385-4415.
123. Hench LL. Bioceramics and the origin of life. *J Biomed Mater Res* 1989; **23**: 685-703.
124. Hench LL. Bioceramics and the origin of life. *J Biomed Mater Res* 1989; **23**: 685-703.

125. Gheysen G, Ducheyne P, Hench LL, de Meester P. Bioglass composites: a potential material for dental application. *Biomaterials* 1983; **4**: 81-84.
126. Hench LL. Biomaterials: a forecast for the future. *Biomaterials* 1998; **19**: 1419-1423.
127. Hench LL. Biomaterials. *Science* 1980; **208**: 826-831.
128. Hench LL. Bioactive materials: the potential for tissue regeneration. *J Biomed Mater Res* 1998; **41**: 511-518.
129. Hench LL. The story of Bioglass. *J Mater Sci Mater Med* 2006; **17**: 967-978.
130. Clupper DC, Gough JE, Embanga PM, Notingher I, Hench LL, Hall MM. Bioactive evaluation of 45S5 bioactive glass fibres and preliminary study of human osteoblast attachment. *J Mater Sci Mater Med* 2004; **15**: 803-808.
131. Hench LL. Ceramics, glasses, and composites in medicine. *Med Instrum* 1973; **7**: 136-144.
132. Hench LL, Paschall HA. Histochemical responses at a biomaterial's interface. *J Biomed Mater Res* 1974; **8**: 49-64.
133. Hench LL. Bioceramics and the origin of life. *J Biomed Mater Res* 1989; **23**: 685-703.
134. Hench LL. Biomaterials: a forecast for the future. *Biomaterials* 1998; **19**: 1419-1423.

135. Xynos ID, Hukkanen MV, Batten JJ, Buttery LD, Hench LL, Polak JM. Bioglass 45S5 stimulates osteoblast turnover and enhances bone formation In vitro: implications and applications for bone tissue engineering. *Calcif Tissue Int* 2000; **67**: 321-329.
136. Jell G, Notingher I, Tsigkou O et al. Bioactive glass-induced osteoblast differentiation: a noninvasive spectroscopic study. *J Biomed Mater Res A* 2008; **86**: 31-40.
137. Li R, Clark AE, Hench LL. An investigation of bioactive glass powders by sol-gel processing. *J Appl Biomater* 1991; **2**: 231-239.
138. Saravanapavan P, Jones JR, Pryce RS, Hench LL. Bioactivity of gel-glass powders in the CaO-SiO<sub>2</sub> system: a comparison with ternary (CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-SiO<sub>2</sub>) and quaternary glasses (SiO<sub>2</sub>-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-Na<sub>2</sub>O). *J Biomed Mater Res A* 2003; **66**: 110-119.
139. Pereira MM, Clark AE, Hench LL. Calcium phosphate formation on sol-gel-derived bioactive glasses in vitro. *J Biomed Mater Res* 1994; **28**: 693-698.
140. Pereira MM, Jones JR, Orefice RL, Hench LL. Preparation of bioactive glass-polyvinyl alcohol hybrid foams by the sol-gel method. *J Mater Sci Mater Med* 2005; **16**: 1045-1050.
141. Oonishi H, Hench LL, Wilson J et al. Quantitative comparison of bone growth behavior in granules of Bioglass, A-W glass-ceramic, and hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res* 2000; **51**: 37-46.

142. Pereira MM, Jones JR, Orefice RL, Hench LL. Preparation of bioactive glass-polyvinyl alcohol hybrid foams by the sol-gel method. *J Mater Sci Mater Med* 2005; **16**: 1045-1050.
143. Xynos ID, Edgar AJ, Buttery LD, Hench LL, Polak JM. Ionic products of bioactive glass dissolution increase proliferation of human osteoblasts and induce insulin-like growth factor II mRNA expression and protein synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; **276**: 461-465.
144. Xynos ID, Hukkanen MV, Batten JJ, Buttery LD, Hench LL, Polak JM. Bioglass 45S5 stimulates osteoblast turnover and enhances bone formation In vitro: implications and applications for bone tissue engineering. *Calcif Tissue Int* 2000; **67**: 321-329.
145. Xynos ID, Edgar AJ, Buttery LD, Hench LL, Polak JM. Gene-expression profiling of human osteoblasts following treatment with the ionic products of Bioglass 45S5 dissolution. *J Biomed Mater Res* 2001; **55**: 151-157.
146. Valerio P, Pereira MM, Goes AM, Leite MF. The effect of ionic products from bioactive glass dissolution on osteoblast proliferation and collagen production. *Biomaterials* 2004; **25**: 2941-2948.
147. Kitagawa M, Kudo Y, Iizuka S et al. Effect of F-spondin on cementoblastic differentiation of human periodontal ligament cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; **349**: 1050-1056.



148. Kaneda T, Miyauchi M, Takekoshi T et al. Characteristics of periodontal ligament subpopulations obtained by sequential enzymatic digestion of rat molar periodontal ligament. *Bone* 2006; **38**: 420-426.
149. Kitagawa M, Kudo Y, Iizuka S et al. Effect of F-spondin on cementoblastic differentiation of human periodontal ligament cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; **349**: 1050-1056.
150. Kitagawa M, Kudo Y, Iizuka S et al. Effect of F-spondin on cementoblastic differentiation of human periodontal ligament cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; **349**: 1050-1056.
151. Chun YH, Foster BL, Lukasavage PA et al. Bisphosphonate modulates cementoblast behavior in vitro. *J Periodontol* 2005; **76**: 1890-1900.
152. Kitagawa M, Kudo Y, Iizuka S et al. Effect of F-spondin on cementoblastic differentiation of human periodontal ligament cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; **349**: 1050-1056.
153. Valerio P, Pereira MM, Goes AM, Leite MF. The effect of ionic products from bioactive glass dissolution on osteoblast proliferation and collagen production. *Biomaterials* 2004; **25**: 2941-2948.
154. Xynos ID, Edgar AJ, Bותרry LD, Hench LL, Polak JM. Ionic products of bioactive glass dissolution increase proliferation of human osteoblasts and induce insulin-like growth factor II mRNA expression and protein synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; **276**: 461-465.
155. Slavkin HC. Recombinant DNA technology and clinical dentistry. *Int J Prosthodont* 1989; **2**: 80-96.

## APÊNDICE

### Ensaio Biomoleculares

A compatibilidade do biomaterial com a cultura celular deve ser avaliada através de ensaios *'In Vitro'* que possam medir vários parâmetros celulares como funcionalidade, morfologia, citotoxicidade, adesão, proliferação entre outros. Para determinar a taxa de crescimento das células uma das técnicas utilizada é a de exclusão de células não vitais coradas por azul de Trypan. Essa técnica muito simples se baseia na penetração do corante azul de Trypan através da membrana plasmática de células não vitais, portanto as células coradas de azul são consideradas não vitais. A membrana plasmática das células é considerada a primeira barreira das células. As células são contadas em câmara de Neubauer utilizando a seguinte equação matemática  $NC \times D \times 10^4 / \#Q$ , onde NC= número de células vitais contadas; D= diluição da amostra (=10) e #Q= número de quadrados da câmara de Neubauer usados para contagem das células.

Outra técnica muito utilizada para avaliação da viabilidade celular é a de redução do sal de tetrazolium (MTT) pelo complexo enzimático piruvato desidrogenase presente na matriz de mitocôndrias. Esse complexo enzimático transforma o sal de tetrazolium em produtos finais de metabolização chamados de cristais de formazan que podem depois serem mensurados quantitativamente em espectrofotômetro a 595nm. Esse ensaio deve ser usado especificamente para a funcionalidade mitocondrial. A mitocôndria é uma das organelas celulares mais importantes, uma vez que é responsável pela respiração celular, portanto a quantificação de sua viabilidade leva indiretamente a viabilidade da célula..

A proliferação é uma função celular muito importante e extremamente estudada em biologia celular e muito utilizada em engenharia de tecidos Existem diferentes métodos de mensuração da proliferação celular. Uma técnica de mensuração da proliferação celular muito importante é utilizando a evidencia da replicação do DNA. Essa técnica pode ser feita com a incorporação de marcadores radioativos em uma base do DNA, a timidina, que depois será radiografada para detecção da proliferação celular. Uma alternativa de uma técnica não radioativa foi proposta por Gratzner *et al* em 1982 que demonstraram a detecção de células na fase de síntese mitótica (faseS). Essa técnica

chamada de BrdU se baseia no uso de anticorpos contra bromodeoxiuridina (BrdU) uma base sintética análoga a timidina natural. Esse método de incorporação de BrdU sintético durante a fase S da mitose pode realmente detectar a replicação do DNA com o uso de anticorpos específicos. Subseqüente quantificação de células BrdU positivas é possível utilizando métodos rotineiros de análise como citometria de fluxo, leitura quantitativa em espectrofotômetro ou imunohistoquímica.

As vantagens da detecção por espectrofotômetro do BrdU comparado com o método de incorporação radiativa da timidina e subseqüente radiografia são o tempo de ensaio mais curto. A técnica de quantificação por incorporação de BrdU tem sido utilizada para determinar taxas de proliferação celular e da cinética do ciclo celular mensurando índices de diferentes populações celulares em tecidos normais ou neoplásicos.

Um ensaio muito utilizado para a verificação de expressão de um determinado gene é a PCR. PCR (Reação de Polimerização em Cadeia) é uma metodologia que se baseia na amplificação exponencial seletiva de uma quantidade reduzida de DNA. Esta técnica revolucionou o mundo científico e as suas aplicações são imensas: é usado no diagnóstico médico, mapeamento genético, detecção de doenças hereditárias, clonagem de genes, teste de paternidade, identificação de impressões digitais genéticas, etc. De fato, a PCR revolucionou várias áreas como a Biologia Molecular, Patologia, Farmácia, Botânica, Medicina Forense e valeu o prêmio Nobel, em 1993, a Kary Mullis. O objetivo da PCR é produzir uma quantidade apreciável de um segmento específico de DNA a partir de uma quantidade mínima. O DNA molde sofre uma amplificação controlada por enzimas, obtendo-se milhões de cópias do fragmento de DNA de interesse [155]. O molde pode ser qualquer forma de DNA de cadeia dupla, como por exemplo, o DNA genômico: pode usar-se uma gota de sangue, um fio de cabelo, uma célula do epitélio oral, um blastômero, etc. Existem dois tipos de PCR:

- O qualitativo que tem como base a presença ou não do produto amplificado. Portanto, existem apenas dois resultados, o positivo e o negativo. Para se afirmar que um resultado é negativo ou não, deve-se ter a certeza de que a ausência de resposta é devido à ausência de DNA molde, e não às falhas na reação. Para tanto, deve se considerar o uso de um controle de amplificação nas reações. As bandas controle nas reações de PCR são geradas a partir da amplificação de uma

sequência que obrigatoriamente existe no material analisado. Vários genes são utilizados como controle para amostras de roedores e de humanos sendo os genes da  $\beta$ -globulina, Actina e da GAPDH os mais usados.

- O semi quantitativo determina o quanto de DNA foi amplificado em comparação a um padrão. Esse padrão pode ser um simples controle ou uma sequência de DNA exógeno introduzido na reação em quantidades conhecidas. A técnica parte do princípio que se o controle de amplificação é uma sequência que vai ser amplificada sob a mesma condição da sequência alvo, ele pode ser utilizado como parâmetro de quantificação dos produtos de PCR. As bandas após a eletroforese são registradas eletronicamente (por fotografia digital ou *scanner*) e posteriormente as bandas são analisadas também por programas de densitometria óptica.

Outro ensaio utilizado para verificar a expressão de proteínas é o Western Blot, um método em biologia molecular e bioquímica para detectar proteínas em um homogenato celular ou em extrato de um tecido biológico. Essa técnica usa eletroforese em gel para separar as proteínas desnaturadas por massa. As proteínas são então transferidas do gel para uma membrana ( de nitrocelulose ou polivinilidina) onde serão usados como sonda, anticorpos específicos à proteína. Nessa fase se pode usar o método com anticorpo primário e secundário, chamada de técnica de dois passos ou utilizar a técnica de um passo , que usa somente um anticorpo. A detecção dos resultados pode ser conseguida de várias maneiras: detecção colorimétrica; por quimioluminescência; detecção radioativa e detecção fluorescente. A análise da proteína alvo deve ser comparada a uma proteína controle estrutural, que pode ser a actina ou  $\beta$ -tubulina. Essa prática garante a correção do total de proteína na membrana no caso de erros. No caso do Western Blot, se pode também ter uma análise qualitativa ou quantitativa, usando os mesmos parâmetros usados na PCR.

Outra técnica é a Imunofluorescência, que permite a visualização da localização de uma determinada proteína nos tecidos ou em culturas celulares utilizando corantes fluorescentes, que absorvem luz e emitem num determinado comprimento de onda. São utilizadas reações específicas com anticorpos que quando ligados com os corantes fluorescentes podem ser visualizados em microscópio confocal. O microscópio confocal utiliza a fluorescência para aquisição de imagens.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL  
- C E T E A -

**CERTIFICADO**

Certificamos que o **Protocolo nº 169/2008**, relativo ao projeto intitulado "**Caracterização de cementoblastos de ligamento periodontal de ratos para engenharia de tecidos**", que tem como responsável(is) **Marivalda de Magalhães Pereira**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **8/ 10/2008**.

Este certificado expira-se em **8/ 10/ 2013**.

**CERTIFICATE**

We hereby certify that the **Protocol nº 169/2008**, related to the project entitled "**Characterization of cementoblasts cells derived from rat molar periodontal ligament for tissue engineering**", under the supervisors of **Marivalda de Magalhães Pereira**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **October 8, 2008**.

This certificate expires in **October 8, 2013**.

Belo Horizonte, 8 de Outubro de 2008.

**Prof. Humberto Pereira Oliveira**  
**Coordenador do CETEA/UFMG**

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil  
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592  
[www.ufmg.br/bioetica/cetea](http://www.ufmg.br/bioetica/cetea) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)