

ESTUDO *IN VITRO* DO PADRÃO DE CRESCIMENTO E PROLIFERAÇÃO CELULAR DE PRÉ-OSTEOBLASTOS HUMANOS COM BIO-OSS® E GENOX®

IN VITRO STUDY OF GROWTH AND PROLIFERATION OF HUMAN PRE-OSTEOBLAST ON BIO-OSS® AND GENOX®

Fernanda Paula YAMAMOTO-SILVA¹; Francisco Fernando TODESCAN²; Rogério Cunha DUARTE³; Ney Soares de ARAÚJO⁴; Lorena Rosa SILVA⁵; Kaique Leite de LIMA⁵; Brunno Santos de Freitas SILVA⁶

1 - Doutora em Patologia Bucal (FO-USP), Professora Adjunto, Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás (FO-UFG), Goiânia, GO.

2 - Doutor em Periodontia (FO-USP), Coordenador do Curso de Especialização em Implantodontia da Fundação para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico da Odontologia – FUNDECTO, São Paulo, SP.

3 - Especialista em Implantodontia, Fundação para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico da Odontologia – FUNDECTO, São Paulo, SP.

4 - Doutor em Patologia Bucal (FO-USP), Diretor do Curso de Graduação em Odontologia do Centro de Pesquisas Odontológicas São Leopoldo Mandic, Campinas, SP.

5 - Estudante de graduação em Odontologia, Centro Universitário Anápolis – UniEVANGÉLICA, Anápolis, GO.

6 - Doutor em Patologia Bucal (FO-USP), Professor Titular, Curso de Odontologia, Centro Universitário Anápolis – UniEVANGÉLICA, Anápolis, GO.

RESUMO

Objetivo: O presente trabalho avaliou o padrão de crescimento, o índice de proliferação celular e morfologia de pré-osteoblastos humanos cultivados com Bio-Oss® e GenOx®. **Material e Método:** Pré-osteoblastos humanos MC3T3-E1 foram cultivados em contato com os biomateriais por 1, 24 e 72 horas para avaliação da proliferação celular, medido com o teste colorimétrico MTS. Para a avaliação do padrão de crescimento e da morfologia celular, as células foram cultivadas por 24 e 72 horas, respectivamente e avaliadas sob microscopia de contraste de fase e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para verificação de diferenças no crescimento celular entre os grupos foi utilizado o teste one-way de ANOVA, sendo considerados significantes valores de $p < 0,05$. **Resultados:** A proliferação celular foi maior na primeira hora nas amostras em contato com os biomateriais em comparação ao grupo controle. Nos períodos de 24 e 72 horas de cultivo celular,

a curva de crescimento não mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p > 0,05$). Na microscopia de contraste de fase observou-se que as células cresceram em proximidade aos biomateriais, iniciando a formação da monocamada de maneira semelhante. Quando analisadas no MEV, as células cultivadas sobre os biomateriais apresentaram-se com formato fusiforme e núcleo arredado. **Conclusão:** Com a comparação do comportamento biológico de Bio-Oss® e GenOx®, realizada *in vitro* neste estudo, pôde-se observar que apesar das diferenças físico-químicas, o padrão, índice de crescimento e morfologia celular de Bio-Oss® e GenOx® se mostraram semelhantes, e que ambos materiais são biocompatíveis e representam uma boa opção como substitutos ósseos.

PALAVRAS-CHAVE: Transplante ósseo; Técnicas de cultura de células; Proliferação de células.

INTRODUÇÃO

Substitutos de enxerto ósseo (SEO) são biomateriais utilizados em diversas áreas da Odontologia com finalidade de aumentar a quantidade de osso, permitindo a instalação de implantes, o levantamento de seio maxilar^{1,2}, a manutenção de altura de crista óssea alveolar pós-extração, entre outras aplicações³.

Os biomateriais são classificados de acordo com sua origem, podendo ser: autógeno, alógeno e xenógeno. O enxerto alógeno caracteriza-se por ser um tecido ósseo doado por outra pessoa ou cadáver, apresentando como desvantagem a possibilidade de transmissão de doenças. O enxerto xenógeno representa um tecido ósseo de outra espécie, tendo como benefícios a utilização de um material previamente adequado para instalação no paciente, associado muitas vezes a um tempo cirúrgico menor, e a um melhor pós-operatório. O enxerto autógeno caracteriza-se pela obtenção de material doador pelo próprio paciente, sendo

ainda considerado o padrão ouro, pois apresenta propriedades osteocondutoras, osteoindutoras e osteogênicas⁴. Entretanto, apresenta como desvantagens a associação com um segundo momento cirúrgico, aumento da morbidade, além de apresentar uma quantidade limitada de material⁵.

Devido às desvantagens do enxerto autógeno, diversos substitutos ósseos foram lançados no mercado oriundos de osso bovino, humano e de plantas. Eles podem ser utilizados isoladamente ou em combinação com osso autógeno, sendo associado a um considerável sucesso clínico. O biomaterial ideal deve ser biocompatível, permitir a aderência celular, ser de fácil manuseio, e deve propiciar a remodelação óssea⁶.

Os biomateriais Bio-Oss®, (Geistlich Biomaterials, Wolhusen, Suíça), produto importado, e o GenOx® (Baumer S.A., São Paulo, Brasil), um produto nacional, apresentam diferença significativa em relação ao custo, principalmente devido à necessidade de

importação do Bio-Oss®. Bio-Oss® é um SEO de hidroxiapatita bovino produzido em baixa temperatura (300°C), apresentando alta porosidade e grânulos grandes, o que melhora a adesão de osteoblastos, proporcionando ainda a permanência de estruturas protéicas. GenOx® é um osso bovino obtido após tratamento em alta temperatura (950-1000°C), o que produz menor porosidade, mas sem resquício de proteínas do animal doador. Apesar de ser menos poroso, o GenOx® apresenta grânulos de menor tamanho⁶. Tais características, teoricamente, podem trazer um comportamento diferente desses biomateriais no hospedeiro como substitutos ósseos. A comparação de Bio-Oss® e GenOx®, no que se refere às características físico-químicas, já foi realizada anteriormente⁷, porém suas características biológicas ainda não foram confrontadas.

Devido à escassez de estudos comparativos entre Bio-Oss® e GenOx®, o objetivo da presente investigação foi comparar o crescimento celular, o padrão de crescimento e a morfologia de pré-osteoblastos humanos sob a influência de GenOx® e Bio-Oss®.

MATERIAL E MÉTODOS

Cultivo celular

Para o cultivo celular foi utilizada a linhagem celular imortalizada MC3T3-E1 (ATCC), sendo estas plaqueadas em frascos de 25 cm² contendo 5ml de meio essencial mínimo, modificação alfa (α MEM – Invitrogen, Burlington, ON, Canadá) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB – Cultilab, Campinas, Brasil), e 1% de solução antibiótica-antimicótica (Sigma). Todo o cultivo foi realizado mantendo-se as células em incubadoras à temperatura controlada de 37°, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. A cada 2 ou 3 dias o meio de cultura era completamente trocado. Após alcançar a subconfluência, as células foram lavadas com PBS, removidas com 5 ml de tripsina (37°C), e concentradas por centrifugação. Foi realizada contagem prévia do número de células cultivadas utilizando-se a câmara de Neubauer.

Proliferação celular

A proliferação celular foi obtida por meio do ensaio com a solução 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) (Promega corp. USA), que determina o número de células viáveis por método colorimétrico que avalia os índices de proliferação. As células foram cultivadas em placas de 96 poços, com a densidade de $3,5 \times 10^3$, e neste momento, foi adicionado 18mg de Bio-Oss® nos poços do grupo Bio-Oss®, 18mg de GenOx® no Grupo GenOx®, e nenhum material foi adicionado nos poços que serviram como controle (grupo controle). Para a realização deste ensaio foram utilizados 3 grupos todos em triplicata.

Após 1, 24 e 72 horas, o meio foi trocado e adicionado 20ml de MTS que ficou incubado de 1-4 horas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂, para posterior leitura em espectrofotômetro - ELISA (SpectraMax plus, molecular devices). O comprimento de onda usado para aferir o grau de absorbância foi de 490nm.

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia das células MC3T3-E1 cultivadas em placas de 35mm² em contato com os biomateriais foi analisada em

microscopia eletrônica de varredura utilizando dois espécimes de cada grupo. Após 3 dias de incubação, as células com 40mg de cada biomaterial foram fixadas em solução de glutaraldeído 2,5% por 24 horas e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% por 1 hora. Após a desidratação em solução de etanol em crescentes concentrações, as células foram secadas utilizando o solvente de baixa tensão 1, 1, 1, 3, 3, 3-hexamethyldisilazane (HMDS - ACROS Organics, New Jersey, USA) e mantidas em dessecador durante 12 horas.

Microscopia de Contraste de Fase (ML)

O padrão de crescimento das células em cultura sobre Bio-Oss® e GenOx® foi avaliado com a utilização de um microscópio de contraste de fase, em magnificação de 10x, após 72 horas do plaqueamento. Para essa análise, levou-se em consideração a deposição das células na superfície da placa, a disposição em mono ou multicamadas, e sua proximidade com os grânulos dos biomateriais.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para verificação de diferenças no crescimento celular entres os três grupos estudados foi utilizado o teste one-way de ANOVA. Foram considerados significantes valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Na primeira hora do ensaio de MTS observou-se uma maior proliferação das células MC3T3-E1 nos biomateriais (Bio-Oss® e GenOx®) analisados em comparação ao grupo controle, porém não havendo diferenças estatisticamente significantes entre os grupos os grupos ($p > 0,05$) (Gráfico 1). Nos períodos de 24 e 72 horas notou-se um crescimento progressivo das células em todos os grupos (Gráfico 1), mas não houve diferença significativa na proliferação celular entre eles ($p > 0,05$).

Durante a análise morfológica das células na superfície dos biomateriais, por meio da microscopia eletrônica de varredura, pôde-se observar que as células encontravam-se devidamente aderidas ao material, tanto no grupo Bio-Oss® quanto GenOx®, apresentando um formato fusiforme com núcleo arredondado, sendo estas características compatíveis com os sinais de biocompatibilidade.

Por meio da microscopia de contraste de fase observou-se que o padrão de crescimento das células dos grupos Bio-Oss® e GenOx® foi semelhante, sendo observada uma concentração celular próxima aos grânulos dos materiais. Pode-se observar também o início da deposição das células em monocamada.

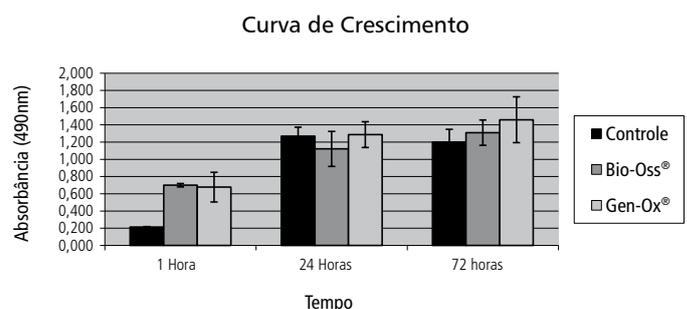


Gráfico 1 - Avaliação do índice de proliferação celular de pré-osteoblastos humanos cultivados com Bio-Oss® e GenOx® após 1, 24 e 72 horas.

DISCUSSÃO

Bio-Oss® e GenOx® são exemplos de substitutos ósseos de origens diferentes, sendo o primeiro suíço e o segundo, nacional, que apresentam uma significativa diferença no custo e em suas propriedades físico-químicas. Devido à escassez de trabalhos comparando esses dois biomateriais, o objetivo do presente estudo foi comparar, *in vitro*, o padrão de crescimento, o índice de proliferação celular e a morfologia de pré-osteoblastos humanos cultivados com Bio-Oss® e GenOx®.

Nos ensaios de crescimento celular realizados neste estudo, pôde-se observar que na primeira hora da cultura celular o índice de proliferação foi relativamente maior na amostra com os biomateriais em comparação ao controle, entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Tais resultados podem indicar que os biomateriais apresentam um potencial osteoindutor, facilitando ou promovendo a proliferação dos pré-osteoblastos.

Apesar dos substitutos ósseos poderem apresentar capacidade osteoindutora, alguns estudos *in vitro* demonstraram que Bio-Oss® pode até suprimir a diferenciação e proliferação de osteoblastos em cultura⁸, inclusive sendo esse material relacionado à falta de adesão e de diferenciação das células⁶. No presente estudo, no período de 24 horas de cultivo celular, apesar da proliferação celular do grupo controle sobrepôr a do Bio-Oss®, a diferença não foi estatisticamente significativa, não sendo interpretada como supressão da proliferação celular. Acredita-se que a supressão da proliferação e a falta de diferenciação deveriam

ser acompanhadas por uma redução expressiva na proliferação celular, além de alterações morfológicas evidentes, fato não observado durante a microscopia eletrônica de varredura e microscopia invertida de fase.

Em estudos clínicos e *in vivo* foi demonstrado que tanto o Bio-Oss^{9,10} quanto o GenOx® estimulam a neoformação óssea^{11,12}. Entretanto, *in vitro*, Bio-Oss® parece influenciar negativamente os níveis fisiológicos de Ca e P, característica essencial para função dos osteoblastos, expressão gênica e mineralização da matriz óssea¹³. Acredita-se que os resultados negativos encontrados *in vitro* tenham sido influenciados pela quantidade/concentração do material no meio de cultura^{6,14-16}, pois a alta concentração de Bio-Oss® parece promover a contração do Ca em 90%, prejudicando a proliferação celular¹³. No presente trabalho, a quantidade do GenOx® e do Bio-Oss® parece não ter influenciado negativamente o cultivo das células pré-osteoblásticas, visto que foram suficientes para aumentar a proliferação celular em comparação ao controle, porém sem diferença estatisticamente significativa.

Além das propriedades químicas dos biomateriais já discutidas anteriormente, a superfície e sua porosidade podem influenciar de maneira expressiva a osteocondução. Os poros influenciam a propriedade osteocondutora dos materiais, uma vez que aumenta a superfície para o crescimento celular. Enxertos ósseos obtidos a alta temperatura, como o GenOx®, apresenta a superfície completamente sem proteínas, grânulos de menor tamanho, porém, com menor quantidade de poros. Já o Bio-Oss®, produzido em baixa temperatura, exibe alta porosidade, grânulos grandes e permite a permanência de proteínas residuais. Grânulos menores e de alta porosidade proporcionam maior superfície e por isso, influenciam no crescimento celular. A permanência de proteínas é controversa, podendo induzir a proliferação celular, mas também ser transmissor de doenças⁶. Apesar de estudos anteriores relatarem a diferença da superfície dos biomateriais obtidos em alta e baixa temperatura, Accorsi-Mendonça et al⁷. (2008) comparam a superfície de Bio-Oss® e GenOx® e afirmam que os poros dos dois biomateriais são semelhantes. O presente trabalho, apesar de não ter avaliado a superfície dos materiais, corrobora com esses achados, uma vez que não identificou diferença na proliferação celular.

Sabe-se que a aderência de osteoblastos na superfície dos SEOs é necessária para a formação óssea e que a superfície e morfologia desses materiais interferem na adesão celular. Na avaliação da morfologia celular e padrão de crescimento, através da microscopia eletrônica de varredura e da microscopia de contraste de fase, não houve diferença nos dois grupos estudados. As células apresentaram formato fusiforme, estavam aderidas e mostraram o início da formação da monocamada celular adjacentes ao grânulo, características de biocompatibilidade do material. Contrariamente, outras investigações mostraram que células cultivadas sobre o Bio-Oss® mostraram formato arredondado e não aderidas à superfície^{6,8}.

O SEO ideal deve ser biocompatível, permitir aderência celular, ter integração tecidual e ser de fácil manuseio. Com a comparação do comportamento biológico de Bio-Oss® e GenOx®, realizada *in vitro* neste estudo, pôde-se observar que apesar das diferenças físico-químicas, o padrão, índice de crescimento e morfologia celular de Bio-Oss® e GenOx® se mostraram semelhantes, e que ambos materiais são biocompatíveis e representam uma boa opção como substitutos ósseos.

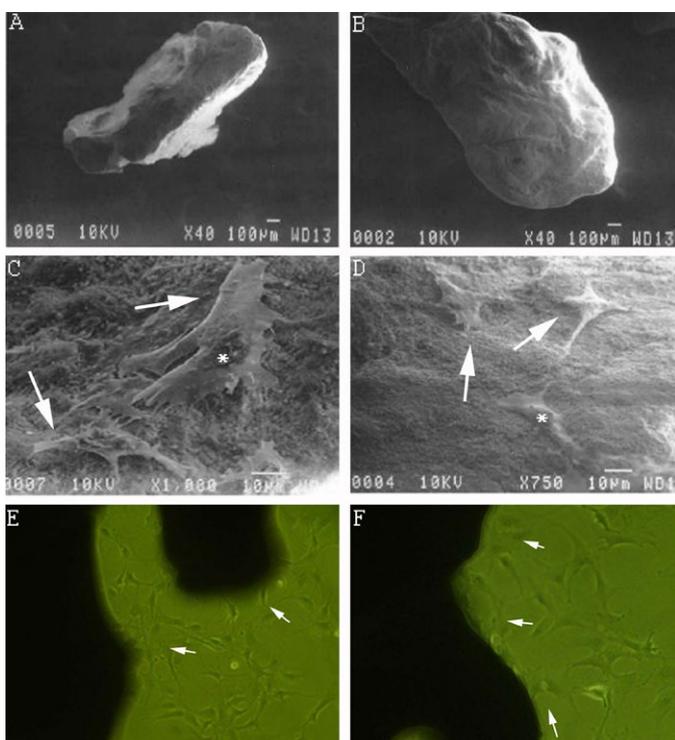


Figura 1 - Comparação entre a morfologia celular e o padrão de crescimento de MC3T3-E1 cultivados com Bio-Oss® e GenOx®. A-B. Micrografias eletrônicas de varredura dos grânulos dos biomateriais, A. Bio-Oss® e B. GenOx®. C-D. Micrografias eletrônicas de varredura mostrando células com formato fusiforme (seta) e núcleo arredondado (asterisco) em ambas as amostras. C- Bio-Oss® e D- GenOx®. Padrão de crescimento celular das células observadas em microscopia de contraste de fase mostrando as células em agrupadas nas adjacências do biomaterial (seta) nos grupos E-Bio-Oss® e F-GenOx® iniciando a formação de uma monocamada.

REFERÊNCIAS

01. Mardas N, Chadha V, Donos N. Alveolar ridge preservation with guided bone regeneration and a synthetic bone substitute or a bovine-derived xenograft: a randomized, controlled clinical trial. *Clin Oral Implants Res.* 2010; 21(7): 688-698.
02. Rickert D, Slater JJ, Meijer HJ, Vissink A, Raghoobar GM. Maxillary sinus lift with solely autogenous bone compared to a combination of autogenous bone and growth factors or (solely) bone substitutes. A systematic review. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2012; 41(2): 160-167.
03. Juodzbals G, Wang HL. Soft and hard tissue assessment of immediate implant placement: a case series. *Clin Oral Implants Res.* 2007; 18(2): 237-243.
04. Davies JE. Mechanisms of endosseous integration. *Int J Prosthodont.* 1998; 11(5): 391-401.
05. Silva FM, Cortez AL, Moreira RW, Mazzonetto R. Complications of intraoral donor site for bone grafting prior to implant placement. *Implant Dent.* 2006; 15(4): 420-6.
06. Kubler A, Neugebauer J, Jung-Hwan O, Scheer M, Zoller JE. Growth and proliferation of human osteoblasts on different bone graft substitutes: an in vitro study. *Implant Dent.* 2004; 13(2): 171-179.
07. Accorsi-Mendonça T, Conz MB, Barros TC, Sena LA, Soares GA, Granjeiro JM. Physicochemical characterization of two deproteinized bovine xenografts. *Braz Oral Res.* 2008; 22(1): 5-10.
08. Ayobian-Markazi N, Fouroutan T, Kharazifar J. Comparison of cell viability and morphology of a human osteoblast-like cell line (SaOS-2) seeded on various bone substitute materials: an in vitro study. *Dent Res J (Isfahan).* 2012; 99(1): 86-92.
09. Tadjoedin ES, de Lange GL, Bronckers AL, Lyaruu DM, Burger EH. Deproteinized cancellous bovine bone (Bio-Oss®) as bone substitute for sinus floor elevation. A retrospective, histomorphometrical study of five cases. *J of Clinical Periodontology.* 2003; 30(3): 261-270.
10. Galindo-Moreno P, Moreno-Riestra I, Avila G, Fernandez-Barbero JE, Mesa F, Aguilar M, Wang HL, O'Valle, F. Histomorphometric comparison of maxillary pristine bone and composite bone graft biopsies obtained after sinus augmentation. *Clin Oral Implants Res.* 2010; 21(1): 122-128.
11. Bernabe PF, Melo LG, Cintra LT, Gomes-Filho JE, Dezan E, Jr. Nagata MJ. Bone healing in critical-size defects treated with either bone graft, membrane, or a combination of both materials: a histological and histometric study in rat tibiae. *Clin Oral Implants Res.* 2012; 23(3): 384-388.
12. Serra e Silva, FM, Albergaria-Barbosa R, Mazzonetto R. Clinical evaluation of association of bovine organic osseous matrix and bovine bone morphogenetic protein versus autogenous bone graft in sinus floor augmentation. *J Oral Maxillofac Surg.* 2006; 64(6): 931-935.
13. Mladenovic Z, Sahlin-Platt A, Andersson B, Johansson A, Bjorn E, Ransjo M. In vitro study of the biological interface of Bio-Oss: implications of the experimental setup. *Clin Oral Implants Res.* 2013; 24(3): 329-335.
14. Turhani D, Cvinkl B, Watzinger E, Weissenbock M, Yerit K, Thurnher D, Lauer G, Ewers R. In vitro growth and differentiation of osteoblast-like cells on hydroxyapatite ceramic granule calcified from red algae. *J Oral Maxillofac Surg.* 2005; 63(6):793-799.
15. Wiedmann-Al_Ahmad M, Gutwald R, Gellrich NC, Hubner U, Schmelzeisen R. Search for ideal biomaterials to cultivate human osteoblast-like cells for reconstruction surgery. *J Mater Sci Mater Med.* 2005,16(1): 57-66.
16. Herten M, Rothamel D, Schwartz F, Friesen K, Koegler G, Becker J. Surface- and non-surface-dependent in vitro effects of bone substitutes on cell viability. *Clin Oral Investig.* 2009;13(2): 149-155.

ABSTRACT

Objective: The present study aimed to evaluate the growth pattern, cell proliferation index and morphology of human pre-osteoblasts cultured with Bio-Oss® and GenOx®. **Material and Methods:** MC3T3-E1 human pre-osteoblasts were cultured in contact with biomaterials for 1, 24 and 72 hours for the cell proliferation assay with the colorimetric test MTS. For the growth pattern and cell morphology analysis, the cells were cultured for 24 and 72 hours, respectively, and evaluated under phase contrast microscopy and scanning electron microscopy. To verify differences in cell growth among the groups, the one-way ANOVA test was used ($p < 0.05$). **Results:** In the first hour of cell culture the cell proliferation was pronounced in samples in contact with the biomaterials. At 24 and 72 hours of cell culture,

no significant differences between the groups was observed in respect of cell proliferation. In phase contrast microscopy it was noted that the cells grew in proximity to the biomaterials, initiating the formation of a monolayer. When analyzed in the scanning electron microscopy, the cells cultured on the biomaterials presented a fusiform morphology and a round nucleus. **Conclusion:** Despite the physico-chemical differences between Bio-Oss® and GenOx®, these two biomaterials presented a similar growth index and cell morphology analysis, showing that both biomaterials are biocompatible and represent a good choice as bone substitutes.

Keywords: Bone Transplantation; Cell Culture Techniques; Cell Proliferation.

AUTOR PARA CORRESPONDÊNCIA

Prof. Dr. Fernanda Paula Yamamoto Silva
 Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás,
 Campus Colemar Natal e Silva, Av. Universitária Esquina
 com 1ª Avenida s/nº, Setor Leste Universitário, CEP: 74605-
 220. Goiânia - Goiás - Brasil.
 E-mail: fernanda.paula.yamamoto@gmail.com