

IGOR DANIEL GARCIA REIS

“ASSOCIAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO DA POLPA DENTÁRIA A ENXERTOS
ÓSSEOS DESMINERALIZADOS PARA A OTIMIZAÇÃO DE REPAROS ÓSSEOS”

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
Janeiro de 2018

IGOR DANIEL GARCIA REIS

“ASSOCIAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO DA POLPA DENTÁRIA A ENXERTOS
ÓSSEOS DESMINERALIZADOS PARA A OTIMIZAÇÃO DE REPAROS ÓSSEOS”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular

Área de concentração: Biologia Celular

Orientadora: Dr^a. Gerluza Aparecida Borges Silva

Co-orientadora: Dr^a. Erika Cristina Jorge

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais

Janeiro de 2018

Dedico esse trabalho à minha família, que sempre me apoiou e esteve presente nos momentos de necessidade.

Agradecimentos

Agradeço à minha família que sempre acreditou em meu potencial e sempre me manteve de pé, mesmo nos momentos mais escuros dessa caminhada. Foram, ao total, 7 anos desde o início da minha formação acadêmica, até essa etapa que aqui se conclui. Muitas vezes, esse apoio foi confiado sem muito entendimento e também sem que eu pudesse retribuir, devido à minha ausência. Serei eternamente grato por todas as oportunidades providas pelos meus pais, que me permitiram crescer pessoalmente e profissionalmente.

As minhas orientadoras Gerluza Silva e Erika Jorge, por toda a paciência, a preocupação e o empenho em me tornar um aluno qualificado para o meio científico.

Aos meus colegas de laboratório que fizeram toda essa caminhada mais prazerosa, tornando cada desafio um pequeno obstáculo, superado com um sorriso. Em especial, agradeço à Íria, por me acolher desde os primeiros momentos e se manter sempre presente. A Júlia, Priscila e Rayan, por todo o companheirismo, piadas, desabafos e ensinamentos. Aos membros do Laboratório de Biologia Oral e do Desenvolvimento, que tornam um ambiente ao mesmo tempo sério, descontraído. Portanto, obrigado Aline, Alinne, Amanda, Carolina, Ricardo e Luiza.

Agradeço ao nosso técnico Francisco Assis. Este trabalho não seria possível sem toda a ajuda durante os experimentos e sua boa vontade.

Agradeço ao Dr. Fernando por todos os ensinamentos compartilhados e por todas as oportunidades de crescimento acadêmico e científico que transcenderam o ambiente laboratorial. Também ao Juliano, por toda a ajuda para o desenvolvimento deste trabalho, incansáveis discussões e planejamentos.

Agradeço a todos os meus professores, do ensino fundamental, médio e de graduação que desenvolveram minhas competências críticas que foram fundamentais durante minha formação. Em especial, agradeço a Professora Tatiana, minha professora de Ciências no Colégio Maximus, que foi extremamente paciente em direcionar toda a curiosidade e energia de seus alunos e que contribuiu em grande parte pelo meu interesse na área científica. Gostaria de agradecer, também, às professoras Tânia (História) e Joyce (Geografia) as quais devo toda a minha capacidade de senso crítico. Após todos esses

anos percebo que a base sólida que me foi passada, com toda ética e dedicação, foram fundamentais para a minha estrutura acadêmica e científica.

Agradeço, finalmente, aos órgãos de fomento (em especial ao CNPq) que tornaram possível a realização desse trabalho, mesmo em tempos de conflitos políticos e econômicos.

Resumo

A utilização de xenoenxertos derivados de osso bovino tem se configurado como uma alternativa aos autoenxertos na substituição de perdas óssea. Entretanto, sua propriedade de osteoindução e potencial osteogênico ainda são limitados. Por essa razão, algumas estratégias como a desmineralização de fragmentos ósseos, bem como a utilização de células tronco mesenquimais tem sido proposta para a otimização do reparo ósseo. Nesse contexto, este estudo avaliou os efeitos da associação de uma matriz óssea de origem bovina, marca comercial- Criteria[®], desmineralizada em EDTA 10%, às CTPD's (modificadas para eGFP - *enhancedgreenfluorescentprotein*) no reparo de um defeito ósseo intrabucal em ratos. Os defeitos foram preenchidos por: 1. Matriz óssea desmineralizada (MOD); 2. CTPD's em suspensão; 3. CTPD+MOD; 4. Coágulo sanguíneo (controle). Os animais foram sacrificados após 7, 14 e 49 dias para avaliações histomorfométricas e imunohistoquímica para GFP (visando o monitoramento das células tronco transplantadas); e após 3 e 7 dias para análise de expressão de genes indicativos de diferenciação osteoblástica (Runx2, Osx e iBSP) por RT-PCRq. Aos 7 dias, o fechamento epitelial foi incompleto em todos os grupos. A morfometria demonstrou que a deposição óssea na área do defeito cirúrgico foi maior no grupo que recebeu a associação proposta, seguido pela enxertia com as CTPD's isoladas. Este resultado está em concordância com a análise molecular, que demonstrou a expressão do marcador de diferenciação osteoblástica iBSP, 64 vezes maior no mesmo período. Esse padrão de deposição óssea na análise morfométrica se manteve nos períodos de 14 e 49 dias, evidenciando a associação benéfica entre CTPD+MOD para terapias de regeneração tecidual óssea. O nível de maturação da matriz foi avaliado por coloração de PicroSirius Red e revelou a maior maturação no grupo CTPD+MOD. Resumidamente, os resultados demonstraram otimização do processo de regeneração óssea com a associação CTPD+MOD em todos os períodos.

O estudo traz esclarecimentos sobre o xenoenxerto de fabricação nacional e apresenta uma proposta de otimização para o seu uso no desenvolvimento de terapias de regeneração tecidual.

Palavras chave: Xenoenxertos – Células tronco mesenquimais – Osteogênese – Osteoindução – Defeito ósseo intrabucal

Abstract

The use of xenografts derived from bovine bone has been configured as an alternative to autografts in the replacement of bone loss. However, its property of osteoinduction and osteogenic potential are still limited. For this reason, some strategies such as demineralization of bone fragments as well as the use of mesenchymal stem cells have been proposed for the optimization of bone repair. In this context, this study evaluated the effects of the association of a bone matrix of bovine origin, commercial brand - Criteria ®, demineralized in EDTA 10%, to the CTPDs (modified for eGFP - enhanced green fluorescent protein) in the repair of an intrabuccal bone defect in rats. The defects were filled by: 1. Demineralized bone matrix (MOD); 2. TDPs in suspension; 3. CTPD + MOD; 4. Blood clot (control). The animals were sacrificed after 7, 14 and 49 days for histomorphometric and immunohistochemical evaluations for GFP (aiming at the monitoring of transplanted stem cells); and after 3 and 7 days for expression analysis of genes indicative of osteoblastic differentiation (Runx2, Osx and iBSP) by RT-PCRq. At 7 days, epithelial closure was incomplete in all groups. Morphometry demonstrated that bone deposition in the area of the surgical defect was higher in the group that received the proposed association, followed by grafting with the isolated TCDC's. This result is in agreement with the molecular analysis, which demonstrated the expression of the osteoblast differentiation marker iBSP, 64 times higher in the same period. This pattern of bone deposition in the morphometric analysis was maintained in the periods of 14 and 49 days, evidencing the beneficial association between CTPD + MOD for tissue regeneration therapies. The maturation level of the matrix was evaluated by staining of PicroSirius Red and revealed the highest maturation in the CTPD + MOD group. Briefly, the results demonstrated optimization of the bone regeneration process with the association CTPD + MOD in all periods.

The study brings clarifications about the xenograft of national manufacture and presents an optimization proposal for its use in the development of tissue regeneration therapies.

Keywords: Xenografts - Mesenchymal stem cells - Osteogenesis - Osteoinduction - Intraoral bone defect

Lista de siglas e abreviaturas

‰: Porcentagem

°C: Graus celsius

µm: Micrômetro

mm: Milímetro

cm: Centímetros

BMP's: *Bone Morphogenetic Proteins*

BSP: *Bone sialoprotein*

SFB: Soro fetal bovino

CEBIO: Centro de Bioterismo

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

CN: Controle Negativo

DAB: Diaminobenzidina

DNA: *Deoxyribonucleic acid*

EDTA: *Ethylenediaminetetraacetic acid*

FDA: *Food and Drug Administration*

eGFP: *Enhanced green fluorescent protein*

H&E: Hematoxilina e Eosina

ICB: Instituto de Ciências Biológicas

MOD: Matriz óssea desmineralizada

Osx: Osterix

PBS: *Phosphate-buffered saline*

RNA: *Ribonucleic acid*

RNAm: RNA mensageiro

RT-PCR: *Reverse transcriptase Polymerase chain reaction*

Runx2: *Runt-related transcription factor 2*

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

FIGURA 1: SINALIZAÇÃO DA VIA BMP E RUNX2 NA DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS MESENQUIMAIS EM OSTEÓBLASTOS E CONDROBLASTOS.....	5
FIGURA 2: CARACTERIZAÇÃO DAS CTPDS POR CITOMETRIA DE FLUXO E RT-PCR.....	16
FIGURA 3: PREPARAÇÃO DA MATRIZ ÓSSEA BOVINA PARA OS PROCEDIMENTOS DE ENXERTIA.....	18
FIGURA 4: ESTUDO PRÉVIO À CRIAÇÃO DOS DEFEITOS ÓSSEOS <i>IN VIVO</i>	19
FIGURA 5: CRIAÇÃO DO DEFEITO ÓSSEO <i>IN VIVO</i> UTILIZANDO A MESA CIRÚRGICA PARA ANIMAIS DE PEQUENO PORTE.....	20
FIGURA 6: MÉTODO DE ANÁLISE MACROSCÓPICA DO SÍTIO CIRÚRGICO.....	22
FIGURA 7: PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA A INCLUSÃO EM PARAFINA HISTOLÓGICA.....	23
FIGURA 8: PERFIL HISTOLÓGICO DO DEFEITO E DELINEAMENTO DA ÁREA DE LEITURA MORFOMÉTRICA.....	25
FIGURA 9: ANÁLISE MORFOMÉTRICA DOS DEFEITOS CORADOS COM TRICRÔMICO DE MASSOM.....	26
FIGURA 10: ANÁLISE QUALITATIVA DO TECIDO ÓSSEO NEOFORMADO - COLORAÇÃO DE PICROSÍRIUS-RED.....	27
FIGURA 11: DETECÇÃO DO TRANSGENE eGFP EM CÉLULAS DOS RATOS LEWIS DOADORES DAS CÉLULAS TRONCO DA POLPA DENTÁRIA POR PCR.....	30
FIGURA 12: ASPECTO MORFOLÓGICO DAS CÉLULAS TRONCO ISOLADAS DA POLPA DENTÁRIA DOS INCISIVOS DE RATOS.....	31
FIGURA 13: IMUNOMARCAÇÃO FLUORESCENTE PARA A PROTEÍNA eGFP EM CÉLULAS TRONCO ISOLADAS DA POLPA DENTÁRIA DE RATOS LEWIS TRANSGÊNICOS.....	32
FIGURA 14: DEPOSIÇÃO DE MATRIZ MINERALIZADA EM CULTURAS DE CTPDS CULTIVADAS COM MEIO QUÍMICO DE DIFERENCIAÇÃO OSTEÓBLÁSTICA.....	33
FIGURA 15: COLORAÇÃO DE VERMELHO DE ALIZARINA SOBRE A MATRIZ MINERALIZADA PRODUZIDA PELAS CTPDS E OSTEÓBLASTOS IMORTALIZADOS.....	34
FIGURA 16: AVALIAÇÃO CLÍNICA DO SÍTIO CIRÚRGICO.....	35
FIGURA 17: ÍNDICE DE EPITELIZAÇÃO SOBRE O SÍTIO CIRÚRGICO.....	35
FIGURA 18: NÍVEL DE DEPOSIÇÃO ÓSSEA AOS 7 DIAS.....	37
FIGURA 19: NÍVEL DE DEPOSIÇÃO ÓSSEA AOS 14 DIAS.....	38
FIGURA 20: NÍVEL DE DEPOSIÇÃO ÓSSEA AOS 49 DIAS.....	39

FIGURA 21: QUANTIFICAÇÃO DE DEPOSIÇÃO ÓSSEA AOS 7, 14 E 49 DIAS.	40
FIGURA 22: ASPECTO DE MATURAÇÃO DA MATRIZ COLÁGENA NOS GRUPOS CO E MOD AOS 7, 14 E 49 DIAS.....	41
FIGURA 23: ASPECTO DE MATURAÇÃO DA MATRIZ COLÁGENA NOS GRUPOS CTPD E CTPD+MOD AOS 7, 14 E 49 DIAS	42
FIGURA 24: MORFOMETRIA DA DEPOSIÇÃO DE MATRIZ COLÁGENA MADURA NOS PERÍODOS DE 7, 14 E 49 DIAS.....	42
FIGURA 25: QUANTIFICAÇÃO DE MATRIZ ÓSSEA MADURA NO PERÍODO DE 49 DIAS.	43
FIGURA 26: ASPECTO HISTOLÓGICO DA EPITELIZAÇÃO SOBRE A ÁREA CIRÚRGICA AOS 7, 14 E 49 DIAS.....	45
FIGURA 27: ASPECTO MORFOLÓGICO TEMPORAL DA DEPOSIÇÃO ÓSSEA NO INTERIOR DO DEFEITO CIRÚRGICO NOS GRUPOS CO E MOD.....	46
FIGURA 28: ASPECTO MORFOLÓGICO TEMPORAL DA DEPOSIÇÃO ÓSSEA NO INTERIOR DO DEFEITO CIRÚRGICO NOS GRUPOS CTPD E CTPD+MOD.....	47
FIGURA 29: ANGIOGÊNESE NO INTERIOR DOS DEFEITOS ÓSSEOS DURANTE O PROCESSO DE REPARO.	48
FIGURA 30: CÉLULAS COM MORFOLOGIA SUGESTIVA DE OSTEOCLASTOS NAS PAREDES REMANESCENTES DO DEFEITO ÓSSEO	49
FIGURA 31: OSTEOBLASTOS ATIVOS NO INTERIOR DOS DEFEITOS ÓSSEOS.....	50
FIGURA 32: ASPECTO HISTOLÓGICO DA MATRIZ ÓSSEA ENXERTADA AOS 7 DIAS.....	51
FIGURA 33: ASPECTO HISTOLÓGICO DA MATRIZ ÓSSEA ENXERTADA AOS 14 DIAS.	53
FIGURA 34: LOCALIZAÇÃO DAS CÉLULAS eGFP ⁺ ENXERTADAS NO PERÍODO DE 7 DIAS. ..	54
FIGURA 35: LOCALIZAÇÃO DAS CÉLULAS eGFP ⁺ ENXERTADAS NO PERÍODO DE 14 DIAS. 55	
FIGURA 36: ESPECIFICIDADE DE ANELAMENTO DOS PRIMERS DESENHADOS PARA AS REAÇÕES DE qPCR.	56
FIGURA 37: QUANTIFICAÇÃO DE MRNA DE GENES DE MATURAÇÃO OSTEOBLÁSTICA EXPRESSOS NA ÁREA DO DEFEITO ÓSSEO.	57

SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
2. Objetivo Geral.....	12
2.1. Objetivos específicos	12
3. Metodologia	13
3.1. Animais	13
3.2. Certificação do genótipo dos animais doadores de células tronco	14
3.3. Obtenção, caracterização e cultivo das células tronco da polpa dentária (CTPDs).....	15
3.3.1. Isolamento das células tronco dos dentes incisivos de ratos eGFP ⁺	15
3.4. Imunofluorescência para eGFP nas culturas de CTPD.....	16
3.5. Análise preliminar do potencial de diferenciação osteogênico da população de células tronco isolada	17
3.6. Adequação do biomaterial – obtenção da matriz óssea (desmineralizada) de osso bovino	17
3.7. Procedimentos cirúrgicos	18
3.7.1. Criação do defeito ósseo intrabucal de dimensões padronizadas	18
3.8. Procedimentos de enxertia	20
3.9. Análise da evolução do reparo ósseo e fechamento do sítio cirúrgico	21
3.9.1. Avaliação macroscópica do sítio cirúrgico	21
3.10. Análise histomorfométrica do reparo ósseo	22
3.10.1. Protocolo de inclusão e microtomia	22
3.10.2. Colorações Histológicas.....	23
3.11. Análise histomorfométrica da deposição óssea	24
3.11.1. Análise de maturação de fibras colágenas por PicroSirius <i>Red.</i>	26
3.11.2. Análises estatísticas	27
3.12. Monitoramento das CTPDs <i>in vivo</i>	27
3.13. Análise de indicadores de diferenciação osteoblástica <i>in vivo</i>	28
3.13.1. Desenho de oligonucleotídeos iniciadores (primers).....	28
3.13.2. Obtenção de RNA total.....	29
3.13.3. Preparo das reações de RT-PCRq.....	29
4. Resultados.....	30
4.1. Genotipagem dos ratos Lewis	30
4.2. Avaliações <i>in vitro</i>	30
4.2.1. Aspectos morfológicos da cultura das células tronco de polpa dentária ..	30

4.2.2.	Imunofluorescência para eGFP nas células isoladas	31
4.2.3.	Potencial osteogênico das CTPDs isoladas	32
4.3.	Avaliações <i>in vivo</i>	34
4.3.1.	Avaliação clínica (macroscópica) do sítio cirúrgico	34
4.4.	Avaliações microscópicas	36
4.4.1.	Análise histomorfométrica da deposição óssea	36
4.4.2.	Aspectos histológicos	44
4.4.3.	Monitoramento das CTPDs enxertadas por imunoperoxidase	54
4.5.	Quantificação da diferenciação osteoblástica no sitio cirúrgico - análise molecular por qPCR	55
5.	Discussão	57
6.	Conclusões	71
7.	Rêferências bibliográficas	72

1. Introdução

O tecido ósseo possui importantes funções no corpo humano, como sustentar e proteger órgãos vitais; ancorar músculos e dentes; armazenar cálcio e fosfato; auxiliar nas funções locomotoras e abrigar a medula óssea, responsável pela produção de células hematopoiéticas (FLORENCIO-SILVA et al., 2015; LOI et al., 2016). Embora o tecido ósseo apresente uma capacidade intrínseca de remodelamento, de autorregeneração e reparo de pequenas lesões, o processo de regeneração óssea nem sempre permite o restabelecimento de suas funções, constituindo um grande desafio para profissionais da ortopedia e odontologia. As perdas ósseas podem estar relacionadas a diversas etiologias, como a retirada de tumores; processos inflamatórios como a osteomielite e artrite (CROTTI et al., 2015); doenças metabólicas como a diabetes mellitus (SCHWARTZ, 2016) e a osteoporose (FISHER; PERETTI; SCOTTI, 2016; SCHWARTZ, 2016). As perdas ósseas são também consequentes de processos degenerativos do envelhecimento, o que é particularmente preocupante devido à estimativa do crescimento da população idosa no Brasil e no mundo (FOLEY; WHITAKER, 2012; JONASSON et al., 2013). Os riscos de fraturas, transtornos de locomoção, desvios de postura, limitação das funções do sistema estomatognático com prejuízos à fonação, mastigação e deglutição (HALLMAN et al., 2008) são exemplos de situações relacionadas à degeneração do tecido ósseo. No âmbito odontológico, a perda do volume ósseo maxilo-mandibular compromete a sustentação dos dentes. Em muitos casos, a falta de tecido ósseo dificulta a instalação de implantes ou próteses, inviabilizando o restabelecimento das funções mastigatórias (PILIPCHUK et al., 2015). Neste contexto, inúmeras estratégias fundamentadas pelas pesquisas nas áreas da bioengenharia tecidual e terapia celular, têm sido propostas para a substituição do tecido ósseo perdido ou para a melhoria nos processos de regeneração óssea (AMINI; et al., 2012; ABOU NEEL et al., 2014; ORYAN et al., 2014; FISHER et al., 2016).

O mecanismo de reparo ósseo, assim como o seu desenvolvimento e remodelagem, é dependente de diversos mecanismos que alteram o equilíbrio entre a ação dos principais componentes celulares dos ossos: osteoblastos e osteoclastos. Essas células são responsáveis pela deposição e mineralização da matriz óssea; e de sua reabsorção, respectivamente, em processos de reparo e remodelagem. A atividade das células osteogênitoras é regida, principalmente, pelo fator de transcrição relacionado a Runt 2 (Runx2). Durante o desenvolvimento embrionário esse fator é expresso por células

progenitoras adjacentes ao tecido esquelético, que podem se diferenciar em osteoblastos ou condroblastos (LIU; LEE, 2013). Esse mecanismo também é observado quando existem estímulos para o reparo do tecido. O comprometimento com a linhagem óssea mantém um nível basal de expressão de Runx2 pelas células progenitoras, enquanto a diferenciação em condroblastos é acompanhada com uma inibição desse fator de transcrição (FAKHRY et al., 2013).

Embora seja crucial para o início do desenvolvimento ósseo, a expressão de Runx2 é transitória, sendo necessária sua supressão nos estágios celulares tardios para a maturação do tecido ósseo formado (LIU; LEE, 2013). Estudos *in vivo* demonstraram que a super expressão de Runx2 em camundongos transgênicos resultou em um quadro de osteopenia e acúmulo de osteoclastos ao nascimento. Embora o aumento de Runx2 não contribua para o osteoclastogênese, sua elevação prolongada impede a maturação de osteoblastos, alterando o equilíbrio de neoformação óssea e de reabsorção que mantém a integridade do tecido (DIRCKX et al., 2013). Por outro lado, a deficiência de Runx2 é responsável pelo desenvolvimento ineficaz do sistema esquelético (KOMORI, 2010). Níveis reduzidos desse fator de transcrição, ou alterações em sua estrutura resultam em uma síndrome conhecida com Displasia Cleidocraniana, marcada pelo desenvolvimento incompleto dos ossos claviculares, baixa estatura, e alterações na dentição, que incluem agenesias e retardo na erupção da dentição permanente (JAVED et al., 2008; JARUGA et al., 2016).

Diversos estudos demonstram o papel crucial do Runx2 na diferenciação de osteoblastos, na produção de matriz orgânica (osteóide) e em sua mineralização (LIU et al., 1996; LIU; LEE, 2013; WU et al., 2016). Esse fenômeno ocorre através da sua ligação do Runx2 ao sítio de ação específico nos osteoblastos, denominado "*osteoblast-specific cis-acting element 2*" (OSE2), responsável pela fase de condensação das células mesenquimais no esqueleto em formação (DUCY et al., 1997). Além disso, sua ativação desencadeia a expressão de genes relacionados a maturação osteoblástica, como a osteocalcina, osteopontina, a sialoproteína óssea (BSP) e colágeno tipo I, que se relacionam com proteínas sintetizadas nos estágios finais de maturação dessas células (FAKHRY et al., 2013).

Durante a formação do tecido ósseo, células mesenquimais são recrutadas e estimuladas por dois fatores de transcrição, Runx2 e Sox9, tornando-se células osteocondro progenitoras. O estímulo subsequente por novos fatores de transcrição determinará a

linhagem, óssea ou cartilaginosa, dessas células nos processos de ossificação por aporte de células ou pelo mecanismo endocondral (LIU; LEE, 2013). O predomínio de Runx2 nesse período é responsável pela ativação de fatores de transcrição como o Osterix (Osx), através da ligação direta de Runx2 ao gene Osx, o que é fundamental para a osteoblastogênese. Uma vez ativado, Osx é capaz de formar complexos que ativam a região promotora do gene responsável pela síntese de colágeno tipo I em osteoblastos, contribuindo, assim, para a sua maturação e síntese de proteínas de matriz (FAKHRY et al., 2013). A inibição desse fator em camundongos demonstrou-se letal para os fetos, que ao nascimento não apresentavam ossos formados, além da ausência de marcadores iniciais e tardios de desenvolvimento osteoblástico (NAKASHIMA et al., 2002; WU et al., 2016).

Devido à grande importância de Runx2 para a osteogênese, o seu estímulo tem sido proposto para terapias que visam a regeneração óssea. Para isso, diversos estudos utilizam as proteínas morfogenéticas ósseas (*Bone morphogenetic proteins* – BMPs) (Yang et al. 2013; Wu et al. 2016; Issa et al. 2016), que possuem uma relação regulatória sobre o Runx2. Essa família de proteínas ósseas é capaz de se ligar a receptores na superfície de células progenitoras, promovendo a formação de complexos de proteínas Smad, que são translocados ao núcleo celular, induzindo ou inibindo genes osteogênicos através da sua ligação com regiões promotoras ou silenciadoras (JAVED et al., 2008; LONG et al., 2013; ROTHRAUFF et al., 2014). O processo de ossificação endocondral, por exemplo, é estimulado pela classe 5 dessa família de proteínas (BMP 5), que induz a condensação de células mesenquimais para seu desenvolvimento em condrócitos sintetizadores de cartilagem que, posteriormente será substituída por tecido mineralizado (LONG; ORNITZ, 2013). Por outro lado, as BMP 2 são responsáveis pela regulação positiva de Runx2 para a osteogênese. Quando as BMP 2 se ligam aos seus receptores nas células progenitoras, ocorre um estímulo a formação de complexos das proteínas Smad 1/5/8, além de Smad 4, que possui a propriedade de se ligar ao DNA, promovendo a expressão desse fator de transcrição (JAVED et al., 2008; LONG; ORNITZ, 2013). Além disso, estudos *in vitro* demonstraram que a BMP 2 é capaz de ativar a expressão de Osx, independente da ativação de Runx2, contribuindo para o processo de maturação de osteoblastos (LIU, LEE 2013). Figura 1.

Uma vez estimuladas pelo Runx2, as células mesenquimais ou osteocondro precursoras, na ausência de Sox9, iniciam o caminho de diferenciação osteoblástica, dando origem as

células osteoprogenitoras. O estímulo de Runx2 pode ocorrer pela ligação de BMP 2 aos seus receptores de membrana, que induzem a formação de complexos de subunidades da proteína Smad, que são transportados ao núcleo celular para a regulação de expressão gênica (WU et al., 2016). Nessa etapa, a presença de Runx2 estimula a expressão de *Osx*, que desencadeia o início da ativação de genes relacionados à síntese de proteínas ósseas como o colágeno do tipo I, a enzima fosfatase alcalina e o hormônio osteocalcina, que serão devidamente sintetizados, ainda em níveis baixos, no estágio de osteoblasto imaturo (FAKHRY et al., 2013). Após a supressão do estímulo de Runx2 sobre essas células, os osteoblastos maduros dão início a expressão do gene responsável pela síntese da sialo proteína óssea (BSP), uma proteína não colagenosa, considerada um marcador específico para esse estágio final de maturação (HOLM et al., 2015). Figura 1.

As BSPs são responsáveis pela mineralização do tecido, por estimularem a nucleação dos íons cálcio e fosfato, promovendo a formação dos cristais de hidroxiapatita sobre a matriz orgânica recém sintetizada (BAHT; HUNTER; GOLDBERG, 2008). Além disso, esta proteína é crucial no processo de desenvolvimento e reparo, por estimular a maturação de condrócitos e osteoclastos, o que é fundamental para o processo de ossificação endocondral (HOLM et al., 2015).

Ao final da deposição e mineralização da matriz extracelular, os osteoblastos podem sofrer apoptose, ou uma nova diferenciação, tornando-se osteócitos e “*bone lining cells*”. Enquanto as *bone lining cells* apresentam um metabolismo reduzido, limitando-se às porções superficiais dos ossos, os osteócitos, que se encontram restritos às lacunas dentro a matriz rígida são responsáveis pela integridade do tecido maduro (FLORENCIO-SILVA et al., 2015). Ambos os tipos celulares, após o fim da maturação osteoblástica, deixam de expressar os principais marcadores de deposição de matriz extracelular, como o colágeno tipo 1, a fosfatase alcalina e a BSP, embora os osteócitos ainda secretem níveis menores de osteocalcina (PELEGRINE et al. 2014, WU et al. 2016; SHAHI et al. 2017).

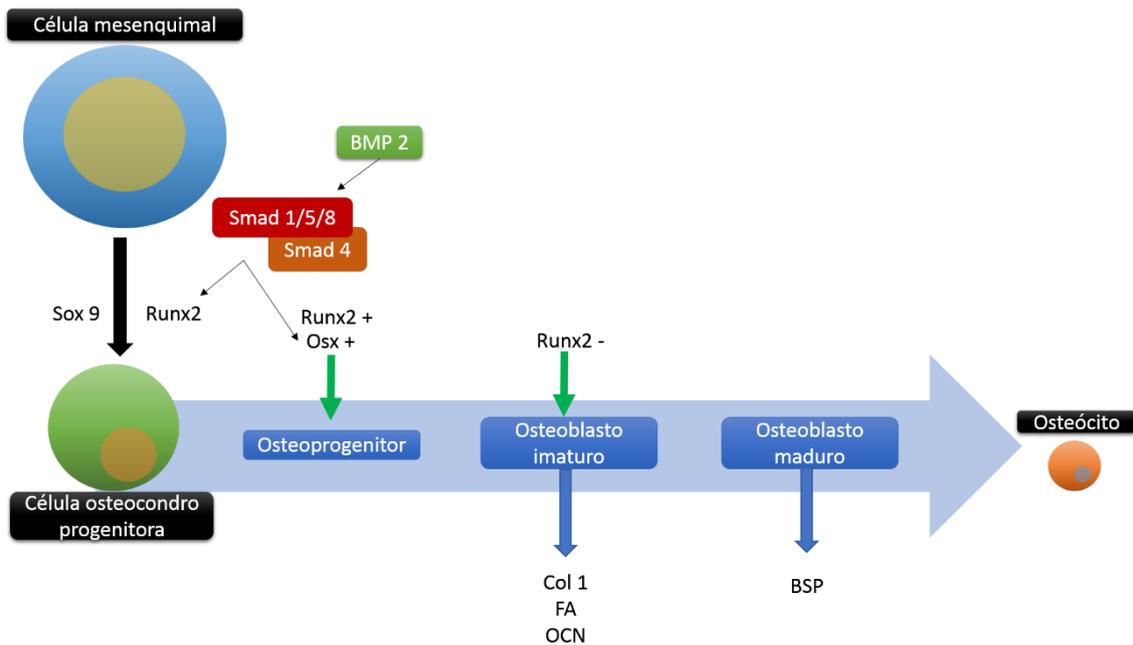


Figura 1: Sinalização da via BMP e Runx2 na diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos e condroblastos. Células mesenquimais indiferenciadas são induzidas à diferenciação osteoblástica pela ação do fator de transcrição Runx2, originando as células osteocondro progenitoras. A permanência do estímulo de Runx2 desencadeia a expressão de Osx, que inicia a expressão de genes relacionados a osteogênese, tornando as células osteoprogenitoras. Tem início, então, a expressão dos genes de colágeno do tipo 1, fosfatase alcalina e osteocalcina, nos então osteoblastos imaturos, que serão sintetizados em níveis apropriados no estágio final de maturação osteoblástica. A sialoproteína óssea (BSP) é considerada um marcador específico de osteoblastos maduros. Após o final da síntese de matriz extracelular e sua mineralização, os osteoblastos restritos às lacunas no interior dos ossos têm seu metabolismo reduzido, tornando-se osteócitos. A ligação de proteínas morfogenéticas 2 aos seus receptores celulares pode estimular a produção do fator de transcrição Runx2, através da formação de complexos de proteínas Smad que são translocados ao núcleo celular, aderidos a sítios específicos do DNA que são responsáveis pela expressão desse fator. Além disso, o complexo formado pelas proteínas Smad é capaz de promover a ativação direta de Osx, sem que ocorra a ativação de Runx2.

Apesar da fisiologia do reparo ósseo ser amplamente estudada, sua manipulação ainda representa um desafio para a medicina reparativa. A utilização de proteínas recombinantes capazes de estimular as células do organismo para a reposição do tecido perdido tem sido proposta, embora apresente custos elevados (FRANCIS et al., 2013). Dessa forma, a utilização de enxertias ainda é o tratamento clínico mais preconizado para as perdas ósseas (LOI et al., 2016).

As enxertias de substituição óssea constituem uma das principais bases terapêuticas para as perdas ósseas. Entretanto, os biomateriais destinados às enxertias devem possuir algumas propriedades recomendadas, como potencial de osteointegração, ou seja, de integração ao tecido ósseo remanescente no sítio de inserção e devem apresentar boa osteocondutividade e propriedade osteoindutora. A osteocondução é a capacidade do biomaterial de promover a adesão e migração celular em sua superfície, bem como no

interior de sua estrutura, viabilizando o aporte de células osteoprogenitoras e o desenvolvimento de vasos sanguíneos. A osteoindução consiste na capacidade dos enxertos de induzirem a proliferação e diferenciação de células dos tecidos adjacentes em células ósseas (HENKEL et al., 2013). Esta osteoindução pode ser uma propriedade intrínseca do biomaterial, ou pode ser viabilizada pela associação de biomateriais a fatores osteoindutores como exemplo, as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), os fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs) e fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGFs) (ALBREKTSSON et al., 2001; NANDI et al., 2010; DIMITRIOU et al., 2011).

Dentre os biomateriais de enxertia óssea, os fragmentos de osso humano (autógeno ou alógeno) e de osso bovino (enxertos xenógenos) têm sido especialmente avaliados, pois constituem biomateriais com características favoráveis à dinâmica de reparo tecidual (ORYAN et al., 2014).

Os transplantes ou enxertos ósseos são amplamente realizados em procedimentos cirúrgicos. O tecido ósseo é o segundo tecido mais transplantado após o sangue (NANDI et al., 2010; ORYAN et al., 2014). Os transplantes autólogos utilizam fragmentos retirados do próprio paciente e são reconhecidos como o “padrão ouro” das enxertias, devido aos baixos riscos de rejeição e transmissão de doenças infecciosas. Além disso, apresentam potencial osteogênico, osteocondutor e osteoindutor, uma vez que são portadores de células e fatores indutores presentes no osso de origem (ATHANASIOU et al., 2010; ORYAN et al., 2014). Porém, clinicamente possuem algumas limitações, como a demanda de um segundo sítio cirúrgico na área doadora e conseqüentemente maior risco de infecções, dor e morbidade para o paciente. Além disso, há relatos da possibilidade de reabsorção dos enxertos autógenos e ainda, pelo limite na quantidade de material retirado do próprio paciente, a técnica torna-se viável e indicada para pequenos defeitos ósseos (RAI et al., 2015). O custo elevado dos autoenxertos também é um aspecto que inviabiliza sua utilização em amplo alcance para a população (MISCH, 2010). Desta forma, os aloenxertos e xenoenxertos são apontados como alternativas interessantes que merecem investimentos científicos visando a substituição dos transplantes autógenos (ORYAN et al., 2014; RAI et al., 2015).

Os enxertos alógenos utilizam fragmentos provenientes de doadores da mesma espécie por meio de bancos de ossos. Embora exista uma maior disponibilidade de material e menor morbidade para o paciente, os riscos de transmissão de doenças infecciosas e a maior antigenicidade representam desvantagens em relação aos transplantes autógenos

(ZIMMERMANN et al., 2011). Outra desvantagem consiste na redução de sua propriedade osteogênica em decorrência do processamento preliminar do tecido, necessário à sua descelularização. Fragmentos de osso alógeno a serem transplantados para seres humanos precisam ser descelularizados para reduzir os índices de rejeição pelo sistema imune (ATHANASIOU et al., 2010; RAI et al., 2015). Tendo em vista as limitações de uso de osso humano para a reposição óssea, os enxertos xenógenos têm sido apontados como a mais adequada alternativa para a substituição óssea, ao lado de inúmeros biomateriais sintéticos. A maior vantagem dos enxertos xenógenos é a ampla disponibilidade, já que são provenientes de espécies animais. As fontes de obtenção destes materiais incluem os ossos de animais de corte como suínos e bovinos, além de corais. Os xenoenxertos podem ser utilizados para a regeneração de defeitos ósseos extensos, sem danos maiores ao paciente (ORYAN et al., 2014; RAI et al., 2015). Entretanto, tal como os aloenxertos, os xenoenxertos requerem processamentos adicionais para a redução da antigenicidade e para reduzir os riscos de transmissão de zoonoses, que culminariam no insucesso cirúrgico.

Estudos *in vitro* (PIETRZAK et al., 2012; PRAMANIK et al., 2015) e em modelos animais (PELEGRINE et al., 2014; NING et al., 2015; ISSA et al., 2016) têm demonstrado o potencial dos enxertos de origem bovina para o reparo ósseo. A maioria destes estudos utiliza fragmentos de osso bovino em sua versão mineralizada e trabeculada, cujo aspecto morfológico e propriedade osteocondutora é bastante similar ao tecido alvo, o osso a ser substituído (RAI et al., 2015). Mais recentemente, matrizes ósseas desmineralizadas têm sido também consideradas como biomateriais promissores para enxertias ósseas, como revelado em estudos *in vitro* e *in vivo* (MAUNEY et al., 2005). Resultados obtidos por El-Chaar (2013) foram satisfatórios com o uso de aloenxertos desmineralizados. O autor demonstrou produção adequada de tecido mineralizado em defeito ósseo intrabucal pós-implante de enxerto ósseo desmineralizado em humanos. Também, Pietrzak et al (2012) relataram a viabilidade das matrizes orgânicas, *in vitro*, para o tratamento de defeitos ósseos crâniomaxilofaciais e na cavidade oral. Em ambos os estudos, o uso de matrizes desmineralizadas foi justificado pela hipótese de que a remoção dos minerais da matriz óssea permite a exposição de fatores osteoindutores, como as BMPs, que iniciam a vascularização e a osteogênese, acelerando o processo de reparo ósseo (ATHANASIOU et al., 2010; BENDERS et al., 2013; SAWKINS et al., 2013). Outra abordagem para melhorar a efetividade dos enxertos ósseos tem sido a sua

associação com células. O emprego de células das linhagens osteoblásticas ou células tronco mesenquimais (CTM) visam compensar ou melhorar o potencial osteogênico e osteoindutor dos xenoenxertos (CAVALCANTI et al., 2013; KIM et al., 2015). A presença de células viáveis nos sítios cirúrgicos, transplantadas por meio dos biomateriais podem estimular a produção local de fatores de crescimento e contribuir para a aceleração do processo de reparo ósseo (LOI et al., 2016; MAHLA, 2016; YASUI et al., 2017).

As CTM são células multipotentes, indiferenciadas com capacidade de auto renovação e de diferenciação em diferentes linhagens celulares (LEDESMA-MARTINEZ et al., 2016). Devido a sua alta taxa proliferativa, à sua viabilidade após a expansão em culturas *in vitro*, à sua capacidade imunomoduladora e plasticidade, as CTM obtidas da medula óssea são amplamente utilizadas para fins terapêuticos (ZHAO et al., 2015). Apesar do seu indiscutível potencial clínico, a coleta de células da medula demanda procedimentos cirúrgicos onerosos, implicando em uma limitação financeira para grande parte da população. Desta forma, outras fontes de CTM vêm sendo descritas, como células derivadas dos tecidos adiposo, muscular e da polpa dentária (MAO et al., 2006; FOLEY et al., 2012; CHATAKUN et al., 2014; RAI et al., 2015; ZHAO et al., 2015; LEDESMA-MARTINEZ et al., 2016).

As células tronco da polpa dentária (CTPD) são encontradas no interior da polpa dos dentes decíduos ou permanentes, sendo majoritariamente constituída de tecido conjuntivo, células mesenquimais, fibras nervosas e vasos sanguíneos e linfáticos e tem como finalidade manter a vitalidade dos dentes (LIU et al., 2015). Nesse tecido, as CTPDs são geralmente recrutadas e diferenciadas em odontoblastos para a síntese de dentina, que constitui o principal componente mineralizado do arcabouço dentário.

Estas células foram inicialmente observadas por Gronthos e colaboradores, quando isoladas de terceiros molares de humanos. Estudos conduzidos por este grupo de pesquisa demonstraram a elevada capacidade proliferativa e a capacidade de gerar nódulos e colônias calcificadas quando cultivadas *in vitro*. Além disso, as CTPDs foram capazes de se diferenciar em células de origem mesenquimal, como adipócitos, condrócitos, mioblastos, osteoblastos e odontoblastos, sendo, portanto, inicialmente descritas como um grupo de CTMs (GRONTHOS et al., 2000). Posteriormente foram obtidas CTPDs de dentes decíduos por Miura e colaboradores, em 2003, que observaram um perfil de alta taxa proliferativa das células isoladas e diferenciadas em linhagens mesenquimais (MIURA et al., 2003). A princípio, a comparação de capacidades proliferativas e

potencial de diferenciação entre essas duas subpopulações demonstrou que as células de dentes decíduos possuem maior capacidade replicativa, e de diferenciação em relação às CTPDs (MIURA et al., 2003). Entretanto, publicações recentes demonstraram que as diferenças previamente encontradas entre esses dois tipos celulares não são significativas. Akpinar e colaboradores avaliaram os perfis replicativos das CTPDs de humanos jovens; da polpa de dentes primários e de polpas adultas, encontrando um perfil morfológico, taxas de replicação, marcadores de superfície e potenciais de diferenciação semelhantes (AKPINAR et al., 2014). Desta forma, o uso de CTPDs de dentes adultos ainda é vantajoso, uma vez que elas podem ser obtidas em qualquer estágio da vida do paciente (BAKOPOULOU et al., 2016).

O isolamento das CTPDs de dentes humanos geralmente ocorre pela digestão enzimática de fragmentos da polpa dentária em soluções de colagenase I e seu cultivo subsequente em placas de cultura celular. A obtenção de CTPDs de incisivos de ratos foi recentemente descrita de maneira semelhante (BERTASSOLI et al., 2016). Quando cultivadas *in vitro*, as CTPDs apresentam morfologia fibroblastóide e, assim como as CTMs, formam colônias, que podem ser amplamente expandidas. Ao contrário de outros tipos celulares, as CTPDs foram cultivadas por até 60 passagens (repiques celulares), sem apresentar comprometimentos nas capacidades proliferativa e plástica, mesmo mantendo o contato entre células (LAINO et al., 2005; WANG et al., 2012). A identificação das CTPDs *in vitro* é realizada segundo critérios de avaliação por imunofenotipagem das células, estabelecido pelo Comitê de Células Tronco Mesenquimais da Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT), que prediz a presença de proteínas de superfície como CD90, CD73 e CD 44, enquanto as proteínas CD45, CD34 e HLA-DR são ausentes.

A elevada capacidade proliferativa *in vitro* das CTPDs e sua viabilidade após o congelamento permitem que bancos de células sejam criados a partir de dentes descartados das clínicas odontológicas, como fontes para transplantes autólogos (COLLART-DUTILLEUL et al., 2015; KUMAR et al., 2015). A criação de bancos de células para transplantes alógenos também é favorecida, devido as características imunorreguladoras das CTM e CTPDs. Essas células possuem capacidade modular a atividade de linfócitos T (PIERDOMENICO et al., 2005). Entretanto, estudos demonstraram a maior capacidade das CTPDs de supressão de sua atividade mediada pela liberação de TGF-B, reduzindo o alorreconhecimento dos transplantes e, assim,

contribuindo para menores chances de rejeição pelo organismo receptor (KWACK et al., 2017).

Diversos estudos têm ressaltado as vantagens da utilização das células tronco da polpa dentária para terapias regenerativas (PRAMANIK et al., 2015; FISHER et al., 2016; LEDESMA-MARTINEZ et al., 2016). Dentes decíduos e permanentes representam fontes menos invasivas para a coleta de CTMs para transplantes autólogos, com menor risco de rejeição e de transmissão cruzada de doenças infecciosas (FISHER et al., 2016; LEDESMA-MARTINEZ et al., 2016). Além disso, estudos comparativos demonstram que as CTPDs apresentam maior capacidade replicativa e potencial de mineralização quando comparadas à outras linhagens mesenquimais, incluindo aquelas tradicionalmente retiradas da medula óssea (AGHAJANI et al., 2016; ALRAIES et al., 2017).

As CTPDs foram inicialmente avaliadas na regeneração de componentes dentários (GALLER, 2015; KIM et al., 2015; PARK et al., 2016). Atualmente pesquisas demonstram a possibilidade de indução destas células em diferentes tecidos, incluindo o tecido ósseo. Por essa razão, pesquisadores têm investigado a cultura de CTPDs sobre diferentes tipos de *scaffolds* (matrizes tridimensionais que servem de suporte para adesão e proliferação celular) desenvolvidos para a diferenciação osteoblástica (CHATAKUN et al., 2014) e produção de matriz mineralizada para o uso em terapias regenerativas ósseas (RAVINDRAN et al., 2014; ALKHALIL et al., 2015; GALLER, 2015; PARK et al., 2016; ZHAO; CHAI, 2015).

O presente estudo propôs avaliar o reparo de um defeito ósseo intrabucal padronizado, em ratos, submetido à enxertia de uma matriz desmineralizada obtida de osso bovino, associada ou não às células tronco de origem dentária. Três diferenciais desta proposta devem ser considerados:

1. Utilizou-se um biomaterial (xenoenxerto) de origem nacional.

A maior parte dos estudos publicados de cunho similar, utiliza materiais importados para a associação às células. Embora os enxertos importados tenham grande credibilidade no mercado, possuem um custo elevado para a maioria dos profissionais de saúde no Brasil e conseqüentemente para os pacientes. Por essa razão, ossos bovinos nacionais presentes no mercado (Baumer, Lumina Bone e Bioinnovation) têm sido utilizados na clínica odontológica, como alternativa aos biomateriais importados. Entretanto, poucos subsídios científicos estão disponíveis na literatura a

respeito das propriedades biológicas desses materiais. Portanto, o presente estudo visou também trazer subsídios científicos a respeito dos biomateriais de origem nacional cujos dados publicados são muito restritos. Aqui, o biomaterial da marca nacional Critéria (Lumina Bone), foi aleatoriamente selecionado dentre outros disponibilizados no Brasil. Os enxertos comerciais Lumina Bone foram submetidos a um processo de desmineralização para a obtenção de nosso biomaterial de interesse (xenoenxerto em versão desmineralizada). Vale ressaltar que os resultados obtidos relacionados ao uso de matrizes ósseas desmineralizadas, com composição orgânica preservada, podem ser aplicáveis a outros tipos de osso xenógeno, independentemente de sua fonte comercial.

2. Utilizou-se células tronco positivas para eGFP.

Células tronco da polpa dentária foram coletadas de ratos Lewis, doadores geneticamente modificados, transgênicos para a expressão de eGFP. Deste modo, foi possível monitorar o destino pós-cirúrgico, na área do defeito ósseo, das células enxertadas em animais receptores, eGFP negativos.

3. Avaliou-se a associação dos biomateriais em um defeito ósseo intrabucal de dimensão padronizada.

Grande parte dos estudos realizados para avaliar a eficácia de biomateriais em Odontologia têm sido realizados em sítios fora da cavidade bucal, como tíbias, fêmures e calotas cranianas de ratos e coelhos (NING; et al., 2015; PRAMANIK et al., 2015; ISSA et al., 2016). Tais modelos permitem visualizar com excelência, o panorama do processo ósseo regenerativo frente aos biomateriais de enxertia óssea. Entretanto, considerando as variáveis presentes na cavidade oral, tais modelos estão livres de fatores intrabucais, como bactérias, fluxo salivar, alterações de pH e forças mastigatórias, o que limita a extrapolação direta dos resultados para clínica odontológica (KARFELD-SULZER et al., 2012; MIRANDA et al., 2012; NING et al., 2015). Uma alternativa para avaliações de reparo ósseo intrabucal em pequenos animais (ratos, camundongos, coelhos, *minipigs*) tem sido o modelo de alvéolos dentários (MIRANDA et al., 2012; SÁ et al., 2013). Entretanto, especialmente para a inserção de biomateriais de natureza sólida, as cavidades alveolares em cobaias de pequeno porte são sítios muito reduzidos. Além disso, os alvéolos dentários possuem dimensões variáveis entre os animais, mesmo de mesma espécie e podem reter

resíduos de ligamento periodontal que podem interferir nas respostas biológicas. Diante disso, o presente estudo propôs a utilização de um modelo de defeito ósseo intrabucal em ratos, criado com perfuradores ósseos (fresas odontológicas) de dimensões padronizadas, compatível com a inserção dos biomateriais de interesse. Para tanto foi utilizado um micromotor odontológico usado em implantodontia, o qual permite o controle absoluto de velocidade e irrigação do sítio cirúrgico. O modelo de defeito ósseo foi desenvolvido pela equipe do Laboratório de Biologia Oral e do Desenvolvimento (UFMG); é um defeito de dimensões padronizadas, reproduzível e de tamanho compatível com os maxilares de ratos, respeitando-se os acidentes anatômicos circunvizinhos à área operada.

O estudo trabalhou com a hipótese de que a associação de células tronco de origem dentária à matriz desmineralizada de osso bovino poderia otimizar a resposta osteogênica do organismo quando comparado aos protocolos isolados de enxertia óssea ou da terapia celular livre de scaffolds.

2. Objetivo Geral

O objetivo geral deste estudo foi avaliar, em um defeito intrabucal em ratos, o potencial da associação de uma matriz desmineralizada de osso bovino, de uso clínico, (Lumina-Bone® Critéria), às células tronco da polpa dentária, como uma proposta alternativa para otimização de enxertos ósseos.

2.1. Objetivos específicos

- 2.1.1. Avaliar a influência dos biomateriais e /ou CTPD no fechamento dos sítios cirúrgicos, pela análise macroscópica do nível de epitelização gengival, após 7, 14, e 49 dias dos procedimentos de enxertia óssea;
- 2.1.2. Avaliar o percentual de neoformação óssea após 7, 14 e 49 dias das enxertias, por análise histomorfométrica, em cortes semisseriados corados com Tricrômico de Masson.
- 2.1.3. Avaliar o nível de maturação das trabéculas ósseas neoformadas por meio da coloração de Picro-Sirius Red, analisada por microscopia de polarização.
- 2.1.4. Monitorar a migração e o destino das células tronco enxertadas ao longo dos tempos de 7, 14, e 49 dias pós-cirúrgicos, por meio da imunohistoquímica para eGFP;

2.1.5. Avaliar a influência dos biomateriais e células tronco pulpares na diferenciação osteogênica, pela análise de expressão de genes marcadores de diferenciação osteoblástica (Runx 2, Osterix e iBSP), por meio de RT-PCRq (RT-PCR quantitativo) aos 3 e 7 dias após as enxertias.

2.1.6. Avaliar aspectos do processo inflamatório, da reabsorção dos biomateriais, da vascularização e osteointegração dos enxertos ao longo do tempo (7, 14 e 49 dias), por meio de microscopia de luz convencional em cortes histológicos corados com H&E.

3. Metodologia

3.1. Animais

Foram utilizados 104 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos, adultos, com aproximadamente 280g, provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO/UFMG). Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais, distribuídos conforme a Tabela 1.

Tabela 1: Grupos experimentais e distribuição das amostras

Grupos	Análises Macroscópicas e Histológicas (n=72)			Análise molecular (n=32)	
	7 dias	14 dias	49 dias	3 dias	7 dias
I – Células tronco da polpa dentária (CTPDs)	6	6	6	4	4
II – CTPDs e Matriz óssea desmineralizada (MOD)	6	6	6	4	4
III – MOD	6	6	6	4	4
IV – Controle, Coágulo Sanguíneo (CO)	6	6	6	4	4

Além destes, 5 ratos Lewis (*Rattus norvegicus*), geneticamente modificados para a expressão da proteína eGFP/GFP^{+/+} (Lew-Tg eGFP F455/Rrrc, Rat Resource and Research Center, University of Missouri, USA) foram utilizados como doadores para a coleta de células tronco de polpas dentárias de seus dentes incisivos inferiores.

Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas contendo um número máximo de 04 (quatro) animais, sob temperatura ambiente e controle de ciclo de luz. Os animais

receberam ração para animais de laboratório e água *ad libitum*. Os protocolos de manejo e manutenção dos animais foram previamente aprovados segundo as diretrizes do CEUA/UFMG (Comitê de Ética no Uso de Animais – protocolo aprovado 07/2015 – documento anexo).

3.2. Certificação do genótipo dos animais doadores de células tronco

Os animais doadores de células tronco (ratos Lewis) tiveram o genótipo (homozigoto - eGFP^{+/+} ou heterozigoto eGFP^{+/-}) do transgene da proteína eGFP, confirmado por meio de Reação de Cadeia Polimerase (PCR). Para isso, o DNA genômico foi extraído de 100µL de sangue total por meio de lise com DNAzol® BD reagent, (Invitrogen – ThermoFisherScientific) e precipitado com isopropanol (Invitrogen – ThermoFisherScientific). As amostras foram centrifugadas e lavadas para a retirada de proteínas e restos celulares e, em seguida, a fração de DNA foi solubilizada com solução de NaOH a 8mM. O DNA das amostras foi quantificado com o equipamento NanoDrop® ND- 1000 UV/Vis Spectrophotometer. O DNA obtido foi encaminhado para a realização das reações de PCR, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores (primers) das sequências referentes ao GFP: LWS 455 5F, LWS 455 5R, e U3r-4 (Invitrogen, City, ST, USA) descritos na tabela 2. As reações foram montadas com dNTPs (0.2 mM), Taq DNA Polymerase (Fermentas; 0.026 u/µl), Taq Buffer (1 of 5x), MgCl₂ (1.5 mM), primers 1, 2 e 3 (0.4 mM), e DNA (≥15 ng) em tubos eppendorfs. As condições de ciclagem foram estabelecidas como: etapa inicial de desnaturação em 94°C por 3 minutos, seguida de 34 ciclos de 30 segundos em 94°C; resfriamento a 64°C por 30 segundos para anelamento dos primers e aquecimento a 72°C por 30 segundos a cada ciclo para a fase de alongamento, seguido por uma última etapa de alongamento a 72°C por 10 minutos. Os fragmentos amplificados foram observados em gel de agarose a 2% comparando-se o peso molecular das bandas com o padrão de peso molecular de 1-kb DNA ladder (Life technologies, City, ST, Country).

Tabela 2: Descrição dos iniciadores (primers) utilizados para a genotipagem dos animais.

Primer	Sequência	Pares de base (pb)
LWS 455 5F	AACCTCCCAGTGCTTTGAACGCTA	24
LWS 455 5R	GGTGCCAAGCCTCAACTTCTTTGT	24
U3r-4	ATCAGGGAAGTAGCCTTGTGTGTG	24

3.3. Obtenção, caracterização e cultivo das células tronco da polpa dentária (CTPDs)

3.3.1. Isolamento das células tronco dos dentes incisivos de ratos eGFP⁺

Após o sacrifício dos animais doadores por sobredose anestésica, as hemimandíbulas foram separadas, limpas em banhos de PBS e de tiosulfato de sódio 0,1%; e desinfetadas por imersão em solução de iodopovidona (PVPI) a 1%. Em seguida, a coleta das células a partir dos dentes incisivos, foi realizada em capela de fluxo laminar. As polpas foram coletadas via forames apicais mandibulares e retiradas com o auxílio de instrumental farpado (estirpa nervos). Em seguida, foram parcialmente digeridas em Colagenase I (Sigma-Aldrich) em uma atmosfera com 5% de CO₂ a 37°C por 40 minutos. A reação foi inativada com meio de crescimento (MC) α -MEM (*MinimumEssentialMediumEagle, Alfa Modification* – Sigma-Aldrich) suplementado por 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco). O conjunto foi, então, centrifugado (300xg) e ressuspensionado em meio de crescimento para a transferência das células e pequenos fragmentos de tecido para garrafas de cultura com 25cm², mantidas em atmosfera com 5% de CO₂ a 37°C.

O meio foi trocado a cada 48 horas e, ao atingir 70% de confluência, as células foram tripsinizadas (0,25% Tripsina, Gibco) e transferidas para outras garrafas. As células foram utilizadas nas enxertias entre a 3^a e 7^a passagem, fase em que se encontram com capacidade proliferativa adequada, mas ainda com aspecto indiferenciado.

3.3.2. Caracterização fenotípica da população de CTPD

Toda a caracterização da população celular utilizada no presente estudo foi previamente realizada e publicada por nosso grupo de pesquisa, em 2016 (BERTASSOLI et al., 2016). Em síntese, atendendo às diretrizes que definem critérios de identificação de células tronco mesenquimais (GRONTHOS et al., 2001) nossas células de interesse são positivas para os marcadores de células tronco mesenquimais CDs 54, 73 e 90 e negativas para os marcadores de células hematopoiéticas, CD 11/BC, CD 45 e CD34. (Figura 2)

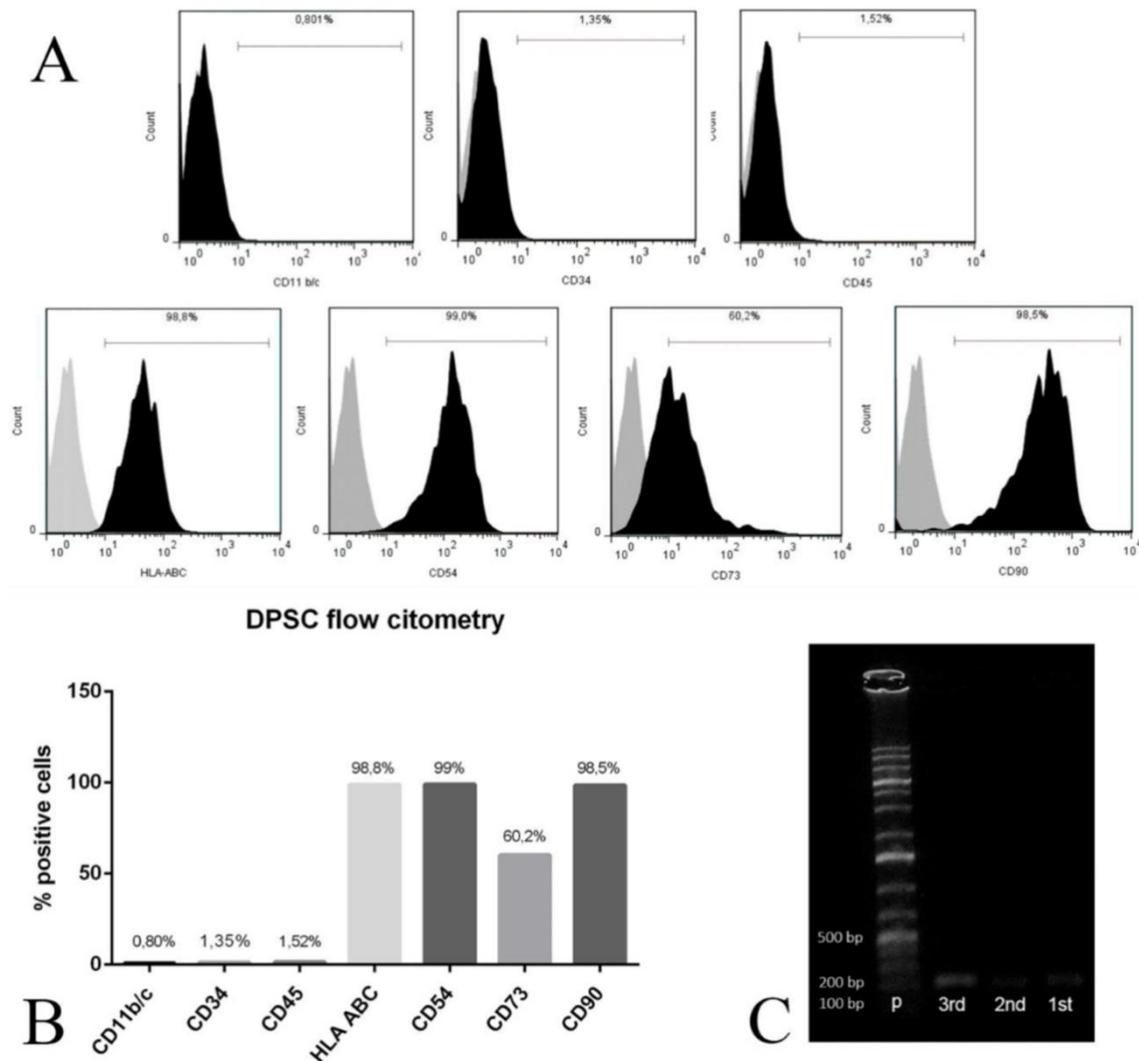


Figura 2: Caracterização das CTPDs por citometria de fluxo e RT-PCR (BERTASSOLI et al. 2016). A e B demonstram a porcentagem de marcação das células isoladas para os antígenos CDs 54, 73 e 90 e negativa para os marcadores de células hematopoiéticas, CD 11/BC, CD 45 e CD34. (C) demonstra a presença do gene marcador de indiferenciação característico de células tronco, NANOG, em gel de agarose 1% após 1, 2 ou 3 passagens das células cultivadas.

3.4. Imunofluorescência para eGFP nas culturas de CTPD

A fim de avaliar a reatividade do anticorpo anti-GFP contra as células tronco isoladas, como um controle preliminar à avaliação *in vivo*, realizou-se uma imunofluorescência para eGFP em células tronco isoladas, em cultura. Para tanto, parte das CTPDs isoladas foram plaqueadas sobre lamínula de vidro circular em placas de 24 poços ($2,5 \times 10^4$ células/poço) para detecção da proteína eGFP por imunofluorescência. As células foram lavadas em PBS, fixadas em paraformaldeído a 4% por 10 minutos e permeabilizadas com Tween 20 a 1%. Foram realizados bloqueios de ligações inespecíficas com albumina sérica bovina 1% (BSA- Sigma-Aldrich) a 37°C por 20 minutos. As células foram, então, incubadas com anticorpo primário contra a proteína eGFP (Rabbit, ChIP Grade (ab290),

1:500, Abcam), *overnight*, em câmara úmida. O excesso de anticorpos foi retirado por lavagem em PBS e as células foram incubadas em anticorpo secundário (Goat anti-Rabbit, 1:700, Alexa Fluor 488 – ThermoFisher Scientific) por 90 minutos em câmara úmida na ausência de luz. Os núcleos celulares foram evidenciados com incubação com 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 1:1000, Life Technologies) por 3 minutos e lavadas em PBS. As lamínulas foram fixadas em glicerol a 50% em lâminas histológicas para a captura de imagens em microscopia de fluorescência (Olympus BX50) com o sistema de captura QCapture 6.0; e a sobreposição dos canais de cores para a imagem de dupla marcação foi realizada com o programa Adobe Photoshop CC.

3.5. Análise preliminar do potencial de diferenciação osteogênica da população de células tronco isolada

A fim avaliar a capacidade osteogênica das CTPD coletadas, foi realizada uma indução, *in vitro*, previamente à transferência das células para os sítios cirúrgicos. Para tanto, parte das CTPDs isoladas foi plaqueada em placas de 24 poços (densidade igual a $2,5 \times 10^4$), e submetida à diferenciação química, em meio de diferenciação osteogênica (MD), composto de α -MEM suplementado com 50nM de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich), 10nM de β -glicerolfosfato (Sigma-Aldrich) e 0,1% de fosfato dissódico de dexametasona (Aché). Os poços controles foram mantidos em meio de crescimento convencional (MC). Após 14 dias de cultura, com trocas de meio a cada 48h, a diferenciação das células tronco pulparens foi mensurada pela capacidade destas células depositarem matriz mineralizada. Depósitos de cálcio foram detectados nas culturas por meio da coloração de vermelho de alizarina. Como controle positivo desse protocolo de diferenciação celular, foi realizada a análise da deposição mineral de osteoblastos imortalizados (MCT3E1), cultivados sob as mesmas condições e que passaram pelo mesmo protocolo de cultura das CTPD. Para a detecção dos grânulos de mineralização por ambas as culturas, Osteoblastos e CTPD, foram lavadas em PBS, fixadas em paraformaldeído (PFA) e coradas com uma solução de 0,2% de vermelho de alizarina (Sigma-Aldrich) por 15 minutos, seguidos de enxagues em água deionizada. Após a coloração, a presença de grânulos de mineralização foi tomada como um critério da atividade funcional dos osteoblastos. As placas foram fotografadas em fotomicroscópio invertido Motic AE31 acoplado a câmera Moticom 2300 e sistema de captura Motic Image Plus 2.0.

3.6. Adequação do biomaterial – obtenção da matriz óssea (desmineralizada) de osso bovino

Utilizou-se no presente estudo, enxertos ósseos bovinos comerciais, da marca Lumina-Bone®, (empresa nacional Critéria), disponibilizados em apresentação mineralizada. Trata-se de um biomaterial poroso, de aspecto trabeculado, comercializado em blocos (Figura 3 A) constituído, segundo perfil descrito pelos fabricantes, de compostos minerais de cálcio e fósforo acelular, provenientes de ossos bovinos. Para a obtenção da versão desmineralizada, os blocos foram imersos em solução quelante de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA - Vetec) 10%, por 72 horas, substituída a cada 24 horas. Ao final do processo, os fragmentos foram lavados em água corrente por uma noite. A desinfecção das amostras foi realizada por imersão em etanol 70% por 24 horas, seguida de exposição em luz ultravioleta por 30 minutos em capela de fluxo laminar. Em seguida, as peças foram lavadas em *Phosphatebuffered saline* (PBS – Sigma-Aldric) estéril onde permaneceram até o momento dos procedimentos cirúrgicos. O processo de desmineralização não interferiu na estrutura trabeculada e porosa dos biomateriais (Figura 3 B). Após a desmineralização, os blocos foram reduzidos a fragmentos de 1 a 3 mm para a adaptação nos defeitos ósseos (Figura 3 C)

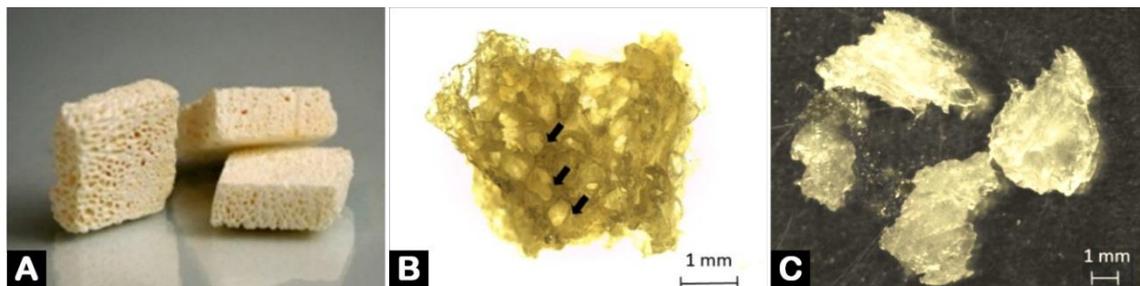


Figura 3: Preparação da matriz óssea bovina para os procedimentos de enxertia. Os blocos comerciais de matriz óssea bovina Lumina-Bone (Criteria®) foram desmineralizados em solução de EDTA, com a preservação de seu arcabouço trabecular (B). Em seguida, as matrizes foram fragmentadas para melhor enxertia nos defeitos ósseos (C).

3.7. Procedimentos cirúrgicos

3.7.1. Criação do defeito ósseo intrabucal de dimensões padronizadas

Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de Cloridrato de Xilazina 2% associado à base anestésica, Cloridrato de Ketamina 10% (ambas a 0,1 ml/100 g). O protocolo de criação dos defeitos ósseos foi realizado segundo Costa-Filho et al (2012). Esta padronização permitiu que, independentemente de variações individuais dos animais, os defeitos ósseos obtidos tivessem de dimensões padronizadas, de aproximadamente 2,5 mm de diâmetro e 2,5 mm de profundidade (Figura 4 D-E). Para o procedimento cirúrgico, após a exodontia dos primeiros molares superiores direitos por

via alveolar, os defeitos ósseos foram criados por meio da remoção dos septos interradiculares na área dos alvéolos remanescentes das raízes distais dos molares extraídos com um micromotor acoplado a uma broca/fresa odontológica cilíndrica KGS-2094, sob irrigação (Figura 5 D-G). Cada animal foi submetido somente a um tipo de enxertia, sempre do lado direito do maxilar e, a fim de não limitar a nutrição do animal, além de evitar a sobreposição de respostas sistêmicas em função de 2 sítios cirúrgicos contralaterais com materiais distintos. Tais procedimentos foram viabilizados pela utilização de uma mesa cirúrgica especificamente delineada para procedimentos cirúrgicos intrabucais em ratos (Patente INPI - PI 1103967-1). Este equipamento garante a reprodutibilidade do protocolo com total segurança para os animais e comodidade para os operadores (Figura 5 A-C).

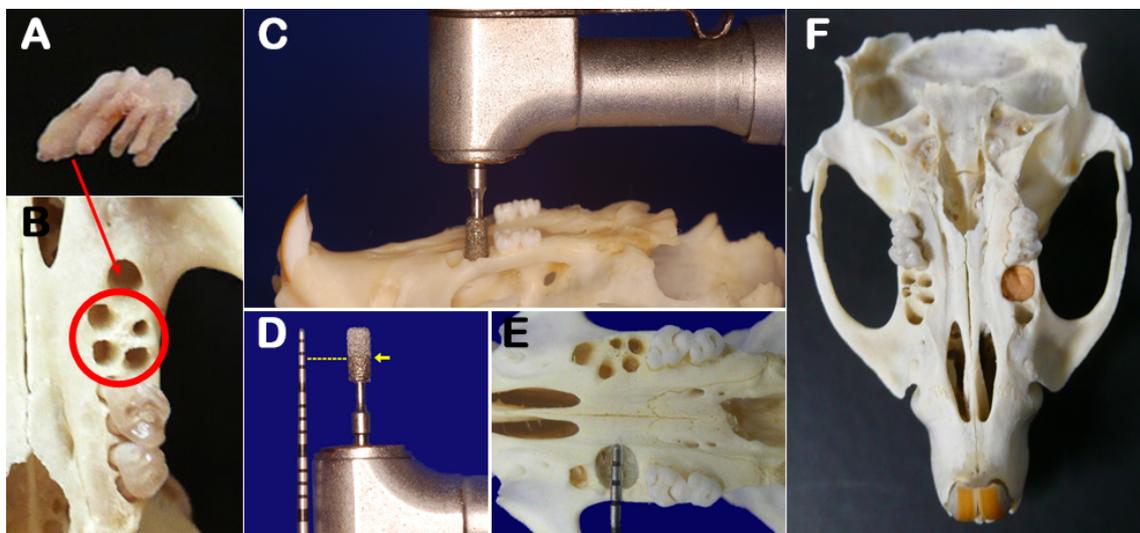


Figura 4: Estudo prévio à criação dos defeitos ósseos *in vivo*. O primeiro molar superior (A) foi extraído do osso mandibular, revelando 5 alvéolos onde estavam inseridas as raízes do dente (B) – o círculo em vermelho indica os alvéolos a serem unificados no procedimento. O alvéolo da raiz mesial, apontado pela seta não foi utilizado. A fim de se criar um defeito ósseo de dimensões padronizadas, foi utilizada uma broca adiamantada acoplada a um micromotor de implante para a remoção dos septos ósseos interradiculares (C). Os defeitos criados tiveram suas dimensões padronizadas 2,5mm de profundidade (D - seta) e 2,5mm de diâmetro (E), permitindo o seu preenchimento com quantidades padronizadas de materiais (F).

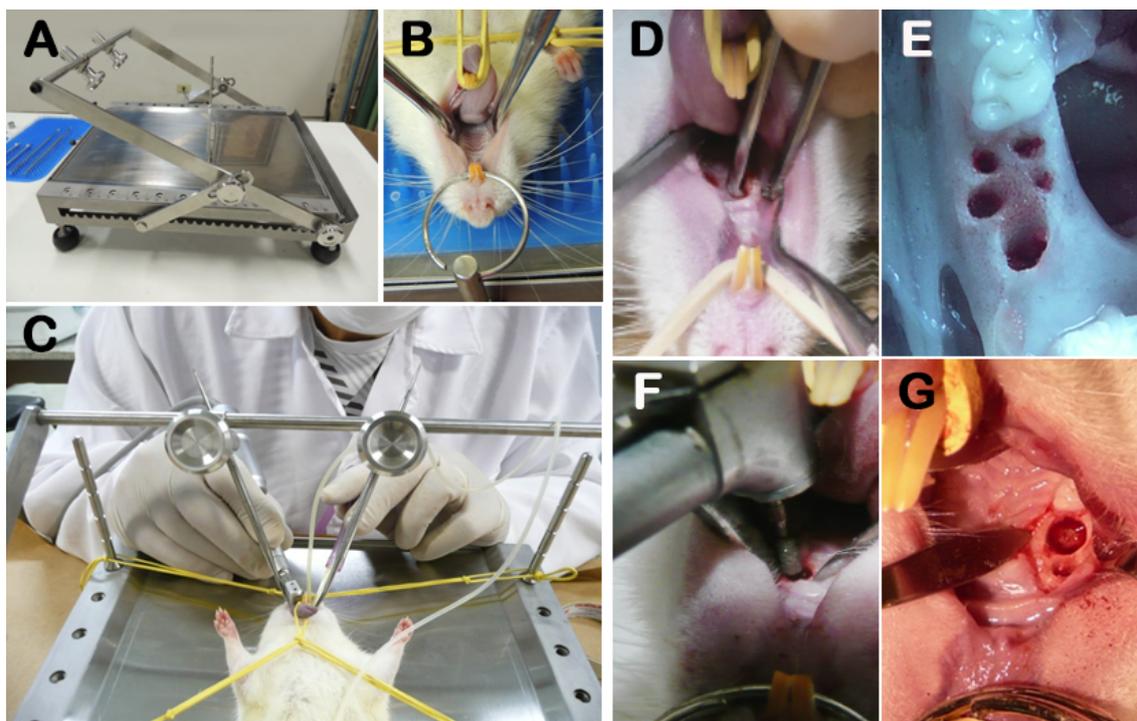


Figura 5: Criação do defeito ósseo *in vivo* utilizando a mesa cirúrgica para animais de pequeno porte (A) patenteada pelo Laboratório de Biologia Oral e do Desenvolvimento. Os animais foram anestesiados e posicionado em decúbito dorsal para a abertura da boca e afastamento dos tecidos moles (B), que permitiram o melhor acesso dos instrumentais a área de interesse; (C) Procedimento pela retirada do primeiro molar superior dos animais, expondo (E) os alvéolos presentes no osso maxilar. (F) Utilização de uma broca adiamantada acoplada a um micromotor de implante; (G) Imagem clínica do defeito ósseo de tamanho padronizado o qual foi enxertado com CTPDS; CTPDS associadas a MOD; apenas MOD e coágulo sanguíneo, como controle negativo.

3.8. Procedimentos de enxertia

As cavidades ósseas foram preenchidas com 4 tipos de enxertia segundo os grupos experimentais propostos (n=6 por grupo): 1. Matriz de osso bovino desmineralizado (MOD), 2. Células tronco da polpa dentária (CTPD) em suspensão, em meio de crescimento, MC, 3. Associação de células tronco da polpa dentária e osso bovino desmineralizado (CTPD+MOD); 4. Coágulo sanguíneo, CO (controle negativo). As células foram concentradas em 3 μ L de meio de cultura, por centrifugação e injetado nos defeitos ósseos intrabucais de ratos com o auxílio de uma micropipeta em condições estéreis. Para o grupo CTPD+MOD, as células tronco foram primeiro introduzidas nas cavidades ósseas e subsequentemente inseridos os fragmentos de matriz bovina desmineralizadas de 2,5 x 2,5 x 2,5 mm (capacidade de volume de 15,7 μ L). Após as enxertias, as bordas de mucosa sobre o sitio cirúrgico foram juntadas e suturadas com fio de nylon (Biosut 6.0), por meio da técnica de colchoeiro modificada. A técnica, utilizada por profissionais em odontologia, permite o melhor fechamento da mucosa reduzindo o risco de contaminações, soltura dos pontos e perda dos biomateriais enxertados. Após o

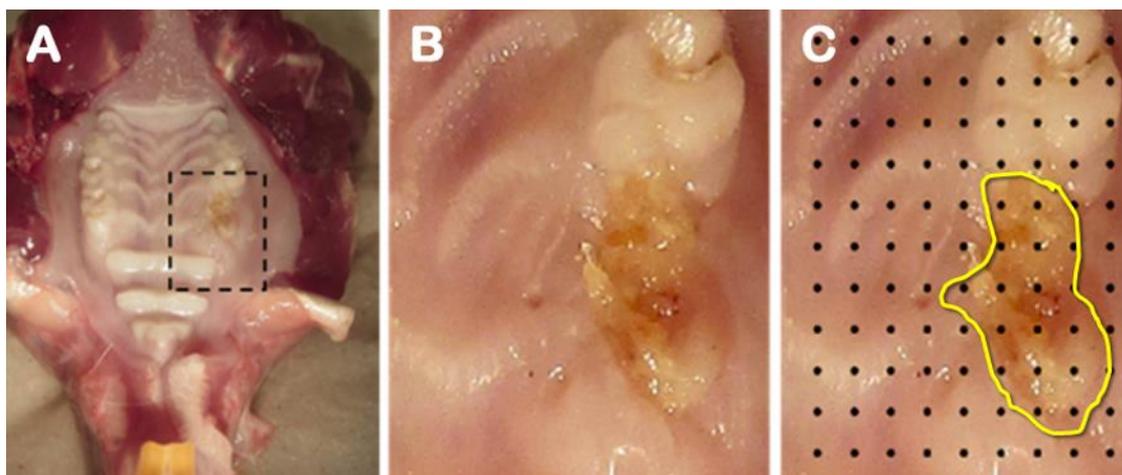
retorno completo da anestesia, os animais receberam uma dose de analgésico, TRAMAL (4 mg/Kg) e ainda, 3 doses subcutâneas do antibiótico oxitetraciclina (Terramicina, Solução injetável), 10 mg/Kg, a cada 24 horas. A remoção dos pontos cirúrgicos foi realizada aos 7 dias, quando os animais receberam metade da dose anestésica proposta, apenas para a abertura dos maxilares e acesso ao sítio cirúrgico. Os animais foram sacrificados após 7 dias, 14 e 49 dias. A seleção dos períodos de análise baseou-se no fato do período de 7 dias corresponder, em condições normais, ao final da fase proliferativa da inflamação, com início da deposição de matriz óssea; e o período de 14 dias ser considerado um período em que a regeneração óssea em grupos controle está na fase intermediária. Qualquer avanço ou retrocesso em relação ao grupo controle é histologicamente melhor evidenciado aos 14 dias. O período de 49 dias corresponde a uma fase avançada, já no estágio final da remodelação óssea, quando o sítio de reparo teoricamente já se encontra totalmente osteointegrado. Nesta fase final do reparo, a qualidade do tecido ósseo formado; a permanência de resquícios de biomaterial; a osteointegração dos enxertos ao osso neoformado e paredes ósseas e aspectos da remodelação óssea habitual podem ser observados e comparados.

3.9. Análise da evolução do reparo ósseo e fechamento do sítio cirúrgico

3.9.1. Avaliação macroscópica do sítio cirúrgico

Logo após o sacrifício em cada uma das etapas (7, 14, 49 dias), as mandíbulas foram dissecadas e os sítios cirúrgicos fotografados com lentes macro (câmera fotográfica Panasonic DMC-TZ3, LUMIX). As fotos foram obtidas sem a utilização de *flashes*, a uma distância padrão de 5 cm do objeto de estudo. Em seguida, as peças foram imersas em solução fixadora de formalina neutra tamponada 10%.

A avaliação do sítio cirúrgico foi baseada no nível de epitelização gengival ou fechamento da ferida sobre a área operada. Para tanto, as imagens foram capturadas em tamanho padronizado e exportadas para o programa Adobe Photoshop CC. Em seguida, as imagens foram posicionadas sob uma grade com 99 pontos equidistantes. Todos os pontos sobre a área ainda aberta ou sobre o tecido de granulação (tecido em processo de regeneração) foram contados. Estes pontos foram convertidos em valores percentuais, em relação ao total da área considerada para avaliação (Figura 6).



$$\text{Índice de epitelação} = \frac{\text{Pontos sobre o tecido de granulação}}{\text{Total de pontos}} \times 100$$

Figura 6: Método de análise macroscópica do sítio cirúrgico. (A) Maxilas dissecadas em posição para as tomadas fotográficas. Área tracejada corresponde à imagem considerada na avaliação, recortada para análise morfométrica. (B) Imagem ampliada da área delimitada em A. Note sítio cirúrgico em processo de epitelação. (C) com o auxílio do programa Adobe Photoshop CC uma malha de pontos equidistantes foi posicionada sobre a imagem. O número de pontos sobre áreas com tecido de granulação (imagem circulado em amarelo em C) foi quantificado, comparado com os demais grupos permitindo mensurar a influência dos biomateriais no fechamento da mucosa no sítio operado.

De acordo com o índice proposto, quanto maior a quantidade de pontos sobre a área de tecido de granulação, menos eficiente é a epitelação gengival. Similarmente, quanto mais pontos sobre a gengiva epitelizada, melhor a condição da cicatrização do sítio cirúrgico. A avaliação macroscópica foi realizada em um estudo cego, com uma calibração prévia, onde se definiu que os pontos localizados sobre o limite entre área epitelizada e área de tecido granuloso deveriam ser incluídos como tecido granuloso para todos os grupos. Após a conversão dos pontos em percentuais, foram calculadas as médias por grupo (n=6 animais). Os dados foram comparados estatisticamente por One-way ANOVA com fator de correção em Teste Tukey e significância estatística igual a $P < 0,05$, através do programa GraphPad Prism 6, utilizado, também para a confecção de gráficos.

3.10. Análise histomorfométrica do reparo ósseo

3.10.1. Protocolo de inclusão e microtomia

As maxilas foram fixadas em formalina neutra tamponada 10% por 72 horas e desmineralizadas em solução tamponada de EDTA 10%, pH 7.2, por um período médio de 35 dias com trocas da solução a cada três dias.

Para a padronização das áreas a ser avaliada histologicamente, um corte inicial foi realizado no centro do defeito ósseo (Figura 7 – linha tracejada), separando o sítio cirúrgico em duas metades, uma mais anterior e uma metade mais posterior. Ambos os fragmentos foram incluídos, mas a metade posterior foi utilizada para a microtomia semiseriada. O bloco anterior foi reservado para substituições se necessário. Para a inclusão, as peças foram desidratadas em álcool etílico em concentrações crescentes por 30 minutos cada (70%, 80%, 90%, 95% e 100%); diafanização em 3 banhos de xilol por 20 minutos cada; Infiltração em 3 banhos de parafina a 58°C (em estufa) por 40 minutos cada e inclusão em parafina. Após a obtenção dos blocos, a microtomia foi iniciada, do centro do defeito (Figura 7 - setas), em direção posterior até o septo interdental no limite com o 2º molar (Figura 7 - asterisco). Para as análises morfométricas e histológicas, 3 lâminas de cada grupo foram avaliadas em diferentes profundidades, desde o centro do defeito até o limite com o 2º molar.

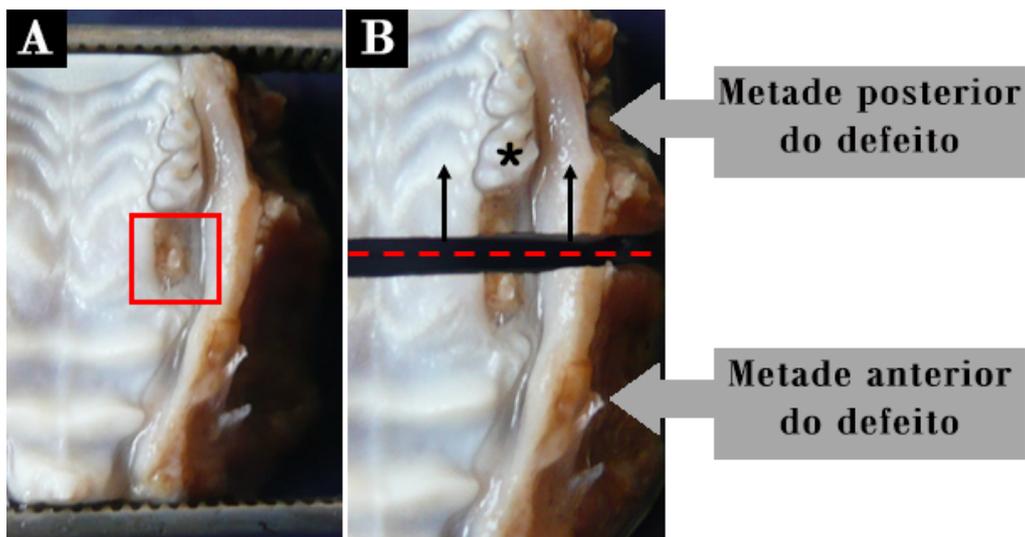


Figura 7: Preparação das amostras para a inclusão em parafina histológica. Após a fixação e o registro fotográfico das peças, as maxilas foram cortadas com lâmina de aço inox na porção central da área do defeito (A) em plano frontal. Os dois fragmentos gerados (B) foram incluídos em parafina. Para a microtomia seriada, o bloco posterior foi cortado, para obtenção de lâminas histológicas partindo do centro da área do defeito (setas) em direção ao segundo molar superior (*). A metade anterior do defeito (na foto, o fragmento desprovido de dentes) foi embebido em parafina e reservado para eventual necessidade.

3.10.2. Colorações Histológicas

Os blocos de parafina foram seccionados em plano frontal, obtendo-se secções seriadas de 5µm. As secções histológicas foram selecionadas em 3 diferentes profundidades de cortes seriados do defeito ósseo para as análises morfométricas. Para a coloração, as lâminas foram desparafinizadas em três banhos de xilol por 20 minutos cada, com posterior hidratação em álcool seriado em ordem decrescente (100%, 90%, 80% e 70%

por 2 minutos cada banho) e imersão em água por 20 minutos. Em seguida as lâminas foram coradas com:

Hematoxilina & Eosina (H&E) – para a descrição qualitativa dos cortes, as lâminas foram inicialmente desparafinizadas em xilol e hidratadas em uma série decrescente de solução de etanol e, então, em água corrente. Em seguida, foram coradas com Hematoxilina de Harris por 40 segundos e submersas em água corrente por 20 minutos. Posteriormente, as lâminas foram coradas com Eosina por 1 minuto. Após a coloração, as lâminas passaram pela desidratação e montagem com lamínula e meio de montagem.

Tricrômico de Masson – para a análise morfométrica da deposição óssea, uma vez que cora o colágeno das trabéculas ósseas recém depositadas em azul. Para a coloração, as lâminas foram coradas inicialmente com Hematoxilina de Harris por 40 segundos e submersas em água corrente por 20 minutos. Posteriormente, as lâminas foram mergulhadas no corante Tricrômico de Masson por 14 minutos. Seguiu-se a desidratação dos cortes e montagem das lâminas como de rotina.

PicroSirius Red – para a análise de maturação das fibras colágenas das trabéculas neoformadas por meio de microscopia de polarização. As lâminas foram coradas com *PicroSirius Red* por 45 minutos em estufa à 60°C e submersas em água corrente por 5 minutos. Em seguida, as lâminas foram coradas com Hematoxilina de Harris por 5 minutos, lavadas por mais 5 minutos em água corrente e processadas para a montagem das lâminas.

Após a etapa de colorações, as lâminas foram desidratadas em sequência crescente de álcool por um minuto em cada solução (95%, 100% e 100%) e diafanizadas em 3 banhos de xilol de montagem por 20 minutos cada. As lâminas foram montadas em meio Entellan (Merck – Alemanha) e foram capturadas em microscópio de luz Olympus BX-50, com sistema de polarização, acoplado a câmera Q-color 3 para análises morfométricas.

3.11. Análise histomorfométrica da deposição óssea

A avaliação morfométrica da deposição óssea foi realizada em cortes corados por Tricromico de Masson, por meio do software *ImageJ*. A Figura 8 representa uma imagem histológica, aleatoriamente selecionada (amostra aleatória de 14 dias) para mostrar a

nossa área de interesse, as estruturas histológicas consideradas no interior do defeito, bem como as paredes ósseas limitantes do defeito criado.

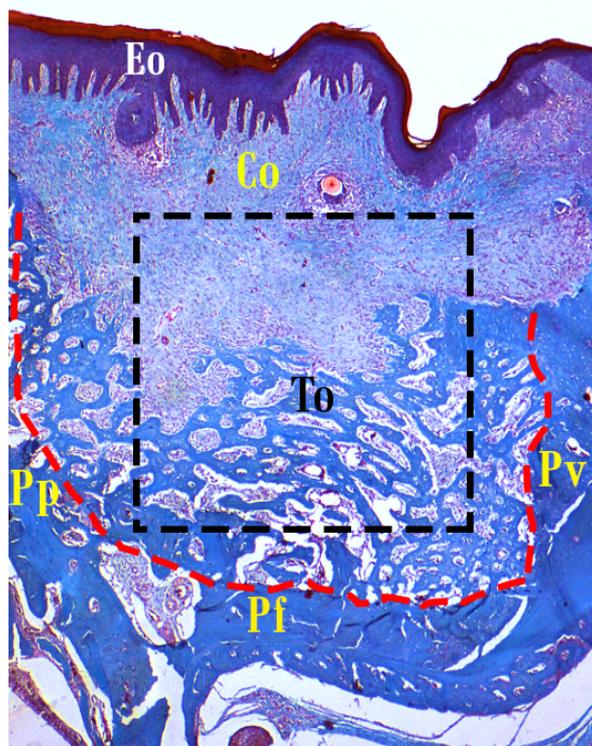


Figura 8: Perfil histológico do defeito e delineamento da área de leitura morfológica. O sítio cirúrgico está localizado abaixo do epitélio oral estratificado pavimentosamente queratinizado (Eo), e de uma camada de tecido conjuntivo (Co). A área de avaliação morfológica (linha pontilhada preta) teve sua posição padronizada para a quantificação das trabéculas ósseas neoformadas (To) na região central do defeito sem a interferência das paredes ósseas vestibular (Pv) e palatina (Pp) e do fundo do defeito (Pf) preexistentes. A linha pontilhada vermelha mostra o limite inicial do defeito, com suas paredes ósseas remanescentes. Internamente a essa linha todo o trabeculado ósseo é considerado osso neoformado. Tricrômico de Masson.

As imagens foram carregadas no programa *ImageJ* (Figura 9 A) e passaram por um *threshold* de cor para a seleção dos pixels azuis referentes a coloração de colágeno. Em seguida, os canais de cores foram separados de modo a fornecer uma imagem em alto contraste para a quantificação dos pixels (Figura 9 B). A fim de eliminar interferências de paredes ósseas remanescentes e padronizar a região de leitura, uma área de interesse de 1,2mm x 1,4mm foi desenhada com o auxílio de uma guia morfológica e posicionada no centro do defeito, excluindo as bordas ósseas (Figura 9 B – retângulo amarelo). A porcentagem da área ocupada pela neoformação óssea (Figura 9 B – detalhe), foi avaliada pela deposição de trabéculas coradas por Tricrômico de Masson. Após a avaliação, as médias dos valores obtidos das seções seriadas (3 diferentes profundidades) foram alcançadas e encaminhadas para a avaliação estatística.

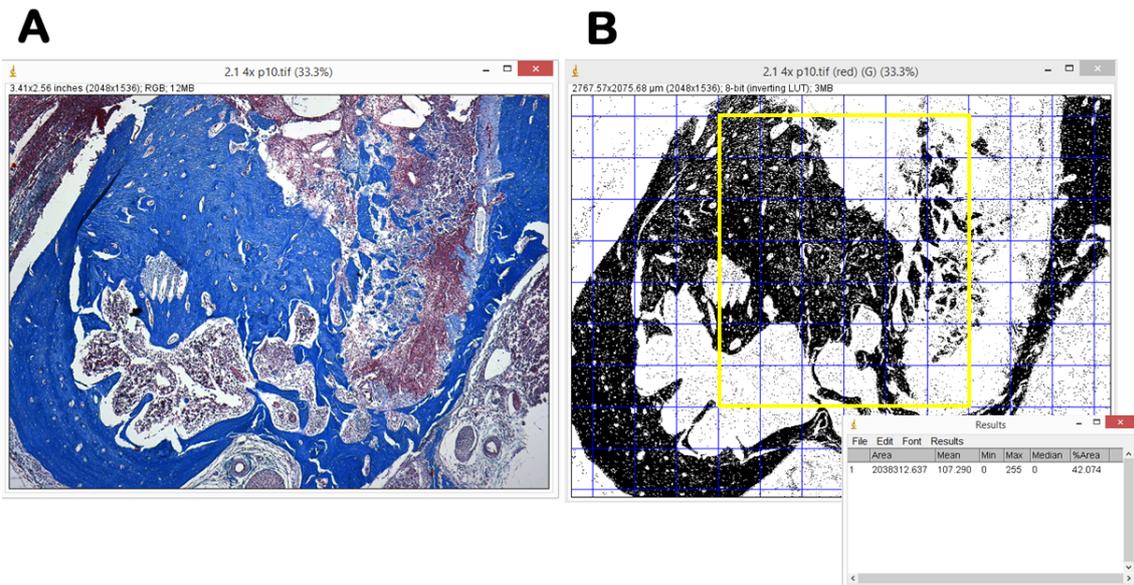


Figura 9: Análise morfométrica dos defeitos corados com Tricrômico de Massom. As imagens obtidas (A) foram encaminhadas ao programa *ImageJ* para a quantificação da deposição óssea por contagem de pixels. As imagens passaram por um *threshold* de cor que selecionou os pixels azuis, referentes a coloração de Massom para o colágeno depositado. Em seguida, os canais de cores foram separados de modo a fornecer uma imagem em alto contraste (B) para a contagem dos pixels. De modo a remover interferências na leitura, uma área de análise foi determinada com dimensões de 1,2mmx1,4mm (detalhe em amarelo) e posicionada na porção central do defeito, com o auxílio de uma grade morfométrica (grade azul), excluindo as paredes ósseas do defeito. A contagem dos pixels foi convertida em porcentagem (detalhe em B) para a realização de testes estatísticos.

3.11.1. Análise de maturação de fibras colágenas por PicroSirius *Red*.

Por meio da polarização das fibras colágenas coradas pelo PicroSirius *Red* foi possível estimar o nível de maturação óssea, nos períodos selecionados, considerando o percentual de fibras vermelhas detectadas com o auxílio do software *ImageJ*. Cortes corados com PicroSirius *Red* foram fotografados e analisados em ambos, campo claro e em luz polarizada (Figura 10 A). Por meio dos recursos de separação de canais de cores do software *ImageJ*, somente a birrefringência das fibras vermelhas (Colágeno tipo I), consideradas mais maduras, espessas e organizadas, foram consideradas (Figura 10 B). Após a quantificação, as médias dos valores obtidos das secções seriadas (3 diferentes profundidades) foram alcançadas. Em um segundo momento, os resultados foram relacionados aos valores obtidos com a morfometria por Tricrômico de Masson a fim de obter o percentual de fibras maduras (detectadas em vermelho pela polarização) dentro do total de osso neoformado (identificado em azul pelo tricrômico de Masson). Essa análise permitiu mensurar a qualidade do tecido ósseo neoformado em função da comparação dos grupos em função da quantidade de fibras maduras.

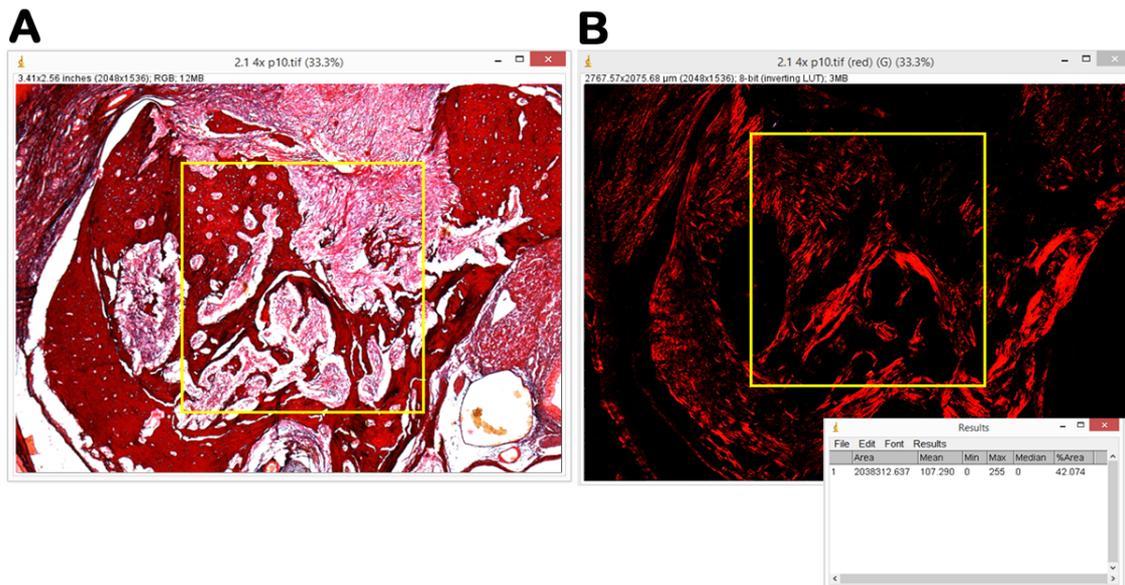


Figura 10: Análise qualitativa do tecido ósseo neoformado - coloração de *Picrosirius-Red*. (A) Imagem obtida em campo claro e (B) mesma imagem obtida por polarização das fibras colágenas. Somente fibras vermelhas foram quantificadas. O quadro amarelo representa a área quantificada, de tamanho padronizado de 1,2mmx1,4mm, posicionadas na região central do defeito para a quantificação dos pixels referentes à deposição do colágeno tipo I. Os pixels tiveram seus valores convertidos em porcentagem (B – detalhe) para a análise estatística.

3.11.2. Análises estatísticas

Os dados das análises histológicas foram avaliados estatisticamente por meio do software PrismStatistical software (Graphpad, San Diego, CA). Os dados foram representados como média \pm desvio padrão e estatisticamente comparados usando análise de variância One-way ANOVA e teste de Tukey. Níveis de confiança $< 95\%$ ($p > 0,05$) foram considerados não significativos. A comparação direta entre dois grupos foi realizada por meio do *t test* com níveis de confiança $< 95\%$ ($p < 0,05$) ou $< 99\%$ ($p < 0,01$).

3.12. Monitoramento das CTPDs *in vivo*

A utilização de células tronco eGFP-positivas permitiu acompanhar, por imunoperoxidase, com anti-GFP, o destino destas células após sua enxertia em animais GFP negativos. Para tanto, os cortes histológicos coletados em lâminas tratadas com Poly-L-lisina foram desparafinizados em xilol e reidratados em séries decrescentes de álcool. Posteriormente, os cortes foram imersos nas soluções de bloqueio, de H_2O_2 3% por 30 minutos (2 banhos), para a neutralização da peroxidase endógena e em solução a 4% de Albumina de Soro Bovino (BSA) em PBS por 30 minutos para o bloqueio dos sítios inespecíficos. Foram utilizados anticorpos primários anti eGFP (*Rabbit*, 1:50, Abcam; Cambridge, UK); e anticorpo secundário, biotilado, anti coelho (Universal LSAB

Kit/HRP, Rb/Mo/ *Goat* K0690-1Dako; Glostrup, Denmark). Os cortes foram incubados *overnight* em anticorpo primário, em câmara úmida a 4°C, lavados em PBS e incubados com anticorpo secundário por 30 minutos, em câmara úmida a temperatura ambiente. Após a lavagem em 3 banhos de PBS, as reações foram reveladas com solução de diaminobenzidina – DAB- (Sigma Chemical Co.), utilizado na concentração de 40µl/mL. Ao final da revelação, a reação foi interrompida com imersão dos cortes em PBS. As lâminas foram desidratadas em série ascendente de álcoois e montadas com meio de montagem Entellan (Merck – Alemanha) para o registro fotográfico no fotomicroscópio Olympus BX-50 acoplado a câmera Q-color 3.

3.13. Análise de indicadores de diferenciação osteoblástica *in vivo*

A diferenciação osteogênica no sitio cirúrgico foi mensurada por meio da análise quantitativa (por RT-qPCR) da expressão de 2 genes indicadores do desenvolvimento osteoblástico inicial (Runx2 e Osterix) e 1 gene representativo dos estágios finais da maturação osteoblástica e produção de matriz óssea (iBSP). O Gene constitutivo GAPDH foi usado como referência para a avaliação dos genes de interesse.

3.13.1. Desenho de oligonucleotídeos iniciadores (primers)

O software Primer3 Plus (www.bioinformatics.nl/primer3plus) foi utilizado para o desenho de iniciadores específicos para *Rattus norvegicus* com base nas sequências depositadas no *GenBank* para os transcritos de interesse (descritos na tabela 3).

Tabela 3- Descrição da sequência de iniciadores para os genes de interesse

<i>Gene de interesse</i>	<i>Primer</i>	<i>Sequência</i>	<i>Pares de base (pb)</i>
RUNX 2	F	AACCTCCCAGTGCTTTGAAC	20
	R	GGCCAGGTCACGAAACTTG	20
OSTERIX	F	GAGGAAGAAGCCCATTACACA	20
	R	TTGGAGCAGAGCAGACAGG	19
iBSP	F	GCGATAGTTCGGAGGAGGAG	20
	R	CCTTCATTTTTGGAGCCTTG	20
GAPDH	F	GTGGTTTGCTTTTGCCTGTT	20
	R	GGCTTTCATTGGAGTTGCTT	20

3.13.2. Obtenção de RNA total

Para a obtenção do RNA total das células presentes na área de reparo, os animais foram anestesiados; os pontos cirúrgicos foram removidos para o acesso ao sítio ósseo e coleta do tecido em regeneração. Utilizando-se um escavador odontológico para dentina, todo o conteúdo presente no defeito foi removido e imediatamente transferido para tubos eppendorfs, que foram imersos em nitrogênio líquido para preservação do RNA. Em seguida, as amostras foram processadas em TRIReagent® (Sigma) para a extração de RNA total de acordo com protocolo do fabricante. Resumidamente, foram adicionados 200 µL de clorofórmio e, após mistura por inversão, o material foi centrifugado por 15 min a 12000xg para separação do RNA total (fase sobrenadante). Aproximadamente 400 µL da fase contendo o RNA total foram transferidos para um novo tubo e acrescidos de 500 µL de isopropanol. O material foi homogeneizado e incubado por 10 min em temperatura ambiente. As amostras foram então centrifugadas por 10 min a 12000xg e a fase alcoólica foi descartada. 100 µL de etanol 75% foram adicionados ao sistema e a amostra foi homogeneizada. O material foi centrifugado por 5 min a 12000xg e ao final do processo o etanol foi descartado para a secagem do precipitado (*pellet*) em termomixer por 5 min a 38°C. O *pellet* foi hidratado utilizando 20 µL de água *nuclease-free* e incubado por 5 min a 55 °C. A integridade do RNA total extraído foi confirmada pela corrida das amostras em gel de agarose 1%. As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro da marca *NanoDrop® ND-1000 and ND-8000 8-Sample Spectrophotometers*. Cerca de 1 µg de RNA total foi convertido em DNA complementar (cDNA), seguindo as instruções dos fabricantes do kit *RevertAid™ H. Minus First Stand cDNA Synthesis* (Fermentas).

3.13.3. Preparo das reações de RT-PCRq

A reação de RT-PCRq foi preparada com 5 µL de iTaq™ *Universal SYBR® Green Supermix* (Bio-Rad), 0,4 µM de cada dos oligonucleotídeos, 1 µL cDNA em diluição de 1:10 em água, com ajuste de volume final para 10 µL com água *nuclease-free*. A reação ocorreu a 50 °C por 2 minutos (ativação UDG), 95 °C por 2 minutos (ativação da Taq), e 45 ciclos de 94 °C por 15 s, 60 °C por 15 s e 72 °C por 20 segundos no aparelho Rotor Gene™ 3000. Para cada par de oligonucleotídeos foi gerada uma curva de *Melting* para verificação de sua qualidade. Os níveis de expressão desses genes foram analisados tomando como gene de referência *GAPDH*. A análise de expressão diferencial e a plotagem dos resultados foi feita utilizando-se o *software* REST 2009 (QIAGEN),

desenvolvido por Pfaffl e colaboradores (2001, 2002), por meio de comparação temporal de expressão em relação ao primeiro período de avaliação (3 dias).

4. Resultados

4.1. Genotipagem dos ratos Lewis (doadores de CTPDs)

A presença do transgene eGFP foi detectada por meio de PCR a partir de DNA genômico extraído do sangue total dos animais, antes do isolamento das células tronco da polpa dos dentes. Todos os animais utilizados foram positivos para e-GFP apresentando bandas de aproximadamente 500 pares de bases (pb) e 100 pb, referentes aos alelos do gene de interesse no gel de agarose 1% (Figura 11).

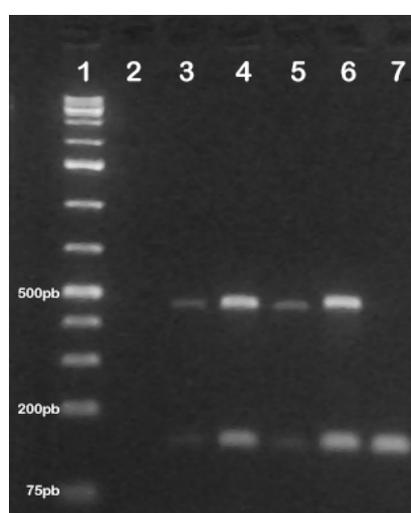


Figura 11: Detecção do transgene eGFP em células dos ratos Lewis doadores das células tronco da polpa dentária por PCR. (1) Padrão de pares de base, (2) Controle negativo da reação. Os animais (canaletas 3 – 7) se mostraram heterozigotos para o transgene, apresentando bandas específicas aos alelos de aproximadamente 500 pb e 100 pb (3-6), ou homozigotos apresentando banda única de aproximadamente 100 pb (7).

4.2. Avaliações *in vitro*

4.2.1. Aspectos morfológicos da cultura das células tronco de polpa dentária

As células isoladas dos incisivos inferiores de ratos Lewis mostraram-se aderentes após um período *overnight* de plaqueamento. Após 3 dias, as células apresentaram morfologia fusiformes, formando colônias, características da fase proliferativa de células tronco mesenquimais (Figura 12 A) e também se expandindo a partir de fragmentos de polpa dos incisivos (Figura 12 C). Aos 5 dias, foi possível observar o aumento da densidade celular

sobre a superfície de cultivo (Figura 12 B e D) e os fragmentos de polpa já não eram mais visualizados (Figura 12 D).

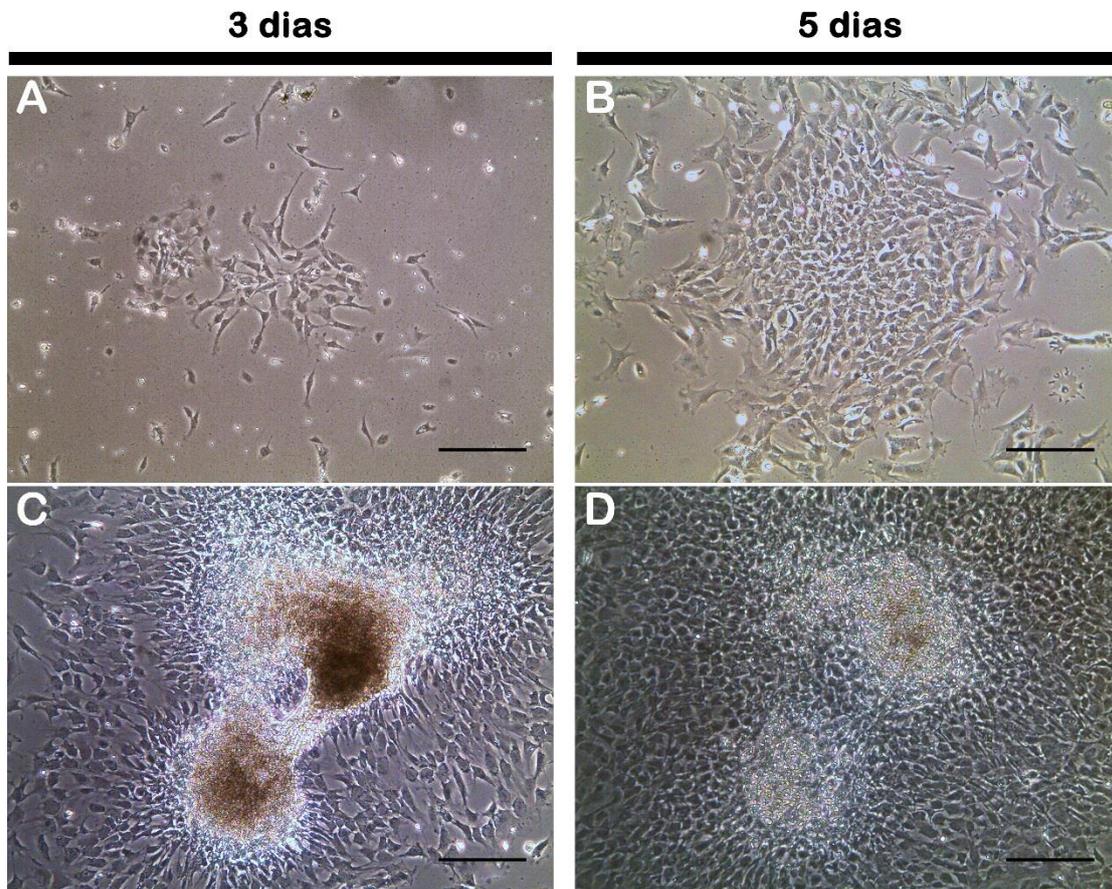


Figura 12: Aspecto morfológico das células tronco isoladas da polpa dentária dos incisivos de ratos. Início de formação de colônias aos 3 dias de plaqueamento (A) e crescimento após 5 dias (B). Foram observadas células em expansão a partir de fragmentos de polpa aos 3 dias (C) que se desfizeram aos 5 dias (D). Barra = 200 μ m

4.2.2. Imunofluorescência para eGFP nas células isoladas

As CTPDs cultivadas em lamínulas apresentaram marcação positiva com anticorpos para a proteína eGFP através da excitação de luz laser (590nm) (Figura 13). A distribuição da proteína apresentou-se predominantemente citoplasmática (Figura 13A) em todas as células aderidas, o que foi observado pela sobreposição da localização dos núcleos celulares com o DAPI (Figura 3B) e da imunomarcação (Figura 13C). Assim como evidenciado pela genotipagem dos animais, foram observadas células com maior e menor intensidade de fluorescência, o que foi entendido como populações homozigotas para os alelos do gene da proteína (Figura 13A-C) e heterozigotas (Figura 13D-E).

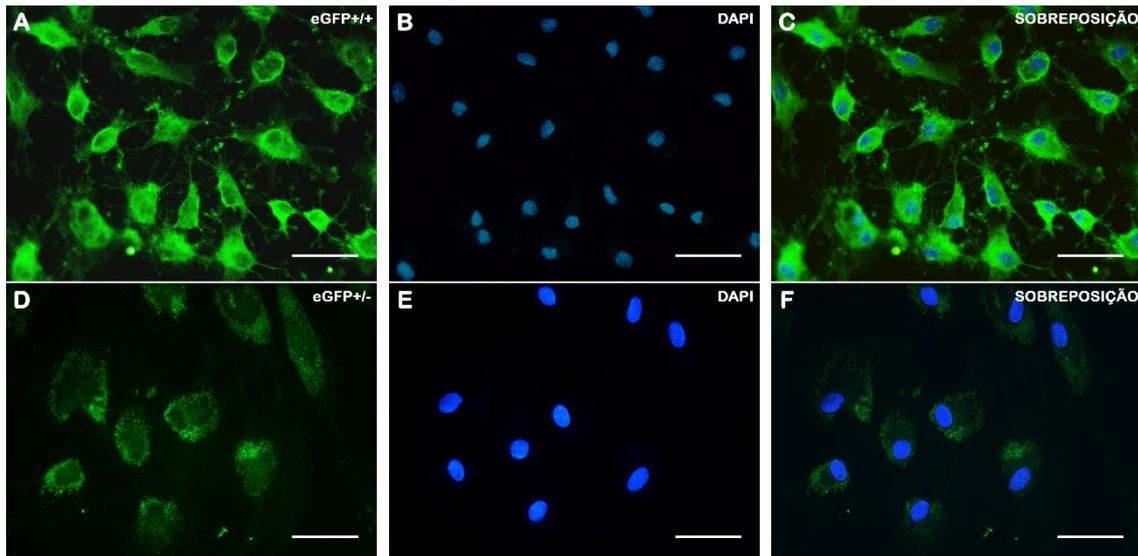


Figura 13: Imunomarcção fluorescente para a proteína eGFP em células tronco isoladas da polpa dentária de ratos Lewis transgênicos. O padrão de marcação da proteína de interesse foi, predominantemente, citoplasmático em células homozigotas (A) e heterozigotas (B) para o transgene. A marcação dos núcleos celulares com DAPI (B e E) e a sobreposição dos canais de cores (C e F) comprovou a presença da proteína em toda a população de células obtidas. Barra = 50µm.

4.2.3. Potencial osteogênico das CTPDs isoladas

CTPDs isoladas foram plaqueadas em placas de cultura após a 3ª passagem para avaliar seu potencial osteogênico após 14 dias de indução química. O estado funcional das células diferenciadas em osteoblastos foi mensurado pela detecção de nódulos de mineralização. Depósitos de cálcio foram corados com solução de vermelho de alizarina e comparados com uma cultura de osteoblastos imortalizados que serviram como controle positivo da técnica. O início da deposição de cálcio ocorreu aos 7 dias de cultivo (Figura 14 A), com a visualização de áreas de brilho entre as células, como *clusters* sobre a monocamada (Figura 14 B). Este aspecto brilhante dos grumos marca a fase inicial da deposição de minerais e é um achado comum nas culturas de osteoblastos previamente à visualização das calcificações marrons sobre a monocamada. Aos 14 dias, a revelação com o corante demonstrou intensa mineralização, com aspectos semelhantes entre as duas populações celulares (Figura 15).

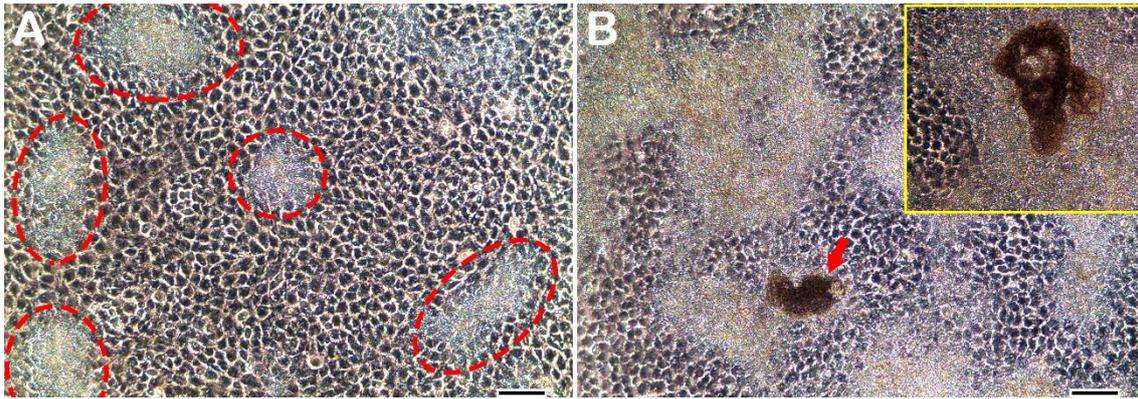


Figura 14: Deposição de matriz mineralizada em culturas de CTPDs cultivadas com meio químico de diferenciação osteoblástica. O início da mineralização foi evidenciado aos 7 dias de cultura (A, círculos tracejados), gerando grumos de mineralização aos 14 dias (B, seta vermelha e destaque, no mesmo aumento). Barra = 100 μ m.

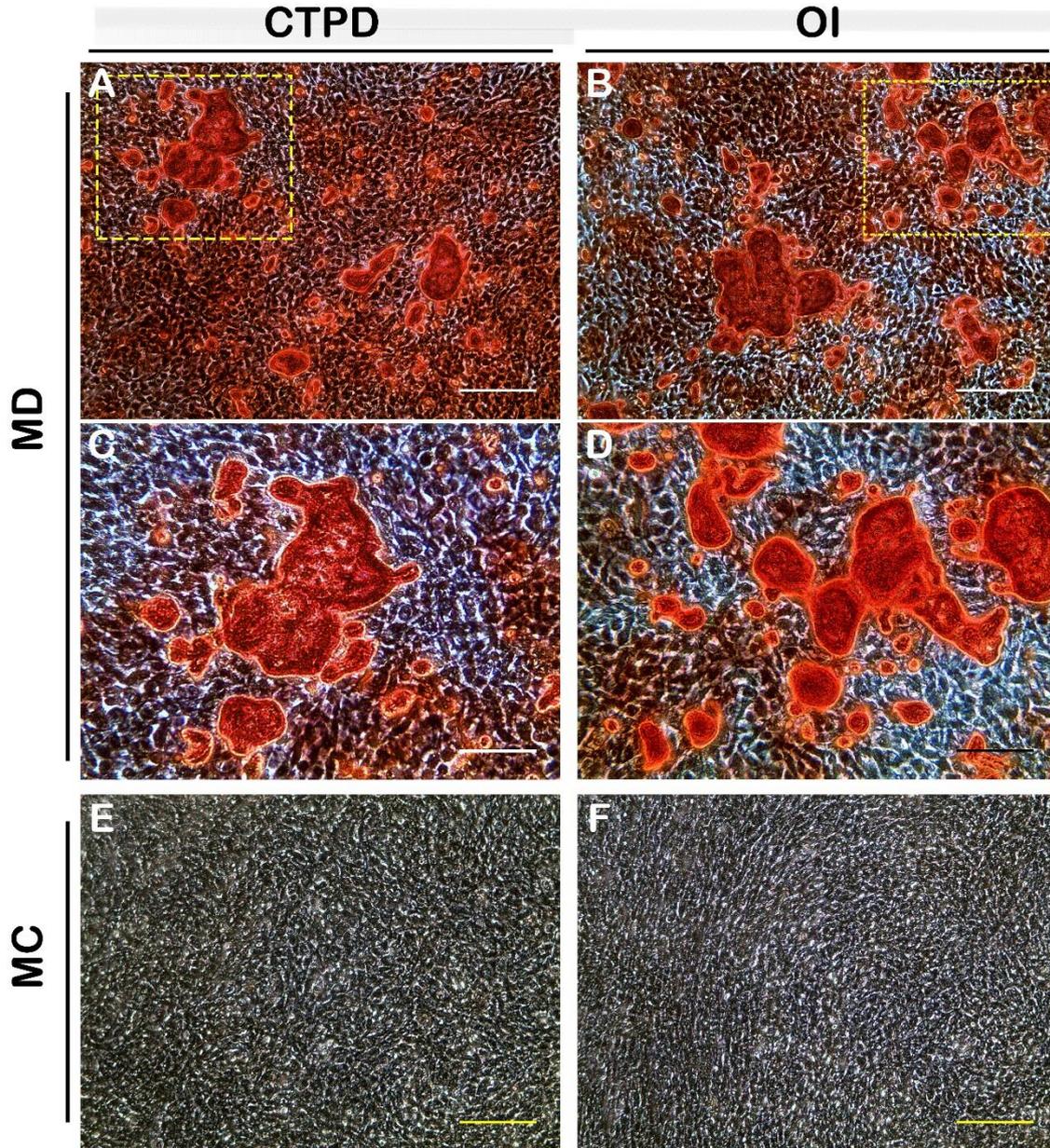


Figura 15: Coloração de vermelho de alizarina sobre a matriz mineralizada produzida pelas CTPDs e osteoblastos imortalizados (OI). Após 14 dias mantidas em meio de diferenciação (MD), a deposição mineral gerada pelas CTPDs apresentou-se difusa entre as células sobre a monocamada e também em depósitos distintos – área tracejada (A). Grupos de mineralização apresentados em maior aumento (C). De forma similar, a cultura de osteoblastos imortalizados, utilizados como controle positivo da técnica apresentou deposição sobre a monocamada (B), gerando, também, núcleos de mineralização (D). Como controle negativo da coloração, foram utilizadas culturas de CTPDs (E) e OI (F) mantidas apenas em meio de crescimento (MC) pelo mesmo período de 14 dias. Barras A-B e E-F 200 μ m; C-D 100 μ m.

4.3. Avaliações *in vivo*

4.3.1. Avaliação clínica (macroscópica) do sítio cirúrgico

Para a avaliação da influência dos enxertos no fechamento das feridas cirúrgicas, foram feitas tomadas fotográficas padronizadas, para a avaliação do índice de epitelização da mucosa. Aos 14 e 49 dias o fechamento da mucosa gengival estava completo em todos os

grupos independentemente do tipo de enxerto (Figura 16 - A, imagem representativa). Aos 7 dias, as feridas apresentaram diferentes níveis de cicatrização gengival (Figura 16 B-E), entretanto os testes estatísticos não revelaram diferença entre os grupos, como demonstrado na Figura 17. Deve-se ressaltar que as colunas mais altas representam maior percentual de tecido de granulação, portanto, menor nível de cicatrização ou epitelização gengival. Observa-se que todos os tratamentos induziram uma pequena melhora na cicatrização gengival em relação ao grupo controle (não enxertado) sem, entretanto, alcançarem o nível de significância estatística pelo teste *one-way* ANOVA (Figura 17).

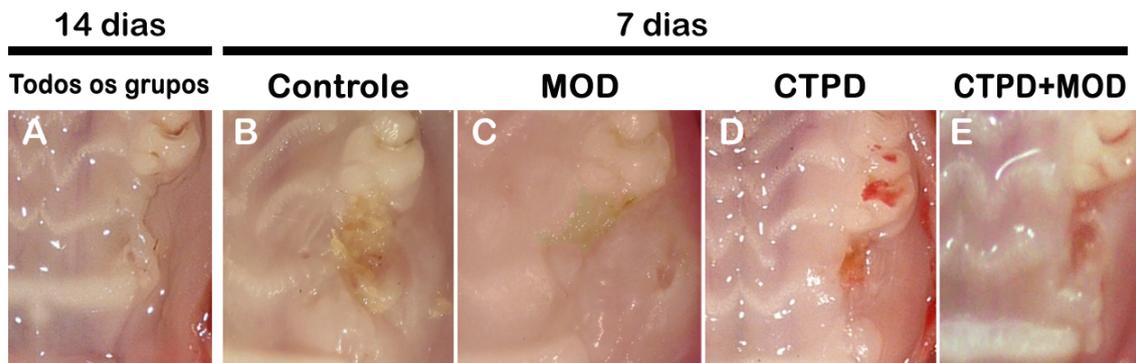


Figura 16: Avaliação clínica do sítio cirúrgico. (A) imagem ilustrativa do aspecto de cicatrização epitelial completo sobre a área cirúrgica, similar a todos os grupos aos 14 e 49 dias. Aos 7 dias o epitélio gengival não estava completamente fechado nos animais. Houve maior incidência de tecido de granulação nos animais do grupo controle (B), seguido pelo grupo que recebeu a MOD. Os grupos que receberam apenas as CTPDs (D) ou a associação proposta (E) tiveram os melhores resultados, respectivamente.

Nível de epitelização sobre a área cirúrgica

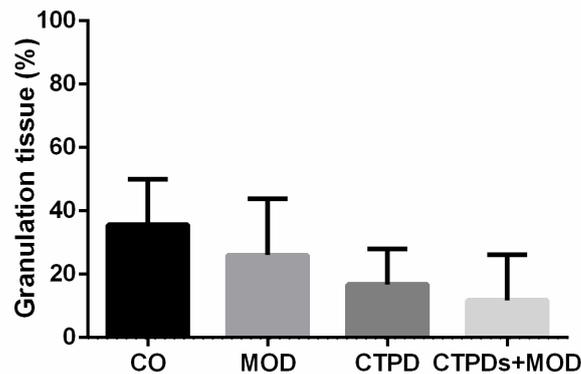


Figura 17: Índice de epitelização sobre o sítio cirúrgico após 7 dias do procedimento. Apesar da tendência de melhora da cicatrização, não houve significância na diferença entre os índices encontrados na comparação entre os grupos pelo teste *one-way* ANOVA.

4.4. Avaliações microscópicas

4.4.1. Análise histomorfométrica da deposição óssea

Cortes semiseriados dos defeitos ósseos, corados em Tricrômico de Massom, foram avaliados para análise da deposição óssea por meio do software *ImageJ*. A Figura 18 apresenta imagens ilustrativas dos 4 grupos experimentais após 7 dias da enxertia.

Aos 7 dias observou-se o início da formação de trabéculas ósseas na porção inferior do defeito criado. O grupo controle (CO) apresentou o menor número de trabéculas neoformadas (Figura 18 A) em comparação com todas as outras enxertias. Em seguida, a utilização da matriz óssea desmineralizada (MOD) isolada apresentou uma neoformação trabecular semelhante a apresentada pelo grupo controle, também restrita a porção do fundo do defeito, próxima a parede palatina (Figura 18 B). A utilização de CTPDs para a enxertia mostrou-se vantajosa tanto em seu uso isolado (Figura 18 C), quanto associadas à MOD (Figura 18 D). Estes tratamentos apresentaram trabéculas ósseas que se estendiam da região do fundo do defeito, assim como os demais grupos, até a porção média e superior.

A análise estatística dos níveis de deposição óssea (Figura 21) aos 7 dias confirmou o aspecto histológico revelado pela coloração, onde a utilização da MOD isolada se mostrou semelhante ao grupo CO. Entretanto, a utilização das CTPDs mostrou-se capaz de acelerar a osteogênese quando comparada ao grupo MOD. Este efeito foi potencializado pela associação das CTPDs+MOD, que apresentou o maior nível de deposição óssea.

7 dias

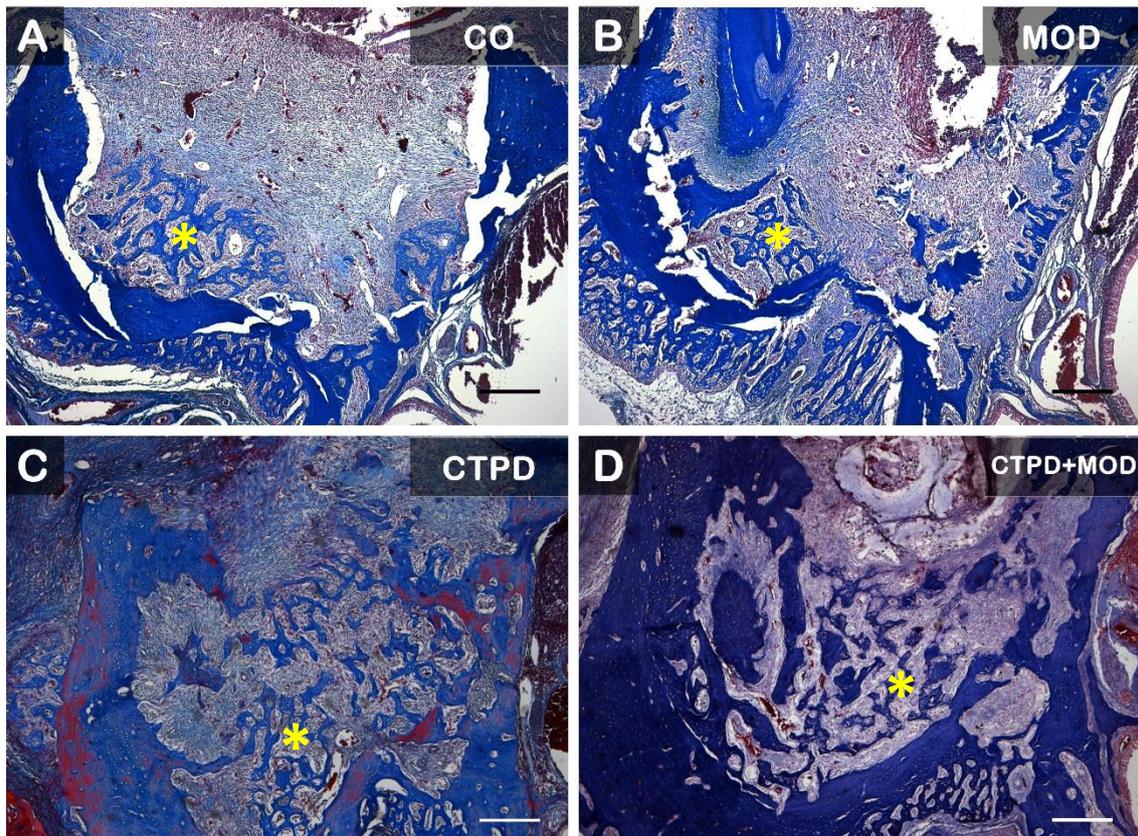


Figura 18: Nível de deposição óssea aos 7 dias. A coloração com tricrômico de Masson revelou maior formação de trabéculas ósseas (*) na porção basal dos defeitos, em todos os grupos. O aspecto trabecular denso foi observado no grupo enxertado com a associação de células tronco e matriz desmineralizada (D). A enxertia de CTPDs isoladas (C) também se mostrou mais eficiente que a utilização da MOD (B), entretanto, não houve diferença estatística destes dois grupos em relação ao preenchimento natural pelo coágulo sanguíneo no grupo controle (A). Barras = 300 μ m.

O período de 14 dias constitui uma fase intermediária do reparo, onde a influência dos biomateriais pode ser melhor observada. A formação de trabéculas ósseas foi observada em todos os grupos, agora também nas regiões centrais do defeito e próximas a parede vestibular. Todos os enxertos tiveram níveis de deposição óssea superiores ao grupo coágulo (Figura 19 A). Entretanto, o grupo tratado com a associação de CTPD+MOD (Figura 19 D) revelou o melhor resultado, apresentando trabéculas ósseas mais densas, alcançando a margem superior do defeito. Em seguida, o emprego das CTPDs isoladas (Figura 19 C) apresentou níveis de formação óssea superiores ao grupo MOD (Figura 19 B). O gráfico representado na Figura 21 ilustra estes resultados.

14 dias

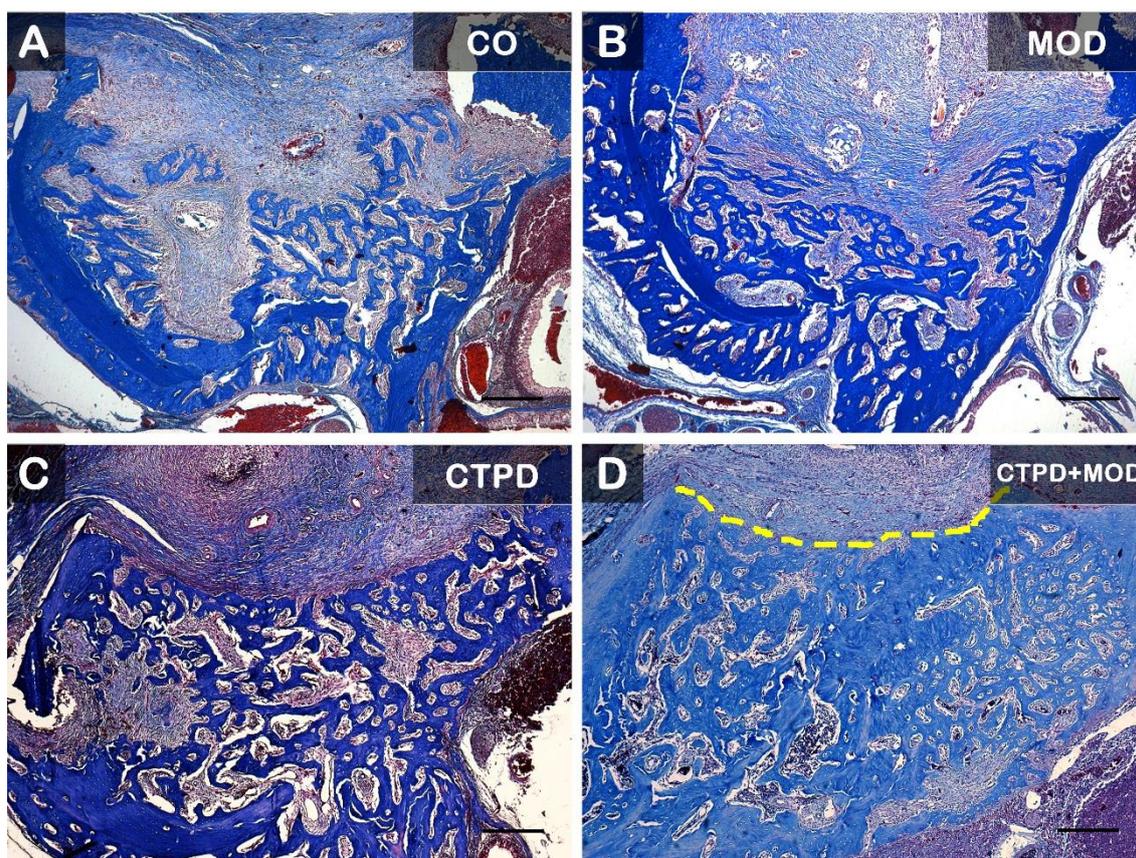


Figura 19: Nível de deposição óssea aos 14 dias. A coloração histológica demonstrou menor índice de trabéculas nos grupos CO (A) e que receberam a MOD isolada (B). Embora o emprego da MOD tenha estimulado a formação óssea, as maiores deposições de trabéculas ósseas foram observadas nos grupos enxertado com as CTPD (C) e a associação CTPD+MOD (D). A análise estatística demonstrou que a osteogênese do grupo da associação foi maior que os demais grupos. A linha tracejada em amarelo representa o nível de deposição óssea mais alto em relação aos outros grupos, que alcançou as bordas originais do defeito. Tricrômico de Massom. Barra = 300 μ m.

O último período avaliado, de 49 dias, corresponde ao estágio mais avançado do reparo, apresentando maior volume de osso formado. A observação do defeito demonstrou a redução das trabéculas finas, que deram lugar a um tecido ósseo mais compacto (Figura 20). Neste período, a quantificação de deposição óssea foi semelhante entre os grupos enxertados com o coágulo sanguíneo, a MOD e as CTPDs isoladas (Figura 20 A-C). Entretanto, a associação de CTPD+MOD, assim como nos demais períodos, demonstrou maior quantidade de tecido ósseo formado (Figura 20 C).

49 dias

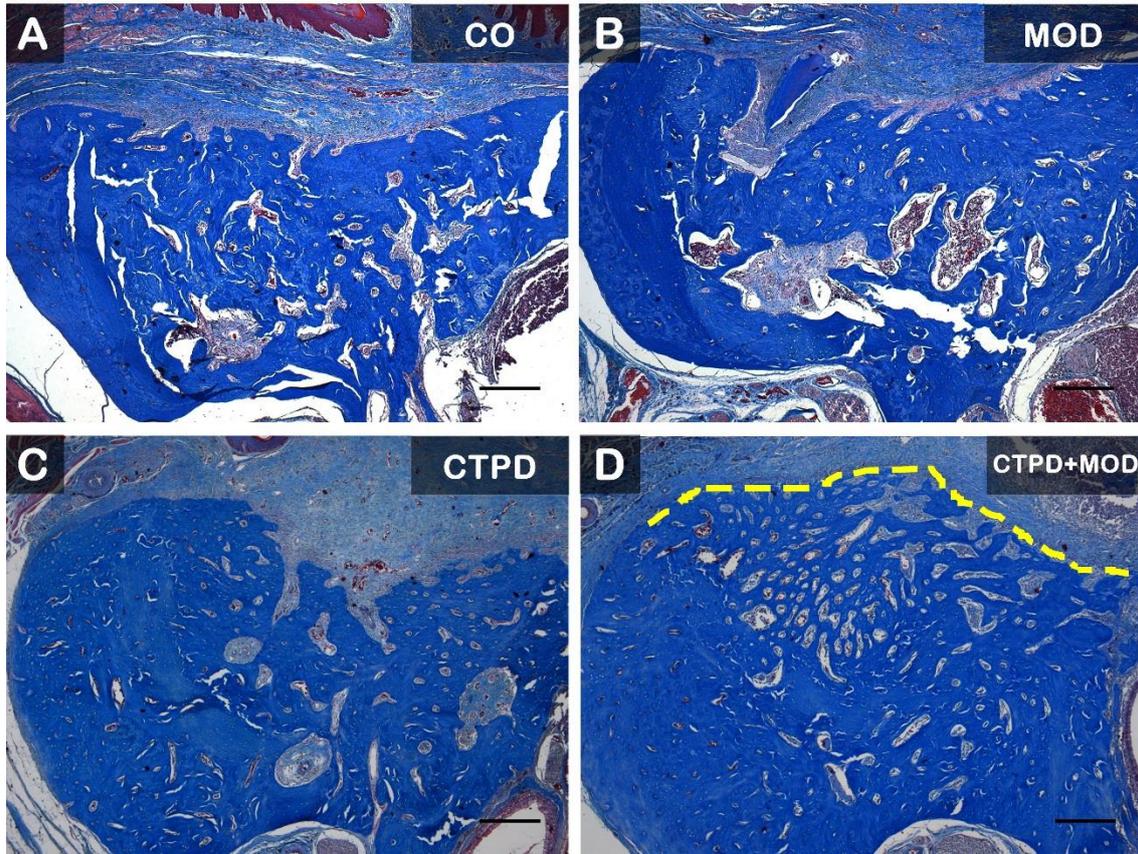


Figura 20: Nível de deposição óssea aos 49 dias. O período mais avançado de avaliação do reparo ósseo proposto pelo estudo demonstrou o predomínio de matriz óssea mineralizada com aspecto mais condensado. O nível de deposição óssea foi semelhante entre os grupos preenchidos pelo coágulo sanguíneo, CO, (A), a MOD(B) e as CTPDs isoladas (C), sem diferenças estatísticas. Entretanto, a associação de CTPD+MOD) mais uma vez, proporcionou maior formação óssea na região do defeito e um contorno mais positivo (linha tracejada amarela) indicando menor perda de volume. Tricrômico de Massom. Barra = 300 μ m.

De maneira geral, a associação de CTPD+MOD mostrou-se mais eficiente em todos os períodos avaliados. (Figura 21). Este resultado positivo foi encontrado mesmo nos períodos de 7 e 49 dias, em que a deposição óssea foi semelhante entre alguns grupos. O segundo melhor índice de indução óssea foi encontrado no grupo que recebeu apenas as CTPDs isoladas. Entretanto, no período final de avaliação desse grupo, 49 dias, os valores encontrados na morfometria não são superiores aos grupos CO e MOD, estando, ainda, inferiores aos obtidos pela enxertia associada entre as células e a matriz desmineralizada.

Neoformação óssea

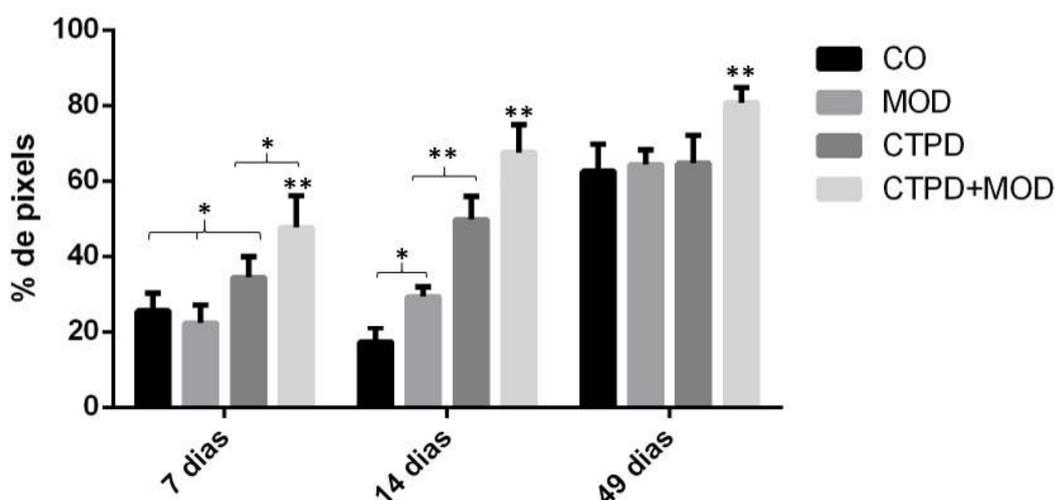


Figura 21: Quantificação de deposição óssea aos 7, 14 e 49 dias. Os níveis de deposição óssea nos defeitos enxertados com a associação de CTPD+MOD foram estatisticamente superiores aos demais grupos em todos os períodos avaliados. Nos períodos de 7 e 14 dias, o grupo enxertado apenas com as CTPDs apresentou o segundo maior índice de mineralização, estatisticamente superior aos grupos que receberam apenas a matriz desmineralizada (MOD) e o controle (CO). Aos 7 dias, não houve diferença estatística entre MOD e CO. Aos 49 dias, o grupo CTPD+MOD apresentou a maior contagem de pixels, indicando a maior formação óssea do período. Não houve diferença estatística entre os demais grupos. Teste estatístico *one-way* ANOVA. (*) $p < 0,05$. (**) $p < 0,01$.

4.4.2. Análise histomorfométrica da maturação da matriz colágena

Cortes semiseriados foram corados com PicroSirius Red para evidenciar o aspecto de maturação das matrizes colágenas depositadas na região do defeito. As amostras foram observadas em microscopia de luz polarizada e fotografadas com o sistema de captura QCapture 6.0 para a análise morfométrica com o software *ImageJ*. Pranchas comparativas do aspecto geral dos resultados histológicos encontrados com a coloração de PicroSirius para todos os grupos são apresentadas nas Figuras 22 e 23.

Os resultados da avaliação morfométrica estão representados na Figura 24. Essa análise revelou, aos 7 dias, maior quantidade de fibras maduras nos grupos CTPD e CTPD+MOD ($p < 0,01$) (Figura 24). Dentre esses tratamentos, o maior índice de maturação óssea foi encontrado na associação de células e matriz. Não houve diferença estatística entre a maturação de colágeno nos grupos CTPD e MOD, comparados com o grupo CO. O uso de CTPD isolado, entretanto foi superior em relação ao resultado de MOD ($p < 0,01$). No período de 14 dias, a análise de maturação da matriz revelou que não houve diferença entre as enxertias de MOD e CTPD em relação ao CO ou entre si. O maior índice de

maturação foi observado na associação de CTPD+MOD ($p<0,01$), quando comparado com o CO e MOD, embora esse grupo não tenha apresentado diferenças significativas com o emprego das CTPDs isoladas. A maturação óssea no período de 49 revelou que todas as enxertias apresentaram maior índice de maturação da matriz sintetizada, quando comparadas ao controle ($p<0,01$). Não houve, diferenças significativas entre os grupos MOD, CTPD e CTPD+MOD.

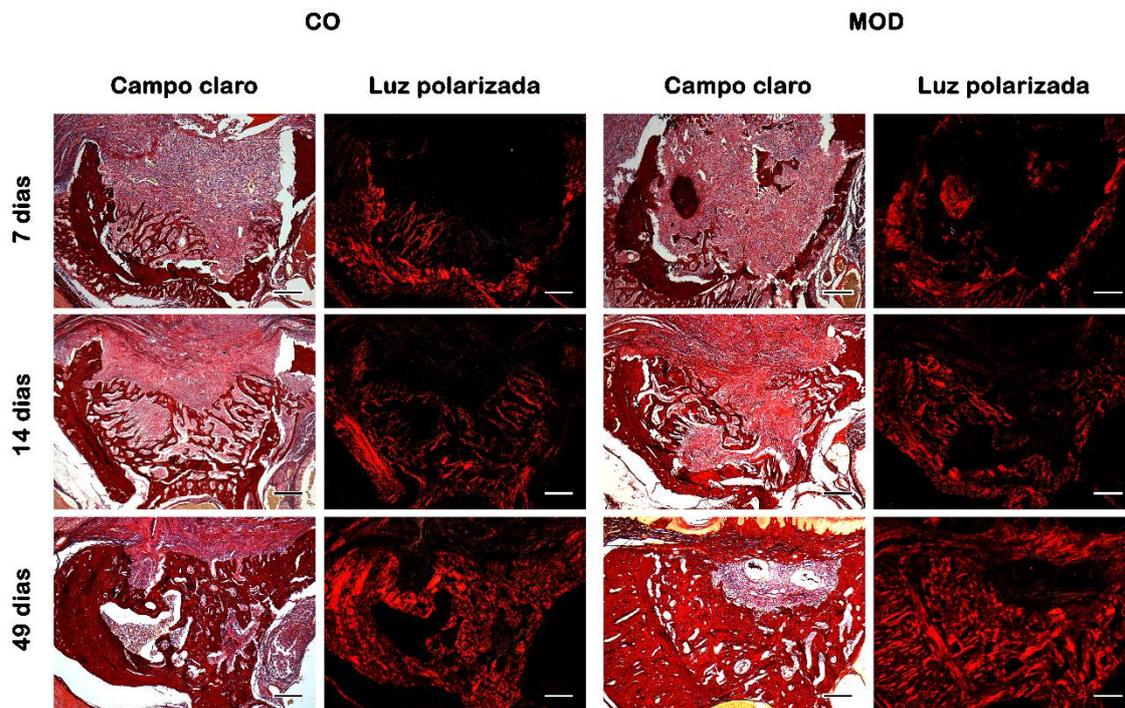


Figura 22: Aspecto de maturação da matriz colágena nos grupos CO e MOD ao longo dos períodos avaliados. A coloração de PicroSirius *Red* permitiu a visualização das matrizes colágenas maduras (Luz polarizada), em contraste com o campo claro. Houve aumento gradual da maturação das fibras no interior dos defeitos. Mesmo aos 7 dias, já há sinais de deposição de algumas fibras maduras na espessura das trabéculas neoformadas. O aspecto de maturação aos 49 dias parece ser maior no grupo MOD do que no controle, o que foi confirmado pela análise morfométrica PicroSirius *Red*. Barra = 300 μ m.

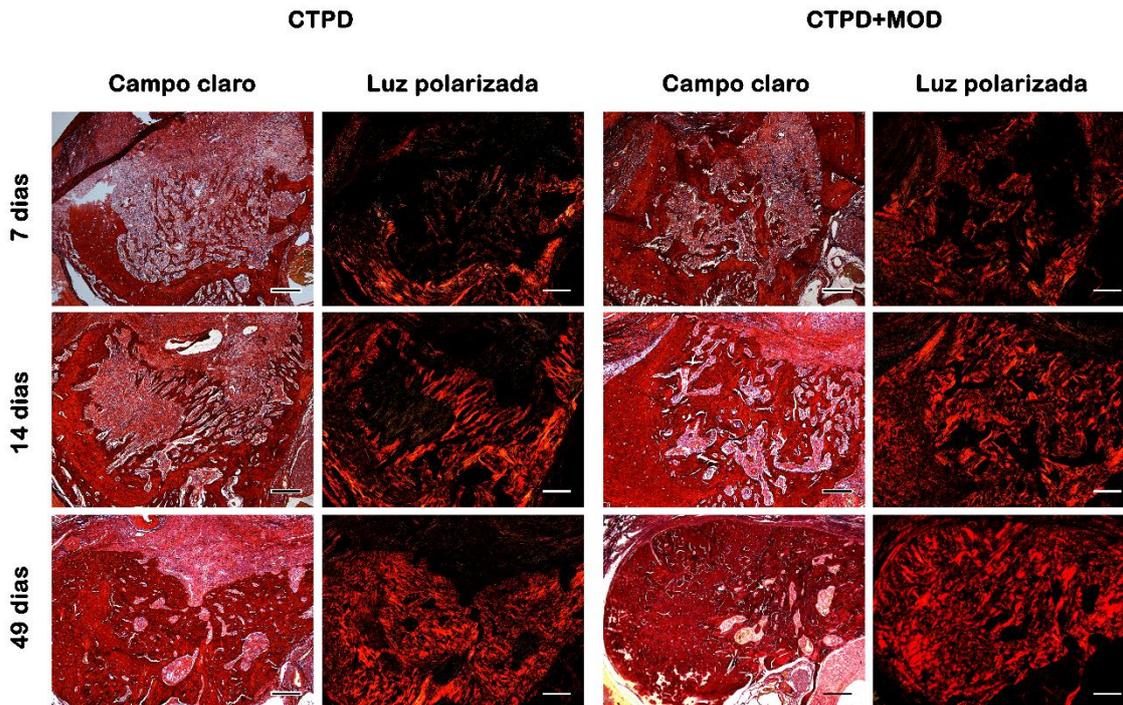


Figura 23: Aspecto de maturação da matriz colágena nos grupos CTPD e CTPD+MOD ao longo dos períodos avaliados. A coloração de PicroSirius Red permitiu a visualização das matrizes colágenas maduras (Luz polarizada), em contraste com o campo claro. Nota-se, à luz polarizada, o aumento gradual da maturação das fibras ao longo dos períodos de avaliação, em ambos os grupos, de modo proporcional à neoformação óssea observada em campo claro. PicroSirius Red. Barra = 300 μ .

Deposição de matriz colágena madura

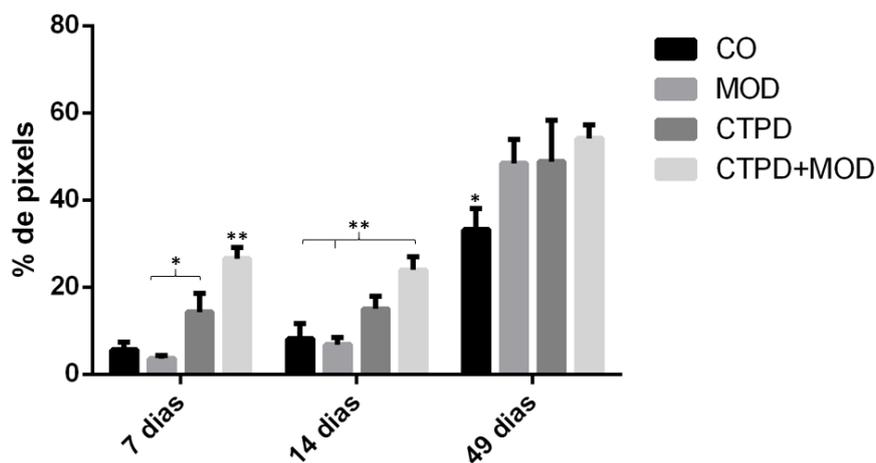


Figura 24: Morfometria da deposição de matriz colágena madura nos períodos de 7, 14 e 49 dias. A análise por microscopia de luz polarizada revelou que aos 7 dias, a associação CTPD+MOD apresentava maior quantidade de matriz colágena madura em relação a todos os grupos. O CTPD foi superior ao grupo MOD e esse foi semelhante ao grupo CO. Aos 14 dias, a associação CTPD+MOD apresentou quantidades de matriz madura estatisticamente superiores aos grupos CO e MOD. Os demais grupos apresentaram valores estatisticamente semelhantes. No período final de avaliação, 49 dias, todos os grupos de enxertia se mostraram melhores que o grupo controle. Entretanto, não houve diferença estatística entre eles. One way ANOVA. (*) $p < 0,05$. (**) $p < 0,01$.

O nível de maturação óssea ao final do processo de reparo é fundamental para o sucesso dos tratamentos de enxertia e o reestabelecimento das funções ósseas na região. Além disso, o tipo de osso formado influencia a seleção das próteses ou implantes a serem instalados no sítio operado. Por essa razão, um refinamento da leitura do PicroSirius *Red* no período final do reparo (49 dias) foi realizado, dessa vez desconsiderando quaisquer outras fibras colágenas dentro da área do defeito que não fossem as trabéculas ósseas, como as naturalmente presentes no tecido conjuntivo de reparo. Desta forma, para uma avaliação mais concreta, o percentual de matriz óssea madura foi reajustado por uma relação matemática entre os valores obtidos pela morfometria de PicroSirius *Red* e a de Tricrômico de Massom. Para tanto, consideramos o percentual de neoformação óssea como o valor referencial de 100%, sobre o qual a porcentagem de maturação encontrada na análise de PicroSirius *Red* foi calculada por proporcionalidade direta.

Os resultados da proporcionalidade demonstraram que a maior quantidade de matriz óssea madura foi encontrada no grupo CTPD+MOD (78,89%), seguido dos grupos CTPD (77,74%) e MOD (75,37%). O grupo controle apresentou o menor percentual de matriz óssea madura, de 53,14%. Os resultados estão representados na Figura 25.

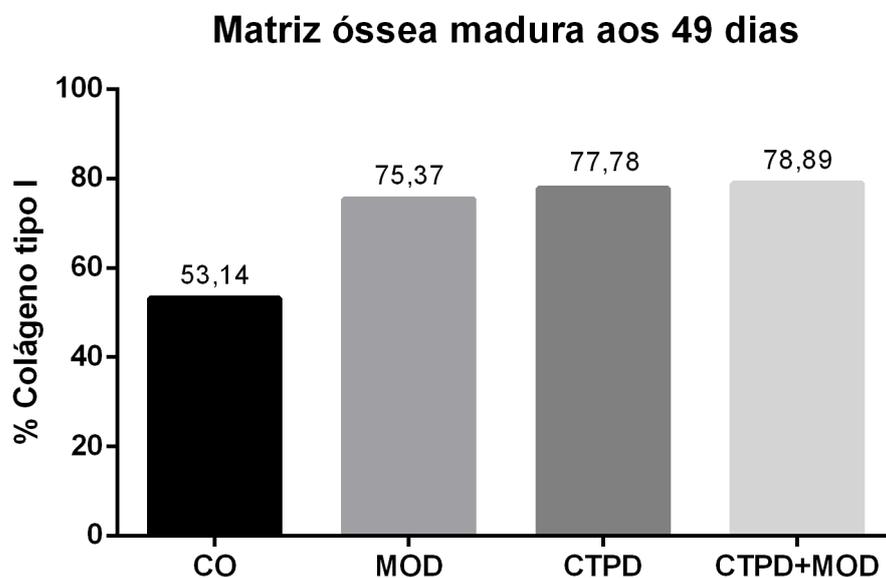


Figura 25: Quantificação de matriz óssea madura no período de 49 dias. A relação entre os percentuais de neoformação óssea e de maturação de matriz demonstraram que a associação do biomaterial às células tronco apresentou maior quantidade de osso maduro no período final de avaliação. A enxertia das células isoladas gerou o segundo melhor percentual de maturação óssea, seguido do grupo que recebeu a matriz isolada. Todas as enxertias, entretanto, produziram maior quantidade de ossos maduros em relação ao controle.

4.4.3. Aspectos histológicos

Cortes corados com H&E foram selecionados para a descrição de alguns aspectos histológicos do tecido em reparo presente nos defeitos ósseos. Esta coloração permitiu evidenciar a magnitude da resposta inflamatória em resposta as enxertias, além de permitir a visualização das células envolvidas nos mecanismos de reparo. Adicionalmente, esta coloração permitiu acompanhar as lâminas de matriz desmineralizada enxertadas (grupos MOD e CTPD+MOD), sua integração com o tecido circunvizinho e sua reabsorção ao longo do tempo (Figura 32).

O fechamento da ferida por epitelização é fundamental para que o processo de regeneração ocorra de maneira adequada, livre de interferentes externos que possam agravar quadros inflamatórios. Para a avaliação histológica, foram consideradas apenas as enxertias que retinham a matriz desmineralizada empregada (grupos MOD e CTPD+MOD), e sem a presença de corpos estranhos no interior dos defeitos. Os animais que não apresentavam esse aspecto foram descartados das análises histomorfométricas.

A avaliação do epitélio sobre a área cirúrgica revelou resultados semelhantes aos achados na avaliação macroscópica da epitelização sobre a área dos defeitos (Figura 26). No período de 7 dias, o epitélio encontrava-se, em geral, ainda aberto em todos os grupos, CO, MOD, CTPD e CTPD+MOD. Nos grupos que não apresentaram o fechamento completo do epitélio, foi observada a presença de infiltrado inflamatório mais concentrado nas regiões superiores dos defeitos, onde foi observada solução de continuidade em comunicação com os contaminantes da cavidade bucal (Figura 26 setas).

Assim como os resultados indicados pela análise macroscópica, todos os grupos apresentaram epitelização completa nos períodos de 14 e 49 dias (Figura 26). Nesses períodos, observou-se a remissão do quadro inflamatório na região interna do defeito. Entretanto, em alguns animais ainda foi possível observar pequenos aglomerados de células inflamatórias no conjuntivo localizado abaixo do epitélio de revestimento do sítio cirúrgico, sem o comprometimento do processo de regeneração tecidual ósseo (Figura 26 H).

A análise qualitativa da deposição óssea foi realizada pela coloração de cortes em H&E (Figura 27 e Figura 28). Aos 7 dias os defeitos estavam preenchidos por tecido conjuntivo, sendo possível observar resquícios de matriz desmineralizada nos grupos MOD (Figura 27 B) e CTPD+MOD (Figura 28 B). Observa-se o início de deposição óssea em

trabéculas, na porção apical do defeito (Figuras 27 A e 28 A). Aos 14 dias, a neoformação óssea se estende até a porção mais cervical da cavidade em todos os grupos (Figura 27 C e D; Figura 28 C e D). Trabéculas mais densas e numerosas são observadas nos grupos CTPD (Figura 28 C) e CTPD+MOD (Figura 28 D). No período final de avaliação, 49 dias, os grupos CO (Figura 27 E), MOD (Figura 27 F) e CTPD (Figura 28 E) apresentaram níveis aproximados de deposição óssea. Foi observada, entretanto, a maior densidade e volume ósseo no grupo enxertado com CTPD+MOD (Figura 28 F).

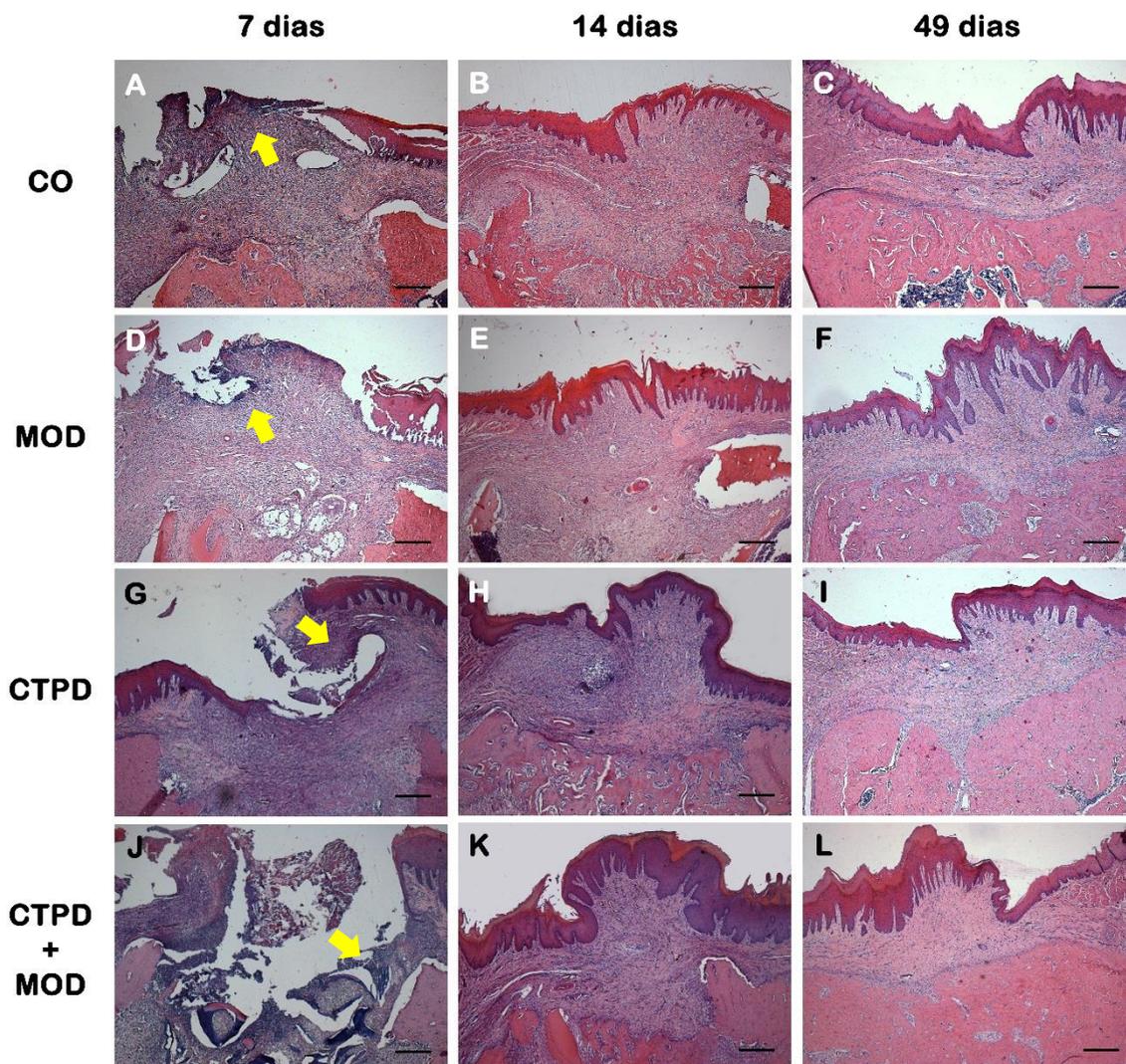


Figura 26: Aspecto histológico da epiteliação sobre a área cirúrgica aos 7, 14 e 49 dias. O período inicial de avaliação demonstrou aberturas no epitélio de revestimento em todos os grupos. As setas amarelas indicam a presença de infiltrado inflamatório em associação às áreas de comunicação com a cavidade bucal. Aos 14 e 49 dias, todos os grupos apresentaram epiteliação completa sobre a área do defeito ósseo. H&E. Barras = 300µm.

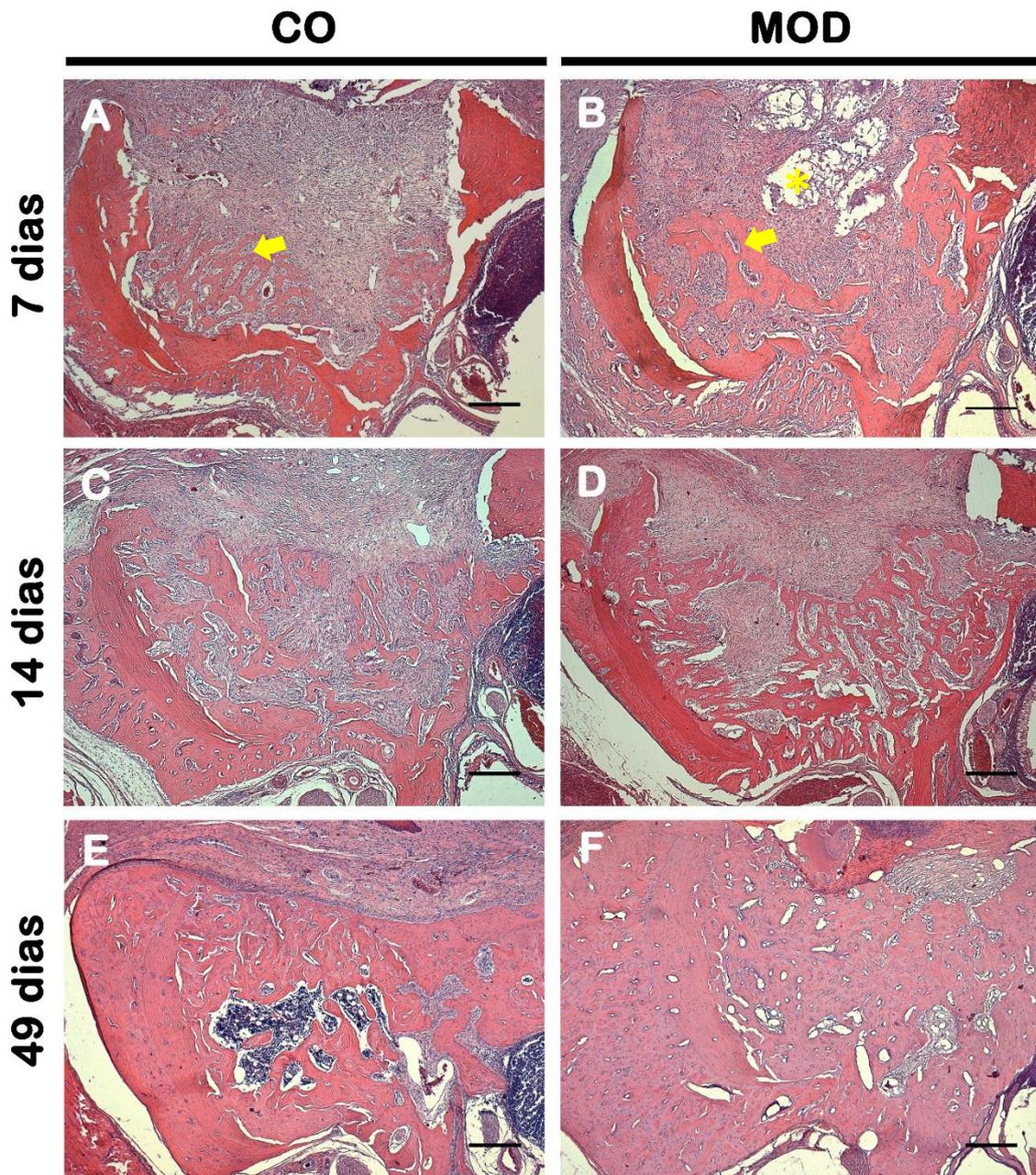


Figura 27: Aspecto morfológico temporal da deposição óssea no interior do defeito cirúrgico nos grupos CO e MOD. No período inicial de avaliação os defeitos ósseos estão preenchidos por tecido conjuntivo em ambos os grupos. Em B é possível observar a presença de lâminas de MOD preenchendo o defeito, entreposta às células do organismo (*). Ainda nesse período é observado o início de formação óssea na base dos defeitos (setas). Aos 14 dias (C e D), os grupos apresentam trabéculas em estágio de crescimento, com amplos espaços em seu interior, se estendendo até a porção superior dos defeitos ósseos. No período final de avaliação, 49 dias (E e F), a formação óssea apresentou aspecto denso, com menor número de trabéculas evidentes. Ainda é possível observar espaços medulares no interior da matriz do grupo CO (E). H&E. Barras = 300 μ m.

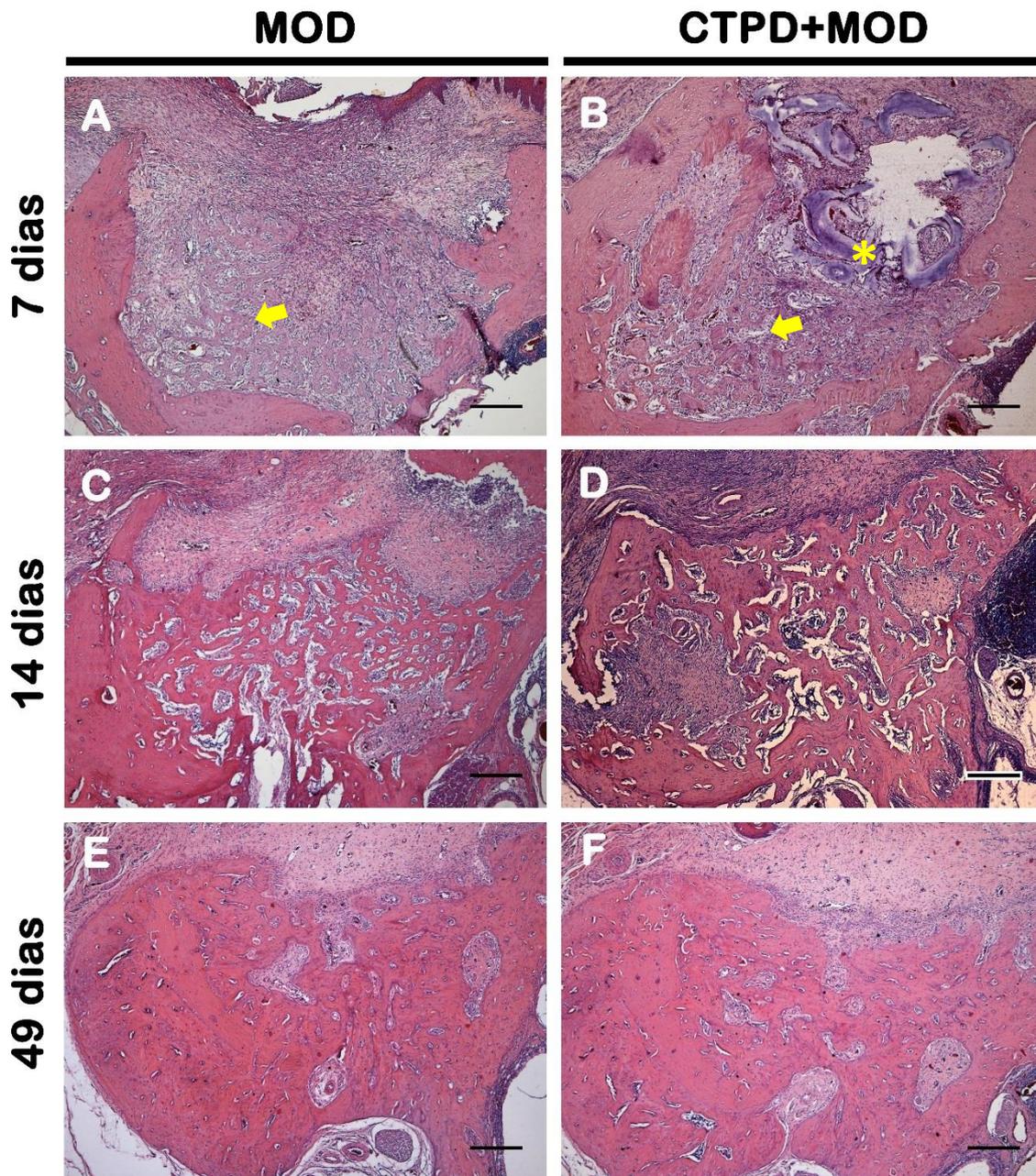


Figura 28: Aspecto morfológico temporal da deposição óssea no interior do defeito cirúrgico nos grupos CTPD e CTPD+MOD. Aos 7 dias, os defeitos ósseos estão preenchidos por tecido conjuntivo em ambos os grupos. Em B é possível observar a presença de lâminas de MOD preenchendo o defeito, entreposta às células do organismo (*). As setas em A e B indicam o início de formação óssea na base dos defeitos. Aos 14 dias (B e C), as trabéculas em estágio de crescimento alcançaram a porção superior dos defeitos ósseos. No período final de avaliação, 49 dias (D e E), a formação óssea apresentou aspecto denso, com menor número de trabéculas evidentes. H&E. Barras = 300 μ m.

Embora a avaliação da angiogênese e a quantificação de vasos sanguíneos formados nos defeitos ósseos fuja do escopo desse trabalho, as análises histológicas permitiram avaliar qualitativamente a formação de vasos sanguíneos na área enxertada. A Figura 29 mostra capilares sanguíneos justapostos às paredes ósseas do sítio cirúrgico e das trabéculas em formação (A-C). Este achado foi visualizado em todos os grupos de enxertia. Além disso,

foram observados vasos em crescimento próximos as lâminas do biomaterial nos grupos MOD e CTPD+MOD (D).

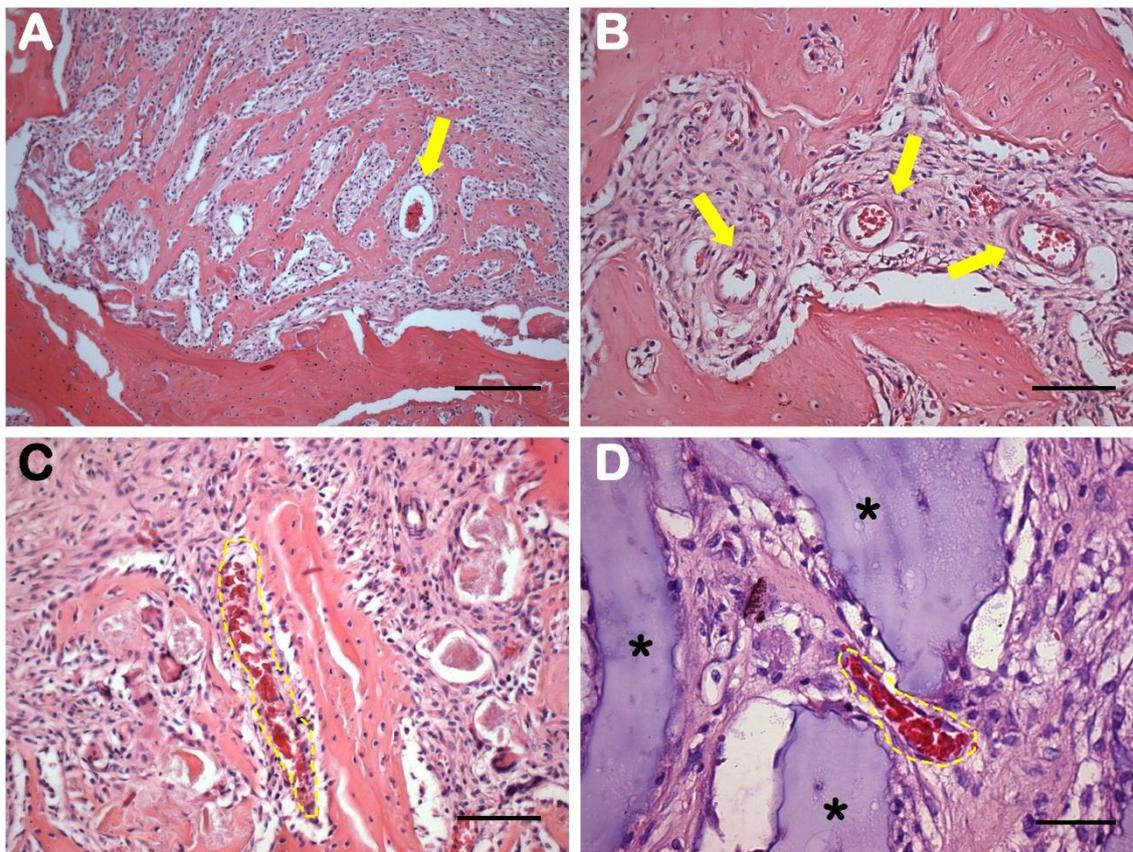


Figura 29: Angiogênese no interior dos defeitos ósseos durante o processo de reparo. A formação de vasos sanguíneos foi observada, principalmente nas regiões de neoformação óssea, próximas à base dos defeitos em todos os grupos de estudo (A) Imagem representativa, obtida do grupo CO da presença de vasos no período de 7 dias (A-C). O processo de angiogênese foi observado no tecido conjuntivo entre as trabéculas ósseas recém-sintetizadas (A – seta) e também em áreas de neoformação posteriormente ao processo de reabsorção das paredes do osso original (B setas). Além disso, as imagens C e D detalham o processo angiogênico ocorrido nos períodos iniciais de avaliação, aos 7 dias (linhas pontilhadas). Em D é possível notar a formação de vasos próximos a fragmentos de matriz desmineralizada, de aspecto basófilo, proveniente da enxertia; aspecto este observado em ambos os grupos MOD e CTPD+MOD (*). H&E. Barras A = 300 μm ., B e C = 100 μm ; D=40 μm .

A atividade das células osteoblásticas e osteoclásticas também foi monitorada pela coloração de H&E. Como processo inicial do reparo, observou-se em todos os grupos, a reabsorção das paredes ósseas dos defeitos (Figura 30 A), promovida por células gigantes, multinucleadas e com coloração acidófila, com morfologia sugestiva de osteoclastos. (Figura 30 B). De maneira similar, essas células foram observadas justapostas a fragmentos de matriz desmineralizada em processo de reabsorção nos grupos MOD e CTPD+MOD (Figura 30 C -D).

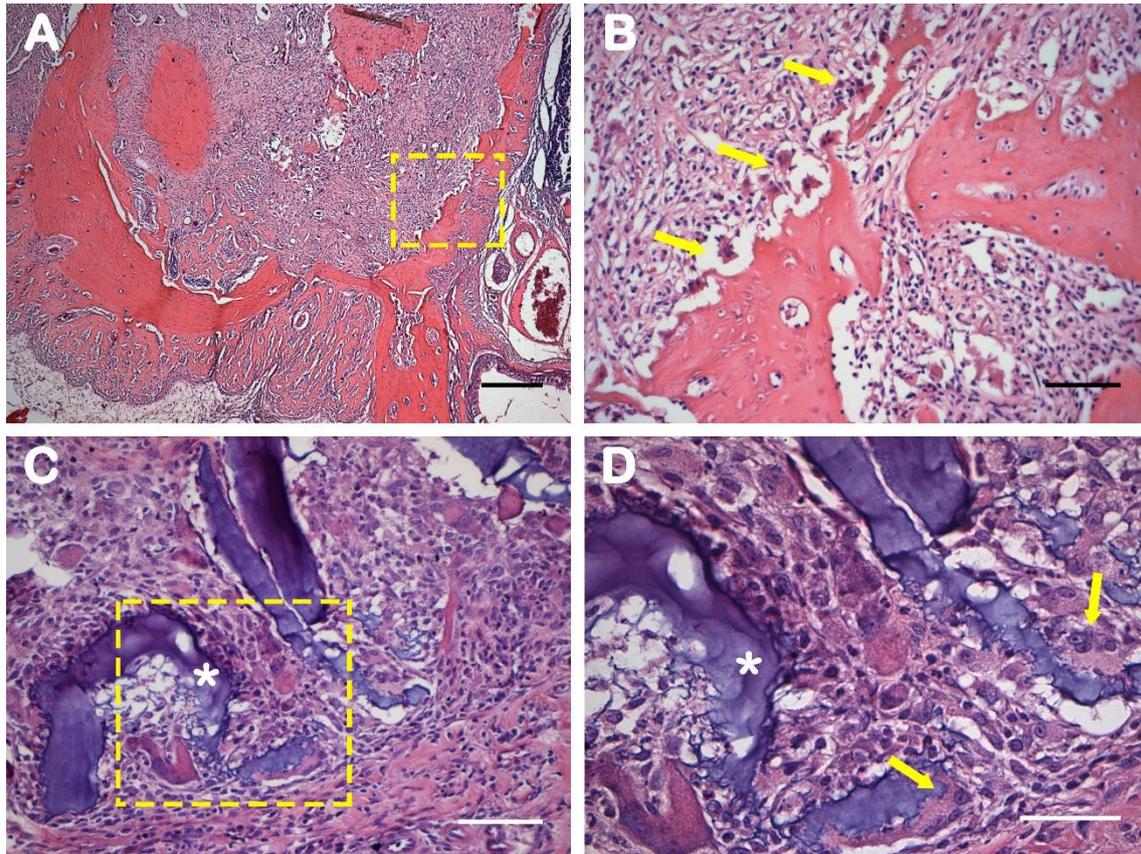


Figura 30: Presença de células com morfologia sugestiva de osteoclastos (setas) nas paredes remanescentes do defeito ósseo; aspecto evidenciado em todos os grupos (A e B); bem como células multinucleadas (células tipo corpo estranho /células clásticas) junto à matriz desmineralizada enxertada (C). (D) Ampliação da área selecionada em C. Observa-se a justaposição dessas células à matriz desmineralizada empregada nos grupos MOD e CTPD+MOD (*), em uma região de reabsorção. H&E. Barra A = 300µm. B = 80µm, C = 80µm e C = 40µm.

Por outro lado, o início da síntese de matriz óssea foi observado nas regiões basais, junto das paredes ósseas no período inicial de avaliação, 7 dias; e de maneira difusa, uma matriz osteóide estava presente entre as trabéculas neoformadas, dentro dos limites originais dos defeitos (Figura 31). A presença de osteoblastos de morfologia ativa foi observada nas regiões de deposição de matriz, principalmente entre as trabéculas ósseas aos 14 dias. (Figura 31 B). A Figura 31 B e C demonstra a presença de osteoblastos enfileirados em regiões trabeculares justapostas as paredes ósseas do defeito. Tais aspectos foram identificados em todos os grupos. Portanto, as imagens selecionadas para a montagem da figura 29 são representativas dos achados nos 4 grupos avaliados (CO, MOD, CTPD e a associação CTPD+MOD). Além disso, em (C e D) é possível observar fragmentos de MOD bem integradas à matriz óssea neoformada, além de osteoblastos envolvidos por osteóide nas margens do defeito.

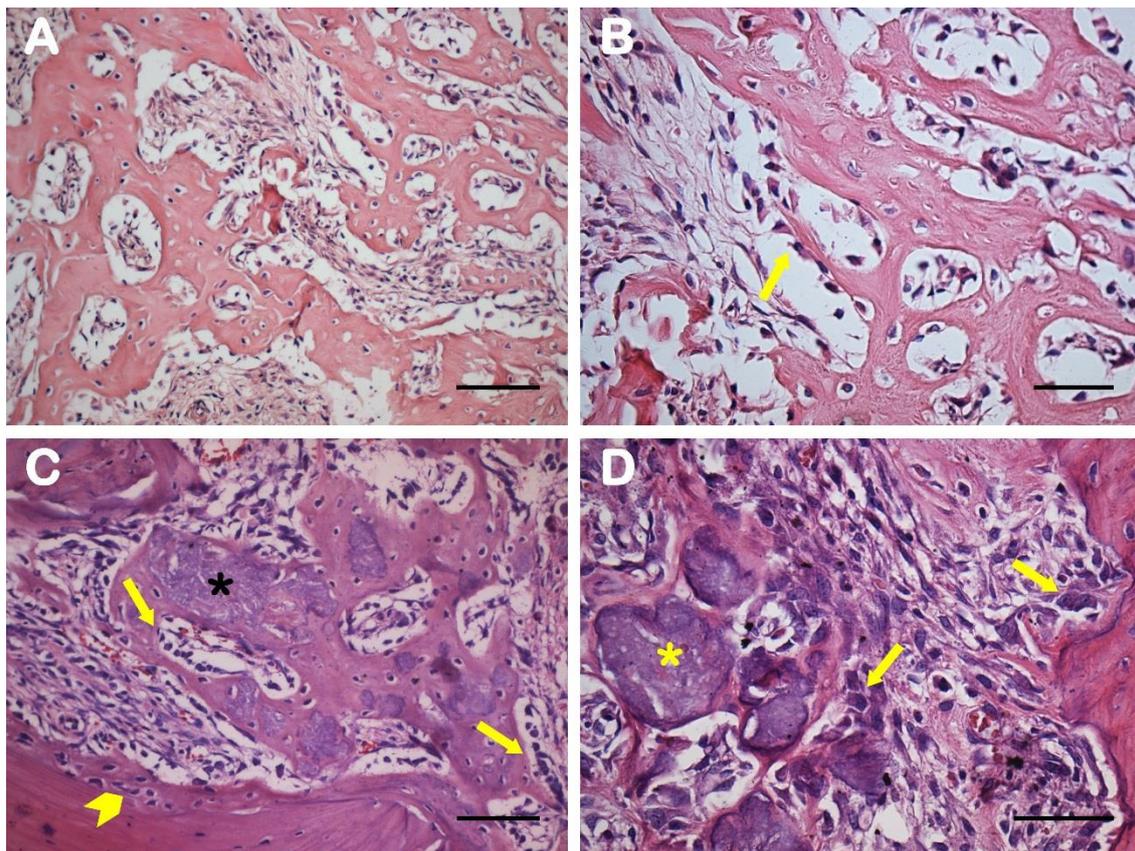


Figura 31: Imagens histológicas da deposição óssea no defeito com osteoblastos ativos junto as trabéculas (A e B) e em síntese de osteóide, próximo ao biomaterial enxertado. Em (A) nota-se as trabéculas neoformadas, aos 7 dias, com aspecto imaturo, muito celular com inúmeros osteócitos desorganizados, recém incluídos na matriz óssea. (B) osteoblastos ativos (em forma de chama ou cuboídes), justapostos às trabéculas neoformadas (setas). A deposição de matriz orgânica por estas células foi observada ainda nos estágios iniciais do reparo, entretanto, sua maior atividade foi vista aos 14 dias (B e C) em todos os grupos. (C) Deposição óssea ao redor dos resquícios da matriz desmineralizada enxertada, que aparece corada em roxo (aspecto basófilo) no interior das trabéculas. Além disso, é possível visualizar osteoblastos sintetizando matriz orgânica na superfície das paredes ósseas originais do defeito (cabeça de seta). Setas = osteoblastos ativos. H&E. Barra A = 150 μ m. Barra B e C = 40 μ m.

O potencial osteocondutor e a histocompatibilidade da matriz desmineralizada também foi acompanhada pela coloração de H&E (Figura 32 e Figura 33). Aos 7 dias foi possível observar a matriz desmineralizada ocupando a porção central dos defeitos enxertados pela associação de CTPD+MOD (Figura 32 A) e MOD (Figura 32 B). Em maior aumento (Figura 32 C-F), é possível observar a íntima associação de células à matriz desmineralizada, demonstrando sua histocompatibilidade e o potencial osteocondutor.

7 dias

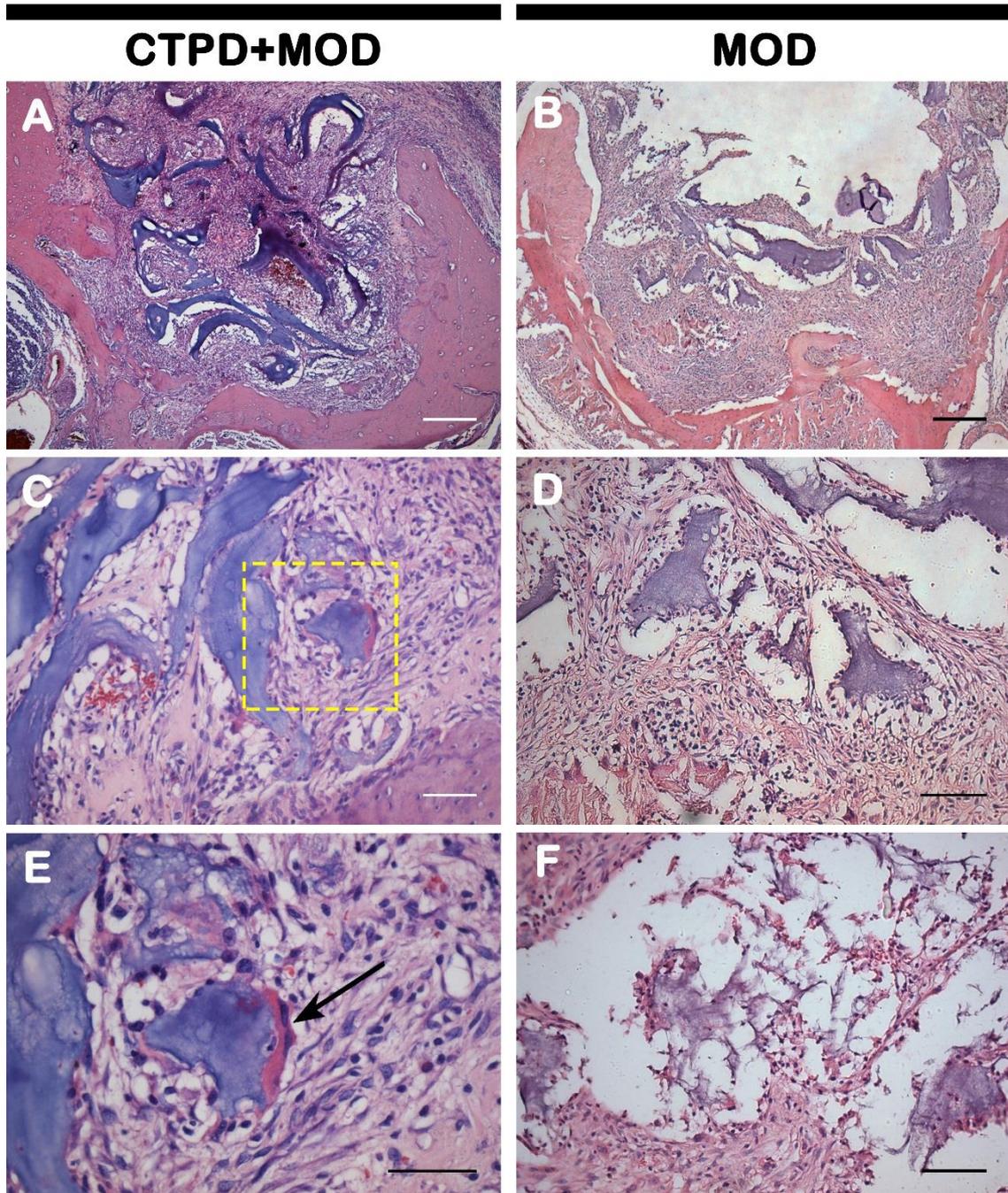


Figura 32: Aspecto histológico da matriz óssea enxertada aos 7 dias. Nesse período a matriz desmineralizada apresentou-se íntegra, preenchendo o interior do defeito ósseo no grupo CTPD+MOD (A). Secções histológicas do grupo MOD apresentaram mais resquícios de matriz preenchendo o defeito ósseo (B). Em maior aumento do quadro tracejado em (C), é possível ver a justaposição de células ativas (setas) nos grupos que receberam apenas o biomaterial (D e F) bem como nos grupos que receberam a associação CTPD+MOD (E). Nesta última, é possível observar o osteóide (acidófilo) sobre as lâminas de biomaterial (seta), inclusive com um osteócito sendo envolto pela matriz óssea. As imagens sugerem uma mais rápida reabsorção das matrizes isoladas (F), em relação ao grupo associado às células tronco (E) no período inicial de 7 dias. H&E. Barras: A e B = 300 μ m. C = 80 μ m. D e F = 150 μ m. E = 30 μ m.

O processo de degradação e reabsorção dos biomateriais enxertados também puderam ser observados nas secções histológicas. Observou-se que no período de 14 dias a maior parte da matriz enxertada foi reabsorvida, sendo possível evidenciar apenas resquícios do biomaterial (Figura 33), com aspecto vacuolizado, em regiões próximas as áreas de formação de trabéculas ósseas. Em ambos os grupos enxertados com a matriz desmineralizada (MOD e CTPD+MOD) não foram observados níveis elevados de infiltrados inflamatórios na região dos defeitos, sugerindo um estágio de resolução (Figura 33 B e D). Ao final da regeneração óssea, no período de 49 dias, não foi observada a presença de matriz desmineralizada nos grupos MOD e CTPD+MOD. Nessa etapa, os defeitos ósseos mostravam-se preenchidos pela matriz óssea de aspecto condensado, conforme exposto na Figura 27.

14 dias

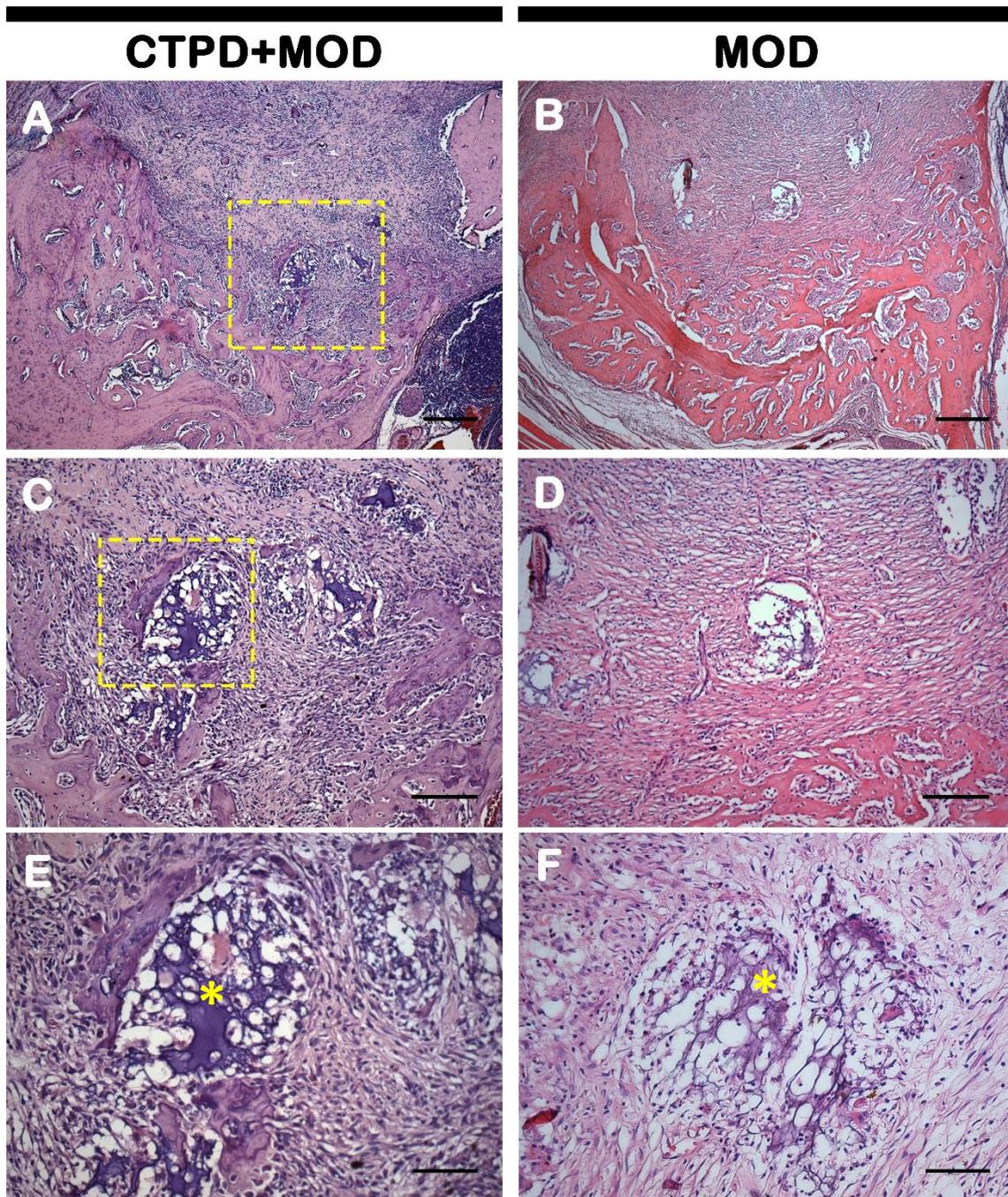


Figura 33: Aspecto histológico da matriz óssea enxertada aos 14 dias. Neste período, a reabsorção da matriz está em estágio avançado, sendo possível evidenciar apenas fragmentos com aspecto vacuolizado em regiões próximas às áreas de neoformação óssea (*) no grupo CTPD+MOD (A) e MOD (B). Área tracejada ampliada na imagem (C). De maneira geral, as lâminas do biomaterial mostraram-se em íntima associação às células, sem a presença de infiltrado inflamatório abundante (C e D). H&E. Barras A e B = 300 μ m. B e C = 150 μ m. E e F = 70 μ m

4.4.4. Monitoramento das CTPDs enxertadas por imunoperoxidase

O destino das células tronco (eGFP-positivas) enxertadas foi monitorado por reação de imunoperoxidase, utilizando anticorpos específicos anti-eGFP. Aos 7 dias, as células enxertadas isoladamente (grupo CTPD) foram vistas junto às trabéculas ósseas neoformadas, nas proximidades das paredes remanescentes do defeito. Tais células apresentaram-se em íntima associação com outras células do animal receptor (Figura 34 A). No grupo associado (CTPD+MOD), essas células estavam presentes também aderidas às lâminas da matriz desmineralizada. Em áreas de neoformação óssea, algumas células eGFP⁺ justapostas às trabéculas apresentavam morfologia semelhante à de osteoblastos ativos (Figura 34 A). Aos 14 dias, algumas células eGFP⁺ foram vistas nas superfícies das trabéculas e também em alguns momentos, envoltas pela matriz osteóide, simulando a formação de osteócitos a partir das células tronco (Figura 35)

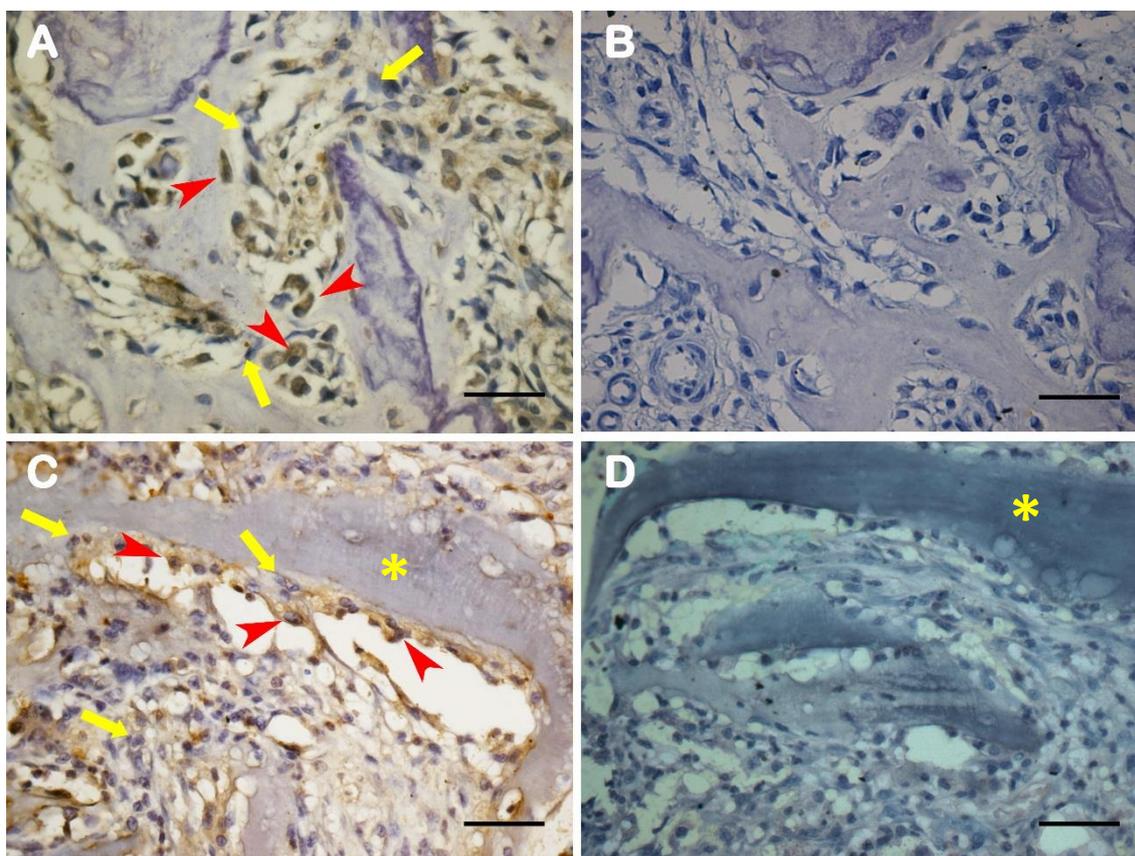


Figura 34: Localização das células eGFP⁺ enxertadas no período de 7 dias. Neste período, as células justapostas às paredes ósseas das trabéculas neoformadas (A), tanto nos grupos enxertados somente com células (grupo CTPD) quanto nos grupos enxertados com biomateriais e células (CTPD+MOD) mostraram morfologia semelhante à de células osteogênicas como os osteoblastos (cabeças de setas) e em harmonia com células do hospedeiro (setas). O grupo CTPD+MOD apresentou células positivas em meio às suas lâminas de matriz desmineralizada (*) (C), embora o aspecto morfológico de osteoblastos, nesse grupo, tenha sido mais evidente nas margens de neoformação óssea do defeito e semelhante a A. Os controles negativos das marcações estão representados em B e D. Barra = 40μm.

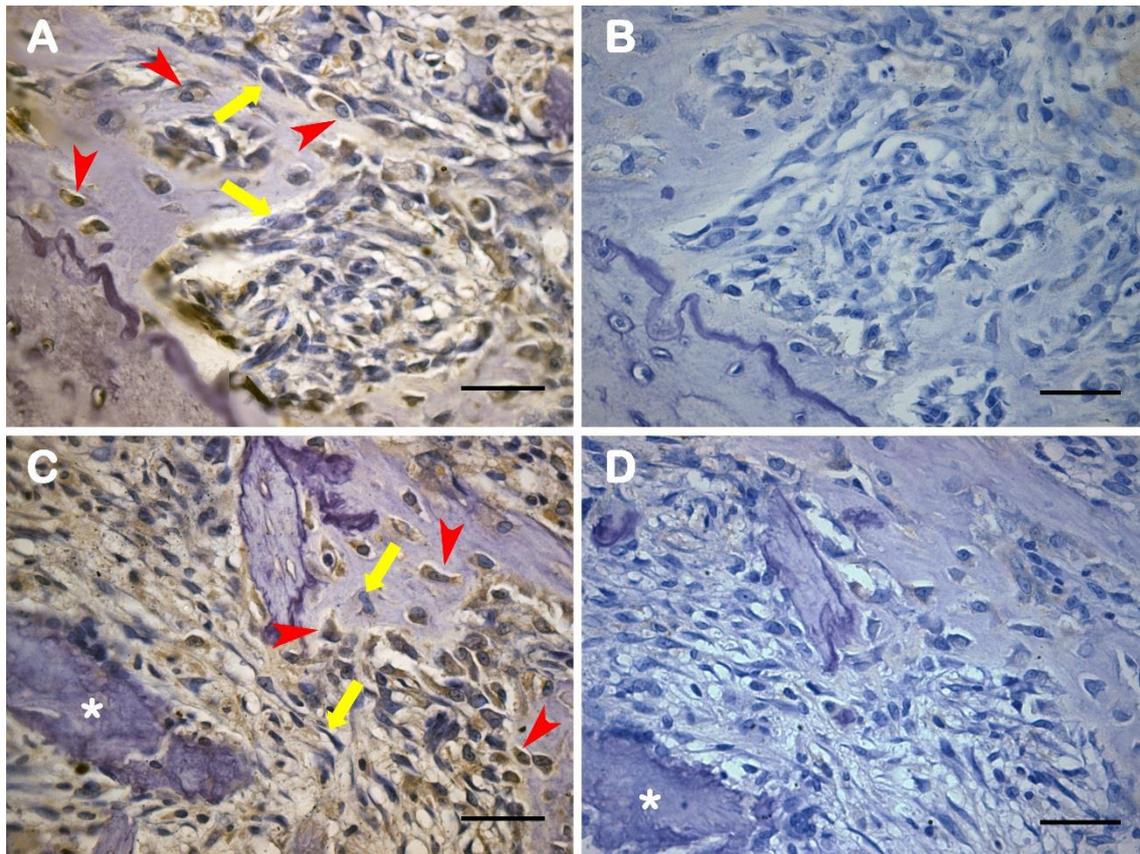


Figura 35: Localização das células eGFP⁺ enxertadas no período de 14 dias. As células foram melhor visualizadas entre as trabéculas ósseas neoformadas e circundadas por matriz óssea recém-sintetizada (cabeças de setas), ainda com citoplasma volumoso típico de osteoblastos ativos. As setas amarelas indicam células do animal hospedeiro, sem marcação positiva pela reação com peroxidase. Em C é possível observar células eGFP⁺ próximas a fragmentos de matriz desmineralizada remanescente (*). Os controles negativos das marcações estão representados em B e D. Barra = 40μm.

4.5. Quantificação da diferenciação osteoblástica no sitio cirúrgico - análise molecular por qPCR

Para avaliar a influência da utilização de CTPDs e a sua associação a MOD sobre a expressão genética de algumas moléculas-chaves na diferenciação osteoblástica, foram realizadas reações PCR quantitativa durante as fases iniciais de reparo do tecido ósseo, aos 3 e 7 dias. Foram avaliadas as expressões de 2 genes marcadores da diferenciação osteoblástica (Runx2 e Osterix,) e 1 gene (iBSP) relacionado à produção da sialoproteína óssea, secretada por osteoblastos maduros em fase de mineralização da matriz sintetizada. A eficiência das sequencias iniciadoras destes transcritos, os *primers*, foi comprovada pelo pico único de detecção de fluorescência após a leitura da reação de qPCR (Figura 36).

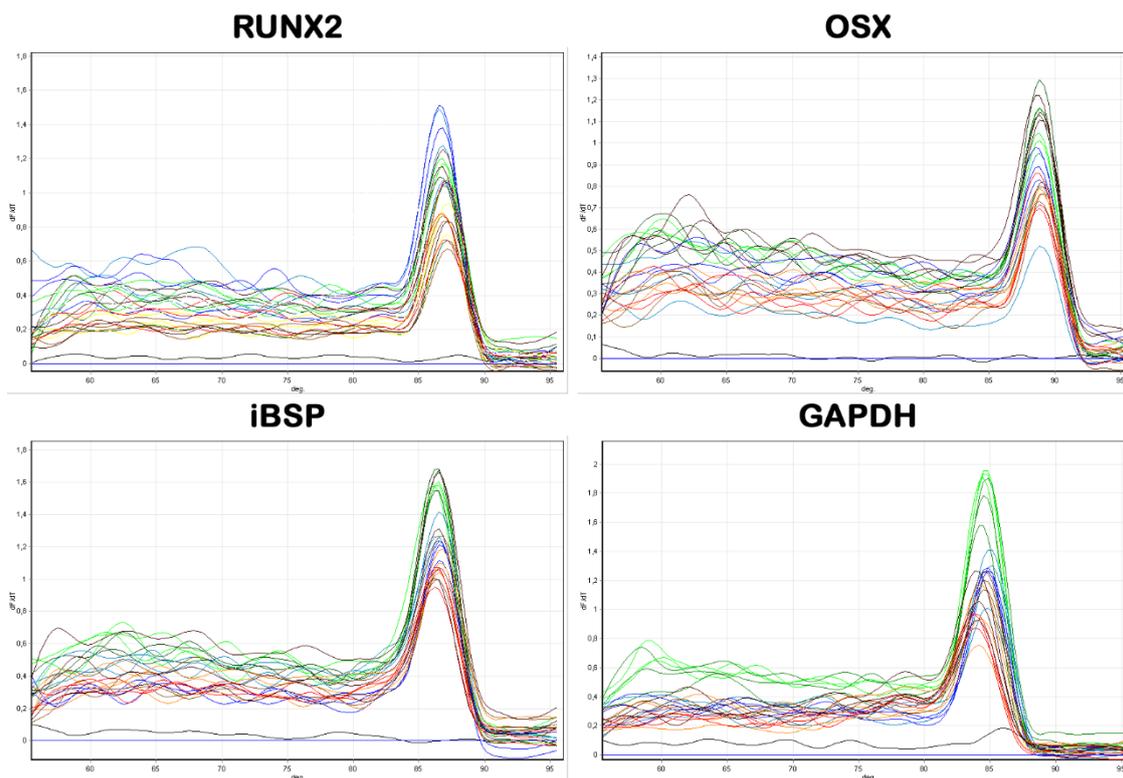


Figura 36: Especificidade de anelamento dos *primers* desenhados para as reações de qPCR. Foram observados picos únicos de detecção de fluorescência ao final do ciclo de reações para os transcritos, sugerindo especificidade adequada para a sua detecção nas análises moleculares.

A detecção da fluorescência ao final de cada etapa de amplificação das reações de qPCR foi convertida em valores numéricos que foram utilizados para a quantificação da expressão dos transcritos de interesse, aos 3 e 7 dias pós cirúrgicos, com normalização pelos valores encontrados para a amplificação do gene de referência (Figura 37). A análise temporal, foi realizada pela comparação entre o período de 7 e 3 dias. Os resultados demonstraram que os níveis de Runx2 não apresentam diferenças significativas de expressão nesse período para todos os grupos, exceto aquele enxertado com a MOD isolada, onde houve redução de aproximadamente 2 vezes. A expressão de Osx foi 4 vezes estimulada no grupo que recebeu as CTPD (C) e no grupo que recebeu a associação de CTPD+MOD (D), entretanto, houve redução significativa de aproximadamente 8 vezes no grupo CO (A). Houve estímulo na produção de iBSP na análise dos grupos, embora seu valor mais elevado, de 64 vezes, tenha sido evidenciado no grupo enxertado com a associação proposta (D).

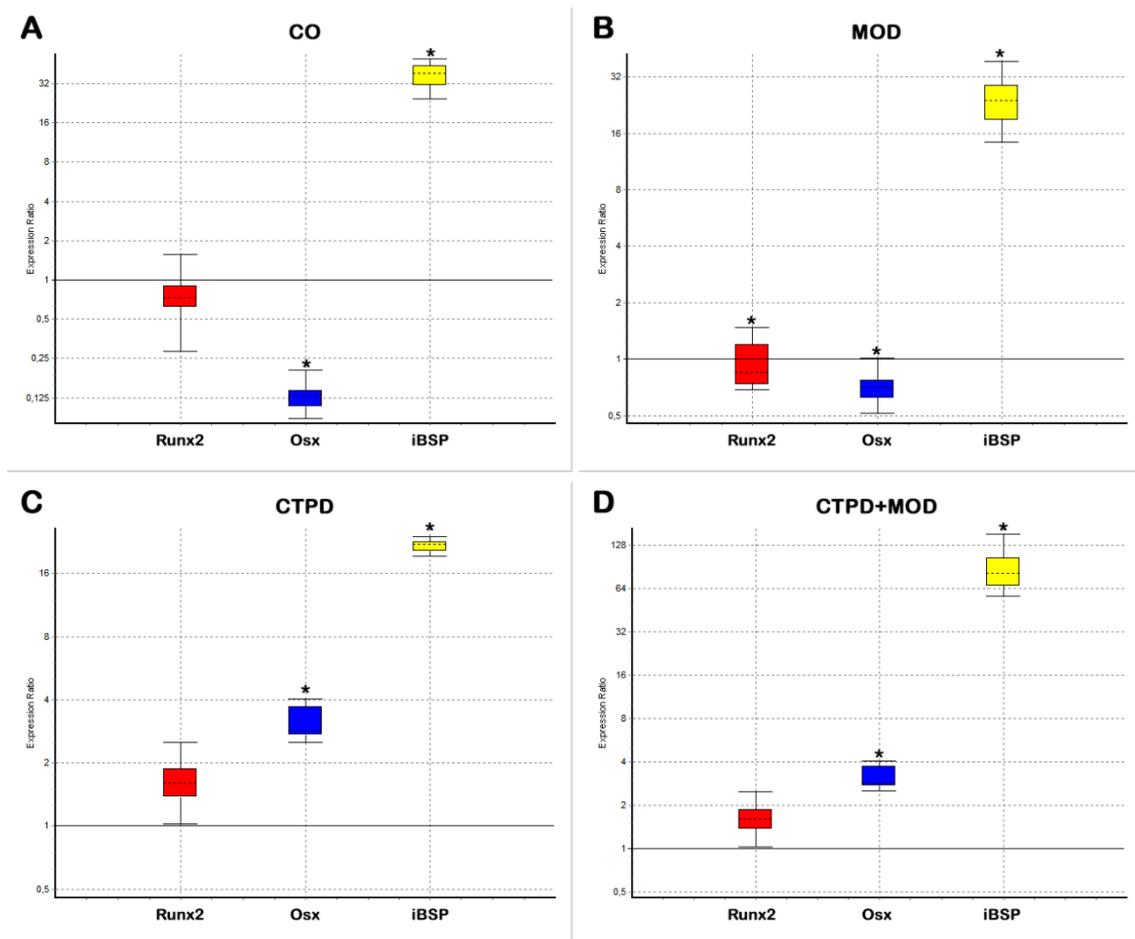


Figura 37: Quantificação de mRNA de genes de maturação osteoblástica expressos na área do defeito ósseo. Os níveis de expressão de Runx2 foram reduzidos no grupo que recebeu a matriz óssea desmineralizada isolada (B). Entretanto, para os demais grupos, os níveis de expressão não foram alterados entre os períodos de avaliação. O fator jusante a ativação de Runx2, Osx se mostrou estimulado nos grupos que receberam as células tronco transplantadas (C e D). Este fator estava suprimido nos grupos CO (A) e MOD (B). Finalmente, houve o estímulo da expressão do gene marcador de maturação osteoblástica, iBSP em todos os grupos. O seu maior aumento, de aproximadamente 64 vezes, foi encontrado no grupo enxertado com a associação de CTPD+MOD (D).

5. Discussão

Este trabalho avaliou pela primeira vez, os efeitos da associação de uma versão desmineralizada de um xenoinxerto de origem nacional às células tronco da polpa dentária. Os xenoinxertos são biomateriais derivados de animais, em geral, bovinos, considerados vantajosos quando comparados aos outros tipos de enxertos por seu baixo custo e ampla disponibilidade, uma vez que são retirados de ossos descartados pela indústria de pecuária de corte (PILIPCHUK et al., 2015; PAPAGEORGIU et al., 2016). Entretanto, as matrizes ósseas destinadas ao uso clínico, sejam mineralizadas ou desmineralizadas, precisam passar por processos de descelularização para a redução de

sua antigenicidade *in vivo*. Mas, a ausência de células osteoprogenitoras nos tecidos transplantados é uma das razões da menor capacidade osteoindutiva do material, podendo impactar no insucesso dos enxertos em alguns pacientes (ORYAN et al 2014; RAI et al 2015). Nesse contexto, a fim de elevar a capacidade de osteoindução das matrizes exógenas destinadas aos transplantes, os pesquisadores têm avaliado inúmeras possibilidades, dentre elas, a melhoria na composição química dos materiais, seja pela associação dos enxertos a agentes osteoindutores ou ainda pela associação dos biomateriais à diferentes tipos celulares sabidamente relacionadas à diferenciação osteogênica. Uma destas linhas de investigação busca valorizar o potencial osteoindutor de componentes orgânicos, naturalmente presentes na matriz óssea. Como exemplo, o emprego de proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) têm sido amplamente sugerido, inclusive com o uso clínico em sua versão comercial (BMPs recombinante), para acelerar a deposição óssea (ARZI et al. 2015; QUINLAN et al. 2015; HUBER et al. 2017). Essas proteínas não colagenosas representam uma família de fatores de crescimento, capazes de induzir a ativação de fatores de transcrição, como o Runx2, fundamental para iniciar a diferenciação e maturação de células osteoblásticas (JARUGA et al., 2016). Entretanto, um dos desafios para a utilização dos fatores de crescimento é encontrar uma via para a liberação gradual das BMPs durante a evolução do processo de reparo. O trabalho de Quinlan et al (2015) demonstra que a utilização de matrizes tridimensionais de colágeno adsorvidas com BMPs recombinantes foi capaz de reduzir em 30 vezes a quantidade de proteína necessária para a regeneração de defeitos críticos em calotas cranianas de ratos. Nesse sentido, Hueber e colaboradores (2017) ressaltam a necessidade da busca por sistemas de entrega inteligentes, propondo, para isso, a utilização da própria matriz óssea como veículo. Interessantemente, matrizes ósseas são ricas em BMPs naturalmente incluídas, dentre as proteínas que compõem o tecido ósseo. Entretanto, estudos recentes de Huber et al (2017) ressaltam que a capacidade o uso dessas matrizes pode ser, ainda, otimizado pela sua associação com fatores osteoindutores exógenos, como as próprias BMPs (SAWKINS et al., 2013). As matrizes ósseas para enxertos são fragmentos de osso bovino, mais comumente utilizados em sua versão mineralizada e trabeculada, cujo aspecto morfológico e propriedade osteocondutora é bastante similar ao tecido alvo, o osso a ser substituído (RAI et al., 2015). Entretanto, em função do potencial osteoindutor de proteínas incutidas nas matrizes ósseas, as versões desmineralizadas têm sido também consideradas como promissoras para enxertias ósseas (MAUNEY et al., 2005), tanto obtidas de osso humano (aloenxertos) quanto obtidas de animais (xenoenxertos).

Resultados obtidos por El-Chaar (2013) foram satisfatórios com o uso de aloenxertos desmineralizados. O autor demonstrou uma produção adequada de tecido mineralizado em defeito ósseo intrabucal pós-implante de enxerto ósseo desmineralizado em humanos. Também, Pietrzak *et al* (2012) relataram a viabilidade das matrizes orgânicas, *in vitro*, para o tratamento de defeitos ósseos crâniomaxilofaciais e na cavidade oral (ATHANASIOU *et al.* 2010; BENDERS *et al.* 2013).

O emprego de matrizes ósseas desmineralizadas tem sido proposto para o tratamento de diversas patologias ósseas. Em geral, a remoção dos minerais depositados sobre a matriz orgânica dos enxertos, majoritariamente composta por colágeno, é capaz de otimizar a biodisponibilidade dos componentes proteicos responsáveis por estimular o reparo tecidual. No presente estudo, utilizamos uma matriz desmineralizada derivada de um xenoenxerto nacional, o Lumina Bone, comercialmente disponibilizado em blocos, cujo interior apresenta uma rede de trabéculas ósseas mineralizadas semelhantes às encontradas no tecido de origem. A opção por esse biomaterial surgiu a partir de dados prévios realizados por nossa equipe, a qual já havia demonstrado resultados favoráveis em sítios de reparo ósseo enxertados com essa matriz desmineralizada em comparação com a sua versão mineralizada (ALBERGARIA, 2017). Albergaria e colaboradores propuseram incrementar a capacidade osteoindutora desse do Lumina Bone, por meio da desmineralização de blocos comerciais (versão mineralizada) utilizando soluções de EDTA. O estudo revelou que este tipo de desmineralização óssea expõe e preserva proteínas osteoindutoras, como as BMPs, naturalmente presentes na matriz orgânica remanescente do material. Os resultados obtidos mostraram maior deposição de tecido mineralizado em defeitos ósseos intrabucais criados em ratos, em relação aos grupos controle e ao grupo enxertado com xenoenxertos mineralizados (ALBERGARIA, 2017).

Ainda como forma de melhorar a resposta osteogênica em enxertias ósseas, diversos estudos propõem a associação dos biomateriais à células, com a finalidade de compensar ou estimular o potencial osteogênico e osteoindutor dos xenoenxertos (CAVALCANTI *et al.*, 2013; KIM *et al.*, 2015; PRAMANIK *et al.*, 2015). Para tanto, as principais linhagens indicadas têm sido as de células osteoblásticas e de células tronco mesenquimais (CTM) provenientes da medula óssea, que podem estimular a produção de fatores de crescimento ou se diferenciar em células necessárias ao reparo tecidual (MAHLA, 2016; YASUI *et al.*, 2017).

Embora a utilização de CTM da medula seja bem estabelecida para terapias médicas, recentemente, o excelente potencial das células tronco da polpa dentária (CTPD) tem sido motivo para indicação desta variável de células tronco mesenquimais nas terapias regenerativas (JONASSON et al., 2013; AURREKOETXEA et al., 2015; FISHER; et al., 2016). As células pulpares apresentam como principal vantagem a possibilidade de serem retiradas de diversos tipos de dentes, decíduos e permanentes, incluindo os dentes sisos, que frequentemente são removidos em clínicas odontológicas. Além disso, a retirada de dentes do próprio paciente para transplantes autólogos, quando comparado à obtenção de células medulares, é um procedimento menos oneroso e debilitante, sem a necessidade de acessos cirúrgicos extensos (ROTHRAUFF; et al., 2014; MAHLA et al., 2016; PARK et al., 2016). A utilização de CTPDs em função de outros tipos celulares tem sido justificada, também, por seu potencial de proliferação e capacidade de diferenciação. Alraies et al (2017) demonstraram que as CTPDs obtidas de dentes humanos podem ser mantidas indiferenciadas por longos períodos de cultivo, sem comprometimentos nas taxas de replicação e na plasticidade. Essas características são mantidas mesmo em células obtidas de indivíduos adultos, tornando-as uma fonte amplamente disponível para transplantes autólogos em pacientes de diferentes idades (AKPINAR et al., 2014).

Neste estudo, trabalhamos com a hipótese de que a associação das CTPDs à matriz óssea desmineralizada (MOD) exerça um efeito sinérgico à osteoindução já demonstrada pela presença das proteínas expostas nas matrizes desmineralizadas pelo EDTA. Para esta avaliação, defeitos cirúrgicos de tamanho padronizado foram criados em maxilares de ratos e foram enxertados com fragmentos de matriz óssea desmineralizada (MOD), células tronco da polpa dentária (CTPDs) ou a associação dessas duas enxertias, CTPD+MOD. Nossas células tronco foram isoladas de ratos Lewis transgênicos para a expressão da proteína eGFP, com a intenção de acompanhar o trajeto ou destino dessas células enxertadas *in vivo*. A primeira análise morfológica das culturas celulares (Figura 12) mostrou células em expansão nos plásticos de cultivo, e capazes de formar colônias, o que condiz com as características de CTPDs cultivadas *in vitro* (AGHAJANI et al., 2016). Embora a presença dos transgenes tenha sido confirmado pelas reações de PCR das genotipagens, antes de seu isolamento, nosso grupo realizou a imunomarcagem com anticorpos fluorescentes para confirmar a expressão das proteínas eGFP pelas células (Figura 13). Essa etapa foi repetida em todas as populações celulares que foram destinadas às enxertias *in vivo*. Nossos resultados condizem com os achados de Carvalho

et al. (2013), que demonstraram que a utilização de linhagens heterozigóticas para o gene eGFP não comprometeu sua detecção tanto por metodologias moleculares, quanto pela imunomarcagem de CTM transplantadas em ratos. De maneira similar, Abematsu et al., (2010) obteve sucesso na imunolocalização de células GFP^{+/-} utilizadas para modelos de reparo neuronal, mesmo após sua diferenciação.

Um diferencial importante no presente estudo foi a utilização de defeitos ósseos de tamanho padronizado. Em seu trabalho com reparo de defeitos ósseos de calvárias de ratos, Honma et al., (2008) atribuiu a variação nas dimensões dos sítios cirúrgicos com as diferenças na quantificação de tecido ósseo regenerado, ressaltando a importância de se utilizar modelos que eliminassem essa variável. Desta forma, o modelo utilizado em nosso estudo permitiu que o volume dos defeitos criados sofresse menos interferência das variações anatômicas dos animais utilizados, fornecendo resultados mais fidedignos quanto a influência dos materiais enxertados nos mecanismos de regeneração tecidual.

No presente estudo, além do foco na evolução do reparo ósseo, avaliou-se, macroscopicamente, a influência dos biomateriais e das células tronco no fechamento ou epiteliação da área operada. Essa análise justifica-se, uma vez que o nível de isolamento da área enxertada dentro da cavidade bucal pode influenciar na contaminação dos enxertos, bem como gerar a perda do biomaterial e comprometer os resultados clínicos. Segundo Rowan et al (2015), a epiteliação sobre lesões evita que materiais estranhos e fontes de infecção interfiram negativamente no sucesso da cicatrização óssea. Por essa razão, o nível de epiteliação sobre os defeitos cirúrgicos foram considerados em todos os períodos avaliados. Observou-se que aos 7 dias pós-operatórios havia ainda a presença de tecido de granulação sobre a área lesionada, indicando a incompleta epiteliação da mucosa gengival. Esse resultado macroscópico foi confirmado pela análise histológica dos defeitos ósseos que relevou, aos 7 dias, a descontinuidade do epitélio de revestimento sobre os sítios cirúrgicos. Entretanto, não houve diferença estatística no nível de fechamento entre o grupo controle (sem enxertia) e os demais grupos. Tais resultados indicam que os biomateriais empregados são apropriados e biocompatíveis. Tanto o grupo de células tronco isoladas quanto o grupo associado ao biomaterial apresentaram um nível de epiteliação gengival compatível com o grupo controle preenchido com o coágulo sanguíneo. Caso contrário, eles poderiam influenciar negativamente a proliferação da mucosa e constituírem corpos estranhos capazes de desencadear processos inflamatórios intensos com o comprometimento da deposição óssea.

Quadros crônicos de inflamação podem resultar em menor sucesso na utilização de enxertos para as terapias ósseas. Entretanto, um nível de inflamação inicial é essencial para a resposta óssea. Vi et al (2015) mostraram que a depleção de células inflamatórias em regiões de reparo ósseo de tíbias de ratos, resultou em menor deposição de tecido ósseo, que foi substituído por tecido fibroso. Segundo os autores, a presença de macrófagos é fundamental para a secreção de BMP-2 e BMP-4, capazes de ativar a produção do fator de transcrição Runx2, que desencadeia a diferenciação osteoblástica para a deposição de matriz; além de RANKL (*receptor activator of nuclear factor k-B ligand*) que proporciona a osteoclastogênese necessária para o remodelamento ósseo da região (VI et al., 2015). O presente estudo não teve o objetivo de avaliar os primeiros dias do pos-operatório, fase mais aguda do processo, quando a inflamação é mais intensa. Mas, aos 7 dias, foi possível observar uma inflamação leve indicando a remissão do processo em todos os grupos. Nos processos cirúrgicos que demandam a manipulação do tecido ósseo por instrumentos rotatórios (osteotomia para confecção do defeito), é natural que o organismo desenvolva uma inflamação aguda. De acordo com Loi et al. (2016), o reparo ósseo se inicia com respostas inflamarórias do sistema imune inato. Mediante ao trauma mecânico, os macrófagos residentes iniciam a sinalização para a degradação de componentes do coágulo sanguíneo estabelecido no local afetado. Ainda, sintetizam citocinas que auxiliam no aporte de células, que darão início aos processos angiogênicos e de reparo. Posteriormente, com menor atividade de células inflamatórias no defeito, ocorre a maior proliferação celular, com atividade de células fibroblásticas que depositam tecido conjuntivo, fundamental para a sustentação e nutrição das células que serão diferenciadas em células ósseas (LOI et al., 2016). Na fase de 7 dias, as secções histológicas demonstraram, em todos os grupos, que a fase inicial do processo inflamatório, com a invasão de neutrófilos e macrófagos e reabsorção do coágulo já havia sido vencida com sucesso. Imagens de infiltrados agudos isolados só foram vistas mais superficialmente, no conjuntivo sob o epitélio em proliferação. Duas hipóteses podem justificar os focos de inflamação nestes locais; a primeira é a coincidência com a perfuração dos pontos da sutura, o que justifica uma inflamação local em função dos fios de sutura retirados no mesmo dia da avaliação (7 dias). A segunda hipótese é a solução de continuidade com o meio externo da cavidade bucal, presente ainda em 7 dias, em todos os grupos. Segundo Rowan et al (2015) é possível atribuir a presença de células inflamatórias à exposição dos sítios cirúrgicos à cavidade oral que é repleta de elementos que podem desencadear respostas do sistema imune. De fato, aos 14 dias, em nossos

experimentos o epitélio apresentou-se fechado, íntegro em todo os grupos (Figura 26), e as imagens histológicas demonstraram a remissão do processo inflamatório. Esses resultados condizem com a progressão descrita por Hurst et al (2001), em experimentos de inflamação e cicatrização óssea onde células inflamatórias foram vistas, tal como nossos dados, apenas nos 7 primeiros dias após os procedimentos cirúrgicos.

A análise histológica temporal permitiu acompanhar o reparo ósseo nas regiões operadas (Figura 27). Os resultados qualitativos, desconsiderando a quantidade de osso neoformado, ou seja, avaliando somente os aspectos histológicos do reparo ósseo, de uma forma geral foram bem similares entre os grupos. No período inicial de nossa avaliação (7 dias) as cavidades ósseas apresentavam-se preenchidas em sua maior área por tecido conjuntivo. A deposição inicial de trabéculas ósseas ocorria nas proximidades das paredes ósseas que delimitavam o fundo do defeito. Nessas regiões, assim como em meio ao conjuntivo, observou-se a proliferação de vasos sanguíneos, e a proliferação de células sintetizadoras de nova matriz celular. As formações de vasos sanguíneos (Figura 29), são cruciais para o aporte de células progenitoras que serão recrutadas para a formação dos novos tecidos. (FLORENCIO-SILVA et al., 2015). Os processos angiogênicos estiveram presentes, também, em regiões do interior da matriz óssea desmineralizada utilizada nesse estudo. De acordo com García & García (2016), a formação dessas estruturas no interior do biomaterial é fundamental para a garantia de sucesso das enxertias. De maneira similar, Genova et al. (2016) considera a angiogênese no interior dos biomateriais um sinal positivo para sua capacidade de condutividade celular e histocompatibilidade com o organismo hospedeiro, predizendo um microambiente favorável para a proliferação de diversos tipos celulares, incluindo as células que darão origem ao tecido ósseo.

Aos 7 dias era também evidente o processo de remodelagem das superfícies ósseas remanescentes. A reabsorção das paredes ósseas do defeito, também constitui um fator comum ao mecanismo de remodelagem do tecido ósseo em regeneração. Segundo Henriksen et al. (2014) essa etapa antecede a deposição de uma nova matriz mineralizada e é realizada com a atuação de células osteoclásticas. A identificação de osteoclastos em microscopia de luz convencional é idealmente realizada por meio de colorações específicas. Entretanto, na coloração com Hematoxilina e Eosina (H&E), essas células são comumente descritas como células gigantes, multinucleadas, com citoplasma acidófilo, encontradas em associação à áreas de remodelagem tecidual (BOHNER, 2010).

Nossas análises histológicas revelaram a presença de células de morfologia semelhante justapostas às concavidades (áreas de reabsorção) nas paredes dos defeitos ósseos nos períodos iniciais de avaliação (Figura 30).

Algumas células gigantes multinucleadas foram também visualizadas em íntima associação aos resquícios de MOD que se encontravam em processo de reabsorção, no período de 14 dias. Estas células, diferentemente de osteoclastos, foram compreendidas como células gigantes de corpo estranho, em um processo natural de tentativa de reabsorver o biomaterial enxertado. Nossos dados revelaram que a versão desmineralizada do Lumina Bone é reabsorvida muito precocemente. Aos 7 dias os defeitos ainda apresentaram lamina integras de biomaterial, mas aos 14 dias foram observados somente resíduos da matriz enxertada, especialmente em sua versão isolada, sem a associação com células tronco. Sabe-se que a velocidade ou dinâmica de reabsorção dos biomateriais interfere na resposta do tecido ósseo e influencia significativamente na seleção dos enxertos pelos profissionais, em função de seus objetivos clínicos. Bohner (2010) comparou o uso de materiais inertes com os que sofriam reabsorção, empregados em reparos ósseos. Os autores concluíram que a utilização de materiais não reabsorvíveis é preconizada em substituições imediatas do tecido ósseo perdido. Entretanto, para a reposição funcional de matriz óssea, é aconselhável a utilização de biomateriais de enxertia que possam ser gradativamente substituídos por tecido ósseo. De fato, nossos dados histomorfométricos demonstraram uma efetiva substituição do biomaterial por osso neoformado. Pode-se dizer, que a dinâmica de reabsorção apresentada pela MOD, dessa modalidade de enxerto comercial (LuminaBone/Criteria) favorece as terapias de reposição tecidual em quadros de perdas ósseas que não demandem a necessidade imediata de suporte ou resistência mecânica.

Aos 7 dias, simultaneamente aos processos de reabsorção das paredes ósseas, foi observado o início da deposição óssea em todos os grupos. Trabéculas ósseas neoformadas foram vistas especialmente no fundo (1/3 apical) dos defeitos. Células com características de osteoblastos em atividade, tais como citoplasma levemente alongado, com núcleos evidentes e dispostas em fileiras circundando a superfície óssea, foram vistas revestindo as trabéculas ósseas primárias. Células com essas características foram visualizadas em maior quantidade aos 14 dias, associadas às trabéculas ósseas recém depositadas e às paredes dos defeitos ósseos que tiveram a remodelagem iniciada aos 7 dias. (Figura 31). Além disso, células com morfologia compatível a de osteoblastos

ativos, foram vistas também em íntima relação com fragmentos da MOD enxertada, sugerindo a capacidade osteoindutora desse material. Estes achados são semelhantes aos encontrados por Issa et al., (2016) XXX, que avaliou o potencial do uso de scaffolds de matriz óssea bovina para o reparo de defeitos em calotas cranianas de ratos. Neste estudo, os autores relataram o sucesso da integração do biomaterial utilizado, por meio da visualização de células realizando a deposição de matriz extracelular em regiões próximas às matrizes de enxertia, sugerindo uma capacidade satisfatória de osteocondução e de osteoindução do biomaterial. Desta forma, propomos que um efeito semelhante tenha ocorrido entre a população de células e a matriz desmineralizada utilizadas em nosso estudo, corroborando com os nossos achados histológicos e resultados morfométricos de deposição de matriz.

A participação das CTPDs transplantadas no processo de reparo foi monitorada através da sua marcação com anticorpos específicos anti-eGFP para imunohistoquímica. A peroxidase permite a avaliação do tecido de fundo e a localização mais precisa das células, o que não é possível com a marcação por fluorescência. CTPDs dividiam seu espaço harmonicamente com células do hospedeiro (Figura 34). Em especial, observamos células eGFP⁺ com morfologia osteoblastóide, próximas às áreas de formação óssea e justapostas às lâminas de MOD enxertadas, no período inicial de 7 dias. Aos 14 dias, células positivas, com aspecto de osteoblastos ativos, foram localizadas às margens das trabéculas ósseas e parcialmente confinadas pela matriz extracelular depositada. Entretanto, osteócitos eGFP⁺ totalmente internalizados não foram visualizados (Figura 35). Sugere-se que, no processo de remodelamento ósseo, as células eGFP⁺ que se diferenciaram em osteoblastos maduros, circundados pela matriz óssea, possam ter sofrido apoptose. Sabe-se que quando a maturação celular de osteoblastos é alcançada, essas células podem alterar seu metabolismo, tornando-se osteócitos, células do tipo “*bone lining cells*” ou serem degradadas, deixando lacunas vazias dentre a matriz óssea (LOI et al., 2016; SHAHI et al., 2017). Acreditamos que este fato tenha ocorrido, uma vez que resquícios celulares com marcação positiva foram vistos próximos a espaços lacunares vazios que também apresentavam vestígios de marcação, embora não apresentassem núcleos celulares evidentes.

A análise histológica qualitativa, discutida até o momento, revelou, sem grandes diferenças, os efeitos das matrizes desmineralizadas (com e sem células tronco associadas) na evolução do processo de reparo. Entretanto, o principal objetivo deste

estudo foi avaliar quantitativamente o nível de deposição óssea, a fim de verificar se a associação de células tronco da polpa dentária à uma matriz óssea desmineralizada (CTPD+MOD), teria um efeito sinérgico aos benefícios já descritos de osteoindução da matriz desmineralizada. Os resultados, obtidos de análises em lâminas coradas em Tricromico Masson, revelaram deposição óssea estatisticamente superior nos grupos enxertados com a associação CTPD + MOD, tanto em relação ao grupo controle quanto aos biomateriais isolados, nos três períodos avaliados, de 7, 14 e 49 dias. (Figura 21). Aos 7 dias, a deposição de colágeno no grupo CTPD+MOD foi aproximadamente 2 vezes superior ao grupo CO ($p < 0,01$). Estes dados corroboram com a visualização da formação de trabéculas em maior quantidade, observadas nas colorações de Tricrômico de Massom (Figura 18) e de H&E (Figura 27). Essa associação foi estatisticamente superior, também, aos grupos enxertados apenas com a MOD ($p < 0,01$) ou apenas com as CTPDs ($p < 0,05$). O uso de CTPDs isoladas se mostrou estatisticamente superior ao uso da MOD desassociada ($p < 0,05$). Entretanto, neste período inicial, não houve diferença estatística entre os tratamentos com MOD e CTPD em relação ao grupo controle. Tais resultados indicam que os materiais isolados parecem ter menor capacidade de osteoindução do que quando em associação. Embora as MOD possuam fatores de crescimento como as BMPs agregadas à sua matriz, esse material, em períodos iniciais apresenta uma menor quantidade de células metabolicamente ativas em seu interior. Por outro lado, apesar de possuírem elevado potencial de diferenciação, as CTPDs sozinhas talvez requeiram um substrato para cumprirem mais rapidamente seu papel de diferenciação osteoblástica e aceleração da deposição óssea. A associação proposta parece ter tido efeitos sinérgicos para o processo de deposição óssea. Esse resultado corrobora com as análises de Huber et al (2017), que ressalva a necessidade de se aliar os potenciais osteoindutivos de fatores de crescimento e osteocondutores de matrizes desmineralizadas para acelerar o reparo ósseo *in vivo*.

No período intermediário de avaliação, 14 dias, foi observado um pico de deposição de trabéculas ósseas, partindo de sua deposição inicial nas paredes da base do defeito, aos 7 dias, agora mostraram-se preenchendo a porção central do defeito nos grupos CO e MOD. Entretanto, nos grupos CTPD e CTPD+MOD, essa neoformação foi evidenciada com maior intensidade, alcançando, também, o 1/3 cervical do defeito ósseo. Esses dados histológicos corroboram com a estatística fornecida pela morfometria óssea; embora todos os tipos de enxertia tenham se mostrado superiores ao coágulo sanguíneo, a

associação proposta obteve a maior taxa de deposição óssea, aproximadamente 4 vezes maior que o grupo CO ($p < 0,01$) e aproximadamente 2 vezes maior que o grupo MOD ($p < 0,01$). Em seguida, o uso de CTPDs isoladas obteve o segundo maior índice de formação óssea, também estatisticamente superior ao encontrado pelo grupo MOD ($p < 0,01$). A enxertia de MOD isolado foi superior apenas em relação ao grupo CO ($p < 0,05$). A associação dos fatores de crescimento presentes nas MOD parece estimular a diferenciação de CTPDs em osteoblastos, conforme constatado por células eGFP⁺ em regiões próximas a MOD, na imunohistoquímica (Figura 34 C). Além disso, o período de 14 dias tem sido descrito como estágio de pico de deposição de colágeno em modelos de reparo ósseo in vivo (POLO-CORRALES et al., 2014). Por essa razão, neste período o microambiente de lesões ósseas parece ser naturalmente favorável para a diferenciação de células osteoprogenitoras. Segundo Núñez-Toldrà et al. (2017), o resultado positivo de deposição óssea no grupo de CTPDs pode ser atribuído ao fato de que essas células possuem elevada capacidade de proliferação e de diferenciação em ambientes com os estímulos adequados. De maneira similar, presença dos fatores de crescimento na MOD podem contribuir para esse microambiente, sendo capazes de induzir a diferenciação de células naturalmente encontradas nas regiões de reparo. Essas hipóteses podem explicar a maior deposição colágena no grupo CTPD + MOD em relação ao grupo controle, o que, mais uma vez, corrobora com os achados de Huber et al (2017).

Aos 49 dias, toda a MOD enxertada havia sido reabsorvida e os defeitos ósseos encontravam-se praticamente preenchidos por tecido ósseo em todos os grupos. Por essa razão, não seria mais um período adequado para análises comparativas da deposição óssea. Mas ainda assim, a deposição óssea no grupo associado, CTPD+MOD se mostrou superior ($p < 0,01$) em relação aos outros tratamentos. A deposição óssea nos grupos CO, MOD e CTPD foi similar, sem diferenças estatísticas. Observamos, portanto, que no período de 49 dias, ocorreu nos grupos tratados, a substituição do biomaterial pelo tecido ósseo. Esse comportamento mostra que os xenoenxertos nacionais da marca Critéria, desmineralizados, são qualificados para o emprego em terapias de regeneração óssea, pois de acordo com Boher et al (2010), é desejável que os biomateriais destinados às terapias de reposição óssea possam ser reabsorvidos e gradualmente substituídos por um novo tecido mineralizado. Tal característica é fundamental, na odontologia, para assegurar a fixação de próteses e implantes dentais, tanto pelo volume ósseo requerido, quanto para a melhor osseointegração (PAPAGEORGIOU et al., 2016).

O período de 49 dias foi escolhido por representar a fase final da cicatrização óssea, quando a qualidade do osso formado pode ser melhor avaliada. Neste período, o tecido ósseo que preencheu a cavidade do defeito apresentava característica densa, com menor número de trabéculas evidentes e mais compacto, com poucos espaços medulares (Figura 27).

Para uma análise mais apurada da qualidade e maturação do osso depositado, secções histológicas obtidas de todos os grupos e em todos os períodos foram coradas com PicroSirius *Red*. Este corante destaca, sob luz polarizada, a presença de fibras colágenas maduras na cor vermelha. Sabe-se que em condições de reparo ósseo, inicialmente, durante a fase proliferativa do processo inflamatório são depositadas fibras colágenas do tipo III, mais finas e delicadas em uma matriz osteóide, imatura e provisional. Gradativamente, essas fibras são substituídas por fibras mais espessas e organizadas, de colágeno do tipo I, características da matriz óssea madura. A coloração de PicroSirius *Red* permite avaliar o nível de maturação da matriz óssea depositada, através da birrefringência diferencial das fibras colágenas I e III em microscopia de luz polarizada. O primeiro tipo de colágeno depositado no processo de regeneração apresenta birrefringência discreta, em tons esverdeados, enquanto as fibras do tipo I possuem birrefringência mais evidente, em tons avermelhados (BHUTDA et al., 2017).

No período inicial de análise, observamos a predominância de fibras maduras nos grupos que receberam as CTPDs isoladas ou associadas ($p < 0,01$), tendo essas últimas o maior índice de maturação. Esse dado corrobora com os achados histomorfométricos, em que o grupo CTPD+MOD apresentou o maior índice de deposição óssea, no período de 7 dias. A análise dos resultados referentes ao grupo CTPD demonstrou que houve melhoria no processo de maturação em relação ao uso isolado de MOD, embora diferenças estatísticas em relação ao grupo controle não tenham sido observadas. A matriz desmineralizada, isolada também não se mostrou melhor do que o CO. Estes achados, novamente, condizem com os dados histomorfométricos. Mas os resultados de maturação óssea em um período tão precoce não parece ser tão relevante, já que o osso é muito dinâmico e ainda não atingiu a fase de equilíbrio entre a deposição e a formação óssea.

No período de 14 dias, não houve diferença na maturação óssea entre as enxertias de MOD e CTPD em relação ao CO ou entre si. O maior índice de maturação foi observado na associação de CTPD+MOD ($p < 0,01$), quando comparado com o CO e MOD, embora esse grupo não tenha apresentado diferenças significativas com o emprego das CTPDs

isoladas. Mais uma vez, sugerimos que os efeitos sinérgicos da associação proposta, sejam responsáveis pela indução da diferenciação das células no microambiente do reparo.

Conforme mencionado, a maturação óssea no período final do reparo, de 49 dias, é de extrema importância para prever o sucesso da utilização clínica dos biomateriais utilizados. A fixação de próteses e implantes requer a formação de tecido ósseo em níveis ideais e com propriedades mecânicas adequadas, encontradas em ossos maduros (PUSHPARAJAN et al., 2013; HUBER et al., 2017). A análise de PicroSirius *Red* revelou que todas as enxertias apresentaram maior índice de maturação da matriz sintetizada, quando comparadas ao controle. Não houve, entretanto, diferenças significativas entre os grupos MOD, CTPD e CTPD+MOD. Entretanto, o fato do nível de maturação no estágio final da avaliação ser superior ao grupo CO e considerando quantitativamente o maior nível de deposição óssea, indicam, juntos, o sucesso da associação proposta. De fato, a quantificação da maturação da matriz colágena em relação à quantidade de trabéculas ósseas neoformadas, no período de 49 dias, demonstra a maior eficiência da associação, já que esse grupo apresentou o maior percentual de osso maduro em relação aos outros tratamentos.

Ainda como forma de avaliar os efeitos primários das enxertias no processo de regeneração óssea, utilizamos a técnica de PCRq, como forma de quantificar a expressão de genes relacionados aos estágios iniciais de diferenciação de células envolvidas na formação óssea nos defeitos. O primeiro transcrito analisado foi referente ao do fator de transcrição Runx, que é responsável por desencadear a diferenciação de células mesenquimais em células da linhagem osteocondro progenitoras. A ativação de Runx2 é capaz de promover a expressão do fator Osx, responsável pela ativação de genes referentes a produção de proteínas de matriz em osteoblastos imaturos (FAKHRY et al., 2013). Para evidenciarmos a presença de osteoblastos maduros, optamos pelo monitoramento da expressão de transcritos referentes a sialoproteína óssea (BSP), específica para o estágio final de maturação (BOULEFTOUR et al., 2014). A coleta de material para a extração de mRNA foi realizada aos 3 e 7 dias, para a análise de evolução temporal da expressão desses transcritos nos diferentes grupos enxertados. O período final de 7 dias foi escolhido para a comparação com os achados histomorfométricos.

Durante a diferenciação osteoblástica o estímulo inicial de Runx2 é importante para o a iniciação do processo, entretanto, para a conclusão da diferenciação de osteoblastos, esse

fator de transcrição deve ser suprimido (JARUGA et al., 2016). Subsequentemente, os osteoblastos maduros iniciam a síntese de proteínas responsáveis pela mineralização da matriz orgânica, como a BSP. Bouleftour et al (2014) demonstraram que esse mecanismo de *turnover* do fator de transcrição Runx2 é fundamental para a expressão apropriada de BSP na formação de ossos durante o desenvolvimento embrionário de camundongos. De acordo com os resultados obtidos (Figura 37), a associação CTPD+MOD foi capaz de estimular a produção de transcritos relacionado aos genes de *Osx*, mas a expressão de Runx2, por sua vez, não foi estimulada ou suprimida em relação aos níveis do período inicial de avaliação. Acreditamos que os valores de regulação positiva de *Osx* nesse grupo, 2x maior do que o período inicial, esteja associado a novos processos de diferenciação osteoblástica, o que explicaria, em parte, os valores inalterados de Runx2. Entretanto, o que chamou a atenção foi a elevação de iBSP aumentado cerca de 64 vezes no grupo CTPD+MOD. O perfil elevado de expressão de transcritos referentes às proteínas responsáveis pela mineralização da matriz nesse grupo corrobora com os resultados obtidos pela morfometria óssea desse grupo, no período de 7 dias. Esse é um achado interessante que pode indicar a participação dos biomateriais na aceleração do processo de reparo, não apenas para a síntese de matriz (deposição óssea) mas também para a subsequente etapa de mineralização. Especialmente para o período de 7 dias, esse é um achado relevante, pois é uma fase muito precoce para um aumento tão significativo da expressão da iBSP. Um perfil semelhante de expressão de marcadores osteogênicos foi visualizado por ZHAO, (2012), que avaliou a eficácia da associação de scaffolds de quitosana funcionalizados com nano cristais de hidroxiapatita. Segundo os achados desses autores, houve um pico de expressão de marcadores tardios de diferenciação osteoblástica (BSP e osteocalcina) no período de 7 dias. Ainda quanto a supressão de Runx2, sugerimos que essa etapa inicial, sem elevação, possa ser posteriormente revertida, tornando sua expressão reduzida, o que deve ser posteriormente avaliado, já que nossos dados e recursos se limitaram à análise entre 3 e 7 dias. As células tronco enxertadas isoladamente apresentaram perfil similar, entretanto, com elevações menores nos índices de expressão de *Osx* e iBSP. O estímulo de iBSP também ocorreu nos grupos CO e MOD, mas em níveis bem inferiores aos observados no grupo da associação com células tronco. Portanto, acreditamos que a avaliação molecular trouxe indícios do benefício da associação nos períodos iniciais do reparo ósseo.

O estudo desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa visava demonstrar o potencial do uso de uma matriz óssea de origem animal para enxertias de reparo ósseo, que ainda não possui grandes fundamentações em trabalhos científicos. Acreditamos que as evidências coletadas a respeito do sucesso da associação da versão desmineralizada dos ossos da empresa Criteria® às células tronco da polpa dentária possam fornecer embasamento científico para estudos complementares que possam culminar em sua aplicabilidade clínica.

6. Conclusões parciais

- A associação da versão desmineralizada da matriz óssea às células tronco da polpa dentária (CTPD+MOD) não prejudicou a cicatrização epitelial sobre a área cirúrgica, apresentando resultados similares aos encontrados com o uso dos componentes isolados (CTPD e MOD) e do grupo controle.
- A utilização de CTPDs de fontes alógenas não gerou respostas de rejeição, mostrando-se em harmonia com células do hospedeiro.
- A associação de CTPD+MOD, foi mais vantajosa para estimular o processo de deposição óssea no interior dos defeitos ósseos nos períodos de 7, 14 e 49 dias.
- O processo de maturação osteoblástica é estimulado pela associação de CTPD+MOD no período de 7 dias.
- A maturação da matriz colágena depositada foi acelerada pela associação CTPD+MOD nos períodos de 7 e 14 dias do reparo ósseo; e mais expressiva no período final do reparo ósseo
- A matriz em sua versão desmineralizada é completamente reabsorvida ao final do processo de reparo, sendo substituída por tecido ósseo neoformado.

Conclusão:

A associação de células tronco pulpares às matrizes desmineralizadas de xenoenxertos potencializaram sua ação osteoindutora, melhorando a resposta de neoformação e maturação óssea em ratos.

7. Referências bibliográficas

- ABEMATSU, M. et al. Neurons derived from transplanted neural stem cells restore disrupted neuronal circuitry in a mouse model of spinal cord injury. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 9, p. 3255–3266, 1 set. 2010.
- ABOU NEEL, E. A. et al. Tissue engineering in dentistry. **Journal of Dentistry**, v. 42, n. 8, p. 915–928, 2014.
- AGHAJANI, F. et al. Comparative Immunophenotypic Characteristics, Proliferative Features, and Osteogenic Differentiation of Stem Cells Isolated from Human Permanent and Deciduous Teeth with Bone Marrow. **Molecular Biotechnology**, v. 58, n. 6, p. 415–427, 28 jun. 2016.
- AKPINAR, G. et al. Phenotypic and Proteomic Characteristics of Human Dental Pulp Derived Mesenchymal Stem Cells from a Natal, an Exfoliated Deciduous, and an Impacted Third Molar Tooth. **Stem Cells International**, v. 2014, p. 1–19, 2014.
- ALBERGARIA, J. D. S. **INFLUÊNCIA DAS MATRIZES MINERALIZADA E DESMINERALIZADA DE ENXERTOS ÓSSEOS BOVINOS NO REPARO DE DEFEITO ÓSSEO INTRABUCAL EM RATOS**. [s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais, 2017.
- ALBREKTSSON, T.; JOHANSSON, C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. **European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society**, v. 10 Suppl 2, n. Suppl 2, p. S96-101, out. 2001.
- ALKHALIL, M.; SMAJILAGIĆ, A.; REDŽIĆ, A. Human dental pulp mesenchymal stem cells isolation and osteoblast differentiation. **Medicinski glasnik : official publication of the Medical Association of Zenica-Doboj Canton, Bosnia and Herzegovina**, v. 12, n. 1, p. 27–32, fev. 2015.
- ALRAIES, A. et al. Variation in human dental pulp stem cell ageing profiles reflect contrasting proliferative and regenerative capabilities. **BMC cell biology**, v. 18, n. 1, p. 12, 2 fev. 2017.
- AMINI, A. R.; LAURENCIN, C. T.; NUKAVARAPU, S. P. Bone tissue engineering: recent advances and challenges. **Critical reviews in biomedical engineering**, v. 40, n. 5, p. 363–408, 2012.
- ARZI, B. et al. Regenerating Mandibular Bone Using rhBMP-2: Part 1-Immediate Reconstruction of Segmental Mandibulectomies. **Veterinary Surgery**, v. 44, n. 4, p. 403–409, maio 2015.
- ATHANASIOU, V. T. et al. Histological comparison of autograft, allograft-DBM, xenograft, and synthetic grafts in a trabecular bone defect: an experimental study in rabbits. **Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research**, v. 16, n. 1, p. BR24-31, jan. 2010.
- AURREKOETXEA, M. et al. Dental pulp stem cells as a multifaceted tool for bioengineering and the regeneration of craniomaxillofacial tissues. **Frontiers in Physiology**, v. 6, n. OCT, p. 1–10, 16 out. 2015.

- BAHT, G. S.; HUNTER, G. K.; GOLDBERG, H. A. Bone sialoprotein–collagen interaction promotes hydroxyapatite nucleation. **Matrix Biology**, v. 27, n. 7, p. 600–608, 1 set. 2008.
- BAKOPOULOU, A.; ABOUT, I. Stem Cells of Dental Origin: Current Research Trends and Key Milestones towards Clinical Application. **Stem Cells International**, v. 2016, p. 1–20, 2016.
- BENDERS, K. E. M. et al. Extracellular matrix scaffolds for cartilage and bone regeneration. **Trends in Biotechnology**, v. 31, n. 3, p. 169–176, 2013.
- BERTASSOLI, B. M. et al. Rat dental pulp stem cells: isolation and phenotypic characterization method aiming bone tissue bioengineering. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 59, 2016.
- BHUTDA, S. et al. Histochemical Staining of Collagen and Identification of Its Subtypes by Picrosirius Red Dye in Mouse Reproductive Tissues. **BIO-PROTOCOL**, v. 7, n. 21, 2017.
- BOHNER, M. Resorbable biomaterials as bone graft substitutes. **Materials Today**, v. 13, n. 1–2, p. 24–30, 1 jan. 2010.
- BOULEFTOUR, W. et al. Skeletal Development of Mice Lacking Bone Sialoprotein (BSP) - Impairment of Long Bone Growth and Progressive Establishment of High Trabecular Bone Mass. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, p. e95144, 9 maio 2014.
- CARVALHO, J. L. et al. Priming mesenchymal stem cells boosts stem cell therapy to treat myocardial infarction. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 17, n. 5, p. 617–625, 14 maio 2013.
- CAVALCANTI, B. N.; ZEITLIN, B. D.; NÖR, J. E. A hydrogel scaffold that maintains viability and supports differentiation of dental pulp stem cells. **Dental Materials**, v. 29, n. 1, p. 97–102, jan. 2013.
- CHATAKUN, P. et al. The effect of five proteins on stem cells used for osteoblast differentiation and proliferation: A current review of the literature. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 71, n. 1, p. 113–142, 2014.
- COLLART-DUTILLEUL, P.-Y. et al. Allogenic banking of dental pulp stem cells for innovative therapeutics. **World journal of stem cells**, v. 7, n. 7, p. 1010–21, 2015.
- CROTTI, T. N. et al. Osteoimmunology : Major and Costimulatory Inflammatory Induced Bone Loss. **Journal of Immunology Research**, v. 2015, 2015.
- DIMITRIOU, R. et al. Bone regeneration: current concepts and future directions. **BMC medicine**, v. 9, p. 66, 2011.
- DIRCKX, N.; VAN HUL, M.; MAES, C. Osteoblast recruitment to sites of bone formation in skeletal development, homeostasis, and regeneration. **Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews**, v. 99, n. 3, p. 170–191, set. 2013.
- DUCY, P. et al. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. **Cell**, v. 89, n. 5, p. 747–54, 30 maio 1997.
- EL-CHAAR, E. S. Demineralized bone matrix in extraction sockets: a clinical and histologic case series. **Implant dentistry**, v. 22, n. 2, p. 120–6, abr. 2013.

- FAKHRY, M. et al. Molecular mechanisms of mesenchymal stem cell differentiation towards osteoblasts. **World journal of stem cells**, v. 5, n. 4, p. 136–48, 26 out. 2013.
- FISHER, J. N.; PERETTI, G. M.; SCOTTI, C. Stem Cells for Bone Regeneration: From Cell-Based Therapies to Decellularised Engineered Extracellular Matrices. **Stem cells international**, v. 2016, p. 9352598, 2016.
- FLORENCIO-SILVA, R. et al. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. **BioMed research international**, v. 2015, p. 421746, 2015.
- FOLEY, L.; WHITAKER, M. Concise Review: Cell Therapies: The Route to Widespread Adoption. **Stem Cells Translational Medicine**, v. 1, p. 438–447, 2012.
- FRANCIS, C. S. et al. rhBMP-2 with a demineralized bone matrix scaffold versus autologous iliac crest bone graft for alveolar cleft reconstruction. **Plastic and reconstructive surgery**, v. 131, n. 5, p. 1107–15, maio 2013.
- GALLER, K. M. Clinical procedures for revitalization: current knowledge and considerations. **International Endodontic Journal**, n. Mohammadi 2011, p. n/a-n/a, 2015.
- GARCÍA, J. R.; GARCÍA, A. J. Biomaterial-mediated strategies targeting vascularization for bone repair. **Drug delivery and translational research**, v. 6, n. 2, p. 77–95, abr. 2016.
- GENOVA, T. et al. Overcoming physical constraints in bone engineering: “the importance of being vascularized”. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 30, n. 7, p. 940–951, fev. 2016.
- GRONTHOS, S. et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 25, p. 13625–13630, 5 dez. 2000.
- HALLMAN, M.; THOR, A. Bone substitutes and growth factors as an alternative/complement to autogenous bone for grafting in implant dentistry. **Periodontology 2000**, v. 47, n. 1, p. 172–192, jun. 2008.
- HENKEL, J. et al. Bone Regeneration Based on Tissue Engineering Conceptions - A 21st Century Perspective. **Bone research**, v. 1, n. 3, p. 216–48, set. 2013.
- HENRIKSEN, K.; KARSDAL, M. A.; JOHN MARTIN, T. Osteoclast-Derived Coupling Factors in Bone Remodeling. **Calcified Tissue International**, v. 94, n. 1, p. 88–97, 23 jan. 2014.
- HOLM, E. et al. Loss of bone sialoprotein leads to impaired endochondral bone development and mineralization. **Bone**, v. 71, p. 145–154, 1 fev. 2015.
- HONMA, T. et al. Bone formation in rat calvaria ceases within a limited period regardless of completion of defect repair. **Oral diseases**, v. 14, n. 5, p. 457–464, jul. 2008.
- HUBER, E. et al. * Demineralized Bone Matrix as a Carrier for Bone Morphogenetic Protein-2: Burst Release Combined with Long-Term Binding and Osteoinductive Activity Evaluated In Vitro and In Vivo. **Tissue engineering. Part A**, v. 23, n. 23–24, p. 1321–1330, dez. 2017.

ISSA, J. P. et al. Bone repair of critical size defects treated with autogenic, allogenic, or xenogenic bone grafts alone or in combination with rhBMP-2. **Clinical oral implants research**, v. 27, n. 5, p. 558–66, maio 2016.

JARUGA, A. et al. Cleidocranial dysplasia and RUNX2-clinical phenotype-genotype correlation. **Clinical Genetics**, v. 90, n. 5, p. 393–402, 1 nov. 2016.

JAVED, A. et al. Structural Coupling of Smad and Runx2 for Execution of the BMP2 Osteogenic Signal. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 13, p. 8412–8422, 28 mar. 2008.

JONASSON, G. et al. Mandibular bone changes in 24 years and skeletal fracture prediction. **Clinical oral investigations**, v. 17, n. 2, p. 565–72, mar. 2013.

KARFELD-SULZER, L. S. et al. Biomaterial development for oral and maxillofacial bone regeneration. **Journal of the Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons**, v. 38, n. 5, p. 264, 2012.

KIM, S. et al. In Vivo Experiments with Dental Pulp Stem Cells for Pulp-Dentin Complex Regeneration. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, 2015.

KOMORI, T. Regulation of Osteoblast and Odontoblast Differentiation by RUNX2. **Journal of Oral Biosciences**, v. 52, n. 1, p. 22–25, 2010.

KUMAR, A.; BHATTACHARYYA, S.; RATTAN, V. Effect of uncontrolled freezing on biological characteristics of human dental pulp stem cells. **Cell and Tissue Banking**, v. 16, n. 4, p. 513–522, 8 dez. 2015.

KWACK, K. H. et al. Human Dental Pulp Stem Cells Suppress Alloantigen-induced Immunity by Stimulating T Cells to Release Transforming Growth Factor Beta. **Journal of Endodontics**, v. 43, n. 1, p. 100–108, 1 jan. 2017.

LAINO, G. et al. A New Population of Human Adult Dental Pulp Stem Cells: A Useful Source of Living Autologous Fibrous Bone Tissue (LAB). **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 20, n. 8, p. 1394–1402, ago. 2005.

LEDESMA-MARTINEZ, E. et al. Mesenchymal Stem Cells Derived from Dental Pulp: A Review. **Stem cells international**, v. 2016, p. 4709572, 2016.

LIU, F. et al. A human Mad protein acting as a BMP-regulated transcriptional activator. **Nature**, v. 381, n. 6583, p. 620–623, 13 jun. 1996.

LIU, J. et al. Concise Reviews: Characteristics and Potential Applications of Human Dental Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells. **STEM CELLS**, v. 33, n. 3, p. 627–638, mar. 2015.

LIU, T. M.; LEE, E. H. Transcriptional regulatory cascades in Runx2-dependent bone development. **Tissue engineering. Part B, Reviews**, v. 19, n. 3, p. 254–63, jun. 2013.

LOI, F. et al. Inflammation, fracture and bone repair. **Bone**, v. 86, p. 119–130, 2016.

LONG, F.; ORNITZ, D. M. Development of the endochondral skeleton. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 5, n. 1, p. a008334, jan. 2013.

MAHLA, R. S. Stem Cells Applications in Regenerative Medicine and Disease Therapeutics. **International journal of cell biology**, v. 2016, p. 6940283, 2016.

- MAO, J. J. et al. Craniofacial tissue engineering by stem cells. **Journal of dental research**, v. 85, n. 11, p. 966–79, 2006.
- MAUNEY, J. R. et al. In vitro and in vivo evaluation of differentially demineralized cancellous bone scaffolds combined with human bone marrow stromal cells for tissue engineering. **Biomaterials**, v. 26, n. 16, p. 3173–3185, 2005.
- MIRANDA, S. C. C. C. et al. Mesenchymal stem cells associated with porous chitosan-gelatin scaffold: A potential strategy for alveolar bone regeneration. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 100A, n. 10, p. 2775–2786, out. 2012.
- MISCH, C. M. Autogenous bone: is it still the gold standard? **Implant dentistry**, v. 19, n. 5, p. 361, out. 2010.
- MIURA, M. et al. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 10, p. 5807–5812, 13 maio 2003.
- NAKASHIMA, K. et al. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. **Cell**, v. 108, n. 1, p. 17–29, 11 jan. 2002.
- NANDI, S. K. et al. Orthopaedic applications of bone graft & graft substitutes: a review. **The Indian journal of medical research**, v. 132, p. 15–30, jul. 2010.
- NING, L.; MALMSTRÖM, H.; REN, Y.-F. Porous Collagen-Hydroxyapatite Scaffolds With Mesenchymal Stem Cells for Bone Regeneration. **Journal of Oral Implantology**, v. 41, n. 1, p. 45–49, fev. 2015.
- NÚÑEZ-TOLDRÀ, R. et al. Dental pulp pluripotent-like stem cells (DPPSC), a new stem cell population with chromosomal stability and osteogenic capacity for biomaterials evaluation. **BMC Cell Biology**, v. 18, n. 1, p. 21, 21 abr. 2017.
- ORYAN, A. et al. Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. **Journal of orthopaedic surgery and research**, v. 9, n. 1, p. 18, 2014.
- PAPAGEORGIOU, S. N. et al. Comparative effectiveness of natural and synthetic bone grafts in oral and maxillofacial surgery prior to insertion of dental implants: Systematic review and network meta-analysis of parallel and cluster randomized controlled trials. **Journal of Dentistry**, v. 48, p. 1–8, maio 2016.
- PARK, Y.-J.; CHA, S.; PARK, Y.-S. Regenerative Applications Using Tooth Derived Stem Cells in Other Than Tooth Regeneration: A Literature Review. **Stem Cells International**, v. 2016, p. 1–12, 2016.
- PELEGRINE, A. A. et al. Repair of critical-size bone defects using bone marrow stromal cells: a histomorphometric study in rabbit calvaria. Part I: use of fresh bone marrow or bone marrow mononuclear fraction. **Clinical oral implants research**, v. 25, n. 5, p. 567–72, maio 2014.
- PIERDOMENICO, L. et al. Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. **Transplantation**, v. 80, n. 6, p. 836–42, 27 set. 2005.
- PIETRZAK, W. S. et al. The in vitro elution of BMP-7 from demineralized bone matrix. **Cell and tissue banking**, v. 13, n. 4, p. 653–61, dez. 2012.

- PILIPCHUK, S. P. et al. Tissue engineering for bone regeneration and osseointegration in the oral cavity. **Dental Materials**, v. 31, n. 4, p. 317–338, abr. 2015.
- POLO-CORRALES, L.; LATORRE-ESTEVEZ, M.; RAMIREZ-VICK, J. E. Scaffold Design for Bone Regeneration. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 14, n. 1, p. 15–56, 1 jan. 2014.
- PRAMANIK, S. et al. In Vitro Study of Surface Modified Poly(ethylene glycol)-Impregnated Sintered Bovine Bone Scaffolds on Human Fibroblast Cells. **Scientific Reports**, v. 5, p. 9806, 7 maio 2015.
- PUSHPARAJAN, S. et al. Efficacy of Guided Bone Regeneration Using Composite Bone Graft and Resorbable Collagen Membrane in Seibert's Class I Ridge Defects: Radiological Evaluation. **Journal of Oral Implantology**, v. 39, n. 4, p. 455–462, 21 ago. 2013.
- QUINLAN, E. et al. Development of collagen–hydroxyapatite scaffolds incorporating PLGA and alginate microparticles for the controlled delivery of rhBMP-2 for bone tissue engineering. **Journal of Controlled Release**, v. 198, p. 71–79, 28 jan. 2015.
- RAI, R. et al. Tissue Engineering: Step Ahead in Maxillofacial Reconstruction. **Journal of international oral health : JIOH**, v. 7, n. 9, p. 138–42, 2015.
- RAVINDRAN, S. et al. Odontogenic Induction of Dental Stem Cells by Extracellular Matrix-Inspired Three-Dimensional Scaffold. **Tissue Engineering Part A**, v. 20, n. 1–2, p. 92–102, jan. 2014.
- ROTHRAUFF, B. B.; TUAN, R. S. Cellular therapy in bone-tendon interface regeneration. **Organogenesis**, v. 10, n. 1, p. 13–28, 2014.
- SÁ, M. et al. Carbon nanotubes functionalized with sodium hyaluronate restore bone repair in diabetic rat sockets. **Oral Diseases**, v. 19, n. 5, p. 484–493, jul. 2013.
- SAWKINS, M. J. et al. Hydrogels derived from demineralized and decellularized bone extracellular matrix. **Acta Biomaterialia**, v. 9, n. 8, p. 7865–7873, 2013.
- SCHWARTZ, A. V. Efficacy of Osteoporosis Therapies in Diabetic Patients. **Calcified tissue international**, 26 jul. 2016.
- SHAHI, M.; PEYMANI, A.; SAHMANI, M. Regulation of Bone Metabolism. **Reports of biochemistry & molecular biology**, v. 5, n. 2, p. 73–82, abr. 2017.
- SHI, S.; ROBEY, P. G.; GRONTHOS, S. Comparison of human dental pulp and bone marrow stromal stem cells by cDNA microarray analysis. **Bone**, v. 29, n. 6, p. 532–539, dez. 2001.
- VI, L. et al. Macrophages Promote Osteoblastic Differentiation In Vivo: Implications in Fracture Repair and Bone Homeostasis. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 30, n. 6, p. 1090–1102, 1 jun. 2015.
- WANG, X. et al. Comparative characterization of stem cells from human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells. **Archives of Oral Biology**, v. 57, n. 9, p. 1231–1240, set. 2012.
- WU, M.; CHEN, G.; LI, Y.-P. TGF- β and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease. **Bone research**, v. 4, p. 16009, 2016.

YANG, W. et al. Bmp2 in osteoblasts of periosteum and trabecular bone links bone formation to vascularization and mesenchymal stem cells. **Journal of cell science**, v. 126, n. Pt 18, p. 4085–98, 15 set. 2013.

YASUI, T. et al. Isolation of dental pulp stem cells with high osteogenic potential. **Inflammation and regeneration**, v. 37, p. 1–10, 2017.

ZHAO, H.; CHAI, Y. Stem Cells in Teeth and Craniofacial Bones. **Journal of Dental Research**, v. 94, n. 11, p. 1495–1501, 2015.

ZHAO, N. Bone repair by periodontal ligament stem cell- seeded nanohydroxyapatite-chitosan scaffold. p. 5405–5414, 2012.

ZIMMERMANN, G.; MOGHADDAM, A. Allograft bone matrix versus synthetic bone graft substitutes. **Injury**, v. 42, p. S16–S21, 2011.

ANEXO 1

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO PROJETO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS:



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 7 / 2015, relativo ao projeto intitulado "Avaliação de enxertos ósseos bovinos, associados ou não à terapia celular no reparo de defeito ósseo intrabucal em ratos.", que tem como responsável Gerluza Aparecida Borges Silva, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 14/04/2015. Este certificado expira-se em 14/04/2020.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 7 / 2015, related to the Project entitled "Evaluation of bovine bone graft associated or not to cell therapy to repair intraoral bone defect in rats.", under the supervision of Gerluza Aparecida Borges Silva, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 14/04/2015. This certificate expires in 14/04/2020.

Cleuza Maria de Faria Rezende
Coordenador(a) da CEUA/UFMG
Belo Horizonte, 14/04/2015.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG
<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

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 - cetea@prpq.ufmg.br