

BRUNO MACHADO BERTASSOLI

**AVALIAÇÃO DE MATRIZ ÓSSEA HUMANA
MINERALIZADA E DESMINERALIZADA COMO
SCAFFOLD PARA BIOENGENHARIA TECIDUAL
ÓSSEA**

Belo Horizonte, MG

Fevereiro/2017

BRUNO MACHADO BERTASSOLI

**AVALIAÇÃO DE MATRIZ ÓSSEA HUMANA MINERALIZADA E
DESMINERALIZADA COMO *SCAFFOLD* PARA
BIOENGENHARIA TECIDUAL ÓSSEA**

Tese 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 a obtenção do título de doutor em Ciências.

Departamento: Morfologia

Área de concentração: Biologia Celular

Orientação: Profa. Dra. Erika Cristina Jorge

Co orientação: Profa. Dra. Gerluza A. Borges Silva

Belo Horizonte, MG

Fevereiro/2017

Este estudo foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Oral e do Desenvolvimento (LABODE) – Departamento de Morfologia - Instituto de Ciências Biológicas da UFMG)

Apoio Financeiro: FAPEMIG, CNPq (processo 141736/2013-5) e CAPES



**ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DE
BRUNO MACHADO BERTASSOLI**

174/2017
entrada
1º/2013
2013667862

Às nove horas do dia 20 de fevereiro de 2017, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Tese, indicada pelo Colegiado de Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "AVALIAÇÃO DE MATRIZ ÓSSEA HUMANA MINERALIZADA E DESMINERALIZADA COMO SCAFFOLD PARA BIOENGENHARIA TECIDUAL ÓSSEA", requisito final para obtenção do grau de Doutor em Biologia Celular, área de concentração: **Biologia Celular**. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, **Dra. Erika Cristina Jorge**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dra. Erika Cristina Jorge	UFMG	Aprovado
Dra. Gerluza Aparecida Borges Silva	UFMG	Aprovado
Dr. Fernando Antônio Mauad de Abreu	PUC	Aprovado
Dra. Patrícia Valério	European Institute	Aprovado
Dra. Kátia Lucy de Melo Maltos	UFMG	Aprovado
Dr. Gregory Thomas Kitten	UFMG	Aprovado

Pelas indicações, o candidato foi considerado: Aprovado
O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 20 de fevereiro de 2017.**

Dra. Erika Cristina Jorge (Orientadora) Erika Cristina Jorge
Dra. Gerluza Aparecida Borges Silva (Co-orientadora) Gerluza A. Borges Silva
Dr. Fernando Antônio Mauad de Abreu Fernando Mauad de Abreu
Dra. Patrícia Valério Patrícia Valério
Dra. Kátia Lucy de Melo Maltos Kátia Lucy de Melo Maltos
Dr. Gregory Thomas Kitten Gregory T. Kitten

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador

Prof.ª Luciana de Oliveira Andrade
Prof.ª Luciana de Oliveira Andrade
COORDENADORA DO PROGRAMA DE
PÓS GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR ICB/UFMG

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Elisia Aparecida Machado e Luiz Carlos Bertassoli, que já não se encontram mais entre nós, e tenho certeza, mais que absoluta, que onde estão sempre me guiaram e cuidaram de minha pessoa.

Dedico esse trabalho a minha família, pois sem eles, tenho grande certeza de que não estaria onde estou e não teria conseguido o que consegui até hoje, dedico em especial a tia Bebel e tio Tonho, tia Lucia e Tio Walter e Luciana!! Meu PORTO SEGURO!!!

Ao meu sobrinho (Rafael de Oliveira da Silva), minha razão de viver !!!!

AGRADECIMENTOS

Agradeço em especial a minha orientadora, Erika Cristina Jorge, e a minha co-orientadora, Gerluza Aparecida Borges Silva. Agradeço o tempo de convivência, agradeço a paciência, agradeço mais que tudo, por me ajudar a ser uma pessoa melhor para o mundo!!!

Aos amigos, colegas, irmãos do LABODES:

Aline Copola, Iria, Igor, Samira, Julia, Luiza, Fernando.

Em especial:

Alinne Costa por me aguentar com minhas chatices, e pra me dar o ombro quando precisei!

Juliano Albergaria: você foi o cara comigo, sempre que estava pra baixo nossas conversas no caminho de casa sempre foram de bom grado, muito obrigado.

Sarah..... oxe menina, eu tenho que lhe agradecer pelos cafês, pelas conversas, pelos conselhos Mininaaaaaa você é muito especial pra mim !!!

Rayan, te considero um irmão, sempre me ajudando quando eu precisava!!

Aos amigos, colegas, professores e funcionários do departamento de Morfologia do ICB/UFMG.

As professoras, Ana Flavia de Carvallho e Celina de Almeida Furlanetto Mançanares, minhas mães postiças de sempre. Sem elas, não seguiria o caminho da pesquisa.

A Thais Borges Lessa..... esse agradecimento é do fundo do meu coração, para mim você é a irmã que não tive!!

Ao Edinho: não tenho palavras pra lhe agradecer.... lhe sou grato por todo esse tempo de convivência, por todo esse tempo de aprendizado, por todo o tempo que passamos juntos! OBRIGADO por me fazer uma pessoa melhor a cada dia !!!

Aos amigos e colegas, que as vezes mesmo que só de passagem, fizeram a diferença em minha vida!

Aos amigos do VOLEI !!!!! vocês fizeram as tardes de domingo mais felizes!

Ao **CNPq (processo 141736/2013-5)**, **FAPEMIG** e **CAPES** por financiarem esta pesquisa.

Há pessoas que desejam saber só por saber, e isso é curiosidade; outras, para alcançarem a fama, e isso é vaidade; outras, para enriquecerem com a sua ciência, e isso é um negócio torpe; outras, para serem edificadas, e isso é prudência; outras, para edificarem os outros, e isso é caridade"

(S. Tomás de Aquino)

RESUMO

Bertassoli BM. *Avaliação da matriz óssea humana mineralizada e desmineralizada como scaffold para bioengenharia tecidual óssea* [tese]. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais; 2017. 97p.

A busca por soluções para perdas ou lesões do tecido ósseo tem estimulado pesquisas que visam a melhoria, a evolução e o desenvolvimento de novos biomateriais de enxertia óssea. Atualmente, enxertos alógenos representam uma alternativa importante, já utilizada em procedimentos clínicos em ortopedia e odontologia. O osso alógeno tem sido indicado como biomaterial de preenchimento, com finalidade osteocondutora e osteoindutora. Mas o potencial de uso da matriz orgânica desmineralizada tem sido pouco estudado. As pesquisas em bioengenharia tecidual óssea tem avançado no intuito de associar tipos celulares diferentes à matrizes 3D modificadas. Neste estudo foram avaliados os potenciais de matrizes ósseas humanas mineralizadas (OHM) e desmineralizadas (OHD) para induzirem a proliferação e diferenciação de células tronco mesenquimais de polpas dentárias (CTPD) e de linhagens osteoblásticas primárias (OP) e imortalizadas (OI) em culturas 3D. As CTPD foram coletadas de incisivos de ratos machos wistar adultos; os OP coletados de calvária de neonatos de ratos com 3 dias de vida; e os OI adquirido comercialmente. Fragmentos ósseos foram obtidos junto ao Banco de Tecido Músculo Esquelético da Universidade de Marília – SP (UNIOSS). A versão desmineralizada foi obtida em laboratório, utilizando solução quelante de EDTA 10%. As CTPD apresentaram características imunofenotípicas e capacidade de diferenciação similar às células tronco mesenquimais. Os OP e OI foram confirmados pela expressão de Osteopontina, BMP4, Colágeno tipo 1 e RUNX2; além de mineralizarem após 21 dias em meio osteogênico. Na caracterização das matrizes, o OHM apresentou-se opaco e com 55% dos seus poros > 500 µm; enquanto que o OHD apresentou-se translúcido, com 76% dos poros > 500 µm. O processo de desmineralização preservou os componentes da matriz orgânica, avaliados por imufluorescência de proteínas ósseas. Os índices de viabilidade dos OP e OI foram maiores quando cultivados sobre os *scaffolds* OHD, quando comparado aos índices obtidos com OHM. As CTPD, no entanto, apresentaram resultado oposto: foram mais viáveis quando cultivadas sobre *scaffolds* de OHM. Os resultados de MEV revelaram que todos os tipos celulares aderiram e formaram uma camada contínua sobre ambos *scaffolds*. O OHD foi ainda capaz de induzir maior atividade da enzima fosfatase alcalina e nódulos de mineralização maiores em todos os tipos celulares, comparados aos dados obtidos com OHM. Os resultados obtidos indicaram, portanto, um importante potencial da matriz óssea humana desmineralizada como *scaffold* e utilização das CTPD para a bioengenharia tecidual óssea.

Palavras chave: Banco de osso humano; Bioengenharia tecidual óssea; Células-tronco da polpa dentária; *Scaffolds*; Matriz óssea desmineralizada; Matriz óssea mineralizada.

ABSTRACT

Bertassoli BM. Evaluation of mineralized and demineralized human bone matrix as a scaffold for bone tissue bioengineering [thesis]. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais; 2017. 97p.

The search for solutions for the bone loss or lesions has been stimulating researches to improve or develop new biomaterials to be used as bone grafts. Currently, allogeneic grafts represent an important alternative and have been widely used in orthopedic and odontologic clinics. Allogene bone has been utilized as biomaterial to fill the lesion site, promoting osteoconduction and osteoinduction. However, the potential of the use of the organic demineralized matrix has not been fully investigated thus far. Bone tissue bioengineering research has improved with the association of different cell types with modified 3D matrix. In this work, the potential of human bone matrix in mineralized (MHB) and demineralized (DHB) forms to induce dental pulp stem cell (DPSC) and osteogenic cell line (primary - PO; and immortalized - IO osteoblasts) proliferation and differentiation were evaluated in 3D culture. DPSC were isolated from Wistar rat incisors; PO from 3 day-old rat calvariae; and the IO were commercially obtained. Bone fragments were obtained from the Musculoskeletal Tissue Bank, at the University of Marília (SP, UNIOSS). The demineralized form of the bone graft was obtained in the lab using 10% EDTA as chelant solution. DPSC showed immunophenotypic and differentiation capacity characteristics similar to mesenchymal stem cells. PO and IO were confirmed by the expression of Osteopontin, BMP4, Type I Collagen and Runx2 and by their mineralization capacity after 21 days of culture in osteogenic media. In the characterization of the bone grafts, the MHB showed an opaque structure, with 55% of their pores $> 500 \mu\text{m}$ while the DHB was found to be translucent, showing 76% of their pores $> 500 \mu\text{m}$. The demineralization process preserved the components of the organic matrix, as revealed by positive immunofluorescence for bone markers. PO and IO showed higher viability indexes when cultivated onto scaffolds of DHB compared to the data obtained with MHB. DPSC, however, showed the opposite result: viability indexes of these cells were higher when they were cultivated onto MHB as scaffolds. Scanning electronic microscopy (SEM) revealed that all cell types could adhere and form a continuous layer on both scaffolds. The DHB was also able to induce higher alkaline phosphatase activity and larger mineralization nodules in all cell types (DPSC, PO and IO), compared to the data obtained with MHB. Therefore, these results showed an important potential of demineralized human bone matrix as a scaffold in bone tissue bioengineering.

Key words: Human bone bank; Bone tissue bioengineering; Dental Pulp Stem Cells; Scaffolds; Demineralized bone matrix; Mineralized bone matrix.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Extração de polpa dentária de incisivos inferiores de ratos Wistar.....	36
Figura 2. Análise de EDX em osso humano mineralizado e desmineralizado.....	45
Figura 3. Esquema representativo da mensuração dos poros dos ossos	46
Figura 4. Microscopia invertida em contraste de fase de osteoblastos primários (OP) e imortalizados (OI) em cultura bidimensional	53
Figura 5. Expressão de Osteopontina, BMP4 e Colágeno tipo I em OP, por imunofluorescência.....	54
Figura 6. Expressão de Osteopontina, BMP4 e Colágeno tipo I em OI, por imunofluorescência.....	55
Figura 7. Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos amplificados por RT-PCR de Runx2 e Colágeno tipo I nos OI e OP.	56
Figura 8. Análise morfológica de fragmentos de osso humano mineralizado (OHM) e osso humano desmineralizado (OHD).....	57
Figura 9. Mensuração dos poros de fragmentos de osso humano mineralizado (OHM) e osso humano desmineralizado (OHD).....	57
Figura 10. Eletronmicrografia de fragmentos de osso humano mineralizado (OHM) e osso humano desmineralizado (OHD).....	58
Figura 11. Cortes histológicos de osso humano.....	59
Figura 12. Imunofluorescência para marcadores osteogênicos na matriz de osso humano desmineralizado.....	60
Figura 13. Análise de ensaio de viabilidade de células cultivadas em meio basal sobre OHM e OHD.	61

Figure 14. Eletromicrografia em de OI cultivados sob <i>scaffolds</i> de OHD e OHM aos 7, 14 e 21 dias de cultivo em meio basal.....	62
Figure 15. Eletromicrografia em de OP cultivados sob <i>scaffolds</i> de OHD e OHM, aos 7, 14 e 21 dias de cultivo em meio basal.....	63
Figura 16. Eletromicrografia de CTPD cultivadas sob <i>scaffolds</i> de OHD e OHM, aos 7, 14 e 21 dias de cultivo em meio basal.....	64
Figura 17. Representação gráfica da atividade da enzima Fosfatase Alcalina, obtida pelo ensaio de NBT/BCIP.	65
Figura 18. Representação gráfica da deposição de mineral, obtida pela coloração de vermelho de alizarina.	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência de nucleotídeos, temperatura de anelamento (Ta) e tamanho do amplicon (em pb) dos oligonucleotídeos utilizados como genes referência e alvo utilizados por RT-PCR.....	43
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

- AATB** - *American Association of Tissue Banks*
- BCIP** (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate)
- BMPs** – Proteínas morfogenéticas ósseas (do inglês: *bone morphogenetic protein*)
- BSA** – Albumina sérica bovina (do inglês: bovine serum albumin)
- BTME** – Banco de tecido musculo esquelético
- CD** – *Cluster of Differentiation*
- CDTN** – Centro de desenvolvimento da tecnologia nuclear
- CEBIO** – Centro de bioterismo
- CEUA** – Comissão de ética no uso de animais
- CTM** – Células tronco mesenquimal
- CTMO** – Células tronco da medula óssea
- CTPD** – Células tronco da polpa dentária
- DO** – Densidade óptica
- EDTA** – Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês: Ethylenediamine tetraacetic acid)
- EDX** – Energia dispersiva de raio x
- FA** – Fosfatase alcalina
- FDA** - *Food and Drug Administration*
- FNT** – Formalina neutra tamponada
- GFP** – Green fluorescence protein
- MC** – Meio de crescimento
- MEV** – Microscopia eletrônica de varredura
- MO** – Meio osteogênico
- MOD** – Matriz ossea desmineralizada
- NBT** - *Nitro blue tetrazolium*
- OH** – Osso humano
- OHD** – Osso humano desmineralizado
- OHM** – Osso humano mineralizado
- OI** – Osteoblasto imortalizado
- OP** – Osteoblasto primário
- PBS** – Agua tamponada fosfatada (do inglês: phosphate-buffered saline)
- PFA** – Paraformaldeideo

RNA – Ácido ribonucleico

RNA_m – Ácido ribonucleico mensageiro

RT-PCR – Reação em cadeia da polimerase transcriptase reversa (do inglês: reverse transcriptase-polymerase chain reaction)

SFB – Soro fetal bovino

SNT – Sistema nacional de transplante

TGF- β – Fator de transformação do crescimento beta (do inglês: *transforming growth factor beta*)

μm – Micrometros

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1. Bioengenharia tecidual e <i>scaffolds</i> para suporte celular.....	20
2.2. Biomateriais para terapias ósseas – propriedades desejáveis.....	22
2.3. Enxertos ósseos – Osso humano alógeno.....	24
2.4. Células de interesse em bioengenharia tecidual óssea.....	29
2.4.1 Células tronco mesenquimais (CTM).....	29
2.4.2 Células tronco da polpa dentária (CTPD).....	31
2.4.3 Células osteoblásticas.....	32
3. OBJETIVOS.....	35
3.1 Objetivo Geral.....	35
3.2 Objetivos Específicos.....	35
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
4.1 Animais.....	36
4.2 Extração e caracterização das Células tronco da polpa dentária (CTPD)....	36
4.3 Coleta de Osteoblastos primários (OP) e obtenção dos Osteoblastos imortalizados (OI).....	38
4.4 Caracterização das linhagens de células osteoblásticas.....	39
4.5 Análise morfológica das células OP e OI.....	40
4.5 Análise do potencial de mineralização das células OP e OI.....	40
4.6 Análise da expressão de marcadores osteogênicos.....	40
4.7 Seleção dos biomateriais de interesse, avaliação preliminar dos biomateriais e preparo dos <i>scaffolds</i> para a cultura.....	44
4.8 Preparo dos <i>scaffolds</i> desmineralizados.....	45
4.9 Esterilização dos <i>scaffolds</i> para cultura celular.....	46
4.10 Análise preliminar de OH.....	47
4.10.1 Análise macroscópica.....	47
4.10.2 Análise microscópica.....	48
4.10.3 Análise de componentes orgânicos dos biomateriais por imunofluorescência.....	48
4.11 Plaqueamento das células sobre os <i>scaffolds</i>	49
4.12 Análises das culturas tridimensionais.....	50
4.12.1 Avaliação da viabilidade celular – Ensaio MTT.....	50
4.12.2 Avaliação de aderência celular.....	51
4.12.3 Análise da diferenciação osteoblástica por meio da fosfatase alcalina .	51
4.12.4 Análise do potencial de deposição mineral por meio da coloração com vermelho de alizarina.....	52
4.13 Análise Estatística.....	53
5. RESULTADOS.....	53
5.1 Isolamento e Caracterização das células tronco mesenquimais da polpa dentária (CTPD).....	53

5.2 Caracterização preliminar dos osteoblastos primários (OP) e imortalizados (OI)	53
5.2.1 Aspectos morfológicos e potencial de deposição mineral de OP e OI	53
5.2.2 Expressão de marcadores osteoblásticos nas culturas OP e OI.....	54
5.3 Caracterização dos <i>scaffolds</i> de osso humano	57
5.3.1 Aspectos ao estereomicroscópio.....	57
5.3.2 Aspectos ultraestruturais dos <i>scaffolds</i> ao MEV.....	59
5.3.3 Aspectos histológicos dos <i>scaffolds</i> ao microscópio de luz	59
5.3.4 Preservação dos constituintes da matriz orgânica dos <i>scaffolds</i>	60
5.4 Avaliação das culturas tridimensionais – CTPD, OI e OP sobre <i>scaffolds</i> de OH	61
5.4.1 Ensaios de viabilidade celular.....	61
5.4.2 Análise das culturas sobre os <i>scaffolds</i> em microscopia eletrônica de varredura - MEV	63
5.4.3 Análise da atividade da Fosfatase Alcalina (FA) das células OI, OP e CTPD cultivadas sobre os <i>scaffolds</i> de OHM e OHD.....	65
5.4.4 Análise da deposição mineral por meio da coloração de grânulos de cálcio (vermelho de alizarina).....	66
6. DISCUSSÃO.....	67
7. CONCLUSÕES.....	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78

1. INTRODUÇÃO

A busca por soluções para perdas ou lesões do tecido ósseo tem estimulado pesquisas que visem a melhoria, a evolução e o desenvolvimento de novos biomateriais de enxertia óssea. Atualmente, os enxertos ósseos de natureza humana (enxertos alógenos), oriundos de banco de tecidos músculo esquelético (BTME), e os biomateriais de natureza bovina (xenoenxertos) representam alternativas importantes, já utilizadas em procedimentos clínicos.

Existe uma crescente demanda de solicitações de enxertos musculoesqueléticos alógenos para reconstruções ortopédicas e odontológicas no Brasil, destacando-se os tecidos ósseos com 21.681 distribuições em 2014, originando o número anual de 113,7 por milhão de população (ANTEBI et al., 2016).

No âmbito da pesquisa clínica, esses enxertos têm sido indicados como biomateriais de preenchimento, com finalidades osteocondutora e osteoindutora. As pesquisas em bioengenharia tecidual óssea tem avançado no intuito de associar diferentes tipos celulares e moléculas bioativas a esses biomateriais, conhecidos na área de bioengenharia como *scaffolds*, a fim de melhorar as propriedades de osteogênese e osteoindução de suas superfícies. *Scaffolds* são biomateriais de aspecto tridimensional, geralmente de natureza porosa, capazes de suportar a adesão e proliferação celular (OLIVEIRA et al., 2010). Os biomateriais e *scaffolds* de bioengenharia tecidual devem ser biocompatíveis, biotolerados, osteoindutores, osteocondutores, osteogênicos; devem ser de fácil manipulação, esterilizáveis, facilmente obtidos, hidrofílicos, baixo custo, não devendo atuar como substratos para a proliferação de patógenos, devem ser livres de potencial cancerígeno ou teratogênico e antigênico. Além disso, uma vez enxertados *in vivo*, devem permanecer no organismo por um tempo compatível para sua substituição por um novo tecido ósseo (FONSECA e DAVIES, 1995; PIKOS, 2000).

Dentre os inúmeros biomateriais utilizados em enxertias ósseas, bem como em trabalhos de bioengenharia tecidual, os ossos de natureza humana têm se destacado por cobrir grande parte das propriedades biológicas requeridas. Indubitavelmente, a fonte autógena desses fragmentos é considerada a melhor alternativa em termos de imunogenicidade. Entretanto, a fonte de osso do próprio paciente é limitada e gera um segundo sítio cirúrgico na área doadora, responsável por um maior nível de morbidade nestes pacientes (ZABEU e MERCADANTE, 2008). Por essa razão, as pesquisas com osso humano alógeno representam uma esperança para pacientes com grandes perdas ósseas. Estudos que visam melhorar as propriedades biológicas dos fragmentos ósseos oriundos de bancos de tecidos humanos são importantes, pois estes biomateriais constituem uma alternativa viável ao uso de osso humano autógeno (ANTEBI et al., 2016). Os fragmentos de osso alógeno já são corriqueiramente fornecidos para profissionais das áreas de ortopedia e odontologia. Os fragmentos ósseos são descelularizados, quimicamente processados e congelados para envio aos profissionais. Em geral são utilizados clinicamente como substitutos ósseos em defeitos bucomaxilofaciais ou em ortopedia (AMATUZZI et al., 2000). Algumas pesquisas têm avaliado o uso destes biomateriais como *scaffolds* para a bioengenharia tecidual óssea, em associação com células e algumas moléculas osteoindutoras (AMINI, LAURENCIN e NUKAVARAPU, 2012; CORRALES, ESTEVES e VICK, 2014)

Fragmentos de osso alógeno são processados pelos Bancos de Tecido licenciados pelo Ministério da Saúde e encaminhados às clínicas em apresentação mineralizada, com a preservação de seus componentes inorgânicos. Os profissionais, previamente cadastrados no Sistema Nacional de Transplantes (SNT) podem solicitar ao Banco de Tecidos Músculo-esqueléticos, o tipo de osso que melhor atende ao seu objetivo clínico, podendo ser trabeculado, cortical ou córtico-medular. Na maioria dos procedimentos

clínicos de enxertia, os ossos humanos são utilizados em sua apresentação inorgânica (fragmentos mineralizados). Recentemente, as pesquisas têm demonstrado o grande potencial de componentes da matriz orgânica do tecido ósseo como importantes coadjuvantes do reparo nas enxertias ósseas (AMINI, LAURENCIN e NAKAVARAPU, 2012). De fato já é uma realidade a comercialização de pastas de matriz óssea desmineralizada rica em BMPs para o preenchimento de articulações (em ortopedia) e defeitos ósseos dos maxilares (em odontologia).

As proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) são exemplos de componentes orgânicos da matriz óssea de uso clínico de grande sucesso entre os profissionais. Os bancos de osso já têm disponibilizado os fragmentos ósseos parcialmente desmineralizados. A hipótese é que o processo de desmineralização deve expor componentes da matriz orgânica com potencial osteogênico e osteoindutor; e tais moléculas, por sua vez, devem interferir no comportamento das células, na adesão, proliferação, diferenciação celular, influenciando o processo de regeneração óssea. Desse modo, é possível que os *scaffolds* desmineralizados utilizados nos protocolos de bioengenharia tecidual sejam mais atraentes para células e possam guardar propriedades osteoindutoras comparativamente superiores aos *scaffolds* mineralizados (AMINI, LAURENCIN e NAKAVARAPU, 2012; BARBOZA et al., 2012; CORRALES, ESTEVES e VICK, 2014).

Diante deste contexto, o presente estudo se propôs avaliar duas modalidades, versões mineralizada e desmineralizada de osso humano trabeculado como *scaffold* para cultura de duas linhagens celulares, células osteoblásticas e células tronco mesenquimais, selecionadas por serem *in vivo*, as células mais envolvidas no processo de reparo ósseo. Investigamos também, a influência da matriz óssea humana, mineralizada e desmineralizada, na adesão, proliferação e diferenciação dessas células.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Bioengenharia tecidual e *scaffolds* para suporte celular

O conceito de bioengenharia tecidual foi introduzido por Langer e Vacanti (1993) e refere-se a um campo interdisciplinar que aplica princípios de engenharia e ciências da vida no sentido do desenvolvimento de substitutos biológicos que recuperem, mantenham ou melhorem a função tecidual, ou de um órgão. A bioengenharia tecidual envolve a combinação entre células, um *scaffold* ou suporte tridimensional para aderência e proliferação celular, e agentes bioativos que possam potencializar a construção do tecido *in vitro*. A vantagem da incorporação de *scaffolds* a essa tecnologia é o fato do material prover a estrutura de suporte inicial para reter as células na área defeituosa e ser depois degradado, quando as células secretarem sua própria matriz. Existem matrizes que fornecem apenas um suporte para a formação óssea; mas, outras podem ser usadas como um sistema para veículo de agentes bioativos, como exemplo, para os fatores de crescimento (DATTA et al., 2005).

Dentre os biomateriais mais utilizados como *scaffolds* para a bioengenharia tecidual óssea, destacam-se quatro grupos principais de biomateriais: polímeros naturais, polímeros sintéticos, materiais metálicos e materiais inorgânicos, como por exemplo, cerâmicas e vidros (NOOEID et al., 2012). Alguns desses biomateriais têm sido tanto como *scaffolds* em estudos de bioengenharia tecidual óssea, quanto para uma aplicação direta *in vivo* como biomateriais para enxertia, como substitutos ósseos. Como exemplos, os fragmentos ósseos bovinos e humanos, hidroxiapatitas e o Beta-fosfato-tricálcio (β -TCP) (DANTAS, et al., 2011, CORRALES, ESTEVES e VICK, 2014). As propriedades, limitações e características específicas de cada biomaterial justificam as vantagens,

desvantagens e a indicação dos biomateriais para uso nos casos de enxerto (*in vivo*) e/ou protocolos preliminares de bioengenharia tecidual (*in vitro*).

Sabe-se que os biomateriais mais indicados para uso *in vivo* são aqueles que apresentam uma melhor biocompatibilidade e baixa imunogenicidade, ou seja, que induzem uma resposta biológica negativa por parte do hospedeiro. Idealmente devem ser quimicamente semelhantes ao organismo receptor (FERREIRA et al., 2007). A biocompatibilidade refere-se ao comportamento das células do hospedeiro quando entram em contato com a superfície do material. Esta superfície deve ser capaz de influenciar a adesão de osteoblastos e células envolvidas no reparo tecidual (ELIAS et al., 2012). Portanto, no caso da engenharia tecidual, os chamados “construtos” que são os tecidos criados *in vitro* e que serão posteriormente enxertados *in vivo*, devem ser atrativos às células e tecidos do organismo receptor (FERREIRA et al., 2007).

De acordo com as propriedades dos biomateriais empregados, eles podem ter apenas a função de preencher espaços (substitutos ósseos) ou podem estimular respostas biológicas adequadas do hospedeiro (AMARAL, 2013).

Métodos de reconstrução óssea são pré-requisitos essenciais para a reabilitação funcional do sistema esquelético e do sistema estomatognático, especialmente para correção de perdas traumáticas ou mudanças atróficas do processo alveolar da maxila ou mandíbula (WILTFANG et al., 2004). As terapias atuais consistem na retirada de parte do osso do paciente ou de um doador para inserí-lo na região danificada (MEIJER et al., 2007). Os transplantes podem ser feitos de forma autóloga, homóloga ou heteróloga (CANCEDDA et al., 2007). A engenharia de tecidos ósseos surgiu como um avanço em relação aos enxertos ósseos isolados. O princípio básico da engenharia tecidual óssea é a formação de um novo osso *in vitro* e *in vivo* através da combinação de células osteopontentes cultivadas em materiais osteocondutivos para gerar um constructo (ZHU

et al., 2006; HUTMACHER e GARCIA, 2005). As matrizes tridimensionais utilizadas no bioengenharia tecidual são projetadas para permitir a migração e a proliferação celular, vascularização e difusão de nutrientes (PUPPI et al., 2010). Atualmente, pesquisas em animais têm utilizado as matrizes ou arcabouços orgânicos dos próprios órgãos onde se pretende restaurar. Como exemplo, para a bioengenharia do tecido cardíaco, matrizes descelularizadas de coração têm sido utilizadas como suporte tridimensional para o cultivo de células tronco que são induzidas à diferenciação muscular (cardiomiócitos) para posterior transplante para áreas infartadas ou comprometidas (MAZZONETTO et al., 2012). De modo similar, algumas pesquisas têm avaliado o arcabouço das matrizes ósseas obtidas do próprio osso humano ou bovino como *scaffolds* osteocondutores para células ósseas (COSTA et al., 2005).

2.2. Biomateriais para terapias ósseas – propriedades desejáveis

Biomateriais são definidos como substâncias ou conjunto de substâncias, idealizados para implante ou incorporação por qualquer período de tempo, com a finalidade de substituir um tecido vivo que perdeu sua função, podendo servir como matriz de suporte, veículo ou estimulador para o crescimento de um novo tecido (WILLIAMS, 1987). Os biomateriais podem ser classificados em relação a vários aspectos, como por exemplo: origem, organização estrutural, topografia da superfície, técnicas de fabricação (LAWRENCE e MADIHALLY, 2008). Quanto ao tipo de material constituinte, esses podem ser classificados como: polímeros, metais, cerâmica e compósitos (CHEUNG, 2007).

A escolha do biomaterial visando a substituição óssea é fundamental para o sucesso das estratégias de readequação funcional, seja por implantes ou próteses. Para o desenvolvimento de matrizes tridimensionais que simulem a fisiologia óssea, as

propriedades mecânicas, estruturais e biológicas devem ser cuidadosamente observadas (MANO et al., 2007).

Araújo e colaboradores (2009) listaram características importantes para os biomateriais a serem utilizados em enxertia: capacidade de produção de ossos a partir da indução da proliferação celular de osteoblastos e de osteoindução de células mesenquimais recrutadas; capacidade de remodelar o osso imaturo em osso lamelar maduro; manutenção do osso maduro sem perda da função; capacidade de estabilizar implantes simultâneos ao enxerto; baixo risco de infecção; eficácia e segurança. Para tanto, os materiais não devem ser tóxicos, carcinogênicos, radioativos e devem ser facilmente esterilizáveis.

Têm sido desenvolvidos biomateriais que sirvam como suporte físico e atuem como um substrato adesivo para células durante cultura *in vitro* para subsequente implantação. No caso da adesão de osteoblastos à superfície de biomateriais, este substrato é considerado osteocondutor. A osteocondução é definida como a capacidade de um biomaterial, natural ou sintético, de promover a migração de células osteoprogenitoras ao longo de sua superfície (JARCHO, 1981).

Biomateriais destinados à reconstrução óssea devem apresentar porosidade. Os materiais porosos e osteocondutores tem substituído materiais biologicamente compactos e inertes (ROSE e OREFFO, 2002). O tamanho dos poros e a interconectividade entre eles interferem nas respostas biológicas. Porém, dados da literatura são divergentes em relação ao tamanho ideal da porosidade dos biomateriais. Pamula e colaboradores (2008) sugeriram que quanto maior o tamanho dos poros (40-600 μm) e interconectividade, maior o número de osteoblastos humanos MG63; porém a diferença desapareceu entre todas porosidades após 15 dias de cultura. Murphy, Haugh e Brien (2010) mostraram que à medida que diminui o tamanho dos poros aumenta a área de contato da superfície do

suporte (*scaffold*), porém encontrou melhor infiltração celular em *scaffolds* com poros de 325 μm . Já para Roosa e colaboradores (2004), a porosidade entre 300-800 μm da policaprolactona teve uma influência limitada na regeneração óssea em 8 semanas.

Karageorgiou e colaboradores (2005) resumiram que poros menores que 100 μm não são suficientes para transporte e migração celular e induzem a formação de cartilagem endocondral antes que a osteogênese ocorra, também devido ao baixo fornecimento de oxigênio, já poros maiores que 300 μm levam diretamente à osteogênese devido à maior vascularização e aporte de oxigênio. Uma grande área de superfície favorece a vascularização, permitindo o fluxo de nutrientes e dos produtos gerados pela célula. No entanto poros maiores parecem gerar o crescimento de células ósseas, mas em competição com células de natureza fibrovascular. A divergência de informações entre os pesquisadores em relação ao tamanho ideal dos poros pode ser devido às diferenças entre os polímeros utilizados.

2.3. Enxertos ósseos – Osso humano alógeno

Os enxertos ósseos são fragmentos sem vascularização, transplantados para área receptora com a finalidade de reconstruir perdas do esqueleto causadas por traumas, infecções e ressecções de tumores. Eles podem ser autógenos, quando retirados e transferidos do mesmo indivíduo; homogêneos ou alógenos, se obtidos a partir de doadores da mesma espécie; ou xenógenos (heterógenos) se obtidos de doadores de espécies diferentes. Tanto o autógeno quanto o homogêneo têm sido amplamente utilizados na prática cirúrgica ortopédica (DUATE da SILVA et al., 2000); já o xenógeno tem sido mais comum na prática odontológica (PADOVAN et al., 2012).

O enxerto autógeno é o único que oferece três propriedades desejáveis para a resposta de reparo ósseo, a osteogênese, osteoindução e osteocondução, sendo estas

propriedades apresentadas ao se instalarem no leito receptor (DINOPOULOS, DIMITRIOU e GIANNOUDIS, 2012).

Pela osteocondução, o enxerto auxilia a cicatrização ao permitir a infiltração vascular e a migração interna de elementos celulares envolvidos na formação do osso, como células mesenquimais indiferenciadas, osteoblastos, osteoclastos, entre outros. A osteogênese consiste na formação do osso a partir de células indiferenciadas e osteoprogenitoras vivas oriundas do hospedeiro ou vindas do enxerto. Materiais orgânicos como os enxertos autógenos são capazes de promover a formação óssea diretamente a partir de osteoblastos (DANTAS et al., 2011).

Já na osteoindução, a matriz proteica e o mineral estrutural fornecem arcabouço, proteínas e células para a formação de um novo tecido ósseo (URIST, 1965; CHEN et al., 2009). Nesse processo, após a exposição ao enxerto, células mesenquimais indiferenciadas e células osteoprogenitoras são induzidas a diferenciarem-se em osteoblastos, evento mediado por fatores de crescimento transformantes beta (do inglês, *Transforming Growth Factors B*, TGF-B) e pelas proteínas morfogenéticas ósseas (BMP) (AMARAL, 2013).

A osteopromoção consiste no uso de meios físicos promotores de isolamento anatômico de um sítio, de modo a permitir a seleção e proliferação de determinado grupo de células, como os osteoblastos. De modo simultâneo, na osteopromoção, ocorre o impedimento de fatores inibitórios do processo de regeneração (DANTAS et al., 2011).

Os enxertos autógenos são considerados o “padrão ouro” das enxertias por que são portadores de células vivas, do próprio indivíduo para área enxertada. Além disso, apresentam propriedades tridimensionais que facilitam a entrada de capilares e células do leito receptor para se diferenciar dentro desta estrutura. Ossos autógenos apresentam

melhor incorporação ao indivíduo e o baixo índice de rejeição em relação aos demais (MAUNEY et al., 2005; AL KAYAL et al., 2015; ANTEBI et al., 2016).

Os enxertos alógenos, homogêneos ou homoenxertos são caracterizados por serem transplantados entre indivíduos de uma mesma espécie com genes não idênticos, como o osso fresco, congelado, liofilizado e desmineralizado (PADOVAN et al., 2012). São enxertos que necessitam de tratamento laboratorial que permita seu armazenamento para futura utilização.

A incorporação do osso alógeno é bem mais lenta do que o autógeno, devido à ausência de células com capacidade osteogênica, destruídas durante o processamento desse material para reduzir sua imunogenicidade. Portanto, enxertos alógenos apresentam maior potencial de osteocondução do que de indução. Nos enxertos alógenos, a área receptora fornecerá os elementos essenciais para a deposição óssea e o enxerto será apenas a matriz mineral, diminuindo quantidade do osso neoformado e o tempo da completa incorporação (BARBOSA et al., 2012).

Nas últimas décadas, tem aumentado o interesse pelos enxertos alógenos do banco de tecidos músculos-esqueléticos (banco de ossos). Eles representam uma alternativa viável aos enxertos ósseos autógenos especialmente para perdas ósseas de grande escala (ROSS et al., 2000).

Os enxertos homogêneos são considerados alternativas, quando comparados com o uso de enxertos autógenos, pois não requerem área doadora, podem oferecer grandes quantidades de material, diferentes combinações de estrutura óssea (cortical, medular ou córtico-esponjoso), ser processados (desmineralizados, liofilizados), pré-moldados (garantindo melhor adaptação no sítio receptor e menor tempo cirúrgico), e são considerados osteocondutores (SOBREIRA et al., 2011)

A obtenção de enxerto ósseo alógeno a partir de cadáveres doadores não impõe limites na quantidade de tecido a ser requerida. Ademais, tem sido utilizado em muitos procedimentos com sucesso (AMATUZZI et al., 2000).

O tecido tratado, osso fresco e congelado, possui alto poder osteoindutivo e osteocondutivo, mas é raramente usado em razão de sua alta resposta imune e pela possibilidade de transmissão de doenças. Isso quando comparadas às transmitidas pelo osso congelado e seco, que possui características inferiores com relação à osteocondução e à osteoindução, menor antigenicidade, além de características mecânicas diminuídas (NOIA et al., 2014).

A osteoindução dos enxertos alógenos varia de acordo com a forma como estes foram processados e a matriz óssea desmineralizada se mostra com boa aceitação e regeneração pelo tecido do leito receptor (MAUNEY et al., 2005).

O osso alógeno criopreservado seco possui apenas a capacidade osteocondutora e nenhuma capacidade osteogênica e osteoindutora, ou seja, ele apenas permite a osseocondução de células do hospedeiro para o seu interior, o que resulta numa incorporação progressiva do enxerto ao leito receptor. Ocorre uma substituição gradual do osso transplantado por meio de uma atividade osteoclástica intensa, seguida de deposição de osso novo (BUTTERMANN, 2008).

Um dos materiais de enxerto que vêm adquirindo maior destaque nas pesquisas é a matriz óssea desmineralizada (MOD), a qual é composta por diversos tipos de colágenos e fatores de crescimento, apresentando assim características osteoindutivas. É processada por métodos de liofilização e descalcificação, além de ser indicada como substituto ósseo para o preenchimento de cavidades ósseas e reconstruções faciais, com bons resultados. Várias técnicas e substâncias têm sido propostas como métodos de desmineralização do tecido ósseo (BOTROM e SEIGERMAN, 2005). A escolha do método de processamento

da matriz óssea influencia diretamente nas propriedades e na composição dessa matriz. Muitas das substâncias utilizadas, se não bem manipuladas, podem afetar negativamente a estrutura do colágeno remanescente, bem como os fatores de crescimento presentes, interferindo nas propriedades de osteocondução e osteoindução da matriz (BARBOZA et al., 2012).

Um importante componente da MOD responsável pela sua atividade óssea indutiva é um grupo de glicoproteínas de baixo peso molecular contidas dentro da fase orgânica, das quais as mais importantes são as BMP. Quando o osso cortical é descalcificado, essas proteínas osteoindutoras, que estão incrustadas dentro da matriz mineralizada, ficam expostas, aumentando assim o processo de formação óssea (TRAIANEDES et al., 2004).

Dentre as características de uso da MOD, destaca-se a variabilidade da atividade osteoindutiva (potencial osteoindutor) por doador. Essa variabilidade é evidente tanto em avaliações *in vitro* como *in vivo* da atividade da MOD, a qual também pode ser influenciada significativamente pelo processamento do tecido. Portanto, a *American Association of Tissue Banks (AATB)* e a *Food and Drug Administration (FDA)* exigem que cada lote de MOD deve ser obtido de um único doador humano (BARBOZA et al., 2012).

Com relação à forma de apresentação, a MOD é comercialmente disponível nas formas de pó, gel e pasta. Além disso, a formulação pode ser suplementada com fragmentos de osso, matriz extracelular processada e outros substitutos de enxerto, como grânulos de sulfato de cálcio. O uso da MOD em conjunto com um carreador tem se tornado um tratamento mais popular de enxerto ósseo. Os transportadores mais comumente utilizados nessa combinação são glicerol, gelatina, ácido hialurônico e sulfato de cálcio, os quais ajudam na retenção do enxerto na localização anatômica desejada,

embora a utilização destes não forneça osteoindutividade adicional (KIM et al., 2008; KIM et al., 2010).

2.4 Células de interesse em bioengenharia tecidual óssea

A crescente demanda por soluções para perda ou lesão do tecido ósseo tem estimulado as pesquisas envolvendo técnicas de enxertia (substituição óssea); bem como a indução da regeneração tecidual por moléculas e biomateriais osteoindutores e/ou osteocondutores. As pesquisas mais recentes têm utilizado terapias celulares, com administração de células tronco mesenquimais e linhagens osteogênicas transplantadas para os sítios de reparo em animais, de modo isolado ou pré-cultivadas em biomateriais e matrizes tridimensionais (*scaffolds*) (SOARES et al., 2007; CORRALES, ESTEVES, VICK, 2014).

A engenharia de tecidos fundamenta-se na tríade matriz x células x fatores de crescimento empregados isoladamente ou associados às terapias de reparo tecidual. Na clínica, os recursos mais utilizados para o reparo ou substituição de tecidos ósseos perdidos ainda são os enxertos ósseos isolados. Mas a associação de biomateriais com células visa melhorar as respostas biológicas, a neoformação óssea em substituição aos enxertos e a osseointegração dos enxertos às paredes ósseas do sítio receptor. As células utilizadas na engenharia de tecidos podem ser especializadas ou células tronco. No entanto, existem dificuldades na obtenção, no cultivo e na expansão de algumas células especializadas.

2.4.1 Células tronco mesenquimais (CTM)

As células tronco são uma fonte atraente de células para engenharia tecidual, uma vez que possuem capacidade de auto-renovação e podem ser estimuladas a se diferenciar em diversos tipos celulares através de moléculas bioativas (AROSARENA, 2005).

As células tronco são tipicamente classificadas de acordo com o seu sítio de localização: as embrionárias são encontradas na massa celular interna dos blastocistos e as células tronco adultas podem ser encontradas no tecido fetal, em neonatos e no organismo adulto (GOKHALE e ANDREWS, 2009; BERTASSOLI et al., 2013).

Células tronco adultas têm sido amplamente investigadas por seu potencial osteogênico. Estas células indiferenciadas são capazes de gerar alguns tipos celulares especializados e por isso são classificadas como multipotentes (WEISSMAN, 2000).

As células tronco adultas podem ser classificadas em hematopoéticas e mesenquimais (HIPPEL e ATALA, 2008). Células tronco mesenquimais tem despertado grande interesse para pesquisadores e clínicos devido sua grande aplicabilidade na engenharia de tecidos (ROSENBAUM, 2008). Devido ao fato de serem células indiferenciadas e apresentarem a capacidade única de dar origem a tipos celulares especializados, representam uma ferramenta promissora para o tratamento de um amplo espectro de lesões e doenças que são tratadas de forma pouco satisfatória pelos métodos tradicionais (WOBUS e BOHELER, 2005).

A capacidade das CTMs se diferenciarem em osteoblastos já foi demonstrada por meio de estudos (CANCEDDA et al., 2003, DOMINICI et al., 2006; GOMES et al., 2010; BERTASSOLI et al., 2016) e por isso elas têm sido usadas clinicamente para tratar defeitos ósseos. CTMs podem ser estimuladas com a utilização de moléculas de sinalização no meio de cultura. A ativação osteogênica exige a presença de B-glicerol-fosfato, ácido ascórbico, dexametasona e soro fetal bovino. Quando cultivadas em monocamada com estes suplementos, as células adquirem uma morfologia osteoblástica

e uma matriz extracelular mineralizada rica em cálcio é depositada (BARRY e MURPHY, 2004; BERTASSOLI et al., 2016).

Pesquisas avaliando o potencial de reparo e a regeneração tecidual têm mostrado resultados promissores em relação à plasticidade das CTM adultas. Tais células têm atraído o interesse público e científico, por representarem uma enorme promessa para as terapias de substituição celular em muitas doenças degenerativas (MENDEZ-OTERO et al., 2005; MENDEZ-OTERO et al., 2007; BERTASSOLI et al., 2013). A associação de *scaffolds* colonizados com células tronco mesenquimais tem sido proposta com grande aplicabilidade na engenharia de tecidos (SAVITZ et al., 2002).

A pesquisa contemporânea também está focada no desenvolvimento de biomateriais tridimensionais semeados com CTM, empregados para a reconstrução de extensos defeitos ósseos (NEČAS et al. 2008). Esta estratégia combina o potencial osteogênico das CTM com a habilidade osteocondutora dos *scaffolds* (VIATEAU et al. 2007). Além disso, a capacidade das CTM se diferenciarem em osteoblastos já foi demonstrada (CANCEDDA et al., 2003, DOMINICI et al., 2006; GOMES et al., 2010; BERTASSOLI et al., 2016).

2.4.2 Células tronco da polpa dentária (CTPD)

As células-tronco da polpa dentária foram descritas como células clonogênicas, com alta capacidade de proliferação e capazes de se auto-renovar e de se diferenciar em multi-linhagem, como ossos, cartilagem e gordura (GRONTHOS et al., 2000; GRONTHOS et al., 2002). As CTPD podem manter suas propriedades imunofenotípicas e potencial de diferenciação mesmo após criopreservação (PAPACCIO et al., 2006). A cultura das CTPD foi possível a partir de dentes molares (PERRY et al., 2008; ALGE et al., 2009). Entre as vantagens das CTPD, pode-se ainda citar a facilidade de acesso

cirúrgico e baixa morbidade após a extração da polpa dentária (MARTINEZ et al., 2016). Podem ser obtidas em qualquer faixa etária. Também são de fácil isolamento e amplificação, além da possibilidade de obtenção a partir de dentes decíduos, molares ou incisivos (ASHRI et al., 2015). As CTPD apresentaram resultados favoráveis com relação à capacidade de regeneração de tecido mineralizado quando comparadas as células tronco mesenquimais de medula óssea (CTMO) (ALGE et al., 2009).

As CTPD mostraram-se úteis não só na regeneração de tecidos orais, mas também em outros tipos de tratamentos, tais como distrofias musculares (KERKIS et al., 2008), defeitos ósseos (AKKOUCH, ZHANG e ROUABHIA, 2014) alterações da córnea (MONTEIRO et al., 2009; GOMES et al., 2010), lesões na medula espinal (HOFSTERTTER et al., 2002). Outra característica importante é que as CTPD também se diferenciam em células endoteliais funcionais, sugerindo seu potencial de uso em condições isquêmicas do coração, cérebro e membros (SAKAY et al., 2010).

Baseado nos benefícios apresentados para uso terapêutico, além da possibilidade de aquisição de células-tronco autólogas provenientes da polpa dentária, o dente constitui uma atrativa e acessível fonte de células tronco que pode ter diversas aplicações clínicas, tanto na medicina regenerativa quanto na engenharia de tecidos (GRONTHOS et al., 2002; BERTASSOLI et al., 2016). Esses aspectos abrem perspectivas promissoras para a implementação de banco de dentes para aplicações futuras em debilidades e doenças humanas.

2.4.3 Células osteoblásticas

A cultura de células ósseas permitiu o estudo *in vitro* da osteogênese, entendimento de doenças ósseas, assim como a citocompatibilidade com novos biomateriais. Geralmente os osteoblastos são utilizados para estudar o metabolismo ósseo

e interações entre as células e biomateriais. Estas células podem ser obtidas de diversas fontes animais, como bovino, ovino, coelho, mas os mais comuns são ratos, camundongos e humano (pois já possuem genoma, metabolismo, forma de cultura e ampla literatura já estabelecidos para comparação). Os protocolos de obtenção incluem diversos tecidos, os principais são mandíbula, vertebra, ossos longos (fêmur e tibia), crista ilíaca e calvária, podendo ser extraídos por digestão enzimática ou por explante (AUBIN, 2001; AKKOUCH, ZHANG, ROUABHIA, 2014)

Devido à vantagem de fácil obtenção e manutenção, quantidade ilimitada, homogeneidade e estabilidade fenotípica a cultura de células clonais (malignas, transformadas ou não transformadas) é frequentemente utilizada (AUBIN, 2001).

Kartsogiannis et al. (2005) mostram uma variedade de osteoblastos imortalizados utilizados, agrupando entre origem maligna (osteosarcoma), transformados e não-transformados. Dentre as de osteosarcoma podemos citar as de origem espontânea de humanos (SaOs, OHS-4, TE-85, MG-63, KPDXM, TPXM, e CAL-72) e de ratos (ROS 17/2 e 17/2.8) e as induzidas de ratos (UMR-106), porém sua proliferação não apresenta inibição por contato. As linhagens osteoblásticas de rato RCT (1 e 3), camundongo KS4 e humana hOB (linhagem osteoblástica de humano adulto) e hFOB (linhagem osteoblástica de feto humano) são osteoblastos imortalizados por transfecção com retrovírus recombinantes. Nas linhagens imortalizadas não diferenciadas há a UMR-201 e CRP de rato e MC3T3-E1 de camundongo.

Segundo Czekanska et al. (2012) o modelo mais apropriado a ser utilizado seria a linhagem de células primárias MC3T3-E1, pois estas células seriam usadas mais frequentemente para o estudo das mutações nos genes relacionados com a osteogênese e desenvolvimento ósseo. Siggelkow e colaboradores (1999) observaram similaridade tempo-dependente na expressão de RNA mensageiro (RNAm) de fosfatase alcalina e pró-

colágeno-I entre pHOB (cultivo primário de osteoblastos humanos) e MC3T3-E1, além do efeito estimulante do ascorbato. Sudo et al. (1983) e Gibon et al. (2012) observaram formação de fibras colágenas semelhantes às fibras colágenas ósseas, formação de camadas parecidas com o perióstio, o depósito mineral exibindo os mesmos padrões da hidroxiapatita nanorientada. Gibon e colaboradores (2012) constataram *in vivo*, que as células MC3T3-E1 subclone 14, são capazes de migrar para o defeito ósseo quando injetadas na corrente sanguínea de camundongos, diferenciando em osteoblastos maduros e acelerando a regeneração óssea.

Este estudo propôs então a utilização de CTM oriundas da polpa dentária de ratos que serão utilizadas em estágio indiferenciada. A opção por CTM de origem dentária vem da viabilidade de coleta dessas células a partir dos dentes do próprio paciente (como dos terceiros molares, por exemplo), considerada uma estratégia favorável à terapia celular. Foi ainda avaliado o comportamento de osteoblastos primários (OP) e imortalizados (OI), todos cultivados sobre *scaffolds* de osso trabeculado humano (OH) mineralizados e desmineralizados. Este estudo investigou, portanto, o comportamento biológico de linhagens celulares diferentes quando cultivadas sobre as matrizes ósseas humanas mineralizadas, atualmente utilizadas em substituição aos enxertos autógenos, e em sua versão desmineralizadas como *scaffolds* para bioengenharia tecidual.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar *in vitro* o comportamento de células tronco mesenquimais extraídas de polpas dentárias e de linhagens osteoblásticas (osteoblastos primários e imortalizados), quando cultivadas sobre matrizes ósseas mineralizadas e desmineralizadas, provenientes de banco de osso humano (OH).

3.2 Objetivos Específicos

1. Caracterizar morfológicamente o aspecto tridimensional dos fragmentos ósseos mineralizados e desmineralizados obtidos de bancos de ossos humanos (OH), por estereomicroscopia, microscopia eletrônica de varredura e microscopia de luz;
2. Padronizar métodos de desmineralização e esterilização das matrizes ósseas que viabilizem a utilização das mesmas para cultura celular;
3. Avaliar a expressão de BMP, Colagênio I e Osteopontina, componentes da matriz orgânica, dos fragmentos de OH, após processo de desmineralização, por imunofluorescência;
4. Estabelecer cultura tridimensional das células de interesse (CTPD, OP, OI) sobre os *scaffolds* ósseos humanos mineralizados e desmineralizados;
5. Avaliar, por meio de ensaio bioquímico (MTT), a viabilidade celular das células pós cultura sobre os *scaffolds*;
6. Avaliar aderência das células aos *scaffold* por Microscopia Eletrônica de Varredura;
7. Avaliar a atividade da enzima Fosfatase Alcalina nas células após 7 e 14 dias de cultura sobre os *scaffolds*;
8. Quantificar a deposição de cálcio das células após 14 e 21 dias de cultura sobre os *scaffolds*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Os animais foram utilizados (somente) para a coleta de células tronco e obtenção de osteoblastos primários. Foram utilizados ratos Wistar (n = 2 por extração; = 10 animais no total), machos, peso de aproximadamente 250 g, para a extração de CTPD; e neonatos de 3 dias de vida (n= 5 por extração = 15 animais no total) para a coleta de osteoblastos primários, todos provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do ICB/UFMG. Todos os experimentos foram realizados de acordo com as diretrizes estabelecidas pela CEUA/UFMG (Comissão de Ética no Uso de Animais), com aprovação sob o protocolo nº288/2013 (Anexo 1).

4.2 Extração e caracterização das Células tronco da polpa dentária (CTPD)

Os animais foram sacrificados utilizando-se uma associação anestésica de de cloridrato de quetamina (Cetamin, Syntec) e cloridrato de xilazina (Xilazin, Syntec), por via intraperitoneal, seguido de decaptação (guilhotina). As mandíbulas foram dissecadas para a exposição do forame apical dos incisivos inferiores (Figura 1A e B). A extração da polpa foi realizada com uma sonda farpada após a abertura posterior do forame dos incisivos com o auxílio de um bisturi (Figura 1).



Figura 1. Extração de polpa dentária de incisivos inferiores de ratos Wistar. Em (A) a hemimandíbula extraída e dissecada. Em (B), exposição do forame apical para extração da polpa. Em (C), extração da polpa com auxílio de um extirpa nervos e em (D), a polpa dentária retirada.

O isolamento das células tronco foi então obtido seguindo o protocolo descrito por Bertassoli e colaboradores (2016). Em síntese, a polpa foi digerida enzimaticamente em Colagenase tipo I (Gibco) por 40 min a 37°C e 5% CO₂. A atividade da colagenase foi inativada ressuspendendo-se as células em meio de crescimento [MC: Alfa-MEM (Sigma-Aldrich), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco) e 1% de penicilina/estreptomicina/anfotericina B (Anti-anti, Gibco)]. As células foram transferidas para garrafas T25 e cultivadas em MC, com as passagens ocorrendo sempre que a confluência de 80% era atingida. Na 3ª passagem, as células foram plaqueadas a uma densidade de $2,5 \times 10^4$, em placas de 24 poços, para a caracterização morfológica, fenotípica e potencial de diferenciação da população isolada, previamente aos experimentos com os biomateriais. As células foram caracterizadas quanto à sua morfologia (monitoramento em microscópio de luz e MEV), potencial osteogênico,

adipogênico e condrogênico (por indução química em meios de diferenciação específicos) e caracterização fenotípica (análise de marcadores de superfície por citometria de fluxo). As células foram acompanhadas por 7, 14 e 21 dias. Após a confirmação do isolamento de população de CTPD segundo protocolo proposto por nosso grupo, bem como a comprovação do potencial de diferenciação osteogênica dessas células (BERTASSOLI et al., 2016 – anexo 2), as CTPD foram utilizadas nas culturas tridimensionais sempre na 3ª passagem.

4.3 Coleta de Osteoblastos primários (OP) e obtenção dos Osteoblastos imortalizados (OI)

Para coleta de OP, os neonatos foram limpos com solução de iodopovidona 10% (PVP-I), anestesiados com cloridrato de quetamina (Cetamin, Syntec) e cloridrato de xilazina (Xilazin, Syntec), por via intraperitoneal seguido de decaptação. Após a decapitação, uma linha de incisão foi feita da região cervical até a ponta do focinho, possibilitando assim a exposição da calvaria. A pele foi removida e um recorte contornando a região occipital, parietal e frontal foi feita para a extração das calvárias. Em seguida, as peças passaram por três banhos em solução I (99% de PBS para 1% de Gentamicina - Gibco) e três banhos em solução II (90% solução I, 9% alfa-MEM, 1% Gentamicina).

Para a digestão enzimática, as calvárias foram divididas ao meio e transferidas para um erlenmeyer contendo a solução III (EDTA-tripsina 0,25% –Gibco, colagenase tipo II – Gibco), por 5 minutos à 37°C sob agitação. O sobrenadante foi descartado e o produto digerido foi fragmentado em pequenos pedaços com uma tesoura estéril. Os fragmentos foram submetidos novamente à digestão com a solução III sob agitação por 25 minutos à 37°C. O produto da digestão (sobrenadante) foi transferido para um tubo

falcon e centrifugado por 7 minutos a 1200 g. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspenso em solução IV [meio basal (MB): meio Alfa-MEM, suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino, AntiAnti e 1% de Gentamicina]. A solução foi filtrada em *Cell Strainer* de 100µm, as células foram transferidas para garrafas T75. As passagens ocorreram sempre que as células atingiam 80% de confluência. Nos experimentos, OP foram utilizados na 3ª passagem.

A linhagem de osteoblastos imortalizados (OI) utilizada foi a MC3T3-E1 Subclone 4 (*American Type Culture Collection* - ATCC® CRL2593™), gentilmente cedida pelos professores Dr. Gregory Thomas Kitten (ICB/UFMG) e Dr. Paulo Tambasco (USP/Ribeirão Preto). Esta linhagem celular vem sendo amplamente utilizada como modelo em estudos de diferenciação osteoblástica *in vitro*, se comportando de maneira similar aos osteoblastos primários (DAN et al., 2016; LIU et al., 2016). Estas células foram cultivadas nas mesmas condições que os osteoblastos primários, em MC e foram utilizadas entre a 3ª passagem.

4.4 Caracterização das linhagens de células osteoblásticas

Uma cultura preliminar de ambas as populações osteoblásticas, OP e OI, foi realizada como um controle, para o conhecimento do comportamento das células antes do estabelecimento das culturas sobre os biomateriais (*scaffolds*) de interesse. Especialmente para o trabalho com OP, esse cuidado é importante, pois na coleta de células primárias, é comum a interferência de células contaminantes ou o isolamento de populações heterogêneas.

As linhagens osteoblásticas (OP e OI) foram caracterizadas quanto à morfologia e expressão de marcadores osteogênicos, para confirmar o fenótipo osteoblástico, além de serem acompanhadas por 21 dias para registro do comportamento das células nos

estágios de (1) adesão e proliferação celular, (2) deposição de matriz orgânica e (3) maturação com a deposição mineral.

4.5 Análise morfológica das células OP e OI

As células foram plaqueadas em placas de 24 poços na densidade de $2,5 \times 10^4$ em meio de crescimento, e após 7, 14 e 21 dias, as culturas foram avaliadas por microscopia invertida em contraste de fase (Motic AE31, USA).

4.5 Análise do potencial de mineralização das células OP e OI

OP e OI são consideradas células pré-osteoblásticas. O cultivo dessas células em meio de indução osteogênica (MO) deve promover a diferenciação das populações celulares em osteoblastos maduros capazes de depositar minerais *in vitro*. A fim de confirmar os potenciais de deposição de minerais das nossas populações de interesse, as células OP e OI foram cultivadas por 21 dias em meio de diferenciação osteogênica (MO) composto de alfa-MEM suplementado com 10% SFB, 50mM de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich) e 10mM de Beta Gliceolfosfato (Sigma-Alcrich). Posteriormente, a diferenciação osteogênica foi mensurada pela deposição mineral nas culturas, detectada por coloração com vermelho de alizarina que cora matriz extracelular rica em cálcio. Para o ensaio de coloração com vermelho de alizarina, os poços contendo as células foram lavados com PBS, fixados em álcool 70% por 5 minutos, novamente lavados com PBS e incubados com o corante vermelho de alizarina 2% (Sigma-Aldrich) por 15 minutos. Após incubação foi feita a lavagem com água destilada e os poços observados no microscópio invertido.

4.6 Análise da expressão de marcadores osteogênicos

A fim de confirmar o fenótipo osteoblástico das células OP e OI, alguns marcadores de linhagens osteoblásticas foram selecionados para avaliação em ambas as culturas por imunofluorescência (Osteopontina, BMP-4 e Colágeno tipo I) e por RT-PCR (Runx2 e Colágeno tipo I).

Para a caracterização por imunofluorescência, as células foram plaqueadas em placas de 24 poços na densidade de $2,5 \times 10^4$ células sobre lamínulas de vidro em MC. Após 48 horas (confluência de 70%), o MC foi retirado e as células lavadas com PBS por 3 vezes de 5 minutos cada. Após a lavagem, as células foram fixadas em paraformaldeído (PFA) 4% por 10 minutos. As células foram novamente lavadas em PBS três vezes por 10 minutos, para retirar o fixador. Foi adicionado Tween-20 0,1% em PBS e as células foram incubadas por 30 minutos a 37°C. Seguiu-se a lavagem em PBS, 3 vezes, por 10 minutos. O BSA (0,2%) foi adicionado e as células foram incubadas a 37°C por 30 minutos. Após este período, as células foram incubadas *overnight* a 4°C com os anticorpos primários: anti-osteopontina (ab8448, ABCAM, goat anti rabbit), anti-colágeno tipo I (ab34710, ABCAM, goat anti rabbit) e anti-BMP4 (sc-6896, Santa Cruz Biotechnology, rabbit anti goat), todos diluídos 1:500 em PBS. Após a incubação com os anticorpos primários, as células foram lavadas com PBS por 4 vezes, 10 minutos cada lavagem. Em seguida, as células foram incubadas com os anticorpos secundários anti-rabbit 488 (Alexa Fluor - Molecular Probes) e anti-goat 555 (Alexa Fluor - Molecular Probes), diluídos 1:700 em PBS, por uma hora e meia em câmara escura. Em seguida, foi adicionado o marcador DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride) por 3 minutos, seguido de 3 lavagens com PBS, por 10 minutos cada. As lâminas foram montadas com glicerol 50% + 2mM Azide em PBS e armazenadas protegidas da luz em temperatura de 4°C. Os resultados foram avaliados em microscópio de fluorescência BX50 (Olympus).

Para a avaliação de marcadores osteoblásticos por RT-PCR, OP e OI foram coletados após 7 dias de cultivo em MC e o RNA total foi isolado seguindo instruções dos fabricantes do Trizol Reagent (Life Technologies). Após o período de cultura, as células (3 poços de placas de 24) foram lavadas com PBS e 1mL de Trizol Reagent foi adicionado. O produto dos poços em trizol foi transferido para um eppendorf e incubado por 15 minutos em temperatura ambiente (TA). O volume de 200 μ L de cloroformio foi adicionado ao eppendorf, homogenizado e novamente incubado durante 5 minutos a TA. Passado o tempo de incubação, o eppendorf foi centrifugado por 15 minutos a 12000g, as fases (RNA, DNA e proteínas) foram separadas e o RNA total da fase superior foi pipetado para um novo eppendorf junto a 500 μ L de isopropanol, novamente homogenizado e incubado durante 10 minutos a T.A. Centrifugou-se por 10 minutos a 12000g e o isopropanol foi descartado. Foi adicionado 1 mL de etanol 75%, vortexado e contrifugado novamente por 5 minutos a 12000g. O etanol foi descartado e o pellet localizado no fundo do eppendorf, foi hidratado com água DEPC (20 μ L), incubado em placa aquecedora por 5 minutos a 55° C e ressuspendido novamente. A qualidade do material extraído foi avaliado por eletroforese em gel de agarose 1% e a quantidade determinada em espectrofotometro (NanoDrop ND 2000 - Thermo Scientific).

O cDNA foi sintetizado a partir da cauda Poli(A) de 1 μ g de RNA total, utilizando-se o *Revert Aid TM H Minus First Strand cDNA Synthesis* Kit (Fermentas). Para tanto foram pipetados em um *eppendorf* 1uL de primers aleatórios (0,2 ug/ul), 2 ug de RNA total, 1uL de Oligo dT (0,5 ug/ul) e 8 uL de água nuclease-free, homegenizados e incubados durante 5 minutos a uma temperatura de 65° C em termociclador. Passado os 5 minutos, o *eppendorf* foi transferido para o gelo e deixado durante 3 minutos, para permitir o anelamento do oligo d(T) as caudas Poli(A) dos RNAs mensageiros presentes no RNA total. O eppendorf foi centrifugado e adicionou-se 4 uL de 5X Reaction Buffer,

1 uL de Riblock RNase inhibitor (20U/uL), 2 uL de 10 mM de dNTP Mix, 1 uL de Revert Aid H. Minus Mulu Reverse Transcriptase (200U/uL). O eppendorf foi levado novamente ao termociclador seguindo o programa: 60 minutos a 42° C e 5 minutos a 70° C. Em seguida, o eppendorf foi armazenado em freezer -20° C.

As amostras foram submetidas à RT-PCR para avaliar a expressão dos marcadores Runx2 e Colágeno tipo I. B-actina, GAPDH e EEF1 foram usados como controle positivo destas PCRs. Os pares de oligonucleotídeos foram obtidos com base nas sequências de *Rattus norvegicus* dos transcritos de interesse, depositadas no GenBank (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov) utilizando o programa Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>) (Tabela 1). O desenho utilizando o programa foi padronizado de forma que todos os oligos fossem obtidos com uma temperatura de melting média de 60° C e que gerassem um amplicon (fragmento) de 200 a 300 pb.

Cerca de 50 ng de cada um dos cDNA sintetizados foi utilizado em uma reação contendo 0,4 µM de cada oligonucleotídeo (Tabela 1), 0,4 mM de cada dNTP, 4 mM de MgCl₂ e 0,05 U/µL de *Taq* DNA Polimerase (PCR Master Mix 2X, Thermo Scientific). Para todos os primers, as reações ocorreram a 94°C por 2 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto; a extensão final foi realizada a 72°C por 5 minutos. Os produtos amplificados foram confirmados em eletroforese em gel de agarose 1 %.

Tabela 1. Sequência de nucleotídeos, temperatura de anelamento (Ta) e tamanho do amplicon (em pb) dos oligonucleotídeos utilizados como genes referência e alvo utilizados por RT-PCR.

Gene		Ta (°C)	Amplicon (pb)	Sequência do oligonucleotideo
Ref	<i>β-actina</i>	60	222	F-5'TGTTGTCCCTGTATGCCTCT3'
				R-5'TAATGTCACGCACGATTTCC3'
	<i>EEF1</i>	60	299	F-5'ACAGCAAAAATGACCCACCA3'
				R-5'ACGAACAGCAAAACGACCA3'
	<i>GAPDH</i>	60	230	F-5'AAGATGGTGAAGGTCGGTGT3'
				R-5'TGGAAGATGGTGATGGGTTT3'
Alvo	<i>Colágeno I</i>	60	257	F-5'ACTGCAACATGGAGACAGGTCAG3'
				R-5'GGCTACGCTGTTCTTGCAGTGAT3'
	<i>RUNX2</i>	60	250	F-5'GCCACCACTCACTACCACAC3'
				R-5'CAGCGTCAACACCATCATTC3'

4.7 Seleção dos biomateriais de interesse, avaliação preliminar dos biomateriais e preparo dos scaffolds para a cultura

Este estudo avaliou 2 tipos de biomateriais, osso humano (OH) em sua versão mineralizada (OHM) e em versão desmineralizada (OHD) como suporte para a implementação da cultura com 3 tipos celulares: Osteoblastos imortalizados (OI), osteoblastos primários (OP) e Células tronco mesenquimais da polpa dentárias (CTPD).

Os blocos de osso humano (OH) foram obtidos junto ao Banco de Tecido Músculo Esquelético da Universidade de Marília –SP (UNIOSS), em colaboração com a Dra. Karla Bacheга (documento anexo 3).

Em sua apresentação comercial, o osso humano, (obtido de banco de tecidos), é disponibilizado em apresentação mineralizada. Nesse estudo, avaliamos o biomaterial em sua versão original (bloco mineralizado de osso cortical – OHM) e também em uma versão desmineralizada (OHD). A proposta da análise da versão desmineralizada decorre da

nossa hipótese de que fragmentos desmineralizados do osso alógeno pode favorecer a adesão e proliferação celular em função da exposição de proteínas osteogênicas da matriz óssea após o processo de desmineralização. A fim de padronizar os experimentos para a cultura, os blocos foram reduzidos a um tamanho padrão de 2,5 x 2,5 x 2,5 mm, com o auxílio de um disco diamantado acoplado a um micromotor odontológico, sob irrigação com água. Estes fragmentos reduzidos constituíram os *scaffolds* para a cultura celular.

4.8 Preparo dos *scaffolds* desmineralizados

A fim de obter a versão desmineralizada dos biomateriais, os blocos mineralizados de osso humano foram imersos em solução quelante de EDTA 10% (pH 7.2), por 2 dias em temperatura ambiente e sob agitação.

A desmineralização completa dos fragmentos é um cuidado importante para o prosseguimento dos protocolos com a cultura de osteoblastos. Isto porque osteoblastos diferenciados sobre os biomateriais tendem a depositar minerais sobre as superfícies de crescimento. A presença de resíduos minerais nos *scaffolds* desmineralizados, poderia gerar um resultado falso-positivo, quando da identificação de depósitos de cálcio nas fases tardias de cultura. A fim de certificar que o processo de desmineralização removeu completamente o conteúdo mineral do OH, as amostras de osso humano desmineralizado foram conduzidas à análise por espectroscopia por energia dispersiva de raios X – EDX (CDTN/UFMG), antes da semeadura das células. Esta técnica permite para análise qualitativa e semiquantitativa dos constituintes principais da amostra, no nesse caso, a presença ou ausência do mineral cálcio (Ca⁺) no osso. Para essa análise, os fragmentos de ossos foram fixados em glutaraldeído 3%, secos em estufa, colados em *stubs* de alumínio, metalizados com ouro no equipamento *sputtering* Bal-Tec (modelo MD20) e analisados no eletromicroscópio (SIGMA VP, Carl Zeiss Microscopy) junto a um sistema

de microanálise constituído por espectrômetro de energia dispersiva de raios X (EDX), modelo XFlash 410-M. Após essa análise, conseguimos observar que todo o cálcio do *scaffold* de osso humano desmineralizado foi retirado (Figura 2), e assim seguimos os experimentos com a certeza de que o osso estava totalmente desmineralizado.

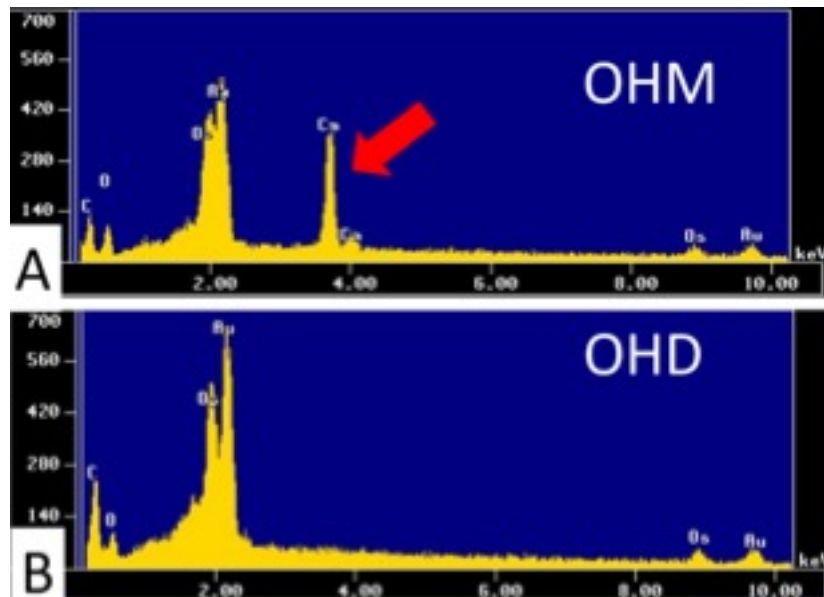


Figura 2. Análise de EDX. A) Pico de cálcio no osso humano antes da desmineralização (Seta); B) osso humano após o processo de desmineralização.

4.9 Esterilização dos *scaffolds* para cultura celular

Para a esterilização, os fragmentos mineralizados de osso foram conduzidos ao CDTN (Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear – UFMG) e submetidos a radiação gama (25 grays), por 30 minutos. A irradiação é o método de esterilização utilizado pelas empresas fornecedoras dos enxertos ósseos mineralizados. Já os fragmentos desmineralizados (OHD) passaram por uma desinfecção em luz ultra violeta, por 30 minutos antes da semeadura celular.

4.10 Análise preliminar de OH

Uma análise microscópica e histológica foi realizada previamente aos experimentos com cultura. Essa análise visou o conhecimento do aspecto tridimensional dos fragmentos osseos utilizados como *scaffolds* em seus aspectos macro e microscópico. Foram considerados os níveis de porosidade, a textura superficial das trabéculas, aspectos histológicos e a expressão de marcadores osteogênicos que poderiam interferir nos ensaios *in vitro*, relacionados à adesão e proliferação celular sobre tais superfícies. Nestas análises preliminares os fragmentos foram avaliados por estereomicroscópio, microscopia eletrônica de varredura, microscopia de luz e imunohistoquímica, conforme metodologia descrita a seguir.

4.10.1 Análise macroscópica

Os *scaffolds* foram avaliados em estereomicroscópio (EZ4 D - Leica) para análise de superfície e porosidade. A dimensão dos poros foi mensurada conforme descrito em Krishnamurthy et al. (2014). Foram obtidas as medidas, utilizando o programa ImageJ, da altura (A – A') e largura (B – B') dos poros visíveis em imagens (20x) de todas as quatro superfícies dos blocos de OHM (Figura 3). Posteriormente, os dados foram plotados em percentuais para das menores e maiores dimensões de poros encontrados.

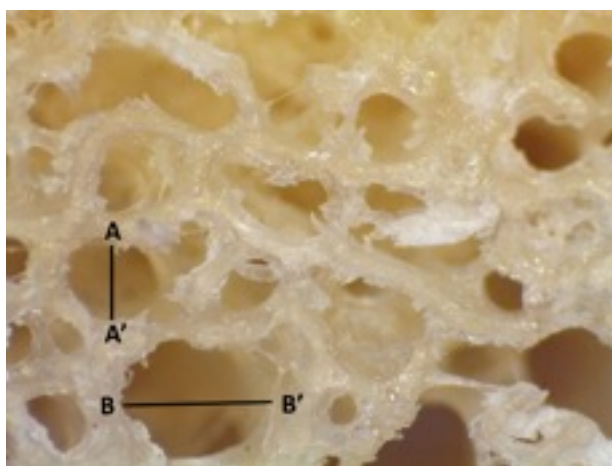


Figura 3. Esquema representativo da mensuração dos poros dos ossos.

4.10.2 Análise microscópica

Após a análise macroscópica, os fragmentos de OH foram avaliados por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia de luz.

Para microscopia eletrônica de varredura, os fragmentos ósseos foram fixados em glutaraldeído 3% por 24 horas e em seguida desidratados em banhos de etanol em concentrações crescente (50-100%) durante 30 minutos em cada série. As amostras foram submetidas à desidratação em ponto crítico e posteriormente coladas em *stubs* de alumínio. A metalização com ouro foi realizada no equipamento *sputtering* Bal-Tec, modelo MD20. As imagens foram obtidas e analisadas no microscópio eletrônico de varredura DSM 950 Zeis (CAPI/UFMG).

Para a microscopia de luz, os fragmentos foram submetidos a um protocolo histológico de rotina. As amostras foram fixadas em formalina neutra tamponada 10% (FNT) por 24 horas e desmineralizados em EDTA 10% por 48 horas. Seguiu-se o protocolo de inclusão dos fragmentos de osso humano em parafina, após a desidratação em série de etanóis em concentrações crescentes (70 a 100%) e diafanização em xilol. Cortes seriados com espessura de 5 μ m foram corados com Hematoxilina/Eosina, para avaliação histológica dos fragmentos ou foram reservados para as avaliações imunofluorescência. Todos os cortes foram analisados em um fotomicroscópio (Olympus BX-50).

4.10.3 Análise de componentes orgânicos dos biomateriais por imunofluorescência.

O objetivo desta análise foi avaliar a preservação de componentes das matrizes ósseas do OHD após os processos de descelularização por que passa o biomaterial em seu processo de produção, bem como após o processo de desmineralização proposto neste

projeto. Para tanto, alguns constituintes da matriz óssea (BMP-4, colágeno tipo I e osteopontina) foram selecionados para serem avaliados por imunofluorescência.

Após desparafinização e hidratação, os cortes foram incubados em solução de H₂O₂ 10% para neutralização da peroxidase endógena. Sítios de ligação inespecífica foram bloqueados com solução de BSA 2% em Tris-HCl pH 7.4, por 1 h. Em seguida, os cortes foram incubados com os anticorpos primários: anti-colágeno I (ab34710, ABCAM); anti-Osteopontina (ab8448, ABCAM) e anti-BMP-4 (Santa Cruz Biotechnology), na diluição 1:200 em PBS, por 18h a 4°C. Os cortes foram lavados com PBS por 4 vezes, 10 minutos cada lavagem. As secções foram incubadas com anticorpo secundário anti-rabbit 488 (Alexa Fluor - Molecular Probes) e anti-goat 555 (Alexa Fluor - Molecular Probes), diluídos 1:700 em PBS, por uma hora e meia em câmara escura. Foi então adicionado DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) por 3 minutos, seguido de 3 lavagens com PBS, por 10 minutos cada. As lâminas foram montadas com glicerol 50% + 2mM Azide em PBS e armazenadas protegidas da luz em temperatura de 4°C. Os resultados da expressão das proteínas nos biomateriais foram avaliados em microscópio de fluorescência (Olympus, BX – 50).

4.11 Plaqueamento das células sobre os *scaffolds*

As células (CTPD, OP e OI) foram plaqueadas a uma densidade de 5×10^4 concentradas em 40 μ L sobre os *scaffolds* de osso humano mineralizado e desmineralizado (estes *scaffolds* foram lavados com MC, deixando-os úmidos). Após um período de 30 minutos de incubação inicial a 37°C e 5% CO₂, as placas foram removidas da incubadora para a complementação do volume do MC com 460 μ L, somando um total de 500 μ L por poço. Em seguida, as placas foram transferidas novamente para a estufa nas mesmas condições supracitadas. Após 24 horas do

plaqueamento, as amostras selecionadas para o ensaio de deposição de mineral foram submetidas ao meio de diferenciação osteogênico (MO = Alfa-MEM 10% SFB, 50 mM ácido ascórbico e 10 mM β -glicerolfosfato – Sigma Aldrich), enquanto o restante das amostras permaneceram em meio basal. A condução dos experimentos em meio osteogênico viabiliza a avaliação do potencial de mineralização das células sobre os diferentes *scaffolds*. Somente na presença de meio osteogênico é possível avaliar e comparar, *in vitro*, a deposição de minerais por células osteoblásticas diferenciadas cultivadas sobre diferentes *scaffolds*. Ambos os meios de cultura (MC = meio de crescimento e MO = meio de indução osteogênico) eram substituídos a cada dois dias. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e as análises realizadas após 7, 14 e 21 dias de cultura.

4.12 Análises das culturas tridimensionais

4.12.1 Avaliação da viabilidade celular – Ensaio MTT

A análise de viabilidade das células semeadas sobre os *scaffolds* foi realizada por meio do ensaio de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolin - Life Technologies) após 7, 14 e 21 dias de cultura. O ensaio de MTT baseia-se na capacidade da succinato desidrogenase, uma enzima do ciclo de Krebs ativa em mitocôndrias viáveis, de converter o sal de tetrazolium (MTT), que é hidrossolúvel e de cor amarela, em cristais de formazan, que são insolúveis em água e de cor azul escura. Essa capacidade indica a atividade mitocondrial que somente as células viáveis possuem. Ao término de cada período de análise, os *scaffolds* com células foram transferidos para outro poço, incubados com MTT (5 mg/mL em PBS) por 2h a 37°C e 5% CO₂ e posteriormente lavadas em PBS. Em seguida, acrescentou-se 1 mL de isopropanol ácido, por poço, e alíquotas de 100 μ L da cultura foram transferidas para placas 96 poços, para a determinação da densidade

óptica a 595 nm, na leitora de placas de ensaios ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), Elx 800-Biotek.

4.12.2 Avaliação de aderência celular

A avaliação comparativa da osteocondução dos *scaffolds*, estimada pelo potencial de aderência das células aos *scaffolds* foi analisada por meio de MEV. As CTPD, OP e OI foram cultivadas sobre os fragmentos ósseos mineralizados e desmineralizados (OHM e OHD) por 7, 14 e 21 dias a 37°C e 5% CO₂.

Após estes períodos, os fragmentos foram fixados em glutaraldeído 3% por 24 horas e submetidos ao protocolo de rotina para MEV. Brevemente, os *scaffold* foram desidratados em banhos de etanol crescente (50-100%) durante 30 minutos em cada série. A desidratação até ponto crítico foi realizada com amostras em álcool absoluto, e na sequência os biomateriais foram colados em *stubs* de alumínio, cobertos por ouro no metalizador (*sputtering* Bal-Tec, modelo MD20) e analisados no microscópio eletrônico de varredura DSM 950 Zeis (CAPI/UFMG).

4.12.3 Análise da diferenciação osteoblástica por meio da fosfatase alcalina

A fim de avaliar o potencial osteoindutor dos *scaffolds*, ou seja, a sua capacidade de induzir ou estimular a diferenciação das células em osteoblastos maduros, as CTPD e OP e OI foram submetidas à análise de expressão da enzima fosfatase alcalina.

A atividade da fosfatase alcalina foi avaliada pelo ensaio de NBT/BCIP (Life Technologies). Esse ensaio é baseado na clivagem de um grupamento fosfato do BCIP (5-bromo 4-cloro 3-indolilfosfato *p*-toluidina) pela FA produzida pelos osteoblastos. Essa reação produz um próton que reduz o NBT (nitroblue tetrazólio clorídrico).

Nos períodos escolhidos para análise (7 e 14 dias), o meio de cultura foi descartado e as células lavadas com PBS. Após descarte do PBS, as células foram incubadas com 200 µL/poço da solução de NBT/BCIP (Life Technologies) na proporção de 1:1:8 em PBS (20 µL de NBT: 20 µL BCIP: 160 µL de PBS), por 2 h à 37 °C e 5% CO₂. Após confirmação da presença de precipitados de cor azul em microscópio de luz, adicionou-se 210 µL/poço de SDS 10% - HCl 0,1N) sem remoção da solução de NBT/BCIP incubada. Para promover a solubilização dos precipitados, as placas foram incubadas por 18 h. Após este período, 100 µL de cada poço foram transferidos, em triplicata, para uma placa de 96 poços e a DO foi medida em espectrofotômetro em comprimento de onda de 595nm.

4.12.4 Análise do potencial de deposição mineral por meio da coloração com vermelho de alizarina

O potencial de deposição mineral, típico de células osteoblásticas diferenciadas foram avaliadas por meio da coloração de vermelho de alizarina. Para este ensaio foram considerados amostras cultivadas em meio basal e meio osteogênico.

Após lavagem em PBS, foi adicionado 1 mL de álcool 70% e os constructos foram incubados por 1 h a 4 °C. Após lavagens com PBS, novamente, e água Milli-Q, *scaffolds* foram corados com 1 mL da solução de vermelho de alizarina 2% (pH 4.2), por 15 min à TA. A alizarina foi removida e o *scaffold* foi lavado com água Milli-Q até clarear.

O vermelho de alizarina incorporado às células foi quantificado conforme descrito por Lin e colaboradores (2008). Os *scaffolds* foram eluídos em 500 µL/poço de cloreto de cetilperidínio 10% a 37 °C, sob agitação. Posteriormente, 100 µL da solução foram transferidos, em triplicata, para uma placa de 96 poços (fundo reto), e a DO mensurada à 550 nm.

4.13 Análise Estatística

Os experimentos foram realizados em triplicata. Os resultados foram analisados pelo *Prism Statistical software* (Graphpad, San Diego, CA). Os dados foram representados como média \pm desvio padrão e, estatisticamente comparados usando análise de variância one-way e/ou two-way ANOVA e teste de Bonferroni. Níveis de confiança $> 95\%$ ($p < 0,05$) foram considerados significativos.

5. RESULTADOS

5.1 Isolamento e Caracterização das células tronco mesenquimais da polpa dentária (CTPD)

Por meio da metodologia proposta nesse estudo foi possível isolar uma população de CTPD, caracterizada por seus aspectos morfológicos, pela caracterização fenotípica e por sua capacidade de diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica. Os resultados dessa fase do estudo estão detalhados no anexo 2 (BERTASSOLI et al., 2016), em um artigo publicado em janeiro de 2016.

5.2 Caracterização preliminar dos osteoblastos primários (OP) e imortalizados (OI)

Previamente ao estabelecimento das culturas celulares sobre os biomateriais, as populações de OI e OP foram estudadas quanto (1) aos aspectos morfológicos, (2) o potencial de diferenciação em meio indutor e (3) a expressão de marcadores osteoblásticos.

5.2.1 Aspectos morfológicos e potencial de deposição mineral de OP e OI

Os OP e OI foram capazes de aderir ao plástico e apresentaram uma morfologia bastante similar em microscopia de luz (Figura 4). Os OP atingiram a confluência de 90% aos 7 dias de cultura em MC (Figura 4C). No entanto, os OI apresentaram um estágio de proliferação inicial mais acelerado, atingindo confluência de 90% após 3 dias de cultura em MC (Figura 4F). Após 21 dias de cultura em meio osteogênico (MO) a deposição mineral das células diferenciadas foi confirmada tanto nos OI (Figura 4D), quanto nos OP (Figura 4H) pela coloração dos grânulos de cálcio em vermelho de alizarina, permitindo confirmar que essas células atingiram a maturação celular quando cultivadas em MO.

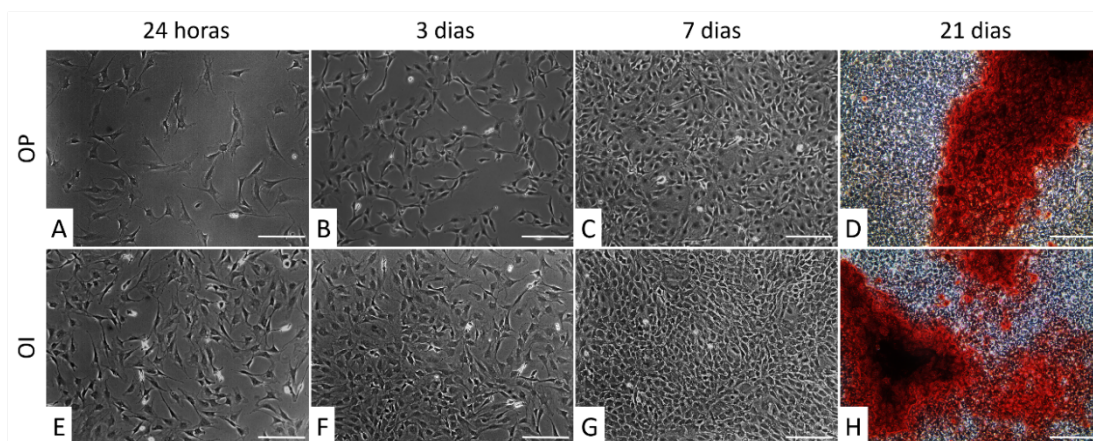


Figura 4. Microscopia invertida em contraste de fase de osteoblastos primários (OP) e imortalizados (OI) em cultura bidimensional. Em (A) OP cultivados durante 24 horas; (B) OP cultivado por 3 dias, confluência de 60%; (C) cultura de OP após 7 dias; (D) deposição de cálcio (em vermelho) após 21 dias em meio de diferenciação; (E) OI cultivados durante 24 horas; (F) OI cultivado por 3 dias, confluência de 90%; (G) cultura de OI após 7 dias; (H) deposição de cálcio (em vermelho) por OI após 21 dias em meio de diferenciação osteogênica (MO); Barras: 100 μ m

5.2.2 Expressão de marcadores osteoblásticos nas culturas OP e OI

Os OP obtidos das calvárias de neonatos expressaram os marcadores Osteopontina (no citoplasma, Figura 5A-C), BMP4 (predominantemente no núcleo, mas com expressão também detectada na membrana, Figura 5D-F), e Colágeno tipo I (no citoplasma, Figura 5G-I). Confirmando a predominância de células da linhagem osteogênica, o que é especialmente importante quando se trabalha com culturas primárias, passíveis de serem

heterogêneas. Resultados similares foram encontrados nas culturas de OI (Figura 6A-I), o que indicou que as células da cultura primária (OP) são osteoblastos, com expressão e comportamento semelhantes aos OI, MC3T3-E1 comercialmente adquiridos.

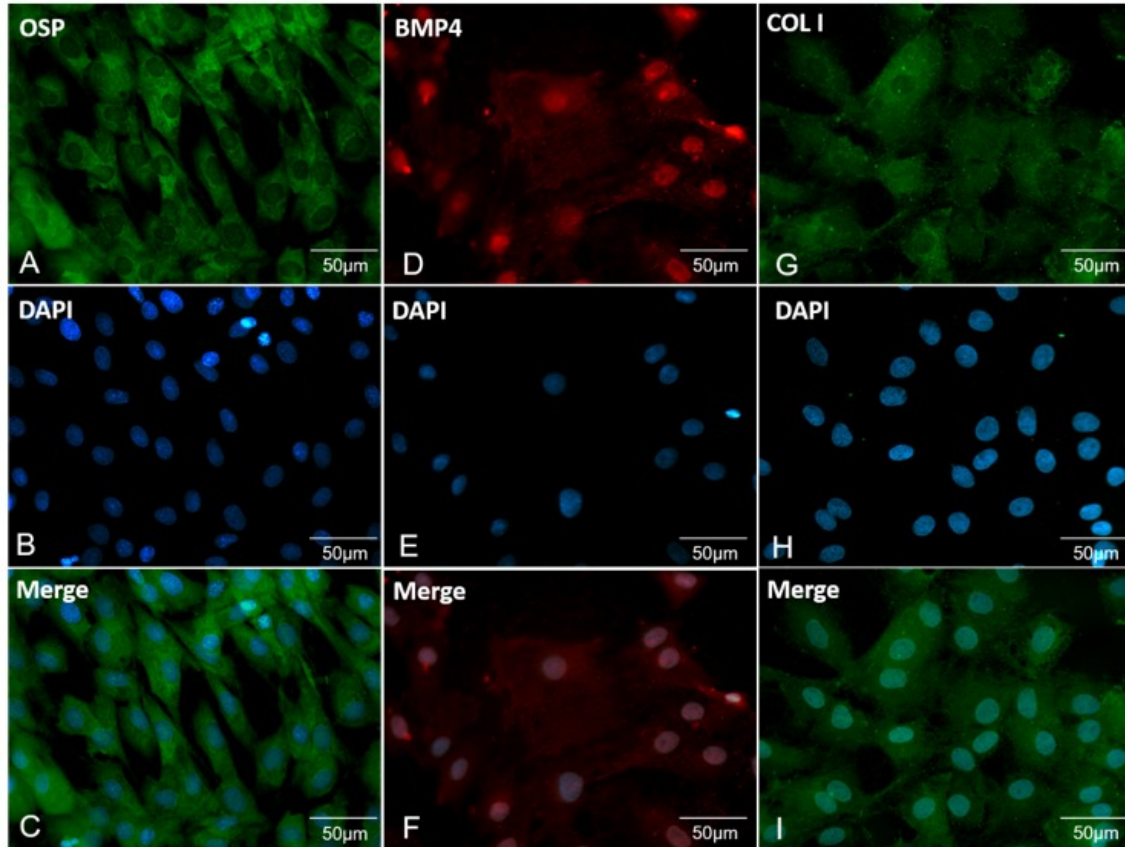


Figura 5. Detecção da expressão de Osteopontina, BMP4 e Colágeno tipo I em OP, por imunofluorescência. Em (A), Osteopontina em OP; em (B), a marcação nuclear por DAPI; e em (C) a sobreposição das imagens de (A) e (B). Em (D), BMP4; em (E), os núcleos corados com DAPI; e em (F), a sobreposição das imagens obtidas em (D) e (E). Em (G), Colágeno tipo I; (H) núcleos com DAPI; e em (I), a sobreposição de (G) e (H).

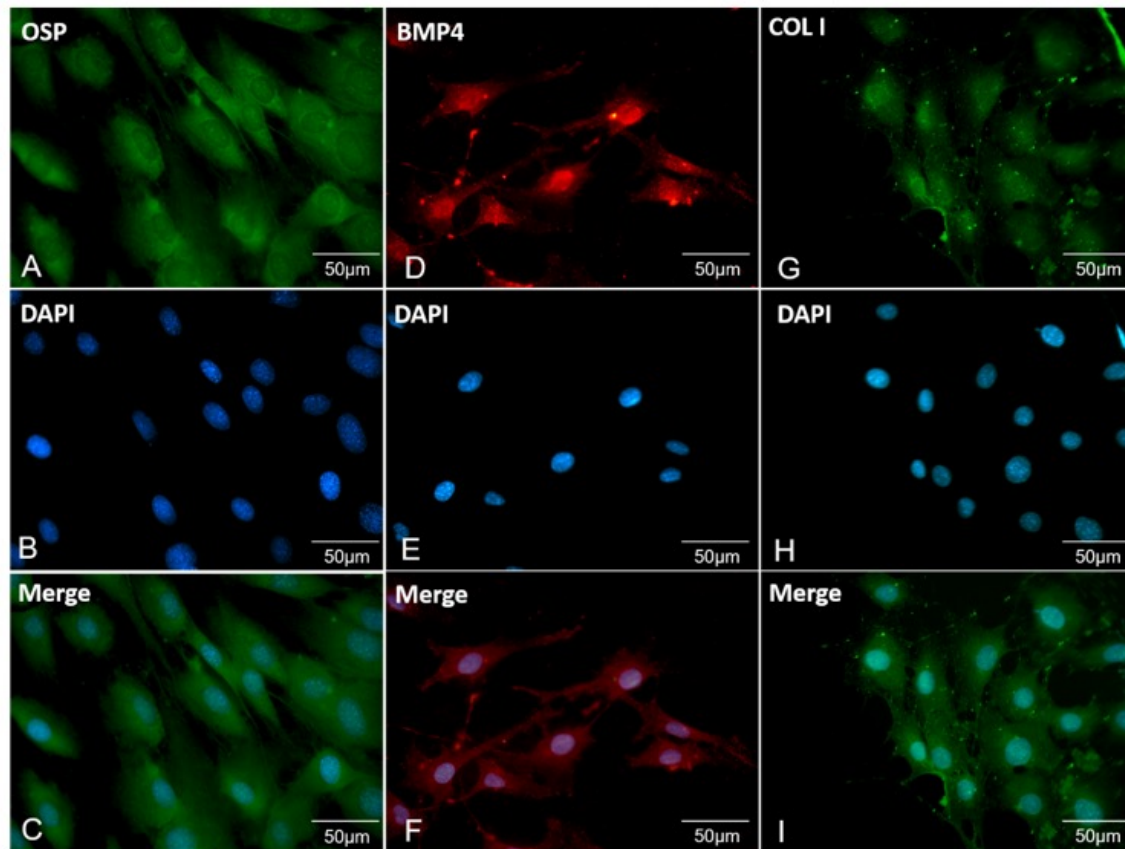


Figura 6. Detecção da expressão de Osteopontina, BMP4 e Colágeno tipo I em OI, por imunofluorescência. Em (A), Osteopontina em OI; em (B), a marcação nuclear por DAPI; e em (C) a sobreposição das imagens de (A) e (B). Em (D), BMP4; em (E), os núcleos corados com DAPI; e em (F), a sobreposição das imagens obtidas em (D) e (E). Em (G), Colágeno tipo I; (H) núcleos com DAPI; e em (I), a sobreposição de (G) e (H).

A confirmação das linhagens foi ainda obtida pela expressão de transcritos de marcadores osteogênicos, avaliada por RT-PCR. Os resultados revelaram que foi possível amplificar fragmentos dos transcritos de Runx2 e Colágeno tipo I em OI e OP nos tamanhos esperados, confirmando também por este método o sucesso do isolamento de osteoblastos em nossa cultura primária.

A expressão dos genes B-actina, EEF1 e GAPDH foi avaliada como controle positivo da reação de RT-PCR.

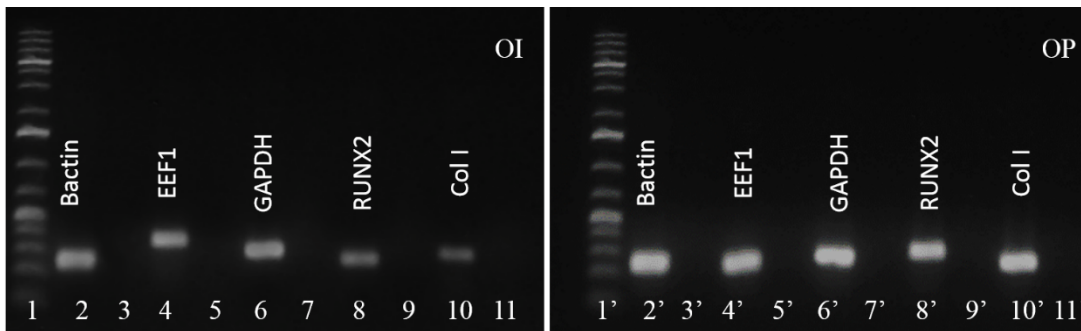


Figura 7. Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos amplificados por RT-PCR de Runx2 e Colágeno tipo I nos OI e OP. Em (OI) e (OP): (1; 1') padrão de peso molecular *GeneRuler1 Kb Plus DNA ladder* (Fermentas); (2, 2') amplificação utilizando o par de oligos para β -actina, utilizado como controle positivo da reação da PCR; (3; 3') controle negativo para β -actina; (4; 4') EEF1 utilizado como controle positivo; (5; 5') controle negativo para EEF1; (6; 6') GAPDH também utilizado como controle positivo; (7; 7') controle negativo para GAPDH; (8; 8') *Runx2*; (9; 9') controle negativo para *Runx2*; (10; 10') Colágeno Tipo I; (11; 11') controle negativo para Colágeno Tipo I.

5.3 Caracterização dos *scaffolds* de osso humano

5.3.1 Aspectos ao estereomicroscópio

Macroscopicamente o osso humano mineralizado apresentou um aspecto opaco à lupa estereoscópica, mas suas trabéculas revelaram-se irregulares e com tamanhos diferentes entre si (Figura 8). Após o processo de desmineralização, os fragmentos do osso humano adquiriram um aspecto translúcido ao microscópio estereoscópico (Figura 8B). Além disso, as trabéculas apresentaram um aspecto ainda mais irregular quando comparadas às trabéculas do osso mineralizado com espaço maior entre elas. Como esperado, a desmineralização conferiu ao bloco de osso humano uma maleabilidade como uma esponja gelatinosa de consistência firme.

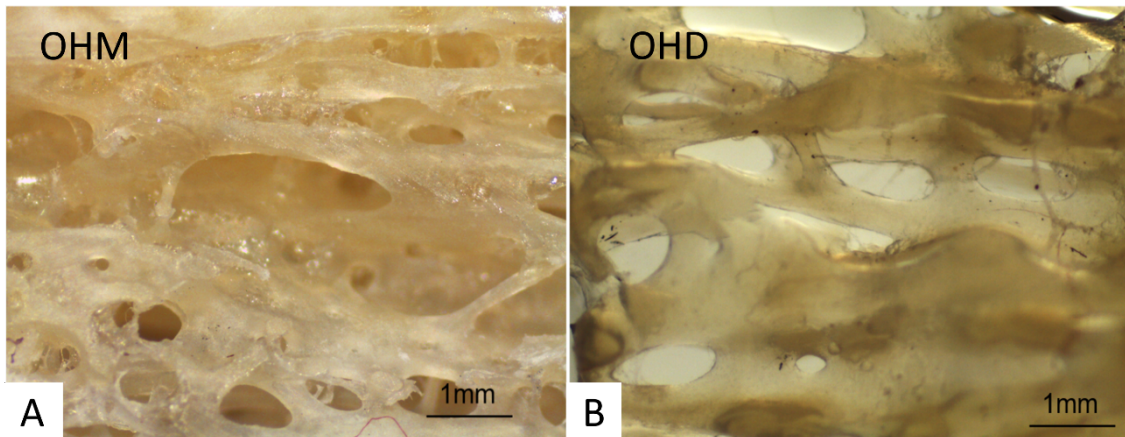


Figura 8. Análise morfológica de fragmentos de osso humano mineralizado (OHM) e osso humano desmineralizado (OHD). Em (A), o osso humano mineralizado; e em (B) o osso humano desmineralizado. (Esteromicroscópio). Aumento 32x.

Além dos aspectos morfológicos, a avaliação ao estereomicroscópio permitiu a análise da dimensão dos poros dos biomateriais. A mensuração do tamanho dos poros foi realizada por medidas lineares dos poros (altura e largura) conforme mostrado na figura 9. Para a plotagem dos resultados, foram considerados percentuais de poros com dimensões de 0 (mínimo) á 1300 μm (máximo) (Figura 9). O osso humano mineralizado apresentou um percentual similar entre os poros < 500 μm (45%) e poros > 500 μm (55%). O fragmento de osso humano desmineralizado revelou poros predominantemente > 500 μm (76%).

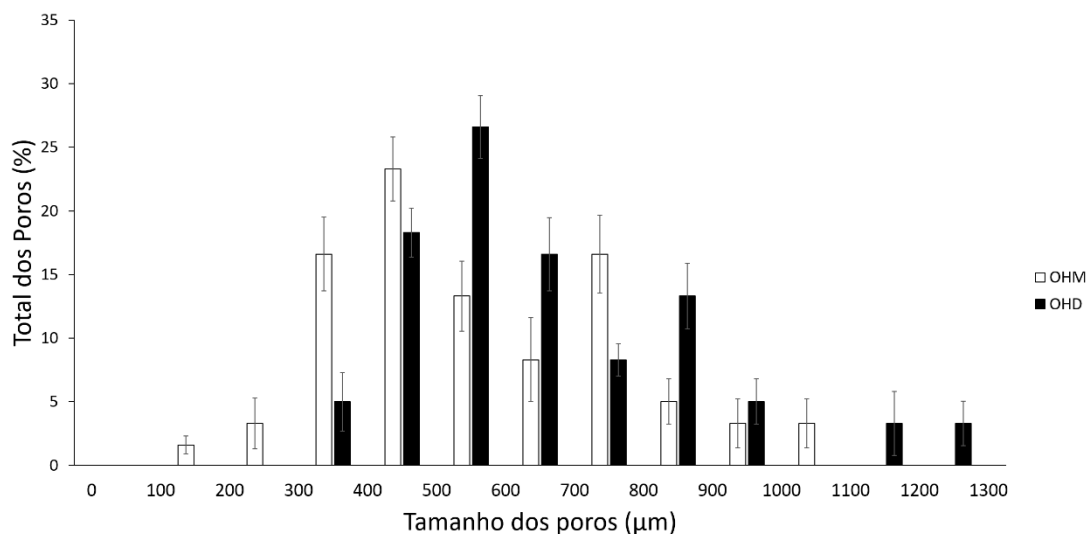


Figura 9. Mensuração dos poros de fragmentos de osso humano mineralizado (OHM) e osso humano desmineralizado (OHD).

5.3.2 Aspectos ultraestruturais dos *scaffolds* ao MEV

A análise ultraestrutural por microscopia eletrônica de varredura revelou a presença de resíduos na superfície das trabéculas dos *scaffolds* de OHM (Figura 10A) e OHD avaliados (Figura 10C). Em nenhum deles a superfície apresentou-se lisa e homogênea.

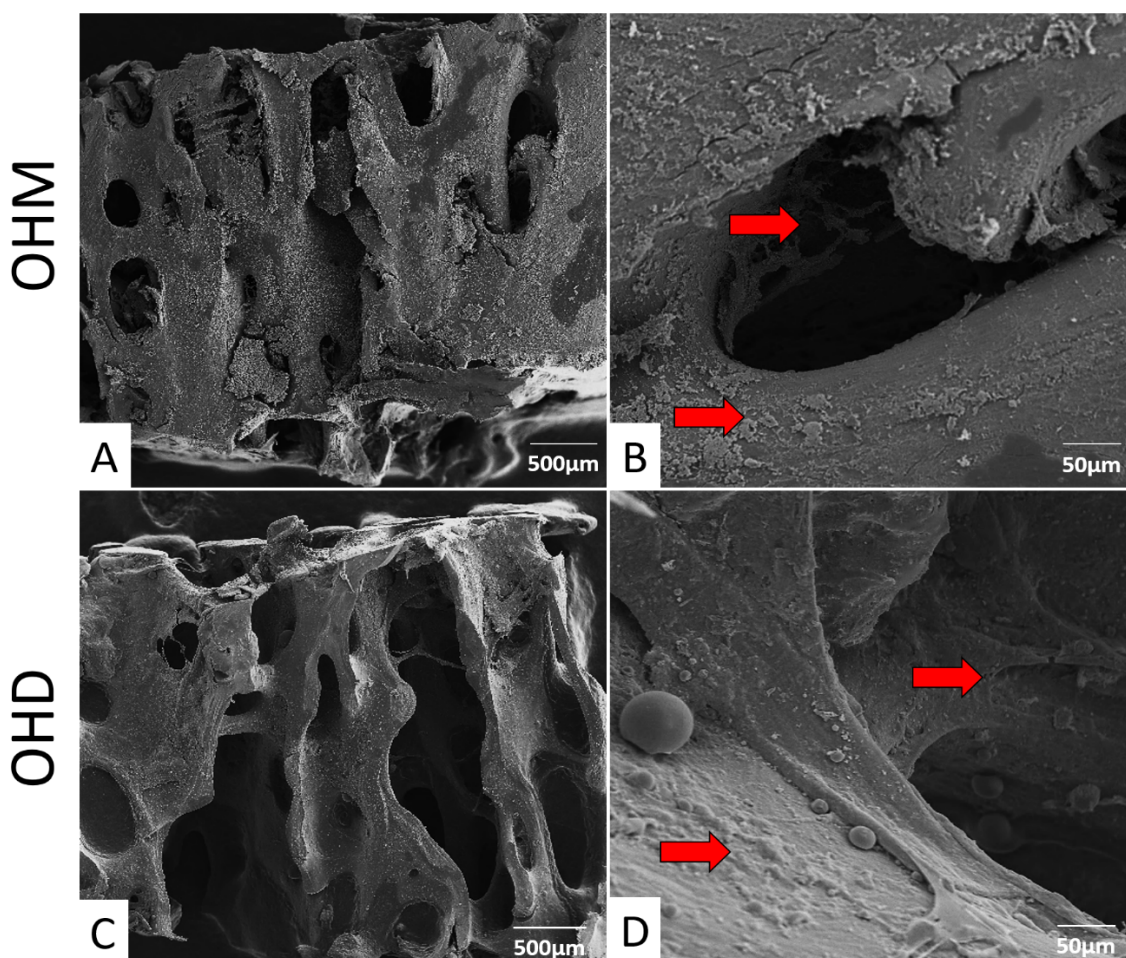


Figura 10. Eletromicrografia de fragmentos de osso humano mineralizado (OHM) e osso humano desmineralizado (OHD). A e B) fragmento de osso humano mineralizado. C e D) fragmento de osso humano desmineralizado. Notar tanto no OHM e OHD presença de resíduos no exterior das trabéculas (setas).

5.3.3 Aspectos histológicos dos *scaffolds* ao microscópio de luz

As imagens em HE revelaram células com núcleos picnóticos, bem corados no interior das trabéculas do osso humano (Figura 11). Além disso, os dados histológicos

confirmaram a presença de resíduos na porção externa das trabéculas, sugerindo resquícios de medula óssea ou restos de tecido biológico, como observado nas imagens obtidas ao MEV (Figura 11).

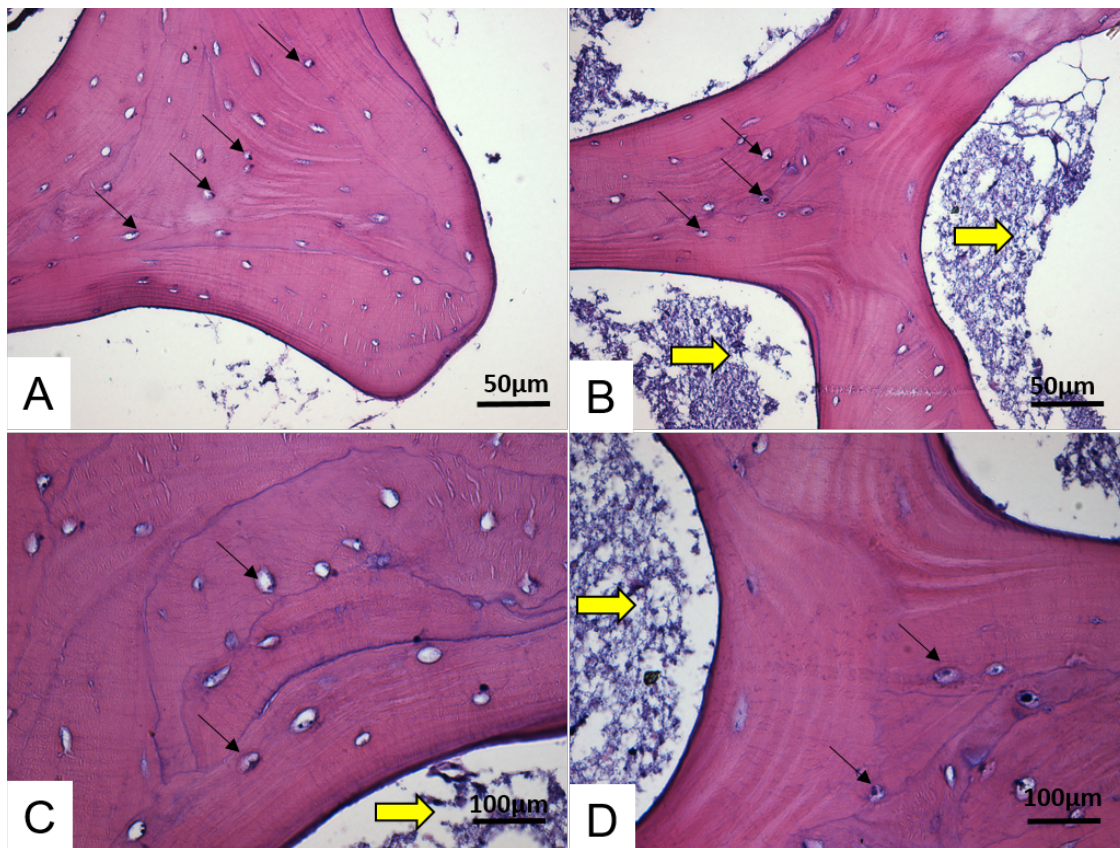


Figura 11. Cortes histológicos de osso humano. Notar resquícios de tecidos biológicos no interior das trabéculas (setas amarelas), e núcleos corados, sugerindo resíduos de osteócitos no interior de osteoblastos (setas pretas).

5.3.4 Preservação dos constituintes da matriz orgânica dos *scaffolds*

A preservação de componentes orgânicos das matrizes ósseas foi avaliado pela expressão de proteínas ósseas, avaliadas por imunofluorescência em cortes de OHD. Os resultados indicaram a presença de Colágeno tipo I, Osteopontina e BMP-4 em cortes histológicos de fragmentos ósseos humanos (Figura 12). Esses resultados indicaram que os tratamentos de descelularização dos ossos alógenos, a que são submetidos nos bancos de tecidos, bem como o processo de desmineralização, o qual foi realizado no laboratório, não foram capazes de alterar ou remover esses compostos da matriz óssea. Este resultado

é sugestivo de que outros componentes da matriz orgânica do tecido ósseo devem estar preservados nas matrizes desmineralizadas.

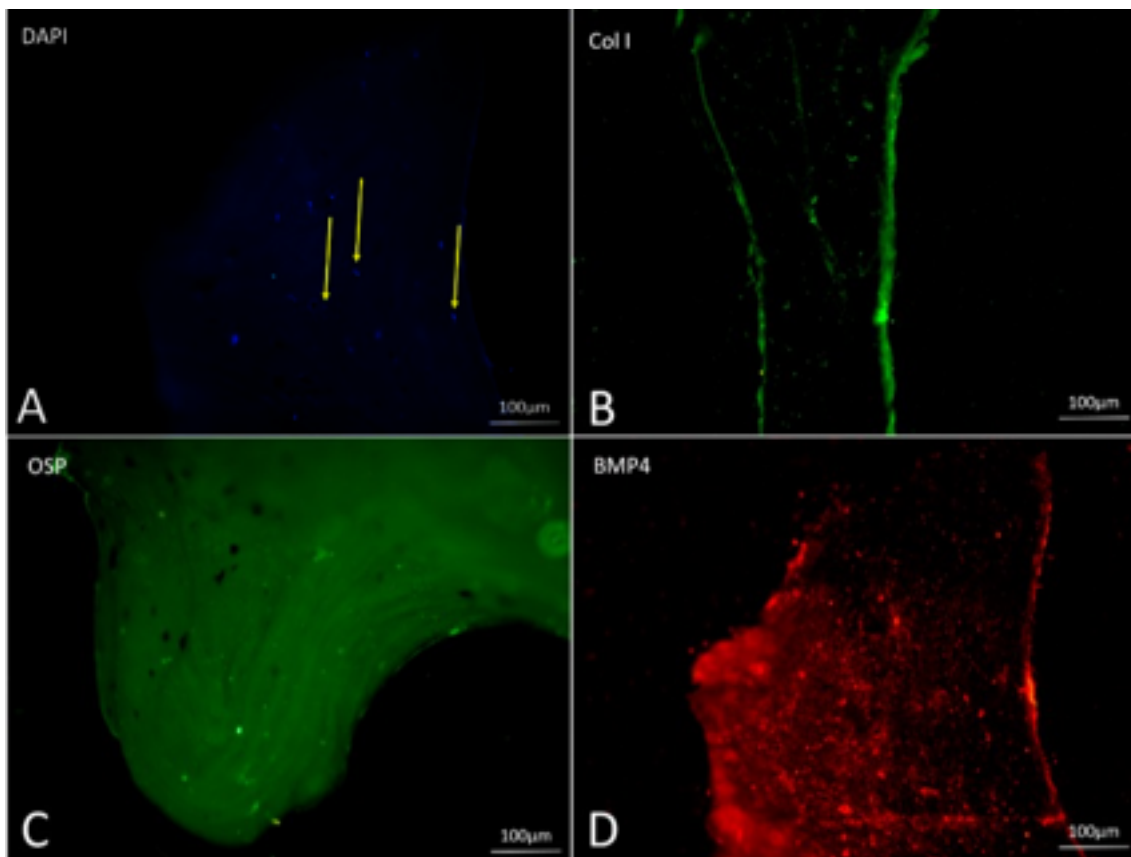


Figura 12. Imunofluorescência para marcadores osteogênicos na matriz de osso humano desmineralizado. Em (A) núcleos corados com DAPI (setas); B) Detecção da expressão de Colágeno tipo I; C) Osteopontina; D) BMP4.

5.4 Avaliação das culturas tridimensionais – CTPD, OI e OP sobre *scaffolds* de OH

5.4.1 Ensaios de viabilidade celular

A viabilidade de CTPD, OP e OI foi avaliada após 7, 14 e 21 dias de cultivo em MC em ambos *scaffolds* de osso humano mineralizado (OHM) e desmineralizado (OHD). O aumento da viabilidade celular foi observado ao longo do tempo avaliado, para os dois *scaffolds* e os três tipos celulares, sugerindo o crescimento contínuo das células osteoblásticas e células tronco em ambos os *scaffolds* avaliados (Figura 13). No entanto, os níveis de viabilidade celular foram diferentes quando comparados entre os *scaffolds*. Para os OI, a viabilidade das células aderidas ao *scaffold* de OHD foi maior quando

comparado a viabilidade das células no OHM (Figura 13A), nos três períodos avaliados (7, 14 e 21 dias). Resultados similares foram observados com a cultura de OP: células aderidas ao OHD apresentaram viabilidade maior comparada a observada para as células aderidas ao OHM (Figura 13B), nos três períodos avaliados.

Já os resultados observados na cultura de CTPD foram inversos ao resultados de cultura de células osteoblásticas. A viabilidade celular em OHM foi maior quando comparada com a viabilidade observada nas células em *scaffolds* de OHD (Figura 13C).

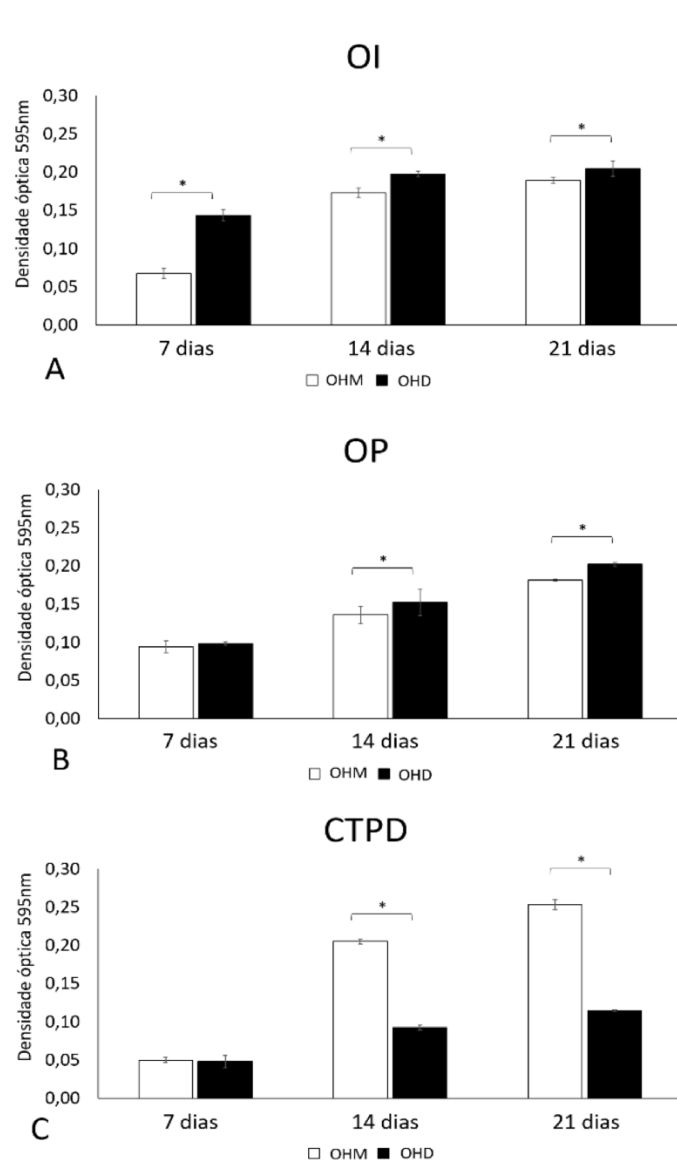


Figura 13. Análise de ensaio de viabilidade de células cultivadas em meio basal sobre OHM e OHD. Em (A), viabilidade de OI aos 7, 14 e 21 dias de cultivo; em (B), índices observados em OP; e em (C), nas CTPD. Dados significativos (*) em $p < 0.05$.

5.4.2 Análise das culturas sobre os *scaffolds* em microscopia eletrônica de varredura

- MEV

A aderência celular aos *scaffolds* de OHM e OHD foi avaliada por MEV após 7, 14 e 21 dias de cultura dos 3 tipos celulares. As imagens dos *scaffolds* com as células revelaram que estas formavam camadas semelhantes sob ambas superfícies, onde OP e OI apresentavam morfologia ovalada (Figura 14 e 15); enquanto que as CTPD apresentaram uma morfologia mais fusiforme (Figura 16). Em todos os tempos analisados, as células constituíram uma monocamada contínua sobre os biomateriais.

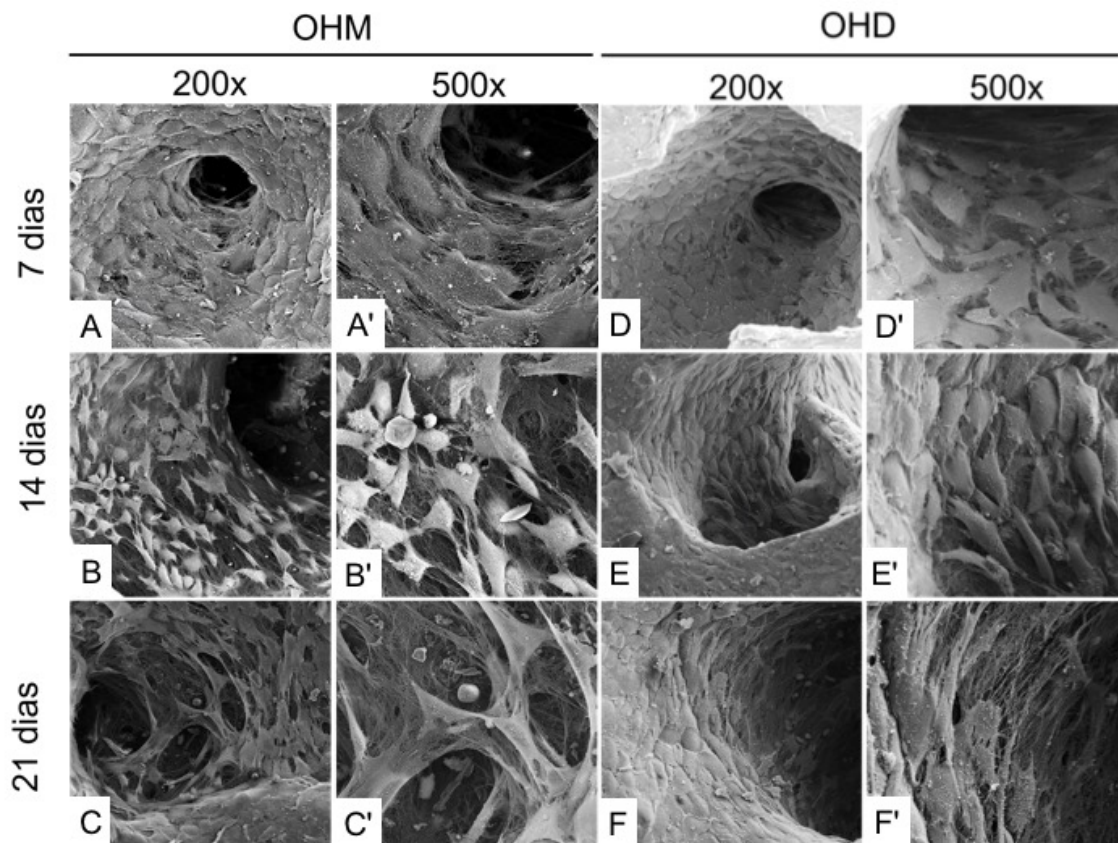


Figure 14. Eletromicrografia de OI cultivados sob *scaffolds* de OHD (A – C') e OHM (D- F'), aos 7, 14 e 21 dias de cultivo em meio de crescimento.

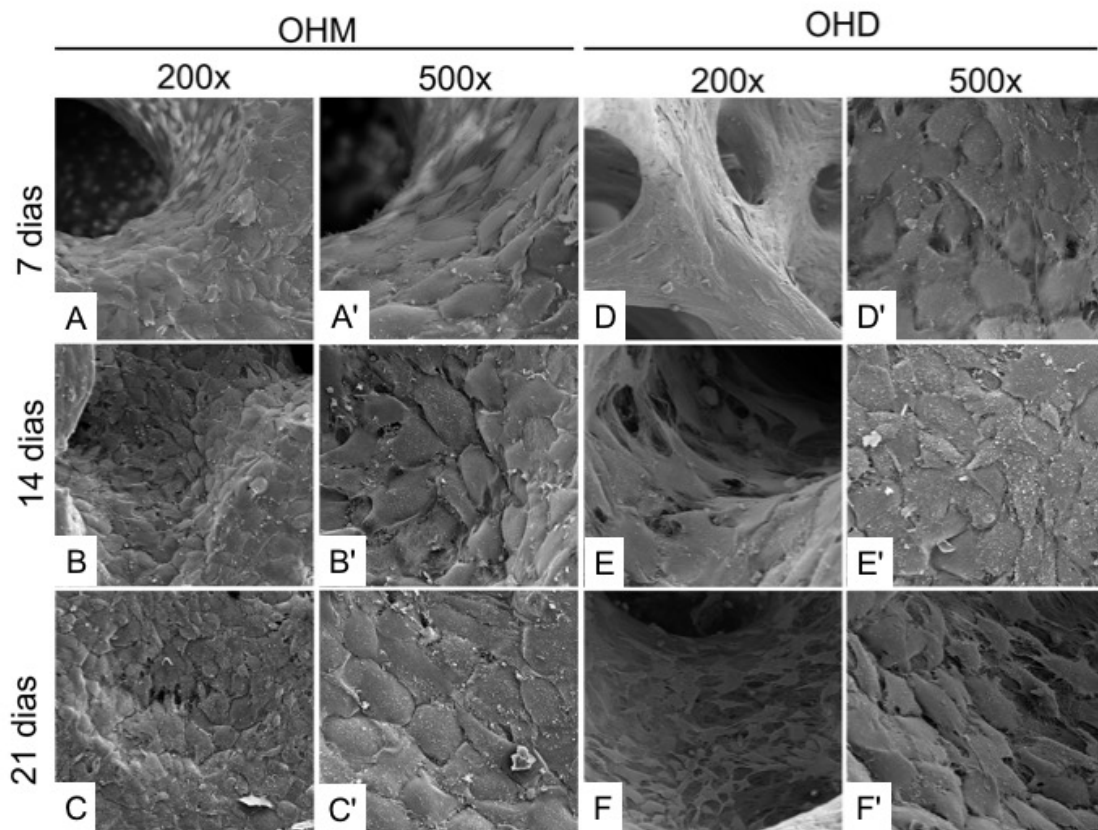


Figure 15. Eletromicrografia de OP cultivados sob *scaffolds* de OHD (A – C’); e OHM (D- F’), aos 7, 14 e 21 dias de cultivo em meio de crescimento.

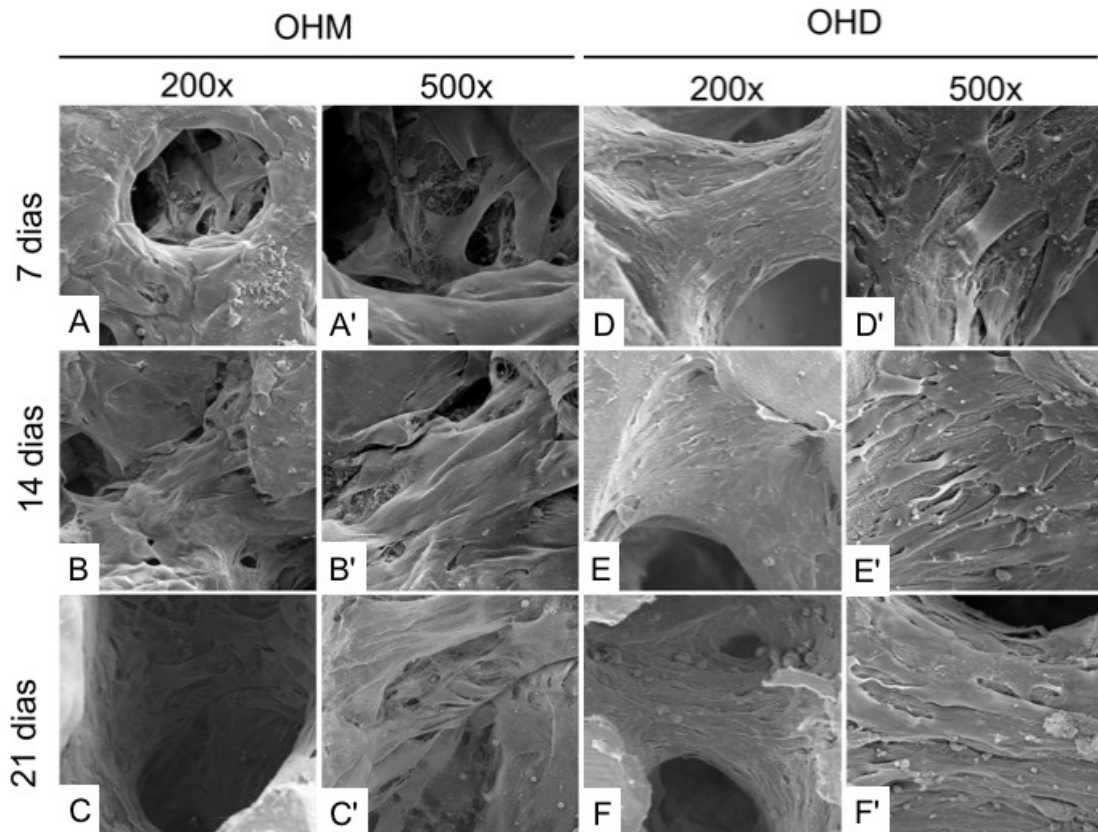


Figura 16. Eletromicrografia de CTPD cultivadas sob *scaffolds* de OHD (A – C'); e OHM (D- F'), aos 7, 14 e 21 dias de cultivo em meio de crescimento.

5.4.3 Análise da atividade da Fosfatase Alcalina (FA) das células OI, OP e CTPD cultivadas sobre os *scaffolds* de OHM e OHD

A influência dos *scaffolds* (OHM e OHD) sobre a diferenciação das populações celulares foi avaliada pelo nível de atividade da enzima Fosfatase Alcalina (FA) nos OI, OP e CTPD cultivados em meio de crescimento por 7 e 14 dias.

Foi observado que tanto aos 7 quanto aos 14 dias, os três tipos de células apresentaram uma maior atividade da enzima FA quando cultivadas sobre o *scaffold* de OHD quando comparado aos mesmos dias em OHM (Figura 17).

Atividade Fosfatase Alcalina

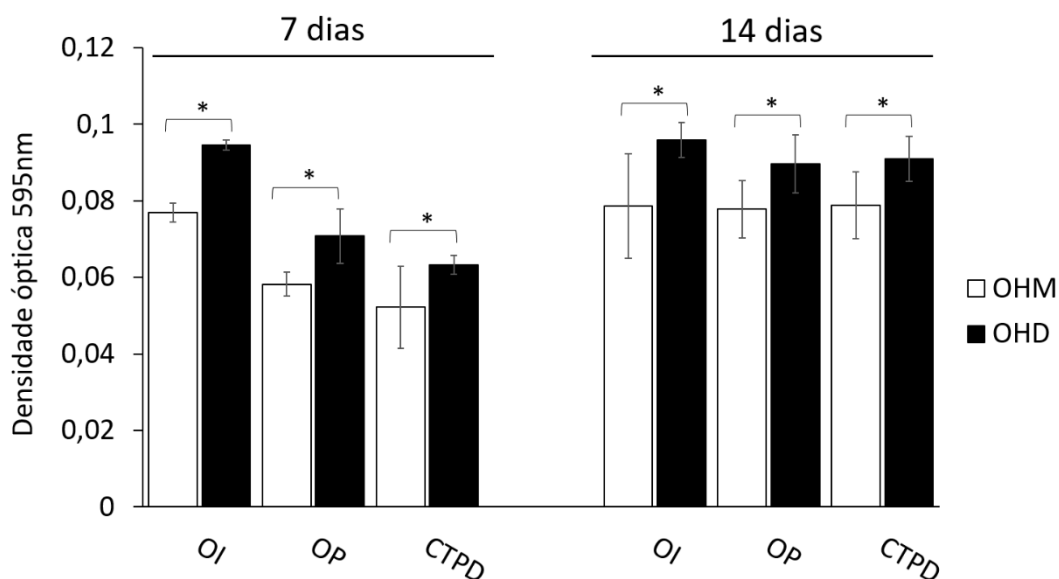


Figura 17. Representação gráfica da atividade da enzima Fosfatase Alcalina, obtida pelo ensaio de NBT/BCIP. Atividade mensurada após 7 e 14 dias de cultura celular sobre os *scaffold* de OHM e OHD. Dados significativos (*) em $p < 0,05$.

5.4.4 Análise da deposição mineral por meio da coloração de grânulos de cálcio (vermelho de alizarina)

O potencial de deposição mineral dos diferentes tipos celulares cultivados nos dois *scaffolds* foi avaliado pela coloração de vermelho de alizarina, que detecta grânulos de cálcio, após 14 e 21 dias da cultura em meio osteogênico. Os resultados indicaram que o OHD, em todas as 3 culturas (OI, OP e CTPD) foi capaz de influenciar positivamente na indução de deposição de mineral, quando comparado a cultura das mesmas células em OHM (Figura 18).

Coloração Vermelho de Alizarina

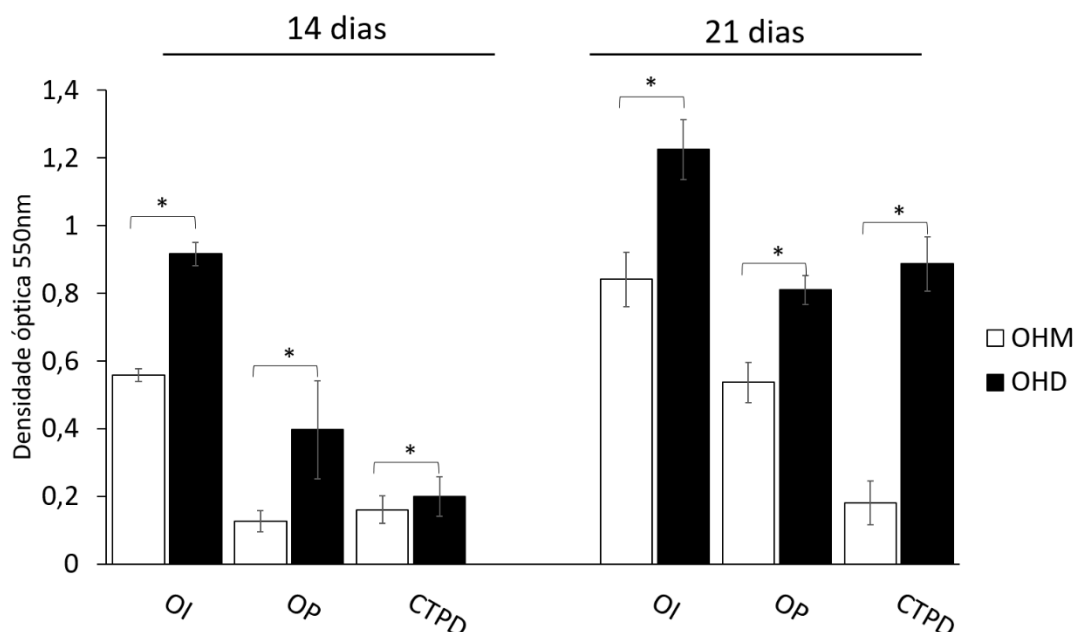


Figura 18. Representação gráfica da deposição de mineral, obtida pela coloração de vermelho de alizarina. Deposição mensurada após 14 e 21 dias de cultura celular sobre os *scaffolds* de OHM e OHD, em meio de diferenciação osteogênica. Dados significativos (*) em $p < 0,05$.

6. DISCUSSÃO

Enxertos alógenos adquiridos em bancos musculoesqueléticos têm sido indicados como biomateriais de preenchimento em lesões ou fraturas ósseas, com finalidades osteocondutora e osteoindutora (RUST et al., 2007; SOBREIRA et al., 2011). Neste trabalho, foi avaliado o potencial do uso de fragmentos ou blocos de ossos de origem humana, nas formas mineralizada e desmineralizada, como *scaffolds* para o crescimento de células de linhagens osteogênicas e células tronco mesenquimais da polpa dentária visando a bioengenharia tecidual óssea. Estes fragmentos de ossos são fornecidos/comercializados em apresentação mineralizada, preservando seus componentes inorgânicos. A forma desmineralizada, onde estão expostos componentes da matriz orgânica, pode interferir no comportamento das células aderidas, influenciando o processo de regeneração óssea (RAVIDRAN et al., 2015). Desse modo, é possível que

tais *scaffolds* desmineralizados, além de atuarem no preenchimento e no suporte celular, possam atuar também como superfícies osteoindutoras. Para investigar essa hipótese, este trabalho se propôs a realizar uma avaliação comparativa de ossos humanos nas formas mineralizada e desmineralizada, a fim de esclarecer qual destas matrizes apresenta efeitos mais benéficos à adesão, proliferação e diferenciação de células de diferentes linhagens pré-osteoblásticas e células tronco mesenquimais.

A bioengenharia tecidual propõe o cultivo de células *in vitro* sobre matrizes tridimensionais para posterior transplantação *in vivo* (RODRIGUES et al., 2010). A seleção de células de interesse na fase de cultivo *in vitro* é uma etapa importante para o objetivo final de reparação tecidual. Neste estudo, três tipos celulares foram utilizados: duas linhagens osteogênicas (osteoblastos primários obtidos de calvarias de neonatos de ratos e uma linhagem comercial de osteoblastos imortalizados) e células tronco mesenquimais derivadas de incisivos de ratos adultos. Com o monitoramento diário dessas culturas foi possível conhecer a evolução e o processo de diferenciação das células, e compará-lo com os aspectos previamente descritos na literatura para culturas de OP e CTPD.

As células tronco de polpa dentária de ratos utilizadas neste trabalho apresentaram as principais características definidas como critérios mínimos para definir uma população de CTM pelo Comitê da Sociedade Internacional de Células Tronco Mesenquimais e Terapia Celular (DOMINICI et al., 2006). As células apresentaram aderência ao plástico e o caráter fibroblastóide foi adquirido após a 3ª passagem (BERTASSOLI et al., 2016), conforme o esperado para CTM (GRONTHOS et al., 2000; GRONTHOS et al., 2002; GUIMARAES et al., 2011). Na caracterização fenotípica, 90% das CTPD isoladas neste trabalho foram positivas para o marcador de CTM conhecido como CD90; embora apenas

60% foram positivas para o marcador de fibroblastos e CTM, conhecido como CD73 (BERTASSOLI et al., 2016).

A fim de comprovar ainda a multipotência da população de células isoladas nesse estudo, as culturas foram ainda quimicamente induzidas e se diferenciaram, após 21 dias, em osteoblastos, condroblastos e adipócitos. A diferenciação para células osteoblásticas, a partir de células tronco, é um grande avanço em termos de bioengenharia tecidual. Inúmeras pesquisas têm buscado a associação de células pré-osteogênicas ou células tronco aos biomateriais usados em enxertias ósseas. Como exemplo, Miranda e colaboradores (2012) utilizaram a associação de células tronco, eGFP positivas (células obtidas de animais geneticamente modificados para proteína eGFP fluorescente), à quitosana e transplantaram o tecido alvéolos dentários de ratos. Os resultados mostraram aceleração do reparo ósseo comprovado por avaliação histológica e tomografias computadorizadas. Além disso, os autores observaram células tronco eGFP positivas no tecido ósseo neoformado e também junto aos vasos e tecido epitelial que revestia o sítio operado. No entanto, do mesmo modo, estudos pré-clínicos de células tronco mesenquimais dentárias se mostram promissoras em biologia óssea, como por exemplo, o potencial de CTPD em regeneração de defeitos críticos de calvária em ratos (MOSHAVERINIA et al., 2014; MENICANIN et al., 2014). Em modelos caninos e suínos, o transplante local de CTPD com *scaffold* de β -TCP e HA/TCP mostraram o sucesso da indução da regeneração óssea em defeitos ósseos orofaciais (ZHENG et al., 2009; KIM et al., 2009).

Segundo Owen e colaboradores (1990) três fases principais caracterizam a progressão de culturas osteogênicas: adesão e proliferação celular, diferenciação, maturação e mineralização de matriz extracelular. A fim de caracterizar previamente as linhagens celulares em nosso estudo e conhecer o comportamento dessas células em

relação a fases, um estudo preliminar *in vitro* foi realizado, anteriormente à fase de semeadura das células sobre os *scaffolds*. Os osteoblastos, OI e OP, foram caracterizados quanto à expressão de transcritos de genes marcadores osteogênicos, *Colágeno tipo I* e *Runx2*, por meio de RT-PCR. Tais genes foram expressos em ambos, OI e OP, embora a expressão tenha sido aparentemente menor nos OI. O gene para *Colágeno tipo I* é expresso precocemente em células comprometidas com a linhagem osteogênica (AUBIN et al., 2001), e indica a atividade das células na produção do principal constituinte proteico da matriz óssea. *Runx2* é um gene importante nas fases de proliferação, diferenciação e na regulação osteogênica, na formação do esqueleto e na ossificação endocondral e intramembranosa (KOMORI et al., 1997; MUNDLOS et al., 1997; OTTO et al., 1997). Handchel e colaboradores (2006), Mikami e colaboradores (2007) e Rey Cubillos e colaboradores (2012) verificaram a habilidade dos osteoblastos cultivados de sintetizar matriz óssea *in vitro*.

Além da expressão dos transcritos de *Runx2* e *Colágeno tipo I* por PCR, a expressão de Colágeno tipo I, Osteopontina e BMP4 também foi avaliada nestas células por imunofluorescência. As culturas de OP e OI expressaram todos os marcadores analisados. A Osteopontina, por estar presente nas periferias da matriz óssea neoformada, é importante iniciadora do processo de mineralização óssea, sendo, portanto, um marcador precoce da diferenciação osteogênica, também prevenindo a precipitação prematura dos cristais de fosfato de cálcio na matriz colagênica (DOI et al., 1992). Osteopontina, BMP4 e Colágeno tipo I também envolvidos na diferenciação osteoblástica (KEMOUN et al., 2007).

Por fim, para avaliar o potencial de maturação e diferenciação das linhagens *in vitro*, as culturas bidimensionais de OP e OI foram também cultivadas por 21 dias em meio de diferenciação osteogênica. Os resultados revelaram a presença de nódulos de

mineralização, corados por vermelho de alizarina, tanto em OI quanto em OP. Estes foram importantes resultados deste trabalho, permitindo confirmar a funcionalidade das populações osteogênicas usadas e para subsidiar a 3a fase do estudo, de cultura tridimensional sobre os *scaffolds*.

No presente estudo, dois modelos potenciais de matrizes para bioengenharia tecidual óssea foram avaliados: 1) fragmentos de osso natural humano, derivado de um banco de tecido músculo esquelético (Uniooss®); e 2) modelo experimental foi obtido em laboratório, a partir da desmineralização dos blocos de osso humano em solução quelante de cálcio (EDTA 10%).

Trabalhos na literatura têm avaliado a morfologia e comportamento de ossos humanos como *scaffolds* celulares. Dentre estes estudos, alguns têm revelado o sucesso no uso do osso humano como arcabouço celular, em sua versão mineralizada (MAUNEY et al., 2005; GRAYSON et al., 2010). A ideia de se trabalhar com a fase orgânica das matrizes ósseas vem sendo investigada. Trabalhos anteriores, como de Mauney e colaboradores (2004a; b) demonstraram que matrizes ósseas parcialmente desmineralizadas utilizadas para suporte, favorecem a adesão e diferenciação osteogênica de células tronco mesenquimais de medula óssea, tanto em estudos *in vitro* quanto *in vivo*.

Os fragmentos de ossos humanos mineralizados e desmineralizados alvos deste trabalho foram avaliados quanto as características de porosidade, capacidade de aderência, histologia e expressão de marcadores osteogênicos.

A porosidade e a interconectividade são características primordiais para a difusão de nutrientes e para a remoção de resíduos metabólicos resultantes da atividade das células (SALGADO et al., 2004; AGARWAL et al., 2008). De acordo com Karageorgiou e Kaplan (2005), o tamanho mínimo de um poro deve ser 100 μm , isso devido a necessidade de migração e transporte celular. No entanto, poros com tamanhos superiores

a 300 μm são recomendados, devido à melhora da neoformação óssea de novos capilares (ROOHANI-ESFAHANI et al., 2010). De acordo com a Chuenjitkuntaworn e colaboradores (2010), um grande crescimento de células foi observado em *scaffolds* com poros $> 400 \mu\text{m}$. A mensuração dos poros dos *scaffolds* (Figura 9) estudados revelou que o osso humano mineralizado entre 120 μm a 1.333 μm e osso humano desmineralizado entre 347 μm a 1.413 μm . Tais resultados demonstram que as 2 matrizes atendem aos parâmetros de porosidade preconizados, considerados ideais para o crescimento e deslocamento celular dentro das cavidades ósseas. Os *scaffolds* de OHM e OHD, visualizado por MEV e microscópio estereoscópico, se assemelhou ao observado no tecido ósseo córtico-esponjoso humano normal. Tais aspectos morfológicos são importantes para a construção tecidual *in vitro*, bem como para a reparação óssea *in vivo*, pois favorece a penetração celular ao longo de todo o corpo do fragmento enxertado, permitindo uma formação óssea uniforme, uma boa perfusão para a penetração de oxigênio e do meio de cultura, nos procedimentos *in vitro* (RUST et al., 2007; KRISHNAMURITHY et al., 2014; RUST et al., 2007). Alguns pesquisadores têm enfatizado outras características essenciais para os *scaffolds* com finalidades ósseas. Segundo Alsberg, Hill e Mooney (2001), Abukawa e colaboradores (2003), Meyer, Joos e Wiesmann (2004), Meyer e colaboradores (2005) e Chim e colaboradores (2006), os biomateriais devem apresentar um desenho, uma composição química e tamanho dos poros semelhante aos da área receptora, além de fornecer osteocondutividade e não serem tóxicos. Todos estes quesitos foram cumpridos para o osso humano utilizados neste trabalho (OHM e OHD).

A matriz óssea desmineralizada (MOD) é produzida pela extração ácida dos minerais inorgânicos de osso alogênico, deixando apenas uma estrutura de Colágeno de tipo I (ZHANG et al., 2015). A desmineralização também expõe fatores de crescimento

osteointutores, incluindo BMP, tornando MOD mais osteointutor do que o próprio ósseos mineralizado. A MOD está atualmente disponível como pó, grânulos, gel, massa e pasta, mas uma limitação intrínseca de todos os tipos de MOD é a fraca resistência mecânica e porosidade (AL KAYAL et al., 2015; TOLLEMAR et al., 2016). Segundo Ravindran e Colaboradores (2015) MOD é composto principalmente de Colágeno (93%); sendo assim, é considerado um biomaterial osteocondutor e osteointutivo (HOLT & GRAINDER, 2012; GRUSKIN et al., 2012). Em nossos resultados, observamos que os três tipos celulares aderiram e proliferaram durante o período estudado em ambos *scaffolds* (mineralizado e desmineralizado). Sugerindo que a porosidade e a estrutura 3D apresentada por estes biomateriais após corte e tratamento foram suficientes como um microambiente adequado para as células aderirem e proliferarem (CHEN et al., 2007 a, b). A adesão de células aos biomateriais é um indicio de sucesso para as fases posteriores de transplantes e reparação de tecido ósseo. No presente estudo as células foram indistintamente plaqueadas de forma concentrada (5×10^4 células em um volume de 40 μL) sobre o *scaffold* e deixadas por 30 minutos, a 37°C, para o início de adesão, deixadas incubadas 30 minutos e somente após esse período, o restante do meio de cultura (460 μL) foi inserido para a cobertura dos biomateriais. Desse modo, as duas superfícies testadas (OHM e OHD) tiveram a mesma oportunidade de colonização celular, mas, de acordo com as imagens por MEV e níveis de MTT, as superfícies desmineralizadas revelaram maior afinidade com as células osteoblásticas.

A desmineralização dos *scaffolds* pode ter um papel significativo na influência da diferenciação osteogênica, pela exposição de alguns fatores de crescimento ou moduladores osteogênicos. A fim de avaliar essa possibilidade, este estudo propôs, como princípio de prova, a avaliação da expressão dos mesmos moduladores osteogênicos analisados nas culturas de células e presentes na matriz óssea: BMP-4, Colágeno tipo I e

Osteopontina. Sabe-se que as BMP (KAPLAN et al., 2005), colágenos (AMEYE et al., 2002; SHEN, 2005) e osteopontina (ONO et al., 2007; HARMY et al., 2004) quando implantados em tecido subcutâneo são capazes de estimular as células mesenquimais circunvizinhas a se diferenciarem e iniciarem um processo similar à ossificação endocondral. No entanto, há evidências de que as BMP podem também induzir a formação óssea diretamente, sem a seqüência endocondral. Pesquisas têm demonstrado que, em todos os grupos de ratos nos quais a BMP foi implantada, ocorreu ossificação (KAPLAN et al., 2004; KAPLAN et al., 2005). Nossos resultados revelaram que as matrizes de osso humano desmineralizado expressou BMP4, Colágeno tipo I e Osteopontina, e que, aparentemente, ela foi preservada após o protocolo de desmineralização por EDTA.

Além da caracterização das células tronco e de linhagens osteogênicas e dos *scaffolds* mineralizados e desmineralizados, este trabalho ainda avaliou a viabilidade celular e o potencial osteogênico destes cosntructos em sistema *in vitro* de culturas 3D. Foi possível observar um maior índice de viabilidade nas células cultivadas sob *scaffold* de osso alógeno desmineralizado, quando comparado com osso mineralizado. Matrizes parcialmente desmineralizadas ou totalmente desmineralizadas resultam em melhor benefício para as células em cultura, quando comparadas com o mesmo *scaffold* mineralizado (PEREZ et al., 2015; RODRIGUEZ et al., 2016). Segundo Leonetti e Koup (2003), Tollemar e colaboradores (2016) potenciais osteoindutivos ficam retidos no osso alógeno mesmo após o seu processamento (seja ele desmineralizado, congelado-seco liofilizado ou fresco congelado). Essa capacidade osteoindutora é atribuída predominantemente à permanência de proteínas morfogenéticas ósseas e também fatores de crescimento de fibroblastos, fatores de crescimento derivado das plaquetas e fator de crescimento semelhante à insulina na matriz colágena (RUST et al., 2007).

O aumento de mineralização em OHD pode ser parcialmente atribuído à propriedade do material do *scaffold*, pois segundo Wang et al., (2016) acredita-se que os próprios componentes naturais podem afetar os comportamentos celulares, tais como adesão, crescimento e diferenciação. A composição do *scaffold* desempenha um papel fundamental no comportamento celular, por exemplo, proteínas adesivas, incluindo Fibronectina, Vitronectina, Colágeno, Laminina e Osteopontina são escolhidas comumente para ancoragem celular inicial (DANIELLE et al., 2008 ; DISCHER, MOONEY & ZANDSTRA, 2009). A matriz óssea quando desmineralizada, expôs tais proteínas, favorecendo assim o melhor comportamento celular sobre OHD quando comparado com OHM.

Colágeno tipo I é um componente orgânico dos ossos e um componente da cartilagem fibrosa, demonstrando estimular a formação óssea (Wang et al., 2016). Os *scaffolds* de OHD utilizados no presente estudo foram derivados de matriz óssea natural decelularizadas, e posteriormente desmineralizada, onde estas são principalmente compostos de Colágeno tipo I. Esta propriedade do *scaffold* pode ter mediado o aumento de mineralização e atividade da Fosfatase Alcalina, como já foi relatado por outros estudos usando *scaffolds* desmineralizados (SHI et al., 2016). Ravidran e colaboradores (2015) a matriz óssea desmineralizada apresenta em sua composição fatores de crescimento osteoindutores (como BMP). A presença deste fator pode ter influenciado indiretamente na diferença significativa na maturação de células osteoblásticas e também na diferenciação das células tronco, entre as matrizes, uma vez que estas moléculas fazem parte do grupo de mediadoras da atividade da enzima Fosfatase alcalina e Osteocalcina (BEHR et al., 2010).

Segundo Kim et al., (2014) a matriz óssea desmineralizada (MOD) é amplamente utilizada para reparar defeitos ósseos, e também é relatada como sendo um material

osteocondutor e como material osteoindutor (cicatrização óssea com recrutamento e estimulação da diferenciação osteoblastogênica de células progenitoras). A matriz óssea desmineralizada utilizada neste trabalho induziu a maior atividade de Fosfatase Alcalina (diferenciação osteoblastica) e também induziu a maior deposição de cálcio (mineralização) quando analisado pelo ensaio de vermelho de alizarina.

Durante a regeneração óssea, o recrutamento de células osteoblásticas e células tronco mesenquimais para o local é essencial para a neoformação óssea (RAVINDRAN et al., 2015). Por conseguinte, um material regenerativo ósseo deve possuir a capacidade de promover a ligação e proliferação destes tipos celulares acima citado. Tanto OHM quando OHD promoveram aderência, proliferação, diferenciação e mineralização de células osteoblásticas e células tronco mesenquimais. Entretanto, observou-se um aumento destes indicativos em OHD em relação a OHM, indicando seu maior potencial para recrutar células. Outros estudos deverão ser realizados para comprovação efetiva desta influencia positiva de matriz desmineralizada.

7. CONCLUSÕES

- Ambos *scaffolds* de OHM e OHD se mostraram viáveis e compatíveis para cultura, tanto para células osteoblásticas, quanto para células tronco da polpa dentária.
- O tratamento de descelularização dos ossos alógenos, a que são submetidos nos bancos de tecidos, bem como o processo de desmineralização, o qual foi realizado no laboratório, não foram capazes de alterar ou remover os compostos da matriz óssea.
- A desmineralização aumentou o percentual de poros $>500 \mu\text{m}$.
- As células de linhagens osteoblásticas (OI e OP) apresentaram melhor viabilidade celular quando cultivadas sobre *scaffolds* de OHD; enquanto que as células tronco mesenquimal de polpa dentária (CTPD) apresentaram melhores índices quando cultivadas sobre os fragmentos de OHM.
- Os fragmentos de OHD apresentaram maior influência na diferenciação e mineralização celular, tanto para células osteoblásticas, quanto para células tronco da polpa dentária.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUKAWA, H.; TERAJ, H.; HANNOUCHE, D.; VACANTI, J. P.; KABAN, L. B.; TROULIS, M. J. Formation of a mandibular condyle *in vitro* by tissue engineering. **J Oral Maxillofac Surg**, 61(1):94-100, 2003.

AGARWAL, S., WENDORFF, J. H., GREINER, A. Use of electrospinning technique for biomedical applications. **Polymer**, 49: 5603–5621, 2008.

AKAI, V. T.; ZHANG, Z.; DONG, Z.; NEIVA, K. G.; MACHADO, M. A.; SHI, S.; SANTOS, C. F.; NÖR, J. E. SHED differentiate into functional odontoblastos and endothelium. **J Dent Res**, 89, 791, 2010

AKIKO, O.; TSUKAMOTO, G.; NAGATSUKA, H.; YOSHIHAMA, Y.; RIVERA, R. S.; KATSURANO, M.; YAO, M.; SASAKI, A. An immunohistochemical evaluation of BMP-2, -4, osteopontin, osteocalcin and PCNA between ossifying fibromas of the jaws and peripheral cemento-ossifying fibromas on the gingiva. **Oral Oncology**, 43(4):339-344, 2007.

AKKOUCH, A.; ZHANG, Z.; ROUABHIA, M. Engineering bone tissue using human dental pulp stem cells and an osteogenic collagen–hydroxyapatite-poly(–lactide-co-ε-caprolactone) scaffold. **J Biomater Appl**, 28: 922–936, 2014.

AL KAYAL, T.; PANETTA, D.; CANCIANI, B.; LOSI, P.; TRIPODI, M.; BURCHIELLI, S.; OTTONI, P.; SALVADORI, P. A.; SOLDANI, G. Evaluation of the Effect of a Aamma Irradiated DBM-pluronic F127 Composite on Bone Regeneration in Wistar Rat. **PLoS One**, 10:e0125110, 2015.

ALGE, D. L.; ZHOU, D.; ADAMS, L. L.; WYSS, B. K.; SHADDAY, M. D.; WOODS, E. J.; GABRIEL, C.T. M.; GOEBEL, W. S. Donor-matched comparison of dental pulp stem cells and bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a rat model. **J Tissue Eng Regen Med**; 4(1):73-81;2009

ALSBERG, E.; HILL, E. E.; MOONEY, D. J. Craniofacial tissue engineering. **Crit Rev Oral Biol Med**,12(1):64-75, 2001.

AMARAL, I. F.; SOUSA, S. R.; NEIVA, I.; SILVA, L. M.; KIRKPATRICK, C. J.; BARBOSA, M. A.; PEGO, A. P. Kinetics and isotherm of fibronectin adsorption to three-dimensional porous chitosan scaffolds explored by ¹²⁵I-radiolabelling. **Biomatter**. 3(2): e24791, 2013.

AMATUZZI, M. M.; CROCI, A. T.; GIOVANI, A. M. M.; SANTOS, L. A. U. Banco de tecidos: estruturação e normatização. **Rev. Bras. Ortop**. 35(5):165-172, 2000.

AMEYE, L.; ARIA, D.; JEPSEN, K.; OLDBERG, A.; XU, T.; YOUNG, M. F. Abnormal collagen fibrils in tendons of biglycan/fibromodulin-deficient mice lead to gait impairment, ectopic ossification, and osteoarthritis. **FASEB J**, 16(7):673-680, 2002.

AMINI, A. R.; LAURENCIN, C.; NUKAVARAPU, S. P. Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges. **Crit Rev Biomed Eng**. 40(5): 363–408, 2012.

ANTEBI, U.; MATHOR, M. B.; SILVA, A. F.; GUIMARÃES, R. P.; HONDA, E. K. Effects of ionizing radiation on proteins in lyophilized or frozen demineralized human bone. **Rev Bras Ortop**. 51(2):224-230, 2016.

ARAUJO, J. V.; MARTINS, A.; LEONOR, I. B.; REIS, R. L.; NEVES, N. M. Surface controlled biomimetic coating of polycaprolactone nanofiber meshes to be used as bone extracellular matrix analogues. **J Biomater Sci Polym**, 19(10):1261-78. 2008.

AROSARENA, O. Tissue engineering. *Curr Opin Otolaryngol* **Head Neck Surg**, 13(4): 233-241, 2005.

ASHRI, N. Y.; AJLAN, S. A.; ALDAHMAH, A. M. Dental pulp stem cells: Biology and use for periodontal tissue engineering. **Saudi Medical Journal**, 36(12), 1391–1399, 2015.

AUBIN, J. E. Regulation of osteoblast formation and function. **Rev Endocr Metab Disord.** 2: 81-94, 2001.

BARBOZA, C. A. G.; XAVIER, L.; SILVA, G. L. A.; SOARES, D. M.; SILVA, J. S. P. Use of demineralized bone matrix in the repair of bone defects. **Rev Odontol UNESP.** 41(3): 209-214, 2012.

BARRY, F. P.; MURPHY, J. M. Mesenchymal stem cells: clinical application and biological characterization. **Int j Bioch Cell Biol.** 36:568-584, 2004.

BEHR, B.; LEUCHT, P.; LONGAKER, M. Y.; QUERTO, N. Fgf-9 is required for angiogenesis and osteogenesis in long bone repair. **PNAS,** 107(26):11853-11858, 2010.

BENOIT, D. S.; SCHWARTZ, M. P.; DURNEY, A. R.; ANSETH, K. S. Small functional groups for controlled differentiation of hydrogel-encapsulated human mesenchymal stem cells. **Nat Mater,** 7:816-823, 2008.

BERTASSOLI, B. M.; ASSIS NETO, A. C.; OLIVEIRA, F. D.; ARROYO, M. A. M.; FERRÃO, J. S. P.; SILVA, J. B.; PIGNATARI, G. C.; BRAGA, P. B. Mesenchymal stem cells – Emphasis in Adipose Tissue. **Braz Archo Biol Technol.** 56(4): 607-617, 2013.

BERTASSOLI, B. M.; COSTA, E. S.; SOUSA, C. A.; ALBERGARIA, J. D. S.; MALTOS, K. L. M.; GOES, A. M.; MARTINS, T. M. M.; SILVA, G. A. B.; JORGE, E. C. Rat dental pulp stem cells: isolation and phenotypic characterization method aiming bone tissue bioengineering. **Braz Arch Biol Technol,** 59:e16150613, 2016

BOSTROM, M. P. SEIGERMAN, D. A. The clinical use of allografts, demineralized bone matrices, synthetic bone graft substitutes and osteoinductive growth factors: a survey study. **Hosp Sp Surg J,** 1(1): 9-18, 2005.

BUTTERMANN, G. R. Prospective nonrandomized comparison of an allograft with bone morphogenetic proteins versus an iliac-crest autograft in anterior cervical discectomy and fusion. **Spine J,** 8 :426-435, 2008.

CANCEDDA, R.; DOZIN, B.; GIANNONI, P.; QUARTO, R. Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone. **Matrix Biology**, 22:81-91, 2003.

CHEN, B.; LIN, H.; WANG, J.; ZHAO, Y.; WANG, B.; ZHAO, W.; SUN, W.; DAI, J. Homogeneous Osteogenesis and Bone Regeneration by Demineralized Bone Matrix Loading with Collagen-targeting Bone Morphogenetic Protein-2. **Biomaterials** 28: 1027–1035, 2007.

CHEN, B.; LIN, H.; ZHAO, Y.; WANG, B.; ZHAO, Y.; LIU, Y.; LIU, Z.; DAI, J. Activation of Demineralized Bone Matrix by Genetically Engineered Human Bone Morphogenetic Protein-2 with a Collagen Binding Domain Derived from Von Willebrand Factor Propolypeptide. **J. Biomed. Mater. Res., Part A**, 80A:428–434, 2007.

CHEN, K. Y.; SHYU, P. C.; DONG, G. C.; CHEN, Y. S.; KUO, W. W.; YAO, C. H. Reconstruction of calvarial defect using a tricalcium phosphate-oligomeric proanthocyanidins cross-linked gelatin composite. **Biomaterials, Surrey**, 30(9): 1682-1688, 2009.

CHEUNG, H.; LAU, K.; LU, T.; HUI, D. A critical review on polymer-based bio-engineered materials for scaffold development. **Composites Part B**. 38:291-300, 2007.

CHIM, H.; HUTMACHER, D. W.; CHOU, A. M.; OLIVEIRA, A. L.; REIS, R. L.; LIM, T. C.; SCHANTZ, J. T. A comparative analysis of *scaffold* material modifications for load-bearing applications in bone tissue engineering. **Int J Oral Maxillofac Surg**, ;35(10):928-34. 2006

CHUENJITKUNTAWORN, B.; INRUNG, W.; DAMRONGSRI, D.; MEKAAPIRUK, K.; SUPAPHOL, P.; PAVASANT, P. Polycaprolactone/hydroxyapatite composite *scaffolds*: preparation, characterization, and *in vitro* and *in vivo* biological responses of human primary bone cells, **J. Biomed. Mater. Res. A**, 94:241-251, 2010.

CORRALES, L. P.; ESTEVES, M. L.; VICK, J. E. R. Scaffold Design for Bone Regeneration. **J Nanosci Nanotechnol**. 14(1): 15–56, 2014.

COSTA, R. C. C.; MIGUEL, F. B.; ROSA, F. P. Estratégias de bioengenharia tecidual na reconstrução óssea. **R. Ci. méd. biol.** 4(1): 70-76, 2005.

CZEKANSKA, E. M.; STODDART, M. J.; RICHARDS, R. G.; HAYES, J. S. In search of an osteoblast cell model for in vitro research. **Euro Cells Mat**, 24:1-17, 2012.

DAN, Y.; LIU, O.; LIU, Y.; ZHANGM Y. Y.; LI, S.; FENG, X.; SHAO, Z.; YANG, C.; YANG, S. H.; HONG, J. Development of Novel Biocomposite Scaffold of Chitosan-Gelatin/Nanohydroxyapatite for Potential Bone Tissue Engineering Applications. **Nanoscale Res Lett**, 11:487, 2016.

DANTAS, T. S.; LELIS, E. R.; NAVES, L. Z.; FERNANDES-NETO, A. F.; MAGALHÃES, D. Bone Graft Materials and their Application in Dentistry. **R Unopar C C Biol Saúde**, 13(2): 131-135, 2011.

DATTA, N.; HOLTERF, H. L.; SIKURITSAS, V. I.; JANSEN, J. A.; MIKOS, A. G. Effect of bone extracellular matrix synthesized in vitro on the osteoblastic differentiation of marrow stromal cells. **Biomaterials**, 26: 971-977, 2005.

DINOPOULOS, H.; DIMITRIOU, R.; GIANNOUDIS, P. V. Bone grafts: what are the options? **Surgeon**, 10(4): 230–239, 2012.

DISCHER, D. E.; MOONEY, D. J.; ZANDSTRA, P. W. Growth Factors, Matrices, and Forces Combine and Control Stem Cells **Science**, 26(324):1673-1677, 2009.

DOI, Y.; HORIGUSHI, T.; KIM, S. H.; MORIWAKI, Y.; WAKAMATSU, N.; ADACHI, M.; IBARAKI, K.; MORIYAMA, K.; SASAKI, S.; SHIMOKAWA, H. Effects of non-collagenous proteins of the formation of apatite in Ca-b-glycerophosphate solution. **Arch Oral Biol.** 37:15-21. 1992

DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.; KRAUSE, D.; DEANS, R.; KEATING, A.; PROCKOP, D.; HORWITZ, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stem stromal cells: The International Society for Cellular Therapy position statement, **Cytothe**, 8: 315-317, 2006.

DUARTE DA SILVA, A. B.; RODRIGUES, L.; JORGETTI, W.; BESTEIRO, J. M.; FERREIRA, M. C.; GONÇALVES, C. G.; DOS REIS, L. M. Alterações histológicas em enxerto de osso homogêneo preparado e armazenado com duas técnicas diferentes. **Acta Cir Bras.** 15: 74-77, 2000.

ELIAS, C. N.; GRAVINA, P. A.; DE FILHO, C. S.; NASCENTE, P. A. P. Preparation of bioactive titanium surface via fluoride and fibronectin retention. **Int J Biomaterials**, 1-7, 2012.

FERREIRA, L. S.; GERECHT, S.; SHIEH, H. F.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G.; LANGER, R. Bioactive hydrogel scaffolds for controllable vascular differentiation of human embryonic stem cells. **Biomaterials**. 28:2706–2717, 2007.

FONSECA, R. J.; DAVIES, W. H. **Reconstructive preprosthetic oral and maxillofacial surgery**. 2nd ed. New York: W. B. Saunders; 1995.

GIBON, E.; BATKE, B.; JAWAD, M. U.; FRITTON, K.; RAO, A.; YAO, Z.; BISWAL, S.; GAMBHIR, S. S.; GOODMAN, S. B. MC3T3-E1 Osteoprogenitor Cells Systemically Migrate to a Bone Defect and Enhance Bone Healing. **Tissue Eng Part A**. 18(9-10):968-973, 2012.

GOKHALE, P. J.; ANDREWS, P. W. Human embryonic stem cells:10 years on. **Lab Investigation**, 89:259–262, 2009.

GOMES, J. A.; GERALDES MONTEIRO, B.; MELO, G. B.; SMITH, R. L.; CAVENAGHI, P. S.; LIZIER, N. F.; KERKIS, A.; CERRUTI, H.; KERKIS, I. Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of human immature DP stem cells. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, 51, 1408; 2010.

- GRAYSON, W.; FROHLICH, M.; YEAGER, K.; BHUMIRATANA, S.; CHAN, M. E.; CANNIZZARO, C.; WAN, L. Q.; LIU, X. S.; GUO, E.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G. Engineering anatomically shaped human bone grafts. **PNAS**, 107(8):3299–3304, 2010.

-

GRONTHOS, S.; BRAHIM, J.; FISHER, L. W.; CHERMAN, N.; DENBESTEN, P.; ROBEY, P. G.; SHI, S. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. **J. Dent. Res**, 81(8): 531-35, 2002.

GRONTHOS, S.; MANKANI, M.; BRAHIM, J.; ROBEY, P. G.; SHI, S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. **PNAS**, 97(25):3625-3630, 2000.

GRUSKIN, E.; DOLL, B. A.; FUTRELL, F. W.; SCHMITZ, J. P.; HOLLINGER, J. O. Demineralized Bone Matrix in Bone Repair: History and Use. **Adv. Drug Delivery Rev.** 64:1063–1077, 2012.

GUIMARÃES, E. T.; CRUZ, G. S.; DE JESUS, A. A.; LACERDA, C. A. F.; ROGATTO, S. R.; PEREIRA, L. D. A. V.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; SOARES, M. B. Mesenchymal and embryonic characteristics of stem cells obtained from mouse dental pulp. **Arch Oral Biol**, 56(11):1247-1255, 2011.

HANDSCHEL, J.; WIESMANN, H. P.; DEPPRICH, R.; KÜBLER, N. R.; MEYER, U. Cell-based bone reconstruction therapies: cell sources. **Int J Oral Maxillofac Implants**.21(6) :890-898, 2006.

HARMEY, D.; HESSLE, L.; NARISAWA, S.; JOHNSON, K. A.; TERKELTAUB, R.; MILLÁN, J. L. Concerted Regulation of Inorganic Pyrophosphate and Osteopontin by *Akp2*, *Enpp1*, and *Ank* : An Integrated Model of the Pathogenesis of Mineralization Disorders. **Am J Pathol**, 164(4):1199-1209, 2004.

HIPP, J.; ATALA, A. Sources of stem cells for regenerative medicine. **Stem Cell Rev.** 4(1):3-11, 2008.

HOFSTETTER, C. P.; SCHWARZ, E. J.; HESS, D.; WIDENFALK, J. E. L.; MANIRA, A.; PROCKOP, D. J.; OLSON, L. Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery. **Proc Natl Acad Sci**; 99:2199 –2204; 2002

HOLT, D. J.; GRAINGER, D. W. Demineralized Bone Matrix as a Vehicle for Delivering Endogenous and Exogenous Therapeutics in Bone Repair. **Adv. Drug Delivery Rev.** 64,:1123–1128, 2012.

HUTMACHER, D. W.; GARCIA A. J. Scaffold-based bone engineering by using genetically modified cells. **Gene**, 347(1):1-10. 2005.

JARCHO, M. Calcium Phosphate Ceramics as Hard Tissue Prosthetics. **Clin Orthop Rel Res**, 157:259-278, 1981.

KAPLAN, F. S.; SHORE, E. M.; PIGNOLO, R. J.; GLASER, D. L. Animal models of fibrodysplasia ossificans progressive. **Clin. Rev. Bone Min. Met.** 3:229–234, 2005.

KAPLAN, F. S.; GLASER, D. L.; HEBELA, N.; SHORE, E. M. Heterotopic Ossification. **J Am Acad Orthop Surg**, 12(2):116-125, 2004.

KARAGEORGIU, V.; KAPLAN, D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. **Biomaterials.** 26(27):5474-5491, 2005.

KARTSOGIANNIS, V.; NH WHA, K. Cell Lines and Primary Cell Cultures in the Study of Bone Cell Biology. **Mol Cell Endocrinol**, 228(1-2):79-102, 2005.

KEMOUN, P.; LAURENCIN-DALICIEUS, S.; RUE, J.; FARGES, J. C.; GENNERO, I.; CONTE-AURIOL, F. et al. Human dental follicle cells acquire cementoblast features under stimulation by BMP-2/-7 and enamel matrix derivatives (EMD) in vitro. **Cell Tissue Res.** 329(2):283-284, 2007.

KERKIS, I.; AMBROSIO, C. E.; KERKIS, A.; MARTINS, D. S.; ZUCCONI, E.; FONSECA, S. A. S.; CABRAL, R. M.; MARANDUBA, C. M. C.; GAIAD, T. P.; MORINI, A. C.; VIEIRA, N. M.; BROLIO, M. P.; SANTANA, O. A.; MIGLINO, M. A.; ZATZ, M. Early transplantation of human immature DP stem cells from baby teeth to golden retriever muscular dystrophy (GRMD) dogs: Local or systemic? **J Transl Med** 6(35), 2008.

KIM, J.; MCBRIDE, S.; DEAN, D. D.; SYLVIA, V. L.; DOLL, B. A.; HOLLINGER, J. O. *In vivo* performance of combinations of autograft, demineralized bone matrix, and tricalcium phosphate in a rabbit femoral defect model. **Biomedical Materials**, 9(3):035010, 2014.

KIM, S. H.; KIM, K. H.; SEO, B. M.; KOO, K. T.; KIM, T. I.; SEOL, Y. J.; KU, Y.; RHYU, I. C.; LEE, Y. M. Alveolar bone regeneration by transplantation of periodontal ligament stem cells and bone marrow stem cells in a canine peri-implant defect model: a pilot study. **J Periodontol**, 80(11):1815–1823, 2009.

KIM, Y. K.; KIM, S. G.; LIM, S. C.; LEE, H. J.; YUN, P. Y. A clinical study on bone formation using a demineralized bone matrix and resorbable membrane. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. 109: 6-11, 2010.

KIM, Y. K.; YUN, P. Y.; KIM, S. G.; KIM, B. S.; ONG, J. L. Evaluation of sinus bone resorption and marginal bone loss after sinus bone grafting and implant placement. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, 107: 21-28, 2009.

KOMORI, T. Runx2, a multifunctional transcription factor in skeletal development. **J. Cell. Biochem**. 87:1–8, 2002

KRISHNAMURITHY, G.; MURALI, M. R.; HAMDI, M.; ABBAS, A. A.; RAGHAVENDRAN, H. B.; KAMARUL, T. Characterization of bovine-derived porous hydroxyapatite scaffold and its potential to support osteogenic differentiation of human bone marrow derived mesenchymal stem cells. **Ceramics Intern**. 40(1):771–777, 2014.

KRISHNAMURITHY, G.; MURALI, M. R.; M.HAMDI, M.; ABBAS, A. A.; RAGHAVENDRAN, H. B.; KAMARUL, T. Characterization of bovine-derived porous hydroxyapatite *scaffold* and its potential to support osteogenic differentiation of human bone marrow derived mesenchymal stem cells. **Ceramics International**, 40:771–777, 2014.

LANGER, R.; VACANTI, J. P. Tissue Engineering. **Science**. 14(260):920-926, 1993.

LAWRENCE, B. J.; MADIHALLY, S. V. Cell colonization in degradable 3D porous matrices. **Cell Adh Migr.** 2(1):9-16, 2008.

LEONETTI, J. A.; KOUP, R. Localized maxillary ridge augmentation with a block allograft for dental implant placement: case reports. **Implant Dent.** 12(3):217-226, 2003.

LIU, Y.; XU, F.; PEI, H. X.; ZHU, X.; LIN, X.; SONG, C. Y.; LIANG, Q. H.L LIAO, E. Y.; YUAN, L. Q. Vaspin regulates the osteogenic differentiation of MC3T3-E1 through the PI3K-Akt/miR-34c loop. **Sci Rep**, 6: 25578, 2016.

MANO, J. F.; SILVA, G. A.; AZEVEDO, H. S.; MALAFAYA, P. B.; SOUSA, R. A.; SILVA, S. S.; BOESEL, L. F.; OLIVEIRA, J. M.; SANTOS, T. C. MARQUES, A. P.; NEVES, N. M. REIS, R. L. Natural origin biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine: present status and some moving trends. **J. R. Soc. Interface**, 4(17):999- 1030, 2007.

MARTINEZ, S. D.; SASAKI, R. T.; NEVES, A. D.; DA SILVA, M. C. Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth: A Growing Literature. **Cells Tissues Organs.** 202(5-6):269-280, 2016.

MAUNEY, J. R.; BLUMBERG, J.; PIRUN, M.; VOLLOCH, V.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G.; KAPLAN, D. L. Osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells on partially demineralized bone *scaffolds in vitro*. **Tissue Eng**,10:81-92, 2004.

MAUNEY, J. R.; LAUDE JAQUIERY, C.; VOLLOCHA, V.; HEBERER, M.; MARTIN, I.; KAPLAN, D. L. *In vitro* and in vivo evaluation of differentially demineralized cancellous bone *scaffolds* combined with human bone marrow stromal cells for tissue engineering. **Biomaterials** 26:3173-3185, 2005.

MAUNEY, J. R.; LAUDE JAQUIERY, C.; VOLLOCHA, V.; HEBERER, M.; MARTIN, I.; KAPLAN, D. L. *In vitro* and in vivo evaluation of differentially demineralized cancellous bone *scaffolds* combined with human bone marrow stromal cells for tissue engineering. **Biomaterials** 26:3173-3185, 2005.

MAUNEY, J. R.; SJOSTROM, S.; BLUMBERG, J.; HORAN, R.; O'LEARY, J. P.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G.; VOLLOCH, V.; KAPLAN, D. L. Mechanical stimulation promotes osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells on 3-D partially demineralized bone *scaffolds in vitro*. **Calcif Tissue Int.** 74:458–68, 2004.

MAZZONETTO, R.; NETTO, H. D.; NASCIMENTO, F. Reconstruções alveolares utilizando blocos ósseos. In: **Enxertos ósseos em Implantodontia**. Nova Odessa: Napoleão; 2012.

MEIJER, G. J.; BRUIJN, J. D.; KOOLE, R.; VAN BLITTERSWIJK, C. A. Cell-based bone tissue engineering. **Plos Medicine**, 4:260-263. 2007.

MENDEZ-OTERO, R.; FREITAS, G. R.; ACNDRE, C.; MENDONÇA, M. L. F.; FRIEDRICH, M.; OLIVEIRA-FILHO, J. Potential Roles of Bone Marrow Stem Cells in Stroke Therapy. **Regen Med**, 2(4):417-423, 2007.

MENDEZ-OTERO, R.; ZAVERUCHA-DO-VALE, C.; GUBERT, F.; FREITAS, G. R.; SANTIAGO, M. F. Regulation and function of neurogenesis in the adult vertebrate brain. **Brazilian J Med Biol Research**, 38:1553-1559, 2005.

MENICANIN, D.; MROZIK, K. M.; WADA, N.; MARINO, V.; SHI, S.; BARTOLD, P. M.; GRONTHO, S. Periodontal-ligament-derived stem cells exhibit the capacity for long-term survival, self-renewal, and regeneration of multiple tissue types in vivo. **Stem Cells Dev.** 23(9):1001–1011, 2014.

MEYER, U.; BÜCHTER, A.; WIESMANN, H. P.; JOOS, U.; JONES, D. B. Basic reactions of osteoblasts on structured material surfaces. **Eur Cell Mater**, 9:39-49, 2005.

MEYER, U.; JOOS, U.; WIESMANN, H. P. Biological and biophysical principles in extracorporal bone tissue engineering. Part I. **Int J Oral Maxillofac Surg**, 33(4):325-32, 2004

MIKAMI, Y.; TAKAHASHI, T.; KATO, S.; TAKAGI, M. Dexamethasone promotes DMP1 mRNA expression by inhibiting negative regulation of Runx2 in multipotential mesenchymal progenitor, ROB-C26. **Cell Biology International** 32(2):239-246, 2007

MIRANDA, C. C. S.; SILVA, A. B. G.; MENDES, R. M.; ABREU, F. N.; CALIARI, M. V.; ALVES, J. B.; GOES, A. M. Mesenchymal stem cells associated with porous chitosan-gelatin scaffold: A potential strategy for alveolar bone regeneration. **J Biomed Mat Res Part A**, 100A:2775-2786, 2012.

MONTEIRO, B. G.; SERAFIM, R. C.; MELO, G. B.; SILVA, M. C.; LIZIER, N. F.; MARANDUBA, C. M.; SMITH, R. L.; KERKIS, A.; CERRUTI, H.; GOMES, J. A.; KERKIS, I. Human immature DP stem cells share key characteristic features with limbal stem cells. **Cell Prolif**, 42, 587, 2009.

MOSHAVERINIA, A.; CHEN, C.; XU, X.; AKIYAMA, K.; ANSARI, S.; ZADEH, H. H.; SHI, S. Bone regeneration potential of stem cells derived from periodontal ligament or gingival tissue sources encapsulated in RGD-modified alginate scaffold. **Tissue Eng Part A**. 20(3-4):611-621, 2014.

MUNDLOS, S.; OTTO, F.; MUNDLOS, C.; MULLIKEN, J. B.; AYLSWORTH, A. S.; ALBRIGHT, S.; LINDHOUT, D.; COLE, W. G.; HENN, W.; KNOLL, J. H.; OWEN, M. J.; MERTELSMANN, R.; ZABEL, B. U.; OLSEN, B. R. Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia **Cell, this issue**. 30;89(5):773-779, 1997

MURPHY, C. M.; HAUGH, M. G.; O'BRIEN, F. J. The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**. 31(3):461-466, 2010.

NEČAS, A.; PLÁNKA, L.; SRNEC, R.; RAUŠER, P.; URBANOVÁ, L.; LORENZOVÁ, J.; CRHA, M.; JANČÁŘ, J.; GÁL, P. Use of biomaterials and stem cells in the treatment of articular cartilage, meniscal, physeal, bone, ligamentous and tendineous defects. **Acta Vet Brno**. 77:277-284, 2008.

NÓIA, C. F.; PINTO, J. M. V.; SÁ, B. C. M.; MORAES, P. H.; LOPES, R. O. Clinical considerations for optimizing results in bone grafting: Part I. **Dental Press Implantol.** 8(3):96-108, 2014.

NOOEAIID, P.; SALIH, V.; BEIER, J. P.; BACCOCCINI, A. R. Osteochondral tissue engineering: scaffolds, stem cells and applications. **J. Cell. Mol. Med.** 16(10):2247-2270, 2012.

OLIVEIRA, L. S. A. F.; OLIVEIRA, C. S.; MACHADO, A. P. L.; ROSA, F. P. Biomaterials for bone regeneration – Methods of analyses and future perspectives. **R. Ci. méd. biol.** 9(Supl.1):37-44, 2010.

OTTO, F.; THORNELL, A. P.; CROMPTON, T.; DENZEL, A.; GILMOUR, K. C.; ROSEWELL, I. R.; STAMP, G. W.; BEDDINGTON, R. S.; MUNDLOS, S.; OLSEN, B. R.; SELBY, P. B.; OWEN, M. J. *Cbfa1*, a candidate gene for the Cleidocranial Dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. **Cell, this issue.** 30;89(5):765-771, 1997.

PADOVAN, L. E. M.; MANFRON, A. P.; SAMPAIO, A. L.; SILVEIRA, B. M.; SIQUEIRA, R. A.; CLAUDINO, M. Aplicabilidade dos enxertos em bloco de origem autógena e xenógena nas reconstruções ósseas. **Jornal ILAPEO**, 6(2):58-63, 2012.

PAMULA, E.; BACAKOV, L.; FILOVA, E.; BUCKZYNSKA, J.; DOBRZYNSKI, P.; NOSKOVA, L.; GRAUSOV, L. The influence of pore size on colonization of poly(L-lactide-glycolide) scaffolds with human osteoblastlike MG 63 cells in vitro. **J Mater Sci Med.** 19. 425-435, 2008.

PAPACCIO, G.; GRAZIANO, A.; DAQUINO, R.; GRAZIANO, M. F.; PIROZZI, G.; MENDITTI, D.; DE ROSA, A.; CARINCI, F.; LAINO, G. Long-Term cryopreservation of dental pulp stem cells (SBPDPSCs) and their differentiated osteoblasts: a cell source for tissue repair. **J Cell Physiol**, 208:319-25, 2006.

PEREZ, R. A.; SEO, S. J.; WON, J. E.; LEE, E. J.; JANG, J. H.; KNOWLES, J. C.; KIM, H. W. Therapeutically relevant aspects in bone repair and regeneration. **Materials Today**, 18(10):573-589, 2015.

PERRY, B. C.; ZHOU, D.; WU, X.; YANG, F. C.; BYERS, M. A.; CHU, T. M.; HOCKEMA, J. J.; WOODS, E. J.; GOEBEL, W. S. Collection, cryopreservation, and characterization of human dental pulp-derived mesenchymal stem cells for banking and clinical use. **Tissue Eng Part C Methods**. 14(2):149-56; 2008.

PIKOS, M. A. Block autografts for localized ridge augmentation: part II. The posterior mandible. **Implant Dent**. 9(1):67-75. 2000.

PUPPI, D.; CHIELLINI, F.; PIRAS, A. M.; CHIELLINI, E. Polymeric materials for bone and cartilage repair. **Progress Poly Sci**, 35:403-440, 2010.

RAVINDRAN, S.; HUANG, C. C.; GAJENDRAREDDY, P.; NARAYANAN, R. Biomimetically Enhanced Demineralized Bone Matrix for Bone Regenerative Applications. **Front. Physiol**. 6:292, 2015.

REY CUBILLOS, J.; A.; LAREO, L.; GUTIÉRREZ, S.; CORREDOR, M. G. Fosfatasa alcalina (alp) y runx2 en cultivos celulares de osteoblastos estimulados con campo eléctrico. **Rev. Fac. Med**, 20(2):14-20, 2012.

RODRIGUES, A. Z.; OLIVEIRA, P. T.; NOVAES JR, A. B.; MAIA, L. P.; SOUZA, S. L. S.; PALIOTO, D. B. Evaluation of in vitro human gingival fibroblast seeding on acellular dermal matrix. **Braz Dental Journal**. 21(3): 179-189, 2010.

RODRIGUEZ, R. U.; KEMPER, N.; BREATHWAITE, DUTTA, S. M.; HSU, E. L.; HSU, W. K.; FRANCIS, M. P. Demineralized Bone Matrix Fibers Formable as General and Custom 3D Printed Mold-Based Implants for Promoting Bone Regeneration. **Biofabrication**, 8(3):035007, 2016.

ROOHANI-ESFAHANI, S. I.; NOURI-KHORASANI, S.; LU, Z.; APPELYARD, R.; ZREIQAT, H. The influence hydroxyapatite nanoparticle shape and size on the properties

of biphasic calcium phosphate *scaffolds* coated with hydroxyapatite-PCL composites, **Biomaterials**, 31:5498-509, 2010.

ROOS, M.V.; MICHELIN A.F., CAMISA JR, A. Procedimentos de um banco de ossos e aplicabilidade dos enxertos por ele proporcionados. **Acta Ortop Bras**, 8(3):122-127, 2000.

ROSA, D. S.; CHIOVATTO NETO, I.; CALIL, M. R.; PEDROSO, A. G.; FONSECA, C. P.; NEVES, S. Evaluation of the Thermal and Mechanical Properties of Poly(ϵ -caprolactone), Low-Density Polyethylene, and Their Blends. *Journal of Applied Polymer Science*. 91(6):3909–3914, 2004.

ROSE, F. R.; OREFFO, R. O. Bone tissue engineering: hope vs hype. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, 292:, 1-7, 2002.

ROSENBAUM, A. J.; GRANDE, D. A.; DINES, J. S. The use of mesenchymal stem cells in tissue engineering: a global assessment. **Organogenesis**. ;4(1):23-27, 2008.

RUST, P. A.; KOLSI, P.; BRIGGS, T. W.; CANNON, S. R.; BLUNN, G. W. Will mesenchymal stem cells differentiate into osteoblasts on allografts? **Clin Orthop Relat Res**, 457:220-226, 2007.

RUST, P. A.; KOLSI, P.; BRIGGS, T. W.; CANNON, S. R.; BLUNN, G. W. Will mesenchymal stem cells differentiate into osteoblasts on allografts? **Clin Orthop Relat Res**, 457:220-226, 2007.

SALGADO, A. J., COUTINHO, O. P., REIS, R. L. Bone Tissue Engineering: State of the Art and Future Trends. **Macromolecular Bioscience**, 4:743–765, 2004.

SAVITZ, S. I.; ROSENBAUM, D. M.; DINSMORE, J. H.; WECHSLER, L. R.; CAPLAN, L. R.; Cell transplantation for stroke. **Ann Neurol**. 52(3): 266-75, 2002.

SHEN, G. The role of type X collagen in facilitating and regulating endochondral ossification of articular cartilage. **Orthod Craniofacial Res**, 8:11-17, 2005.

SIGGELKOW, H.; REBENSTORFF, K.; KURRE, W.; NIEDHART, C.; ENGEL, I. SC HULZ, H.; ATKINSONM, J.; HUFNER, M. Development of the osteoblast phenotype in primary human osteoblasts in culture: Comparison with rat calvarial cells in osteoblast differentiation. **J. Cell. Biochem.** 75:22–35, 1999.

SOARES, A. P.; KNOP, L. A. H.; JESUS, A. A.; ARAUJO, T. M. Células tronco em odontologia. **R Dental Press Ortodon Ortop Facial**, 12(1): 33-40, 2007.

SOBREIRA, T.; MAIA, F. B. M.; PALITÓ, A. P. P. G.; GALDINO, A. D. S. E; MORAIS, F. R. D. Enxerto Ósseo Homógeno para Reconstrução de Maxila Atrófica. **R Cirur Traum Buco-maxilo-facial**, 11(1):21-25, 2011.

SUDO, H.; KODAMA, H. A.; AMAGAI, Y.; YAMAMOTO, S.; KASAI, S. In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. **J Cell Biol.** 96(1):191-198, 1983.

THEIN-HAN, W. W.; MISRA, R. D. Biomimetic chitosan-nanohydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. **Acta Biomater.** 5(4):1182-1197, 2009.

TOLLEMAR, V.; COLLIER, Z. C.; MOHAMMED, M. K.; LEE, M. J.; AMEER, G. A.; RUSSELL, R. Reid Stem cells, growth factors and scaffolds in craniofacial regenerative medicine. **Genes & Diseases**, 3(1): 56-71, 2015.

TOLLEMAR, V.; COLLIER, Z.; MOHAMMED, M. K.; LEE, M. J.; AMEER, G. A.; REID, R. R. Stem cells, growth factors and scaffolds in craniofacial regenerative medicine. **Genes & Diseases**, 3(1):56-71, 2016.

TRAIANEDES, K.; RUSSELL, J. L.; EDWARDS, J. T.; STUBBS, H. A.; SHANAHAN I. R.; KNAACK D. Donor age and gender effects on osteoinductivity of demineralized bone matrix. **J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.** 70, 21–29, 2004.

URIST, M. R.; STRATES, B. S. Bone morphogenetic protein. **J Dent Res**, 50(6):1392-1406, 1971.

VIATEAU, V.; GUILLEMIN, G.; BOUSSON, V.; OUDINA, K.; HANNOUCHE, D.; SEDEL, L.; LOGEART-AVRAMOGLU, D.; PETITE, H. Long-bone critical-size defects treated with tissue-engineered grafts: a study on sheep. **J Orthop Research**. 22:741-749, 2007.

WANG, S. J.; JILIANG, D.; ZHANG, Z. Z.; HUANG, A. B.; QI, Y. S.; WANG, H. J.; ZHANG, Y.; YU, J. K. Chondrogenic Potential of Peripheral Blood Derived Mesenchymal Stem Cells Seeded on Demineralized Cancellous Bone Scaffolds. **Scientific Reports**. 6:36400, 2016.

WEISSMAN, I. L. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. **Cell**, 100: 157-168, 2000.

WEN, T. A.; ARONOW, M.; SHALHOUB, V.; BARONE, L. M.; WILMING, L.; TASSINARI, M. S.; KENNEDY, M. B.; POCKWINSE, S.; LIAN, J. B.; STEIN, G. S. Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. **J Cell Physiol**. 143(3):420-430, 1990.

WILLIAMS, D. F. **Definitions in Biomaterials. Proceedings of a Consensus Conference of the European Society for Biomaterials**, Chester, England, March 3-5, 1986.

WILTFANG, J.; KLOSS, F. R.; KESSLER, P.; NKENKE, E.; SCHULTZE-MOSGAU, S.; ZIMMERMANN, R.; SCHLEGEL, K. A. Effects of platelet-rich plasma on bone healing in combination with autogenous bone and bone substitutes in critical-size defects. An animal experiment. **Clin Oral Imp Res**, 15(2):187-193, 2004.

WOBUS, A. M.; BOHELER, K. R. Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. **Physiological Reviews**, 85, 2005.

ZABEU, J. L. A.; MERCADANTE, M. T. Bone graft substitutes compared to autologous bone graft in orthopedic surgery – Systematic literature review. **Rev Bras Ortop**.;43(3):59-68, 2008

ZHANG, Y.; WANG, J.; WANG, J.; NIU, X.; LIU, J.; GAO, L.; ZHAI, X.; CHU, K.; Preparation of porous PLA/DBM composite biomaterials and experimental research of repair rabbit radius segmental bone defecteSpringer. **Cell Tissue Bank**. 16(4):615-622, 2015.

ZHENG, Y.; LIU, Y.; ZHANG, C. M.; ZHANG, H. Y.; LI, W. H.; SHI, S.; .LE, A. D.; WANG, S. L. Stem cells from deciduous tooth repair mandibular defect in swine. **J Dent Res**, 88(3):249–254, 2009.

ZHU, L.; LIU, W.; CUI, L.; CAO, Y. Tissue-engineered bone repair of goat-femur defects with osteogenically induced bone marrow stromal cells. **Tissue Eng**, 12(3):423-433, 2006.

ANEXOS



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 288 / 2013, relativo ao projeto intitulado "Osso humano x osso bovino: qual o melhor scaffold para bioengenharia tecidual óssea?", que tem como responsável Erika Cristina Jorge, 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 03/12/2013. Este certificado espira-se em 03/12/2018.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 288 / 2013, related to the Project entitled "Human and bovine bone: which one is the best scaffold for bone tissue bioengineering?", under the supervision of Erika Cristina Jorge, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 03/12/2013. This certificate expires in 03/12/2018.

FRANCISNETE GRACIANE ARAUJO MARTINS

Coordenador(a) da CEUA/UFMG
Belo Horizonte, 03/12/2013.

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



**Banco de Tecidos Músculo Esqueléticos
Universidade de Marília**

TERMO DE COMPROMISSO

Eu, Gerluza Aparecida Borges Silva, RG:M2-995547, CPF: 665499226-15, (pesquisadora/professora), residente a Rua Castelo de Belmonte, 347 - Bairro Castelo, no município de Belo Horizonte, orientarei e serei responsável pelo trabalho de pesquisa intitulado: "Osso humano/osso bovino: Qual melhor *scaffold* para a bioengenharia tecidual óssea?", dentro do Programa de Pós Graduação em Biologia Celular a nível de doutorado no Instituto de Ciências Biológicas, pertencente à Universidade Federal de Minas Gerais, utilizando o seguinte material fornecido pelo UNIOSS - BANCO DE OSSOS: Blocos de ossos córtico medular.

Igualmente, firmo os seguintes compromissos:

(a) o material fornecido não será utilizado para fins ou interesses comerciais;

(b) o material fornecido não será repassado para outra finalidade ou para utilização em outra pesquisa sem a devida autorização dos responsáveis do UNIOSS - BANCO DE OSSOS;

(c) todo material de divulgação dos resultados da pesquisa constará de citação no texto do trabalho e/ou como agradecimento no artigo, tese ou dissertação o nome UNIOSS - BANCO DE OSSOS;

(d) disponibilização de todo o material de divulgação dos resultados desta pesquisa ao setor científico do UNIOSS - BANCO DE OSSOS.

Estou ciente destes compromissos e da Lei Portaria GM 2600 de 21/10/2009, Artigo 156, e que o NÃO cumprimento de qualquer destes, inviabilizará o fornecimento de materiais e parcerias com o UNIOSS - BANCO DE OSSOS.

Belo Horizonte, 17 de dezembro de 2014

Dra. Gerluza A. B. Silva
PROF.ª DEPTO. MORFOLOGIA
ICB/UFMG

Gerluza A. Borges Silva

Assinatura do(a) pesquisador(a) responsável

Nome: Gerluza Aparecida Borges Silva

Fones: (31) 3409-3033

e-mail: gerluzab@gmail.com