

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular/Departamento de Bioquímica e Imunologia e no Laboratório de Biologia do Desenvolvimento/Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, com apoio financeiro da FAPEMIG.

*“O que move o mundo não são as respostas,
mas sim as perguntas”*

Agradecimentos

Agradeço a DEUS, fonte de tudo e todos, pelo Dom da vida, por poder encerrar mais esta etapa.

Aos meus pais, meus exemplos de sabedoria, dignidade, humanidade, pelo apoio incondicional em todas as etapas da minha vida.

Ao meu orientador, Professor Alfredo Goes, pelos os ensinamentos, apoio e estímulo para execução desta tese.

À minha co-orientadora, Professora Gerluza Aparecida Borges Silva, por tudo... pelo acolhimento em seu laboratório, por toda a orientação e atenção.

Ao Eduardo, pelo amor, cumplicidade e companheirismo durante esses anos difíceis!

Ao Renato Mendes, por toda a paciência, disponibilidade, auxílio e apoio; pela viabilização dos procedimentos cirúrgicos.

À Carolina Barcelos Machado e à Rafaela Chitarra Rodrigues Hell por tudo que me ensinaram.

A Estéfane Lorraine pela incansável ajuda, em todas as horas e a qualquer momento, por fazer renascer em mim a esperança nas próximas gerações.

À Silviene Novikoff, ao Alexander Pedrosa, à Paula Castanheira obrigada pelo imenso apoio, indispensável para a realização deste trabalho!

À Iraídes, pelo apoio durante todo o curso.

Aos amigos e colegas dos Laboratórios de Imunologia Celular e Molecular e de Desenvolvimento, o “*et al.*” indispensável e extremamente agradável para que este trabalho fosse realizado.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1:	Estrutura química da quitosana.....	23
FIGURA 2:	Genotipagem dos ratos Lewis transgênicos eGFP.....	38
FIGURA 3:	Imagens de matrizes de quitosana-gelatina nos poços de placas de cultura. Fase de secagem do biomaterial.....	42
FIGURA 4:	Desenho esquemático dos experimentos <i>in vitro</i>	49
FIGURA 5:	Imagens do preparo dos animais para o procedimento cirúrgico.....	53
FIGURA 6:	Representação esquemática do modelo experimental e implantes nos alvéolos dentários de ratos.....	54
FIGURA 7:	Método de Análise morfométrica utilizando imagens obtidas por TCCB.....	57
FIGURA 8:	Caracterização macroscópica da matriz 3D e padronização dos fragmentos implantados/transplantados.....	62
FIGURA 9:	Caracterização morfológica da matriz 3D por Microscopia eletrônica de varredura e confocal.....	63
FIGURA 10:	Análise de elementos químicos da superfície da quitosana-gelatina, obtida pelas análises EDS e XRD.....	65
FIGURA 11:	Caracterização fenotípica das CTMMO.....	67
FIGURA 12:	Análise da Redução do MTT	69
FIGURA 13:	Análise do Ensaio da atividade de fosfatase alcalina.....	71
FIGURA 14:	Fotomicrografias de microscopia de luz (ML) representativas de culturas 3D de CTMMO, em meio MB/MO, após 1 dia de cultura.....	73
FIGURA 15:	Fotomicrografias representativas de MEV de culturas 3D de CTMMO, em meio MB/MO, após 1 dia de cultura.....	74
FIGURA 16:	Fotomicrografias de microscopia de luz (ML) representativas de culturas 3D de CTMMO, em meio MB/MO, após 3 dias de cultura.....	76

FIGURA 17:	Fotomicrografias representativas de MEV de culturas 3D de CTMMO, em meio MB/MO, após 3 dias de cultura.....	77
FIGURA 18:	Fotomicrografias de microscopia de luz (ML) representativas de culturas 3D de CTMMO, em meio MB/MO, após 8 e 14 dias de cultura.....	79
FIGURA 19:	Fotomicrografias representativas de MEV de culturas 3D de CTMMO, em meio MB/MO, após 8 e 14 dias de cultura.....	80
FIGURA 20:	Análises de EDS nas culturas 3D de CTMMO, após de três dias de cultura.....	81
FIGURA 21:	Fotomicrografias representativas da análise histológica <i>in vivo</i> – 5 dias após implante do biomaterial sem células. HE.....	83
FIGURA 22:	Fotomicrografias representativas da análise histológica <i>in vivo</i> – 21 dias após implante do biomaterial sem células. HE.....	85
FIGURA 23:	Fotomicrografias representativas da análise histológica <i>in vivo</i> – 35 dias após implante do biomaterial sem células. HE.....	87
FIGURA 24:	Análise morfométrica do reparo ósseo utilizando imagens obtidas por TCCB após 5, 21 e 35 dias do implante.....	89
FIGURA 25:	Fotomicrografias representativas da análise histológica <i>in vivo</i> – 5 dias após implante do construto (biomaterial+células). HE.....	91
FIGURA 26:	Fotomicrografias representativas da análise histológica <i>in vivo</i> – 21 dias após implante do construto (biomaterial+células). HE.....	92
FIGURA 27:	Reação citoquímica TRAP em células gigantes multinucleadas, aos 21 dias.....	94

FIGURA 28:	Fotomicrografias representativas da análise histológica <i>in vivo</i> – 35 dias após implante do construto (biomaterial+células). HE.....	97
FIGURA 29:	Controle positivo para reações imunohistoquímicas <i>in vivo</i>	100
FIGURA 30:	Análise imunohistoquímica após 5 dias de transplante.....	101
FIGURA 31:	Análise imunohistoquímica após 21 dias de transplante....	103
FIGURA 32:	Análise imunohistoquímica após 35 dias de transplante....	105

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Distribuição dos animais em grupos experimentais, para análise histológica e morfométrica.	39
TABELA 2: Resultados morfométricos por TCCB: Proporção de preenchimento por osso neoformado através da avaliação pela escala de cinza.....	96

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

ABI	áreas de baixa intensidade
AE	área de estudo
ATA	área total do alvéolo
2D	bidimensional
3D	tridimensional
BCIP	bromo-cloro-indol fosfato
BMSC	bone marrow stem cell
Co	controle
CBCT	cone beam computed tomography
CTMMO	células-tronco mesenquimais de medula óssea
CTM	células-tronco mesenquimais
CT	células-tronco
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CD	cluster of differentiation, grupamento de diferenciação
CH-G	quitosana-gelatina
CO	controle negativo
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DRX/XRD	difração de raios x
EDS	espectroscopia de energia dispersiva
EDTA	<i>ethylenediaminetetraacetic acid tetrasodium salt dihydrate</i>
eGFP	<i>enhanced Green fluorescent protein</i>
EM	espaço medular
Exp	experimental
FNT	formalina neutra tamponada
HE	hematoxilina e eosina
LM	light microscopy
LP	ligamento periodontal
MB	meio de cultura basal
MC	microscopia confocal
MEC	matriz extracelular
ML	microscopia de luz
MO	meio de cultura com estímulo osteogênico

MP	membrana periodontal
MTT	brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio] ou metiltetrazol
NBT	nitrobluetetrazol
OI	osso imaturo
OM	osso maduro
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , salina tamponada com fosfato
PMN	polimorfonuclear
RRRC	<i>Rat Resource and Research Center</i>
SEM	scanning electron microscopy
SFB	soro fetal bovino
TC	tecido conjuntivo
TCCB	tomografia computadorizada Cone Beam
TRAP	<i>tartrate-resistant acid phosphatase staining</i>
XRD	x-ray diffraction
WT	<i>wild type</i> , tipo selvagem

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1. Engenharia de tecidos.....	18
2.2. Biomateriais.....	19
2.2.1. Quitosana e gelatina como matéria-prima de matrizes tridimensionais para engenharia de tecidos.....	22
2.3. Células-tronco.....	26
2.4. Biologia do processo de cicatrização alveolar.....	29
2.5. Defeitos ósseos alveolares	31
3. OBJETIVOS	34
4. MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1. Animais doadores, receptores e grupos experimentais.....	36
4.2. Obtenção das matrizes 3D de quitosana e gelatina.....	40
4.2.1. Síntese das matrizes 3D de quitosana e gelatina.....	40
4.2.2. Caracterização das matrizes 3D de quitosana e gelatina.....	42
4.3. ESTUDO <i>IN VITRO</i>	44
4.3.1. Meios de cultura.....	44
4.3.1.1. Meio de cultura basal.....	44
4.3.1.2. Meio de cultura osteogênico.....	45
4.3.2. Isolamento e cultivo das CT Mesenquimais de Medula Óssea.....	45
4.3.3. Caracterização fenotípica das CTMMO por citometria de fluxo.....	46
4.3.4. Culturas 2D e 3D.....	48
4.3.5. Análises das culturas 2D e 3D.....	49
4.3.5.1. Teste de conversão de MTT.....	49
4.3.5.2. Avaliação da atividade de fosfatase alcalina.....	50

4.3.5.3. Análise morfológica.....	52
4.4. ESTUDO <i>IN VIVO</i>	52
4. 4. 1. Procedimento cirúrgico para implante do biomaterial/ transplante do construto.....	52
4.4.2. Análise morfométrica por meio de tomografia computadorizada.....	55
4.4.3. Análise histológica e coloração por TRAP.....	58
4.4.4. Análise imunohistoquímica.....	59
4.5. Análise estatística.....	60
5. RESULTADOS	61
5.1. Caracterização das matrizes 3D de quitosana e gelatina.....	61
5.2. Caracterização das CTMMO.....	66
5.3. Análises <i>in vitro</i>	68
5.3.1. Teste de conversão de MTT.....	68
5.3.2. Avaliação da atividade de fosfatase alcalina.....	70
5.3.3. Análise morfológica.....	72
5.4. Análises <i>in vivo</i>	82
5.4.1. Análise histológica.....	82
5.4.1.1. Implante de matrizes porosas de quitosana e gelatina.....	82
5.4.1.2. Transplante de CTMMO em matrizes porosas de quitosana e gelatina	88
5.4.2. Análise morfométrica.....	95
5.4.3. Análise imunohistoquímica.....	98
6. DISCUSSÃO	105
7. CONCLUSÃO	114
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	115
9. ANEXO	123

Resumo

A associação de células-tronco e biomateriais representa uma alternativa promissora para reconstruções ósseas. No presente estudo, avaliou-se o comportamento *in vitro* e *in vivo* de células-tronco mesenquimais de medula óssea de ratos, cultivadas em uma matriz tridimensional de quitosana e gelatina. Essa matriz foi sintetizada e caracterizada química (energia dispersiva de raios-x - EDS e difração de raios-x - XRD) e morfológicamente (microscopia de luz - ML, microscopia eletrônica de varredura - MEV e microscopia confocal). Células-tronco mesenquimais de medula óssea (CTMMO), obtidas de ratos Lewis transgênicos para eGFP (*Enhanced green fluorescent protein*), foram semeadas nas matrizes. Os experimentos *in vitro* e *in vivo* foram realizados com células-tronco mesenquimais marcadas endogenamente com eGFP (*Enhanced green fluorescent protein*), extraídas de ratos transgênicos isogênicos da linhagem Lewis-eGFP positivos (Universidade de Missouri – EUA) e ratos Lewis WT eGFP negativos foram, posteriormente, usados como receptores, para permitir o monitoramento do destino das células transplantadas *in vivo*, por meio da técnica imunohistoquímica. As matrizes sintetizadas foram também avaliadas *in vitro* quanto à biocompatibilidade (análises de conversão de MTT, atividade de fosfatase alcalina e morfológica, por meio de ML e MEV) e comparou-se o comportamento das células (colonização, adesão, “proliferação” e diferenciação osteogênica) em culturas bi e tridimensionais mantidas em meio basal (DMEM) e em meio osteogênico (DMEM acrescido de suplementos osteogênicos). Na avaliação *in vivo*, trinta e dois ratos machos selvagens foram usados como recipientes para o implante da matriz (n=16) ou para o transplante do construto (n=16) e empregou-se o modelo de alvéolos dentários de ratos. Sendo assim, após a exodontia dos primeiros molares superiores, as matrizes/construtos foram implantados nos alvéolos dentários esquerdos de ratos receptores, Lewis *Wild Type*. Os alvéolos contralaterais foram utilizados como controles. Os animais, ratos Lewis (n=16) de cada grupo experimental, foram eutanasiados 5, 21 e 35 dias após a cirurgia. O comportamento, a biodegradação e biocompatibilidade da matriz após implante foram avaliados histologicamente, por meio de microscopia de luz, nos três períodos experimentais. Os implantes dos

construtos (biomaterial + CTMMO cultivadas em meio basal por 3 dias) também foram avaliados nos três períodos experimentais. Realizou-se a análise morfométrica, para quantificação do preenchimento ósseo dos alvéolos experimentais, lado esquerdo, e controles, lado direito, nos períodos de 5, 21 e 35 dias após a cirurgia, por meio de tomografia computadorizada *cone beam* (TCCB). Rastreou-se o destino das células-tronco eGFP-positivas transplantadas, por análise imunohistoquímica, com uso de anticorpos anti-GFP. Os resultados *in vivo* revelaram alta biocompatibilidade e lenta biodegradação da matriz. A morfometria mostrou um aumento significativo da mineralização óssea nos alvéolos transplantados após 21 e 35 dias. A imunohistoquímica revelou a contribuição de CTMMO para os reparos ósseo, epitelial e vascular. As matrizes de quitosana e gelatina apresentaram propriedades físico-químicas e biológicas adequadas para a utilização como material de preenchimento, como carreador de células-tronco e para a reconstituição de tecidos ósseos por meio da engenharia tecidual. Os resultados mostraram que a matriz de quitosana e gelatina é um biomaterial promissor para o carregamento de CTMMO e que o construto obtido (matriz de quitosana e gelatina-CTMMO) pode ser uma estratégia viável para engenharia de tecido ósseo em Odontologia.

Descritores: quitosana-gelatina, células-tronco mesenquimais de medula óssea; engenharia de tecidos, alvéolos dentários.

Abstract

The association of stem cells and biomaterials is a promising alternative for bone reconstruction. In the present study, the *in vitro* and *in vivo* behavior of the mesenchymal stem cells from rat bone marrow cultured in a chitosan and gelatin tridimensional matrix. This matrix was synthesized and characterized chemical (energy dispersive x-rays - EDS, x-ray diffraction - XRD) and morphologically (light microscopy, scanning electron microscopy and confocal microscopy). Mesenchymal stem cells from bone marrow (BMSC) obtained from Lewis rats transgenic for eGFP (enhanced green fluorescent protein) were seeded in these scaffolds. *In vitro* and *in vivo* experiments were performed with mesenchymal stem cells endogenously tagged with eGFP (enhanced green fluorescent protein) from transgenic rat inbred strain Lewis-eGFP positive (University of Missouri - USA) and Wild Type Lewis-eGFP negative rats were, subsequently, used as receptors, to allow monitoring the fate *in vivo* of the transplanted cells, by immunohistochemical technique. The scaffolds synthesized were also evaluated *in vitro* for the biocompatibility (MTT conversion, alkaline phosphatase activity and morphological analyzes by SEM and LM) and the cells behavior were compared (colonization, adhesion, "proliferation" and osteogenic differentiation) in monolayer and in tridimensional cultures maintained in basal medium, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) and in osteogenic medium (DMEM plus osteogenic supplements). *In vivo*, thirty-two wild male rats were used as recipients for the implantation of the scaffold (n=16) or for the transplantation of the construct (n=16) and the tooth sockets of rats model were employed. Therefore, after extraction of the first upper molars, the scaffolds/constructs were implanted in the left dental sockets of the recipient rats, Lewis Wild Type. The right dental sockets were used as controls. The animals, Lewis rats (n=16) from each experimental group were euthanized 5, 21 and 35 days after surgery. The behavior, biocompatibility and biodegradation of the matrix after implantation were evaluated histologically by light microscopy, for the three experimental periods. The constructs implants (scaffold seeded with BMSC in basal medium for three days) were also evaluated in the three experimental periods. Morphometric analysis was performed to quantify bone filling of the experimental sockets, left side, and

controls, right side, in periods of 5, 21 and 35 days after surgery by means of cone beam computed tomography (CBCT). The fate of the eGFP-positive stem cells transplanted was screened by immunohistochemistry. The *in vivo* results showed high biocompatibility and slow degradation of the matrix. Morphometric analysis showed a significant increase in bone mineralization in the sockets transplanted after 21 and 35 days. Immunohistochemistry revealed the contribution of BMSC to repair bone, epithelial and vascular tissues. The gelatin and chitosan scaffolds showed physic-chemical and biological properties suitable for use as a filling material, as a carrier for stem cells and reconstitution of the bone tissue by means of tissue engineering. The results showed that the gelatin and chitosan scaffold is a promising carrier biomaterial for BMSC and the construct (chitosan and gelatin scaffold-BMSC) represents a viable strategy for bone tissue engineering in dentistry.

Keywords: Chitosan-gelatin scaffold, bone marrow mesenchymal stem cells, tissue engineering, tooth sockets.