

1. Introdução

A reconstrução do complexo maxilo-facial e a reabilitação da função mastigatória após trauma, processos patológicos ou deformidades congênitas continua um desafio na clínica odontológica (Kretlow *et al.*, 2009). O “padrão ouro” atual para enxerto ósseo é o transplante de osso autógeno fresco. Entretanto, a grande desvantagem desses enxertos é a quantidade limitada de tecidos, o que torna a reparação de grandes defeitos ósseos problemática. Uma alternativa às tradicionais fontes de enxerto é a engenharia de tecido ósseo, uma nova abordagem promissora para o reparo ósseo (Healy e Guldberg, 2007).

O paciente edêntulo apresenta uma mutilação semelhante à amputação de qualquer outro órgão do corpo e deve, portanto, receber uma reabilitação oral. A população brasileira com faixa etária entre 35 e 44 anos apresenta em média, 13,2 dentes perdidos, enquanto a população entre 65 e 74 anos apresenta cerca de 25,8 dentes perdidos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005). A utilização de implantes tem se tornado uma alternativa de sucesso para reabilitar as áreas edêntulas. Métodos de reconstrução óssea são pré-requisitos essenciais para a reabilitação funcional do sistema estomatognático, especialmente na correção de perdas traumáticas ou mudanças atróficas do processo alveolar da maxila ou mandíbula (Wiltfang *et al.*, 2004). Atualmente, muita atenção tem sido dada à reconstrução de ossos humanos, uma vez que, o uso de enxertos ósseos em práticas clínicas apresenta vários inconvenientes. 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 pode, potencialmente, prover soluções alternativas para tais problemas, como a utilização de matrizes porosas tridimensionais (3D) projetadas para permitir a migração e a proliferação celular, vascularização e difusão de nutrientes (Puppi *et al.*, 2010). Sob o aspecto da engenharia de materiais, o primeiro passo para a reconstrução de um tecido é a seleção do biomaterial da matriz, o qual pode ser polimérico, metálico ou cerâmico (Lorcan *et al.*, 2006).

Os polímeros naturais vêm sendo amplamente utilizados na construção de matrizes porosas aplicadas à engenharia de tecidos, incluindo a de ossos e outros tecidos mineralizados (Hutmacher, 2000). Dentre os polímeros naturais, destacam-se a quitosana e a gelatina, por apresentarem excelentes propriedades biológicas complementares. Estudos anteriores de quitosana-gelatina enfocaram principalmente a preparação e a caracterização de diferentes blendas do biomaterial. No presente trabalho, desenvolveu-se uma matriz 3D porosa, natural e de baixo custo, constituída de quitosana e gelatina, que foi semeada com células-tronco mesenquimais de medula óssea e transplantada para alvéolos dentários de ratos. Portanto, esse estudo tem como finalidade apresentar a combinação desses dois biomateriais com características complementares, unidos ao potencial de diferenciação das células-tronco mesenquimais de medula óssea com o objetivo de aplicação na reconstrução do tecido ósseo.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Engenharia de tecidos

A formação dos diversos tecidos e órgãos que compõem o corpo humano, durante a embriogênese ou no processo de regeneração e reparo de lesões, ocorre por meio de um conjunto de eventos complexos nos quais células se agrupam em unidades funcionais gerando uma matriz extracelular e promovendo a formação ou crescimento de um tecido especializado. Reproduzir estes eventos fora do corpo humano com métodos que controlem e estimulem o crescimento de tecidos *ex vivo* é um desafio para a medicina regenerativa, tendo recentemente originado uma nova área tecnológica denominada de Engenharia de Tecidos (Langer e Vacanti, 1993). A engenharia de tecidos visa reparar e/ou regenerar tecidos danificados com a adição de biomateriais (suportes, matrizes tridimensionais, arcabouços, *scaffolds*, estruturas) combinados com células e fatores estimulantes apropriados (Rose e Oreffo, 2002). Portanto, trata-se de um campo interdisciplinar e emergente, envolvendo biologia celular e ciência dos materiais para o desenvolvimento de substitutos biológicos para restaurar, manter ou melhorar a função dos tecidos lesados ou acometidos por patologias, ao invés de apenas repará-los (Langer e Vacanti, 1993; Xiao *et al.*, 2003; Shin *et al.*, 2004, Hutmacher e Garcia, 2005). A engenharia de tecidos tem sido considerada uma alternativa potencial ao transplante de órgãos e tecidos (Caia *et al.*, 2005).

O princípio básico da engenharia de tecidos no campo da pesquisa voltada para a engenharia óssea é a formação de um novo osso *in vitro* e *in*

vivo através da combinação de células osteopotentas cultivadas em materiais osteocondutivos para gerar um construto (Zhu *et al.*, 2006; Hutmacher e Garcia, 2005). As células utilizadas na engenharia de tecidos podem ser células especializadas ou células-tronco. No entanto, existem dificuldades na obtenção, no cultivo e na expansão de algumas células especializadas. As células-tronco são uma fonte atraente de células para a 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).

Dessa forma, o campo da engenharia de tecidos é impulsionado pela necessidade de se fornecer equivalentes funcionais dos tecidos nativos que possam ser utilizados para implantação. Com o envelhecimento da população, o aumento da expectativa de vida e a busca por qualidade de vida, essa necessidade é crescente, sendo imprescindível projetar combinações apropriadas de matrizes tridimensionais, células e metodologias de cultivo visando atingir o objetivo final da engenharia de tecido ósseo, o desenvolvimento de substitutos ósseos (Burdick e Vunjak-Novakovic, 2009).

2.2. Biomateriais

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 a sua função, podendo servir como matriz de suporte, veículo ou estimulador para o crescimento de novo tecido (Williams, 1987). Os biomateriais podem ser classificados em

relação a vários aspectos, tais como: origem, organização estrutural, topografia da superfície, técnicas de fabricação (Lawrence e Madihally, 2008). Quanto ao tipo do material constituinte, os biomateriais são divididos em: polímeros, metais, cerâmicas e compósitos (Cheung, 2007). A utilização dos biomateriais para o reparo de tecidos vivos tem aumentado consideravelmente nas últimas três décadas, devido ao desenvolvimento de novos materiais e à melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na sua interação com os organismos vivos (Huebsch e Mooney, 2009).

Os materiais poliméricos têm recebido destaque devido a sua vasta aplicabilidade no corpo humano (Blunk, 2003). Um dos fatores que tem atraído a atenção para a utilização de polímeros é a possibilidade de alterar grupamentos químicos pertencentes à arquitetura macromolecular das cadeias, o que pode auxiliar na fabricação de materiais que induzam interações específicas entre o biomaterial e o tecido hospedeiro (Oréfice, 2006).

Porém, são muitas as variáveis relacionadas ao *design* da matriz tridimensional que podem influenciar fortemente a resposta biológica, incluindo a composição única ou multifásica, a composição química da superfície, a taxa de degradação e os produtos de degradação e as propriedades mecânicas da matriz, tais como módulo de elasticidade (Healy e Guldberg, 2007; Puppi *et al*, 2010). Os parâmetros arquitetônicos, tais como porosidade, tamanho dos poros e interconectividade, são extremamente relevantes. Quanto à porosidade, matrizes altamente porosas são desejáveis (Rose e Oreffo, 2002). As estruturas porosas 3D são usadas como modelos para a semeadura celular temporária, migração, proliferação e diferenciação antes da regeneração do tecido biologicamente funcional ou da matriz extracelular natural (Hutmacher,

2000; Lutolf e Hubbel, 2005). Dessa forma, esses microambientes 3D são empregados para sustentar e guiar o crescimento celular dentro da matriz, durante a colonização por células. Essas matrizes oferecem uma configuração similar às condições *in vivo* e têm sido desenvolvidas e utilizadas em várias estratégias de regeneração tecidual ou ainda, como modelos para avaliação dos mecanismos de alterações patológicas (Lawrence e Madhally, 2008).

A escolha do biomaterial é fundamental para o sucesso da engenharia de tecido na reparação óssea. No desenvolvimento de matrizes 3D, as propriedades mecânicas, estruturais e biológicas devem ser cuidadosamente observadas (Mano *et al.*, 2008). Há uma tendência de transição dos biomateriais não-porosos, biologicamente inertes a materiais mais porosos, osteocondutores (Rose e Oreffo, 2002). 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).

A biodegradação é outro fator importante na escolha do biomaterial. A biodegradação se refere à susceptibilidade de um polímero ser degradado por hidrólise ou digestão enzimática (Ge *et al.*, 2008). Os produtos da degradação não devem provocar inflamação ou citotoxicidade e devem ser removidos através de vias metabólicas.

Tendo em vista que a biocompatibilidade é uma propriedade importante para o uso humano de biomateriais, fica evidente a necessidade de se fazer estudos "*in vitro*" e "*in vivo*" do comportamento celular na interface com esses materiais. Modelos animais são essenciais para prover informações sobre as respostas biológicas de um implante, porém, os resultados são complexos e podem ser de difícil interpretação em nível celular (Cancedda *et al.*, 2007). Os

ensaios “*in vitro*” são mais rápidos, de menor custo, não envolvem problemas éticos e simulam o desempenho do material no organismo. Os testes “*in vivo*” utilizam procedimentos de implantação, fornecem resultados mais realísticos do comportamento do material e permitem o estudo da resposta inflamatória, aguda e crônica e a relação destas no período tardio, com sucesso ou insucesso do biomaterial (Cancedda *et al.*, 2007). Biomateriais biocompatíveis não deverão apresentar efeito tóxico ou prejudicial sobre sistemas biológicos (Keong e Halim, 2009).

Atualmente, biomateriais naturais e biomiméticos têm se destacado como matrizes para regeneração tecidual por apresentarem resposta biológica superior quando comparados com biomateriais sintéticos (Thein-Han e Misra, 2009). Dentro desse contexto, uma opção para o desenvolvimento de *scaffolds* é o emprego de componentes da matriz extracelular derivados de fontes animais (Lawrence e Madihally, 2008). Têm sido desenvolvidos biomateriais que sirvam como suporte físico e atuem como um substrato adesivo para células durante cultura “*in vitro*” para subsequente implantação. Esses biomateriais, tais como a quitosana e a gelatina, viabilizam a regeneração do tecido hospedeiro em termos de morfologia e função (Grenha *et al.*, 2010).

2.2.1. Quitosana e gelatina como matéria-prima de matrizes tridimensionais para engenharia de tecidos

A quitosana é um polissacarídeo natural, derivado da desacetilação parcial da quitina, encontrada na carapaça de crustáceos marinhos e exoesqueletos de artrópodes (Coutinho *et al.*, 2008; Thein-Han *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2009). A quitosana é composta de glicosaminas e *N*-acetil

glicosaminas; a proporção entre as duas confere o grau de acetilação dessa substância (Fig. 1) (Di Martino *et al.*, 2005).

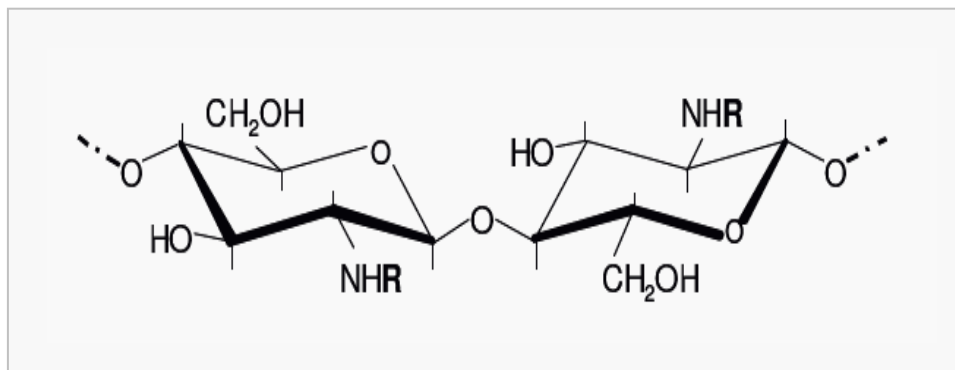


Figura 1: Estrutura química da quitosana. Glicosamina (R=H) é a unidade de repetição predominante. A unidade de repetição acetilada, *N*-acetilglicosamina (R=COCH₃) está distribuída aleatoriamente. Adaptado de Coutinho (2008).

Seu peso molecular pode oscilar de 300 a mais 1000 kD, de acordo com o grau de desacetilação que varia de 30% a 95%. Em sua forma cristalina, não é solúvel em soluções aquosas com pH acima de 7, entretanto soluções ácidas (pH<6) facilitam a solubilidade da molécula (Di Martino *et al.*, 2005).

Devido a sua alta biocompatibilidade, aceitável biodegradabilidade, similaridade química com a estrutura da matriz extracelular (MEC), atividade antimicrobiana e capacidade para produzir matrizes porosas, a quitosana tem sido amplamente estudada como um biomaterial para aplicação em engenharia de tecidos (Khor e Lim, 2003; Huang *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2003; 24. Xia *et al.*, 2004). Suh e Mattew, 2000, além de reportarem a biocompatibilidade e a biodegradação da quitosana na presença de lisozima, mostraram que os seus produtos de degradação não são tóxicos e podem ser

incorporados na MEC para a reconstrução normal dos tecidos (Suh e Matthew, 2000). Essas propriedades, conjuntamente com a habilidade em promover crescimento e diferenciação de células ósseas, estimulam o uso da quitosana como um material de suporte para a regeneração óssea (Spin-Neto *et al.*, 2008).

A fim de melhorar as propriedades mecânicas e biológicas da quitosana, a mistura desse material com colágeno ou gelatina tem sido proposta (Huang *et al.*, 2005; Risbud *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2009). A associação de quitosana e colágeno no processamento de *scaffolds* é um método efetivo de se modificar a taxa de biodegradação e melhorar as propriedades mecânicas desse polímero (Sun *et al.*, 2009). Essa integração é favorecida pelo emprego do glutaraldeído, como agente ligante. O glutaraldeído é uma espécie de ligante bifuncional que pode fazer uma ligação entre dois grupos amino de duas cadeias polipeptídicas adjacentes. Nesse contexto, a quitosana pode funcionar como uma ponte para aumentar a eficiência da reticulação do glutaraldeído, pois apresenta um grande número de grupos amino em sua cadeia molecular (Ma *et al.*, 2003).

Estudos anteriores demonstraram que a gelatina exibe características importantes para a engenharia de tecidos, tais como biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa antigenicidade e alta resistência à tensão (Huang *et al.*, 2005; Rocha *et al.*, 2002). A gelatina é uma proteína solúvel derivada do colágeno parcialmente hidrolizado (Thein Han *et al.*, 2009). O colágeno tipo I, presente em gelatina de origem animal, desempenha um papel central na cascata temporal dos eventos que conduzem à formação de osso novo a partir de células progenitoras (Yang *et al.*, 2004). As proteínas de adesão, como o colágeno e seus receptores, constituem um sistema de reconhecimento versátil

que fornece sinais de ancoragem, tração para a migração e polarização, posição e diferenciação celular (Huang *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2003; Lawrence e Madhally, 2008). O colágeno apresenta seqüências de aminoácidos arginina-glicina-aspartato (RGD - seqüência). A seqüência RGD é encontrada em várias proteínas da matriz extracelular e está envolvida na adesão celular. (Le Trong, 2003). A adesão celular é uma questão fundamental em engenharia óssea, pois representa um pré-requisito para a secreção da matriz por osteoblastos, células dependentes de ancoragem (Valerio *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2008). Recentemente, foi relatado que a mistura de gelatina com quitosana proporciona uma armação estrutural melhor para a proliferação e viabilidade celular em relação à quitosana pura (Thein-Han *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2009).

Matrizes de blenda de gelatina e quitosana agiram como um biomaterial de estrutura estável para a colonização e diferenciação celular de células-tronco mesenquimais em células da linhagem osteogênica *in vitro* (Machado *et al.*, 2007). A resposta tecidual de implantes à base de quitosana também já foi estudada (Muzzarelli *et al.*, 1994, Yin *et al.*, 2003). Muzzarelli *et al.*, 1994, avaliou lesões de 7 mm em cômulo femoral de ovelhas tratadas com quitosana e observou neoformação de um tecido com estrutura trabecular, na área periférica e, nódulo de mineralização associado a um componente fibroso, no centro, 40 dias após a cirurgia.

A cultura tridimensional (3D) em *scaffolds* de quitosana-gelatina é bastante diferente dos sistemas de cultura bidimensional (2D) padrão e, dessa forma, o estudo da atividade biológica e do crescimento celular nessas matrizes é importante. Células em um organismo vivo são cercadas por outras células e matriz extracelular (MEC). Para imitar fisiologicamente esse

ambiente, a cultura de células em um espaço 3D é mais relevante, em comparação as culturas em monocamada ou bi-dimensionais (2D) (Wang *et al.*, 2004).

2.3. Células-tronco

Células-tronco são células indiferenciadas que possuem a capacidade de auto-renovação e diferenciação em vários tipos celulares (Gepstein, 2002).

As células-tronco são tipicamente classificadas de acordo com o seu sítio de localização. As embrionárias são encontradas na massa celular interna dos blastocitos e as células-tronco adultas podem ser encontradas no tecido fetal, em recém-nascidos e no organismo adulto. Há uma distinção clássica entre as células-tronco, no que se refere a sua plasticidade e, portanto, estas células foram divididas em grupos. Dessa forma, as células que têm a maior capacidade de produzir tipos especializados são as células-tronco embrionárias, classificadas como pluripotentes, por darem origem a células dos três folhetos embrionários: ectoderma, mesoderma e endoderma, sendo capazes de gerar todos os tipos celulares. As células-tronco embrionárias produzem os fatores de transcrição Oct-4, Nanog e Sox2 responsáveis pela manutenção do estado de pluripotência (Gokhale e Andrews, 2009). Porém, estas células exibem um potencial de formação de teratomas quando introduzidas em camundongos imunodeficientes, sendo limitado o seu emprego em humanos (Nussbaum *et al.*, 2007). Além disso, sua obtenção e utilização geram questionamentos éticos, políticos e religiosos (Fischbach e Fischbach, 2004). No Brasil, a utilização de células-tronco embrionárias é permitida de

acordo com a Lei de Biossegurança (Lei 11.105), de 24 de março de 2005 (Pereira, 2008).

Uma alternativa às células-tronco embrionárias são as células-tronco adultas. Estas células indiferenciadas são capazes de gerar apenas alguns tipos celulares especializados e por isso são classificadas como multipotentes. Esta restrição ao seu potencial de diferenciação reflete a dinâmica natural de renovação celular em um dado tecido, assim como sua capacidade de reparo após uma lesão ou doença (Weissman, 2000). Porém, sob condições especiais, estas células podem se transdiferenciar, ou seja, uma célula-tronco de um tecido pode gerar um tipo celular especializado de outro tecido ou de outro folheto germinativo (Ringe *et al.*, 2002). A transdiferenciação envolve uma reprogramação genética, onde ocorre o desligamento de conjuntos de genes e a ativação de outros (Slack e Tosh, 2001). Este fenômeno ainda não é bem conhecido. As células-tronco adultas podem ser isoladas de tecidos fetais, placenta, cordão umbilical e de várias fontes do indivíduo adulto, tais como sangue, pâncreas, córnea e retina, cérebro, sistema músculo-esquelético, polpa dental, fígado, pele e medula óssea (Fauza, 2004; Da Silva Meirelles, Chagastelles *et al.*, 2006; De Coppi *et al.*, 2007). A medula óssea contém, além das células-tronco hematopoiéticas e das células-tronco endoteliais, uma população rara de células-tronco capaz de dar suporte a hematopoiese e de se diferenciar em diversas linhagens celulares, como condrócitos, osteócitos e adipócitos. Estas células foram originalmente identificadas a partir de células mononucleares da medula óssea de camundongos em 1970, por Alexander Friedenstein e colaboradores, que as denominaram células formadoras de

colônias fibroblásticas. Mais recentemente estas células têm sido denominadas células-tronco mesenquimais (CTM).

Células-tronco mesenquimais têm despertado grande interesse para pesquisadores e clínicos por apresentarem grande aplicabilidade na engenharia de tecidos (Rosenbaum, 2008). Células-tronco mesenquimais, juntamente com células-tronco hematopoiéticas são as células-tronco adultas mais bem estudadas e caracterizadas (Hipp e Atala, 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 satisfatórias pelos métodos tradicionais (Wobus e Boheler, 2005). As células-tronco mesenquimais de medula óssea (CTMMO) constituem uma importante fonte de células-tronco adultas pluripotentes (Rosenbaum *et al.*, 2008). Além disso, essas contribuem fisiologicamente para a regeneração de tecidos de origem mesenquimal, tais como: ósseo, cartilaginoso, muscular e adiposo (Haynesworth, 1992).

Essas células apresentam facilidades de obtenção e utilização. O doador das células pode ser o próprio indivíduo, o que elimina complicações relacionadas à rejeição tecidual. A capacidade das CTM se diferenciarem em osteoblastos já foi extensivamente demonstrada através de vários estudos (Cancedda *et al.*, 2007) e por isso elas têm sido usadas clinicamente para tratar defeitos ósseos. CTMMO podem ser estimuladas com a utilização de moléculas de sinalização no meio de cultura. A ativação osteogênica exige a presença de β -glicerol-fosfato, ácido ascórbico-2-fosfato, dexametasona e soro fetal bovino. Quando cultivadas em monocamada com estes suplementos, as

células adquirem uma morfologia osteoblástica e matriz extracelular mineralizada rica em cálcio é depositada (Barry e Murphy, 2004).

O princípio fundamental da terapia com células-tronco é que células indiferenciadas, seguindo no hospedeiro uma via de migração até o sítio da injúria, diferenciar-se-ão em células com um fenótipo apropriado, sob influência de sinalização local. Dessa forma, essas células então diferenciadas contribuiriam para o reparo do tecido lesado (Barry e Murphy, 2004).

2.4. Biologia do processo de cicatrização alveolar

A cicatrização do alvéolo dentário pós-extração pode servir como um modelo para descrever os eventos teciduais que levam à formação do tecido ósseo no defeito do processo alveolar. Logo após a exodontia, a cavidade é preenchida pelo coágulo sangüíneo formado através do rompimento de vasos sangüíneos do ligamento periodontal (LP) e do forame apical. Há migração de células inflamatórias para o interior do coágulo, quando o processo de reestruturação do defeito é iniciado. Novos fibroblastos, produzidos por diferenciação de células mesenquimais e mitoses de fibroblastos pré-existentes, sintetizam uma delicada matriz de colágeno que, juntamente com os capilares neoformados, caracterizam o tecido de granulação (Yugoshi *et al.*, 2002). O coágulo é progressivamente reabsorvido, quando é invadido por fibroblastos derivados do LP, que proliferam ativamente e migram em direção a ele, formando um tecido conjuntivo imaturo. Posteriormente, diferenciam-se em osteoblastos responsáveis por produzir novo tecido ósseo durante a cicatrização alveolar (Teófilo *et al.*, 2001). As fibras colágenas, inicialmente

depositadas, formam uma trama preliminar na qual ocorre a deposição de osso neoformado. Osteoclastos atuam na remodelação óssea das margens do alvéolo e dos septos interradiculares remanescentes, presentes após a extração de dentes multirradiculares (Lindhe, 2005). Por fim, os eventos de cicatrização alveolar culminam no preenchimento do alvéolo com tecido ósseo trabecular. Em ratos, o reparo alveolar está completo três semanas após a exodontia, com o alvéolo sendo preenchido por trabéculas ósseas bem organizadas e revestidas por osteoblastos (Teófilo *et al.*, 2001).

A cicatrização tecidual pode ocorrer através de dois processos distintos: por reparo, quando há a formação de uma cicatriz fibrosa, ou por regeneração, quando há formação de um tecido com características semelhantes ao original. A regeneração óssea a partir de enxerto envolve processos de osteogênese, osteocondução e osteoindução. A osteogênese é realizada pelas células existentes no material de enxerto (osteoblastos ou células precursoras de osteoblastos). A osteoindução é o processo de estimulação da osteogênese que segue as seguintes etapas: quimiotaxia de células mesenquimais, proliferação de células ósseas progenitoras e diferenciação de cartilagem e osso. O processo de osteocondução refere-se à capacidade do material enxertado funcionar como uma matriz para deposição de novo osso a partir do osso pré-existente (Lindhe, 2005). Dá-se pela invasão de capilares e células progenitoras da área receptora para dentro do enxerto seguido da reabsorção progressiva do material e sua substituição por osso (Lindhe, 2005).

O tecido ósseo pode ser formado por meio de dois processos distintos de ossificação. Um deles seria a diferenciação de células precursoras mesenquimais, diretamente em osteoblastos, como observado no

desenvolvimento dos ossos faciais, que representa o processo de ossificação intramembranosa. Um segundo processo seria o de ossificação sobre um modelo de cartilagem intermediário, presente no desenvolvimento de ossos longos, que caracteriza o processo de ossificação endocondral (Kanyama *et al.*, 2003). No alvéolo dentário, observa-se apenas ossificação intramembranosa (Kanyama *et al.*, 2003), sem formação de cartilagem ou presença de condrócitos (Shyng *et al.*, 1999).

O osso alveolar é formado através de ossificação intramembranosa e consiste em uma matriz calcificada com osteócitos aprisionados em lacunas. Os osteócitos se intercomunicam através de prolongamentos que se irradiam em canalículos. A matriz óssea que é depositada pelos osteoblastos não é mineralizada e é denominada osteóide. Quando ocorre deposição de novas camadas de osteóide, o tecido mais antigo localizado mais afastado da superfície, mineraliza-se (Lindhe, 2005).

O processo de cicatrização alveolar fornece um modelo adequado para o estudo da formação óssea em ratos e pode ser considerado um sensível indicador de lesão óssea experimental sob diferentes condições experimentais (Hsieh *et al.*, 1994).

2.5. Defeitos ósseos alveolares

Defeitos de rebordo alveolar resultante da extração do dente, trauma ou doença periodontal geralmente exigem correção cirúrgica prévia para a reconstrução protética. Se os implantes ou próteses fixas convencionais estão previstas, sem uma análise cuidadosa e planejamento do tratamento

adequado, defeitos de tecido duro e/ou mole podem levar a comprometimentos funcional, estrutural ou estético na prótese final.

Defeitos ósseos de diferentes tamanhos não podem ser tratados da mesma forma e a compreensão do tipo e da extensão do defeito faz com que o profissional planeje o tratamento adequadamente. Baseado em vários estudos, a literatura especializada propõe algumas classificações para os defeitos ósseos. Wang e Al-Shammari, 2002, introduziram uma nova classificação bastante prática, baseada no tipo e tamanho do defeito ósseo. Sendo assim, eles dividiram os defeitos ósseos em: horizontal, vertical e horizontal combinado com vertical. Cada uma dessas categorias foi subdividida em pequena (menor ou igual a 3 mm), média (entre 4 e 6 mm) e extensa (maior ou igual a 7 mm) (Wang e Al-Shammari, 2002).

Porém, a classificação de Tinti e Benfenati, 2002, um sistema de classificação terapeuticamente orientado, veio suprir a necessidade de se protocolar a indicação de enxertia óssea, nos diversos tipos de defeitos. Com base na preservação e proteção do coágulo sanguíneo e no momento de inserção do implante, esses autores classificaram os defeitos em 5 categorias, que avaliam: (i) paredes alveolares após exodontia, fenestração, deiscência, defeito horizontal do rebordo e defeito vertical do rebordo. Essas categorias são subdivididas em classes I ou II, sendo que defeitos horizontais e verticais do rebordo, tipo classe II, necessitam de enxerto ósseo. No defeito horizontal do rebordo tipo classe II, os implantes ficam fora do envelope ósseo e no defeito vertical do rebordo tipo classe II, há insuficiência de mais de 3 mm de altura óssea. Além desses defeitos, a complexidade da reconstrução óssea da

mandíbula e da maxila representa um dos maiores desafios em cirurgia bucomaxilo-facial e implantodontia (Francischone *et al.*, 2006).

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Sintetizar e caracterizar uma matriz tridimensional de quitosana e gelatina, para o cultivo de CTMMO *in vitro*, e posteriormente, avaliar o comportamento desse construto (matriz tridimensional de quitosana e gelatina associada as CTMMO) *in vivo* em modelo de alvéolo dentário de ratos.

3.2. Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste estudo foram:

- 1) Desenvolver e caracterizar uma matriz porosa de quitosana e gelatina, para cultura tridimensional de CTMMO *in vitro*;
- 2) Isolar, expandir e caracterizar as CTMMO a serem transplantadas;
- 3) Desenvolver um construto, constituído por CTMMO semeadas na matriz tridimensional de quitosana e gelatina, para transplante em alvéolos dentários;
- 4) Avaliar o comportamento da matriz tridimensional de quitosana e gelatina como material de preenchimento ósseo em alvéolos dentários;
- 5) Avaliar o comportamento do transplante de CTMMO, carregadas na matriz tridimensional de quitosana e gelatina, em alvéolos dentários;

6) Avaliar a contribuição de CTMMO, carregadas na matriz tridimensional de quitosana e gelatina, na formação de tecido ósseo em alvéolos dentários;

7) Avaliar, por meio de análise imunohistoquímica, a migração e integração de CTMMO aos tecidos do hospedeiro;

4. Materiais e métodos

Este trabalho de pesquisa compreende dois estudos principais. O primeiro corresponde à preparação, caracterização e avaliação, *in vitro* e *in vivo*, da biocompatibilidade e degradação de uma matriz tridimensional, porosa a base de quitosana e gelatina. No segundo realiza-se o transplante de um construto para alvéolos dentários de ratos e quantifica-se o preenchimento ósseo desses alvéolos, através de análise morfométrica por tomografia computadorizada. Esse construto foi obtido após três dias de cultivo de eGFP-CTMMO na matriz tridimensional desenvolvida e previamente utilizada nos experimentos *in vitro* e visou o carreamento das CTMMO até a região lesada no modelo de defeito ósseo em alvéolos dentários de ratos.

4.1. Animais doadores, receptores e grupos experimentais

Ao todo foram utilizados 36 ratos Lewis pesando entre 230-250 g (8 semanas) nos experimentos *in vitro* e *in vivo*. Visando um resultado sem falso positivo, optou-se pelo uso de células-tronco mesenquimais marcadas endogenamente com eGFP (*Enhanced green fluorescent protein*). Estas células foram extraídas de ratos transgênicos isogênicos da linhagem Lewis que expressam eGFP em todos os seus tecidos. Estes ratos foram adquiridos no *Rat Resource and Research Center* (RRRC) da Universidade de Missouri nos Estados Unidos e suas alterações genéticas são caracterizadas pela presença do vetor lentivírus, contendo o gene eGFP sob controle do promotor da ubiquitina C. Estes ratos foram genotipados para a identificação de

homozigotos e heterozigotos. Para isso, foi padronizado o ensaio para diferenciação dos ratos transgênicos eGFP dos ratos selvagens (WT) (Fig. 2)

Quatro animais doares, transgênicos para a expressão da proteína verde fluorescente-eGFP (LEW-Tg EGFP F455/Rrrc), foram empregados para se obter células-tronco mesenquimais de medula óssea, endogenamente marcadas (eGFP-CTMMO).

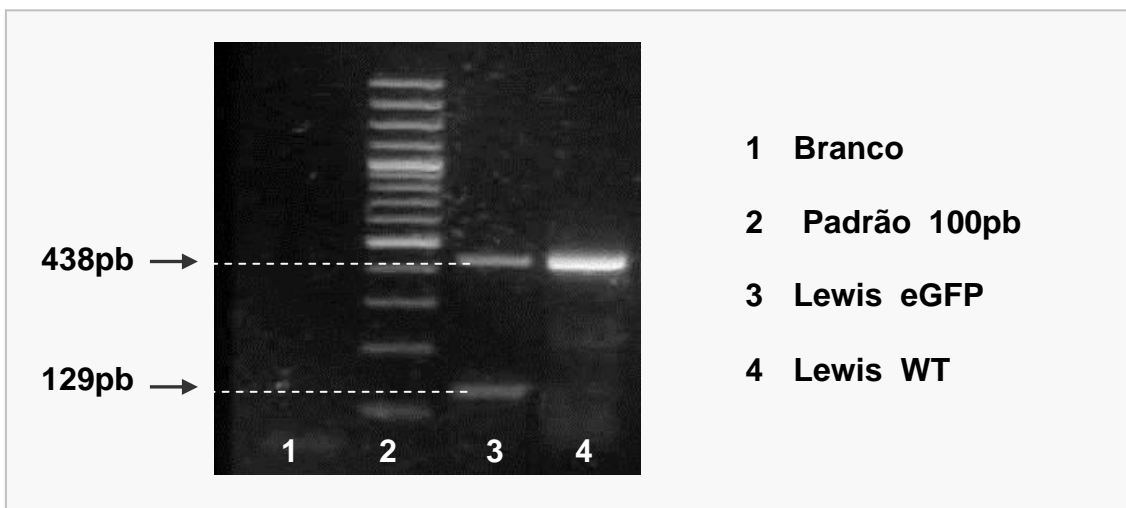


Figura 2: Genotipagem dos ratos Lewis transgênicos eGFP. Imagem obtida através de um ensaio de PCR para identificar ratos homozigotos e heterozigotos eGFP, a canaleta contendo DNA de ratos Lewis eGFP mostra a presença de duas bandas distintas, sendo a banda com 438 pb relativa ao alelo selvagem (WT) e a banda de 129 pb diz respeito ao alelo transgênico eGFP; indicando que este rato é eGFP heterozigoto. A canaleta contendo DNA de ratos Lewis selvagens apresenta somente uma banda de 438 pb, indicando que este rato é selvagem homozigoto.

Trinta e dois ratos machos selvagens *inbred* da linhagem LEWIS/H foram usados como recipientes para o implante do biomaterial sintetizado ou para o transplante do construto obtido. Durante o período experimental, os animais foram mantidos em biotério apropriado, acondicionados em gaiolas plásticas contendo um número máximo de 04 animais, sob temperatura ambiente e controle de luz automática (07h-19h). Os animais receberam ração para animais de laboratório e água *ad libitum*. Os experimentos foram realizados de acordo com as orientações para experimentação animal, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética Animal (CETEA/UFMG) sob o protocolo de número 9/2007 (ANEXO 01).

Todos os receptores tiveram os primeiros molares superiores extraídos, de ambos os lados, e receberam um dos seguintes tratamentos descritos abaixo no alvéolo dentário esquerdo. Dessa forma, de acordo com a Tabela 1, os seguintes grupos experimentais e subgrupos foram constituídos:

- i. Implantação do biomaterial de quitosana e gelatina (CH-G)
- ii. Implantação do construto, constituído pelo mesmo biomaterial de quitosana e gelatina cultivado por 3 dias com eGFP-CTMMO (CH-G/CTMMO).

O alvéolo dentário direito de cada animal foi utilizado como controle para a análise dos resultados.

Tabela 1: Distribuição dos animais em grupos experimentais, para análise histológica e morfométrica.

Grupo	Período Experimental	n	Tratamento	
			Alvéolo direito (controle)	Alvéolo esquerdo (experimental)
CH-G	5 dias	6	coágulo	matriz de quitosana e gelatina
	21 dias	5		
	35 dias	5		
CH-G/ CTMMO	5 dias	6	coágulo	matriz de quitosana e gelatina com CTMMO (construto)
	21 dias	5		
	35 dias	5		

4.2. Obtenção das matrizes 3D de quitosana e gelatina

4.2.1. Síntese das matrizes 3D de quitosana e gelatina

As matrizes foram produzidas a partir de polímeros naturais, quitosana com grau de desacetilação de 85% (Sigma) e gelatina de pele suína (Vetec). Soluções de quitosana a 0,7% (p/v) e gelatina a 0,7% (p/v) foram preparadas em solução 0,1 M de ácido acético (Vetec), separadamente, e agitadas até se tornarem homogêneas. Após descansarem por 24 h em temperatura ambiente, essas duas soluções distintas foram misturadas na proporção de 3:1 (quitosana/gelatina) para se obter uma blenda. Nesse momento foi adicionado a essa mistura o agente ligante, o glutaraldeído a 25% (Sigma), numa concentração de 0,1%. A solução final foi mantida em agitação por 1h. Foram dispensados 1 mL dessa solução em cada poço das placas de cultura celular de 24 poços, usadas como moldes cilíndricos para a obtenção de discos padronizados da esponja de quitosana e gelatina.

Após secagem *overnight*, as placas foram incubadas a 37°C durante 24 h e, em seguida, foram congeladas a -20°C por mais 24h. As matrizes foram, então, liofilizadas, com o intuito de se remover todo o solvente. As matrizes foram ressuspensas em glutaraldeído a 25% (Sigma), numa concentração de 0,1% e as placas foram agitadas por mais 30 min. Todo o processo (aquecimento, congelamento e liofilização) foi repetido. Finalmente, foi adicionado 1mL/poço de álcool absoluto (Merck) e as amostras descansaram até a secarem completamente (Fig. 3).

Dessa forma, matrizes de quitosana e gelatina, ligadas com glutaraldeído, foram obtidas através da técnica de congelamento/liofilização. Neste processo, a solução contendo o polímero é rapidamente resfriada para congelar o solvente. Em seguida, a pressão do sistema é reduzida para permitir a sublimação (transformação sólido-gás) do solvente. O espaço, antes preenchido pelo solvente congelado constitui a porosidade do material. Porosidades acima de 90% são obtidas por este método, com poros de diâmetro menor que 200 μm e interconectados (Oréfica *et al.*, 2006).

Discos de 8 mm de diâmetro e 2,5 mm de espessura, com uma textura esponjosa foram cortados em 4 partes iguais, resultando em fatias de 4 mm de raio (Fig. 1A), utilizadas em todos os experimentos *in vitro* e *in vivo*. As amostras foram distribuídas em placas de cultura de 24 poços, seladas e esterilizadas por irradiação gama, a 20 Grays, por 30 minutos, no Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear/Centro de Energia Nuclear (CDTN/CENEN).

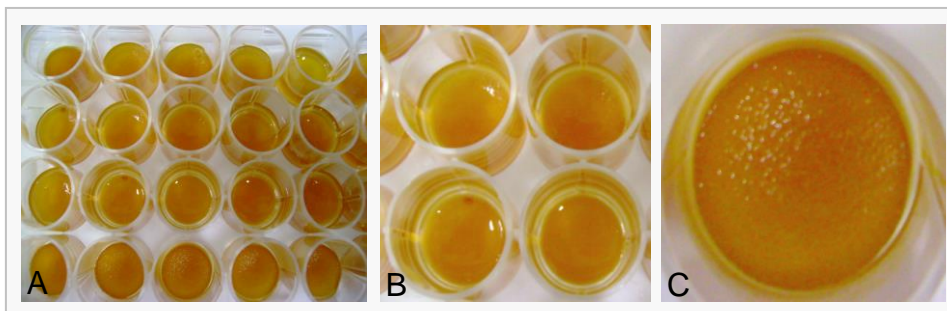


Figura 3: (A) Matrizes tridimensionais de quitosana, gelatina e glutaraldeído, em placa de 24 poços, prontas para secagem. (B) e (C) Imagens ampliadas do biomaterial em fase de secagem nos poços da placa de cultura.

4.2.2. Caracterização das matrizes 3D de quitosana e gelatina

Neste estudo utilizou-se a microscopia de luz (ML), a microscopia confocal (MC), a microscopia eletrônica de varredura (MEV) e o método de Arquimedes, para a avaliação morfológica do material sintetizado. A caracterização química foi realizada através da combinação da espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDS) e da difração de raios-X (XRD).

As matrizes, sem células, foram analisadas imediatamente após a síntese e após 1, 3, 8 e 14 dias de imersão nos meios de cultura MB e MO. Para o processamento histológico, foram fixadas em formalina neutra tamponada a 10%, desidratadas através de soluções crescentes de etanol, incluídas em paraplast X-TRA (Sigma), cortadas a 6 μm e coradas com hematoxilina e eosina (HE). Os cortes foram avaliados tanto com microscópio

de luz (Olympus BX-41/Q-Color3 digital color camera) quanto com microscópio confocal (BioRad MRC 1024). O microscópio confocal foi utilizado para verificar se a auto-fluorescência da quitosana era mantida após o preparo da blenda. Um feixe de laser de argônio com um comprimento de onda 488 nm (verde) foi utilizado para excitar o sinal auto-fluorescente.

Para a MEV, as matrizes sem células foram fixadas em glutaraldeído a 2,5% (0,1 mol/L tampão fosfato – PBS, pH 7,4) por 48 h e pós-fixadas com tetróxido de ósmio 1% por 2 h. Após a desidratação, foi realizada a secagem em ponto crítico com CO₂ líquido (CPD-020 Balzers). As amostras foram montadas em suportes metálicos e metalizadas com ouro (Sputter coater – SPI Supplies) por 90 segundos, 13 mA. As imagens foram adquiridas utilizando-se um microscópio eletrônico de varredura Zeiss DSM 950, 15kV, 750 mA. A morfologia, a interconectividade, a integridade dos poros e os aspectos micro-estruturais das esponjas foram avaliados.

Foi utilizada uma técnica básica de caracterização de materiais, para a determinação da porosidade, utilizando-se do princípio de Arquimedes, conforme descrito por Sun *et al.*, 2009. Neste método, uma proveta graduada foi preenchida com etanol, usado como líquido de deslocamento, à temperatura ambiente, uma vez que as amostras são insolúveis neste líquido (Yang *et al.*, 2002). Para se obter a porosidade, a matriz seca foi utilizada e o volume deslocado foi calculado como V_1 . A amostra seca também foi pesada (P_1) e, posteriormente, foi imersa em etanol. O peso da amostra saturada foi chamado de P_2 . A porosidade foi calculada a partir da seguinte equação, onde ρ é a densidade do etanol: $\text{porosidade} = (P_2 - P_1) / \rho / V_1$. A porosidade foi medida para 3 amostras e a média foi calculada e considerada como porosidade final.

A composição química foi avaliada por EDS (Microsonda eletrônica marca JEOL, modelo JXA-8900-RL). O microscópio eletrônico de varredura, acoplado a um espectrofotômetro de dispersão de energia de raios X, foi utilizado para identificação dos elementos químicos presentes na matriz. A composição de fases dos biomateriais foi analisada por difração de raios X (fonte Cu K α , modelo RX-SA-HFM3, Rigaku) no CDTN/CNEN. Exatamente os mesmos protocolos foram usados para as análises morfológicas por ML, MEV e EDS de matrizes 3D cultivadas com as CTMMO, nos períodos experimentais de 1, 3, 8 e 14 dias.

4.3. ESTUDO *IN VITRO*

4.3.1. Meios de cultura

4.3.1.1. Meio de cultura basal

D-MEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Gibco) suplementado com 5mM de bicarbonato de Sódio (Merck), 10% de soro fetal bovino (Gibco), 100 unidades de penicilina G/mL, 100 unidades de estreptomicina/mL e 0,25 μ g de anfotericina B /mL (PSA, Gibco). O pH do meio foi ajustado para 7,2 e, em seguida, o meio foi filtrado com membrana de difluoreto de polivinilideno de 0,22 μ m (Millipore). Esse meio foi utilizado para expansão celular e para cultura 2D e 3D dos experimentos *in vitro* e foi denominado de meio basal completo (MB).

4.3.1.2. Meio de cultura osteogênico

Como meio de cultura com estímulo osteogênico, utilizou-se o meio de cultura basal completo, D-MEM, acrescido de 50 µg/mL de ácido ascórbico (Sigma), 10 mM de βglicerofosfato (Merck) e 0,1 µM de dexametasona (Sigma), descrito por Jaiswal *et al.*, 1997. O pH do meio foi ajustado para 7,2 e, em seguida, o meio foi filtrado com membrana de difluoreto de polivinilideno de 0,22 µm (Millipore). Esse meio foi introduzido para cultura 2D e 3D dos experimentos *in vitro* e foi denominado de meio com estímulo osteogênico (MO).

4.3.2. Isolamento e cultivo das Células-Tronco Mesenquimais de Medula Óssea

As células-tronco mesenquimais da medula óssea foram obtidas de ratos Lewis transgênicos para a proteína eGFP. Os animais foram sacrificados com uma dose letal de quetamina/xilasina e tiveram suas tíbias e fêmures dissecados e removidos. Em capela de fluxo laminar, as epífises dos ossos coletados foram cortadas expondo a medula óssea, que foi extraída através do influxo de meio de cultura basal, DMEM (MB), com auxílio de uma seringa de 15 mL. As células foram coletadas em tubo de 50 mL (Falcon) e centrifugadas a 1400 rpm, por 10 minutos, a 10°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e, com o precipitado contendo a fração celular, obteve-se uma suspensão de células em 10 mL de MB. As células foram cultivadas em frascos para cultura celular T-75 (75 cm², TPP) contendo MB em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após 48h as células foram lavadas com PBS (solução tampão de fosfato padrão) para remoção das células não aderidas. O meio de cultura foi

trocado 3 vezes por semana. As células aderidas, semelhantes a fibroblastos, foram cultivadas e expandidas até próximas a 100% de confluência, quando foram repicadas 1:3. As culturas foram expandidas até a quarta passagem, quando as células foram desaderidas por tripsinização e cetrifugadas. O *pellet* resultante foi ressuspendido em MB, acrescido de SFB 10% para inativação da tripsina e as células em suspensão foram usadas para caracterização celular ou foram plaqueadas para a realização dos experimentos *in vitro* e *in vivo*.

4.3.3. Caracterização fenotípica das CTMMO por imunocitoquímica e citometria de fluxo

A análise das moléculas de superfície das CTMMO foi realizada por citometria de fluxo, para a caracterização da população de trabalho.

As CTMMO foram caracterizadas através da análise da presença das seguintes moléculas de superfície celular: CD90, CD54 e CD73. Essas proteínas são expressas por células-tronco mesenquimais, sendo então utilizadas como “marcadores” positivos destas células (Dominici *et al.*, 2006). Para se excluir a possibilidade de contaminação da cultura de células-tronco mesenquimais com células-tronco hematopoiéticas, também foi analisada a presença da molécula de superfície celular CD45, que é considerada um “marcador” positivo destas células hematopoiéticas.

Para a citometria de fluxo, foram utilizadas CTMMO na quarta passagem. Após o tratamento com tripsina, aproximadamente 1×10^6 células foram incubadas por 30 minutos a 4°C com os anticorpos primários supra citados diluídos 1:50 (BD Pharmingen). As células foram lavadas com PBS e

incubadas com anticorpo secundário marcado com Alexa 488 (Molecular Probes) por 30 minutos a 4°C. As células foram novamente lavadas em PBS, fixadas em formaldeído 2% e analisadas no citômetro de fluxo (FACSCalibur; Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Como controle negativo de fluorescência, também foi adicionado o anticorpo secundário às células não marcadas com o anticorpo primário. Células sem qualquer tipo de marcação foram fixadas e utilizadas para gerar o gráfico de tamanho versus granulosidade para estabelecer a população a ser analisada.

Um mínimo de 15.000 eventos foram adquiridos, utilizando o programa CELL Quest (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Os dados obtidos foram analisados no programa WinMDI 2.8. Primeiramente, a população de células a ser estudada foi delimitada através das regiões definidas no gráfico de tamanho versus granulosidade gerado pela análise de células que não foram submetidas a nenhum tipo de marcação. Posteriormente, utilizou-se um gráfico de histograma para delimitação da região do controle negativo de fluorescência referente às células que foram incubadas apenas com o anticorpo marcado com Alexa 488. A partir da definição destes parâmetros, iniciou-se a análise das células marcadas com os anticorpos primários e secundários.

4.3.4. Culturas 2D e 3D

As eGFP-CTMMO, obtidas da cultura primária e expandidas em DMEM até a quarta passagem, foram semeadas numa densidade de 5×10^4 /mL/poço em placas de cultura celular de 24 poços (Nunc), em monocamada (cultura 2D) ou em biomateriais (cultura 3D). As células cultivadas em monocamada, na

ausência de biomaterial, foram usadas como controle positivo. Nessa fase, os dois meios de cultura descritos anteriormente foram usados:

(1) Meio basal completo (MB) – DMEM

(2) Meio com estímulo osteogênico (MO) – DMEM suplementado

O teste de conversão de MTT e a avaliação da atividade da fosfatase alcalina foram realizados em culturas 2D e 3D. As análises morfológicas (ML e MEV) e por EDS foram realizadas apenas nas culturas 3D. As culturas foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ e analisadas ao final de 1, 3, 8 e 14 dias. Três experimentos independentes foram realizados e cada variável foi avaliada em triplicata (Fig. 4).

Posteriormente, as eGFP-CTMMO cultivadas em 3D por 3 dias em DMEM completo foram utilizadas como construtos para transplantes de eGFP-CTMMO, nos procedimentos *in vivo*. Esse meio foi selecionado para os estudos *in vivo* para não interferir no endereçamento das eGFP-CTMMO para diferentes tecidos e para permitir que fatores locais se expressem na diferenciação destas células em várias linhagens celulares.

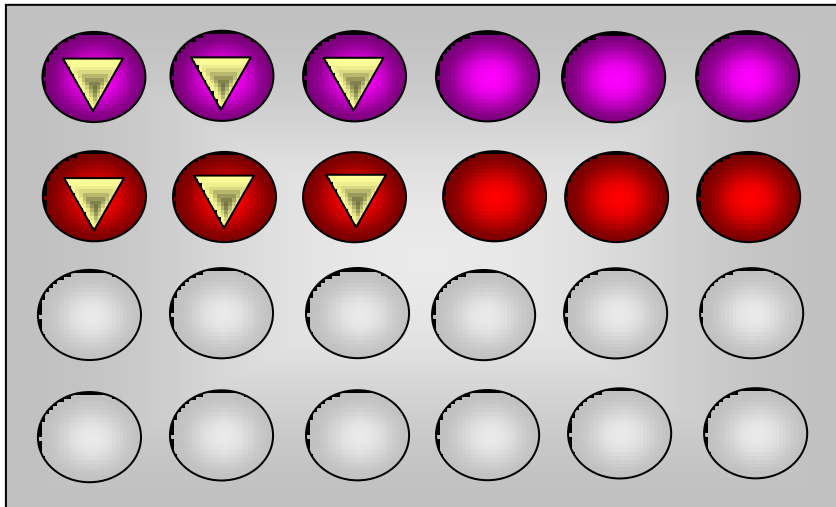


Figura 4: Desenho experimental. Células cultivadas em placas de 24 poços, para análise *in vitro*. Os experimentos foram realizados em triplicatas para cada tratamento (3D/2D, roxo-MB/vermelho-MO).

4.3.5. Análises das culturas 2D e 3D

4.3.5.1. Teste de conversão de MTT

O ensaio de MTT {*brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difeniltetrazolio]*} é um método colorimétrico, sensível, que mensura a viabilidade celular (Mosmann, 1983). Baseia-se na capacidade da enzima desidrogenase, presente na mitocôndria de células viáveis, em converter o sal de tetrazólio (MTT), solúvel em água, no cristal de formazan, produto insolúvel em água. Dessa forma, a conversão do MTT em formazan é realizada somente por células viáveis, indicando atividade mitocondrial e conseqüentemente, viabilidade celular. Os cristais de formazan são solubilizados e a densidade ótica pode ser determinada pelo espectrofotômetro.

Ao final de cada período experimental (1, 3, 8 e 14 dias), as células (5×10^4) das culturas 2D e 3D, tratadas com MB e MO e cultivadas em placas de 24 poços (Nunc), foram analisadas através do teste de conversão do MTT em cristais de formazan.

O meio de cultura (MB ou MO) foi retirado e 210 μ L dos respectivos meios foram adicionados em cada poço, assim como 170 μ L da solução de MTT (Sigma) 5 mg/mL. As placas de 24 poços foram incubadas por 2 horas, em estufa a 37°C e 5% de CO₂. A formação dos cristais de formazan foi observada ao microscópio de luz e as culturas foram fotografadas. Foram acrescentados a cada poço 210 μ L de SDS-10% HCl, para a solubilização dos cristais, e as placas permaneceram incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 18 horas. Após esse período, 100 μ L/poço foram transferidos para placas de 96 poços e o ensaio foi quantificado através da leitura dos valores de absorvância da solução resultante realizada a 595 nm em um leitor automático de micro placas (Elx800, Bio-tek instruments, Inc.).

Como controle da interferência do biomaterial na medição colorimétrica do MTT, as matrizes foram incubadas em meio de cultura (MB/MO), sem células, pelos mesmos períodos e condições experimentais.

4.3.5.2. Avaliação da atividade da fosfatase alcalina

A produção de fosfatase alcalina foi avaliada por meio do ensaio de NBT-BCIP (Gibco). Este ensaio é baseado na reação cromatogênica iniciada pela clivagem do grupamento fosfato presente no BCIP {*5-bromo-4-chloro-3'-indolilfosfato p-toluidine salt*} pela fosfatase alcalina presente nas células. A

reação produz um próton que reduz o NBT {*nitro-blue tetrazolium chloride*} a um precipitado insolúvel de cor púrpura (Valério *et al.*, 2004).

Ao final de cada período experimental (1, 3, 8 e 14 dias), as células (5×10^4) das culturas 2D e 3D, tratadas com MB e MO e cultivadas em placas de 24 poços (Nunc), foram analisadas através do ensaio de BCIP-NBT (Gibco).

Após cada período, o meio de cultura foi retirado, as células foram lavadas com PBS e incubadas por 2 horas, com 200 μL da solução BCIP-NBT, preparada de acordo com as instruções do fabricante. Após esse período, as células e a formação dos precipitados de cor púrpura foram observados em microscópio de luz e foram adicionados 210 μL de SDS 10% HCl para a solubilização dos precipitados de cor púrpura. As placas foram incubadas em estufa a 37°C e 5% CO_2 , novamente, por 18 horas. Após a solubilização, 100 μL de cada poço foram colocados numa placa de 96 poços e a densidade óptica da solução foi medida a 595 nm num leitor automático de micro placas.

Da mesma forma como no ensaio de MTT, como controle da interferência do biomaterial na medição colorimétrica do MTT, as matrizes foram incubadas em meio de cultura (MB/MO), sem células, pelos mesmos períodos e condições experimentais.

4.3.5.3. Análise morfológica

A análise morfológica por ML e MEV foi realizada nas culturas 3D, em MB e MO, após 1, 3, 8 e 14 dias. As amostras foram obtidas após a remoção das matrizes 3D das placas de 24 poços e foram processadas como descrito anteriormente. Através dessa análise observou-se a adesão e morfologia celular, secreção de matriz extracelular (MEC), além da distribuição

celular nos poros e da preservação da malha do biomaterial. A composição química das amostras foi determinada pelo EDS, após três dias de cultura, a fim de detectar a presença de cálcio na MEC, como um sinal indicativo de síntese da matriz óssea.

4.4. ESTUDO *IN VIVO*

4. 4. 1. Procedimento cirúrgico para implante do biomaterial/ transplante do construto

O modelo de alvéolo dentário de rato foi empregado como defeito ósseo experimental. Para a realização das cirurgias, os animais foram anestesiados através de injeção intramuscular de uma combinação de cloridrato de xilasina 2% (0,1mL/100g), utilizado como relaxante muscular, e cloridrato de quetamina 10% (0,1mL/100g), anestésico geral. Após serem anestesiados, os ratos Lewis machos usados como recipientes foram submetidos à extração dos primeiros molares superiores (Fig. 5). Utilizando-se um instrumento de Holleback para sindesmotomia e uma pinça dente de rato para luxação, foram extraídos os primeiros molares superiores direitos e esquerdos. Após confirmação da integridade dos dentes removidos e dos alvéolos, os alvéolos tratados foram completamente preenchidos. Os animais foram divididos em 2 grupos (Fig. 6) e receberam tratamentos distintos, nos alvéolos dos lados esquerdos (experimental): (i) dezesseis animais receberam biomateriais sem células, imediatamente implantados nos alvéolos dentários e (ii) dezesseis animais receberam construtos constituídos dos biomateriais semeados com 5×10^4 CTMMO, por meio de um micro porta-amálgama (ABC instrumentos cirúrgicos).

As bordas dos alvéolos, de ambos os grupos, foram suturadas com fio de sutura 6-0 (Biosut). Os animais receberam ração triturada e umedecida, além de água *ad libitum* nas primeiras 48 horas após a realização das cirurgias e foram sacrificados após 5, 21 e 35 dias por decapitação. Os crânios foram dissecados e as peças removidas foram imediatamente fixadas por imersão em formalina neutra tamponada (FNT) 10%, à temperatura ambiente, por 48 horas.

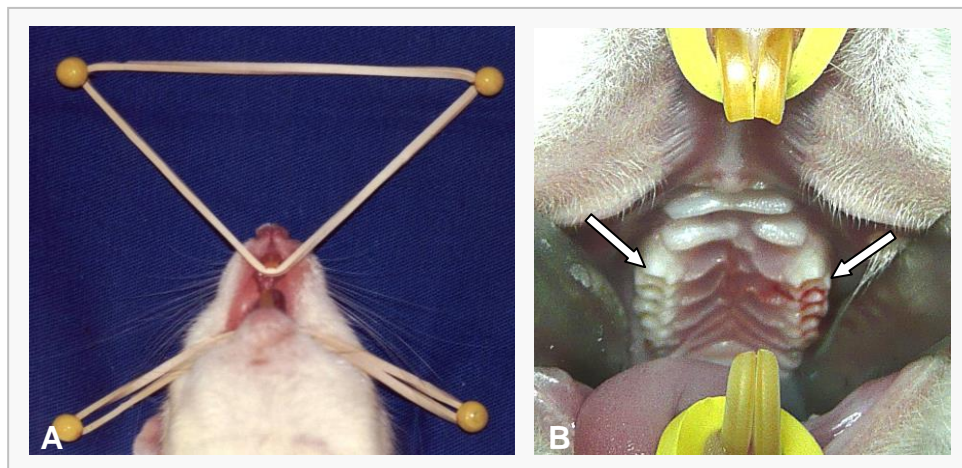


Figura 5: Imagens do preparo para o procedimento cirúrgico. (A) Animal anestesiado, posicionado na mesa operatória, para realização do procedimento cirúrgico. (B) Cavidade oral de rato receptor (Setas, primeiros molares superiores).

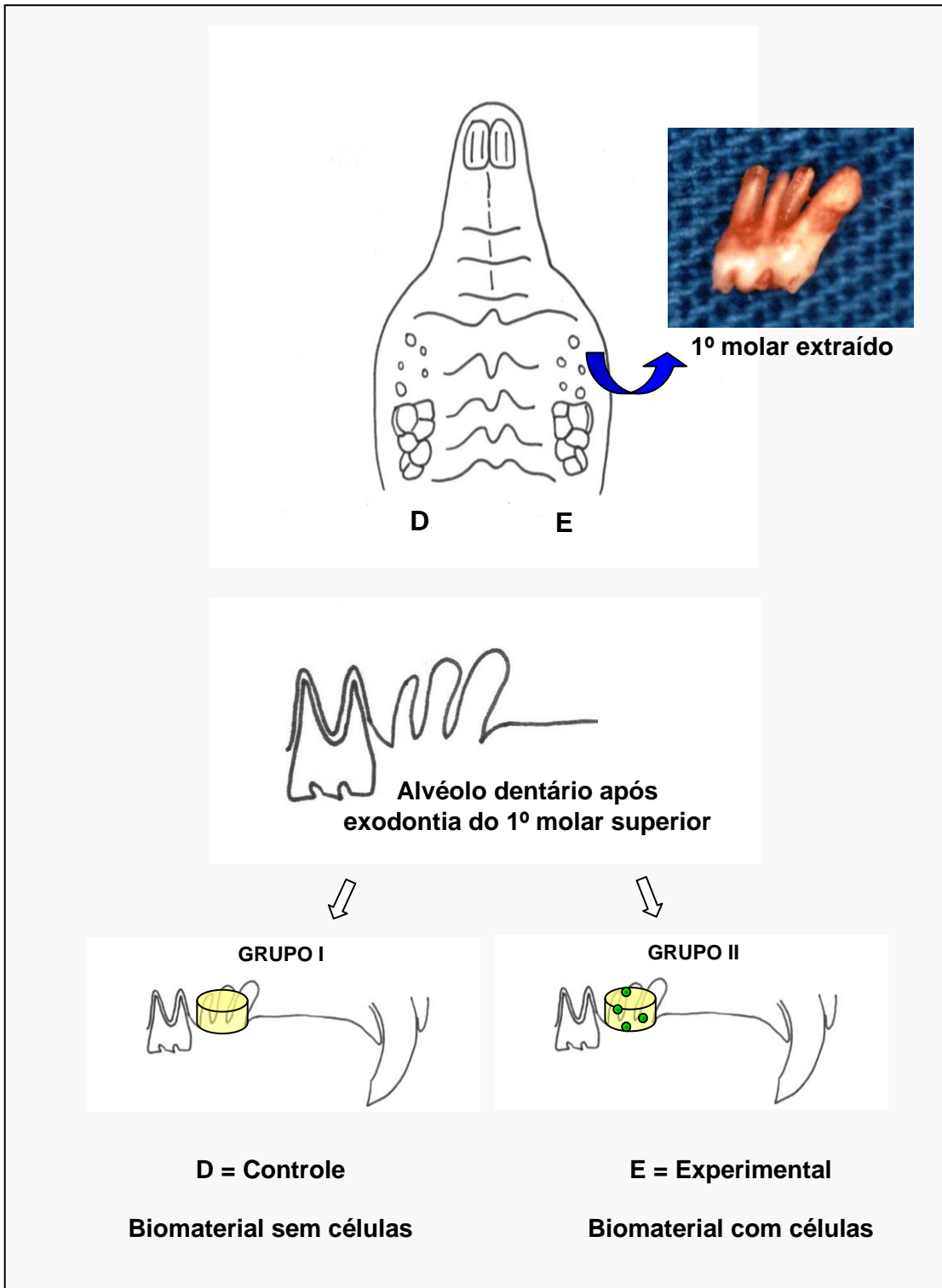


Figura 6: Representação esquemática do modelo experimental. Implante do biomaterial em alvéolos dentários gerados após a exodontia dos 1^{os} molares superiores, com e sem associação de células.

4.4.2. Análise morfométrica por meio de tomografia computadorizada

Após a fixação, os crânios dos ratos, submetidos ao implante do biomaterial, foram lavados em água corrente e mantidos em álcool 70%. Posteriormente, foram *scaneados* por meio de tomografia computadorizada Cone Beam (TCCB), em um tomógrafo i-CAT (Xoran Technologies, Ann Arbor, Michigan, Imaging Sciences International, Hatfield, PA) para a aquisição das imagens da maxila. A posição do cone emissor de raios-X foi padronizada de modo que a distância entre o emissor e a maxila fosse constante. As TCCB receberam um código numérico aleatório para permitir que fosse realizado um estudo cego. As TCCB foram adquiridas com espessura de corte de 0,5 mm; pitch de 0,5 mm; voltagem de 120 kV e amperagem de 350 mAs. Para a reconstrução tridimensional das imagens, o software Dental Slice software (version 2.1.1) foi utilizado. A Fig. 7A ilustra uma reconstrução 3D de um crânio. O plano transversal foi usado como referência nesse estudo, passando pelos alvéolos dentários distais dos primeiros molares extraídos, mesialmente aos segundos molares superiores (Fig. 7B). Para medir a área correspondente ao osso neoformado no interior dos alvéolos dentários, 3 cortes seriados representativos dos lados experimental e controle de cada animal foram capturados, totalizando 15 imagens por grupo. As imagens foram importadas para o software KS300 (KS 300 image processing, Carl Zeiss, Germany) e uma escala de cinza calibrada foi ajustada para reconhecer o tom de preto de mais baixa intensidade e o tom de branco de mais forte intensidade. Assim, áreas de alta intensidade, de tons cinza médio a branco, corresponderam ao tecido ósseo mais maduro. Para quantificar o nível de preenchimento ósseo, as áreas

de baixa intensidade (ABI), dentro da área de estudo (AE – Fig. 7D), foram descontadas da área total do alvéolo (ATA – Fig. 7C). Os pontos de baixa intensidade (ABI) correspondem a tecido conjuntivo frouxo, como matriz de fibrina, coágulo sanguíneo e processo inflamatório. A porcentagem de osso formado foi obtida através da seguinte fórmula, para corrigir erros devido a variações de tamanho dos alvéolos dentários de animais diferentes:

$$\text{Preenchimento médio do alvéolo\%} = \frac{[\text{ATA} - \text{ABI} (\text{mm}^2)]}{\text{ATA} (\text{mm}^2)} \times 100.$$

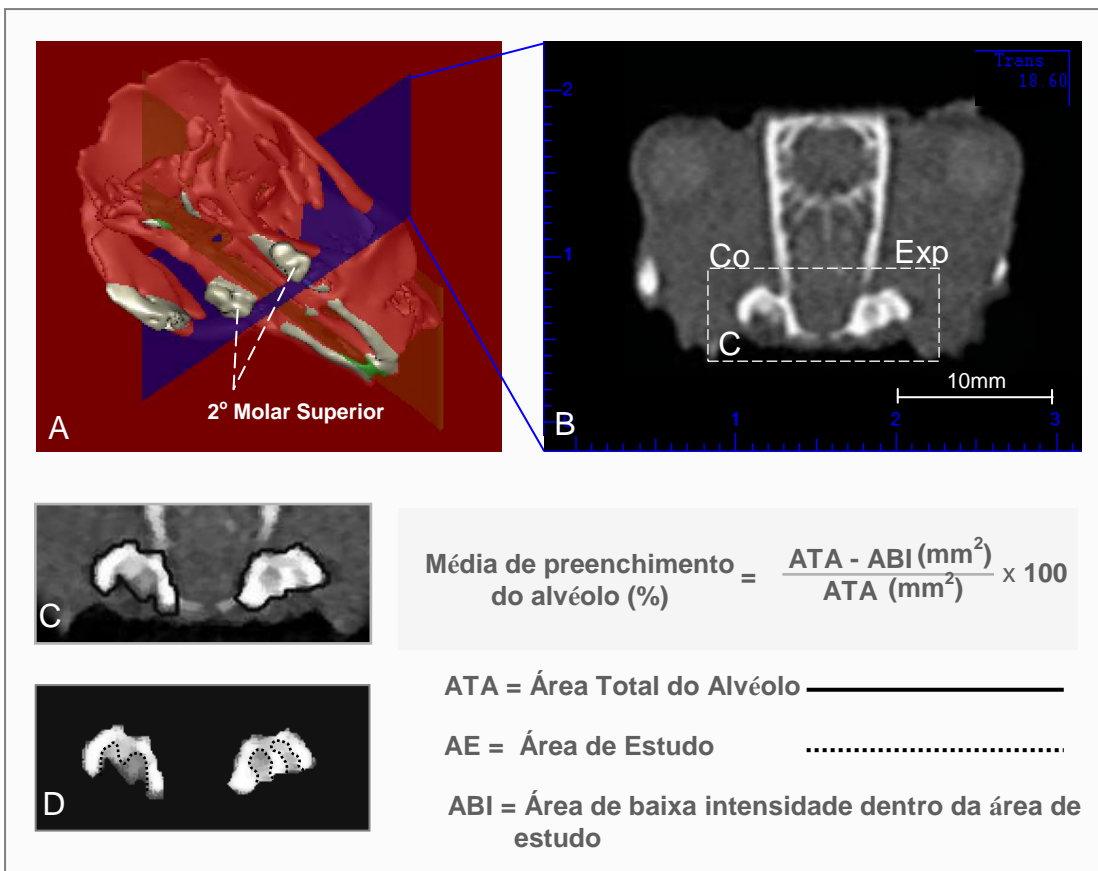


Figure 7: Análise morfométrica utilizando imagens obtidas por TCCB. (A) Reconstrução 3D de crânio de rato. O plano transversal foi usado como referência para a obtenção dos cortes usados na morfometria. (B) TCCB mostrando a área de estudo dos alvéolos experimental (Exp, lado esquerdo) e controle (Co, lado direito). (C) Medição da área total do alvéolo (ATA, delimitada pela linha preta contínua). (D) Área de estudo (AE, delimitada pela linha preta pontilhada) no alvéolo dentário, onde áreas de baixa intensidade (ABI) foram medidas. Fórmula empregada no cálculo da porcentagem média de preenchimento dos alvéolos.

4.4.3. Análise histológica e coloração por TRAP

Após a aquisição das imagens por TCCB, as maxilas foram desmineralizadas em solução tamponada de EDTA 10% (pH entre 7,2 e 7,4), à temperatura ambiente, por um período de aproximadamente 40 dias. A solução foi renovada duas vezes por semana. Após a desmineralização, as maxilas foram lavadas *overnight* em água corrente e divididas ao longo do plano sagital mediano para separar os alvéolos esquerdos dos direitos. As peças foram processadas seguindo-se as etapas de inclusão:

- a) Fase de desidratação: imersão das amostras em séries crescentes de álcool etílico (70% I e II, 80% I e II, 90%, 95%, absoluto I, II e III) por um período de 30 minutos em cada banho.
- b) Fase de diafanização: imersão das amostras em três banhos de xilol por um período de 20 minutos cada.
- c) Fase de infiltração: imersão das amostras em três banhos de paraplast X-Tra a 58°C, sendo o primeiro de 30 minutos e os demais de 40 minutos cada.
- d) Fase de inclusão: as amostras foram incluídas em paraplast X-Tra fluidificado contido em moldes pré-definidos/fabricados e posicionadas de modo que os alvéolos pudessem ser cortados longitudinalmente (cortes sagitais)

Cortes sagitais de 6 µm foram montados em lâminas histológicas previamente tratadas com silano 3%. As lâminas foram armazenadas para realização de coloração com hematoxilina e eosina (HE) e imunohistoquímica. Para a realização da técnica de fosfatase ácida resistente ao tartarato (*Tartrate-resistant acid phosphatase staining* - TRAP) foi utilizado o kit de fosfatase ácida leucócito-específico (TRAP 387A-1KT Sigma, St. Louis, USA).

Os cortes foram corados com solução de TRAP por 1 hora a 37°C e contra coradas com hematoxilina de Mayer, de acordo com instruções do fabricante. Células TRAP-positivas mostraram uma coloração vermelho-escura ou roxa. Amostras de 21 dias foram selecionadas para o desenvolvimento da técnica histoquímica para TRAP com o objetivo de investigar a reabsorção do biomaterial por células da linhagem osteoclástica

4.4.4. Análise imunohistoquímica

Para localizar o destino, a distribuição e a diferenciação das CTMMO transplantadas nas matrizes 3D, a proteína eGFP foi usada como marcador. As lâminas foram desparafinizadas em xilol, re-hidratadas por meio de uma série gradual de etanol e lavadas em solução salina tamponada com fosfato (PBS). Os cortes foram então imersos em H₂O₂ 3% (1 hora) para neutralizar a atividade da peroxidase endógena e incubados com BSA 2% em PBS (1 hora) para bloquear os sítios de ligação inespecíficos. Posteriormente, os cortes foram incubados *overnight* a 4°C com anticorpos de coelho anti-GFP de rato (1:100, Abcam, Cambridge, UK). O anticorpo secundário biotilado anti-coelho (Universal LSAB™+ Kit/HRP, Rb/Mo/Goat K0690-1Dako, Glostrup, Denmark) foi aplicado por 30 minutos à temperatura ambiente. Após lavagens em PBS, os cortes foram incubados com conjugado peroxidase streptavidina por 30 minutos à temperatura ambiente. A reação foi revelada com uma solução contendo 350 mM 3,3'-diaminobenzidina (Sigma Chemical Co.) e H₂O₂ 1% em PBS. As lâminas foram contra-coradas com hematoxilina de Mayer. Todas as imuno-reações foram realizadas numa mesma bateria para evitar diferenças

entre os ensaios. Os controles negativos foram realizados pela omissão do anticorpo primário.

4.5. Análise estatística

Os dados dos testes de conversão de MTT e de avaliação da atividade de fosfatase alcalina foram submetidos à análise de variância. As médias foram comparadas e os dados foram analisados pelo teste Student-Newman-Keuls (Instat, version 3.00, 32 Win 95/NT; GraphPad Software, San Diego, Calif., USA), sendo considerada diferenças significativa quando $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) e $p < 0,001$ (***). Os resultados apresentados representam a média o desvio padrão (\pm DP).

Os resultados das análises morfométricas realizadas nas imagens obtidas por TCCB, medidas nos lados controle e experimental da mesma unidade amostral, foram submetidos ao teste de Wilcoxon. Os dados foram apresentados na forma de percentual. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5. Resultados

5.1. Caracterização da matriz 3D de quitosana e gelatina

O aspecto macroscópico final e a arquitetura tridimensional do *scaffold* assemelharam-se ao de uma esponja. Assim como trabéculas ósseas, a matriz consistiu-se de um arranjo homogêneo de poros (Fig. 8A-C). A figura 8C ilustra o tamanho padrão de biomaterial utilizado nos experimentos *in vitro* e *in vivo*. A auto-fluorescência da quitosana foi mantida no composto, conforme observado em imagem obtida em microscópio confocal (Fig. 9A-B). As conexões entre os poros do biomaterial foram observadas na figura 9B e estão indicadas pelas setas. Matrizes tridimensionais porosas adequadas para o cultivo celular foram obtidas a partir dos polímeros naturais, quitosana e gelatina, ligados quimicamente pelo glutaraldeído. Essa ligação foi efetiva uma vez que conferiu ao composto uma estabilidade necessária à manutenção de sua estrutura, observada até o último período experimental estudado, tanto *in vitro* (14d) (Fig. 9E e Fig. 18C), quanto *in vivo* (35d) (Fig. 23B). O biomaterial permaneceu intacto após 14 dias de imersão em meios MB/MO e incubação em cultura. Este achado pôde ser observado nas análises de MEV (Fig. 9E) e de ML (Fig. 18C). A análise de MEV mostrou poros interconectados, de diferentes tamanhos, variando em torno de 200 μm , com paredes relativamente lisas (Figs. 9C-9E). Estas características das paredes foram confirmadas pela análise confocal (Figs. 9A e B).

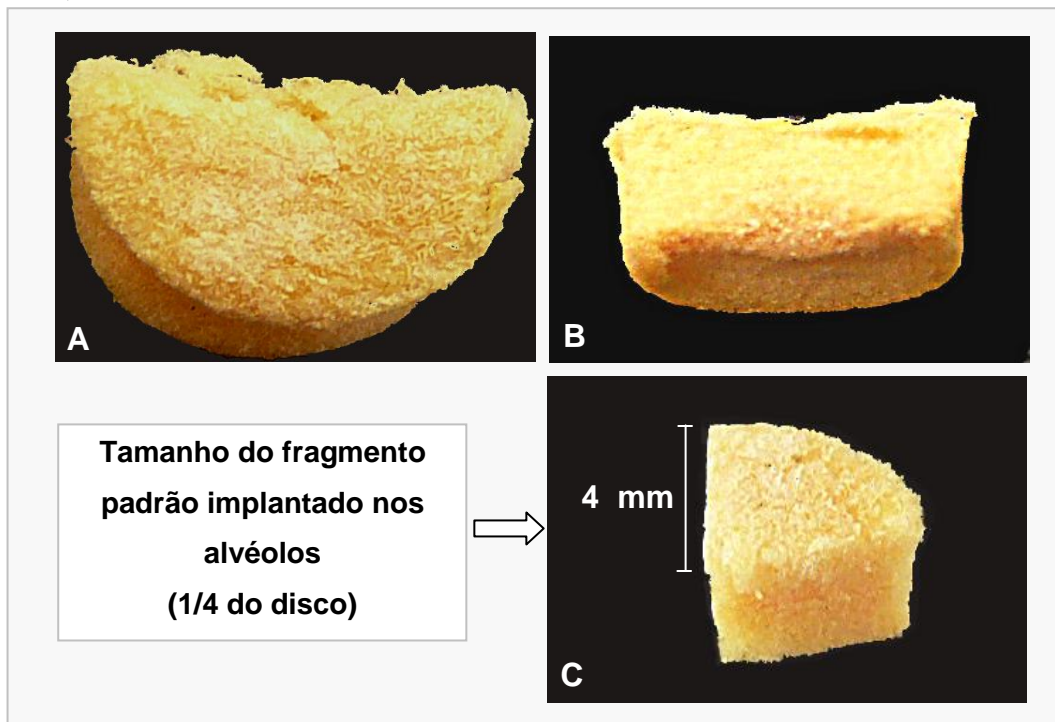


Figura 8: Caracterização macroscópica da matriz 3D. (A) aspecto macroscópico de um hemi-disco de quitosana, visão superior. Note a consistência e aspecto semelhante a uma esponja. (B) Vista lateral da espessura do disco. (C) Fragmento de tamanho padrão inserido nos alvéolos – $\frac{1}{4}$ do disco.

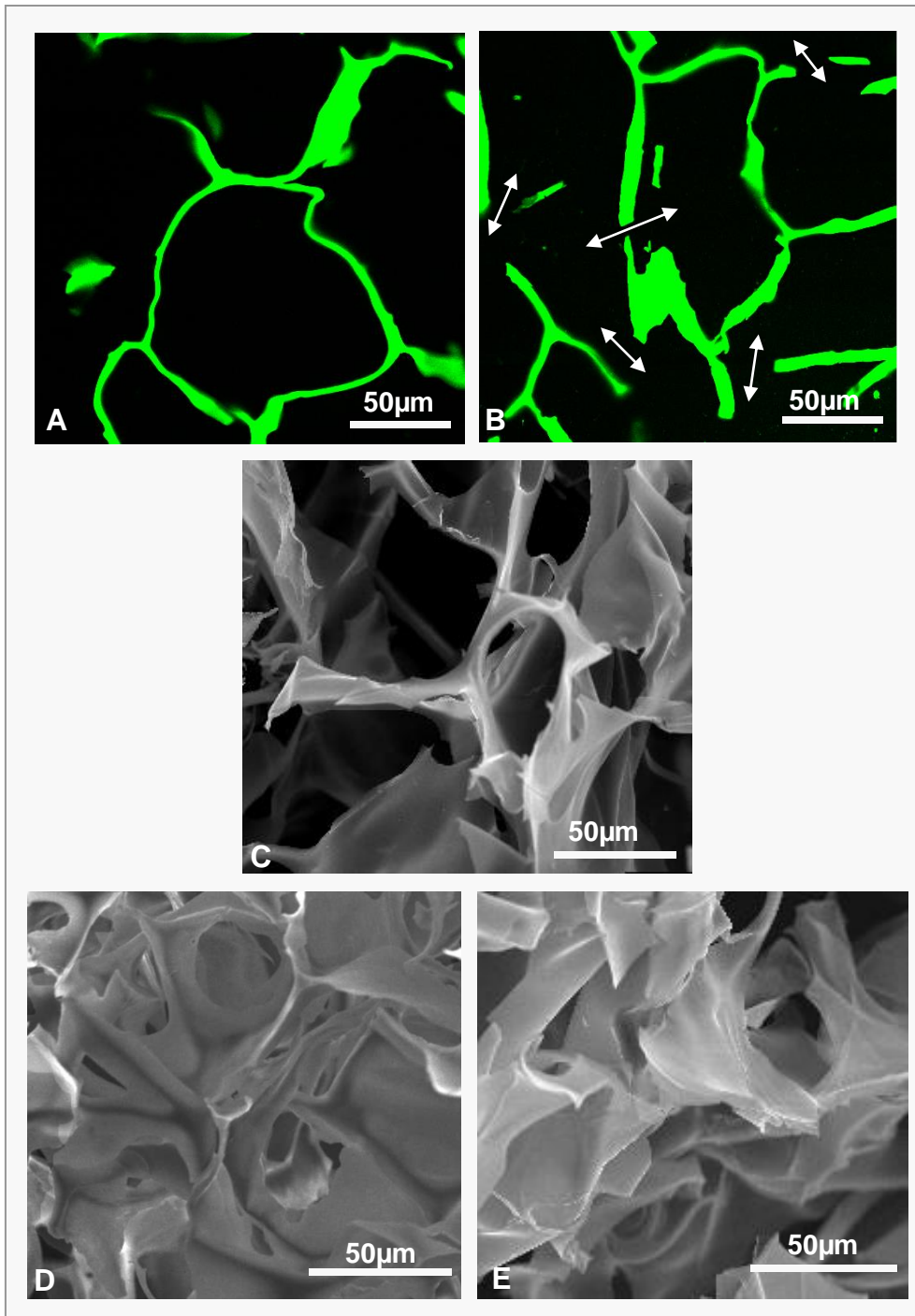


Figura 9: Caracterização morfológica da matriz 3D. (A) Imagem de microscopia confocal mostrando a preservação da autofluorescência da matriz de quitosana, associada à gelatina. Note a conformação de um poro do biomaterial. (B) Imagem da interconexão entre os poros da quitosana-gelatina (setas). (C) Aspecto microestrutural (MEV) da esponja de gelatina e quitosana. (D) Estrutura do biomaterial imediatamente após sua síntese e (E) após 14 dias de imersão em meio de cultura. Note preservação da alta porosidade e microestrutura do biomaterial.

Para a formação de poros, o método usado foi o de congelamento e liofilização do material. A porosidade aparente da matriz de quitosana-gelatina, medida pelo método de Arquimedes foi de $95,9 \pm 0,2\%$. A análise química por EDS mostrou que a superfície foi constituída exclusivamente de carbono e oxigênio (Fig. 10A), detectada pelos picos específicos e esperados para polímeros orgânicos. Picos no espectro correspondem aos elementos presentes na amostra. O nível de energia do pico indica qual o elemento. Os resultados EDS foram confirmados pelos resultados de DRX. O espectro de difração de raios X da amostra mostrou um pico largo ($2\theta = \sim 20^\circ$), que sugere uma fase amorfa do composto de quitosana-gelatina (Fig. 1G). Na análise de DRX, picos representam um composto cristalino, enquanto os picos mal definidos correspondem a uma estrutura amorfa. A quitosana e a gelatina são polímeros naturais, orgânicos, e, dessa forma, não era esperado um pico bem definido de uma estrutura cristalina organizada.

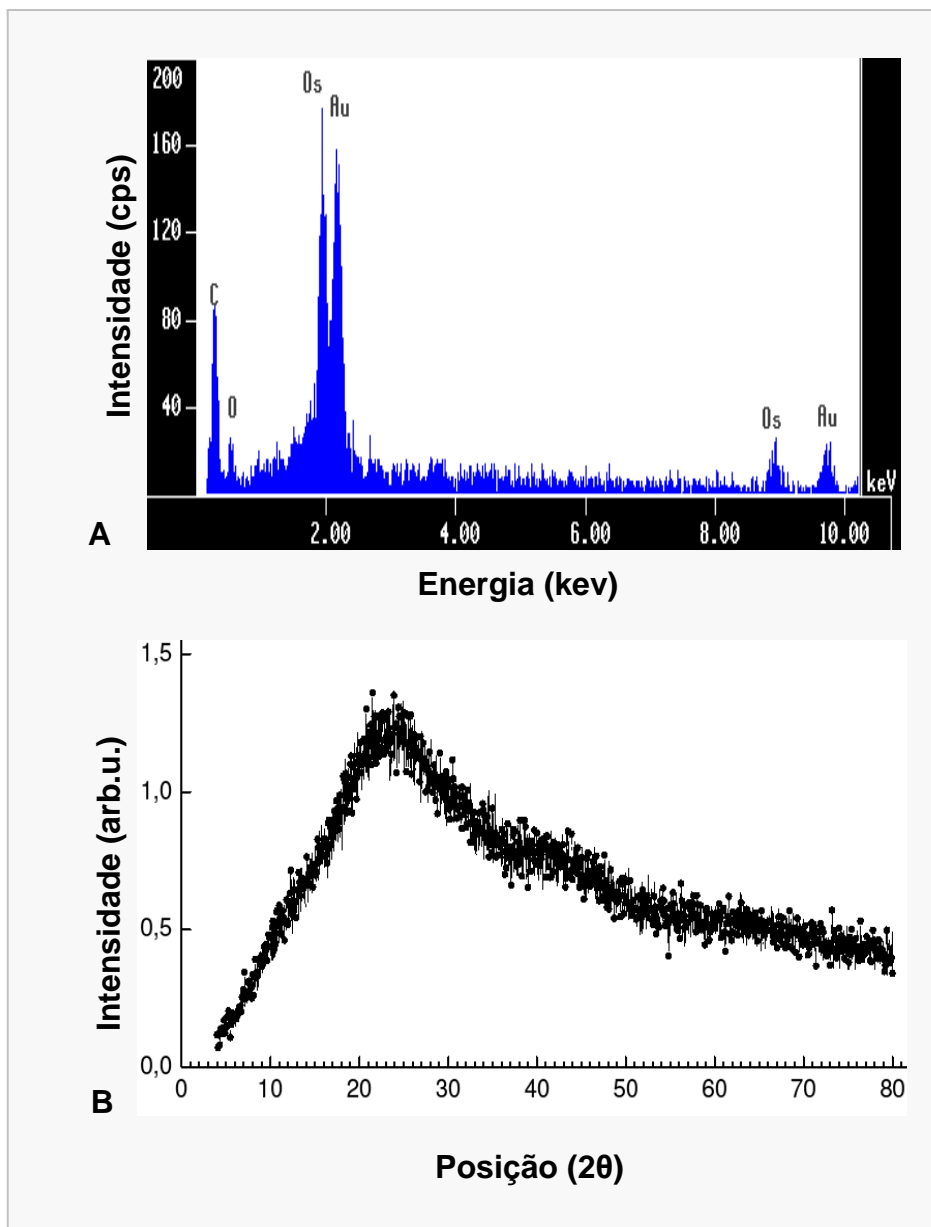


Figura 10: (A) Análise de elementos químicos da superfície da quitosana-gelatina, obtida pela análise EDS. (B) Composição amorfa da matriz de quitosana-gelatina, observada por XRD.

5.2. Caracterização das CTMMO

CTMMO apresentaram morfologia típica, em forma de fuso, com adesão ao plástico e organização em monocamada (Fig. 11A). A análise/caracterização fenotípica das BMMSC indicou alta expressão de marcadores não-hematopoiéticos, CD54 (95%), CD73 (94%) e CD90 (87%). Além disso, não houve expressão de CD45 em 97% das células (Fig. 11B). Assim, as células isoladas preencheram os critérios utilizados para definir as CTMMO.

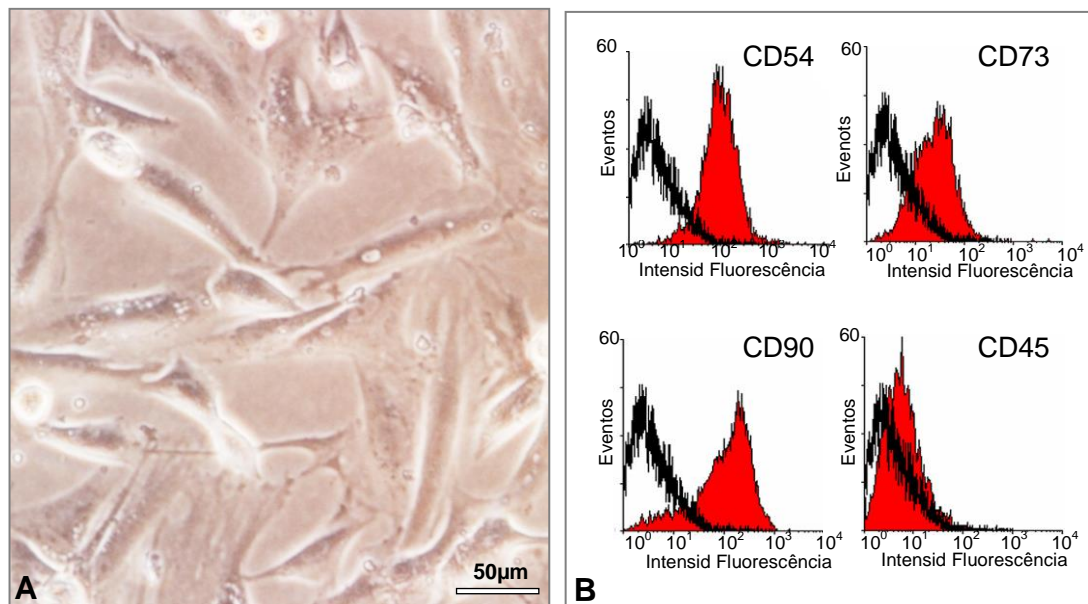


Figura 11: (A) Fotomicrografia de microscopia de luz de CTMMO mostrando a aderência ao plástico e a forma fusiforme característica. (B) Análise fenotípica das CTMMO. Histogramas de intensidade média de fluorescência versus número de eventos demonstram o padrão de expressão típico de antígenos de superfície (CD54, CD73, CD90 e CD45).

5.3. Análises *in vitro*

5.3.1. Ensaio de MTT

As células foram capazes de converter o MTT em cristais de formazan em ambos os meios utilizados MB/MO, em monocamada e também nas matrizes 3D de quitosana-gelatina (Figs. 12A, 12B-D). Foi possível visualizar os cristais de formazan no interior do material, demonstrando células viáveis dentro do poro da matriz 3D (Fig. 12C). A medição da densidade óptica do formazan dissolvido indicou maior conversão do MTT, após um dia na cultura 3D com meio OS, em comparação com as culturas em monocamada tanto no médio MB, quanto no meio MO ($p < 0,001$). No entanto, após três dias de cultura, o maior nível de conversão de MTT foi observado na cultura 3D com meio MB, com diferenças estatisticamente significativas, em relação às culturas em monocamada, independentemente do meio ($p < 0,001$). No período de 3 dias, as culturas apresentaram confluência próxima a 100%, à inspeção visual em microscópio de luz invertida.

O meio MB manteve maior nível de conversão de MTT nos períodos de 8 e 14 dias, em culturas 2D ($p < 0,01$) e 3D ($p < 0,001$), respectivamente. As culturas 3D mostraram níveis superiores de conversão de MTT em relação às culturas 2D em ambos os meios avaliados, sugerindo a viabilidade celular em matrizes porosas de quitosana-gelatina.

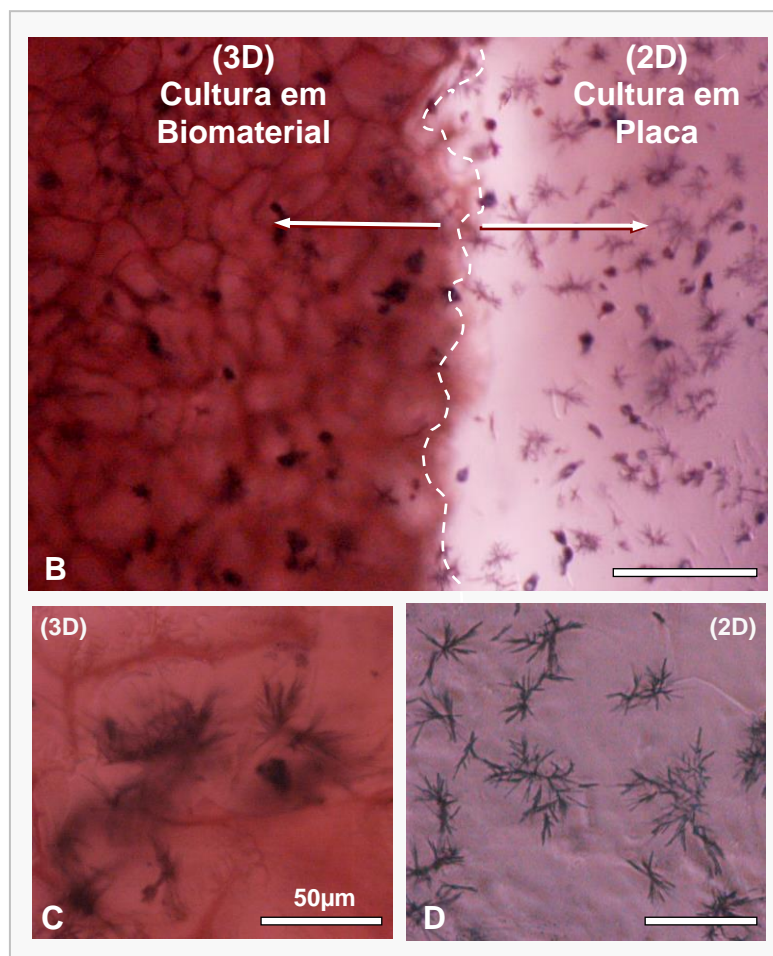
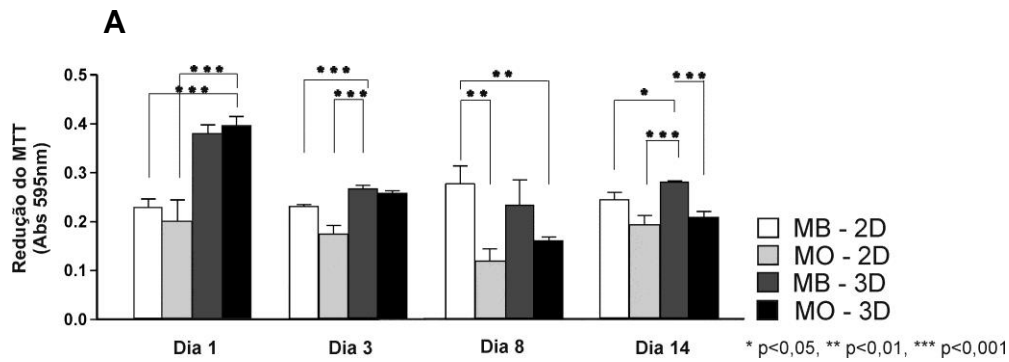


Figura 12: (A) Redução do MTT em cristais de formazan (medido por meio de absorbância DP \pm a 595 nm), por CTMMO cultivadas (em monocamada e em matrizes 3D), em meio MB/MO, nos períodos de 1, 3, 8 e 14 dias. (B-D) Fotomicrografias representativas da redução do MTT (B) Visualização de cristais de formazan em cultura 3D (esquerda) e em cultura 2D (direita). A figura C mostra cristais de formazan no interior do poro da matriz 3D e a figura D mostra cristais em monocamada.

5.3.2. Atividade de fosfatase alcalina

A atividade de fosfatase alcalina foi detectada em culturas 2D e 3D em ambos os meios de cultura MB/MO para todos os períodos avaliados. Maiores níveis de atividade da fosfatase alcalina foram observados nas culturas em monocamada, mas nenhum meio foi estatisticamente superior (Fig. 13A). As culturas 3D em meio MO apresentaram níveis mais baixos de fosfatase alcalina, em relação às culturas 2D em meio MB, com diferenças significativas nos dias 3 ($p < 0,01$), 8 e 14 ($p < 0,001$). As figuras 13B e 13C mostram a atividade de fosfatase alcalina em culturas 3D e 2D em microscópio de luz invertida.

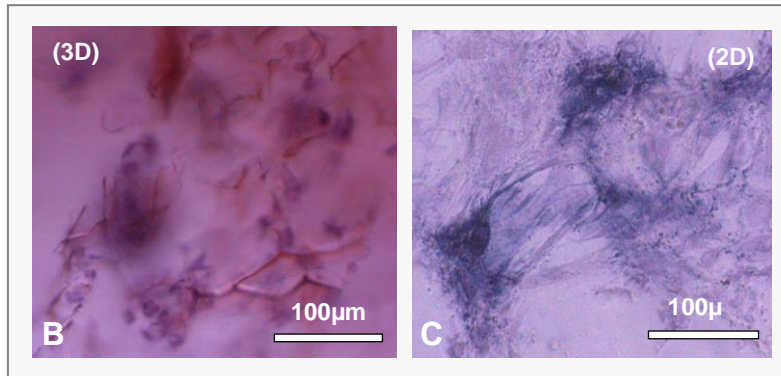
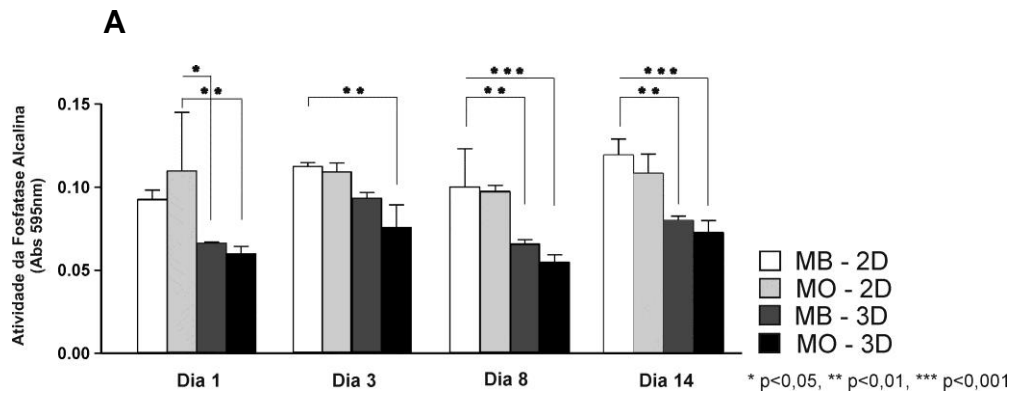


Figura 13: (A) Atividade de fosfatase alcalina através do ensaio de BCIP-NBT (medido por meio de absorvância DP \pm a 595 nm), em CTMMO cultivadas (em monocamada e em matrizes 3D), em meio MB/MO, nos períodos de 1, 3, 8 e 14 dias. (B e C) Fotomicrografias representativas da atividade de fosfatase alcalina, evidenciada pelo ensaio BCIP-NBT, em culturas 3D e 2D, respectivamente.

5.3.3. Análise morfológica

A manutenção da arquitetura da matriz 3D e a viabilidade, distribuição e morfologia das células semeadas foram avaliadas por ML e MEV e documentadas em fotomicrografias nos dias 1, 3, 8 e 14. Os aspectos morfológicos foram semelhantes no MB e MO. Na ML, a matriz apresentou uma rede de trabéculas finas coradas pela eosina (Fig. 14A-B 16A-E, 18A-D). Nas primeiras 24 horas após a semeadura de células, em ambos os meios, a maioria das células tinha forma esférica ou elíptica (Figs. 14A, 15A-B). Algumas células achatadas se espalharam sobre as lâminas da matriz e exibiram extensões citoplasmáticas, como filopódios, sugerindo áreas de adesão focal entre as membranas celulares e a superfície da matriz de quitosana-gelatina (Fig. 14B; 15C-D).

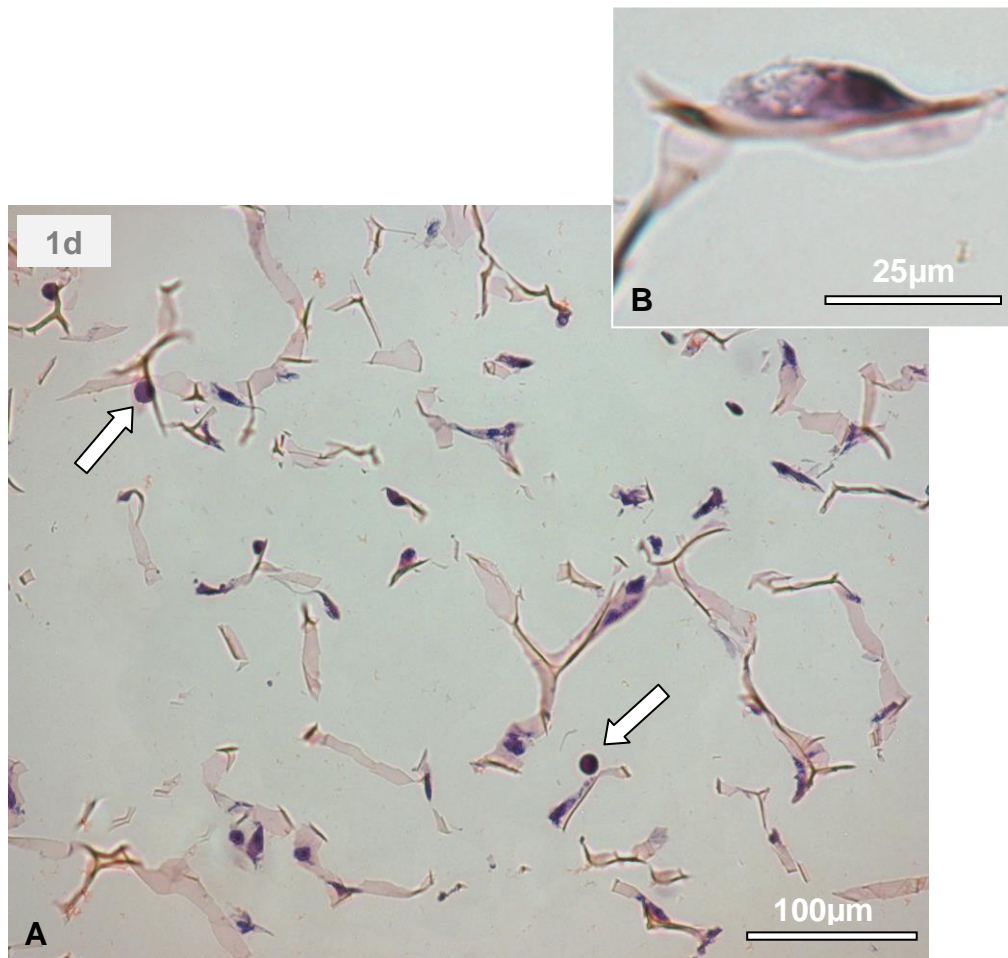


Figura 14: Fotomicrografias de microscopia de luz (ML) representativas de culturas 3D de CTMMO, em meio MB/MO, após 1 dia de cultura. HE. A matriz de quitosana-gelatina encontra-se corada em rosa pela eosina e as CTMMO, em roxo pela hematoxilina. A figura A mostra células aderidas à quitosana esféricas (setas) e a figura (B) mostra em detalhe células fibroblastóides alongadas.

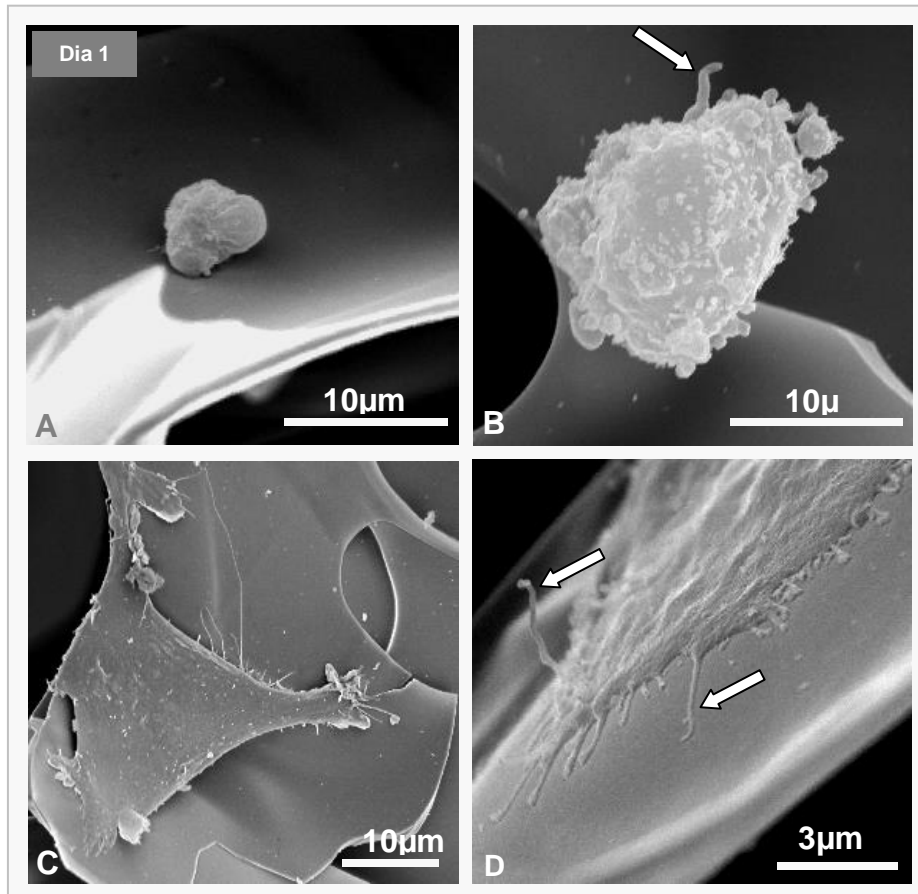


Figure 15: Fotomicrografias representativas de MEV de culturas 3D de CTMMO, em meio MB/MO, após 1 dia de cultura (A-D). CTMMO com morfologia arredondada, não aderida foi observada próxima à lâmina do biomaterial (A); Células com alguns pontos de adesão e emissão de discretos alongamentos filopodiais (seta) (B); Alongamento das células que adquirem aspecto de fibroblastos (C) devido à interação com o biomaterial por meio de grandes áreas de adesão (D). Prolongamentos citoplasmáticos filopodiais são apontados pelas setas (D).

Após 3 dias de cultura, o número de células aumentou (Figs. 16A, 17D) e elas se apresentaram mais uniformemente distribuídas por toda a malha de quitosana-gelatina. Muitas células tinham um aspecto fusiforme, fibroblasto-*like*, com nucléolo evidente e grânulos citoplasmáticos (Figs. 16C-D). Células nesta fase foram vistas organizadas em grumos, semelhantes a nódulos celulares próximos à superfície do biomaterial (Figs. 16E, 17A-C).

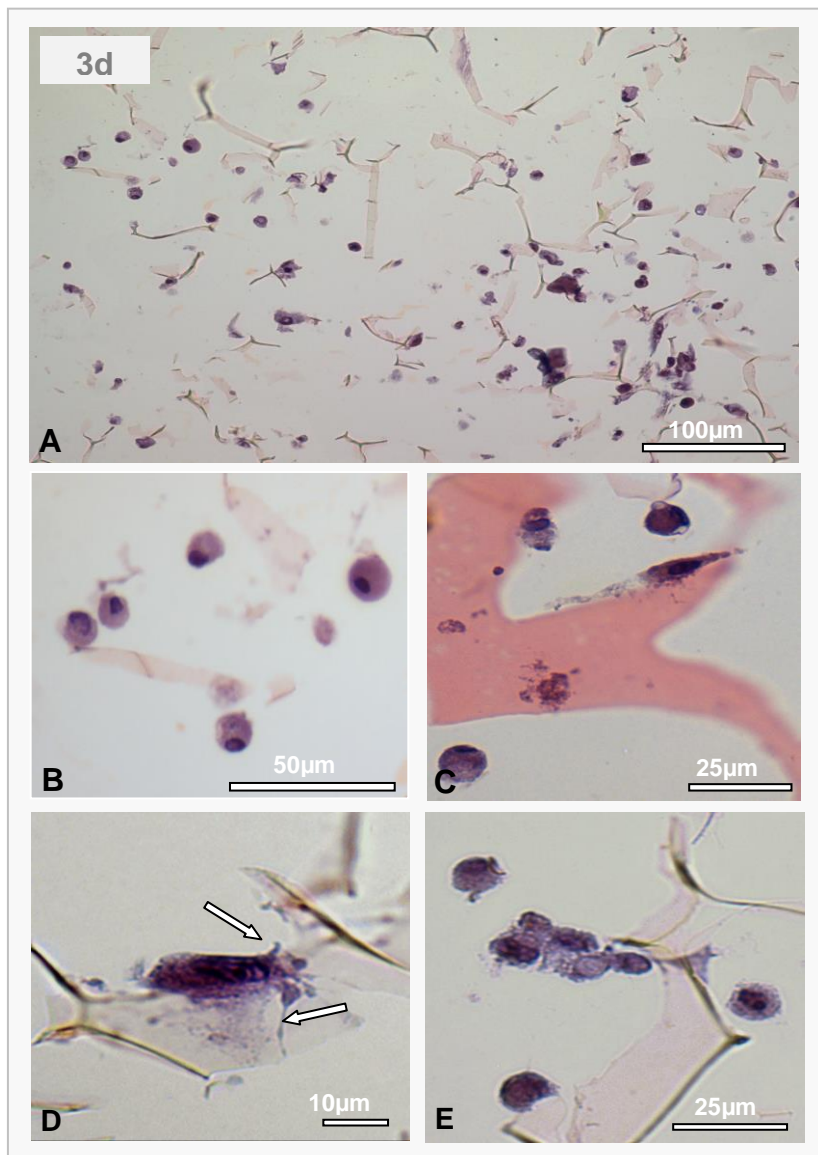


Figura 16: Fotomicrografias de microscopia de luz (ML) representativas de culturas 3D de CTMMO, em meio MB/MO, após 3 dias de cultura. HE. Note maior número de células aderidas e não aderidas em relação ao 1º dia (A); muitas células esféricas (B) ou fibroblastóides (C) aderidas ao *scaffold*; células com citoplasma granular, nucléolo evidente e emissão de filopódios (setas) (D); células esféricas aderidas, livres e em grumos (E).

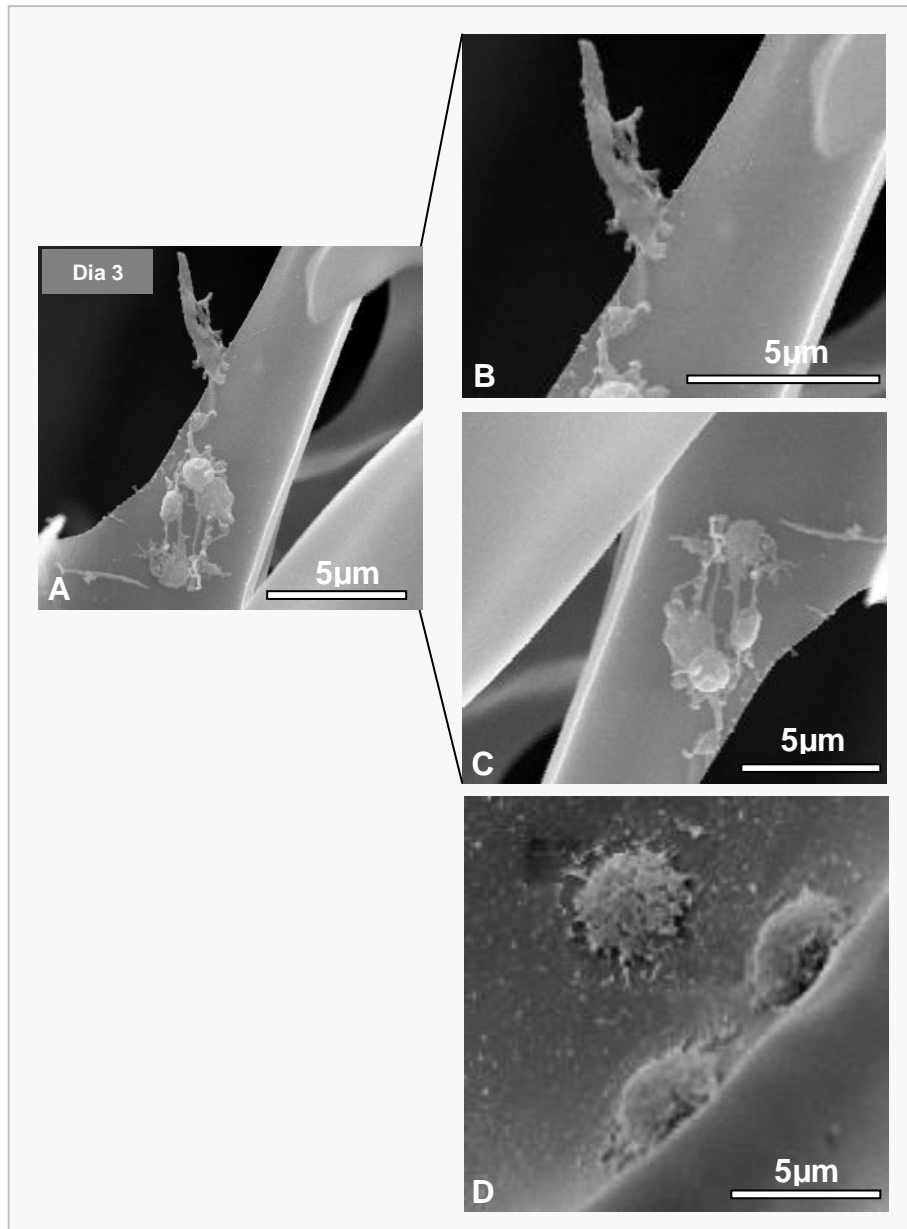


Figura 17: Fotomicrografias representativas de MEV de culturas 3D de CTMMO, em meio MB/MO, após 3 dias de cultura. Foi observado um número maior de células por campo (A); células apresentavam-se parcialmente aderidas (B); em grupos, interconectadas (C) ou isoladas (D) sobre as lâminas de quitosana.

Em contrapartida, entre 8-14 dias, o número de células observadas na superfície e no interior dos poros da matriz diminuiu (Fig. 18). Depois de oito dias, a ML e MEV revelaram algumas células, isoladas ou aglomeradas, aderidas à quitosana (Figs. 18A, 19A). As membranas celulares espalharam-se ativamente na superfície da matriz (Fig. 19B). Curiosamente, mesmo após a imersão nos vários banhos do processamento histológico das amostras, foi possível observar células viáveis não aderidas, porém enclausuradas no interior dos poros da matriz (Fig. 18B).

No período experimental mais longo (14 d), a rede de quitosana estava preservada (Figs. 9E, 18C), mas haviam poucas células distribuídas de forma dispersa (Fig. 18D). Estas células, com morfologia alongada e aplainada, permaneceram aderidas ao biomaterial construindo pontes entre as lâminas de quitosana (Fig. 19C). A análise por MEV mostrou algumas imagens sugestivas de secreção de MEC, que foram mais evidentes aos 8 e 14 dias de cultura (Figs. 19B-C). De fato, na análise EDS destas áreas (ver área de MEC em fotomicrografia MEV - Fig. 20) detectou-se a presença de cálcio, após três dias de cultura em ambos os meios de cultura MB/MO utilizados (Figs. 20B e D). Como controle negativo, a análise de EDS revelou a ausência de cálcio sobre as superfícies do *scaffold* livres de células ou debris (ver na área de SB em fotomicrografia MEV - Fig. 20A e 20C).

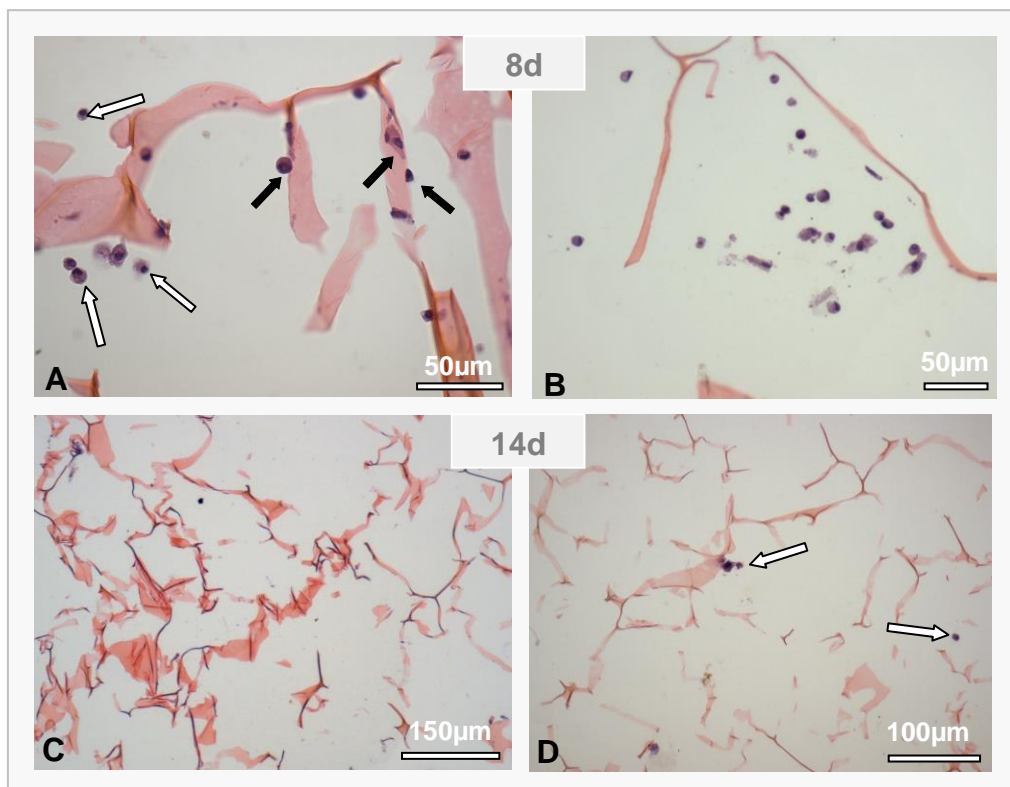


Figura 18: Fotomicrografias de microscopia de luz (ML) representativas de culturas 3D de CTMMO, em meio MB/MO, após 8 e 14 dias de cultura. HE. No 8º dia de cultura, células esféricas aderidas (setas pretas) e não aderidas (setas brancas) foram observadas (A). Células livres foram mantidas dentro da estrutura do poro (B). No final de 14 dias, a microestrutura do biomaterial foi preservada (C), mas somente algumas células esparsas (setas) foram observadas (D).

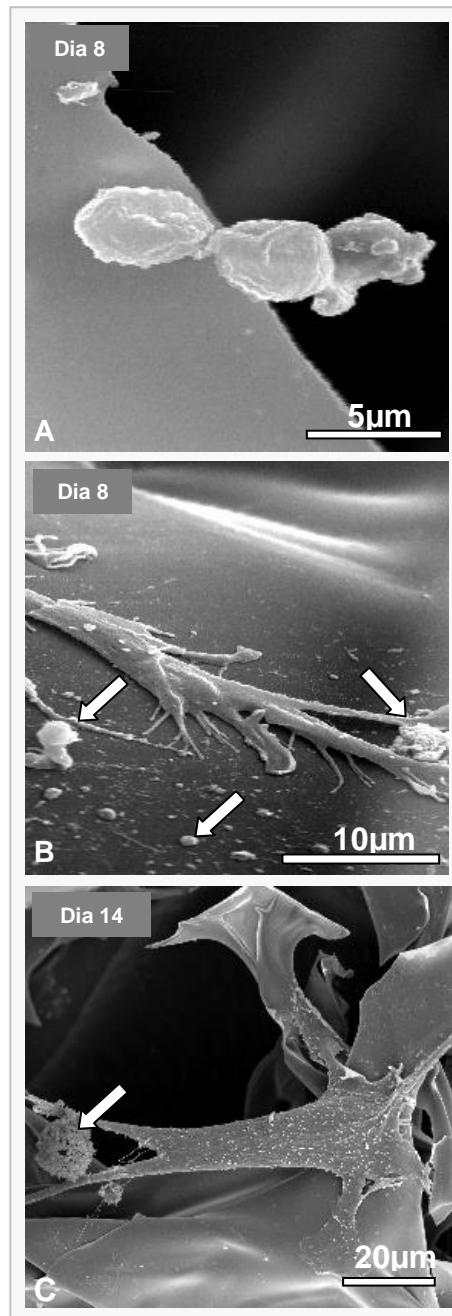


Figura 19: Fotomicrografias representativas de MEV de culturas 3D de CTMMO, em meio MB/MO, após 8 e 14 dias de cultura. (A) 8 dias: presença de células associadas junto as lâminas do biomaterial; (B) 8 dias: Algumas células com morfologia achatada e numerosos filopódios estabelecem íntimo contato com o biomaterial. (C) 14 dias: poucas células presentes ainda formando pontes que interconectam lâminas do biomaterial. Imagens sugestivas de matriz extracelular são indicadas por setas.

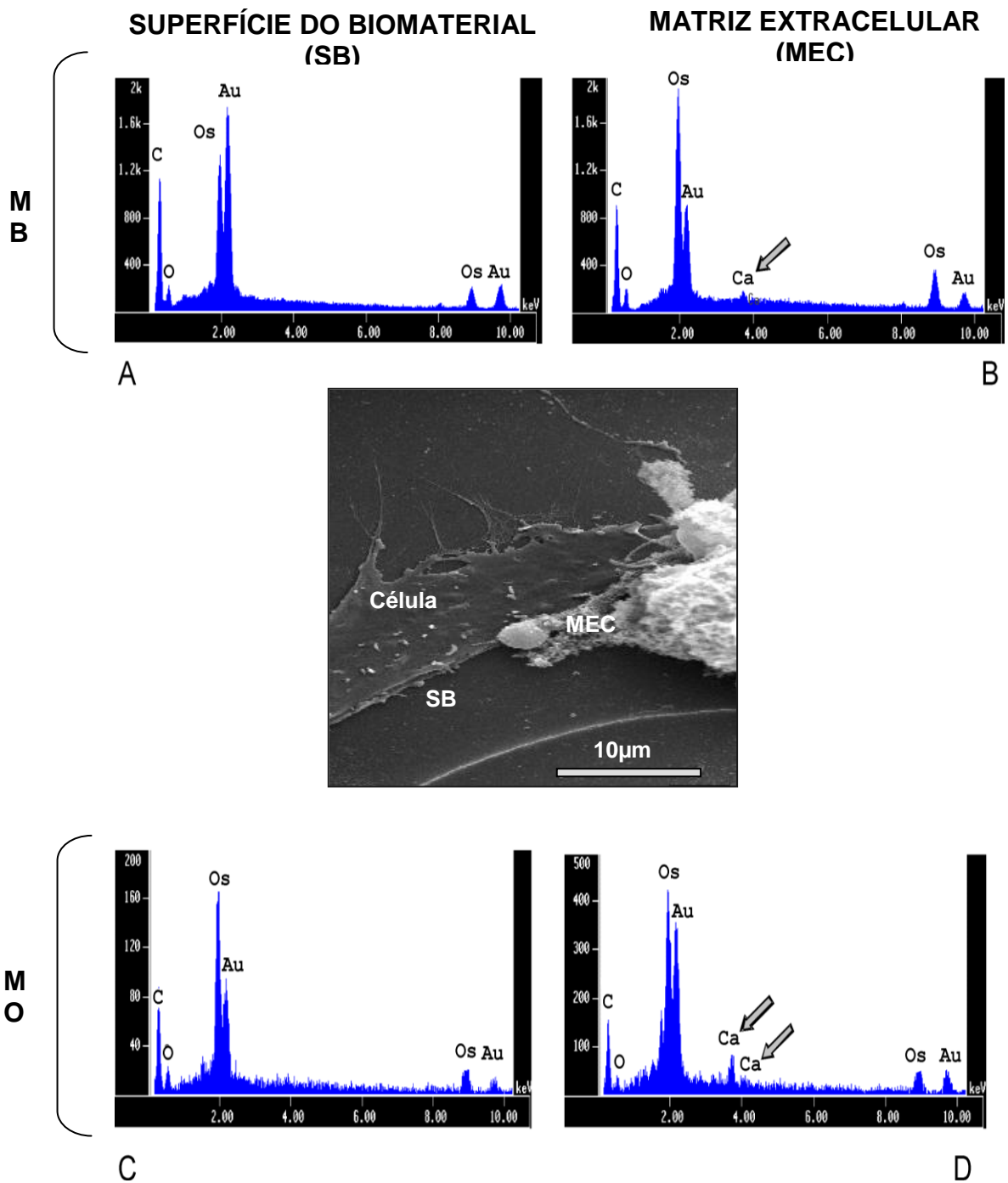


Figura 20: Análises de EDS nas culturas 3D de CTMMO, após de três dias. O cálcio não foi encontrado na superfície da matriz (A e C), enquanto picos de cálcio foram detectados (setas), apenas na matriz extracelular, em meios MB/MO (B/D, respectivamente). A fotomicrografia central é uma imagem representativa das áreas analisadas por EDS: superfície do biomaterial de quitosana-gelatina (SB) e da matriz extracelular (MEC).

5.4. Análise *in vivo*

5.4.1. Análise histológica

5.4.1.1. Implante de matrizes porosas de quitosana e gelatina

5 dias

Após 5 dias de implantação de quitosana-gelatina, a análise à microscopia de luz revelou um processo inflamatório intenso, com infiltrado típico de polimorfonucleares (PMN) (Fig. 21A). Estas células eram especialmente abundantes na área superficial alveolar em contato com a cavidade oral (Fig. 21B, C).

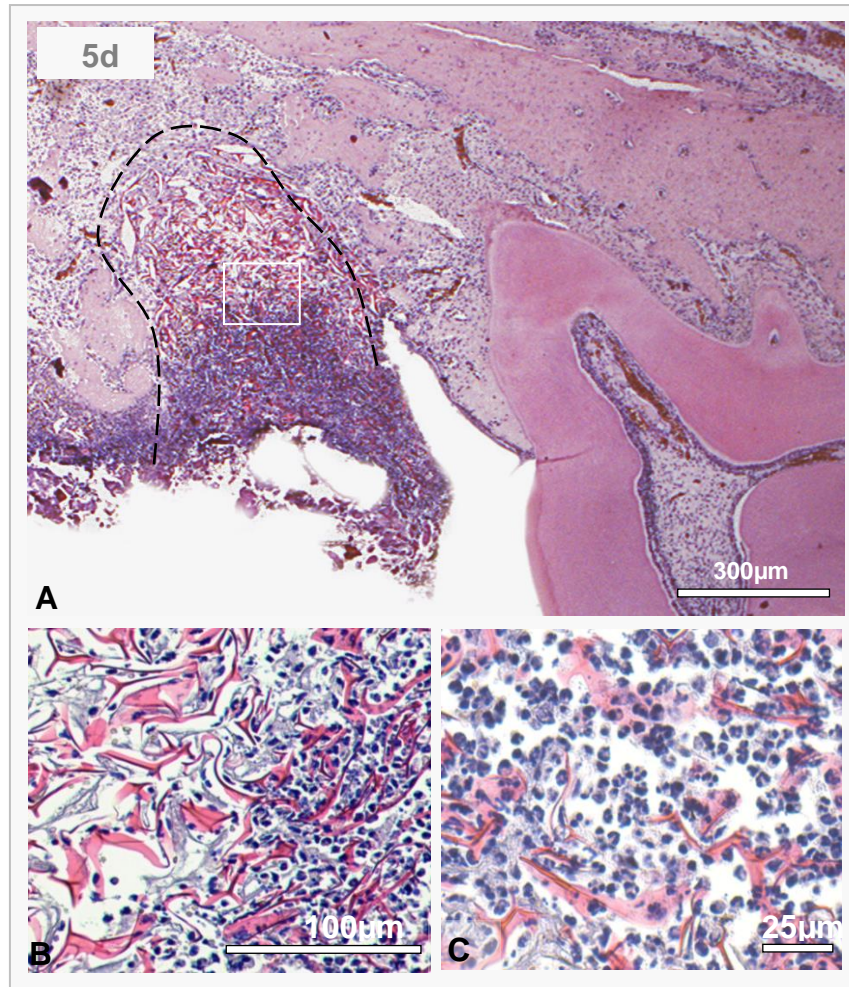


Figura 21: Fotomicrografias representativas da análise histológica *in vivo* – 5 dias após implante do biomaterial. HE. (A) Aspecto panorâmico do alvéolo (sítio receptor, delimitado pela linha tracejada). Presença de infiltrado inflamatório agudo, especialmente na área cervical em contato com a cavidade oral. (B) Matriz de quitosana-gelatina preenchida por células inflamatórias. À direita, nota-se abundante infiltrado inflamatório, correspondente à área cervical do alvéolo e, à esquerda, moderada inflamação (centro do alvéolo). (C) Detalhe da região cervical do alvéolo. Intenso infiltrado inflamatório agudo, rico em polimorfonucleares (PMN).

21 dias

No dia 21, o reparo ósseo e cicatrização da mucosa oral foram alcançados (Fig. 22A). O osso recém formado apresentou aspecto imaturo, com lamelas desorganizadas e muitos espaços medulares (Fig. 22B). Imagens que sugerem a incorporação de quitosana-gelatina na matriz óssea mineralizada, bem como nos espaços medulares são apresentadas na Figura 22B (detalhe). Restos de biomaterial foram observados no tecido conjuntivo frouxo, porém sem nenhum sinal de inflamação ou formação de cápsula de tecido fibroso ao redor do implante (Fig. 22A). Os poros do *scaffold* foram invadidos por células do tecido conjuntivo nativo, sugerindo uma ação quimiotática induzida pelo biomaterial (Fig. 22C). Essas células apresentaram núcleos claros sugestivos de uma alta atividade de síntese de RNA.

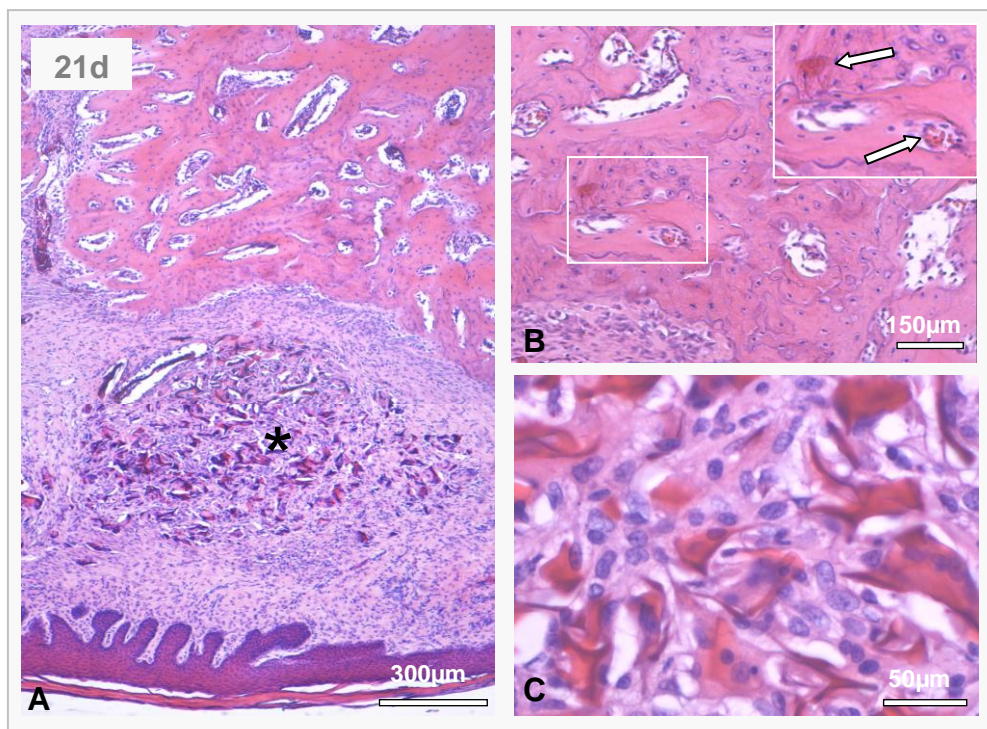


Figura 22: Fotomicrografias representativas da análise histológica *in vivo* – 21 dias após implante do biomaterial. HE. (A) Aspecto panorâmico do sítio receptor, mostrando reparação óssea normal e cicatrização completa da mucosa oral. Notam-se restos de biomaterial não degradadas no tecido conjuntivo (asterisco) e ausência de processo inflamatório. (B) Aspecto imaturo do novo osso depositado pode ser visto. No detalhe, biomaterial incorporado na matriz óssea e em espaços medulares do osso neoformado (setas). (C) Restos da malha do biomaterial, corados de vermelho, colonizados por células do tecido conjuntivo e reabsortivas.

35 dias

Após 35 dias, a matriz óssea estava mais homogênea e organizada. O tecido epitelial foi completamente fechado/cicatrizado, com uma camada queratinizada bem definida (Fig. 23A). Restos de biomaterial não degradados permaneceram no tecido conjuntivo. Confirmando os resultados de 21 dias, as imagens sugestivas de incorporação de lâminas de quitosana-gelatina na matriz óssea também foram evidentes após 35 dias de implantação (Fig. 23B).

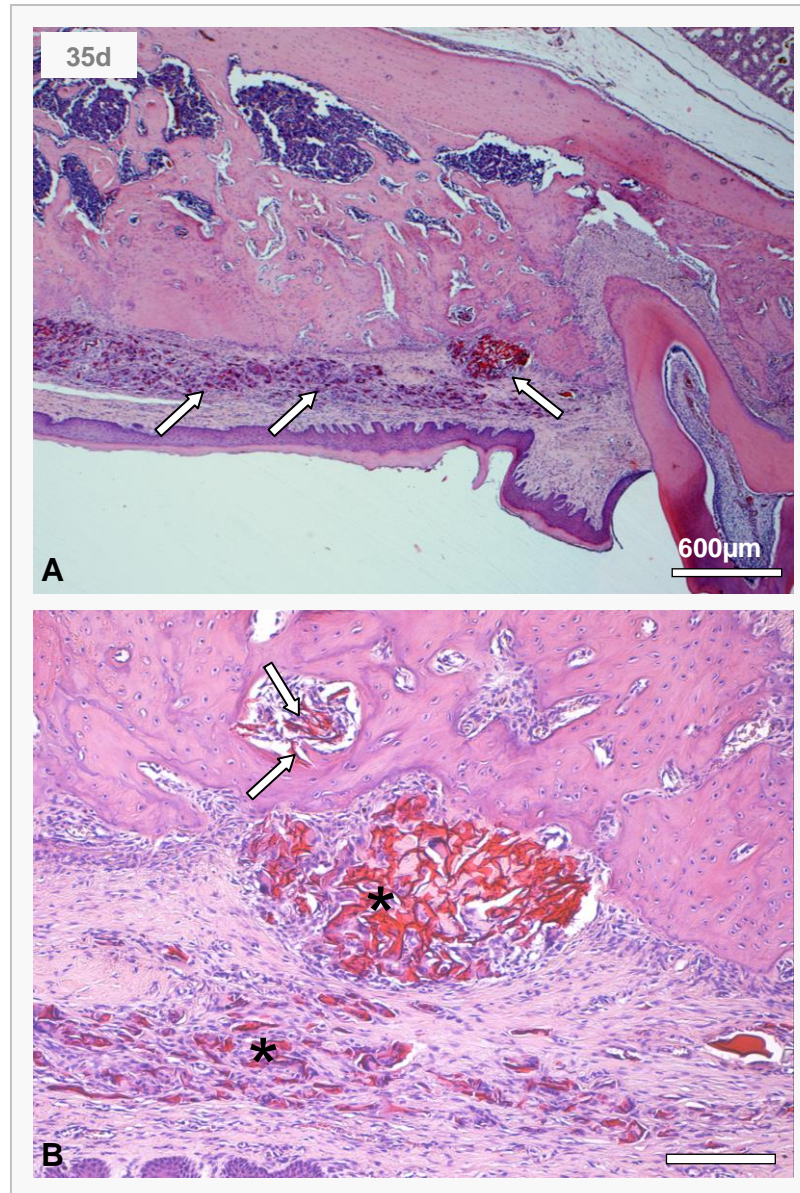


Figura 23: Fotomicrografias representativas da análise histológica *in vivo* – 35 dias após implante do biomaterial. HE. (A) Aspecto panorâmico do sítio receptor. Nota-se completa cicatrização óssea e epitelial completa. As setas apontam restos de biomaterial semi-degradado. (B) Detalhe da figura A mostrando restos não degradados de matriz de quitosana (asterisco), invadidos por tecido conjuntivo e também observados em espaços medulares da matriz óssea recém-sintetizada (setas).

5.4.1.2. Transplante de CTMMO em matrizes porosas de quitosana e gelatina

5 dias

Aos 5 dias, os alvéolos tratados revelaram um quadro de inflamação aguda e neoformação vascular mais proeminente do que os alvéolos controles (Fig. 24B e A, respectivamente). Porém, essa angiogenese acelerada e a formação de tecido de granulação foram observadas e bem características da resposta de reparo. A cicatrização epitelial (setas brancas) e a neoformação óssea (setas pretas) pareciam retardados nos alvéolos tratados (Fig. 24B) em relação aos alvéolos controles contra-laterais (Fig. 24A). A malha de quitosana apresentou-se invadida por neutrófilos polimorfonucleares (Fig. 24C). Células multinucleadas em início de organização (setas – Fig. 24D) indicavam o início do processo de reabsorção do biomaterial (Fig. 24D).

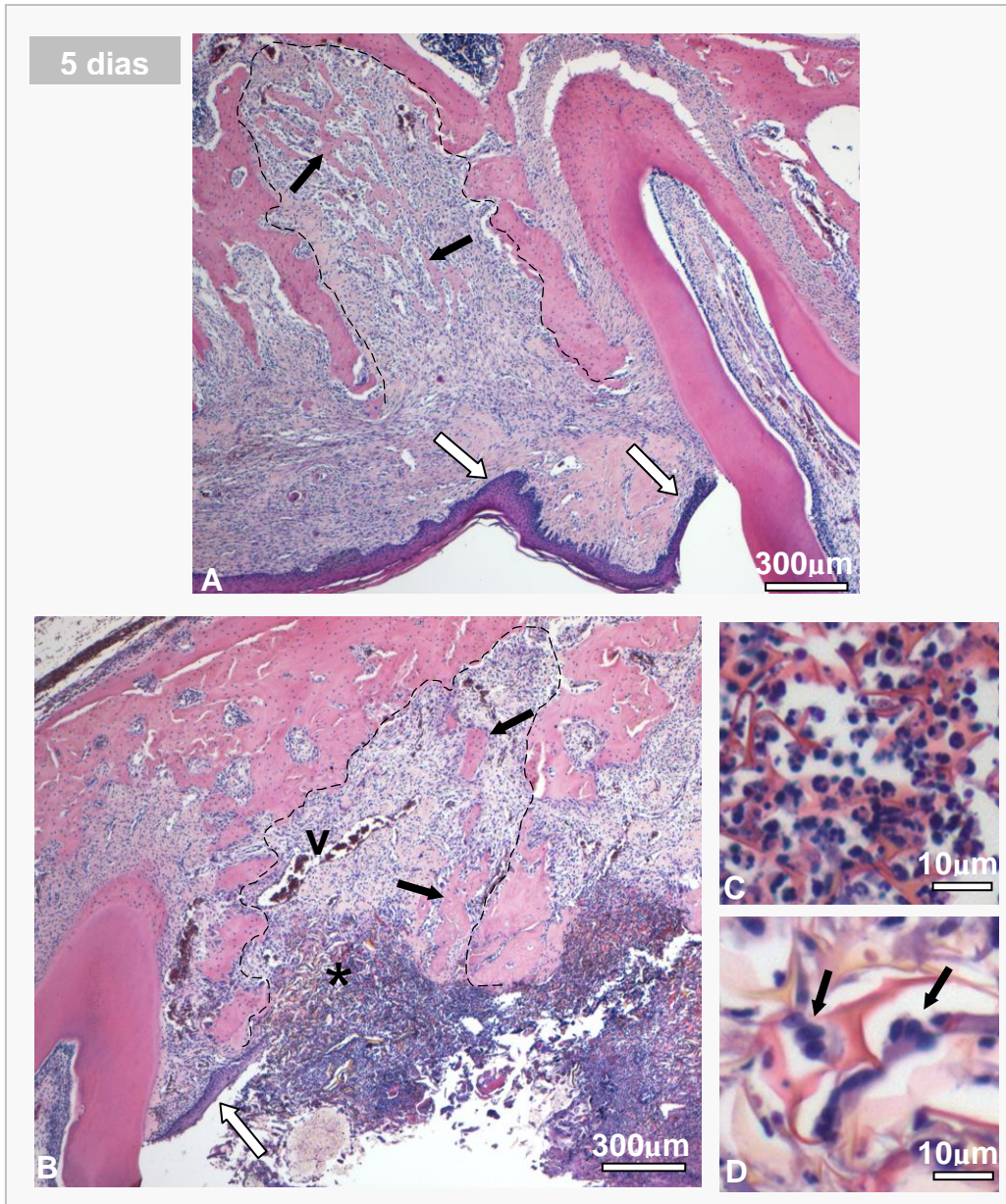


Figura 24: Fotomicrografias representativas da análise histológica *in vivo* – 5 dias após implante do construto (biomaterial+células). HE. (A) Alvéolo controle (distal) delimitado com linha pontilhada. Completa cicatrização epitelial (setas brancas) e áreas de deposição óssea inicial (setas pretas). (B) Alvéolo experimental (implantado). Nota-se a malha de quitosana-gelatina (asterisco) invadida por neutrófilos polimorfonucleares. (C) Detalhe do infiltrado inflamatório agudo. (D) Células reabsortivas multinucleadas (setas) perto das lâminas do biomaterial, coradas em vermelho pela eosina.

21 dias

Aos 21 dias, a cicatrização epitelial e o reparo ósseo alveolar apresentaram-se completos em ambos os lados, controle (Fig. 25A) e experimental (Fig. 25B). Também o nível de maturação óssea foi similar entre os lados controle e experimental (Fig. 25C). O tecido ósseo neoformado na área operada apresentou caráter imaturo, com muitos espaços medulares e osteócitos desordenados incluídos na matriz óssea recém depositada. A figura C ilustra o aspecto imaturo da matriz óssea encontrada nos alvéolos tratados e experimentais. Restos do biomaterial permaneceram no tecido conjuntivo (Asterisco – Fig. 25B) com células gigantes tipo corpo estranho, multinucleadas, evidentes entre as lâminas de quitosana (Fig. 25D e 26A). A técnica histoquímica para TRAP revelou que essas células não pertencem à linhagem osteoclástica (Fig. 26B). A figura 26C mostra o controle positivo da reação, células osteoclásticas TRAP-positivas, obtidas no mesmo corte histológico, no ligamento periodontal do dente vizinho à área operada.

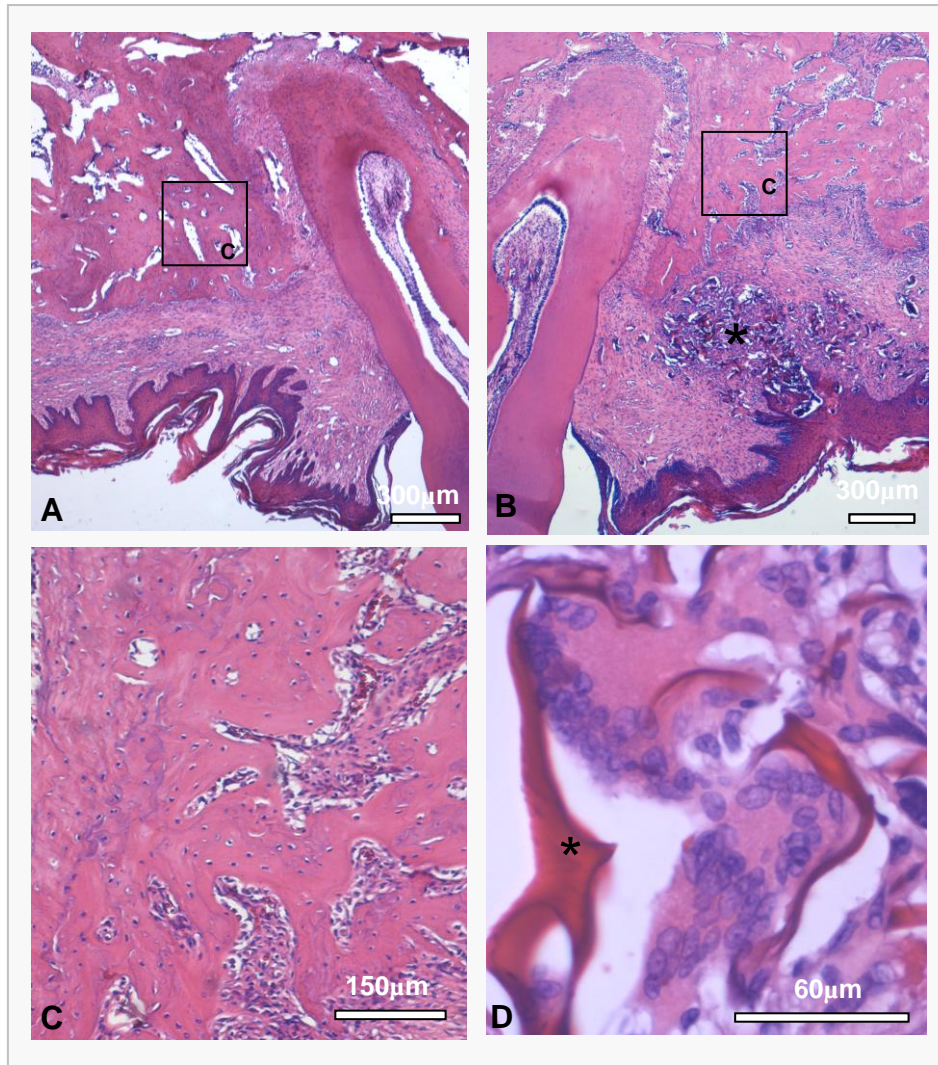


Figura 25: Fotomicrografias representativas da análise histológica *in vivo* – 21 dias após implante do construto (biomaterial+células). HE. (A) Alvéolo controle e (B) experimental. Cicatrização do tecido ósseo e do epitélio concluída em ambos os lados. Restos de biomaterial são observados no tecido conjuntivo do grupo experimental (asterisco). (C) Aspecto histológico imaturo de osso neoformado observado em ambos os lados. (D) Células gigantes multinucleadas nos poros do biomaterial.

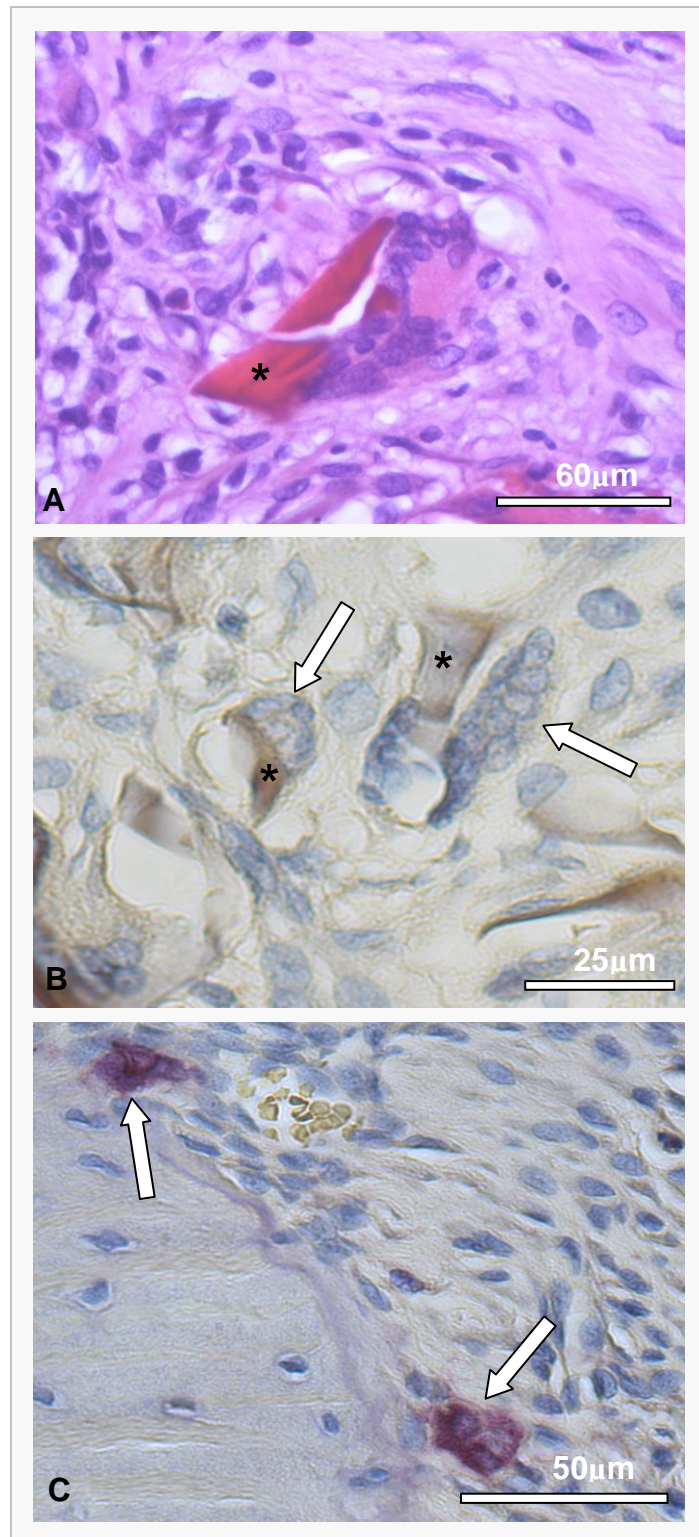


Figura 26: Reação citoquímica TRAP em células gigantes multinucleadas. (A) Imagem das células nos poros do biomaterial. HE. (B) Células apresentaram reação TRAP-negativa (setas). (C) Osteoclastos (TRAP-positivos) na área do ligamento periodontal do dente vizinho (2º molar), utilizados como controle positivo da coloração de TRAP. Asteriscos (A e B) indicam lâminas de quitosana.

35 dias

Os aspectos histológicos aos 35 dias foram extremamente similares àqueles descritos para 21 dias, em ambos os alvéolos controle e enxertado. A cicatrização epitelial mostrou-se completa e os alvéolos mostraram-se totalmente preenchidos por tecido ósseo. O osso formado nos alvéolos controle, embora com trabéculas mais espessas e com menos espaços medulares do que aos 21 dias, ainda apresentava características histológicas de osso imaturo (OI – Osso Imaturo), com osteócitos desorganizados aprisionados na matriz neoformada (Fig. 27A). Nos alvéolos enxertados (Fig. 27B), foram observados pontos de tecido ósseo ainda imaturo, mas na maioria das amostras, o aspecto histológico era mais organizado, com osteócitos enfileirados e lamelas de colágeno paralelas, sugerindo um nível mais avançado de maturação óssea (OM – Osso Maduro) do que no lado controle. Restos de quitosana permaneceram presentes, homogeneamente espalhados no tecido conjuntivo (Fig. 27C), com lâminas aparentemente mais finas (Detalhe – Fig. 27D) do que aquelas observadas aos 21 dias.

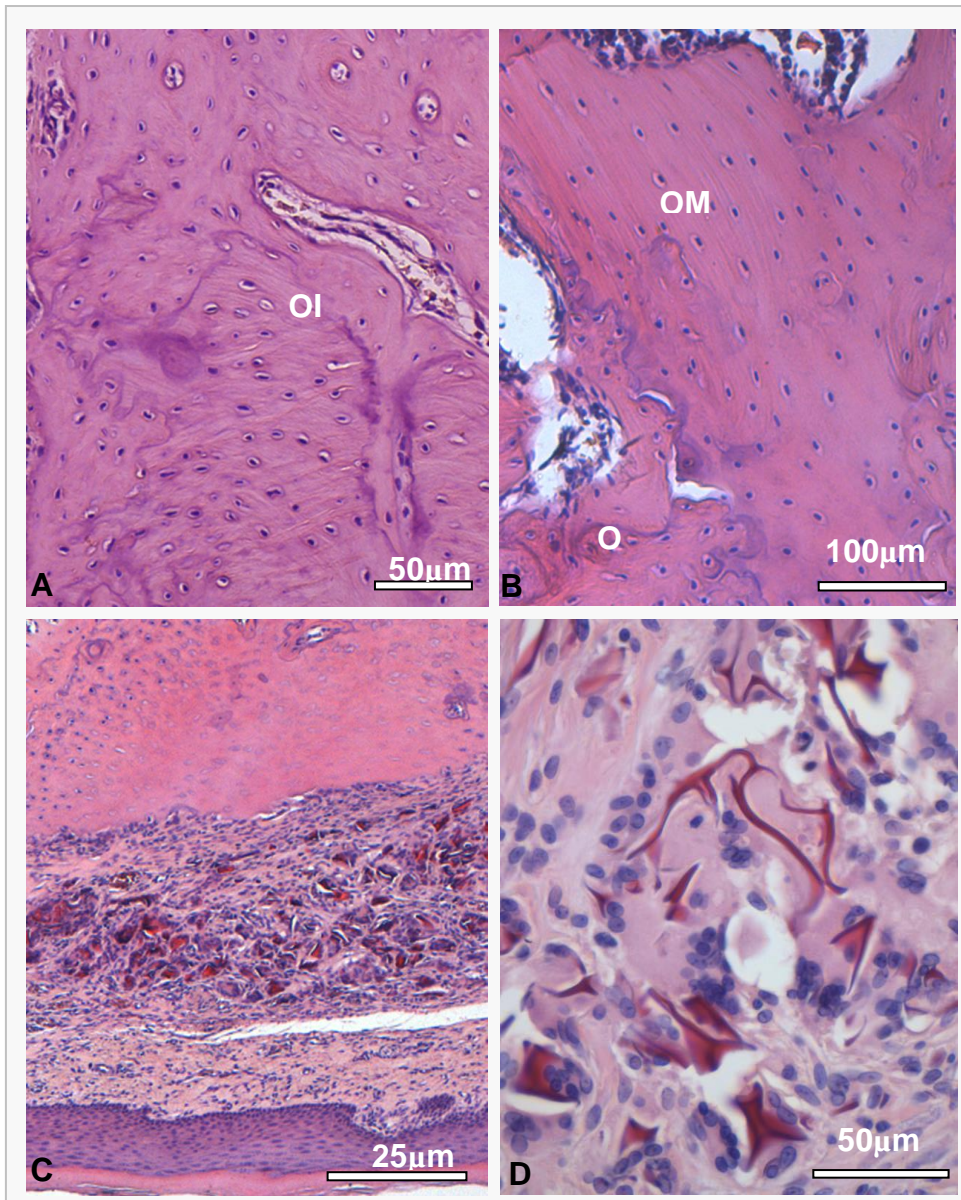


Figura 27: Fotomicrografias representativas da análise histológica *in vivo* – 35 dias após implante do construto (biomaterial+células). HE. (A) Lado controle. Aspecto histológico do osso cicatrizado, imaturo (OI). (B) Lado experimental. Aspecto histológico do osso cicatrizado, em sua maior parte com aspecto lamelar, osteócitos enfileirados típicos de osso maduro (OM). (C) Visão panorâmica da mucosa do lado experimental. Biomaterial ainda observado no tecido conjuntivo, sem sinal de inflamação. (D) Detalhe das lâminas residuais do biomaterial (vermelho).

5.4.2. Análise morfométrica

A quantificação do osso neoformado nos alvéolos dentários por meio da avaliação da densidade dos tons de cinza é resumida na tabela 2. A análise morfométrica expressa as porcentagens médias das áreas de osso neoformação em relação às áreas totais dos alvéolos.

Desta forma, taxas maiores observadas em relação aos períodos (35d>21d>5d) correspondem à maiores áreas de preenchimento ósseo, identificadas pela escala de cinza no software KS 300 (Tabela 2, Fig. 28). Os alvéolos tratados demonstraram maior densidade para todos os períodos avaliados. A densidade observada em cinco dias no lado implantado é justificada pela radiopacidade do *scaffold*, conforme mostrado no detalhe da Fig. 28A. Uma visão oclusal da reparação óssea em cada período é ilustrada nas imagens de reconstrução 3D (Fig. 28, à direita).

Tabela 2

Resultados morfométricos por TCCB: Proporção de preenchimento por osso neoformado através da avaliação pela escala de cinza.

Grupo	n	Média (%)	DP	p
5 dias				
Experimental	6	28,2	4,9	0,028 *
Controle	6	22,5	4,6	
21 dias				
Experimental	5	42,8	2,4	0,043*
Controle	5	40,9	2,5	
35 dias				
Experimental	5	61,1	2,0	0,043*
Controle	5	56,7	2,2	

Note: Os valores de **p** se referem à significância de probabilidade do teste de *Wilcoxon*.

DP = desvio-padrão

* Diferença significativa

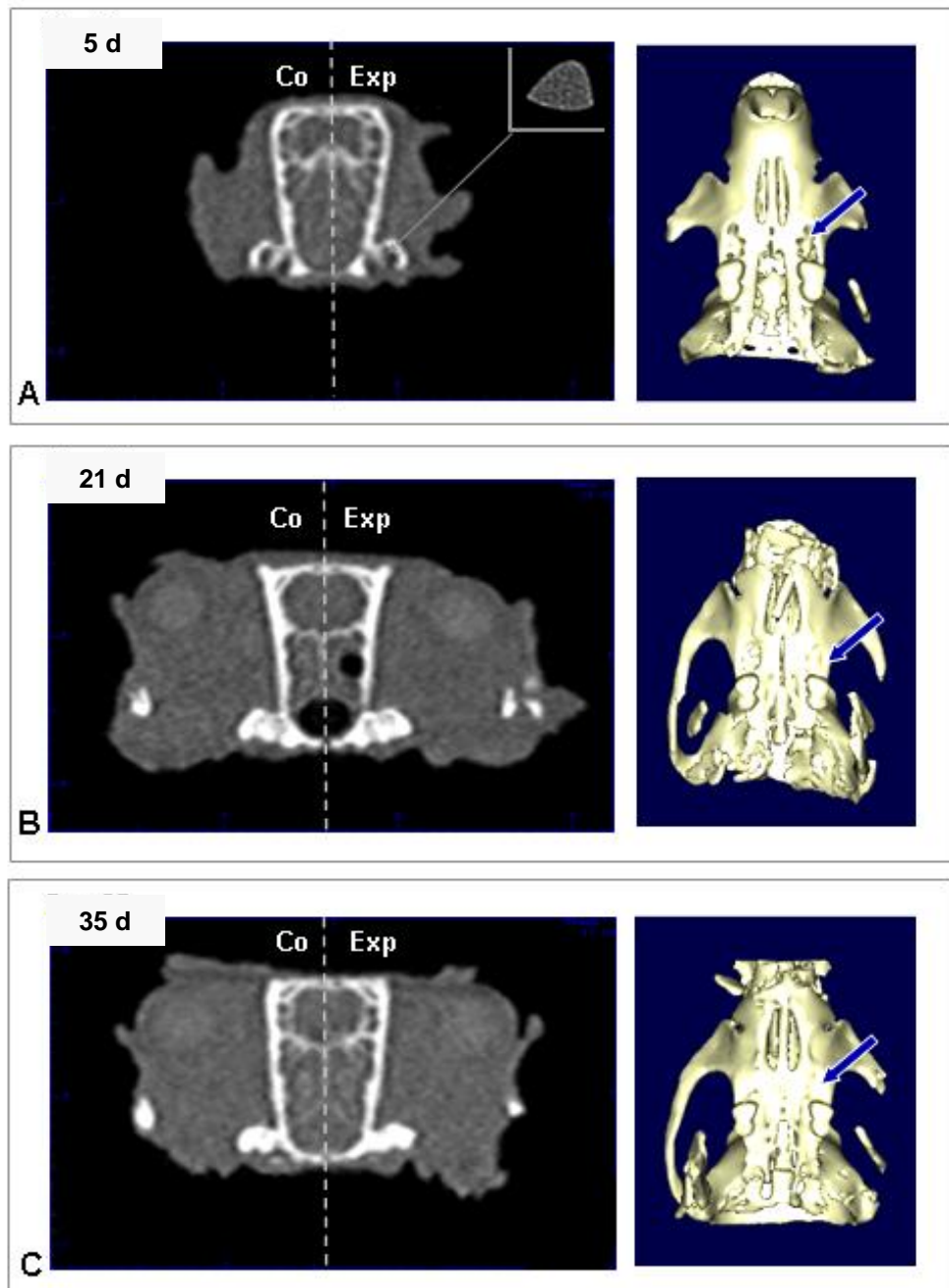


Figura 28: Análise morfométrica utilizando imagens obtidas por TCCB. (A-C) Cortes representativos de TCCB dos alvéolos experimental (esquerdo) e controle (direito), após 5 dias (A), 21 (B) e 35 (C) dias da cirurgia. Note a maior densidade de cinza no lado experimental para todos os períodos avaliados. Aos 5 dias a densidade é atribuída à radiodensidade do *scaffold* (Fig. A - detalhe) implantado. Respectivas reconstruções 3D (direita) ilustram a vista oclusal do reparo ósseo alveolar. As setas indicam lado experimental com melhor preenchimento somente após 21 e 35 dias.

5.4.3. Análise imunohistoquímica

5 dias

Previamente a análise imunohistoquímica *in vivo* a atividade do anticorpo anti-eGFP de rato foi testada nas CTMMO, após 3 dias de cultura em *scaffold*, para controle positivo das reações imunohistoquímicas (Fig. 29).

No quinto dia após o implante (Fig. 30A), apenas algumas CTMMO eGFP-positivas foram observadas isoladas entre as camadas do biomaterial. Este resultado sugere que essas células migraram da matriz 3D, em um período de tempo menor que 5 dias. A imunoexpressão foi mais evidente na área de neoformação óssea. As células marcadas foram observadas na superfície das trabéculas do osso recém-formado, bem como dentro de espaços medulares (Fig. 30B). Osteócitos eGFP-positivos foram observados no interior da matriz óssea, perfeitamente integrados com os osteócitos nativos eGFP-negativos (Fig. 30C). O ligamento periodontal dos dentes adjacentes apresentou várias células eGFP-positivas (Fig. 30E). As figuras 30D e 30F representam a imagem dos controles negativos para o tecido ósseo e ligamento periodontal, respectivamente.

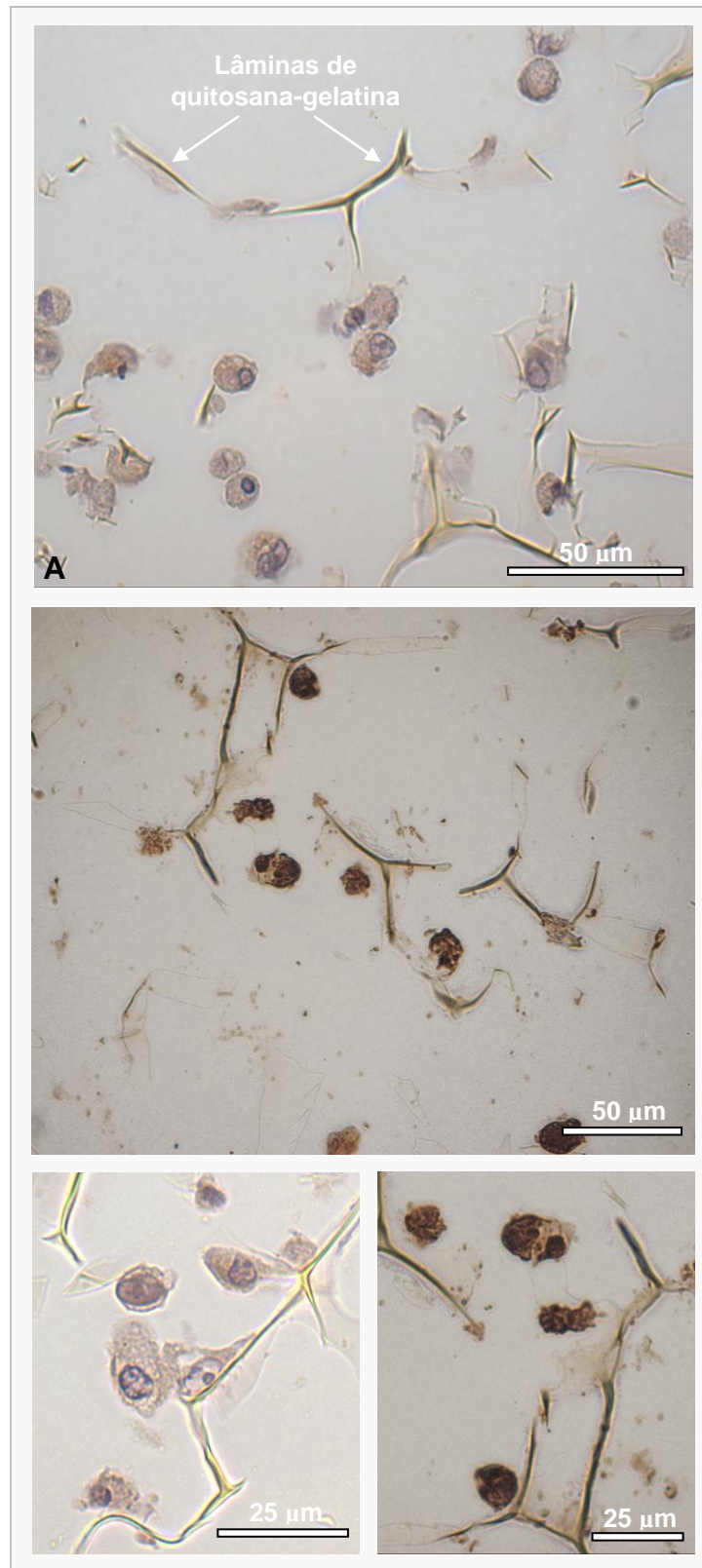


Figura 29: Controle positivo para reações imunohistoquímicas *in vivo*: análise da expressão eGFP nas células-tronco mesenquimais em matriz de quitosana-gelatina após 3 dias de cultura. (A) e (C) Controles negativos da reação onde se omitiu a incubação com anticorpo 1^{ário}. (B) e (D) Células eGFP-positivas reveladas em marrom pela técnica de imunoperoxidase.

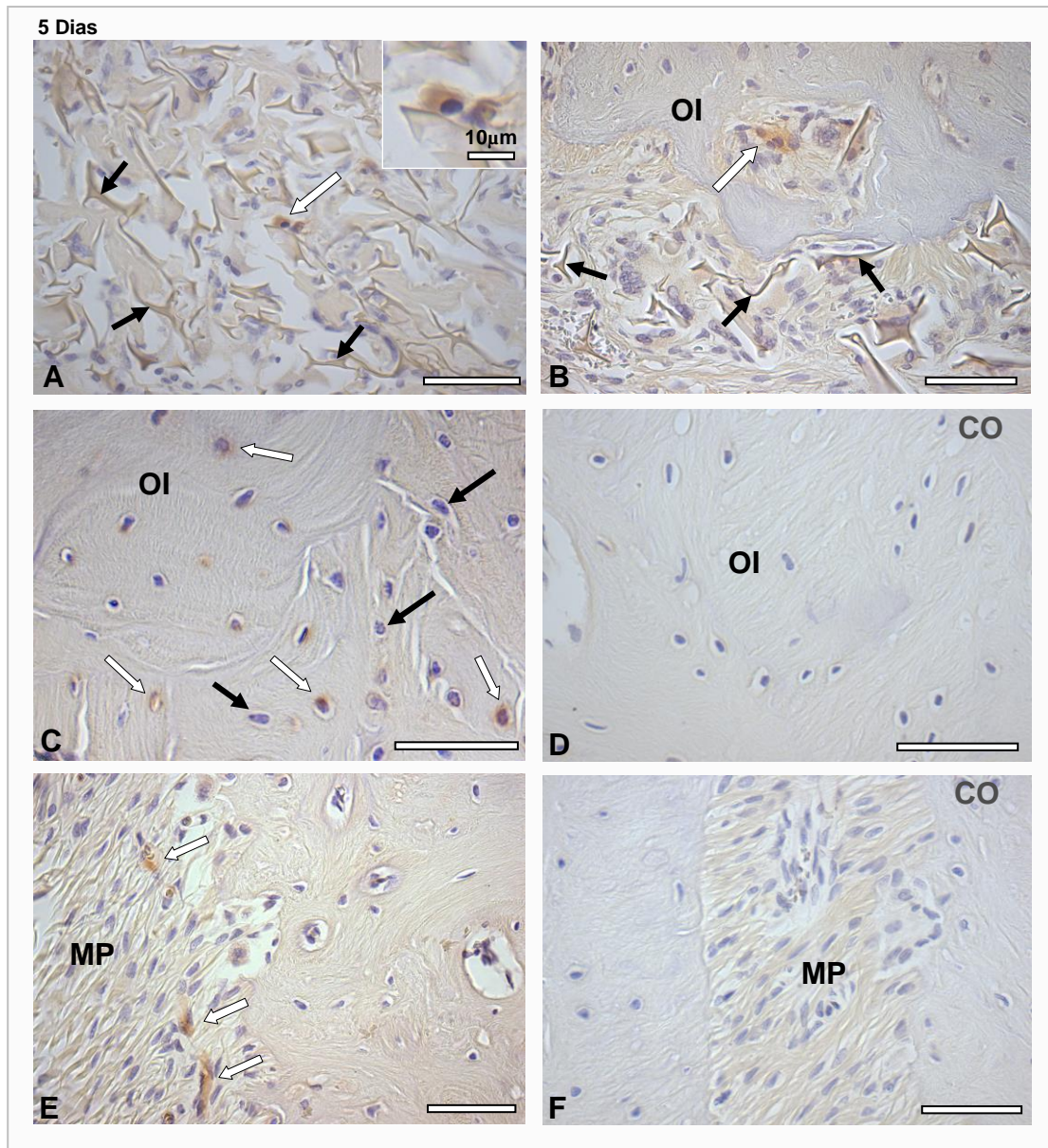


Figura 30: Análise imunohistoquímica após 5 dias de transplante. As setas brancas indicam células eGFP-positivas observadas: (A) no *scaffold* (setas pretas); (B) dentro dos espaços medulares; (C) incluídas na matriz extracelular do tecido ósseo (E) no ligamento periodontal. Note que osteócitos eGFP-positivos (C - setas brancas) estão perfeitamente integrados com os osteócitos nativos (C - setas pretas). (D) e (F) são imagens representativas do controle negativo no tecido ósseo e no ligamento periodontal, respectivamente. Barra= 50 µm. OI= Osso Imaturo. MP= membrana periodontal. CO= Controle negativo.

21 dias

Após 21 dias, nenhuma CTMMO eGFP-positiva foi observada no interior dos poros da matriz 3D. A imunoe expressão foi observada no tecido conjuntivo entre os remanescentes do biomaterial e a área de cicatrização alveolar (Fig. 31A). As células marcadas foram especialmente evidenciadas próximas à matriz do tecido ósseo e nos espaços medulares, em agregados celulares sugestivos de ossificação intramembranosa (Fig. 31B e C). Células eGFP-positivas também estavam presentes nas paredes dos vasos sanguíneos em ambos, tecido conjuntivo (Fig. 31E) e canais vasculares do osso recém-formado (Fig. 31F). A Figura 31D é uma imagem representativa de controle negativo aos 21 dias.

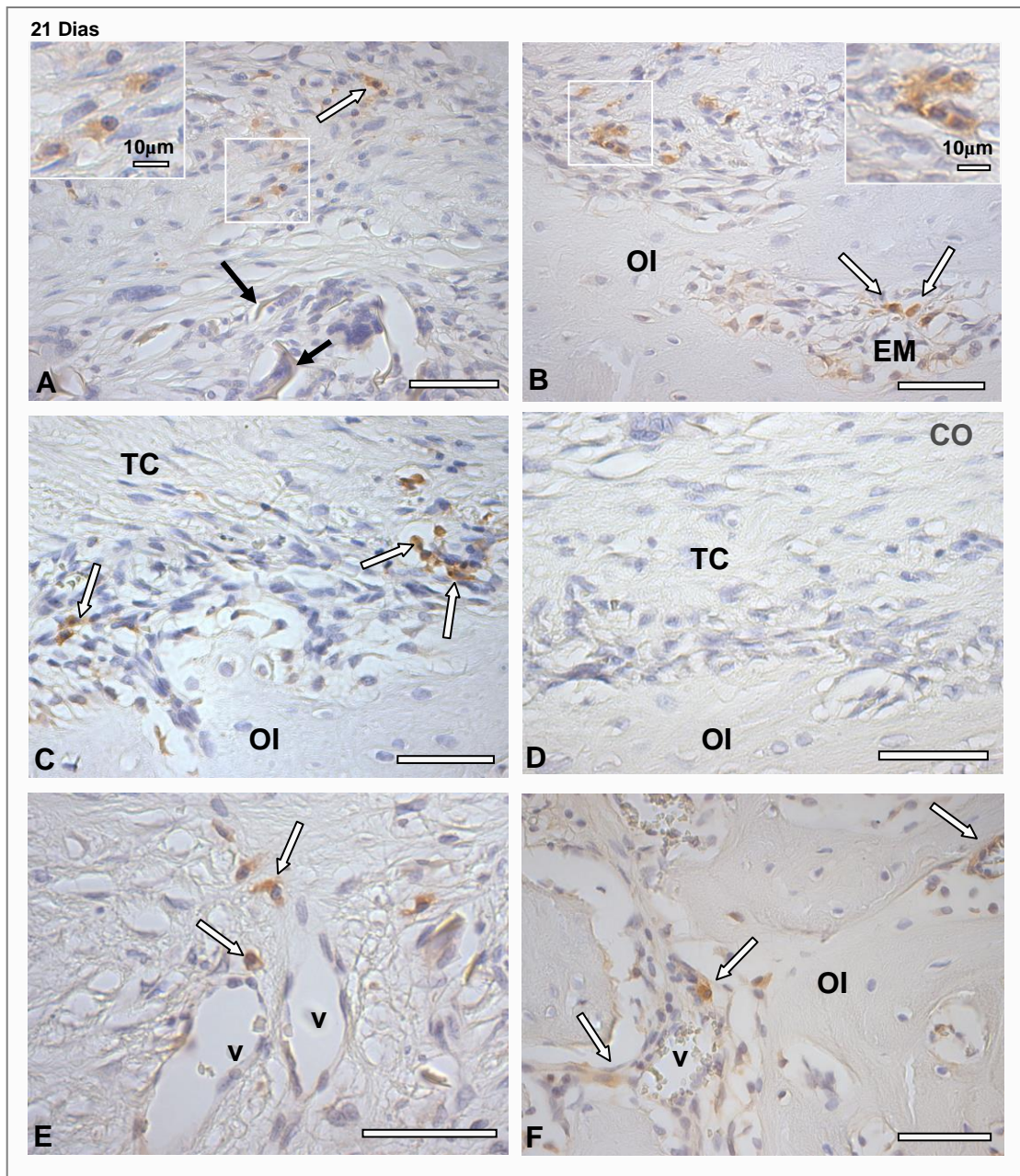


Figura 31: Análise imunohistoquímica 21 dias após o transplante. As setas brancas apontam células eGFP-positivas observadas: (A) na região do tecido conjuntivo entre os remanescentes do biomaterial (setas pretas) e na área de cicatrização alveolar; (B) e (C) perto da superfície óssea ou no interior de espaços medulares em nichos sugestivos de ossificação intramembranosa; (E) e (F) nas paredes dos vasos sanguíneos do tecido conjuntivo e nos canais vasculares do osso novo formado, respectivamente. (D) Imagem representativa do controle negativo. Barra = 50 μm . OI = osso imaturo. TC = tecido conjuntivo. EM = espaço medular. V = vaso. CO= Controle negativo.

35 dias

Após 35 dias, a imunoeexpressão foi observada especialmente em osteócitos incluídos na matriz de osso imaturo (Fig. 32A) ou histologicamente organizado como tecido ósseo maduro (Fig. 32B). As células diferenciadas eGFP-positivas foram perfeitamente integradas com os osteócitos do hospedeiro (Figs. 32A e B). A expressão de EGFP foi mantida em células de linhagem osteogênica localizadas na superfície do tecido osso (Fig. 32C). Adicionalmente, a BMMSCs eGFP-positivas também foram encontradas na camada espinhosa do tecido epitelial (Fig. 32E), sugerindo sua participação no processo de reparo/regeneração e *turnover* epitelial. As figuras 32D e 32F representam as imagens de controle negativo dos tecidos ósseo e epitelial, respectivamente.

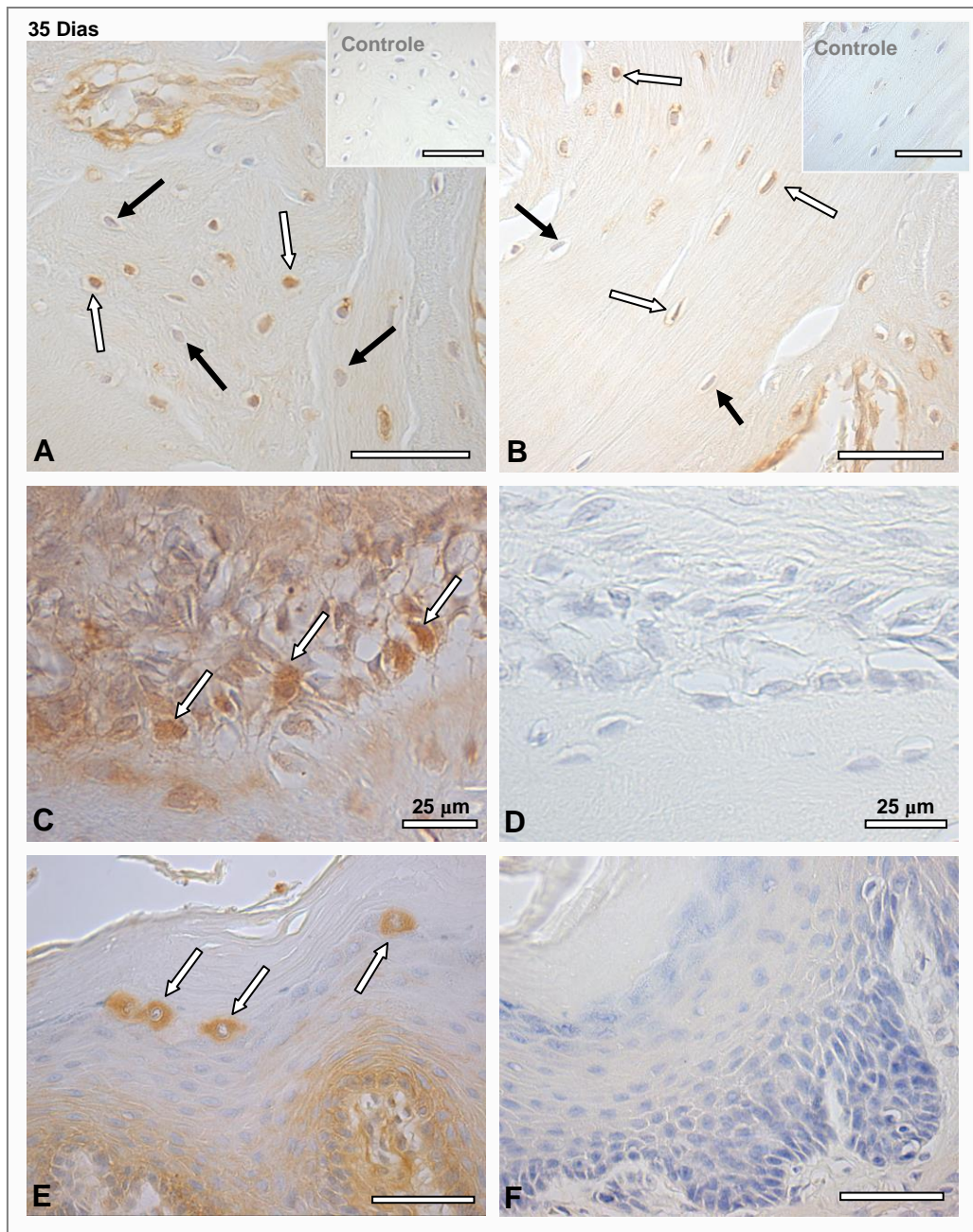


Figura 32: Análise imunohistoquímica, após 35 dias do transplante. As setas brancas indicam células eGFP-positivas observadas em: (A) algumas áreas do osso imaturo; (B) osteócitos tipicamente diferenciados, nas áreas de osso maduro, (C) osteoblastos na superfície óssea; (E) incluídos no tecido epitelial. As setas pretas indicam osteócitos diferenciados a partir de células do hospedeiro, eGFP-negativas. (D) e (F) são imagens representativas do controle negativo, na superfície óssea (D) e do tecido epitelial (F), respectivamente. Barra = 50 μm.

6. DISCUSSÃO

Refinamentos nas técnicas de engenharia tecidual ao longo da década passada possibilitaram a regeneração óssea *in vivo*, em muitos modelos animais e a transmissão destas técnicas para aplicações ortopédicas (Arosarena & Collins, 2005). Enquanto esses avanços são promissores para uma eventual regeneração óssea nos maxilares, muito ainda precisa ser aprendido sobre a biologia de células progenitoras, interações célula-célula, interações celulares com a matriz extracelular, e mecanismos que envolvem a diferenciação funcional dos tecidos. O presente estudo mostrou o efeito da matriz 3D desenvolvida, à base de quitosana e gelatina, sobre a colonização e a diferenciação celular, em uma avaliação *in vitro*, em culturas 3D de CTMMO, e *in vivo*, utilizando-se o modelo de alvéolo dentário de ratos.

A quitosana é um dos biopolímeros promissores para a engenharia de tecidos e possivelmente para a aplicação na regeneração óssea (Di Martino *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2005). A gelatina, por sua vez, foi associada à quitosana para melhorar a adesão celular na cultura 3D, propriedade extensivamente reportada na literatura e atribuída ao domínio RGD (Yang *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2005; Lawrence e Madihally, 2008). Adicionalmente, *scaffolds* semelhantes a esponjas foram obtidos através da técnica de congelamento e liofilização, que é um método empregado na produção de matrizes porosas de polímeros (Mao *et al.*, 2003; Oréfice *et al.*, 2006). Nossos resultados mostraram uma microestrutura altamente porosa e com poros interconectados, como confirmado pela análise morfológica e pelo método de Arquimedes. A porosidade e a estrutura aberta de poros são propriedades desejáveis para biomateriais empregados na engenharia tecidual, pois permite

o ingresso de células, a difusão de nutrientes e desempenham um papel fundamental na adesão e proliferação celular (Mao *et al.*, 2003; Lawrence e Madhally, 2008). De fato, CTMMO foram observadas em íntimo contato com o biomaterial, estabelecendo numerosos pontos de adesão via prolongamentos filopodiais com a superfície da matriz 3D já no primeiro dia de cultura. Adesão celular similar foi descrita por Malafaya *et al.*, 2005, em *scaffolds* de quitosana semeados com células-tronco mesenquimais de tecido adiposo humano. Entretanto, tais achados ocorreram somente após 2 semanas de cultura. A adesão precoce das CTMMO foi um diferencial importante do nosso estudo, pois a adesão é um pré-requisito fundamental para a secreção de matriz por osteoblastos, que são células dependentes de ancoragem (Mello *et al.*, 2007). Além disso, os múltiplos e bem desenvolvidos sítios de adesão focal induzem as células a passar da fase de proliferação e iniciar uma diferenciação precoce (Bacáková *et al.*, 2004).

Na análise morfológica, por meio de microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura, a matriz de quitosana-gelatina mostrou capacidade de promover a adesão e o espalhamento das CTMMO. A morfologia esférica ou fibroblastóide das células foi observada em todos os períodos experimentais. Ao se comparar a resposta celular nas culturas 3D em meio MB e MO, achados muito similares foram observados. Conjuntamente com os dados do teste de MTT, que evidenciou a viabilidade das células pela conversão do MTT em todos os períodos de tempo avaliados na cultura 3D, estes resultados indicam uma baixa citotoxicidade da mistura (quitosana-gelatina) e do agente ligante (glutaraldeído) empregados. A queda acentuada desses valores entre os dias 1

e 3 pode ser explicada pela remoção das células não-aderidas com a primeira troca do meio de cultura.

O aumento na atividade de fosfatase alcalina é um indicativo de diferenciação em células da linhagem osteogênica, enquanto uma posterior diminuição correlaciona-se com uma avançada mineralização da matriz e um fenótipo celular mais maduro (Jaiswal *et al.*, 1997). Baseando-se nesses parâmetros, em nosso estudo, a atividade da fosfatase alcalina foi quantificada, assim como a presença de cálcio na MEC, para investigar a diferenciação das CTMMO *in vitro* em *scaffolds* de quitosana-gelatina. Para ambos os meios e em todos os períodos avaliados, os níveis de fosfatase alcalina foram menores em culturas 3D em relação às 2D. Esse achado foi interpretado como um avanço na maturação das células da linhagem osteogênica quando cultivadas em quitosana-gelatina (cultura 3D), caminhando para a fase de deposição mineral. De fato, já ao final de 3 dias, as culturas 3D MB/MO apresentaram um pico de produção de fosfatase alcalina e, à análise de EDS, foi detectado cálcio na matriz extracelular. Esses resultados sugerem atividade de mineralização da MEC e nos indicam que o construto CTMMO/*scaffold* de quitosana-gelatina apresenta características estruturais e propriedades biológicas adequadas para a engenharia de tecido ósseo. Achados histológicos importantes foram especialmente evidentes após 3 dias de cultura, como o aumento do número de células viáveis no interior dos poros do *scaffold*, aderidas e não aderidas, observados por ML e MEV. Todos esses resultados apontam o estágio de desenvolvimento do construto "tecido-like" de três dias como período ideal para o transplante das CTMMO *in vivo*.

Estudos anteriores de quitosana-gelatina enfocaram principalmente a preparação e a caracterização de diferentes blendas do biomaterial (Huang *et al.*, 2005; Yin *et al.*, 2003). Em nosso estudo, propusemos um avanço nos experimentos, com a realização dos experimentos *in vitro* e transplante do construto para um modelo de defeito ósseo clinicamente importante para a odontologia. Sendo assim, os construtos obtidos após 3 dias de cultura foram utilizados no modelo de alvéolos dentários de ratos. O modelo experimental de cicatrização de alvéolo dentário pós extração tem sido bastante utilizado em pesquisas para a avaliação de possíveis fatores que possam interferir no processo de reparo, acelerando-o ou retardando-o (Kanyama *et al.*, 2003; Teófilo *et al.*, 2001; Mendes *et al.*, 2008). O processo de regeneração óssea após a extração dentária é um modelo experimental interessante para estudar o reparo do tecido duro, pois inclui a sobreposição das fases de inflamação, formação de tecido de granulação, angiogênese e deposição de matriz extracelular (Kanyama *et al.*, 2003). Nossos resultados histológicos *in vivo*, após 5 dias de implantação do biomaterial, estão em conformidade com outros estudos sobre cicatrização de alvéolos, mostrando uma resposta inflamatória aguda típica (Kanyama *et al.*, 2003; Mendes *et al.*, 2008).

Entretanto, aos 21 dias de implante da matriz, a regeneração óssea foi alcançada, com a remissão do processo inflamatório e ausência de sinais de encapsulamento do biomaterial. O tecido epitelial totalmente cicatrizado, com uma camada queratinizada bem estabelecida, o que sugere restabelecimento do *turnover* epitelial, um processo geralmente associado à ausência de inflamação e infecção no tecido conjuntivo subjacente. A propriedade antibacteriana da quitosana pode ter contribuído para este resultado. De

acordo com Khor e Lim, 2003, a quitosana apresenta uma atividade antibacteriana intrínseca, inibindo a proliferação de bactérias. Esta propriedade da quitosana se deve à interação eletrostática dos grupos amino, catiônicos, com ânions da parede bacteriana (Di Martino *et al.*, 2005; Khor e Lim, 2003).

Um biomaterial ideal deve ser biodegradável (Ge *et al.*, 2008). Ao se alcançar a cicatrização alveolar completa, a biodegradação do biomaterial é desejada, a fim de se obter a deposição de novo osso regenerado (Ge *et al.*, 2008). A quitosana-gelatina foi progressivamente reabsorvida, com uma taxa de degradação lenta, e simultaneamente, observou-se a substituição por tecido ósseo compatível com o tempo de observação, tal como preconizado para um *scaffold* ideal por Donzelli *et al.*, 2007. A quitosana é degradada *in vivo* por hidrólise catalisada por lisozima e é decomposta em oligossacarídeos. A taxa de degradação da quitosana é inversamente proporcional ao grau de cristalinidade e, portanto, a composição amorfa da quitosana exibe degradação mais rápida (Liu, 2007). O espectro de XDR do biomaterial desenvolvido revelou uma característica composição da fase amorfa, que explica a biodegradação progressiva do biomaterial. Embora grande parte do biomaterial tenha sido reabsorvido por células gigantes, presentes entre as lâminas de quitosana em todos os períodos avaliados, observamos remanescentes da matriz transplantada no tecido conjuntivo circundante, ainda nos períodos de 21 e 35 dias. Acreditamos que uma quantidade excessiva de biomaterial tenha sido utilizada para o pequeno volume dos alvéolos, ultrapassando as paredes das cavidades alveolares.

Além disso, imagens sugestivas da incorporação do biomaterial na matriz óssea e nos espaços medulares do osso neoformado foram visualizadas

após 21 e 35 dias de implantação. A reabsorção da quitosana-gelatina não pôde ser atribuída às células osteoclásticas. As células gigantes multinucleadas observadas entre as camadas do construto foram TRAP-negativas. Assim, o processo de reabsorção da quitosana-gelatina, parece ser conseqüência de uma reação típica do corpo estranho, que evolui para uma interação implante-tecido favorável. Restos do biomaterial permaneceram até 35 dias no tecido conjuntivo, sem formação de cápsula fibrosa, que representa um achado desfavorável descrito na literatura para outros biomateriais (Ashammakhi, 2005; Zhu *et al.*, 2006). Sendo assim, seus produtos de degradação não são tóxicos e podem ser incorporados na matriz extracelular para a reconstrução de tecidos (Suh e Matthew, 2000; Frolich *et al.*, 2008).

A literatura tem sugerido que o transplante de células apresenta valor terapêutico, pois proporciona o reparo tecidual. Por isso, neste estudo avaliou-se também o efeito dos construtos eGFP-CTMMO/matriz na cicatrização dos alvéolos. Por meio do rastreamento das células eGFP-positivas transplantadas, foi possível conhecer o destino e a contribuição dessas células para a regeneração óssea CTMMO foram preferencialmente utilizadas neste estudo, uma vez que são facilmente isoladas de aspirado de medula óssea e expandidas *in vitro*, permitindo uma transposição do nosso modelo para a aplicação clínica. Além disso, essas células apresentam um via padrão de diferenciação para a linhagem osteogênica (Logeart-Avramoglou *et al.*, 2005; Donzelli *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2006). Surpreendentemente, observamos que as células transplantadas contribuíram também para a cicatrização epitelial e na neovascularização tecidual. De fato, essas áreas lesadas pelo ato cirúrgico certamente produzem mediadores que devem atrair células-tronco

mesenquimais. Como o construto foi transplantado com 3 dias de cultura, algumas células presentes no scaffold podem não ter sido comprometidas in vitro com a linhagem osteogênica. Esses resultados indicam que a matriz desenvolvida, embora tenha similaridade estrutural com a matriz óssea, pode ser também utilizada como carreador de células tronco para outras finalidades e não apenas reconstruções ósseas.

Quando se trabalha em modelos de transplante, uma grande preocupação é a identificação e a manutenção de uma marcação efetiva das células do organismo doador, para o traceamento do destino dessas células no organismo hospedeiro, por todo o período experimental. Embora a proteína eGFP seja considerada um marcador de escolha para muitos tipos de transplante de células, sabe-se que ela pode perder sua fluorescência direta durante o processamento de tecidos (Swenson *et al.*, 2007). Por esta razão, a imuno marcação foi realizada e conseguiu-se um rastreamento efetivo dessas células até o final do período mais longo de análise. Conforme o esperado, as células transplantadas migraram e se diferenciaram em osteoblastos e osteócitos nas regiões de lesão tecidual, contribuindo para a regeneração óssea. A imuno-histoquímica mostrou células transplantadas, fisiologicamente integradas com os osteócitos nativos (eGFP-negativos), na matriz óssea. Esses resultados revelaram o potencial das matrizes de quitosana-gelatina em atuar como carreadoras de CTMMO e a capacidade de diferenciação dessas células na linhagem osteogênica. Além disso, pela primeira vez mostrou-se a migração de CTMMO transplantadas através de todos os tecidos lesados, assim como a contribuição dessas células para a cicatrização epitelial e neovascularização da área da ferida.

Curiosamente, 21 dias pós-transplante, a reparação óssea no lado experimental foi histologicamente semelhante ao lado controle. No entanto, utilizando-se a TCCB como ferramenta complementar de diagnóstico para análise morfométrica, demonstrou-se uma maior deposição de tecido ósseo mineralizado nos alvéolos transplantadas aos 21 e 35 dias. A TC já havia sido relatada como um método auxiliar para avaliar a capacidade osteogênica em modelos de implante ectópico (Wu *et al.*, 2008). Os tomógrafos do tipo *cone beam* foram concebidos para o estudo por imagem dos tecidos duros da região maxilofacial e são capazes de fornecer resolução sub-milimétrica em imagens de alta qualidade (Scarfe *et al.*, 2006). Ao contrário dos métodos tradicionais, sobreposições anatômicas puderam ser eliminadas para visualização da área de estudo sem distorção no plano transversal (Farman e Scarfe, 2006; Ramaswamy *et al.*, 2009). A TCCB permitiu ainda a realização de uma análise quantitativa e qualitativa da amostra, em formato 2D ou 3D, em condições naturais, sem desmineralização e processamento, com mínima distorção e preparação (Tan *et al.*, 2004). Nossos resultados da análise morfométrica por TCCB mostraram a importância das CTMMO, tanto para a formação óssea, quanto para a maturação deste tecido, uma condição extremamente relevante para o sucesso clínico das reconstruções ósseas.

Apesar da quitosana ter sido extensivamente estudada nos últimos anos, não há nenhuma evidência de sua aplicação clínica para a reparação óssea em odontologia. No presente estudo, a matriz tridimensional de quitosana-gelatina permitiu regeneração tecidual adequada e apresentou uma perfeita integração aos tecidos circundantes. A biocompatibilidade evidenciada pelo comportamento das células *in vitro* reforça a viabilidade deste biomaterial como

um potencial carreador para CTMMO na engenharia de tecido ósseo. Além desses dados, a maior mineralização nos alvéolos tratados, demonstrada pelos exames TCCB abrem perspectivas para sua aplicação clínica e para futuros estudos destinados à reconstrução óssea oral.

7. CONCLUSÃO

A matriz tridimensional de quitosana-gelatina mostrou ser um suporte adequado para a obtenção de construtos com CTMMO, além de ser um potente carreador celular para áreas de injúria tecidual.

Os construtos transplantados contribuíram para a regeneração epitelial, vascular e óssea e aceleraram o processo de maturação do tecido ósseo neoformado, representando uma estratégia viável para a engenharia de tecido ósseo em odontologia.

8. Referências Bibliográficas

Arosarena, O. A. e W. L. Collins. Bone regeneration in the rat mandible with bone morphogenetic protein-2: a comparison of two carriers. Otolaryngol Head Neck Surg, v.132, n.4, Apr, p.592-7. 2005.

Arosarena, O. Tissue engineering. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg, v.13, n.4, Aug, p.233-41. 2005.

Ashammakhi, N. Reactions to biomaterials: the good, the bad, and ideas for developing new therapeutic approaches. J Craniofac Surg, v.16, n.2, Mar, p.195-6. 2005.

Bacáková, L., E. Filova, *et al.* Cell adhesion on artificial materials for tissue engineering. Physiol Res, v.53 Suppl 1, p.S35-45. 2004.

Barry, F. P. e J. M. Murphy. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. Int J Biochem Cell Biol, v.36, n.4, Apr, p.568-84. 2004.

Blunk, T., Gopfericha, A., Tessmar, J. Special issue biomimetic polymers. Biomaterials, v.24, p.4335, 2003.

Burdick, J. A. e G. Vunjak-Novakovic. Engineered microenvironments for controlled stem cell differentiation. Tissue Eng Part A, v.15, n.2, Feb, p.205-19. 2009.

Caia, K., Rechtenpach, A., *et al.* Polysaccharide-protein surface modification of titanium via a layer-by-layer technique: Characterization and cell behaviour aspects. Biomaterials, v.26, p.5960-5971. 2005.

Cancedda, R., Giannonic, R. *et al.* A tissue engineering approach to bone repair in large animal models. Biomaterials, v.28, p.4240-4250. 2007.

Cheung, H.Y.; K.T. Lau, *et al.* A critical review on polymer-based bio-engineered materials for scaffold development. Composites:Part B, v.38.p.291-300. 2007.

Choi, Y. S., S. R. Hong, *et al.* Studies on gelatin-containing artificial skin: II. Preparation and characterization of cross-linked gelatin-hyaluronate sponge. J Biomed Mater Res, v.48, n.5, p.631-9. 1999.

Coutinho, D. F., *et al.* The effect of chitosan on the in vitro biological performance of chitosan-poly(butylene succinate) blends. Biomacromolecules, v.9, p.1139-1145. 2008.

Da Silva Meirelles, L., P. C. Chagastelles, *et al.* Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. J Cell Sci, v.119, n.11, Jun 1, p.2204-13. 2006.

De Coppi, P., G. Bartsch, Jr., *et al.* Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. Nat Biotechnol, v.25, n.1, Jan, p.100-6. 2007.

Devlin, H. e P. Sloan. Early bone healing events in the human extraction socket. Int J Oral Maxillofac Surg, v.31, n.6, Dec, p.641-5. 2002.

Di Martino, A., M. Sittinger, *et al.* Chitosan: a versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. Biomaterials, v.26, n.30, Oct, p.5983-90. 2005.

Dominici, M., K. Le Blanc, *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy, v.8, n.4, p.315-7. 2006.

Donzelli, E., A. Salvade, *et al.* Mesenchymal stem cells cultured on a collagen scaffold: In vitro osteogenic differentiation. Arch Oral Biol, v.52, n.1, Jan, p.64-73. 2007.

Farman, A. G. e W. C. Scarfe. Development of imaging selection criteria and procedures should precede cephalometric assessment with cone-beam computed tomography. Am J Orthod Dentofacial Orthop, v.130, n.2, Aug, p.257-65. 2006.

Fauza, D. Amniotic fluid and placental stem cells. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, v.18, n.6, Dec, p.877-91. 2004.

Fischbach, G. D. e R. L. Fischbach. Stem cells: science, policy, and ethics. J Clin Invest, v.114, n.10, p.1364-70. 2004.

Francischone, Carlos Eduardo. Osseointegração e o tratamento multidisciplinar/ José Bernardes das Neves (Cap. Manipulação dos tecidos moles em implantodontia) Laércio Vasconcelos, Gustavo Petrilli, Laura P.G. Paleckis (Enxertos ósseos autógenos na implantologia). - São Paulo: Quintessence Editora Ltda., 2006.

Friedenstein, A. J., R. K. Chailakhjan, *et al.* The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. Cell Tissue Kinet, v.3, n.4, Oct, p.393-403. 1970.

Fröhlich, M., W. L. Grayson, *et al.* Tissue Engineered Bone Grafts: Biological Requirements, tissue culture and clinical relevance. Curr Stem Cell Res Ther, v.3, p.254-264. 2008.

Ge, Z., Z. Jin, *et al.* Manufacture of degradable polymeric scaffolds for bone regeneration. Biomed Mater, v.3, n.2, Jun, p.1-11. 2008.

Gepstein, L. Derivation and potential applications of human embryonic stem cells. Circ Res, v.91, n.10, Nov 15, p.866-76. 2002.

Gokhale, P. J. e P. W. Andrews. Human embryonic stem cells: 10 years on. Lab Invest, v.89, n.3, Mar, p.259-62. 2009.

Grenha, A., M. E. Gomes, *et al.* Development of new chitosan/carrageenan nanoparticles for drug delivery applications. J Biomed Mater Res A, v.92, n.4, Mar 15, p.1265-72, 2010.

Haynesworth, S. E., J. Goshima, *et al.* Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. Bone, v.13, n.1, p.81-8. 1992.

Healy, K. E. e R. E. Guldberg. Bone tissue engineering. J Musculoskelet Neuronal Interact, v.7, n.4, Oct-Dec, p.328-30. 2007.

Hipp, J. e A. Atala. Sources of stem cells for regenerative medicine. Stem Cell Rev, v.4, n.1, Spring, p.3-11. 2008.

Hsieh, Y. D., H. Devlin, *et al.* Early alveolar ridge osteogenesis following tooth extraction in the rat. Arch Oral Biol, v.39, n.5, May, p.425-8. 1994.

Huang, Y., S. Onyeri, *et al.* In vitro characterization of chitosan-gelatin scaffolds for tissue engineering. Biomaterials, v.26, n.36, Dec, p.7616-27. 2005.

Huebsch, N. e D. J. Mooney. Inspiration and application in the evolution of biomaterials. Nature, v.462, n.7272, Nov 26, p.426-32. 2009.

Hutmacher, D. W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. Biomaterials, v.21, n.24, Dec, p.2529-43. 2000.

Hutmacher, D. W. e A. J. Garcia. Scaffold-based bone engineering by using genetically modified cells. Gene, v.347, n.1, Feb 28, p.1-10. 2005.

Jaiswal, N., S. E. Haneynesworth, *et al.* Osteogenic differentiation of purified, culture expanded human mesenchymal stem cells *in vitro*. J Cell Biochem, v. 64, p. 295-312, 1997.

Jarcho, M. Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. Clin Orthop Relat Res, n.157, p.259-78. 1981.

Kanyama, M., T. Kuboki, *et al.* Connective tissue growth factor expressed in rat alveolar bone regeneration sites after tooth extraction. Arch Oral Biol, v.48, n.10, Oct, p.723-30. 2003.

Keong, L. C. e A. S. Halim. In vitro models in biocompatibility assessment for biomedical-grade chitosan derivatives in wound management. Int J Mol Sci, v.10, n.3, Mar, p.1300-13. 2009.

Khor, E. e L. Y. Lim. Implantable applications of chitin and chitosan. Biomaterials, v.24, n.13, p.2339-49. 2003.

Komori, M., S. Tsuji, *et al.* Efficiency of bone marrow-derived cells in regeneration of the stomach after induction of ethanol-induced ulcers in rats. J Gastroenterol, v.40, n.6, Jun, p.591-9. 2005.

Kretlow, J. D., S. Young, *et al.* Injectable Biomaterials for Regenerating Complex Craniofacial Tissues. Adv Mater Deerfield, v.21, n.32-33, Apr 20, p.3368-3393. 2009.

Langer, R. e J. P. Vacanti. Tissue engineering. Science, v.260, n.5110, May 14, p.920-6. 1993.

Lawrence, B. J. e S. V. Madhally. Cell colonization in degradable 3D porous matrices. Cell Adh Migr, v.2, n.1, Jan, p.9-16. 2008.

Le Trong, I., McDevitt, T. C., Nelson, K. E., Stayton, P. S., Structural characterization and comparison of RGD cell-adhesion recognition sites engineered into streptavidin. Acta Crystallogr, v.59, p.828-34, 2003.

Li, J., Y. Chen, *et al.* Modulation of nano-hydroxyapatite size via formation on chitosan-gelatin network film in situ. Biomaterials, v.28, n.5, Feb, p.781-90. 2007.

Lindhe, J., Karring, T., Lang, N. P. Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral. Ed. Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro: 4. Ed., 720 p., 2005.

Liu SQ. Part II. Chapter 12. Biomaterial aspects of bioregenerative engineering. In: Wiley-interscience. John Wiley & Sons, Inc. editors. Bioregenerative engineering: principles and applications. New Jersey: Hoboken; 2007. p. 468-498.

Lorcan, T. A., Tosetto, M. *et al.* Surface-induced changes in protein adsorption and implications for cellular phenotypic responses to surface interactions. Biomaterials, v.27, p.3096-3108. 2006.

Logeart-Avramoglou, D., F. Anagnostou, *et al.* Engineering bone: challenges and obstacles. J Cell Mol Med, v.9, n.1, Jan-Mar, p.72-84. 2005.

Lutolf, M. P. e J. A. Hubbell. Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. Nat Biotechnol, v.23, n.1, Jan, p.47-55. 2005.

Ma, L., C. Gao, *et al.* Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering. Biomaterials, v.24, n.26, Nov, p.4833-41. 2003.

Machado, C. B., J. M. Ventura, *et al.* 3D chitosan-gelatin-chondroitin porous scaffold improves osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. Biomed Mater, v.2, n.2, Jun, p.124-31. 2007.

Malafaya, P. B., A. J. Pedro, *et al.* Chitosan particles agglomerated scaffolds for cartilage and osteochondral tissue engineering approaches with adipose tissue derived stem cells. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, v.16, p. 1077-1085. 2005.

Mano, J. F., Oliveira, J. T., *et al.* Bone, cartilage and osteochondral tissue engineering strategies using natural origin polymers and ceramics, growth factors and progenitor cells. Tissue engineering:Part A, v.14, n.8, p.707, . 2008.

Mao, J. S., L. G. Zhao, *et al.* Structure and properties of bilayer chitosan-gelatin scaffolds. Biomaterials, v.24, n.6, Mar, p.1067-74. 2003.

Meijer, G. J., Bruijn, J. D., *et al.* Cell-based bone tissue engineering. Plos Medicine, v.4, p.260-263. 2007.

Mello, A., Z. Hong, *et al.* Osteoblast proliferation on hydroxyapatite thin coatings produced by right angle magnetron sputtering. Biomed Mater, v.2, n.2, Jun, p.67-77. 2007.

Mendes, R. M., G. A. Silva, *et al.* Sodium hyaluronate accelerates the healing process in tooth sockets of rats. Arch Oral Biol, v.53, n.12, Dec, p.1155-62. 2008.

Ministério da saúde. Condições de saúde bucal da população brasileira 2002-2003: resultados principais. Brasília: Ministério da saúde, 68 p., 2005.

Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods, v.65, n.1-2, Dec 16, p.55-63. 1983.

Muzzarelli, R. A., M. Mattioli-Belmonte, *et al.* Stimulatory effect on bone formation exerted by a modified chitosan. Biomaterials, v.15, n.13, Oct, p.1075-81. 1994.

Nussbaum, J., E. Minami, *et al.* Transplantation of undifferentiated murine embryonic stem cells in the heart: teratoma formation and immune response. Faseb J, v.21, n.7, May, p.1345-57. 2007.

Oliveira, S. M., D. Q. Mijares, *et al.* Engineering endochondral bone: in vivo studies. Tissue Eng Part A, v.15, n.3, Mar, p.635-43. 2009.

Oréfice, Rodrigo Lambert. Biomateriais; fundamentos e aplicações/ Rodrigo Lambert Oréfice, Marivalda de Magalhães Pereira, Herman Sander Mansur. – Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006.

Pereira, L.V. The importance of the use of stem cells for public health. Ciências & Saúde Coletiva, v.13, p.7-14. 2008.

Pittenger, M. F., A. M. Mackay, *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science, v.284, n.5411, Apr 2, p.143-7. 1999.

Puppi, D., Chiellini, F., *et al.* Polymeric materials for bone and cartilage repair. Progress in polymer science, v.35, p.403-440. 2010.

Ramaswamy, S., J. B. Greco, *et al.* Magnetic resonance imaging of chondrocytes labeled with superparamagnetic iron oxide nanoparticles in tissue-engineered cartilage. Tissue Eng Part A, v.15, n.12, Dec, p.3899-910. 2009.

Ringe, J., C. Kaps, *et al.* Stem cells for regenerative medicine: advances in the engineering of tissues and organs. Naturwissenschaften, v.89, n.8, Aug, p.338-51. 2002.

Risbud, M., J. Ringe, *et al.* In vitro expression of cartilage-specific markers by chondrocytes on a biocompatible hydrogel: implications for engineering cartilage tissue. Cell Transplant, v.10, n.8, p.755-63. 2001.

Rocha, L. B., G. Goissis, *et al.* Biocompatibility of anionic collagen matrix as scaffold for bone healing. Biomaterials, v.23, n.2, Jan, p.449-56. 2002.

Rose, F. R. e R. O. Oreffo. Bone tissue engineering: hope vs hype. Biochem Biophys Res Commun, v.292, n.1, Mar 22, p.1-7. 2002.

Rosenbaum, A. J., D. A. Grande, *et al.* The use of mesenchymal stem cells in tissue engineering: A global assessment. Organogenesis, v.4, n.1, Jan, p.23-7. 2008.

Scarfe, W. C., A. G. Farman, *et al.* Clinical applications of cone-beam computed tomography in dental practice. J Can Dent Assoc, v.72, n.1, Feb, p.75-80. 2006.

Schleicher, U., M. Rollinghoff, *et al.* A stable marker for specific T-cells: a TCR alpha/green fluorescent protein (GFP) fusionprotein reconstitutes a functionally active TCR complex. J Immunol Methods, v.246, n.1-2, Dec 1, p.165-74. 2000.

Shin, M., H. Yoshimoto, *et al.* In vivo bone tissue engineering using mesenchymal stem cells on a novel electrospun nanofibrous scaffold. Tissue Eng, v.10, n.1-2, Jan-Feb, p.33-41. 2004.

Shyng, Y. C., H. Devlin, *et al.* Expression of cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein during healing of the rat tooth-extraction socket. Arch Oral Biol, v.44, n.9, Sep, p.751-7. 1999.

Silva, S. S.; S. M. Luna, *et al.* Plasma surface modification of chitosan membranes: characterization and preliminary cell response studies. Macromol Biosci, v.8, p.568-576. 2008.

Slack, J. M. e D. Tosh. Transdifferentiation and metaplasia--switching cell types. Curr Opin Genet Dev, v.11, n.5, Oct, p.581-6. 2001.

Spin-Neto, R., Pavone, C., *et al.* Biomateriais à base de quitosana com aplicação médica e odontológica: Revisão de Literatura. Revista de Odontologia da UNESP, v.37(2), 155-161. 2008.

Suh, J. K. e H. W. Matthew. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. Biomaterials, v.21, n.24, Dec, p.2589-98. 2000.

Sun, L. P., S. Wang, *et al.* Biological evaluation of collagen-chitosan scaffolds for dermis tissue engineering. Biomed Mater, v.4, n.5, Oct, p.1-6. 2009.

Swenson, E. S., J. G. Price, *et al.* Limitations of green fluorescent protein as a cell lineage marker. Stem Cells, v.25, n.10, Oct, p.2593-600. 2007.

Tan, W., A. Sendemir-Urkmez, *et al.* Structural and functional optical imaging of three-dimensional engineered tissue development. Tissue Eng, v.10, n.11-12, Nov-Dec, p.1747-56. 2004.

Teofilo, J. M., L. G. Brentegani, *et al.* A histometric study in rats of the effect of the calcium antagonist amlodipine on bone healing after tooth extraction. Arch Oral Biol, v.46, n.4, Apr, p.375-9. 2001.

Thein-Han, W. W. e R. D. Misra. Biomimetic chitosan-nanohydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. Acta Biomater, v.5, n.4, p.1182-97. 2009.

Thein-Han, W. W., J. Saikhun, *et al.* Chitosan-gelatin scaffolds for tissue engineering: physico-chemical properties and biological response of buffalo embryonic stem cells and transfectant of GFP-buffalo embryonic stem cells. Acta Biomater, v.5, n.9, p.3453-66. 2009.

Tinti, C.; Benfenati, S. P. The Ramp Mattress suture: a new suturing technique combined with a surgical procedure to obtain papillae between implants in the buccal area. The International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry, v.22, n.1:63-69, 2002.

Valerio, P., M. M. Pereira, *et al.* The effect of ionic products from bioactive glass dissolution on osteoblast proliferation and collagen production. Biomaterials, v.25, n.15, Jul, p.2941-8. 2004.

Xia, W., W. Liu, *et al.* Tissue engineering of cartilage with the use of chitosan-gelatin complex scaffolds. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, v.71, n.2, p.373-80. 2004.

Xiao, Y., H. Qian, *et al.* Tissue engineering for bone regeneration using differentiated alveolar bone cells in collagen scaffolds. Tissue Eng, v.9, n.6, Dec, p.1167-77. 2003.

Yang, S., K. F. Leong, *et al.* The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. Tissue Eng, v.7, n.6, Dec, p.679-89. 2001.

- Yang, J., G. Shi, *et al.* Fabrication and surface modification of macroporous poly(L-lactic acid) and poly(L-lactic-co-glycolic acid) (70/30) cell scaffolds for human skin fibroblast cell culture. J Biomed Mater Res, v.62, n.3, Dec 5, p.438-46. 2002.
- Yang, X. B., R. S. Bhatnagar, *et al.* Biomimetic collagen scaffolds for human bone cell growth and differentiation. Tissue Eng, v.10, n.7-8, Jul-Aug, p.1148-59. 2004.
- Yin, Y., F. Ye, *et al.* Preparation and characterization of macroporous chitosan-gelatin/beta-tricalcium phosphate composite scaffolds for bone tissue engineering. J Biomed Mater Res A, v.67, n.3, Dec 1, p.844-55. 2003.
- Yugoshi, L. I., M. A. Sala, *et al.* Histometric study of socket healing after tooth extraction in rats treated with diclofenac. Braz Dent J, v.13, n.2, p.92-6. 2002.
- Wang, H. L. e K. Al-Shammari. HVC ridge deficiency classification: a therapeutically oriented classification. Int J Periodontics Restorative Dent, v.22, n.4, Aug, p.335-43. 2002.
- Wang X. H., Li D. P., Wang W. J., *et al.* Cross-linked collagen/chitosan matrix for artificial livers. Biomaterials, v.24, p.3213-3220. 2003.
- Wang, H. J., J. Pieper, *et al.* Stimulation of skin repair is dependent on fibroblast source and presence of extracellular matrix. Tissue Eng, v.10, n.7-8, Jul-Aug, p.1054-64. 2004.
- Weissman, I. L. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. Cell, v.100, n.1, Jan 7, p.157-68. 2000.
- Williams D. F. Definitions in biomaterials. Amsterdam:Elsevier, 1987.
- Wiltfang, J., F. R. Kloss, *et al.* 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 Implants Res, v.15, n.2, Apr, p.187-93. 2004.
- Wobus, A. M. e K. R. Boheler. Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. Physiol Rev, v.85, n.2, Apr, p.635-78. 2005.
- Wu, B., Q. Zheng, *et al.* Preparation and ectopic osteogenesis in vivo of scaffold based on mineralized recombinant human-like collagen loaded with synthetic BMP-2-derived peptide. Biomed Mater, v.3, n.4, Dec, p.044111. 2008.
- Zhu, L., W. Liu, *et al.* Tissue-engineered bone repair of goat-femur defects with osteogenically induced bone marrow stromal cells. Tissue Eng, v.12, n.3, Mar, p.423-33. 2006.

**9. ANEXO 1: Parecer do Comitê de Ética em Experimentação Animal
CETEA/UFMG.**



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

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 9/2007**, relativo ao projeto intitulado "**Regeneração do osso alveolar através da engenharia de tecidos: avaliação in vitro e in vivo de células tronco mesenquimais associadas a matrizes porosas de quitosana**", que tem como responsável **Alfredo Miranda Goes**, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **9/ 05/2007**.

Este certificado expira-se em **9/ 05 / 2012**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 9/2007**, related to the project entitled "**Regeneration of alveolar bone by tissue-engineered implants: in vitro and in vivo evaluation of mesenchymal stem cells associated with chitosan porous scaffolds**", under the supervision of **Alfredo Miranda Goes**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **May 9, 2007**.

This certificate expires in **May 9, 2012**.

Belo Horizonte, 10 de Maio de 2007.

Prof. Humberto Pereira Oliveira
Presidente do CETEA/UFMG

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

(Mod. Cert. v1.0)