

ALEXANDRE MOREIRA FERNANDES

**Expressão da Osteopontina após utilização de matriz dentinária
humana desmineralizada em alvéolos de ratos :
análise imunohistoquímica**

FACULDADE DE ODONTOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
BELO HORIZONTE
2016

ALEXANDRE MOREIRA FERNANDES

**Expressão da Osteopontina após utilização de matriz dentinária
humana desmineralizada em alvéolos de ratos :
análise imunohistoquímica**

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Odontologia - área de Concentração em Endodontia

Orientador : Prof. Dr. José Bento Alves

Co-orientador (exterior) : Prof. Dr. Ricardo Battaglino

Faculdade de Odontologia - UFMG
Belo Horizonte
2016

FICHA CATALOGRÁFICA

F363e
2016
T

Fernandes, Alexandre Moreira

Expressão da osteopontina após utilização de matriz dentinária humana desmineralizada em alvéolos de ratos : análise imunohistoquímica / Alexandre Moreira Fernandes. – 2016.

56 f.: il.

Orientador (a): José Bento Alves

Coorientador (a): Ricardo Battaglino

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Odontologia.

1. Dentina. 2. Alvéolo dental. 3. Osteopontina. 4. Reparo ósseo. I. Alves, José Bento. II. Battaglino, Ricardo. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Odontologia. IV. Título.

BLACK D047



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA



FOLHA DE APROVAÇÃO

**Expressão da Osteopontina após utilização de matriz dentinária humana desmineralizada em alvéolos de ratos :
análise imunohistoquímica**

ALEXANDRE MOREIRA FERNANDES

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Odontologia, área de concentração Endodontia.

Aprovada em 22 de julho de 2016, pela banca constituída pelos membros:

Prof(a). Jose Bento Alves - Orientador
UFMG

Prof(a). Eduardo Nunes
PUCMINAS

Prof(a). Fernando Antonio Mauad de Abreu
Newton Paiva

Prof(a). Suzana Coulaud Costa Cruz Miranda
Newton Paiva

Prof(a). Frank Ferreira Silveira
PUCMINAS

Belo Horizonte, 22 de julho de 2016.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA



ATA DA DEFESA DE TESE DO ALUNO ALEXANDRE MOREIRA FERNANDES

Aos 22 dias de julho de 2016, às 08:00 horas, na sala 3418 da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, reuniu-se a Comissão Examinadora composta pelos professores Jose Bento Alves (Orientador) – FO/UFGM, Eduardo Nunes – PUCMG, Fernando Antonio Mauad de Abreu – Centro Universitário Newton Paiva, Suzana Coulaud Costa Cruz Miranda – Centro Universitário Newton Paiva e Frank Ferreira Silveira – PUCMG, para julgamento da tese intitulada: **Expressão da Osteopontina após utilização de matriz dentinária humana desmineralizada em alvéolos de ratos : análise imunohistoquímica**. O Presidente, Prof. Jose Bento Alves, abriu os trabalhos e apresentou a Comissão Examinadora. Após a exposição oral do trabalho pelo aluno e arguição pelos membros da Comissão Examinadora, o candidato foi considerado:

Aprovado

Reprovado

Finalizados os trabalhos, lavrou-se a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos demais membros da Comissão. Belo Horizonte, 22 de julho de 2016.

Prof(a). Jose Bento Alves

Prof(a). Eduardo Nunes

Prof(a). Fernando Antonio Mauad de Abreu

Prof(a). Suzana Coulaud Costa Cruz Miranda

Prof(a). Frank Ferreira Silveira

Dedico esse trabalho...dedico a minha vida ao meu filho Lucas e à minha esposa, eterna companheira Maria Luiza. Só existo porque vocês existem.

*Dedico este trabalho às minhas mães Maria de Lourdes e Maria do Amparo,
ao meu pai Maurílio Fernandes, meus exemplos, minhas raízes.
Minha segunda mãe precisou nos deixar...
Quanta saudade mãezinha, esse trabalho é seu.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, agradeço a Nossa Senhora Aparecida por colocarem tudo em seu lugar no tempo certo. Por enviarem inúmeros anjos, que cruzam nossos caminhos no momento em que mais precisamos.

Meus sinceros agradecimentos :

Ao meu orientador no mestrado e no doutorado Dr. José Bento Alves, um desses anjos que cruzam nossas vidas para nunca mais nos deixar. Um mestre, um amigo, muitas vezes um pai. Não há palavras que possam expressar minha gratidão, por tudo que passamos juntos e pela mão estendida no momento mais tenso e mais crucial do doutorado. Com certeza, JB, se não fosse o senhor, eu não estaria aqui.

Ao Dr. Ricardo Battaglino e sua esposa Dra. Leslie Morse, outros anjos amigos. Meus orientadores no estágio no exterior (Forsyth Institute, Cambridge MA - EUA), que me ofereceram uma das melhores oportunidades de aprendizado que já tive na vida. O tempo que passei no Forsyth foi mágico, Ricardo e Leslie tornaram-se amigos e Graças a Deus as portas continuam abertas para novos sonhos...

À Dra. Yan Xu grande amiga no Forsyth, pelo carinho e pelos ensinamentos com a competência de pesquisadora e paciência de professora. 谢谢 (Xièxiè).

Ao prof. Dr. Saul Paiva e Dra. Maria Cássia Ferreira de Aguiar por todo o esforço para que o estágio no exterior se realizasse. Nunca vou me esquecer do carinho que vocês demonstraram, gratidão eterna.

Nossa amiga Elizabeth Barry, por facilitar nossa vida nos EUA, providenciando tudo que precisávamos com enorme carinho e amizade.

Meus pais Maria de Lourdes e Maurílio pelo exemplo de vida. Meus irmãos Flávio (Gute) e Cristiano (Tice) pela amizade, pelo apoio nos EUA. Minhas cunhadas Thuy e Érica, meus sobrinhos americanos Zazá, Emma, Kay.

Meu sogro Cel. João Sylla, minha cunhada Sylmara, Antônio Carlos, meu afilhado Mateus, meus sobrinhos Pedro e Enzo.

Célia Amália, D. Zaíra pelo carinho.

Aparecida, por segurar a barra lá em casa, muito obrigado, você é um anjo.

Meus amigos Lucas Scudeler, Veri, Vlad, Rodrigo Aliprandi, Fabiano Cunha como é bom tê-los na nossa vida, vocês são muito especiais !

Meus irmãos de coração, muito mais do que amigos Cap. João Luiz e João Sylla Filho, agradeço por vocês serem muito mais do que irmãos... Zim e Dão.

Minha amiga Vanessa, obrigado pela amizade e pelo carinho...

Meus amigos da música (meu equilíbrio) Rodrigo Bruno, Alexandre Pawlow, Cristiano Esteves, Humberto Hermeto, Welter, Rafael, Thiago, Chan e Cléber. A todos os professores da Newton Paiva, que me acolheram com tanto carinho e seguraram muitas barras nas fases finais do doutorado. Destaco minha amiga coordenadora Flávia Barbosa, Carol Dolabela, Gerdal, e os professores José Flávio, Geraldo Magela, Rafael, Augusto, Júlio, Rodrigo Amaral, Alessandra Rosa, Adriana Silva, Daniela Goursand e todos os outros, cujos nomes não estão aqui mas que serão sempre lembrados.

Meus sentidos de vida Luiza e Luquinhas, essa vida só faz sentido porque vocês fazem parte dela. Vocês são uma parte de mim... a melhor parte.

Mãezinha Amparo, não sei porque a senhora teve que ir...

“Quando me for, levarei um pouco de ti e deixarei um pouco de mim.” C.CHAPLIN

A senhora não deixou um pouco, deixou muita ternura, amor e saudade. Fique em paz !

À CAPES, pelo apoio à pesquisa.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO DA LITERATURA	
2.1. Organização histológica do reparo ósseo alveolar.....	19
2.2. Eventos moleculares do reparo ósseo alveolar.....	21
3.2. Matriz Dentinária Desmineralizada (MDD).....	25
4.2. Osteopontina (OPN).....	28
3. OBJETIVOS	
3.1 - Objetivo geral.....	30
3.2 - Objetivos específicos.....	30
4. MÉTODOS	
4.1 - Animais	31
4.2 - MDDH.....	31
4.3 - Procedimentos cirúrgicos.....	31
4.4 - Análises histológicas e histomorfométricas.....	32
4.5 - Análise Imunohistoquímica.....	33
4.6 - Análise estatística.....	34
5. RESULTADOS	
5.1 - Análise histológica e histoquantitativa.....	35
5.2 - Análise imunohistoquímica.....	40
6. DISCUSSÃO.....	43
7. CONCLUSÕES.....	47
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
9. PRODUÇÃO INTELECTUAL DESENVOLVIDA DURANTE O CURSO.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTs	Activinas
ANOVA	Análise de Variância
BMPs	Proteína Morfogenética Óssea
BGLAP/OCN	Osteocalcina
COL	Colágeno
DNA	Ácido Desoxiribonucléico
DDM	Matriz Dentinária Desmineralizada
EDTA	Ácido Dietilamino Tetracético
EGF	Fator de Crescimento Epidermal
FGF	Fator de Crescimento de Fibroblasto
FN	Fibronectina
GM-CSF	Fator estimulador de formação de colônia de macrófagos e granulócitos
GDNFs	Fatores neurotróficos derivados de células da glia
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HE	Hematoxilina-Eosina
IGF	Fator de crescimento semelhante a insulina
IL	Interleucina
INH	Inibinas
M-CSF	Fator estimulador de formação de colônia de macrófagos
MDD	Matriz Dentinária Desmineralizada
MDDH	Matriz Dentinária Desmineralizada Humana
MDT	Matriz Dentinária Tratada
MEC	Matriz Extra Celular
MEV	Microscópio Eletrônico de Varredura
mRNA	Ácido Ribo Nucléico mensageiro
PBS	Solução Salina Tamponada
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular

ON

Osteonectina

OPN

Osteopontina

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Grade com linhas verticais e horizontais colocada sobre a fotomicrografia para determinar quantidade de novas trabéculas ósseas.

Figura 2(a) – 5o dia, lado experimental. Corte histológico (HE) mostrando fatias de dentina desmineralizadas na porção apical do alvéolo (próximas ao osso basal). Observa-se pequena reação inflamatória, porém, início de processo de reparo. TC = tecido conjuntivo; setas = MDDH; OB= osso basal, Barra = 100µm.

Figura 2(b) – 5o dia, lado experimental. Corte histológico (HE) ilustrando a MDDH cercada por tecido conjuntivo. MDDH = matriz dentinária desmineralizada humana; TC = tecido conjuntivo; Setas = áreas de reabsorção da MDDH; V = vasos sanguíneos; Barra = 20µm.

Figura 3(a) – 10º dia, lado controle, coloração : HE. Redução do processo inflamatório, fibras colágenas e fibroblastos, em fase de organização do tecido conjuntivo antes da formação de novas trabéculas ósseas. TC = tecido conjuntivo, T = novas trabéculas, Barra = 100µm

Figura 3(b) – 10º dia, lado experimental, coloração HE. Trabéculas ósseas recentemente formadas conectando as porções periféricas de osso antigo, às áreas centrais. Tecido conjuntivo organizado cercado pelas novas trabéculas formam os espaços medulares. M= espaços medulares; T= trabéculas; V= vasos sanguíneos; CT = tecido conjuntivo; Barra = 100µm

Figura 4(a) – 21o dia, lado controle, coloração HE. Trabéculas recém-formadas, menos mineralizadas, observadas próximas ao tecido conjuntivo organizado. T= trabéculas, TC = tecido conjuntivo , Barra = 100µm

Figura 4(b) – 21º dia, lado experimental, coloração HE. Maturação trabecular caracterizada pela deposição de camadas de osso lamelar formando tecido com maior teor de mineralização. TC = tecido conjuntivo, T = trabéculas ósseas. Barra = 100 µm

Figura 5 - Resultados histoquantitativos : número de pontos sobre as trabéculas dos alvéolos controle (direito) e experimental (esquerdo) em 5, 10 e 21 dias após a exodontia. * p < 0.05.

Figura 6(a) - 5o dia, lado controle. Marcação imunohistoquímica para OPN. Expressão fraca e espaçada, detectada mais claramente próxima à parede vascular (seta) Barra = 50µm

Figura 6(b) – 5o dia, lado experimental. Marcação imunohistoquímica para OPN pode ser observada de forma mais intensa que no grupo controle, tanto distribuída pelo conjuntivo, em área adjacente à matriz dentinária (MDDH) e principalmente próxima à parede de vasos sanguíneos. V = vaso sanguíneo, Barra = 50µm

Figura 7(a) – 10o dia, lado controle. Imunomarcação para OPN distribuída pelo conjuntivo em maior intensidade que no 5o dia, porém, sensivelmente menos intensa que no grupo experimental Barra = 100µm.

Figura 7(b) - 10o dia, lado experimental. Marcação imunohistoquímica para OPN. Marcação muito intensa distribuída pelo conjuntivo, e ainda mais nítida próxima à vasos sanguíneos e à MDDH. MDDH= Matriz Dentinária Desmineralizada Humana Barra = 100µm

Fig. 8 - 10o dia, lado experimental. Marcação imunohistoquímica para OPN é muito intensa na área de tecido conjuntivo próximo à MDDH e bem menos intensa nas áreas de osso trabecular mineralizado (T). MDDH = matriz dentinária desmineralizada humana. T= trabéculas mineralizadas, Barra= 100µm

“Na vida, somos eternos amadores... pois vivemos pouco para sermos mais do que isso.” (Charlie Chaplin)

TÍTULO

Expressão da Osteopontina após utilização de matriz dentinária humana desmineralizada em alvéolos de ratos : análise imunohistoquímica

RESUMO

Apesar de sua capacidade de reparo, o tecido ósseo pode ser submetido a alguns tipos de fraturas, cirurgias ou patologias que podem levar a grandes defeitos ósseos. As principais estratégias de tratamento de defeitos ósseos são baseados em osteoindução ou osteocondução. Matriz dentinária desmineralizada humana (MDDH) é uma alternativa biocompatível para preencher defeitos ósseos, melhorando a qualidade e quantidade de osso produzido. 24 Ratos Wistar foram selecionados, submetidos à extração de ambos os segundos molares superiores (direito e esquerdo). Os alvéolos foram separados em dois grupos: controle (direita) preenchido com coágulo sanguíneo e experimental (esquerda) preenchido com MDDH. Os animais foram sacrificados aos 5, 10 e 21 dias. Foram realizadas análises histológicas, histomorfométricas (análise de variância - ANOVA e teste de Tukey) e imunohistoquímica para osteopontina (OPN) como indicador de osteogênese. Aos 5 dias MDDH foi incorporada pelas novas trabéculas ósseas. Aos 10 dias observou-se organização do tecido conjuntivo e trabéculas no grupo experimental. Detectou-se coloração intensa para OPN em área adjacente à MDDH no grupo experimental. Aos 21 dias no grupo experimental verificou-se trabéculas maduras. Houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Maior número de trabéculas em grupos experimentais que nos grupos controle em todos os períodos de análise. MDDH implantadas em alvéolos de ratos, induz a aceleração da osteogênese. Presença OPN observada mais intensamente aos 10 dias próximo à MDDH.

Palavras Chave : matriz dentinária humana desmineralizada, reparo alveolar, osteopontina, reparo ósseo

TITLE

OSTEOPONTIN EXPRESSION AFTER USE OF DEMINERALIZED HUMAN DENTIN MATRIX IN RATS ALVEOLI : IMMUNOHISTOCHEMISTRY ANALYSIS

ABSTRACT

BACKGROUND - Despite its good capacity for regeneration, bone tissue subjected to some types of fractures or surgery that can lead to large bone defects. The major bone defects treatment strategies are based in osteoinduction or osteoconduction. Demineralized human dentin matrix (DHDM) is a biocompatible alternative to fill bone defect, improving the quantity and quality of bone produced.

METHODS - Wistar rats were selected, submitted to the extraction of both second molars (right and left). Alveoli were separated into two groups: control (right) filled with blood clot and experimental (left) filled with DHDM. Animals were sacrificed at 5, 10 and 21 days. Histological and histoquantitative analyzes (analysis of variance - ANOVA, and Tukey's test) were performed and immunostaining for osteopontin (OPN) as osteogenesis indicator.

RESULTS - 5 days - DHDM incorporated by new trabeculae. 10 days - connective tissue organization and new trabeculae in the experimental group. Intense staining for OPN close to DHDM in the experimental group. 21 days - experimental group showing mature trabeculae. Statistical difference observed ($p < 0.05$). Higher number of trabeculae in experimental groups in all periods of analysis.

CONCLUSIONS - DHDM implanted in alveoli induces the acceleration of osteogenesis. Presence of OPN observed more intensely at 10 days close to DHDM.

Keywords : demineralized human dentin matrix, wound healing, osteopontin, bone repair

1. INTRODUÇÃO

O tecido ósseo reúne diversos tipos celulares a uma extensa matriz extracelular mineralizada, colágeno, proteínas não-colagenosas, água e diversos fatores de crescimento. Tanto a formação óssea (osteogênese) quanto a reabsorção óssea são processos fundamentais para o equilíbrio do metabolismo do cálcio no organismo e manutenção dos elementos estruturais do corpo. Além do papel fisiológico, a osteogênese também auxilia no controle de desordens metabólicas ósseas como a osteoporose ou na recomposição do tecido no caso de fraturas (Lieberman *et al.*, 2002; Yamamoto *et al.*, 2002). Trata-se de um tecido com boa capacidade de reparo, podendo reagir a vários tipos de agressão, demonstrando ampla habilidade de reparar estruturas e formar tecido saudável.

No entanto, em relação aos ossos maxilares, a doença periodontal, as patologias de origem endodôntica, os tumores e exodontias podem gerar reabsorções ósseas de moderadas a severas. Nesses casos, a reabsorção se justifica pela dependência entre processos alveolares e os elementos dentais. As extrações dentárias, por exemplo, deflagram um processo biológico irreversível e progressivo que culmina na reabsorção das cristas alveolares, gerando perdas consideráveis na profundidade e espessura do alvéolo (Jambhekar *et al.*, 2015; Trombelli *et al.*, 2008). Tentativas de redução dessa perda tecidual têm sido adotadas por meio de estratégias de reconstrução tecidual ou aceleração da osteogênese (Won *et al.*, 2015; De Oliveira *et al.*, 2013; Reis-Filho *et al.*, 2012; Schroeder & Mosheiff, 2011; Dupoireux *et al.*, 1994).

As principais estratégias de tratamento de defeitos ósseos baseiam-se tanto na liberação de moléculas sinalizadoras estimulando a diferenciação de precursores de osteoblastos, chamada osteoindução (Ji *et al.*, 2015; Alaei *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2014; Abreu *et al.*, 2013; Ferreira *et al.*, 2013; Marquez *et al.*, 2013; Martinez *et al.*, 2007; Lieberman *et al.*, 2002) quanto no preenchimento da falha com enxertos ou “*scaffolds*” que servem de suporte estrutural para a neoformação tecidual denominado osteocondução (Reis-Filho *et al.*, 2012; Schroeder & Mosheiff, 2011; Dupoireux *et al.*, 1994). Admitindo-se que as células diferenciadas por fatores de crescimento podem não conseguir migrar através de grandes falhas ósseas e que enxertos ou “*scaffolds*” não geram osteogênese sem a presença de novos

osteoblastos sintetizando e mineralizando a matriz óssea, conclui-se que a osteoindução e a osteocondução são interdependentes (Schroeder & Mosheiff, 2011; Mendes *et al.*, 2008; Lieberman *et al.*, 2002).

Entretanto, atualmente as terapias para estímulo da osteogênese por meio de fatores de crescimento possuem o alto custo, o que constitui um fator limitante. As técnicas que utilizam enxertos autógenos apresentam desvantagens como presença de uma segunda área cirúrgica doadora e morbidade no sítio doador. Terapias baseadas em biomateriais, muitas vezes demandam processos de esterilização e purificação que podem diminuir a capacidade de osteoindução ou a ósseo-integração (Schroeder & Mosheiff, 2011). Essas desvantagens impulsionaram os estudos na busca de outras alternativas para os tratamentos envolvendo estímulo da osteogênese.

Embriologicamente, tanto a dentina quanto o osso alveolar possuem a mesma origem : células da crista neural e ectomesênquima. O osso alveolar e a dentina possuem composições químicas extremamente semelhantes. Ambos apresentam cerca de 65% de componentes inorgânicos e 35% de matéria orgânica. Em relação à composição orgânica, tanto na dentina quanto no osso alveolar destacam-se : colágeno I, vários fatores de crescimento como as proteínas morfogenéticas ósseas (BPMs), sialoproteínas, osteopontinas entre várias outras proteínas. Com base nesses aspectos, a possibilidade de utilização de matriz dentinária como componente osteoindutor e osteocondutor passou a orientar diversos trabalhos *in vitro*, *in vivo* e até em seres humanos.

A matriz dentinária amplamente utilizada nos trabalhos *in vitro*, principalmente em estudos de cultura celular foi denominada matriz dentinária tratada (MDT) ou matriz dentinária desmineralizada (MDD). Pesquisas que cultivaram células de folículo dentário e células pré-osteogênicas em conjunto com a MDD/MDT observaram biocompatibilidade, comportamento indutor da matriz dentinária, estimulando osteodiferenciação, mineralização e expressão de osteocalcina, sialofosfoproteínas ósseas, colágeno I, osteopontina, osteonectina e fosfatase alcalina (Ji *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2013; Guo *et al.*, 2009; Kalajzik *et al.*, 2004). Trabalhos também demonstraram que a MDD de origem humana (MDDH) (Li *et al.*, 2009) ou MDD criopreservada por até 6 meses (Jiao *et al.*, 2014) mantiveram as mesmas propriedades de biocompatibilidade e osteoindução.

Estudos *in vivo* utilizaram MDD alógena ou autóloga em modelos animais com amplos defeitos ósseos parietais ou femurais. Esses trabalhos concluíram que a MDD integrou-se de forma biocompatível ao defeito ósseo, promovendo discreta reação inflamatória, melhorando a quantidade e a qualidade do tecido ósseo produzido em relação aos grupos controle, promovendo neovascularização e sendo biologicamente reabsorvida. Esses autores consideraram a MDD um “*scaffold*” osteocondutor e osteoindutor, recomendando sua utilização em tratamentos de reconstrução óssea (Ji *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2013; Bakhshalian *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2011; Carvalho *et al.*, 2004; Gomes *et al.*, 2002; Gomes *et al.*, 2001). Trabalho que observou o comportamento de MDD autóloga em alvéolos de terceiros molares em humanos concluiu que a matriz dentinária apresentou biocompatibilidade, maior qualidade do novo tecido ósseo (homogeneidade das trabéculas) além de completa bio-reabsorção (Gomes *et al.*, 2006).

A osteopontina (OPN) é uma das proteínas não-colagenosas mais abundantes do tecido ósseo. Desempenha diversas funções que incluem controle de mineralização, organização da osteogênese, adesão das células osteogênicas à matriz óssea e reabsorção. OPN e osteocalcina têm sido considerados os principais marcadores da osteogênese principalmente nas etapas iniciais de ossificação (Suenaga *et al.*, 2015).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Organização histológica do reparo ósseo alveolar

Os processos alveolares tanto da mandíbula quanto da maxila existem em função da presença dos dentes. Assim, diante da perda de um ou múltiplos elementos dentais a reorganização óssea invariavelmente leva à substanciais perdas ósseas horizontais e em espessura (Jambhekar *et al.*, 2015). No interior do alvéolo, a formação óssea envolve um processo complexo, coordenado e dinâmico entre células, matriz extra-celular e moléculas sinalizadoras para o preenchimento do espaço antes ocupado pela raiz dentária (Dimitriou *et al.*, 2005).

O primeiro processo histológico observado, iniciado imediatamente após a remoção dentária resulta do intenso rompimento dos vasos sanguíneos do ligamento periodontal, antes ligados à superfície radicular. Trata-se da coagulação sanguínea, deflagrada pelo contato sanguíneo e plaquetário com as fibras colágenas e em seguida pela sucessiva ligação entre os fatores plasmáticos de coagulação que gera a transformação do gel de fibrinogênio na rede de fibrina (Junqueira e Carneiro, 2013). Pesquisas em cães e coelhos observaram coágulo sanguíneo totalmente formado, ocupando completamente a cavidade alveolar, de 24 a 72 horas após a remoção dentária (Lin *et al.*, 2011; Cardaropoli *et al.*, 2003). Perifericamente ao coágulo, observam-se células inflamatórias (principalmente neutrófilos), também presentes junto ao tecido conjuntivo gengival. Em detalhe, o coágulo sanguíneo apresenta sua composição tradicional, ou seja, hemácias e plaquetas envolvidos pela rede de fibrina. Adjacentemente às paredes alveolares, observa-se remanescente do ligamento periodontal, junto ao qual apresentam-se células mesenquimais indiferenciadas, fibroblastos, fibras colágenas e vasos sanguíneos amplamente dilatados. Ao final das 72 primeiras horas, verifica-se, na periferia do coágulo, intensa proliferação vascular substituindo pequenos segmentos do trombo sanguíneo. Nessa fase, podem se observar áreas de necrose por coagulação em todas as porções do coágulo, conferindo o aspecto hialino ao tecido (Cardaropoli *et al.*, 2003).

No período de 7 dias após a exodontia, trabalho em ratos evidencia importantes modificações teciduais para o processo de reparo tecidual alveolar.

Acompanhando a retração do coágulo e a amplificação das áreas de necrose, verifica-se migração de tecido conjuntivo fibroso, fibroblastos e células mesenquimais indiferenciadas em direção ao centro do alvéolo (Lin *et al.*, 2011). A estrutura do coágulo sanguíneo não se mantém nessa fase, sendo substituída por tecido de granulação nas porções centrais e aumento significativo de fibras colágenas migrando perifericamente em direção ao centro (Kuboki *et al.*, 1988). Nas porções periféricas do centro e ápice do alvéolo, adjacente às paredes alveolares observam-se osteoclastos ancorados em intensa atividade de remodelação, gerando alguns espaços medulares (Cardaropoli *et al.*, 2003). Além disso, principalmente nas regiões mais apicais pode-se perceber as primeiras deposições periféricas de “woven bone” (WB), tecido ósseo pouco mineralizado muito celular. Essa deposição, gerada por grande atividade osteoblástica se adianta em direção ao centro alveolar e regiões mais coronárias, podendo ser amplamente verificada em muitas porções do alvéolo 10 dias após a extração (Lin *et al.*, 2011; Kuboki *et al.*, 1988).

Aos 14 dias, em cães, destacam-se ao menos três eventos importantes : (i) a ausência do ligamento periodontal, (ii) a presença de grande montante de WB, ocupando agora a maior parte do alvéolo, fazendo a conexão entre as porções de osso antigo periférico com as áreas mais centrais e (iii) a restrição de células inflamatórias a pequenas porções na periferia do alvéolo (Cardaropoli *et al.*, 2003). Durante essa mesma fase, em ratos e coelhos, além dos alvéolos já estarem completamente preenchidos por tecido ósseo trabecular, pode-se perceber algumas áreas periféricas de substituição de WB por tecido ósseo lamelar, menos celular e com maior teor de mineralização (Lin *et al.*, 2011; Kuboki *et al.*, 1988).

Passados 30 dias da remoção dentária, observa-se nítida organização periodontal nos alvéolos de cães. O tecido conjuntivo marginal organiza-se em fibras orientadas, alinhadas ao epitélio queratinizado, o tecido ósseo periférico mineraliza-se, organiza-se na forma de ósteons e recebe novas inserções de fibras colágenas. Simultaneamente, em várias regiões alveolares, detecta-se intensa atividade osteoclástica, reabsorvendo o WB, gradualmente substituído por tecido ósseo lamelar (Cardaropoli *et al.*, 2003).

Autores que observaram a organização tecidual alveolar em período superior a 30 dias relataram constante evolução da maturação óssea. Esse amadurecimento

foi caracterizado através de contínua deposição de camadas incrementais de osso lamelar, reforçando estruturalmente as pontes mineralizadas e também pelo restabelecimento do periósteo, propiciando a adesão entre a mucosa marginal e o osso cortical recém produzido (Cardaropoli *et al.*, 2003).

Cabe ressaltar que as características locais e moleculares da osteogênese alveolar aqui descritas determinam ocorrência exclusiva de ossificação intramembranosa, ou seja, com diferenciação de células mesenquimais diretamente em osteoblastos e produção imediata de tecido ósseo. O outro tipo de ossificação apresenta diferenciação prévia das células mesenquimais em um estágio intermediário (condroblastos) que produzem tecido cartilaginoso. Esse tecido, posteriormente substituído por tecido ósseo, caracteriza a ossificação endocondral, observada principalmente em regiões mecanicamente menos estáveis, em geral próximas à fraturas ósseas (Allori *et al.*, 2008; Dimitriou *et al.*, 2005).

2.2. Eventos moleculares do reparo ósseo alveolar

Hormônios, citocinas e fatores de crescimento participam da osteogênese como moléculas sinalizadoras secretadas por células locais ou absorvidas do plasma sanguíneo. Entre os mais importantes fatores de crescimento e diferenciação, citocinas pró-inflamatórias, fatores angiogênicos e constituintes da matriz extra celular envolvidos na osteogênese estão : superfamília do fator de crescimento transformador beta (TGF- β), fator de crescimento de fibroblastos 1 e 2 (FGF-1, FGF-2), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento semelhante à insulina 1 e 2 (IGF-1, IGF-2), família das proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), osteonectina (ON), osteocalcina (BGLAP), osteopontina (OPN), fibronectina (FN), interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), fator estimulador de formação de colônia de macrófagos e granulócitos (GM-CSF), fator estimulador de formação de colônia de macrófagos (M-CSF) e fator de crescimento vascular e endotelial (VEGF) (Poniatowski *et al.*, 2015). Essas moléculas formam complexas interações e podem possibilitar a formação óssea, desde que 3 fatores essenciais estejam presentes : presença de colágeno, viabilidade de fosfato e cálcio, além da remoção dos fatores inibidores de mineralização (Allori *et al.*, 2008).

Para fins didáticos, divide-se o processo de recuperação óssea alveolar em 3 grandes fases : fase inflamatória, que se inicia imediatamente após a exodontia, perdurando por aproximadamente 3 a 4 dias em ratos; fase reparadora, observada após o 4º até o 14º dia e fase de remodelação, geralmente considerada após o 14º dia no modelo animal rato (Allori).

Imediatamente após a remoção do elemento dental, o rompimento das fibras do ligamento periodontal, feixe vâsculo-nervoso e periósteo alveolar inicia um processo inflamatório que irá se perpetuar por alguns dias. Durante esse período inicial de 1 a 4 dias, predomina a síntese e liberação de citocinas pró-inflamatórias : interleucina-1 (IL-1), fator de necrose tumoral alpha (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6). Essas citocinas exercem efeito quimiotático para outras células inflamatórias, angiogênese e atração para fibroblastos (Dimitriou *et al.*, 2005). Observam-se ainda, nesse período inflamatório, intensa expressão de IGF-1, IGF-2, FGF-1 e FGF-2, secretados por células locais e inflamatórias. Nessa fase, esses fatores também atuam como fortes elementos quimiotáticos para fibroblastos e intensificam a angiogênese (Zhao *et al.*, 2007). A expressão de IGF e FGF pode ser verificada em todas as fases do reparo ósseo, participando da proliferação, diferenciação celular, síntese, maturação óssea e remodelação osteogênica (Dimitriou *et al.*, 2005). A degradação das plaquetas presentes em função dos processos de coagulação funcionam como uma das principais fontes de fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF). Além de importante efeito angiogênico, o PDGF exerce um dos mais fortes efeitos quimiotáticos e mitogênicos para osteoblastos e precursores mesenquimais (Allori *et al.*, 2008). Um dos importantes fatores de crescimento intensamente expressos durante a fase inflamatória inicial é o TGF- β (Zhao *et al.*, 2007). A superfamília do TGF- β constitui-se em um enorme grupo de polipeptídeos reguladores que agrega muitas outras famílias de fatores de crescimento : BMPs, activinas (ACTs), inibinas (INHs), fatores neurotrópicos derivados de células da glia (GDNFs), entre outras. Estudos em modelo de fratura observaram a presença de TGF- β 24 horas após o trauma, na região do periósteo, originado principalmente dos grânulos alfa das plaquetas, monócitos, macrófagos e células endoteliais. Sua presença no soro humano aumenta gradualmente durante as primeiras duas semanas, atingindo nível máximo no 14º dia (Allori *et al.*, 2008; Sarahrudi *et al.*, 2011). Trabalhos em modelo experimental alveolar em ratos demonstra pico de

expressão local no 10º dia e diminuição gradual na porção final da fase reparadora, até o 14º dia (Zhao *et al.*, 2007). As famílias de TGF- β e BMPs são os fatores de crescimento mais relacionados ao tecido ósseo. Quase todas as células do organismo sintetizam e possuem receptores para TGF- β . No caso das linhagens celulares relacionadas ao reparo ósseo, sua resposta depende do grau de diferenciação, da relevância da célula no processo, da presença de outras células e do efeito sinérgico de outras citocinas e fatores de crescimento. Os efeitos celulares gerados pela ligação do TGF- β à superfície celular podem ser considerados como uma conexão entre as fases inflamatória e reparadora (Vaughan *et al.*, 2000; Lieberman *et al.*, 2002; Poniatowski *et al.*, 2015). Na primeira fase, TGF- β apresenta intensa ação quimiotática, gerando recrutamento de células mesenquimais indiferenciadas, ósteo-progenitoras, fibroblastos e células imunológicas (Narine *et al.* 2006). Além disso possui efeito angiogênico, atuando de forma sinérgica ao VEGF. O VEGF é considerado o mais importante fator angiogênico. Sua expressão se intensifica a partir do período inflamatório, atingindo pico de produção em torno do 7º dia, já na fase reparadora, quando sofre ligeiro declínio (Zhao *et al.*, 2007) Durante o período reparador, TGF- β induz a síntese e ossificação da matriz extra celular por fibroblastos e osteoblastos. Simultaneamente, contribui para incremento da matriz óssea, ao inibir a ativação, proliferação e diferenciação de osteoclastos em conjunção com IL-1, IL-3, IL-6 (Hankenson *et al.*, 2015) e ao induzir sua apoptose, prevenindo reabsorção prematura do tecido recém formado (Poniatowski *et al.*, 2015).

A fase reparadora se inicia com a redução do processo inflamatório (após o 4º dia), quando se intensifica a migração de fibroblastos em substituição ao coágulo, em direção às porções centrais do alvéolo. Essa infiltração do tecido conjuntivo é acompanhada pelo aumento da síntese das proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs). BMPs são os fatores de crescimento de maior potencial osteogênico já descritos e sua sinalização molecular um dos processos de reparo ósseo mais bem estudados. BMP-2, -4, -6, -7 e -9 são considerados os elementos mais osteogênicos, sendo capazes de induzir diferenciação osteoblástica em vários tipos celulares (células mesenquimais indiferenciadas, fibroblastos). Proporcionando diferenciação de osteoblastos e condrócitos, as BMPs atuam tanto na ossificação intramembranosa quanto endocondral. (Allori *et al.*, 2008; Hankenson *et al.*, 2015).

Estudos em ratos demonstram que a expressão das BMPs nos alvéolos dentais é mínima, durante o período inflamatório, ao contrário do TGF- β cuja presença já é bastante intensa nesse período. No entanto, ambos os fatores de crescimento se comportam de maneira semelhante na fase reparadora. Tanto o TGF- β quanto as BMPs são progressivamente expressos, atingem seu pico em torno do 10º dia, e, a partir desse momento sofrem sensível redução em sua síntese até o final da fase reparadora no 14º dia (Zhao *et al.*, 2007). A expressão dos principais elementos da matriz extracelular óssea como osteopontina, osteonectina (OPN, ON) apresentam padrão de expressão semelhante. São minimamente sintetizados durante a fase inflamatória, sendo gradualmente mais observados durante a fase reparadora. Nesse período, a curva de produção é ascendente até o final da fase, indicando sua presença progressiva, a medida em que o tecido ósseo se expande (Zhao *et al.*, 2007). Osteonectina (ON) é uma das principais glicoproteínas da matriz extracelular óssea, classificada como importante nucleador de mineralização mediada por colágeno. Já a osteopontina (OPN) é uma sialoproteína cuja expressão é estimulada pelo TGF- β , presente na matriz extra celular durante a osteogênese endoconal e intramembranosa. Produzida normalmente por osteoblastos, osteócitos e precursores, participa ativamente da osteogênese no controle da mineralização, adesão celular e sobrevivência dos osteoblastos (Allori *et al.*, 2008b; Subraman *et al.*, 2015). Como agentes de mineralização, a presença de ON e OPN na fase reparadora é mais observada nas regiões de tecido osteóide e sítios de mineralização do que nas áreas completamente mineralizadas (Pintero *et al.*, 1995).

Durante a fase de remodelação, após o 14º dia, evidencia-se novamente a participação da citocina pró-inflamatória TNF- α , estimulando a formação e função dos osteoclastos. (Hankenson *et al.*, 2015). Durante a fase de remodelação, após o 14º dia, evidencia-se novamente a participação da citocina pró-inflamatória TNF- α , estimulando a formação e função dos osteoclastos. (Hankenson *et al.*, 2015). Nesse período, metaloproteinases específicas degradam o tecido ósseo mineralizado, permitindo a invasão de vasos sanguíneos (Dimitriou *et al.*, 2005). Além das metaloproteinases e citocinas pró-inflamatórias, a fase de remodelação óssea é caracterizada pela presença de osteocalcina (OCN). Trata-se de uma proteína contendo ácido carboxigutâmico, presente exclusivamente nas porções mineralizadas e frequentemente relacionada como reguladora da mineralização,

inibindo a precipitação espontânea de minerais e o crescimento dos cristais de hidroxiapatita. Assim, a OCN tem sido implicada como diretamente envolvida nos processos de reabsorção e remodelação óssea. (Allori *et al.*, 2008b).

2.3 Matriz Dentinária Desmineralizada (MDD)

De acordo com a engenharia de tecidos, os melhores *scaffolds* devem interagir positivamente com as células, melhorar sua adesão, crescimento, migração e diferenciação (Jiao *et al.*, 2014). Nesse sentido, a matriz dentinária tratada (MDT) ou matriz dentinária desmineralizada (MDD) já foi extensivamente avaliada do ponto de vista microestrutural, constituição molecular, sobre os possíveis efeitos do tratamento (desmineralização) e biocompatibilidade, através de estudos em culturas de células e animais. Posteriormente, foram testados os potenciais condutores e indutores da formação de tecido mineralizado ósseo e dentário sob diversas condições.

Após completa limpeza, preparo e desmineralização da MDD por métodos protocolares normalmente adotados, análises em microscopia eletrônica de varredura (MEV) revelaram completa limpeza de resíduos de tecidos moles nas superfícies radiculares dentinárias utilizadas como substrato. Observações detalhadas evenciaram a ampla exposição dos túbulos dentinários e espaçamento das fibras colágenas da dentina tubular e peritubular. Avaliações histológicas mostraram que o espaçamento entre as fibras podem representar canais para liberação de proteínas de fatores de crescimento em direção à matriz extracelular. (Guo *et al.*, 2009). Assim, com ênfase em sua aplicabilidade como *scaffold*, a MDD não apenas preserva as características físicas e morfológicas da matriz extracelular como possui várias das proteínas presentes nos fluidos tissulares. A MDD pode fornecer tanto suporte mecânico quanto meio indutor. (Chen *et al.*, 2015).

O processo de desmineralização dentinária contribui positivamente para que a exposição das densas fibras colágenas favoreçam a adesão celular. Além disso, em relação à contribuição para a osteogênese, sabendo-se que a dentina contém várias proteínas não colagenosas, inclusive fatores de crescimento como as BMPs, uma vez desmineralizada, os túbulos dentinários tornam-se mais amplos, funcionando como canais para liberação de proteínas essenciais que podem

promover crescimento e diferenciação de osteoblastos (Koga *et al.*, 2016). Pesquisas quantificando a liberação de proteínas e fatores de crescimento pela MDD em comparação à matriz dentinária não tratada concluíram que a MDD liberou mais proteínas e fatores solúveis que a dentina não tratada. Os resultados apontaram para o colágeno I e o TGF- β 1 como as mais altas concentrações (Li *et al.*, 2011).

A presença de moléculas bioativas inerentes à sua constituição, tornam a MDD um reservatório de fatores indutores à recuperação tecidual (Guo *et al.*, 2009). Análises imunohistoquímicas da MDD mostraram a presença de : proteína de matriz dentinária 1(DMP1) , sialoproteína dentinária (DSP) , sialoproteína óssea (BSP), osteopontina (OPN), fator de crescimento transformador beta 1 (TGF- β 1), colágeno I (COL-I), decorina, biglicana e metaloproteinases. Todos envolvidos no controle da mineralização durante o reparo tecidual (Guo *et al.*, 2009; Hedenbjörk-Lager *et al.*, 2016). Trabalhos também comprovaram a estabilidade molecular e manutenção de potencial indutor da DDM criopreservada. Concluiu-se não haver diferenças entre a DDM natural e a DDM criopreservada por até 6 meses, comprovando-se a preservação de suas propriedades e estabilidade da matriz. Dessa forma, um banco de criopreservação de matriz dentinária pode representar grande utilidade do ponto de vista de sua aplicação clínica. DDM pode ser transportada para clínicas de atendimento na forma congelada, sendo imediatamente disponível para pacientes, de forma similar a outros produtos de engenharia tecidual (Jiao *et al.*, 2014).

A utilização de matriz dentinária tratada de origem humana (MDDH) em substituição à dentina de origem animal mostrou-se viável e vantajosa. Além de apresentar melhor arquitetura morfológica das fibras e maiores quantidades de fatores de crescimento associados à sua constituição (Li *et al.*, 2011), amplia as possibilidades de novos estudos, visando aplicabilidade desse *scaffold* diretamente em tratamentos humanos de forma autógena.

Uma série de estudos com implantação de MDD autógena em animais atestaram as propriedades favoráveis desse *scaffold* osteoindutor. Avaliações histológicas, radiográficas, histomorfométricas e imunohistoquímicas em defeitos parietais e mandibulares em coelhos, após períodos de avaliação de até 90 dias permitiram concluir que as fatias de dentina foram completamente incorporadas ao

novo tecido ósseo e reabsorvidas durante o reparo. Houve aceleração do reparo ósseo quando comparados os grupos experimentais (MDD) e controle. Pode-se observar aumento da trabeculação óssea, melhora na qualidade do tecido e biocompatibilidade, sem formação de processos inflamatórios ou infecciosos (Gomes *et al.*, 2001; Gomes *et al.*, 2002; Carvalho *et al.*, 2004; Bakhshalian *et al.*, 2013). Trabalhos com esse mesmo modelo animal (coelho) com diabetes induzida foram avaliados por meio de densidade óssea e histomorfometria. Esses estudos observaram que MDD mostrou biocompatibilidade durante o reparo ósseo em coelhos diabéticos, estimulando a formação de tecido ósseo (Gomes *et al.*, 2007; Gomes *et al.*, 2008). Outros experimentos em coelhos avaliaram a associação da MDD a compostos constituídos por colágeno ou utilizaram a matriz dentinária como carreador de fator de crescimento. Em ambos os casos, houve boa biocompatibilidade, biodegradação e osteocondutividade. A MDD mostrou-se também um ótimo carreador para o fator de crescimento BMP recombinante (Li *et al.*, 2013; Um *et al.*, 2016).

A implantação de fatias dentinárias desmineralizadas em alvéolos de animais revelou propriedades favoráveis na aceleração da formação óssea e melhora na qualidade tecidual. Após análise histológica, histomorfométrica e imunohistoquímica, os pesquisadores concluíram que MDDH aumentou a expressão de VEGF, BMP e acelerou o processo de reparo em alvéolos de ratos estimulando a diferenciação osteoblástica, deposição óssea e a formação vascular. Esses resultados sugerem que a MDDH apresenta potencial osteoindutor e osteocondutor e pode representar um eficiente material de enxerto para regeneração óssea (Reis-Filho *et al.*, 2012; de Oliveira *et al.*, 2013).

Poucos trabalhos em humanos avaliaram a influência da MDDH autógena colocada em alvéolos dentários. Num deles, a matriz dentinária foi deixada em alvéolos de 3os molares imediatamente após a exodontia e foram realizadas análises de densitometria óssea. Os resultados mostraram biocompatibilidade, com completa integração da matriz ao osso neoformado, melhor qualidade óssea e discreta aceleração do reparo em relação ao grupo controle (Gomes *et al.*, 2006). No outro estudo, um relato de caso, 5 pacientes foram acompanhados por 5 anos após colocação de MDD autógena juntamente com implantes dentários. Os autores

relataram que houve biocompatibilidade, regeneração óssea guiada e o implante sendo mantido com sucesso, passados 5 anos da cirurgia (Kim *et al.*, 2016).

2.4 Osteopontina (OPN)

OPN foi descrita pela primeira vez em 1986 em osteoblastos, sendo sintetizada e constituindo a matriz extracelular óssea, junto com a sialoproteína óssea. Por isso foi denominada inicialmente como sialoproteína óssea I e depois sialoproteína óssea II. Trata-se de uma glicoproteína, cujo nome se deve ao seu papel no tecido ósseo. Ali, essa molécula funciona como uma “ponte”, exercendo a conexão entre a hidroxiapatita e os elementos celulares (Subraman *et al.*, 2015).

Pesquisas realizadas por análise imunohistoquímica localizaram a OPN na matriz extracelular durante a ossificação endocondral e intramembranosa. Em geral, a OPN é produzida por osteoblastos, osteócitos e células precursoras, mas também por osteoclastos, condrócitos e fibroblastos. Momentos após a fratura, a OPN é marcadamente expressa por osteoblastos, sugerindo seu envolvimento no recrutamento imediato de células para recuperação e posteriormente para remodelação óssea (fases iniciais e tardias da osteogênese) (Allori *et al.*, 2008b).

A expressão da OPN é estimulada por vários fatores :

(a) Citocinas inflamatórias

(b) Hormônios esteróides, ácido retinóico, glicocorticóides e 1,25 dihidroxi vitamina D3

(c) Fatores de crescimento e diferenciação como fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator de crescimento transformador beta(TGF- β).

Hormônio paratireotrófico (PTH) e dexametasona inibem a expressão e síntese de OPN (Allori *et al.*, 2008b).

A localização e as fases de maior expressão da OPN durante o reparo ósseo reflete diretamente seu papel durante a osteogênese. Atribui-se à OPN os papéis sistêmicos de estímulo imunológico e inflamatório, regulagem da adesão celular, migração e sobrevivência de vários tipos celulares (Subraman *et al.*, 2015). Mais especificamente em relação à osteogênese, a OPN relaciona-se à maturação,

adesão e sobrevivência dos osteoblastos, contribuindo para a mineralização óssea (Viale-Bouroncle *et al.*, 2014).

Trabalho utilizando mandíbula neonatal de ratos procurou desvendar a localização da OPN durante a osteogênese do crescimento mandibular, esclarecendo muitos aspectos em relação à fase e à participação dessa glicoproteína. OPN foi claramente observada no tecido osteóide, aumentando a intensidade da imunomarcação em direção ao *front* de mineralização, ao contrário do cálcio, exclusivamente confinado nas áreas mineralizadas e ausente no tecido osteóide. Assim, os pesquisadores ressaltam que, encontrando-se intensamente presente na região de início de mineralização e também no tecido osteóide, a OPN relaciona-se às fases iniciais da osteogênese, regulando o processo de precipitação mineral. Considerando-se as marcações celulares, a OPN foi observada no citoplasma dos osteoblastos e osteócitos mas não no citoplasma dos osteoclastos, apesar de ser observada claramente nas regiões de remodelação óssea. Tal observação sugere que osteoclastos ativos e maduros não produzem OPN. A imunolocalização da OPN próximo às vilosidades citoplasmáticas dos osteoclastos indicam que a OPN ali verificada foi exposta durante a desmineralização óssea remodelatória, juntamente com outras proteínas não colagenosas também observadas (Pintero *et al.*, 1995).

3. OBJETIVOS

3.1 - Objetivo geral

Avaliar o potencial osteogênico da MDDH.

3.2 - Objetivos específicos

3.2.1 - Analisar comparativamente, por meio de cortes histológicos (HE) as alterações e a reorganização tecidual provocada pela MDDH deixada em alvéolos de ratos, 5, 10 e 21 dias após os procedimentos cirúrgicos.

3.2.2 - Analisar comparativamente, por meio de avaliação histomorfométrica a quantidade de tecido ósseo neoformado nas porções apicais dos alvéolos de ratos, 5, 10 e 21 dias após os procedimentos cirúrgicos.

3.3.3 - Avaliar a expressão de osteopontina (OPN), por meio de imunohistoquímica, nos alvéolos tratados com MDDH nos tempos : 5 e 10 dias.

4. MÉTODOS

4.1 - Animais

Foram selecionados 24 ratos Wistar do gênero masculino com cerca de 2 meses de idade, pesando entre 150-200 gramas. Os animais foram mantidos em ambiente com condições climáticas controladas, sob ciclos de 12 horas de luz/ escuridão e acesso *ad libitum* à ração e água. Essa pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética Animal da Universidade de Uberaba n. No. 022/2009.

4.2 - MDDH

Os dentes foram coletados no banco de dentes da Faculdade de Odontologia da Universidade de Uberaba. As orientações para questões éticas seguiram Resolução 196 do Conselho Nacional de Saúde, 1996.

A MDDH foi obtida de dentes sem lesões cariosas ou qualquer outra patologia. As raízes foram cortadas, separando a porção coronária da porção radicular, limpas com remoção da polpa dentária e ligamento periodontal, desmineralizadas em ácido dietilaminotetracético (EDTA) 10%, pH 7,3 a 25°C por aproximadamente 3 meses e cortadas em criostato. Fatias de MDDH foram lavadas em água desionizada esterilizada, durante 10 minutos, em seguida, armazenadas em solução salina tamponada com fosfato (PBS) contendo 100 unidades/ml de penicilina (Gibco BRL) e 100 mg/ml de estreptomicina (Gibco BRL) para a descontaminação.

4.3 - Procedimentos cirúrgicos

O protocolo cirúrgico foi montado de acordo com método estabelecido por nosso grupo de estudos (Reis-Filho et al., 2012). Resumidamente, os animais foram aleatoriamente agrupados e cada um deles foi submetido à exodontia de ambos os segundos molares superiores (direito e esquerdo) após anestesia obtida através de solução de Quetamina 10% com Xilazina 2%, 1:1, num volume de 0,1ml por 100g

de peso corporal injetada intra-muscularmente. Os alvéolos foram separados em dois grupos : o grupo controle (lado direito) no qual os alvéolos não receberam MDDH, sendo naturalmente preenchidos apenas por coágulo sanguíneo e grupo experimental (lado esquerdo) cujos alvéolos foram preenchidos por MDDH utilizando porta amálgama. Em um estudo anterior (Abreu *et al.*, 2013), foram utilizados lados invertidos de grupos controle e experimental para verificar a possibilidade de algum viés relacionado a essa opção. Não foi observado nenhum viés quando os lados inversos ao presente estudo foram utilizados.

Os animais foram mantidos em posição supina durante todo o tempo de duração da anestesia (aproximadamente 4 horas) a fim de se evitar o deslocamento da MDDH do alvéolo dentário. Além disso, os animais receberam alimentação pastosa por dois dias após a cirurgia. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical sob anestesia com Quetamina 10% e Xilazina 2%, 1:1, num volume de 0,1ml por 100g de peso corporal injetada intra-muscularmente para avaliação da regeneração e remodelação óssea precoce, intermediária e tardia dos alvéolos dentários. As eutanásias ocorreram após 5,10 e 21 dias após a cirurgia, quando as análises histológicas e imunohistoquímicas foram realizadas em 8 animais por grupo.

4.4 - Análises histológicas e histomorfométricas

As maxilas foram dissecadas e fixadas em formalina neutra tamponada 10% por 48 horas em temperatura ambiente. Após fixação, as maxilas foram desmineralizadas em EDTA 10% (pH 7,3), desidratadas usando soluções graduais de etanol, incluídas em parafina e cortadas em micrótomo no plano sagital, produzindo secções de 5 µm. As secções foram coradas com hematoxilina-eosina (HE) para análises histológicas e morfométricas ou processadas para imunohistoquímica para avaliação da expressão de OPN.

As imagens foram observadas por meio de microscópio óptico Olympus® BX 50 e capturadas usando o software Qcapture 6.0. A análise se concentrou na região apical dos alvéolos da raiz distal, como o local inicial de formação óssea. As imagens foram tratadas pelo software Qcapture 6.0 acoplado a um computador.

Para determinar a quantidade de novas trabéculas ósseas, essas foram contadas utilizando uma tela com linhas verticais e horizontais posicionada sobre a fotomicrografia (Fig. 1), com o auxílio do assistente confocal (Chapel Hill, NC). O número de trabéculas ósseas localizadas nos cruzamentos de linha de grade foi contado por uma pessoa calibrada (Reis-Filho et al., 2012).

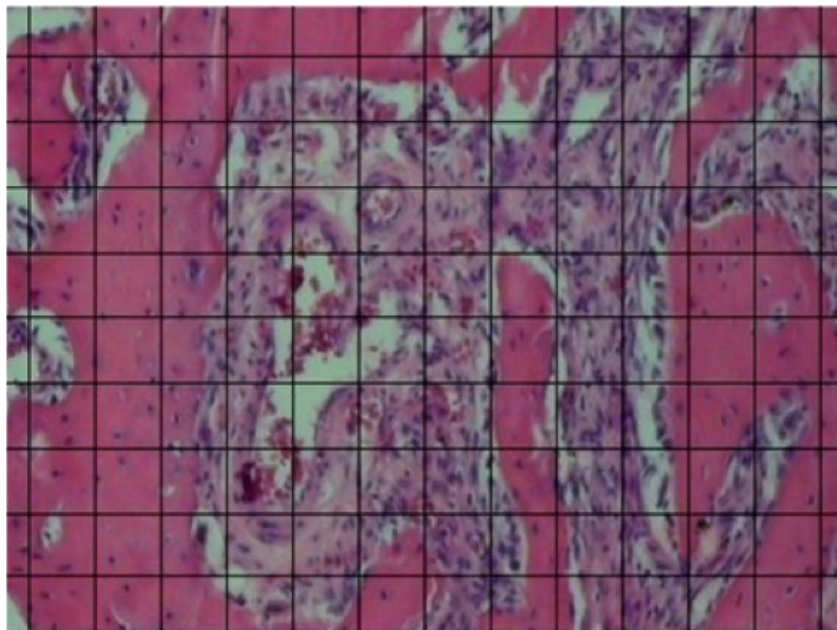


Figura 1 - Grade com linhas verticais e horizontais colocada sobre a fotomicrografia para determinar quantidade de novas trabéculas ósseas.

4.5 - Análise Imunohistoquímica

A expressão de OPN em cada período de tempo foi avaliada por, pelo menos três animais diferentes. Para obtenção dos slides, as secções foram desparafinizadas com xileno, re-hidratadas em série gradual de etanol diluído em PBS e incubadas em H₂O₂ 10% em metanol para neutralização da atividade da peroxidase endógena. Sítios de ligação não específica foram bloqueados com BSA 2% diluído em PBS por 1 hora. As secções foram incubadas overnight a 4°C com anticorpo anti-osteopontina de rato, diluição 1:50 (Santa Cruz Biotechnology - OPN : código sc-21742). Após três lavagens em PBS, as secções foram incubadas com o anticorpo secundário biotilado por 30 minutos à temperatura ambiente (Kit SLAB - Dako código K0690). Os cortes foram então lavados novamente em PBS e

incubados com conjugado complexo streptavidina-peroxidase por 30 minutos em temperatura ambiente. Os cortes foram novamente lavados em PBS, a atividade de ligação da peroxidase foi detectada por meio do substrato 3,3' diaminobenzidina-tetracloridrato e H₂O₂ 0,01% em PBS, depois contra corados em hematoxilina. Os controles foram submetidos ao mesmo processo, omitindo-se a incubação com o anticorpo primário. Para determinar-se a quantidade de células coradas, 12 secções aleatoriamente escolhidas foram avaliadas tanto no lado controle quanto no lado experimental. As imagens foram obtidas numa magnificação final de 400X utilizando uma placa de captura e microscópio (Nikon Eclipse E200) acoplado a um computador pessoal e um software de tratamento de imagens (Reis-Filho et al., 2012).

4.6 - Análise estatística

As diferenças entre os parâmetros avaliados de cada grupo foram testadas através da Análise da Variância (ANOVA) e do teste de Turkey. Os dados de todos os grupos foram examinados quanto à normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Todas as análises foram realizadas em triplicata e a significância foi estabelecida quando $p \leq 0,05$.

5 - RESULTADOS

5.1 - Análise histológica e histoquantitativa

A análise histológica mostrou os fragmentos MDDH imersos em alvéolos dentários, cercados por tecido conjuntivo em diferentes estágios de reabsorção. No 5º dia, a porção apical dos alvéolos no grupo experimental (lado esquerdo) apresentaram menor número de áreas inflamadas do que o lado controle. O material implantado (MDDH) encontra-se em contato direto com o tecido conjuntivo organizado, aumentando a formação e organização das fibras de colágeno, iniciando a promoção do processo de reparação tecidual (Fig. 2a). Observação detalhada da interação de MDDH com tecido conjuntivo mostra várias áreas de reabsorção da dentina, em contato com regiões de tecido organizado. Os vasos sanguíneos também estão presentes nestas áreas (fig. 2b).

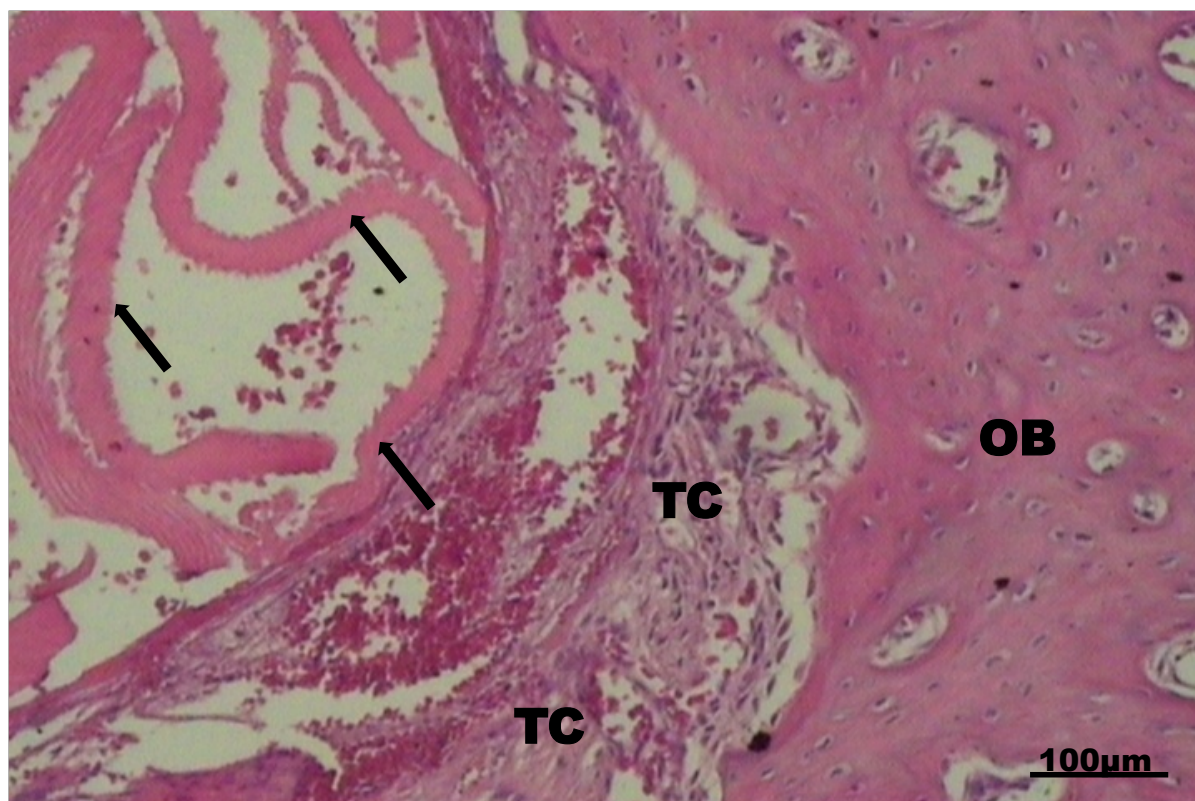


Figura 2(a) –5o dia, lado experimental. Corte histológico (HE) mostrando fatias de dentina desmineralizadas na porção apical do alvéolo (próximas ao osso basal). Observa-se pequena reação inflamatória, porém, início de processo de reparo. TC = tecido conjuntivo; setas = MDDH; OB= osso basal, Barra = 100µm.



Figura 2 (b) – 5o dia, lado experimental. Corte histológico (HE) ilustrando a MDDH cercada por tecido conjuntivo. MDDH = matriz dentinária desmineralizada humana; TC = tecido conjuntivo; Setas = áreas de reabsorção da MDDH; V = vasos sanguíneos; Barra = 20µm.

No 10o dia, as diferenças entre os lados controle e os lados experimentais em relação às etapas de reparação tecidual tornou-se mais relevante. No lado controle, as áreas mais proeminentes observadas consistem em fibras colágenas e fibroblastos, configurando organização do tecido conjuntivo que precede a formação de novas trabéculas (Fig. 3a). Os alvéolos experimentais mostram o reparo tecidual em uma fase mais adiantada. Novas trabéculas são observadas próximas ao tecido conjuntivo altamente organizado, e novos vasos sanguíneos também estão presentes. O tecido conjuntivo cercado por novas trabéculas formam os espaços medulares que caracterizam a arquitetura da conformação final do osso medular (Fig. 3b).

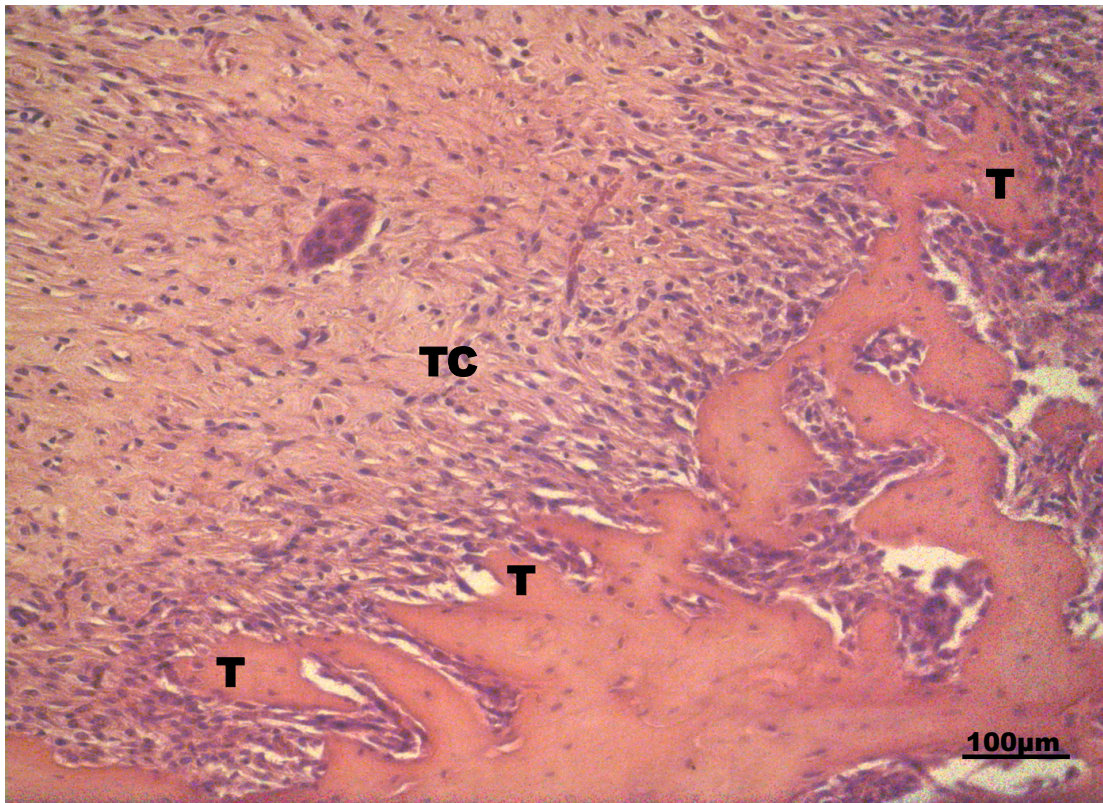


Figura 3(a) – 10º dia, lado controle, coloração : HE. Redução do processo inflamatório, fibras colágenas e fibroblastos, em fase de organização do tecido conjuntivo antes da formação de novas trabéculas ósseas. TC = tecido conjuntivo, T = novas trabéculas, Barra = 100µm

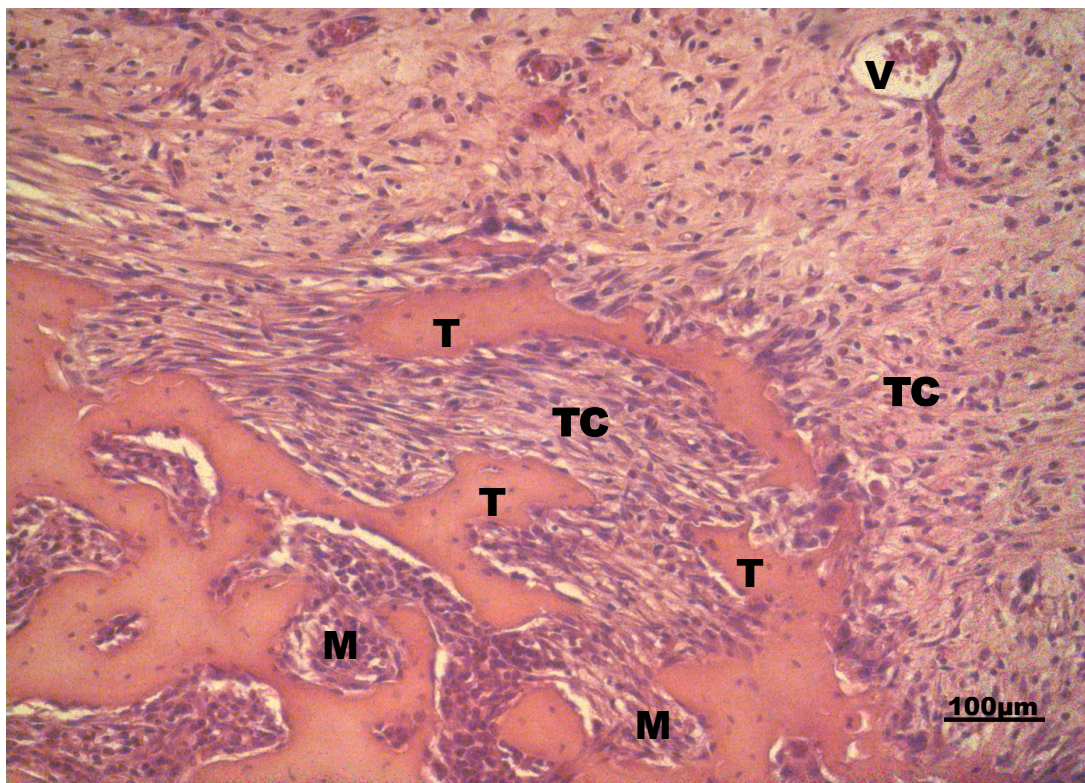


Figura 3(b) – 10º dia, lado experimental, coloração HE. Trabéculas ósseas recentemente formadas conectando as porções periféricas de osso antigo, às áreas centrais. Tecido conjuntivo organizado cercado pelas novas trabéculas formam os espaços medulares. M= espaços medulares; T= trabéculas; V= vasos sanguíneos; CT = tecido conjuntivo; Barra = 100µm

O 21º dia do lado controle corresponde aproximadamente ao 10º dia do alvéolo experimental. Novas trabéculas, ainda muito celulares e menos mineralizadas, são observadas adjacentes ao tecido conjuntivo organizado (Fig. 4a). No lado experimental a fase de maturação é caracterizada pela deposição contínua de camadas incrementais de osso lamelar, e pela substituição de osso celular por um tecido mais mineralizado (Fig. 4b).

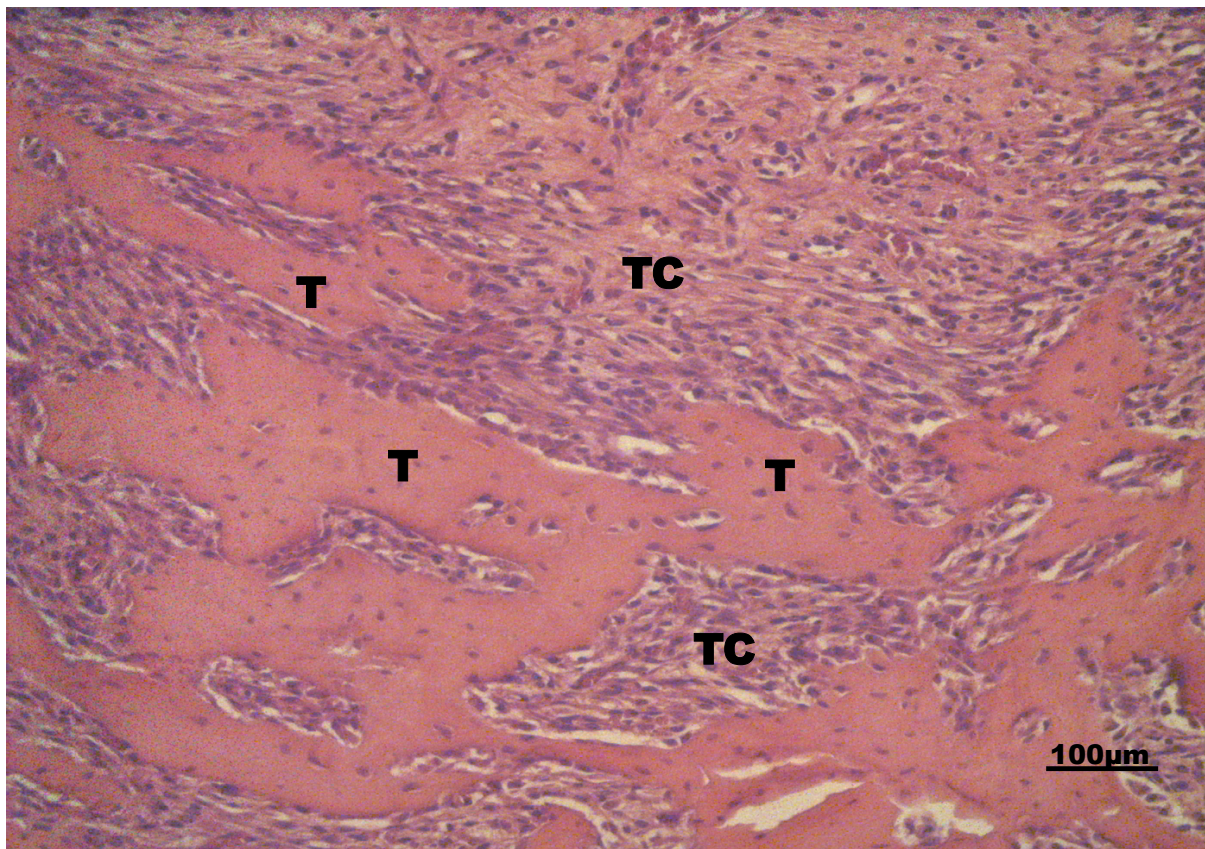


Figura 4(a) – 21º dia, lado controle, coloração HE. Trabéculas recém-formadas, menos mineralizadas, observadas próximas ao tecido conjuntivo organizado. T= trabéculas, TC = tecido conjuntivo , Barra = 100µm

Cambridge, January 20, 2015

To whom it may concern

This letter is my final report on Alexandre Fernandes's stay in my laboratory at The Forsyth Institute from February 2014 to January 2015. Alexandre came to my laboratory as part of the CAPES fellowship to work on a project entitled: "DENTAL PULP STEM CELLS: isolation, characterization and uses in neuro-regeneration".

The goal of this study is to study the differentiation potential of dental pulp stem cells *in vitro*, and to determine the impact of cell transplantation on neurological recovery *in vivo* in a rodent model of contusion SCI. Information obtained from this work will be used to guide future clinical trials using dental stem cells to improve neuro-recovery after stroke, traumatic brain injury, and spinal cord injury.

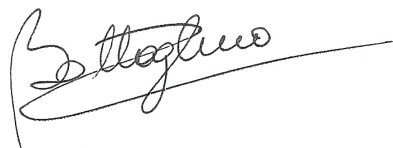
Alexandre's contributions were essential for the successful development of several projects:

1. He helped determine factors associated with stemness and neural differentiation potential of dental pulp stem cells isolated from exfoliated teeth from children (SHED) and extracted third molars from adults (DPSC).
2. He and his co-workers also determined that inflammatory stimuli were able to block terminal neural differentiation of dental stem cells and that anti-inflammatory resolvins could reverse that effect.
3. Finally, Alexandre worked to determine the impact of DPSC transplantation on neurological recovery in a rodent model of contusion Spinal Cord Injury. Specifically, Alexandre was in charge of scoring locomotor behavior according to the Basso, Beattie and Bresnahan (BBB) open field test.

Alexandre was a regular and active participant in my weekly laboratory meetings and attended research seminars offered at the Forsyth Institute. He has an impressive ability to analyze data and to propose new solutions based on that analysis. The results of his work are part of two manuscripts, currently in preparation.

Alexandre spent an extremely productive time at The Forsyth Institute, and I rate his visit as an outstanding success.

Sincerely,



Ricardo A. Battaglino, Ph.D.
Instructor, Department of Oral Medicine Infection and Immunity
Harvard School of Dental Medicine
Associate Member of Staff,
Mineralized Tissue Biology Department
The Forsyth Institute
245 First St
Cambridge, MA - 02142
617.892.8442



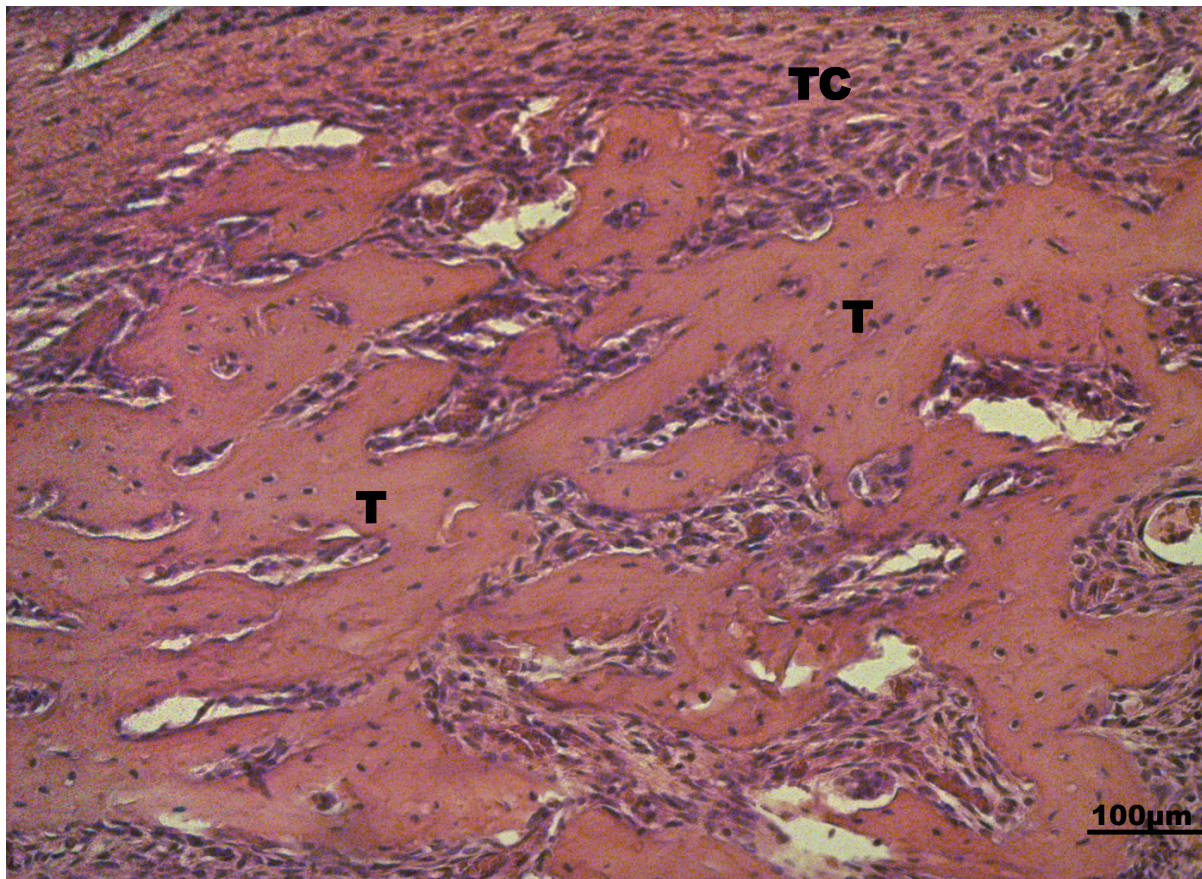


Figura 4(b) – 21º dia, lado experimental, coloração HE. Maturação trabecular caracterizada pela deposição de camadas de osso lamelar formando tecido com maior teor de mineralização. TC = tecido conjuntivo, T = trabéculas ósseas. Barra = 100 µm

Os resultados da análise histoquantitativa expressam o número de trabéculas na figura 5. Houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre o número de trabéculas dos lados controle e experimentais em todos os períodos de análise.

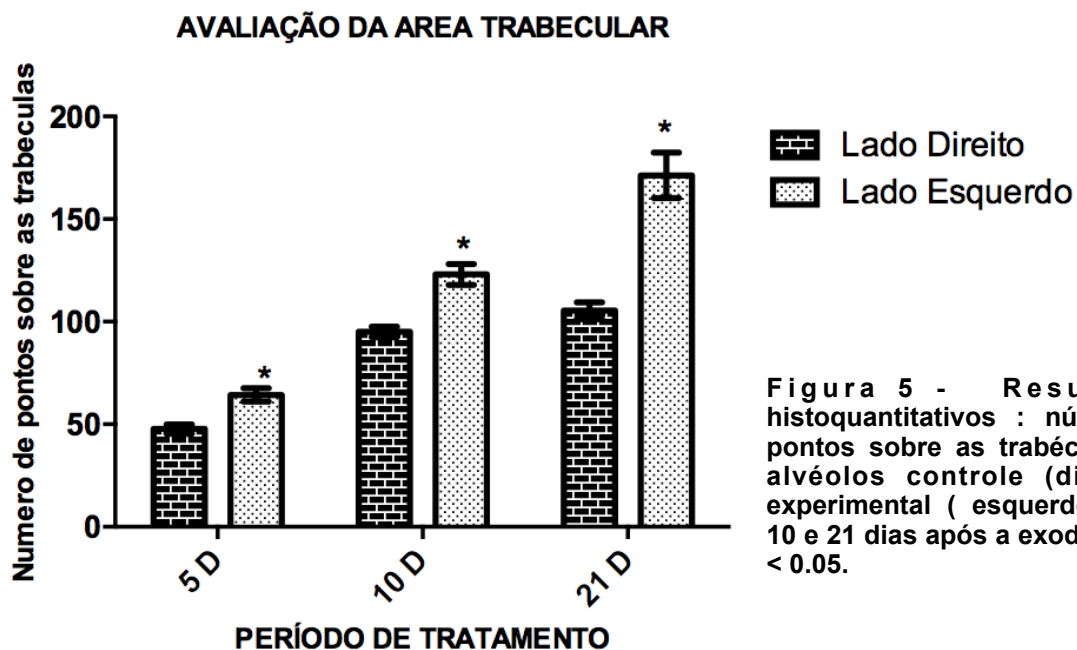


Figura 5 - Resultados histoquantitativos : número de pontos sobre as trabéculas dos alvéolos controle (direito) e experimental (esquerdo) em 5, 10 e 21 dias após a exodontia. * $p < 0.05$.

5.2 - Análise imunohistoquímica

A avaliação das secções submetidas à imunohistoquímica revelou resultados distintos entre os grupos controle e experimental mesmo nos períodos iniciais. Aos 5 dias após a exodontia, o alvéolo controle (lado direito) mostrou imunomarcagem muito fraca e espaçada. Somente em áreas adjacentes a vasos sanguíneos, a OPN pode ser identificada com alguma clareza (fig. 6a). No lado experimental, a imunoexpressão pode ser claramente observada, distribuída pelo tecido conjuntivo, próxima à matriz dentinária e principalmente próxima às paredes dos vasos sanguíneos (fig 6b).

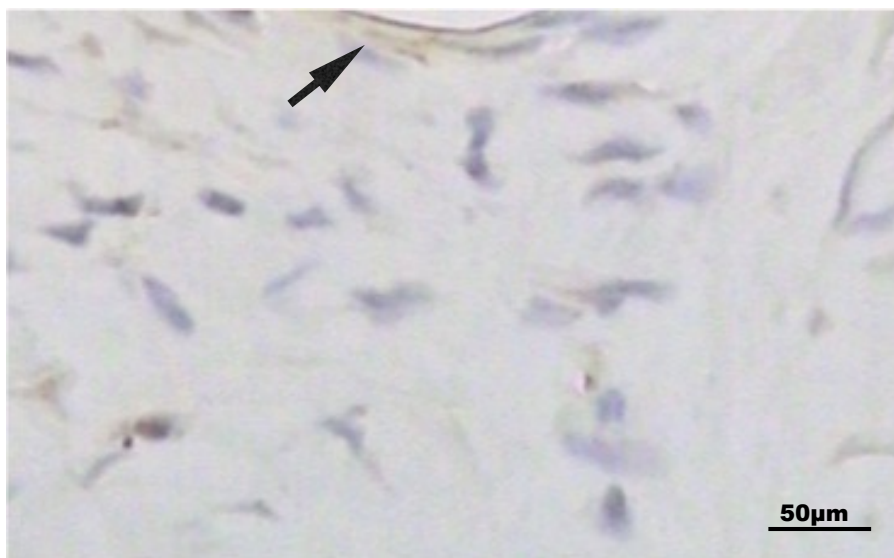


Figura 6(a) - 5o dia, lado controle. Marcação imunohistoquímica para OPN. Expressão fraca e espaçada, detectada mais claramente próxima à parede vascular (seta) Barra = 50µm



Figura 6(b) – 5o dia, lado experimental. Marcação imunohistoquímica para OPN pode ser observada de forma mais intensa que no grupo controle, tanto distribuída pelo conjuntivo, em área adjacente à matriz dentinária (MDDH) e principalmente próxima à parede de vasos sanguíneos. V = vaso sanguíneo, Barra = 50µm

Passados 10 dias da exodontia, embora a imunomarcaco no lado controle tenha se intensificado, uniformemente distribuída pelo conjuntivo (fig 7a), no lado experimental a expressão de OPN tornou-se ainda mais evidente, claramente maior que no alvéolo controle. Também nesse período, a presença de OPN se destaca em regiões próximas  MDDH e em torno de áreas vasculares (fig 7b).

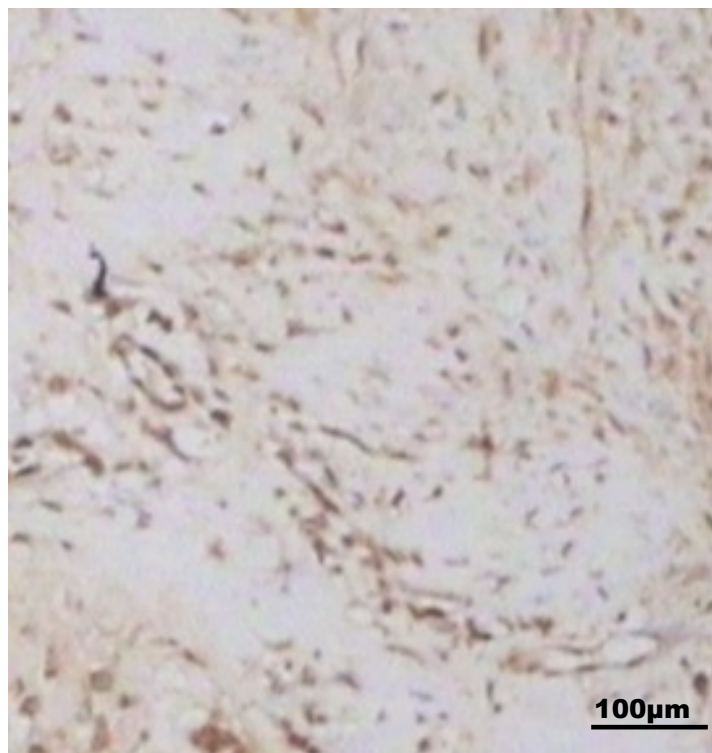


Figura 7(a) – 10o dia, lado controle. Imunomarcaco para OPN distribuída pelo conjuntivo em maior intensidade que no 5o dia, porém, sensivelmente menos intensa que no grupo experimental Barra = 100µm.

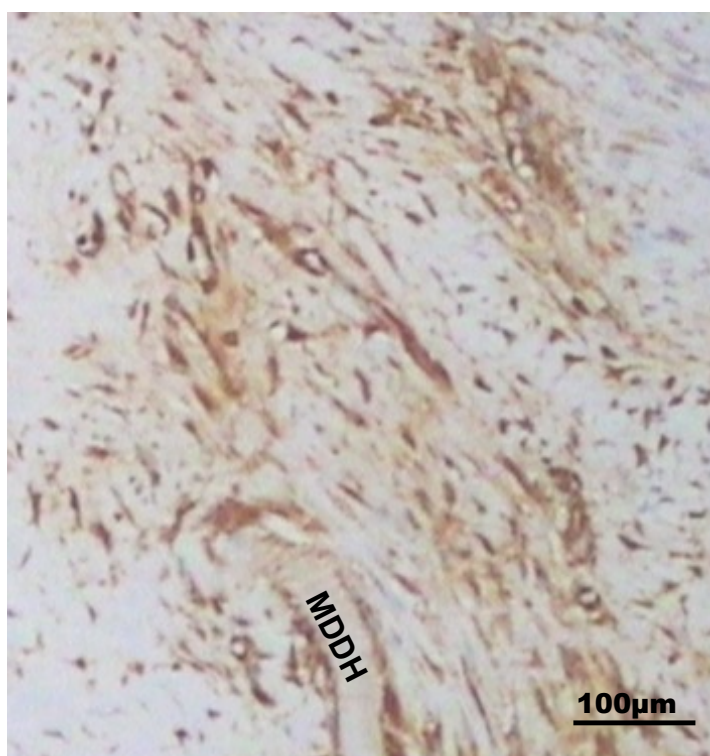


Figura 7(b) 10o dia, lado experimental. Marcaco imunohistoquímica para OPN. Marcaco muito intensa distribuída pelo conjuntivo, e ainda mais nítida próxima  vasos sanguíneos e  MDDH. MDDH= Matriz Dentinária Desmineralizada Humana Barra = 100µm

Secções de análise imunohistoquímica ainda no 10º dia evidenciaram, não apenas a intensidade da presença de OPN próxima à MDDH, mas também menor imunomarcção em regiões trabeculares onde a mineralização já ocorreu de forma mais adiantada (T). Nesses locais, embora a OPN possa ser notada, sua imunexpressão torna-se bem menos intensa que nas áreas conjuntivas adjacentes (fig.8).

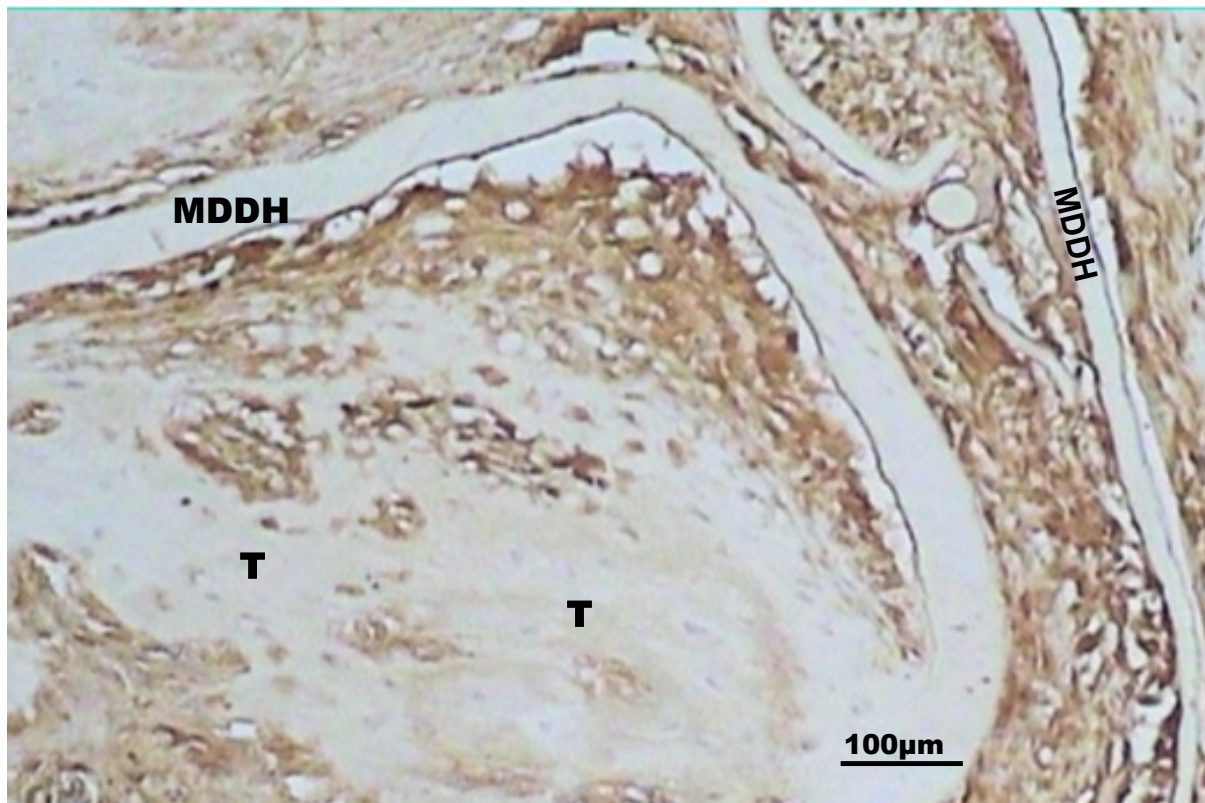


Fig. 8 - 10o dia, lado experimental. Marcação imunohistoquímica para OPN é muito intensa na área de tecido conjuntivo próximo à MDDH e bem menos intensa nas áreas de osso trabecular mineralizado (T). MDDH = matriz dentinária desmineralizada humana. T= trabéculas mineralizadas, Barra= 100µm

6 - DISCUSSÃO

A escolha correta de um agente osteoindutor e osteocondutor é crítica para o sucesso de terapias osteogênicas visando a regeneração de tecidos após trauma ou cirurgia. As vantagens da utilização da matriz de dentina desmineralizada como um agente osteocondutor e osteoindutor são a facilidade de obtenção, baixo custo, simplicidade de preparação e de instalação no local do tratamento. Os procedimentos cirúrgicos envolvidos neste processo são minimamente invasivos, especialmente quando comparados com os tratamentos que utilizam implantes de osso autógeno.

Embriologicamente, tanto dentina quanto o osso alveolar possuem a mesma origem: células da crista neural e ectomesênquima. Além disso, osso alveolar e dentina têm composições químicas muito semelhantes. Ambos constituem-se por cerca de 65% de componentes inorgânicos e 35% de matéria orgânica. A composição orgânica em ambos são também muito semelhantes. Clinicamente, as reabsorções radiculares por substituição, quando ocorre reabsorção dentinária e formação óssea no local da raiz confirma a biocompatibilidade entre estes dois tecidos (Kim *et al.*, 2013). Esses aspectos corroboram com a utilização de matriz de dentinária como um agente indutor de osteogênese.

Neste trabalho, foi escolhida a realização da primeira análise somente após de 5 dias devido, aos resultados obtidos em um estudo prévio (Reis-Filho *et al.*, 2012). Nesse trabalho anterior, o processo inflamatório observado após 3 dias influenciou negativamente os marcadores imunohistoquímicos e os principais eventos histológicos. Assim, no presente estudo, foi possível melhor observação dos eventos de reparação de tecidos. Os outros períodos de avaliação (10 e 21 dias) também foram baseados em marcos da reparação alveolar após a exodontia (Abreu *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2011; Cardaropoli *et al.*, 2003). Neste estudo avaliou-se a porção basal do alvéolo. Esta escolha, com base em resultados de trabalhos anteriores (de Oliveira *et al.*, 2013; Reis-Filho *et al.*, 2012) ocorreu uma vez que esta região é a primeira a produzir tecido ósseo após a exodontia durante o reparo alveolar. Considerando que seria avaliado um marcador precoce de osteogênese (OPN), a observação da região síntese óssea precoce mostrou-se adequada.

Nossos resultados mostraram maior quantidade de ósseas nos alvéolos experimentais em relação ao controle em todos os períodos avaliados. Este resultado, confirmado estatisticamente se deve, provavelmente, à presença de MDDH nos alvéolos experimentais. Foi verificado que a MDDH, após cinco dias no alvéolo apresenta superfície irregular, coberta por elementos celulares, indicando evidente processo de reabsorção. Esta reabsorção gradual da MDDH está de acordo com relatos de muitos outros estudos (de Oliveira *et al.*, 2013; Reis-Filho *et al.*, 2012; Guo *et al.*, 2009; Carvalho *et al.*, 2004; Gomes *et al.*, 2002). Uma das maiores vantagens da biodegradação é a liberação lenta e gradual de fatores de crescimento presentes na matriz de dentina (BMPs, TGF- β , IGF, FGF, PDGF). Em áreas de reabsorção dentinária ou óssea, os tecidos reabsorvidos podem funcionar como uma fonte de fatores de crescimento e outras moléculas, aumentando a viabilidade destas substâncias no meio extracelular (Silva *et al.*, 2004). A MDDH pode agir como uma zona de ação dinâmica, capaz de influenciar o fenótipo da celular. Proteínas da matriz extracelular podem interagir diretamente com os receptores da superfície celular, iniciando assim uma via de transdução de sinal e modulando a resposta celular aos factores de crescimento. Assim, os fatores de crescimento e diferenciação lentamente liberados, pode induzir as células mesenquimais adjacentes a se diferenciarem em condrócitos e osteoblastos (Kim *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2004). Dessa forma, a presença de MDDH foi provavelmente responsável pela aceleração do reparo do alvéolo experimental quando comparado ao grupo controle.

Um dos fatores de crescimento constituinte da complexa rede de citocinas presentes no MDDH e gradualmente liberados durante a reabsorção é o TGF- β . Trata-se de um potente estimulador do crescimento de células ósseas, frequentemente implicado na osteogênese *in vivo* (Poniatowski *et al.*, 2015). O contato direto entre MDDH e o tecido ósseo recém formado observado durante esse período está em conformidade com estas observações. Em relação à organização do tecido conjuntivo, o TGF- β foi diretamente relacionado com a síntese e contração das fibras colágenas por fibroblastos no tecido conjuntivo (Chan *et al.*, 2005). Esta contração fibrilar, que caracteriza a organização do tecido conjuntivo pode ser considerado crucial para a reparação tecidual.

Simultaneamente à degradação ou a incorporação de DHDM ao osso, verificou-se intensa coloração OPN principalmente em áreas adjacentes à DHDM. A presença desta biomolécula como um indicador de reparação e regeneração do tecido mineralizado já foi extensamente reportada (Subraman *et al.*, 2015; Viale-Bouroncle *et al.*, 2014 Kuratate *et al.*, 2008). OPN é uma citocina multifuncional, considerado como um marcador precoce de osteogênese, como um dos indicadores da fase final de diferenciação dos osteoblastos (Allori *et al.*, 2008b). Assim, a presença da OPN detectada mais intensamente nas secções de imuno-histoquímica dos alvéolos tratados com DHDM pode indicar maior número de osteoblastos diferenciados e refletir em osteogênese ocorrendo em um ritmo mais adiantado do que o observado nos alvéolos controle, no mesmo período.

Considerando-se a localização da expressão de OPN, a análise imunohistoquímica no período de 5 e 10 dias verificou imuno marcação em regiões adjacentes a vasos sanguíneos. Essa observação corrobora com os resultados de Reis-Filho e colaboradores (2012). Considerando-se que o Fator de Crescimento Endotelio-Vascular (VEGF) é o fator mais importante para angiogênese e que o suprimento sanguíneo adequado é essencial para qualquer reparo tecidual, este autor realizou imunomarcação (VEGF) após preenchimento de alvéolos de ratos com MDDH. De acordo com os pesquisadores, células mesenquimais e osteoprogenitoras localizam-se adjacentes à células endoteliais. As observações sugerem que um dos mecanismos através dos quais a MDDH estimularia osteogênese seria através da angiogênese. Assim, o VEGF proporcionaria a ligação entre a angiogênese e a osteogênese por um mecanismo co-dependente, durante o reparo ósseo.

Os resultados observaram aos 10 dias, fraca imunomarcação da OPN nas áreas completamente mineralizadas da nova trabeculagem óssea e intensa imunomarcação nas regiões de tecido em fase de diferenciação de osteoblastos e deposição de tecido osteóide (*front* de mineralização). Esses resultados estão de acordo com trabalho de Pinero e colaboradores (1995). De acordo com esses pesquisadores, a fraca marcação da OPN na área completamente mineralizada se deve ao recobrimento dos epitopos anti-OPN pelo tecido mineral, impedindo a ligação antígeno-anticorpo. Esse fato foi comprovado à partir do momento em que

houve tratamento de desmineralização com EDTA e as áreas antes mineralizadas exibiram imunomarcção para OPN.

7 - CONCLUSÕES

A) - A MDDH instalada em alvéolos de segundos molares de ratos apresenta amplo potencial osteogênico, refletido em maior número de trabéculas ósseas formadas no lado experimental em relação ao lado controle, considerando-se os mesmos períodos avaliados.

B) - As análises histológicas mostraram que a reorganização e o reparo tecidual nos alvéolos experimentais, tratados com MDDH ocorreu de forma mais adiantada em relação aos alvéolos controle. Tal conclusão baseia-se na verificação de redução do quadro inflamatório, organização de fibras conjuntivas e produção de tecido mineralizado em períodos anteriores nos alvéolos experimentais.

C) A expressão de OPN, marcador precoce de osteogênese, ocorreu de forma nitidamente mais intensa nos alvéolos experimentais em relação aos alvéolos controle. A imunolocalização da OPN ocorreu principalmente nas áreas adjacentes aos vasos sanguíneos e próximas à MDDH nos alvéolos experimentais.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS :

- 1 - Abreu FA, Ferreira CL, Silva GA, Paulo Cde O, Miziara MN, Silveira FF, Alves JB. Effect of PDGF-BB, IGF-I growth factors and their combination carried by liposomes in tooth socket healing. *Braz Dent J.* 2013;24:299-307.
- 2 - Alaei F, Hong SH, Dukas AG, Pensak MJ, Rowe DW, Lieberman JR. Evaluation of osteogenic cell differentiation in response to bone morphogenetic protein or demineralized bone matrix in a critical sized defect model using GFP reporter mice. *J Orthop Res.* 2014;32:1120-8.
- 3 - Allori AC, Salloum AM, Warren SM. Biological basis of bone formation, remodeling, and repair-part I: biochemical signaling molecules. *Tissue Eng Part B Rev.* 2008;14:259-73.
- 4 - Allori AC, Salloum AM, Warren SM. Biological basis of bone formation, remodeling, and repair-part II: extracellular matrix. *Tissue Eng Part B Rev.* 2008b;14:275-83.
- 5 - Bakhshalian N, Hooshmand S, Campbell SC, Kim JS, Brummel-Smith K, Arjmandi BH. Biocompatibility and microstructural analysis of osteopromotive property of allogenic demineralized dentin matrix. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2013;28:1655-62
- 6 - Cardaropoli G, Araújo M, Lindhe J. Dynamics of bone tissue formation in tooth extraction sites. An experimental study in dogs. *J Clin Periodontol.* 2003;30:809-18.
- 7 - Carvalho VA, Tosello Dde O, Salgado MA, Gomes MF. Histomorphometric analysis of homogenous demineralized dentin matrix as osteopromotive material in rabbit mandibles. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2004;19:679-86.
- 8 - Chan CP, Lan WH, Chang MC, Chen YJ, Lan WC, Chang HH, Jeng JH. Effects of TGF-beta s on the growth, collagen synthesis and collagen lattice contraction of human dental pulp fibroblasts in vitro. *Arch Oral Biol.* 2005;50: 469-79.
- 9 - Chen G, Chen J, Yang B, Li L, Luo X, Zhang X, Feng L, Jiang Z, Yu M, Guo W, Tian W. Combination of aligned PLGA/Gelatin electrospun sheets, native dental pulp extracellular matrix and treated dentin matrix as substrates for tooth root regeneration. *Biomaterials.* 2015;52:56-70.

10 - De Oliveira GS, Miziara MN, Silva ER, Ferreira EL, Biulchi AP, Alves JB. Enhanced bone formation during healing process of tooth sockets filled with demineralized human dentine matrix. *Aust Dent J*. 2013;58:326-32.

11 - Dimitriou R, Tsiridis E, Giannoudis PV. Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury*. 2005;36:1392-404.

12 - Ferreira CL, Abreu FA, Silva GA, Silveira FF, Barreto LB, Paulino Tde P, Miziara MN, Alves JB. TGF- β 1 and BMP-4 carried by liposomes enhance the healing process in alveolar bone. *Arch Oral Biol*. 2013;58:646-56.

13 - Gomes MF, dos Anjos MJ, Nogueira Tde O, Catanzaro Guimarães SA. Autogenous demineralized dentin matrix for tissue engineering applications: radiographic and histomorphometric studies. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2002;17:488-97.

14 - Gomes MF, dos Anjos MJ, Nogueira TO, Guimarães SA. Histologic evaluation of the osteoinductive property of autogenous demineralized dentin matrix on surgical bone defects in rabbit skulls using human amniotic membrane for guided bone regeneration. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2001;16:563-71.

15 - Gomes MF, Abreu PP, Morosolli AR, Araújo MM, Goulart Md. Densitometric analysis of the autogenous demineralized dentin matrix on the dental socket wound healing process in humans. *Braz Oral Res*. 2006;20:324-30.

16 - Gomes MF, Banzi EC, Destro MF, Lavinicki V, Goulart Md. Homogenous demineralized dentin matrix for application in cranioplasty of rabbits with alloxan-induced diabetes: histomorphometric analysis. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2007;22:939-47.

17 - Gomes MF, Destro MF, Banzi EC, Vieira EM, Morosolli AR, Goulart Md. Optical density of bone repair after implantation of homogenous demineralized dentin matrix in diabetic rabbits. *Braz Oral Res*. 2008;22:275-80.

18 - Guo W, He Y, Zhang X, Lu W, Wang C, Yu H, Liu Y, Li Y, Zhou Y, Zhou J, Zhang M, Deng Z, Jin Y. The use of dentin matrix scaffold and dental follicle cells for dentin regeneration. *Biomaterials*. 2009;30:6708-23.

19 - Hankenson KD, Gagne K, Shaughnessy M. Extracellular signaling molecules to promote fracture healing and bone regeneration. *Adv Drug Deliv Rev.* 2015;94:3-12

20 - Hedenbjörk-Lager A, Hamberg K, Pääkkönen V, Tjäderhane L, Ericson D. Collagen degradation and preservation of MMP-8 activity in human dentine matrix after demineralization. *Arch Oral Biol.* 2016;68:66-72.

21 - Jambhekar S, Kern F, Bidra AS. Clinical and histologic outcomes of socket grafting after flapless tooth extraction: a systematic review of randomized controlled clinical trials. *J Prosthet Dent.* 2015;113:371-82.

22 - Ji B, Sheng L, Chen G, Guo S, Xie L, Yang B, Guo W, Tian W. The combination use of platelet-rich fibrin and treated dentin matrix for tooth root regeneration by cell homing. *Tissue Eng Part A.* 2015;21:26-34.

23 - Jiao L, Xie L, Yang B, Yu M, Jiang Z, Feng L, Guo W, Tian W. Cryopreserved dentin matrix as a scaffold material for dentin-pulp tissue regeneration. *Biomaterials.* 2014;35:4929-39.

24 - Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica – texto e atlas.* 12nd ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2013.

25 - Kim YK, Lee J, Um IW, Kim KW, Murata M, Akazawa T, Mitsugi M. Tooth-derived bone graft material. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg.* 2013;39:103-11.

26 - Kim YK, Lee JH, Um IW, Cho WJ. Guided Bone Regeneration Using Demineralized Dentin Matrix: Long-Term Follow-Up. *J Oral Maxillofac Surg.* 2016;74:515.e1-9.

27 - Koga T, Minamizato T, Kawai Y, Miura K, I T, Nakatani Y, Sumita Y, Asahina I. Bone Regeneration Using Dentin Matrix Depends on the Degree of Demineralization and Particle Size. *PLoS One.* 2016;11:e0147235.

28 - Kuboki Y, Hashimoto F, Ishibashi K. Time-dependent changes of collagen crosslinks in the socket after tooth extraction in rabbits. *J Dent Res.* 1988;67(6):944-8.

29 - Kuratate M, Yoshiba K, Shigetani Y, Yoshiba N, Ohshima H, Okiji T. Immunohistochemical analysis of nestin, osteopontin, and proliferating cells in the reparative process of exposed dental pulp capped with mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 2008;34:970-4.

30 - Lee JS, Yang JH, Hong JY, Jung UW, Yang HC, Lee IS, Choi SH. Early bone healing onto implant surface treated by fibronectin/oxysterol for cell adhesion/osteogenic differentiation: in vivo experimental study in dogs. *J Periodontal Implant Sci.* 2014;44:242-50.

31 - Li J, Yang J, Zhong X, He F, Wu X, Shen G. Demineralized dentin matrix composite collagen material for bone tissue regeneration. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2013;24:1519-28.

32 - Li R, Guo W, Yang B, Guo L, Sheng L, Chen G, Li Y, Zou Q, Xie D, An X, Chen Y, Tian W. Human treated dentin matrix as a natural scaffold for complete human dentin tissue regeneration. *Biomaterials.* 2011;32:4525-38.

33 - Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA. The role of growth factors in the repair of bone. *Biology and clinical applications.* *J Bone Joint Surg Am.* 2002;84-A:1032-44. Review.

34 - Lin Z, Rios HF, Volk SL, Sugai JV, Jin Q, Giannobile WV. Gene expression dynamics during bone healing and osseointegration. *J Periodontol.* 2011;82:1007-17.

35 - Marquez L, de Abreu FA, Ferreira CL, Alves GD, Miziara MN, Alves JB. Enhanced bone healing of rat tooth sockets after administration of epidermal growth factor (EGF) carried by liposome. *Injury.* 2013;44:558-64.

36 - Martinez EF, Araújo VC, Sousa SO, Arana-Chavez VE. TGF-beta1 enhances the expression of alpha-smooth muscle actin in cultured human pulpal fibroblasts: immunochemical and ultrastructural analyses. *J Endod.* 2007;33:1313-8.

37 - Mendes RM, Silva GA, Lima MF, Calliari MV, Almeida AP, Alves JB, Ferreira AJ. Sodium hyaluronate accelerates the healing process in tooth sockets of rats. *Arch Oral Biol.* 2008;53:1155-62.

- 38 - Narine K, De Wever O, Van Valckenborgh D, Francois K, Bracke M, DeSmet S, Mareel M, Van Nooten G. Growth factor modulation of fibroblast proliferation, differentiation, and invasion: implications for tissue valve engineering. *Tissue Eng.* 2006;12:2707-16.
- 39 - Pinero GJ, Farach-Carson MC, Devoll RE, Aubin JE, Brunn JC, Butler WT. Bone matrix proteins in osteogenesis and remodelling in the neonatal rat mandible as studied by immunolocalization of osteopontin, bone sialoprotein, alpha 2HS-glycoprotein and alkaline phosphatase. *Arch Oral Biol.* 1995;40:145-55.
- 40 - Poniatowski ŁA, Wojdasiewicz P, Gasik R, Szukiewicz D. Transforming growth factor Beta family: insight into the role of growth factors in regulation of fracture healing biology and potential clinical applications. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:137823. doi: 10.1155/2015/137823.
- 41 - Reis-Filho CR, Silva ER, Martins AB, Pessoa FF, Gomes PV, de Araújo MS, Miziara MN, Alves JB. Demineralized human dentine matrix stimulates the expression of VEGF and accelerates the bone repair in tooth sockets of rats. *Arch Oral Biol.* 2012;57:469-76.
- 42 - Sarahrudi K, Thomas A, Mousavi M, Kaiser G, Köttstorfer J, Kecht M, Hajdu S, Aharinejad S. Elevated transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1) levels in human fracture healing. *Injury.* 2011;42:833-7
- 43 - Schroeder JE, Mosheiff R. Tissue engineering approaches for bone repair: concepts and evidence. *Injury.* 2011 Jun;42(6):609-13.
- 44 - Silva TA, Rosa AL, Lara VS. Dentin matrix proteins and soluble factors: intrinsic regulatory signals for healing and resorption of dental and periodontal tissues? *Oral Dis.* 2004;10: 63-74.
- 45 - Subraman V, Thiyagarajan M, Malathi N, Rajan ST. OPN -Revisited. *J Clin Diagn Res.* 2015;9:ZE10-3.
- 46 - Suenaga H, Furukawa KS, Suzuki Y, Takato T, Ushida T. Bone regeneration in calvarial defects in a rat model by implantation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cell spheroids. *J Mater Sci Mater Med.* 2015;26:254.

- 47 - Trombelli L, Farina R, Marzola A, Bozzi L, Liljenberg B, Lindhe J. Modeling and remodeling of human extraction sockets. *J Clin Periodontol* 2008;35: 630-9.
- 48 - Um IW, Hwang SH, Kim YK, Kim MY, Jun SH, Ryu JJ, Jang HS. Demineralized dentin matrix combined with recombinant human bone morphogenetic protein-2 in rabbit calvarial defects. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg*. 2016;42:90-8.
- 49 - Vaughan MB, Howard EW, Tomasek JJ. Transforming growth factor-beta1 promotes the morphological and functional differentiation of the myofibroblast. *Exp Cell Res*. 2000;257:180-9.
- 50 - Viale-Bouroncle S, Gosau M, Morsczeck C. Collagen I induces the expression of alkaline phosphatase and osteopontin via independent activations of FAK and ERK signalling pathways. *Arch Oral Biol*. 2014;59:1249-55.
- 51 - Won JE, Yun YR, Jang JH, Yang SH, Kim JH, Chrzanowski W, Wall IB, Knowles JC, Kim HW. Multifunctional and stable bone mimic proteinaceous matrix for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2015 Jul;56:46-57.
- 52 - Yamamoto N, Furuya K, Hanada K. Progressive development of the osteoblast phenotype during differentiation of osteoprogenitor cells derived from fetal rat calvaria: model for in vitro bone formation. *Biol Pharm Bull*. 2002;25:509-15.
- 53 - Zhao C, Hosoya A, Kurita H, Hu T, Hiraga T, Ninomiya T, Yoshida K, Yoshida N, Takahashi M, Kurashina K, Ozawa H, Nakamura H. Immunohistochemical study of hard tissue formation in the rat pulp cavity after tooth replantation. *Arch Oral Biol*. 2007;52:945-53.

9 - PRODUÇÃO INTELECTUAL DESENVOLVIDA DURANTE O CURSO

Artigo Publicado

REV BRAS HEMATOL HEMOTER. 2016;38(2):106-112



Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia
Brazilian Journal of Hematology and Hemotherapy

www.rbhh.org



Original article

Oral health-related quality of life of children and teens with sickle cell disease



Maria Luiza da Matta Felisberto Fernandes^{a,*}, Ichiro Kawachi^b,
Alexandre Moreira Fernandes^a, Patrícia Corrêa-Faria^a, Saul Martins Paiva^a,
Isabela Almeida Pordeus^a

^a Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brazil

^b Harvard School of Public Health, Boston, United States


Artigos Submetidos

QUALIS B2

Indian Journal of Dental Research

Article Cycle		Logout		
Article details...				
Title	OSTEOPONTIN EXPRESSION AFTER USE OF DEMINERALIZED HUMAN DENTIN MATRIX IN RATS ALVEOLI : IMMUNOHISTOCHEMISTRY ANALYSIS			
Type	Original Article - Evaluative study			
Submission Date	08-May-16 11:26			
Abstract	Click here to view Abstract			
Subjects				
Author profiles	[View author profiles]			
SR	Article Title	Manuscript Id	Current Status	Remarks / file
Em revisão				
1	OSTEOPONTIN EXPRESSION AFTER USE OF DEMINERALIZED HUMAN DENTIN MATRIX IN RATS ALVEOLI : IMMUNOHISTOC...	IJDR_334_16	Peer Review	-


Journal of Prosthodontic Research received its first Impact factor: 1.547!




Em revisão

Research

[register](#) | [change details](#) | [log out](#)

Contact us 

Help ? 



ELSEVIER

Username: endoamf@gmail.com

Switch To: Author ↓

Maintenance outage on 12 June 2016 ... [more](#)

'My EES Hub' available for consolidated users ... [more](#)

Go to: [My EES Hub](#)

Version: EES 2016.4

Alexandre Moreira Fernandes

total submissions) Display 10 results per page.

Title ▲▼	Initial Date Submitted ▲▼	Status Date ▲▼	Current Status ▲▼
Demineralized dentin matrix in alveolar osteogenesis : Review.	Jun 11, 2016	Jun 11, 2016	Submitted to Journal

total submissions) Display 10 results per page.

Aguardando autorização do orientador no exterior para submissão :

Matrigel and human pulp stem cells: implications on cell viability and neuronal differentiation in vitro

Ana Paula S. Turrioni^a, Alexandre Fernandes^b, Kathy Xou^c, Yan Xu^d, Leslie Morse^{d,e}, Ricardo Battaglino^{d*}

^a UNESP- Univ. Estadual Paulista, Araraquara School of Dentistry, Department of Pediatric Dentistry and Orthodontics, Araraquara, SP, Brazil

^b UFMG – Univ. Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte School of Dentistry, Department of Restorative Dentistry, Belo Horizonte, MG, Brazil

^c Rowan University School of Osteopathic Medicine, Stratford, NJ, US

^d The Forsyth Institute, Department of Mineralized Tissue Biology, Cambridge, MA, US

^e Spaulding- Harvard SCI Model System, Spaulding Rehabilitation Hospital, Boston, MA, US

* Corresponding author:

Dr. Ricardo Battaglino

Department do Mineralized Tissue Biology

The Forsyth Institute, 245 First Street, 02142

E-mail: rbattaglino@forsyth.org

