



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE
SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**



ALAN ARAUJO DE JESUS

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL OSTEOGÊNICO DE
CÉLULAS-TRONCO DA POLPA DENTÁRIA EM
ASSOCIAÇÃO COM BIOMATERIAIS. ESTUDO *IN VITRO* E
*IN VIVO***

Feira de Santana, BA
2010

ALAN ARAUJO DE JESUS

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL OSTEOGÊNICO DE
CÉLULAS-TRONCO DA POLPA DENTÁRIA EM
ASSOCIAÇÃO COM BIOMATERIAIS. ESTUDO *IN VITRO* E
*IN VIVO***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Ribeiro dos Santos
Co-orientadora: Dr^a Milena Botelho Pereira Soares

Feira de Santana, BA
2010

Para Luana e Artur, com muito amor.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores Dr. Ricardo Ribeiro dos Santos e Dr^a Milena Botelho Pereira Soares, pela oportunidade, pelos ensinamentos e pelo exemplo de dedicação ao trabalho e à pesquisa.

Aos colegas do LETI, em especial a Dr^a Simone Macambira, Adriano Araujo, Flávia Lima, Dr. Ricardo Lima, José Fernando Costa, Juliana Senra, Dr^a Elisalva Guimarães, Euler Penha, Cássio Meira e Matheus Sá, pelo apoio e contribuição para a realização deste trabalho.

Ao curso de Pós-graduação em Biotecnologia da UEFS, em especial, ao Dr. Aristóteles Góes Neto, Coordenador do curso, e a Héilton Ricardo, Secretário do curso, pelo apoio e organização do programa de Pós-graduação e à Gisele Santos, pelo preparo das amostras para microscopia eletrônica.

À Sr^a Lucyvera Imbroinise, pelo apoio e pelo bom andamento da parte administrativa do LETI.

À Dr^a Zaquer Costa e Dr^a Fabienne Petitinga, pelas sugestões e pela participação como membro da banca de qualificação.

Ao Dr. Luiz Freitas, pelos ensinamentos e pela ajuda com as análises das lâminas histológicas.

À Dr^a Viviane Sarmiento, pelos ensinamentos e pela ajuda com as análises dos exames radiográficos.

Ao Dr. Marcelo Velame, pela disponibilidade e ajuda com a realização dos exames radiográficos.

Ao Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, pelo apoio e estrutura que tornou este trabalho possível.

À Unidade de Microscopia Eletrônica do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, em especial a Cláudio Figueira, pela ajuda com as análises das amostras.

Ao Serviço de Histotecnologia do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, pela produção das lâminas histológicas.

Ao Biotério do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, por disponibilizar adequadas condições de trabalho.

Ao MCT, ao CNPq, à CAPES, à FINEP e à FAPESB, pelo apoio financeiro.

Saber não é suficiente; temos que aplicar. Ter vontade não é suficiente; temos que implementá-la.

Goethe

RESUMO

O tecido ósseo tem boa capacidade de regeneração, porém existem defeitos onde é necessária a enxertia óssea. O enxerto autógeno é o padrão ouro, mas causa uma segunda ferida cirúrgica e maior complexidade e morbidade. Neste trabalho investigamos o potencial osteogênico de células-tronco da polpa de dentes decíduos (CTD) associadas a biomateriais. Foi avaliada *in vitro* a influência dos biomateriais Bonoceramic (BC), Bonfill e Composto ósseo de rícino (COR) sobre culturas de CTD, em relação à proliferação celular e à diferenciação osteogênica, corando-se com alizarina vermelha, além da análise morfológica por microscopia ótica e eletrônica de varredura (MEV) e análise de elementos químicos, por espectroscopia de dispersão de elétrons (EDS). As CTD foram facilmente obtidas e apresentaram boa capacidade proliferativa. O BC estimulou a proliferação celular e nenhum dos biomateriais inibiu a diferenciação osteogênica. No estudo *in vivo*, ratos foram divididos em três grupos e submetidos à indução de defeito na calvária. O grupo controle foi preenchido com coágulo e os demais receberam o COR, ou o COR+CTD. Após 15, 30 e 60 dias foram feitas análises por radiografias digitais, microscopia ótica, MEV e EDS. Não ocorreu regeneração espontânea do defeito. O grupo COR+CTD exibiu maior radiopacidade aos 15 dias. O biomaterial não apresentou reabsorção, foi biocompatível, com indícios de osseointegração, e funcionou como preenchimento mecânico. Somente foram identificadas áreas ossificadas esparsas, que no grupo COR+CTD foram maiores e mais maturadas. Apesar de não ter sido comprovada uma ação osteoindutora ou osteogênica do COR+CTD, a associação da terapia celular a biomateriais é promissora e deve ser melhor investigada.

Palavras-chave: Biomateriais. Células-tronco. Dentes decíduos. Regeneração óssea. Terapia Celular.

ABSTRACT

Although the bone tissue has a good regenerative capacity, there are defects which need bone grafting in order to properly recover the damaged tissue. Autogenous bone graft, the “gold standard” procedure, requires a second operation, with increased complexity and morbidity. In this study we investigated the osteogenic potential of stem cells obtained from the pulp of deciduous teeth (DSC) associated with biomaterials. We evaluated the effects of three biomaterials [Bone Ceramic (BC), Bonafill and a polyurethane derived from *Ricinus communis* (RC)] on *in vitro* cultures of DSC on cell proliferation, osteogenic differentiation (after staining with alizarin red), and cell morphology (by optical microscopy) and the three biomaterials were analyzed by scanning electron microscopy (SEM), and chemical composition [by electron dispersive spectroscopy (EDS)]. The DSC were easily obtained and showed good proliferative capacity. The BC stimulated cell proliferation and none of the biomaterials inhibited osteogenic differentiation. In the *in vivo* study, rats were divided into three groups and bone defects were prepared in the calvaria. The control group was filled with clot and the others were filled with the RC or the RC+DSC. After 15, 30 and 60 days they were sacrificed and the defect area was analyzed by digital radiography, optical microscopy, SEM, and EDS. There was no spontaneous regeneration of the defect. The group RC+DSC showed highest radiopacity at 15 days. The biomaterial worked as a mechanic filling and showed biocompatibility, evidence of osseointegration and no particles re-absorption. Only sparse ossified areas were identified which in the group RC+DSC were larger and more mature. Although the osteoinductive or osteogenic potential of RC+DSC was not clearly demonstrated, the association of cell therapy with biomaterials is promising and should be further investigated.

Keywords: Biomaterials. Bone regeneration. Cell therapy. Deciduous teeth. Stem cells.

LISTA DE ABREVIATURAS

BC	BONECERAMIC
BF	BONEFILL
COR	COMPOSTO ÓSSEO DE RÍCINUS
COR+CTD	COMPOSTO ÓSSEO DE RÍCINUS ASSOCIADO À CTD
CT	CÉLULAS-TRONCO
CTD	CÉLULAS-TRONCO DA POLPA DE DENTES DECÍDUOS
CV	COEFICIENTE DE VARIAÇÃO
DMSO	DIMETILSULFÓXIDO
EDS	ANÁLISE DE ELEMENTOS QUÍMICOS POR ESPECTROSCOPIA DE DISPERSÃO DE ELÉTRONS
GC	GRUPO CONTROLE
H&E	HEMATOXILINA E EOSINA
MC	MODELO EXPERIMENTAL EM CALOTA CRANIANA
MEV	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREUDRA
MF	MODELO EXPERIMENTAL EM FÊMUR
MTT	(BROMETO DE 3-[4,5-DIMETIL-TIAZOL-2-IL]-2,5-DIFENIL-TETRAZÓLIO)
NC	NÍVEIS DE CINZA
OI	OSSO ÍNTEGRO
ON	OSSO NEOFORMADO
PB	PARTÍCULA DO BIOMATERIAL
RPM	ROTAÇÕES POR MINUTO
SBF	SORO BOVINO FETAL
TC	TECIDO CONJUNTIVO

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Potencial de diferenciação de células-tronco embrionárias em todos os tipos celulares.	21
Figura 2	Potencial de diferenciação de células-tronco adultas da medula óssea.	24
Figura 3	Coleta, cultura e indução à diferenciação <i>in vitro</i> de CTD.	26
Figura 4	Célula unitária da hidroxiapatita.	33
Figura 5	Opções de utilização da engenharia tecidual para a regeneração óssea associando-se CT a biomateriais.	40
Figura 6	Exames solicitados para o planejamento do procedimento.	41
Figura 7	Biomateriais testados.	45
Figura 8	Regiões mais utilizadas em experimentos de regeneração óssea em ratos.	51
Figura 9	Seqüência cirúrgica de realização e preenchimento dos defeitos.	53
Figura 10	Análises imaginológicas.	55
Figura 11	Avaliação da radiopacidade tecidual de uma das amostras.	57
Figura 12	Acompanhamento da cultura primária de células-tronco proveniente de dentes decíduos por microscopia ótica.	61
Figura 13	Análise da proliferação celular pelo ensaio de MTT com as culturas sob a influência dos extratos dos biomateriais COR, Bonfill e Bonceramic.	63
Figura 14	Acompanhamento da proliferação celular, com as culturas sob a influência dos extratos dos biomateriais COR, Bonfill e Bonceramic por microscopia ótica.	64
Figura 15	Análise da proliferação celular pelo ensaio de MTT com as culturas sob a influência dos extratos dos biomateriais COR, Bonfill e Bonceramic.	65

Figura 16	Análise da diferenciação osteogênica em culturas de CTD.	66
Figura 17	Indução da diferenciação das CTD cultivadas com meio osteogênico e extratos dos biomateriais.	67
Figura 18	Análise ultra-estrutural dos biomateriais COR, Bonefill e Boneceramic por meio de microscopia eletrônica de varredura.	69
Figura 19	Análise ultra-estrutural de fragmentos ósseos humano e de rato por meio de microscopia eletrônica de varredura.	70
Figura 20	Análise dos elementos químicos presentes no biomaterial composto ósseo de rícinus por meio de análise por EDS.	71
Figura 21	Análise dos elementos químicos presentes no biomaterial Bonefill por meio de análise por EDS.	72
Figura 22	Análise dos elementos químicos presentes no biomaterial Boneceramic por meio de análise por EDS.	73
Figura 23	Análise por EDS dos biomateriais testados. Identificação e distribuição espacial dos elementos químicos presentes nos três biomateriais.	74
Figura 24	Defeitos ósseos obtidos pelos dois modelos testados.	75
Figura 25	Falhas ósseas de animais sacrificados 15 dias pós-cirurgia.	77
Figura 26	Falhas ósseas de animais sacrificados 30 dias pós-cirurgia.	78
Figura 27	Falhas ósseas de animais sacrificados 60 dias pós-cirurgia.	79
Figura 28	Análise radiográfica para quantificação da radiopacidade tecidual 15 dias pós-cirurgia.	80
Figura 29	Análise da radiopacidade em animais sacrificados 15 dias pós-cirurgia por meio da quantificação dos níveis de cinza.	81
Figura 30	Análise da radiopacidade em animais sacrificados 15	82

	dias pós-cirurgia por meio do coeficiente de variação.	
Figura 31	Análise da radiopacidade em animais sacrificados 30 dias pós-cirurgia por meio da quantificação dos níveis de cinza.	83
Figura 32	Análise da radiopacidade em animais sacrificados 30 dias pós-cirurgia por meio do coeficiente de variação.	84
Figura 33	Análise da radiopacidade em animais sacrificados 60 dias pós-cirurgia por meio da quantificação dos níveis de cinza.	85
Figura 34	Análise da radiopacidade em animais sacrificados 60 dias pós-cirurgia por meio do coeficiente de variação.	86
Figura 35	Análise histológica do grupo controle por meio de microscopia ótica.	88
Figura 36	Análise histológica do grupo COR por meio de microscopia ótica.	90
Figura 37	Análise histológica do grupo COR+CTD por meio de microscopia ótica.	92
Figura 38	Análise ultra-estrutural do grupo controle, 60 dias pós-cirurgia, por meio de microscopia eletrônica de varredura.	94
Figura 39	Análise ultra-estrutural do grupo COR, 60 dias pós-cirurgia, por meio de microscopia eletrônica de varredura.	96
Figura 40	Análise ultra-estrutural do grupo COR, 60 dias pós-cirurgia, por meio de microscopia eletrônica de varredura.	97
Figura 41	Análise ultra-estrutural do grupo COR+CTD 60 dias pós-cirurgia por meio de microscopia eletrônica de varredura.	98
Figura 42	Análise ultra-estrutural por meio de microscopia eletrônica de varredura. Peça óssea íntegra, da mesma região anatômica estudada, sem realização de defeito.	99

- Figura 43** Quantificação de elementos químicos presentes em uma das amostras do grupo COR+CTD por meio de análise por EDS. 100
- Figura 44** Verificação da presença e determinação da localização dos elementos químicos em uma das amostras do grupo COR+CTD por meio da análise por EDS. 101
- Figura 45** Comparação da maturação óssea entre duas áreas selecionadas em uma das amostras do grupo COR+CTD por meio da análise por EDS. 102
- Figura 46** Análise por EDS da quantificação de cálcio nos defeitos ósseos dos animais sacrificados 60 dias pós-cirurgia. 103
- Figura 47** Análise por EDS da quantificação de fosfato nos defeitos ósseos dos animais sacrificados 60 dias pós-cirurgia. 104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Descrição da legislação sobre a utilização de células-tronco embrionárias em diversos países.	22
Tabela 2	Ocorrências de fosfatos de cálcio em sistemas biológicos e suas relações Ca/P.	32
Tabela 3	Delineamento experimental do estudo <i>in vitro</i>.	46
Tabela 4	Delineamento experimental do estudo <i>in vivo</i>.	54
Tabela 5	Quantificação dos elementos químicos presentes no biomaterial composto ósseo de rícinus por meio de análise por EDS.	71
Tabela 6	Quantificação dos elementos químicos presentes no biomaterial Bonefill por meio de análise por EDS.	72
Tabela 7	Quantificação dos elementos químicos presentes no biomaterial Boneceramic por meio de análise por EDS.	73
Tabela 8	Avaliação qualitativa dos modelos cirúrgicos experimentais.	76
Tabela 9	Quantificação de elementos químicos presentes em uma das amostras do grupo COR+CTD por meio de análise por EDS.	101

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	19
3	REVISÃO DA LITERATURA	20
3.1	MEDICINA REGENERATIVA	20
3.2	CÉLULAS-TRONCO	20
3.3	CÉLULAS-TRONCO DA POLPA DE DENTES DECÍDUOS	25
3.4	TECIDO ÓSSEO	27
3.5	ENXERTOS ÓSSEOS	28
3.6	BIOMATERIAIS E REGENERAÇÃO ÓSSEA	31
3.7	ASSOCIAÇÃO DE BIOMATERIAIS A CT PARA A REGENERAÇÃO ÓSSEA	37
4	MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1	OBTENÇÃO E CULTURA DE CÉLULAS-TRONCO DA POLPA DE DENTES DECÍDUOS (CTD)	41
4.2	AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA INFLUÊNCIA DOS BIOMATERIAIS NAS CTD	43
4.2.1	Biomateriais testados	43
4.2.2	Delineamento experimental do experimento <i>in vitro</i>	45
4.2.3	Análises realizadas	47
4.2.3.1	Avaliação da proliferação celular	47
4.2.3.2	Avaliação da capacidade de diferenciação osteogênica das CTD	48
4.2.3.3	Avaliação da morfologia celular	49
4.2.3.4	Avaliação dos biomateriais por microscopia eletrônica de varredura (MEV)	49
4.2.3.5	Análise de elementos químicos por EDS	50
4.3	AVALIAÇÃO <i>IN VIVO</i> DA ASSOCIAÇÃO BIOMATERIAL-CTD	50
4.3.1	Padronização do modelo experimental	51
4.3.2	Delineamento experimental do experimento <i>in vivo</i>	53
4.3.3	Eutanásia dos animais e obtenção das amostras	54
4.3.4	Análises realizadas	55
4.3.4.1	Análise macroscópica	55
4.3.4.2	Avaliação da radiopacidade tecidual por meio de radiografias digitais	55
4.3.4.3	Análise histológica por microscopia ótica	57
4.3.4.4	Análise ultra-estrutural por MEV	57
4.3.4.5	Análise de elementos químicos por EDS	58
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	58
5	RESULTADOS	60
5.1	OBTENÇÃO E CULTURA DE CTD	60
5.2	AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA INFLUÊNCIA DOS BIOMATERIAIS NAS CTD	61
5.2.1	Avaliação da proliferação celular	61

5.2.2	Avaliação da capacidade de diferenciação osteogênica das CTD	65
5.2.3	Análise ultra-estrutural dos biomateriais por microscopia eletrônica de varredura	68
5.2.4	Análise de elementos químicos dos biomateriais por espectroscopia de dispersão de elétrons	70
5.3	AVALIAÇÃO <i>IN VIVO</i> DA ASSOCIAÇÃO BIOMATERIAL-CTD	75
5.3.1	Padronização do modelo experimental	75
5.3.2	Análise macroscópica da regeneração óssea	76
5.3.3	Avaliação da radiopacidade tecidual por meio de radiografias digitais	79
5.3.4	Análise histológica por microscopia ótica	86
5.3.5	Análise ultra-estrutural por MEV	93
5.3.6	Análise de elementos químicos por EDS	100
6	DISCUSSÃO	105
6.1	OBTENÇÃO E CULTURA DE CTD	105
6.2	AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA INFLUÊNCIA DOS BIOMATERIAIS NAS CTD	107
6.2.1	Avaliação da proliferação celular	107
6.2.2	Avaliação da capacidade de diferenciação osteogênica das CTD	108
6.2.3	Análise ultra-estrutural dos biomateriais por MEV	109
6.2.4	Análise de elementos químicos dos biomateriais por EDS	110
6.3	AVALIAÇÃO <i>IN VIVO</i> DA ASSOCIAÇÃO BIOMATERIAL-CTD	111
6.3.1	Padronização do modelo experimental	112
6.3.2	Análise macroscópica da regeneração óssea	113
6.3.3	Avaliação da radiopacidade tecidual por meio de radiografias digitais	114
6.3.4	Análise histológica por microscopia ótica e ultra-estrutural por MEV	116
6.3.5	Análise de elementos químicos por EDS	120
6.4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	121
7	CONCLUSÕES	123
	REFERÊNCIAS	124
	ANEXOS	143
	ARTIGO 1: COLLECTION AND CULTURE OF STEM CELLS DERIVED FROM DENTAL PULP OF DECIDUOUS TEETH: TECHNIQUE AND CLINICAL CASE REPORT	143
	ARTIGO 2: ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF STEM CELLS OBTAINED FROM MOUSE DENTAL PULP.	151

1. INTRODUÇÃO

As células-tronco (CT) são células precursoras indiferenciadas que possuem a capacidade de se diferenciar em diversos tipos celulares especializados e de estimular a regeneração tecidual. A comunidade científica tem produzido um grande número de trabalhos que demonstram a importância e as perspectivas da terapia com CT em áreas diversas, tais como doenças neurológicas [ex. Parkinson (RICE *et al.*, 2003), mal de Alzheimer (MALER *et al.*, 2006), afecções medulares (CUMINGS *et al.*, 2006; CHRISTOU *et al.*, 2007)], diabetes tipo 1 (LECHNER, 2004; MISZTA-LANE *et al.*, 2006), doenças hepáticas (LYRA *et al.*, 2007), lesões renais (RICARDO e DEANE, 2005) e degenerações da retina (YOUNG, 2005). É importante ressaltar que muitas destas doenças tem caráter crônico, com prognóstico ruim, e os tratamentos disponíveis atualmente focam, na maioria das vezes, no controle dos sintomas. A terapia com CT abre a perspectiva de se estabelecer um tratamento que atue na regeneração dos tecidos lesados e no reestabelecimento das suas funções.

As CT podem ser de origem embrionária ou adulta (MISZTA-LANE *et al.*, 2006; CHRISTOU *et al.*, 2007). As CT embrionárias são as únicas que possuem a capacidade de se diferenciar em todos os tipos celulares, mas as CT adultas, quando obtidas do próprio paciente, apresentam as vantagens de não desencadear rejeição imunológica, responder aos fatores de crescimento inerentes ao hospedeiro, além de não incorrer em limitações éticas e morais (PRENTICE e TARNE, 2007). As CT adultas estão presentes em diversos tecidos, tais como, medula óssea, fígado, tecido adiposo e cordão umbilical, dentre outros (THOMSON *et al.*, 1998; YANG *et al.*, 2002; ROMANOV *et al.*, 2003; ZHU *et al.*, 2008).

A identificação de novas fontes de CT, com a sua apropriada caracterização, e a realização de experimentos *in vitro* e *in vivo* que avaliem a sua potencial aplicação na regeneração de tecidos, são importantes etapas para o sucesso da terapia celular, pois é possível que exista uma fonte mais eficaz ou adequada de CT para utilização em uma determinada terapia.

Recentemente foi descoberta uma nova fonte de CT proveniente da polpa de dentes decíduos. O acesso a estas CT é relativamente fácil, uma vez que são obtidas de órgãos não vitais que normalmente são descartados naturalmente na fase de esfoliação para o irrompimento dos dentes permanentes (MIURA *et al.*,

2003; ZHANG *et al.*, 2008; HUANG *et al.*, 2009). Estudos realizados com estas células ressaltam uma grande capacidade de proliferação e um potencial promissor de indução da regeneração tecidual (HUANG *et al.*, 2009; KOYAMA *et al.*, 2009; NAKAMURA *et al.*, 2009; YAMADA *et al.*, 2010).

O tecido ósseo é bastante dinâmico e tem uma boa capacidade de regeneração, mas quando ocorre perda grande de tecido por trauma ou lesões é necessário que se faça a reposição por meio de enxertos. O enxerto autógeno é o padrão ouro de escolha, devido à compatibilidade imunológica e potencial osteogênico, porém necessita de uma área doadora, que causa uma segunda ferida cirúrgica e, conseqüentemente, uma maior complexidade e tempo do procedimento cirúrgico, maior risco de infecções, pior pós-operatório para o paciente, além de onerar o procedimento. Existem ainda limitações em se conseguir áreas doadoras acessíveis, que possuam tecido ósseo em quantidade e qualidade (OLIVIER *et al.*, 2004; JANG *et al.*, 2010).

No caso, por exemplo, da instalação de implantes dentários em regiões de perda óssea significativa, é necessária a realização de enxerto ósseo prévio aos implantes. A área doadora com melhor acesso e quantidade de tecido disponível para a retirada de grandes volumes é a crista ilíaca (KLIJN, *et al.*, 2010). Portanto, além da cirurgia oral para realização do enxerto e dos implantes dentários, há a necessidade de internação hospitalar, anestesia geral e intervenção cirúrgica por um ortopedista. Este procedimento seria simplificado se existisse uma alternativa segura aos enxertos ósseos autógenos de maior porte, pois poderia ser realizado somente pelo dentista, com anestesia local e em ambiente de consultório,

Uma opção aos enxertos ósseos autógenos e seus problemas inerentes é a utilização dos biomateriais. Disponíveis no mercado com diferentes composições e apresentações, os biomateriais são definidos como substâncias de origem natural ou sintética usados para substituir total ou parcialmente os tecidos e órgãos (DOHERTY *et al.*, 1992). Eles têm sido bastante úteis para a regeneração de lesões ósseas, mas ainda não possuem as qualidades necessárias para serem utilizados em todas as situações, pois na maioria das vezes apresentam somente o papel de arcabouço osteocondutor que necessita da presença, da proliferação e da diferenciação de células residentes, para que o local da lesão e o próprio biomaterial seja colonizado e ocorra a regeneração e formação do novo tecido (MARQUIS *et al.*, 2009; GHNAATI *et al.*, 2010).

A busca por um biomaterial ideal que supra todas as necessidades clínicas para a substituição do tecido ósseo é constante, mas eles ainda apresentam limitações. Atualmente os biomateriais têm sido associados a mediadores químicos e a fatores de crescimento, como as proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs) ou o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), para que se tornem osteoindutores e estimulem as células mesenquimais residentes no local da lesão a colonizar, se diferenciar e reparar o tecido (CANTER *et al.*, 2010; MOOREN *et al.*, 2010; SCHUKERT *et al.*, 2010).

Uma perspectiva promissora para evitar os inconvenientes dos enxertos autógenos é suprir a principal deficiência dos biomateriais já disponíveis, que é a ausência do componente celular, associando-os às CT do próprio paciente, previamente coletadas e cultivadas. Com isto, espera-se criar um micro-ambiente celularizado, semelhante ao osso natural, que permita a total integração e vascularização do enxerto e a conseqüente regeneração óssea.

Diante disto, o objetivo deste trabalho é avaliar o potencial osteogênico de CT originárias da polpa de dentes decíduos humanos, por meio de estudos *in vitro* e *in vivo*, realizados para estabelecer a cultura destas células, verificar a sua resposta em relação à presença de biomateriais na cultura celular e analisar o processo de regeneração óssea após implantação de enxertos das mesmas, associadas a um biomaterial, em defeitos ósseos padronizados criados em calota craniana de ratos.

2 OBJETIVOS

Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo geral investigar o potencial terapêutico de células-tronco da polpa dentária de dentes decíduos (CTD), em associação com arcabouços, no reparo do tecido ósseo.

Objetivos específicos

- Estabelecer a técnica de obtenção e cultura de CTD.
- Analisar a capacidade de proliferação e diferenciação osteogênica das CTD *in vitro*, em associação com três biomateriais utilizados para a regeneração óssea.
- Padronizar o modelo experimental de defeito ósseo em ratos.
- Avaliar o processo de regeneração óssea em defeitos ósseos, em animais enxertados com um biomaterial à base de óleo de mamona, associado ou não a CTD.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 A MEDICINA REGENERATIVA

Existem diversas alterações, tais como lesões medulares (CHRISTOU *et al.*, 2007; CUMINGS *et al.*, 2006), mal de Alzheimer (MALER *et al.*, 2006), doença de Chagas (SANTOS *et al.*, 2004), diabetes tipo 1 (LECHNER, 2004; MISZTA-LANE *et al.*, 2006), doenças hepáticas (LYRA *et al.*, 2007) e lesões renais (RICARDO e DEANE, 2005) ainda sem um tratamento eficaz estabelecido. Elas decorrem de alterações teciduais que causam perda de função com sérias alterações clínicas, além de altos custos para o sistema de saúde. A regeneração destes tecidos e melhora da sua função é o objetivo principal da medicina regenerativa.

A medicina regenerativa é a atividade que aplica os princípios da engenharia e das ciências da saúde para a obtenção de substitutos biológicos que mantenham, melhorem ou restaurem as funções de órgãos e tecidos do corpo humano. De natureza interdisciplinar, a medicina regenerativa inclui conceitos de ramos tão diversos como o da biologia celular, a robótica e a ciência dos materiais, dentre outros. (ANVISA, 2010). A terapia celular é um exemplo de medicina regenerativa e o uso de células-tronco para o reparo de órgãos e tecidos lesados expandiu as suas possibilidades (PRENTICE e TARNE, 2007).

3.2 CÉLULAS-TRONCO (CT)

Células-tronco (CT) são definidas como células indiferenciadas com grande capacidade de auto-renovação e de produção de mais de um tipo celular especializado, como osteoblastos, hepatócitos e células nervosas. As CT podem ser de origem embrionária ou adulta (ODORICO *et al.*, 2001; MISZTA-LANE, 2006; CHRISTOU *et al.*, 2007; PRENTICE e TARNE, 2007).

As CT embrionárias são isoladas da massa celular interna do embrião no estágio de blastocisto (MARTIN, 1981). As CT embrionárias humanas foram isoladas pela primeira vez por Thomson *et al.* (1998). As CT embrionárias são pluripotentes, ou seja, possuem a capacidade de diferenciação em todos os tipos celulares (fig. 1), mas apresentam uma maior instabilidade genética, são alogênicas, possuem um risco de formar teratocarcinomas, além de haverem limitações do seu

uso por questões éticas e religiosas (ODORICO, 2001; NAKASHIMA, 2005; SOLTER, 2006).

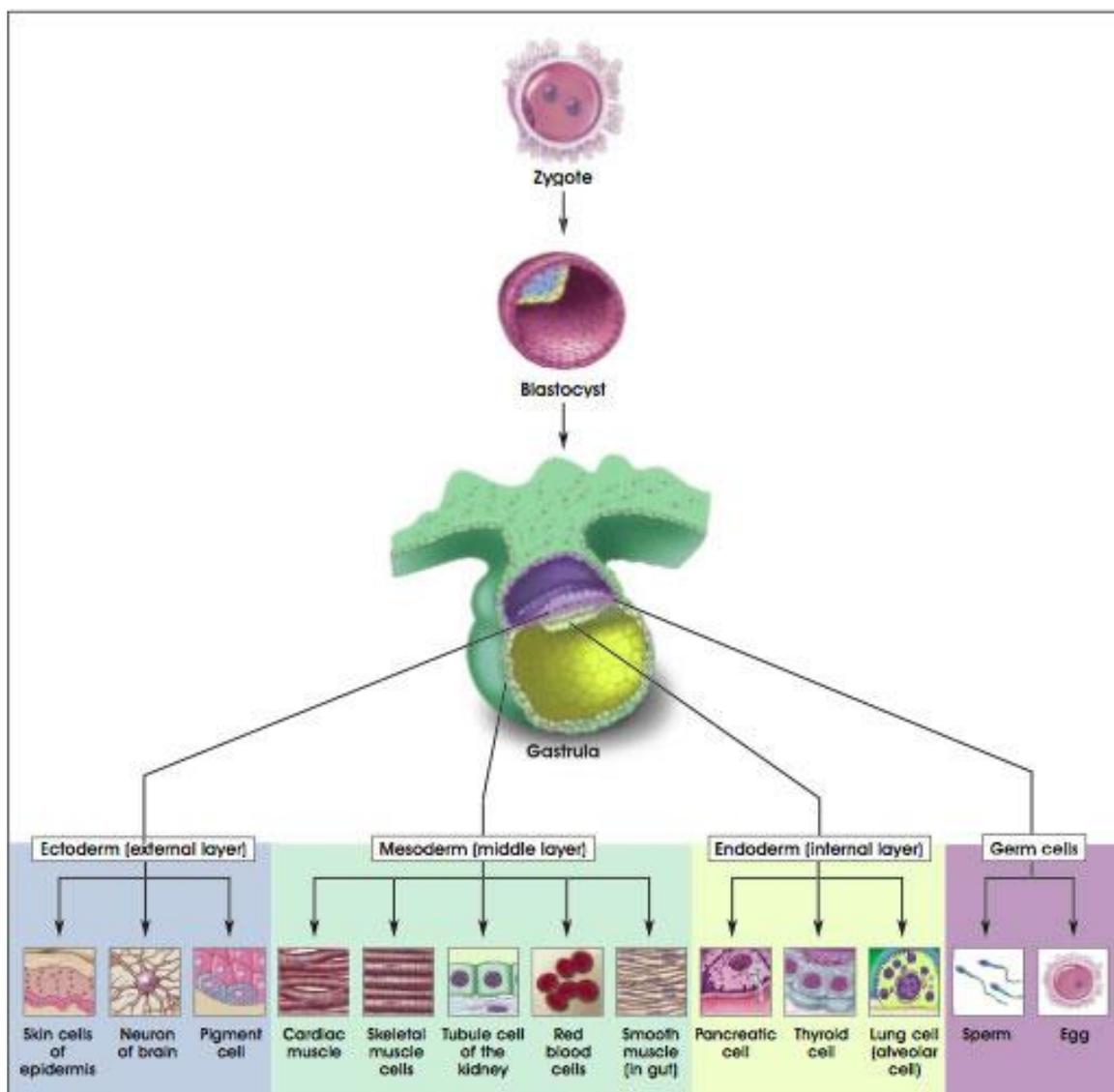


Fig. 1 – Potencial de diferenciação de células-tronco embrionárias em todos os tipos celulares.
 Fonte: Winslow, T; Duckwall, C. 2001.

A legislação sobre a utilização e a pesquisa com CT embrionárias é bastante variada. Existem países que permitem a pesquisa, mas outros criaram restrições que vão desde o não financiamento com recursos públicos até a total proibição (RISBUD e SHAPIRO, 2005) (tabela 1).

Tabela 1 – Descrição da legislação sobre a utilização de células-tronco embrionárias em diversos países. * FIV – fertilização *in vitro* ** NT – transferência nuclear. Fonte: International Society for Stem Cell Research – ISSCR- Acesso: mar. 2007.

Pais	Legislação Pendente	Pesquisa com linhagens de células-tronco existentes	Pesquisa com embriões não utilizados, oriundos de FIV*	Embriões criados exclusivamente para pesquisa via FIV*	Embriões criados via Transferência Nuclear (NT**)
Alemanha	Não	Sim	Não	Não	Não
Austrália	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
Brasil	Não	Sim	Sim	Não	Não
Canadá	Não	Sim	Sim	Não	Não
Espanha	Não	Sim	Sim	Não	Não
Estados Unidos	Sim	Sim	Não	Não	Não
França	Não	Sim	Sim	Não	Não
Holanda	Não	Sim	Sim	Não	Não
Índia	Sim	Sim	Sim	Não	Não
Israel	Não	Sim	Sim	Sim	Sim
Japão	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Noruega	Não	Não	Não	Não	Não
Reino Unido	Não	Sim	Sim	Sim	Sim
Singapura	Não	Sim	Sim	Sim	Sim
Suécia	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Suíça	Não	Sim	Sim	Não	Não

A CT adulta é uma célula indiferenciada encontrada no organismo após o nascimento. Elas podem ser obtidas do próprio paciente (sendo neste caso autogênicas e, portanto, não desencadeiam rejeição imunológica), respondem aos fatores de crescimento inerentes ao hospedeiro, além de não incorrer em limitações éticas e morais. Dentre os principais tipos de CT adultas estão as CT hematopoiéticas, que dão origem às diversas células sanguíneas, e as CT mesenquimais. As CT mesenquimais podem ser isoladas de diversos tecidos e são responsáveis pela auto-renovação e homeostase do seu tecido de origem ao longo da vida e participam do reparo de lesões, gerando precursores capazes de originar os vários tipos celulares especializados ou diretamente através da sua diferenciação nestas células especializadas (MINGUELL *et al.*, 2001; SANTOS *et al.*, 2004; PRENTICE e TARNE, 2007).

O Comitê de Célula-Tronco Tecidual e Mesenquimal da Sociedade Internacional para Terapia Celular definiu os critérios para caracterização das CT mesenquimais humanas (DOMINICI *et al.*, 2006): as CT mesenquimais devem ser aderentes ao plástico, quando mantidas em condições padrão de cultura; devem possuir capacidade de diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica; devem expressar CD73, CD90 e CD105; e não devem expressar marcadores de linhagem hematopoiéticas c-kit, CD14, CD11b, CD34, CD45, CD19, CD79 alfa, e antígeno leucocitário humano (HLA)-DR.

Ainda não estão bem estabelecidos os mecanismos através dos quais as CT mesenquimais são recrutadas para regeneração de tecidos. É fato que a presença de uma lesão causa alterações no microambiente que estimulam a sua ação (KORBLING e ESTROV, 2003).

As CT mesenquimais da medula óssea (fig. 2) ainda hoje são as células mais utilizadas como terapia celular (PRENTICE e TARNE, 2007). Contudo, são de acesso invasivo, pois o método mais comum de obtenção é por punção da crista ilíaca, e sabe-se que o número de células obtidas por procedimento é influenciado pela idade do paciente (STENDERUP *et al.*, 2003).

Atualmente já foram isoladas CT mesenquimais de diversos tecidos, tais como o cérebro (CLARKE *et al.*, 2000), o fígado (YANG *et al.*, 2002), a pele (TOMA *et al.*, 2001), o tecido adiposo (ZUK *et al.*, 2001), o músculo esquelético (JACKSON *et al.*, 1999) e a polpa de dentes decíduos (MIURA *et al.*, 2003), dentre outros.

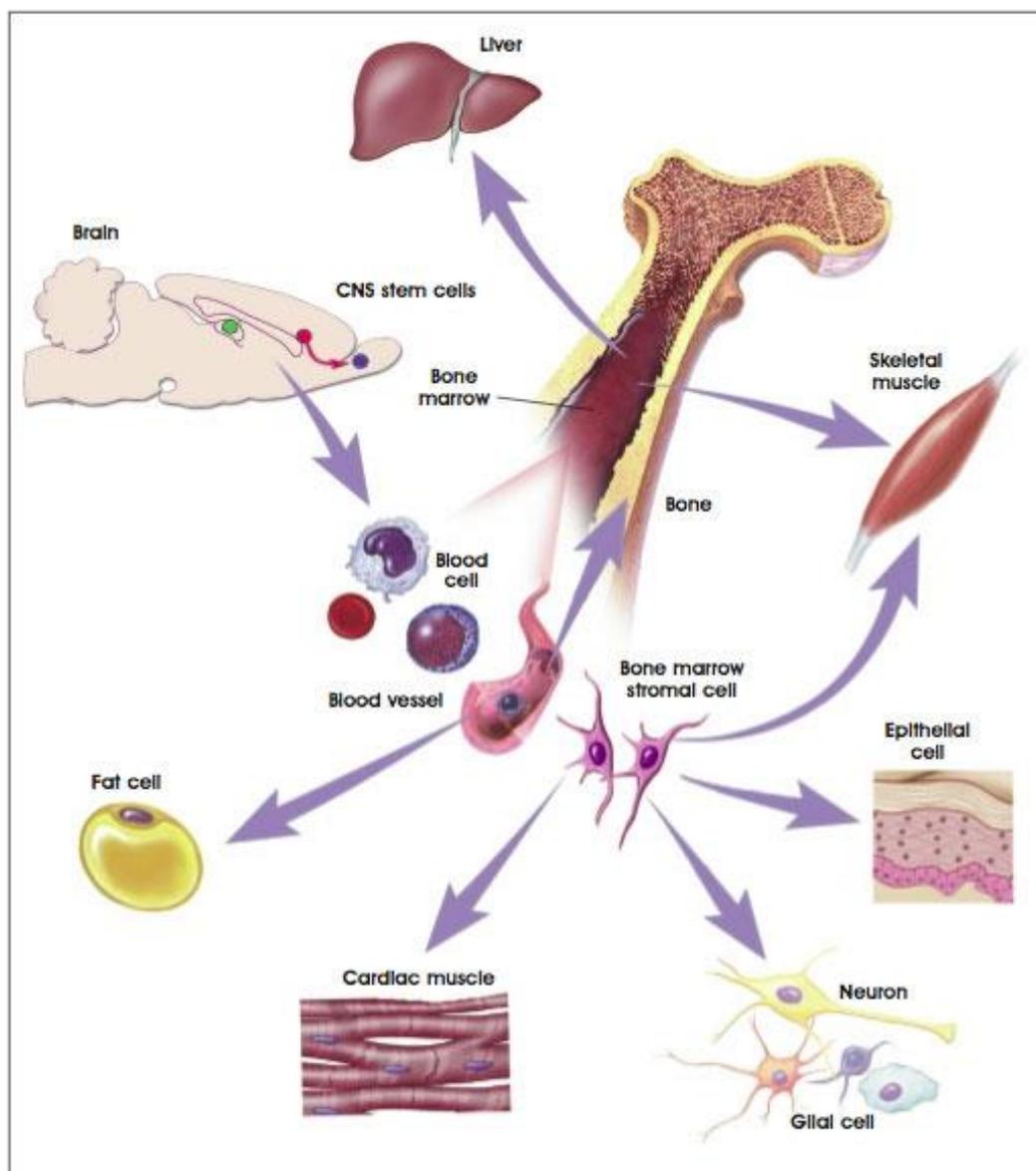


FIG. 2 - Potencial de diferenciação de células-tronco adultas da medula óssea. Fonte: NIH, 2009.

Em relação ao método de obtenção, de forma simplificada, as CT mesenquimais são liberadas de fragmentos de tecidos e selecionadas por meio da aderência à superfície plástica do recipiente de cultura. Este método foi proposto por Friedenstein *et al.* (1970), que publicaram o primeiro relato do isolamento de células com características de CT mesenquimais, e desde então vem sendo utilizado com adaptações, de acordo com a origem da célula. Podem ser encontrados na literatura diversos relatos de protocolos de obtenção de CT de diferentes tecidos (TOMA *et al.*, 2001; ZUK *et al.*, 2001; IN'TANKER *et al.*, 2004; MIKI *et al.*, 2005, dentre outros). As CT, após cultivo inicial, podem ser criopreservadas para uma possível necessidade posterior do paciente, ou para realização de experimentos, quando

poderão ser descongeladas, novamente cultivadas e utilizadas sem alterações nas suas características (MARTINELLO *et al.*, 2010; DING *et al.*, 2010).

Em decorrência das suas características, as CT mesenquimais têm sido amplamente estudadas e testadas em diferentes modelos experimentais, para avaliar o seu potencial terapêutico e os resultados indicam boas perspectivas (YANG *et al.*, 2002; SOARES *et al.*, 2004; DAÍ *et al.*, 2005; NAKASHIMA *et al.*, 2005; CUMINGS *et al.*, 2006; CHRISTOU *et al.*, 2007; MORIGI *et al.*, 2008; SEO *et al.*, 2008; SNYKERS *et al.*, 2009; OH *et al.*, 2010; SALVADÈ *et al.*, 2010). Entretanto, ainda é necessário um maior conhecimento sobre suas características intrínsecas e uma melhor compreensão do seu mecanismo de ação (CLARKE *et al.*, 2000; RISBUD e SHAPIRO, 2005).

3.3 CÉLULAS-TRONCO DA POLPA DE DENTES DECÍDUOS (CTD)

A polpa dentária é um tecido conjuntivo frouxo encontrado internamente às coroas dentárias e tem função formadora de dentina, nutritiva e sensorial. Do ponto de vista histológico evidenciam-se diversos componentes celulares, dentre os quais destacam-se: odontoblastos, fibroblastos, células mesenquimais indiferenciadas, macrófagos e outras células imunocompetentes, bem como, vasos sangüíneos e linfáticos, fibras nervosas e, permeando este conjunto, substância fundamental amorfa (NONAKA *et al.*, 2005). A polpa é derivada de componentes ectodérmicos e mesenquimais que contêm células da crista neural com capacidade plástica e multipotente (KERKIS *et al.*, 2006).

Gronthos *et al.* (2000) isolaram pela primeira vez CT mesenquimais da polpa de dentes permanentes e demonstraram que elas apresentavam imunofenótipo semelhante a CT mesenquimais de medula óssea e que possuíam capacidade de auto-renovação e diferenciação em adipócitos. As CTD foram então isoladas por Miura *et al.* (2003), que chamaram a atenção que o seu fácil acesso e o fato de não serem órgãos vitais, que normalmente são descartados após a esfoliação poderia estabelecer uma nova fonte importante de CT adulta.

Posteriormente, Inúmeros estudos têm isolado CT mesenquimais derivadas da polpa dentária e demonstrado que tais células são multipotentes e possuem a capacidade de auto-renovação e de diferenciação em diferentes tipos celulares (SHI *et al.*, 2003; NAKASHIMA, 2005; SOUZA *et al.*, 2008; NOGUEIRA *et al.*, 2009;

KOYAMA *et al.*, 2009; NAKAMURA *et al.*, 2009; YAMADA *et al.*, 2010). Comprovadamente, as CTD apresentam potencial de diferenciação em pelo menos três linhagens celulares: osteo/odontogênica, adipogênica e neurogênica (HUANG *et al.*, 2009) (fig. 3). Este potencial de diferenciação é um dos critérios para caracterizar CT mesenquimais propostos pelo Comitê de Célula Tronco Tecidual e Mesenquimal da Sociedade Internacional para Terapia Celular. Até o momento não existe um marcador específico para CT mesenquimais (DOMINICI *et al.*, 2006).

Quando comparadas com as CT mesenquimais provenientes da medula óssea e da polpa de dentes permanentes, notou-se que CTD apresentam uma maior taxa de proliferação (NAKAMURA *et al.*, 2009).

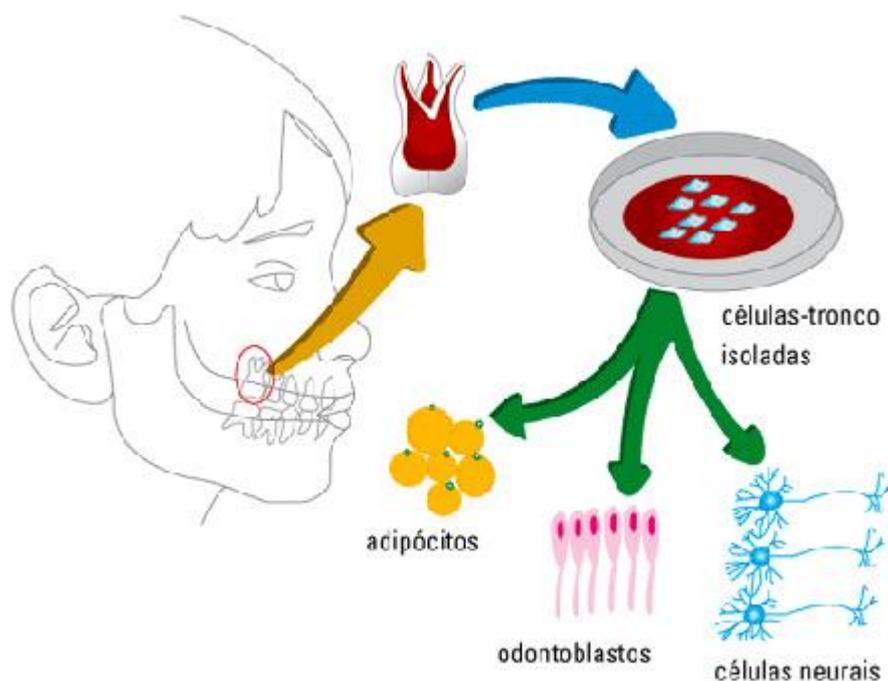


Fig. 3 – Coleta, cultura e indução à diferenciação *in vitro* de CTD. Fonte: Soares *et al.*, 2007.

Para a obtenção de uma linhagem celular osteogênica de CTD uma camada confluyente de células deve ser incubada em um meio indutor contendo uma mistura de β -glicerofosfato, ácido ascórbico e dexametasona, por um período de 2-3 semanas (ZHANG *et al.*, 2008). A diferenciação na linhagem osteogênica é confirmada pela atividade da fosfatase alcalina e mensurada pelo acúmulo de cálcio (PITTINGER *et al.*, 1999). A identificação dos depósitos de cálcio após cultivo com meio osteogênico pode ser feita pela coloração por alizarina vermelha, como pode

ser visto nos trabalhos de Samee *et al.* (2008), Huang *et al.* (2009), OH *et al.* (2010) e de Salvadè *et al.* (2010), dentre outros.

As limitações da coleta de CTD incluem a possibilidade de contaminação e a pequena quantidade de células disponibilizada para terapia (MIURA *et al.*, 2003; HUANG *et al.*, 2009). Além disto, as CTD devem ser obtidas na fase de esfoliação dos dentes decíduos, para dar lugar aos dentes permanentes, conseqüentemente possuem um período restrito de acesso, pois os dentes decíduos estão presentes em crianças de seis até 12 anos em média, como comprovado por Nolla (1960).

Para a criopreservação de CTD têm surgido métodos alternativos mais simples do que a forma tradicional de coletar o tecido, cultivar e congelar as CT. A proposta é de criopreservar o tecido pulpar (PERRY *et al.*, 2009) ou toda a unidade dentária (WOODS *et al.*, 2009). Estes métodos excluem a cultura prévia ao congelamento e os resultados de ambas as técnicas foram inicialmente positivos.

3.4 O TECIDO ÓSSEO

O tecido ósseo consiste, basicamente, de cristais de hidroxiapatita e matriz extracelular. A matriz extracelular é composta por 90% de proteínas colágenas (97% de colágeno tipo I e 3% de colágeno tipo V) e 10% de proteínas não-colágenas (20% de osteocalcina, 20% de osteonectina, 12% de sialoproteínas, 10% de proteoglicanos, osteopontina, fibronectina, fatores de crescimento, BMPs e outras), sendo todas elas proteínas sintetizadas pelos osteoblastos (ANSELME, 2000).

O tecido ósseo pode ser formado pela ossificação intramembranosa ou endocondral. Na ossificação intramembranosa os osteoblastos são diferenciados diretamente das células mesenquimais, enquanto que na ossificação endocondral as células mesenquimais diferenciam-se primeiro em condrócitos, formando um molde de cartilagem. Assim, os osteoblastos são diferenciados a partir de células mesenquimais envolvidas imediatamente após a maturação hipertrófica dos condrócitos (MURATA *et al.*, 1998). A formação óssea pela via intramembranosa está relacionada aos ossos da região craniofacial, enquanto que a ossificação endocondral acontece, na maioria das vezes, nos ossos longos (REDDI *et al.*, 1997).

Apesar da grande proporção acelular, o tecido ósseo possui três tipos celulares característicos que regem seu metabolismo: os osteócitos, os osteoblastos

e os osteoclastos. Os osteoblastos são células mononucleadas, basófilas, com grande poder de síntese. Elas são as responsáveis pela produção do colágeno, além de outras proteínas com função estrutural e sinalizadora. É, portanto, a principal célula da gênese e da regeneração óssea, depositando toda a matriz extracelular do tecido. Os osteócitos são células fusiformes que estão encarceradas na matriz extracelular. Na realidade, os osteócitos são osteoblastos que se isolaram na matriz extracelular e que diminuíram o seu poder de síntese. Entretanto, eles continuam a produzir fatores e proteínas sinalizadoras importantes no metabolismo ósseo. Os osteoclastos, por sua vez, são células volumosas, multinucleadas, ricas em mitocôndrias e ribossomos livres, provenientes de linhagem hematopoiética. São responsáveis por realizar a reabsorção óssea, liberando enzimas que quebram a matriz de colágeno e ácidos que agem na dissolução da hidroxiapatita (TEITELBAUM *et al.*, 1995).

O tecido ósseo passa constantemente por um processo dinâmico de remodelação, sendo absorvido e novamente depositado. Este processo se dá concomitante em múltiplos locais. A proporção entre absorção e formação óssea varia ao longo da vida. Na fase de crescimento ou em momentos de estresse mecânico, tende a ser maior a deposição óssea. Já em períodos de inatividade prolongados, a absorção ocorre de forma mais pronunciada, reduzindo a massa óssea. Além de importante na mecânica do esqueleto, este processo é responsável pela manutenção do cálcio sérico, contribuindo para o fino equilíbrio iônico requerido para o normal funcionamento dos diversos processos metabólicos do organismo (TAKAHASHI *et al.*, 1988).

O reparo ósseo envolve os tecidos esquelético e conjuntivo, apresentando muitos processos que estão presentes na remodelação. Para o reparo ósseo, uma seqüência de eventos celulares e bioquímicos inicia uma reação inflamatória. O controle da migração, proliferação e síntese de proteínas é essencial para a angiogênese e formação de tecido conjuntivo. Os macrófagos aparentam ter um papel importante neste processo, liberando fatores de crescimento que estimulam as células endoteliais a formarem capilares e as células mesenquimais a formarem a matriz óssea, que será posteriormente mineralizada (PROBST e SPIEGEL, 1997).

3.5 ENXERTOS ÓSSEOS

As cirurgias para regeneração óssea decorrentes de traumas ou lesões são corriqueiras. Anualmente cerca de 800,000 enxertos são realizados ao redor do mundo com um mercado estimado em 300 milhões de euros e incluem enxertos autógenos, alógenos, xenógenos e com biomateriais sintéticos (European Commission Human Tissue-Engineered Products, 2003).

O enxerto de osso autólogo é a opção com maior índice de sucesso e é considerado o padrão ouro para a realização de enxertos, pois fornece os três elementos necessários para a regeneração óssea: um arcabouço, as células progenitoras osteogênicas e os fatores de crescimento, além de não apresentarem risco de resposta imunogênica. Contudo, apresenta inconvenientes relacionados à necessidade da segunda ferida cirúrgica na área doadora tais como, aumento do custo, maior risco cirúrgico, pior pós-operatório, além do que a quantidade e qualidade de osso disponíveis para a enxertia pode ser insuficiente (CLAVERO e LUNDGREN, 2003; OLIVIER *et al.*, 2004).

O enxerto alógeno envolve dois indivíduos da mesma espécie. Normalmente é coletado de doador cadáver e, após tratamento, é mantido em banco de ossos. Para evitar a possibilidade de infecção e resposta imunogênica, a parte celular do tecido é retirada e ele é utilizado somente como arcabouço osteocondutor, podendo ser associado a fatores de crescimento (ORBAN *et al.*, 2002). Os pacientes podem ter uma percepção negativa por receio de contaminação, rejeição imunológica ou até mesmo por conceitos sócio-culturais e/ou religiosos (BUCK *et al.*, 1989).

Os enxertos xenógenos envolvem espécies diferentes. Os mais comuns são de origem bovina e suína e existem diversos produtos disponíveis no mercado. Normalmente são liofilizados e podem ser encontrados em bloco ou em pó, com diferentes granulações. Existe a opção da porção mineral ou da matriz óssea descalcificada (FIGUEIREDO *et al.*, 2010). Eles podem sofrer restrições de uso pelo fato de ser proveniente de tecido animal, assim como citado anteriormente em relação aos enxertos alógenos (WENZ *et al.*, 2001).

Os biomateriais sintéticos para enxerto ósseo podem ser divididos de acordo com tipo básico de composição. Existem os metais, os polímeros, os compósitos e as cerâmicas. São apresentados em diversas formas, de acordo com a aplicação, e as suas características podem ser modificadas e ajustadas em relação a sua performance biológica como degradabilidade, bioatividade e

composição química. Não apresentam riscos de transmissão de doenças relacionadas a um organismo doador (NI e CHANG, 2009).

- Metais

A rigidez e potencial toxicidade, através da libertação de íons que podem provocar metaloses, reações inflamatórias e encapsulação fibrosa, são os principais inconvenientes deste tipo de material. O aço inox, a liga de titânio-alumínio-vanádio (TÍ6A14V) e as ligas de cobalto-cromo são alguns exemplos de metais ou ligas metálicas já utilizadas (AFONSO, 1998). Os implantes metálicos de titânio comercialmente puro são totalmente inertes e largamente utilizados para a substituição de dentes perdidos com total segurança. Atualmente é o maior exemplo de biomaterial metálico (SALVI e BRAGGER, 2009).

- Polímeros

Os polímeros são cadeias extensas de unidades monoméricas repetidas, unidas por ligações covalentes, com peso molecular elevado. As propriedades físico-químicas destes materiais são marcadamente influenciadas por vários fatores como a composição química, a estrutura, a extensão da cadeia macro-molecular e a distribuição de tamanhos nas cadeias. Os polietilenos, o polipropileno, o poliuretano, o ácido polilactídico (PLA) e o polimetilmetacrilato (PMMA) são exemplos de polímeros utilizados como biomateriais sintéticos (HIGASHI *et al.*, 1986; AFONSO, 1998).

- Compósitos

Os compósitos são decorrentes da combinação de tipos diferentes de biomateriais com o intuito de somar as suas características positivas, obter melhores resultados e ampliar as indicações de utilização. Uma analogia interessante é o tecido ósseo, constituído por fibras colágenas e minerais, que seria um compósito criado pela natureza, com ótimas propriedades biomecânicas. Já existem relatos de diferentes associações para obtenção de compósitos (AFONSO, 1998; VERHEYEN *et al.*, 1993; ZHANG *et al.*, 2010).

- Cerâmicas

Os materiais cerâmicos são estáveis e não reativos. São duros e frágeis e podem ser divididos em três grupos, de acordo com sua composição e características: os materiais cerâmicos oxidados, como o óxido de zircônia e de alumina, muito utilizados em próteses dentais; as cerâmicas tipo fosfato de cálcio, utilizadas na regeneração óssea, representadas pela hidroxiapatita e o fosfato tricálcico; e o grupo dos vidros de sílica e vidros cerâmicos, também utilizados em preenchimentos de defeitos ósseos (AFONSO, 1998; LEGEROS, 2002; CHAN, 2010).

3.6 BIOMATERIAIS E REGENERAÇÃO ÓSSEA

Os biomateriais são definidos, em um sentido amplo, como toda substância ou conjunto de substâncias de origem sintética ou natural, que durante um período de tempo é empregada como um todo ou parte integrante de um sistema para tratamento, ampliação ou substituição de qualquer tecido, órgão ou função corporal (DOHERTY *et al.*, 1992).

Especificamente, os biomateriais para regeneração óssea podem ser definidos como qualquer material implantado que promova neoformação óssea através de processos osteogênicos, osteoindutivos ou osteocondutivos (BAUER e MUSCHLER, 2000). Estas substâncias não necessariamente devem ser inertes ou inócuas, mas indutoras de respostas do hospedeiro (GUASTALDI, 2004).

O processo osteogênico ocorre quando o biomaterial para enxerto ósseo contém células capazes de se diferenciarem em osteoblastos, para produzir tecido ósseo, e de estimularem as células osteogênicas residentes do leito receptor. Este processo pode ser observado nos enxertos autógenos. A osteoindução ocorre quando o biomaterial estimula células mesenquimais indiferenciadas do leito receptor, mesmo fora do tecido ósseo, a se diferenciarem em linhagem osteogênica, para que formem tecido ossificado. E a osteocondução é evidenciada quando a função do biomaterial é servir de arcabouço, permitindo que células osteogênicas do leito receptor se proliferem e penetrem no mesmo para a formação de tecido ósseo, em toda a sua extensão (ZAFIROPOULOS *et al.*, 2007; ARAUJO, 2008; OH *et al.*, 2010).

Dentre os diversos tipos de biomateriais disponíveis para a regeneração óssea, um dos mais comuns e mais utilizados são as cerâmicas de fosfato de cálcio, que possuem um arranjo estrutural e mineral composto por hidroxiapatita ou β -tricálcio fosfato ou pela associação de ambos, formando a cerâmica bifásica de fosfato de cálcio. A hidroxiapatita é o componente primário dos ossos e a sua fórmula estequiométrica é $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, com proporção Ca/P igual a 1,67 (ARAUJO, 2008). A tabela 2 descreve os principais fosfatos de cálcio existentes, sua ocorrência e a relação Ca/P.

A modificação na proporção CA/P pode ser alterada por sua origem e pelo processo de fabricação e influência nas suas características físicas e comportamento biológico (LEGEROS, 2002; ARAÚJO e SANTOS FILHO, 2008; CHAN, 2010). O tricálcio fosfato, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, não é um componente natural do osso, mas apresenta proporção de cálcio e fosfato similares a ele em uma razão de 1,5 (JARCHO, 1986).

Tabela 2 – Ocorrências de fosfatos de cálcio em sistemas biológicos e suas relações Ca/P.
Fonte: Araujo, 2008.

Nome do composto	Fórmula química	Ocorrências	Ca/P
Monohidrogeno fosfato de cálcio dihidratado (DCPD)	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	cálculo dentário, ossos decompostos	1.0
Pirofosfato de cálcio dihidratado (CPPD)	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	depósitos de pseudo-gotas de fluidos	1.0
Fosfato de octacálcio (OCP)	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	cálculo dentário e urinário	1.33
Fosfato de cálcio (TCP)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	cálculo dentário e urinário, pedras salivares, cáries dentárias, calcificação tecidos moles	1.5
Hidroxiapatita (HAP)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	esmalte, dentina, osso, cálculo dentário, pedras, cálculo urinário, calcificação de tecido mole	1.67

Os biomateriais cerâmicos têm alta capacidade de adsorver ou absorver moléculas. Isto acontece devido às suas características estruturais (fig. 4), que permitem que os grupos hidroxila (OH^-) sejam retirados, com relativa facilidade,

gerando canais vazios entre os hexágonos, e também por sua composição química, pois são formados basicamente por cálcio e fosfato que são elementos que participam de forma dinâmica do equilíbrio iônico com o fluido biológico do leito receptor. Este comportamento dos biomateriais cerâmicos permite que eles possam ser utilizados como carreadores de drogas, com finalidades diversas, ou de substâncias que ajudem na regeneração tecidual (SEPULVEDA *et al.*, 1999; ARAUJO, 2008).

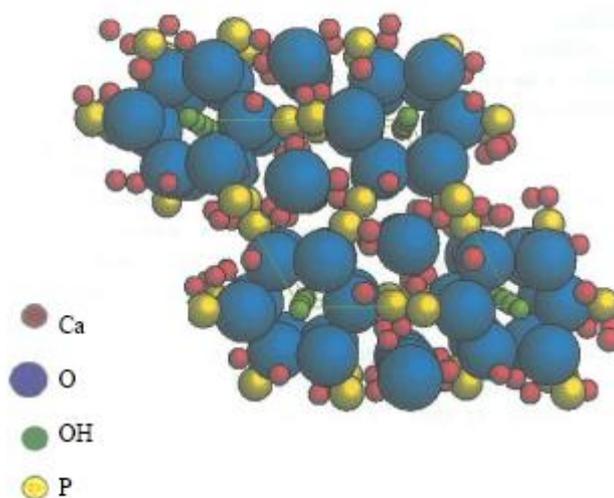


Fig. 4 – Célula unitária da hidroxiapatita. Fonte: Araujo, 2008.

A indicação das cerâmicas para diversas finalidades clínicas pode ser creditada principalmente à alta compatibilidade e osteointegração do material, cuja composição química é similar à dos ossos, além de apresentar ausência de toxicidade local ou sistêmica, ausência de resposta a corpos estranhos ou inflamatória e aparente habilidade em se ligar ao tecido hospedeiro (LEGEROS, 2002; ARAÚJO e SANTOS FILHO, 2008; CHAN, 2010).

Os biomateriais cerâmicos por si só, não são osteogênicos ou osteoindutivos, mas proveem um arcabouço osteocondutor para a formação óssea. Contudo, eles são bioativos e apresentam a capacidade de alteração de sua superfície com a formação de hidroxiapatita carbonatada $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4.\text{HPO}_4.\text{CO}_3)_6(\text{OH})_2$, que leva a uma maior adesão ao tecido ósseo neoformado e a uma maior resistência do osso (JARCHO, 1986).

A degradação lenta da hidroxiapatita é um fator limitante ao seu uso para a regeneração óssea, pois a reabsorção concomitante à neoformação óssea é uma

característica normalmente desejada para um biomaterial (CHAN, 2010). Existem estudos que mostram que as hidroxiapatitas podem levar de 4 a 5 anos para serem reabsorvidas (DE GROOT, 1980; NORDSTRÖM e KARLSSON, 1990). A degradação depende de fatores intrínsecos do biomaterial, como a forma de obtenção, o tamanho das partículas, sendo quanto menor mais rápida a degradação, e a solubilidade da hidroxiapatita, e de fatores físicos e biológicos do indivíduo receptor, como o pH do leito, a taxa de fagocitose, os leucócitos e os mediadores químicos (ARAÚJO e SANTOS FILHO, 2008).

As cerâmicas de fosfato de cálcio bifásicas são compostas pela associação de hidroxiapatita e β -tricálcio fosfato. A vantagem desta associação é obter o benefício da degradação rápida do β -tricálcio fosfato com a manutenção da estrutura do arcabouço, decorrente da reabsorção lenta da hidroxiapatita (KAUSCHKE *et al.*, 2006).

Existem diversos relatos de bons resultados em estudos que analisaram a regeneração óssea após a utilização de cerâmicas de fosfato de cálcio de diferentes origens, composições e processos de fabricação (LEGEROS, 2002; FLECKENSTEI *et al.*, 2006; JENSEN *et al.*, 2007; JENSEN *et al.*, 2009), porém podem ser encontrados alguns relatos de não-regeneração óssea em estudos como o de Develioglu *et al.* (2007), dentre outros.

NI e CHANG (2009) realizaram um estudo com biomateriais cerâmicos comprovando a influência das suas composições nas suas características biológicas e chamaram a atenção que a presença de Mg pode inibir a proliferação celular e que a simples presença de P na composição do biomaterial não é uma garantia de sucesso.

Recentemente foi lançado no mercado o produto Boneceramic, uma nova cerâmica 100% sintética de fosfato de cálcio bifásica em uma relação controlada de 60/40 de hidroxiapatita e fosfato β -tricálcico (Straumann®, Suíça). Foram publicados estudos com resultados promissores para a regeneração óssea utilizando o Boneceramic em diferentes situações (ZAFIROPOULOS *et al.*, 2007; ARTZI *et al.*, 2008; CORDARO *et al.*, 2008; REICHERT *et al.*, 2009). Entretanto, em um experimento com ratos, Chan (2010) observou que, após a utilização do BC, não houve a regeneração tecidual do defeito ósseo criado, além de ter ocorrido um encapsulamento fibroso do material. Também com resultados negativos em seu estudo clínico, DeCoster *et al.* (2009) relataram que a análise de alvéolos dentais

humanos preenchidos com o BC após exodontias demonstrou que o mesmo diminuiu a regeneração óssea, quando comparados com alvéolos preenchidos somente com coágulo sanguíneo.

Dentre os biomateriais para enxertos ósseos os polímeros são os mais versáteis, quando comparados com metais e cerâmicas, pois apresentam as vantagens de poderem ser produzidos em diferentes composições e estruturas, modificando as suas características e comportamento biológico (ANGELOVA, 1999). Um exemplo de versatilidade é que os polímeros podem ser preparados no momento da utilização e, ainda em forma pastosa, injetados no leito receptor com uma técnica de acesso cirúrgico menos invasiva (GUELCHER, 2008).

Vêm sendo desenvolvidas, para a regeneração óssea, poliuretanas de origem vegetal a base do óleo de mamona (*Ricinus communis*). A mamona possui um grande potencial oleoquímico, é um recurso renovável, de baixo custo, de fácil acesso e já é utilizada com frequência para a fabricação de uma série de produtos (SINGH *et al.*, 2005; PEREIRA-JUNIOR *et al.*, 2007). A utilização de biomateriais produzidos a partir do óleo de mamona é particularmente interessante para o Brasil, um país com grande potencial e conhecimento agroindustrial (OHARA, 1995).

As poliuretanas vegetais são produzidas a partir da reação tipo uretana entre dois componentes básicos, o polioliol e o pré-polímero, sintetizados a partir de moléculas derivadas de ácidos graxos vegetais. As poliuretanas vegetais para a regeneração óssea podem ser utilizadas na formulação pura ou em associação com o carbonato de cálcio, cuja função é fornecer íons cálcio, que facilitam a troca iônica na interface osso-resina, com incremento do mecanismo de deposição de cálcio na matriz colagênica, durante o processo de reparação óssea (PEREIRA JUNIOR, *et al.*, 2007). No estudo de Beloti *et al.* (2003) a adição do carbonato ou do fosfato de cálcio à poliuretana derivada de mamona favoreceu a deposição de cálcio em culturas de células osteogênicas.

Os materiais poliméricos também estão sujeitos a fenômenos de biodegradação, que dependem da composição química do polímero, dos monômeros residuais e dos aditivos aceleradores da polimerização incluídos no processo de fabricação. Podem ocorrer reações oxidativas e hidrolíticas em zonas localizadas das cadeias, dando origem à dissolução, deformação e fratura de componentes (GALANTE, 1991). Existem diversos relatos de biomateriais

poliméricos biodegradáveis (SANTERRE *et al.*, 2005; ADHIKARI *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2009).

A degradação de poliuretanas derivadas do óleo de mamona, após a implantação no leito receptor, é controversa. Existem relatos de degradação das partículas (CAVALIERE, 2000; LEONEL *et al.*, 2003; MENDONZA-BARRERA *et al.*, 2003), porém muitos autores chamam a atenção que nos seus estudos a degradação não ocorreu, pelo menos até o período de tempo analisado (MENDONÇA *et al.*, 2006; PEREIRA JUNIOR *et al.*, 2007; LAUREANO FILHO *et al.*, 2009).

As poliuretanas derivadas do óleo de mamona têm sido utilizadas em diferentes modelos experimentais, com resultados diversos, para verificar o seu potencial no processo de regeneração óssea, como pode ser visto a seguir.

Calixto *et al.* (2001) encontraram um retardo na regeneração de alvéolos de ratos preenchidos, após extração dentária, com grânulos irregulares de poliuretana derivada do óleo de mamona, quando comparados aos alvéolos preenchidos somente pelo coágulo sanguíneo.

Del Carlo *et al.* (2003) verificaram que a poliuretana derivada do óleo de mamona foi biocompatível e que a associação com um aspirado de medula óssea autóloga incrementou os parâmetros de regeneração óssea em rádios de coelhos.

Mendonza-Barrera *et al.* (2003) concluíram em seu relato que a utilização da poliuretana derivada do óleo de mamona diminuiu a regeneração óssea em defeitos ósseos criados em tíbias de ratos, quando comparados com o grupo controle, que teve os defeitos preenchidos somente por coágulo.

Os resultados de Figueiredo *et al.* (2004) demonstraram que a poliuretana de mamona mostrou maior propriedade osteocondutiva e menor reação inflamatória que o osso bovino desvitalizado. Foi observada uma invasão de seus poros e o preenchimento das cavidades por tecido ósseo, mostrando-se eficaz como arcabouço para a reparação tecidual guiada.

Leonel *et al.* (2003) obtiveram confirmação de neoformação óssea no interior dos poros de blocos de poliuretana derivada do óleo de mamona, que foram utilizados para o preenchimento de defeitos ósseos no arco zigomático de ratos, caracterizando assim a osteocondução.

Frazilio *et al.* (2006) utilizaram, com sucesso, a poliuretana derivada do óleo de mamona para a correção cirúrgica de luxação patelar em cães. Não foram

encontrados sinais de necrose, inflamação ou rejeição e o material permaneceu sem integração ao osso.

Mendonça *et al.* (2006) enxertaram discos sólidos de poliuretana derivada do óleo de mamona em defeitos criados no osso zigomático de coelhos. O material apresentou biocompatibilidade, mas até o momento da avaliação não osseointegrou-se às bordas das lesões.

Pereira Junior *et al.* (2007) não encontraram sinais de osteocondução, induzida pela poliuretana derivada do óleo da mamona, quando verificaram a regeneração de defeitos criados no rádio de coelhos e preenchidos com a mesma. Contudo, o biomaterial mostrou-se biocompatível e com um potencial de osteointegração.

Leite *et al.* (2008), observaram neoformação óssea em defeitos criados em mandíbulas de ratos, após 60 dias, porém ainda podiam ser encontradas células clásticas multinucleadas.

Laureano Filho *et al.* (2009) encontraram melhores resultados na regeneração óssea de defeitos criados em calotas cranianas de coelho quando os mesmos foram preenchidos por uma poliuretana derivada do óleo de mamona do que por matrizes ósseas humanas e bovinas desmineralizadas.

3.7 ASSOCIAÇÃO DE BIOMATERIAIS A CT PARA A REGENERAÇÃO ÓSSEA

A associação de biomateriais a CT busca obter um sistema osteogênico para a utilização em defeitos ósseos complexos, evitando a necessidade de enxertos autógenos e suas desvantagens e limitações subsequentes à realização de uma segunda ferida cirúrgica, relativa à área doadora (OLIVIER *et al.*, 2004; SALVADÈ *et al.*, 2010).

Existem inúmeras possibilidades de associações variando-se o tipo de biomaterial e a origem das CT. Os biomateriais cerâmicos e as CT obtidas de medula óssea têm sido a associação mais comumente utilizada por uma série de trabalhos, com diversos modelos experimentais (ORSI *et al.*, 2007; KHOJASTEH *et al.*, 2008; MANKANI *et al.*, 2008; PIERI *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2008). Contudo, existem trabalhos com vidros bioativos e CT de tecido adiposo (OH *et al.*, 2010). Com cerâmicas bifásicas e CTD (SEO *et al.*, 2008). Com hidroxiapatita bovina e CT endoteliais (KOOB *et al.*, 2010). Com osso autógeno e CT de medula (LACERDA *et*

al., 2009). Com membranas de colágeno e CT de dentes permanentes (COSTA, 2009) e com implantes de titânio e CTD e de medula (YAMADA *et al.*, 2010), dentre outros.

Estão disponíveis algumas opções de modelos experimentais em animais que permitem a avaliação da regeneração óssea. Modificando-se o animal, a localização e o tamanho da área escolhida, além da técnica cirúrgica e das avaliações posteriores, pode-se individualizar o modelo de acordo com o objetivo do experimento (FRAME, 1980; EINHORN, 1999). Quando são necessários testes de materiais com maior tamanho, como implantes dentários e próteses, são indicados animais com maior porte, como caprinos e cães (COELHO *et al.*, 2010; JUNKER *et al.*, 2010). Porém, os roedores são os animais mais utilizados para a maioria dos experimentos com animais. Eles possuem características fisiológicas compatíveis com as humanas, são de fácil manuseio e acarretam em custo relativamente baixo, comparando-se com outros animais (LIEBSCHENER, 2004).

Hipoteticamente, um biomaterial ideal para ser associado à CT ou à fatores de crescimento, com finalidade de regeneração óssea, deveria apresentar as seguintes características (CHAN, 2010):

- Biocompatibilidade.
- Biodegradação proporcional à neoformação óssea.
- Existência de macroporos, que permitam a interconectividade tecidual, e microporos, que facilitem a vascularização e a aderência celular.
- Alta resistência mecânica e estabilidade, para manter a forma do local a ser regenerado enquanto não é formado o novo osso.
- Fácil utilização.
- Osteocondutividade, para permitir a neoformação óssea ao seu redor ou no seu interior.
- Manter a viabilidade celular e permitir a diferenciação.

Não está bem estabelecido o tempo de vida útil das CT após implantação em defeitos ósseos. Giannoni *et al.* (2009) realizaram um estudo, com a utilização de CT de medula para regeneração óssea, no intuito de verificar o tempo de vida destas células. Os resultados demonstraram que o número de células foi reduzido significativamente após a sua aplicação: cerca de 30% no primeiro dia, 50% após dois dias e 95% após dois meses. A hipótese dos autores é que isto ocorra devido à

baixa celularidade do tecido ósseo e à dificuldade de vascularização e os mesmos sugerem que se busquem formas de prolongar este tempo.

A vascularização tem, possivelmente, um papel importante na osteogênese. Peng *et al.* (2005) realizaram um estudo em camundongos, com CT de origem muscular, e demonstraram que existe relação entre a modulação da angiogênese e a regeneração óssea. Baseando-se no fato de que a isquemia é um fator limitador durante o procedimento cirúrgico de distração osteogênica, Centrulo *et al.* (2005) injetaram CT previamente marcadas em ratos, durante o procedimento citado, e confirmaram que as células migraram para o local da lesão e permaneceram durante a fase de consolidação óssea. Os autores sugerem que elas podem ter um papel importante na vascularização e na regeneração da área lesada. Contudo, Koob *et al.* (2010) encontraram um aumento da vascularização, após a utilização de CT endoteliais na regeneração de defeitos em calota craniana de camundongos, mas este evento não acarretou em uma melhor regeneração óssea.

A engenharia tecidual para a regeneração óssea, utilizando a associação de CT a biomateriais, é promissora e abre um leque de possibilidades. Pode ser realizada somente a associação simples, mas pode-se acrescentar variações, no intuito de obter melhores resultados, como a seleção celular, a expansão *ex-vivo*, a terapia gênica, a construção do arcabouço baseado em exames de imagens do paciente, a inclusão de fatores bioativos e modificações na superfície do biomaterial (OLIVIER *et al.*, 2004) (fig. 5).

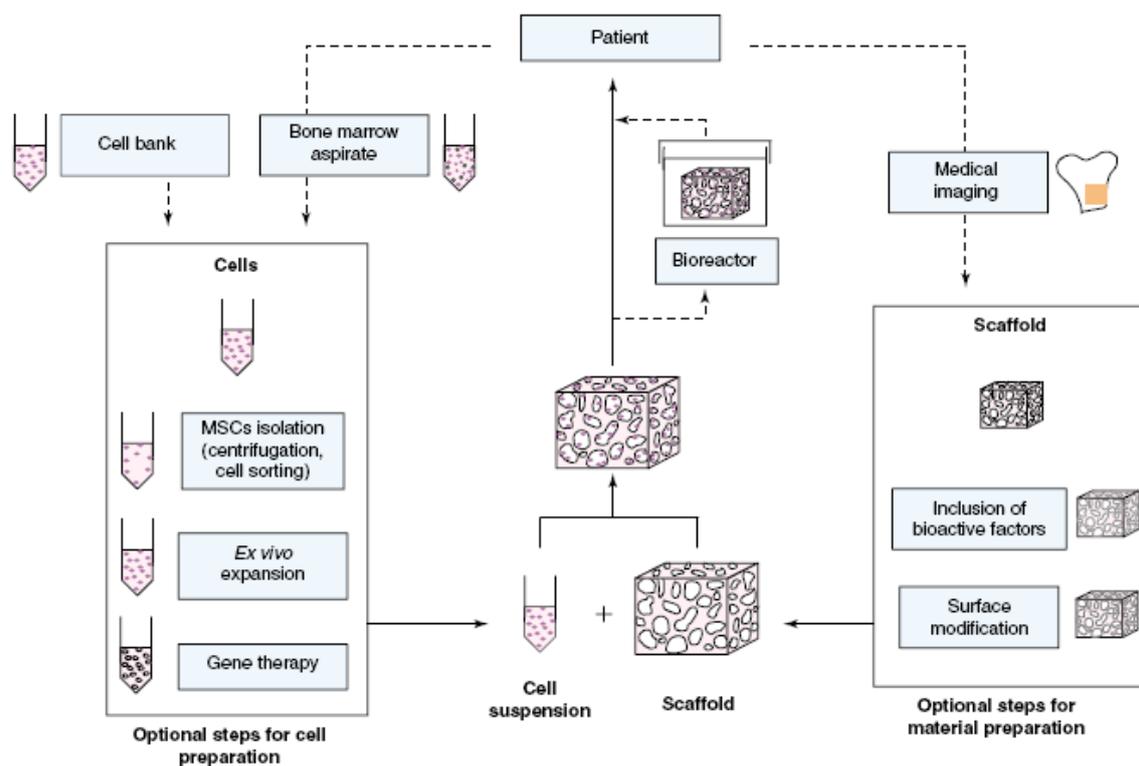


Fig. 5 – Opções de utilização da engenharia tecidual para a regeneração óssea associando-se CT a biomateriais. Fonte: Olivier *et al*, 2004.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO E CULTURA DE CÉLULAS-TRONCO DA POLPA DE DENTES DECÍDUOS (CTD)

As CT utilizadas foram obtidas de tecidos pulparem retirados de dentes decíduos que foram extraídos na fase próxima à esfoliação natural, após autorização dos responsáveis pelo paciente por assinatura de termo de consentimento.

Neste trabalho o doador foi um paciente com oito anos de idade, portador de dentição mista. Foram solicitados exames radiográficos e fotográficos (Fig. 6) e as unidades 6.3, 7.3, 7.5 e 8.3 foram definidas como alvo por estarem na fase de esfoliação e não apresentarem lesões cariosas.

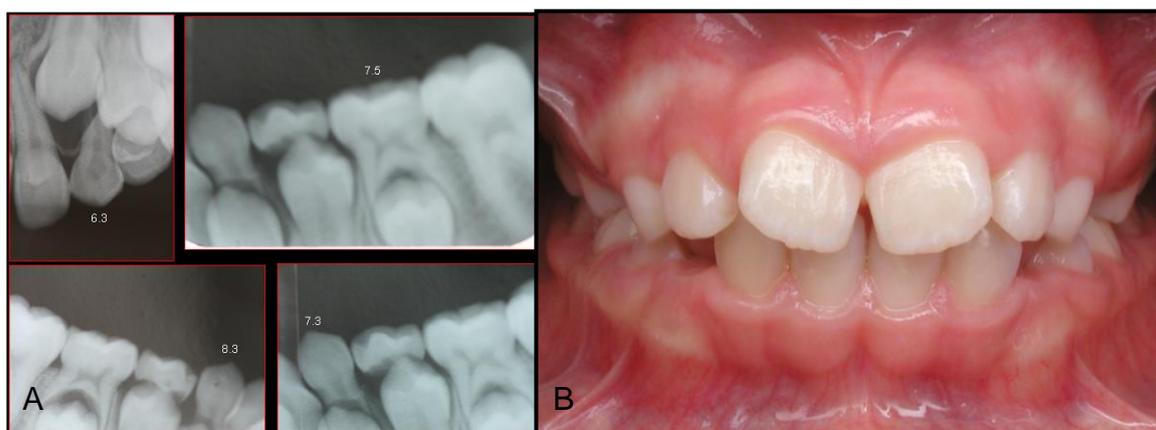


Fig. 6 – Exames solicitados para o planejamento do procedimento. (A) Radiografias das unidades 6.3, 7.3, 7.5 e 8.3. (B) Fotografia frontal intra-oral.

As exodontias foram realizadas em duas etapas, com intervalo de 15 dias, divididas por hemi-arco. Inicialmente foi feito um controle rigoroso da cadeia asséptica a fim de minimizar a presença de microrganismos no meio bucal. Realizou-se a assepsia extra-oral, profilaxia intra-oral, bochecho com clorexidina 2%, em seguida foi feita anestesia infiltrativa e gengival, sindesmotomia e retirada das unidades com um fórceps infantil, com um mínimo de tempo e contato com saliva. Quaisquer resíduos de tecido mole foram retirados e as unidades foram imediatamente colocadas em recipientes individuais contendo meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Sigma Chemical Co., EUA) com 50 µg/ml de

gentamicina (Novafarma, Brasil), acondicionadas a uma temperatura entre 4 e 8° C e encaminhadas para o Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia da Fiocruz/BA, para o isolamento das células.

Todo o procedimento de retirada da polpa e cultura celular foi realizado em fluxo laminar vertical. O acesso à câmara pulpar foi feito através do ápice aberto devido à risólise e quando necessário a coroa foi seccionada com discos diamantados (KG Sorensen, Brasil) em baixa rotação, sob irrigação constante. O tecido pulpar foi retirado com o auxílio de curetas e limas endodônticas, imediatamente acondicionado em garrafas de cultura, com meio DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF; Cultilab, Brasil) e armazenado em estufa a 37° C e 5% de CO₂ para proliferação celular e aderência à garrafa. A troca do meio completo foi feita a cada três dias, durante um período aproximado de 10 dias, quando a cultura obteve cerca de 80-90% de confluência, sendo acompanhada por meio de observação em microscópio óptico invertido. Ao longo das trocas, as CT mesenquimais aderentes foram selecionadas, enquanto que as células suspensas no meio de cultura foram sendo descartadas.

Neste ponto de confluência foi realizada a liberação das células da superfície plástica, para permitir a continuidade da proliferação e a criopreservação de parte das células. Para liberar as células, foi feita a troca do meio por duas vezes com solução salina estéril e após a remoção da solução salina, foi adicionada solução de tripsina a 0,25% (Invitrogen, Brasil), durante 2-5 minutos, para que as ligações das células à matriz extracelular fossem desfeitas, permitindo o desprendimento das células da superfície plástica da garrafa de cultura.

Após confirmação do desprendimento das células, por observação em microscópio óptico invertido, a enzima foi inativada pela adição de meio completo. O meio da garrafa contendo as células foi então coletado, utilizando uma pipeta e centrifugado a 1500 RPM por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o pellet de células ressuspendido em 1 mL de meio DMEM suplementado com 10% de SBF. Neste momento, uma parte das células foi separada para criopreservação em nitrogênio líquido e o restante das células foi utilizado para a continuidade do trabalho em estudos *in vitro* e *in vivo*.

Para a criopreservação, entre 10⁶-10⁷ células por tubo foram preparadas em um volume final de 1 mL, sendo 900 µL de meio completo contendo as células e 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). Os tubos de criopreservação foram submetidos a

abaixamento criostático variando a temperatura de 4 a -80° C por 24 h e, posteriormente, foram estocados em nitrogênio líquido.

Para a realização dos experimentos *in vitro* e *in vivo* foi selecionada uma das linhagens obtidas, que foi caracterizada no Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia da Fiocruz/BA utilizando as técnicas de coloração das células com o método de Giemsa, por imunofluorescência, por citometria de fluxo e por RT-PCR (NOGUEIRA *et al.*, 2009).

4.2 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA INFLUÊNCIA DOS BIOMATERIAIS NAS CTD

Foi avaliada a influência de três biomateriais utilizados para a regeneração óssea sobre a cultura de CTD, em relação a proliferação, a diferenciação osteogênica, a morfologia e a quantidade de cálcio e fosfato produzidos pelas células.

4.2.1 Biomateriais testados

Os três biomateriais testados são utilizados em procedimentos que induzam ou permitam a regeneração óssea. Foram testados um material sintético, um de origem animal e outro de origem vegetal. As informações expostas a seguir foram obtidas dos respectivos fabricantes.

- **Boneceramic (Straumann®, Suíça)**

- Composição: é um biomaterial osteocondutor, 100% sintético, bifásico, composto de hidroxiapatita e fosfato β -tricálcico em uma relação de 60:40.
- Apresentação (fig. 7 A): *blisters* de 400-700 μ m ou 500-1000 μ m, com macroporos interconectados.
- Degradabilidade: reabsorção gradativa. A hidroxiapatita tem uma degradação mais lenta e o fosfato β -tricálcico, uma degradação mais rápida.
- Modo de utilização: as partículas devem ser misturadas com sangue/osso autógeno ou com soro fisiológico estéril.
- Indicações: preenchimento e/ou aumento de defeitos ósseos.

- **Bonefill (Bionnovation Biomedical S/A, Brasil)**

- Composição: é um biomaterial osteocondutor de origem bovina, composto exclusivamente da parte mineral do tecido ósseo.
- Apresentação (fig. 7 B): estruturas macro e microscópicas com apresentação em três granulações: fina até 0,6 mm, média de 0,6 a 1,5 mm e grossa de 1,5 a 2,5 mm. Neste trabalho foi utilizada a granulação fina.
- Degradabilidade: uniforme e homogênea.
- Modo de utilização: as partículas devem ser misturadas com sangue/osso autógeno ou com soro fisiológico estéril.
- Indicações: em procedimentos cirúrgicos, como material de preenchimento de falhas ósseas.

- **Composto ósseo de rícinus (Poliquil, Brasil)**

- Composição: é uma poliuretana composta por um pré-polímero derivado de isocianato, um polioli poliéster derivado do óleo de mamona e carbonato de cálcio. A relação de mistura é de 1,00 do pré-polímero para 0,65 de polioli e o carbonato de cálcio corresponde a 50% da soma da massa dos dois componentes. A inclusão do carbonato de cálcio permite a formação de poros e confere melhor padrão de resistência e elasticidade em relação ao tecido ósseo.
- Apresentação (fig. 7 C): apresentado na forma líquida, pré-moldados, prototipado ou em grânulos com granulação média de 500 µm, que foi a forma utilizada neste trabalho.
- Degradabilidade: não informada.
- Modo de utilização: as partículas devem ser misturadas com sangue/osso autógeno ou com soro fisiológico estéril.
- Indicações: indicado para fixação, reconstrução, restauração ou expansão óssea em procedimentos de ortopedia, traumatologia, neurocirurgia, cirurgia crânio-maxilo-facial, cirurgia plástica e odontologia; em alterações congênitas ou adquiridas, onde a enxertia óssea se fizer necessária.



Figura 7 - Biomateriais testados. (A) Straumann® BoneCeramic. (B) Bonefill. (C) Composto ósseo de rícinus.

4.2.2 Delineamento experimental do experimento *in vitro*

Os biomateriais testados foram submetidos às avaliações para verificar sua influência sobre as culturas celulares de acordo com a tabela 3.

Tabela. 3 - Delineamento experimental do estudo *in vitro*. As descrições dos grupos, as avaliações propostas e os métodos selecionados.

Grupo	Avaliações	Método Utilizado	Descrição do grupo
Controle	Proliferação	MTT	Cultura celular padrão com meio DMEM
	Diferenciação	Alizarina vermelha	
	Morfologia	M. ótica e MEV	
	Quant. Ca e P	EDS	
Grupo I	Proliferação	MTT	Experimentos com Straumann® BoneCeramic
	Diferenciação	Alizarina vermelha	
	Morfologia	Descritivo	
	Quant. Ca e P	EDS	
Grupo II	Proliferação	MTT	Experimentos com Bonefill
	Diferenciação	Alizarina vermelha	
	Morfologia	Descritivo	
	Quant. Ca e P	EDS	
Grupo III	Proliferação	MTT	Experimentos com Composto ósseo de rícinus (COR)
	Diferenciação	Alizarina vermelha	
	Morfologia	Descritivo	
	Quant. Ca e P	EDS	

4.2.3 Análises realizadas

4.2.3.1 Avaliação da proliferação celular

Para a avaliação comparativa da proliferação celular foram utilizados o ensaio quantitativo por MTT descrito pela norma ISO/EN 10993-5 (*International Organization for Standardization*, 2009) e a análise qualitativa pelo acompanhamento das culturas, com microscopia ótica, durante o experimento. Para esta avaliação são utilizados extratos, obtidos dos materiais através da incubação em meio de cultura, que são adicionados às culturas celulares de acordo com os passos abaixo descritos.

- Obtenção dos extratos

Os extratos foram obtidos a partir da incubação dos três biomateriais testados em meio DMEM por 24 h a 37° C. A proporção foi de 200 mg dos biomateriais para 1 mL de meio. Após a incubação, os extratos foram submetidos à centrifugação para a coleta dos sobrenadantes. Os extratos foram então diluídos em meio DMEM em proporções de 1/5, 1/100 e 1/250. Todos os meios foram suplementados com 10% de soro bovino fetal (Cultilab, Brasil) e 50 µg/ml de gentamicina (Novafarma, Brasil).

- Composição das placas de cultura

As células, previamente cultivadas, foram liberadas da garrafa utilizando-se tripsina a 0,25% e a suspensão celular foi centrifugada e ressuspensa em meio, ajustando-a para uma densidade de 1×10^5 células/mL. Os experimentos foram feitos em triplicata e foram colocados 100 µl da suspensão, que corresponderam a 1×10^4 , em cada poço em placas de 96 poços.

- Incubação por 24 h

As células foram incubadas por 24 h (5 % CO₂, 37 °C, > 90 % umidade) para se aderirem e formarem uma camada semi-confluenta. Em seguida, os poços foram examinados em microscópio para verificação da morfologia e de possíveis alterações, como contaminação, não aderência ou diferenças visíveis de quantidade de células.

- Aplicação dos extratos

Após aspiração do meio de cultura, foi adicionado 100 µl dos meios experimentais, nas diferentes concentrações, em cada poço, de acordo com a divisão dos grupos. Todos os testes foram feitos em triplicata.

- Realização do ensaio por MTT

Após 48 h de cultura com os diferentes biomateriais, as células foram examinadas em microscópio ótico para verificação de alterações morfológicas. O meio de cultura foi removido dos poços e adicionou-se 100 µl de solução de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólio) (Sigma-Aldrich, EUA) a 0,5 mg/mL de meio DMEM. As placas foram incubadas por 4 h a 37 °C, para a formação dos cristais de formazan, após isto a solução foi retirada e foi adicionado ácido clorídrico 0,1 N em álcool isopropílico com a finalidade de dissolver os cristais de formazan. Após 30 min, determinou-se a absorvância em um espectrofotômetro Spectramax 190 (Molecular Devices, EUA), a 570 nm. Este mesmo procedimento para a avaliação da proliferação celular também foi realizado após 4 dias de cultura.

4.2.3.2 Avaliação da capacidade de diferenciação osteogênica das CTD

Para verificação da capacidade de diferenciação osteogênica das células sob a influência dos extratos dos biomateriais utilizou-se a marcação por alizarina vermelha, que identifica a deposição de cálcio. O experimento seguiu as seguintes etapas:

- Indução osteogênica

As células foram cultivadas em placa de 24 poços, em meio DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal durante dois dias até atingirem 50% de confluência. A partir deste momento, utilizou-se uma associação dos meios experimentais, obtidos dos extratos, com o meio indutor de osteogênese que é composto por: meio DMEM contendo 10% de soro bovino fetal, 100 nM de dexametasona, 0,05 mM de L-ácido ascórbico 2- fosfato e 10 mM de β -glicerofosfato (Sigma-Aldrich, EUA). O tempo de cultura foi de 21 dias. Como grupo controle as células foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal. Os experimentos foram feitos em triplicata, o meio das culturas foi trocado a cada três dias e a evolução da diferenciação foi acompanhada diariamente através de microscópio ótico.

- Coloração por alizarina vermelha

Após 21 dias de cultivo, as culturas foram lavadas com PBS, fixadas com paraformaldeído 4% (Electron Microscopy Sciences, EUA) durante 30 minutos, lavadas duas vezes com água destilada, quando foi aplicada a alizarina vermelha 2% (Sigma-Aldrich, EUA) por três minutos. Após a remoção da alizarina, as culturas foram lavadas três vezes com água destilada e imagens digitais dos depósitos de cálcio foram capturadas para realização de análise quantitativa da % de área corada de cada poço, através de programa de imagem específico (Image-pro Express, Media Cybernetics, EUA). As áreas coradas também foram analisadas com microscópio ótico para confirmação da coloração e avaliação qualitativa.

4.2.3.3 Avaliação da morfologia celular

A morfologia celular foi acompanhada e avaliada de forma descritiva em todas as etapas do experimento *in vitro* através da observação em microscópio ótico. Foram realizados registros de imagens.

4.2.3.4 Avaliação dos biomateriais por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Esta etapa foi realizada na Plataforma de Microscopia Eletrônica do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, utilizando-se o microscópio JSM 6390LV (JEOL, Japão). O preparo para MEV foi feito no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia da UEFS (LAPEM) e consistiu na metalização dos biomateriais em sua forma de apresentação. As partículas dos biomateriais foram aderidas a suportes metálicos (*stubs*) com fita de carbono e submetidas a um aparelho metalizador SCD 050 (BAL-TEC, Suíça) para deposição de uma cobertura ultrafina de ouro que tornou as amostras eletricamente condutivas.

4.2.3.5 Análise de elementos químicos por espectroscopia de dispersão de elétrons (EDS)

Esta etapa foi realizada na Plataforma de Microscopia Eletrônica do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, utilizando-se o sistema EDS Nonotrace TN-JEM1230-3NUS (Termo Electron corporation, EUA), com uma distância das amostras para o detector de 10 mm e com a voltagem de 15 kv. As mesmas amostras preparadas para a análise por MEV puderam ser analisadas por EDS. O preparo é o mesmo para ambas as análises.

Para caracterizar os biomateriais testados foram identificados os elementos químicos presentes nos mesmos.

4.3 AVALIAÇÃO *IN VIVO* DA ASSOCIAÇÃO BIOMATERIAL-CTD

Todos os procedimentos deste experimento seguiram as normas de conduta para experimentação animal do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz FIOCRUZ/Ba e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Hospital São Rafael.

4.3.1 Padronização do modelo experimental

Neste trabalho foram utilizados ratos, pois o seu porte permite o acesso a regiões ósseas de tamanho suficiente para as avaliações propostas.

Existem duas áreas principais disponíveis para a realização de defeitos ósseos em ratos: nos membros posteriores, com a tibia ou o fêmur e a calota craniana (fig. 8). Os dois modelos foram testados nesse estudo.

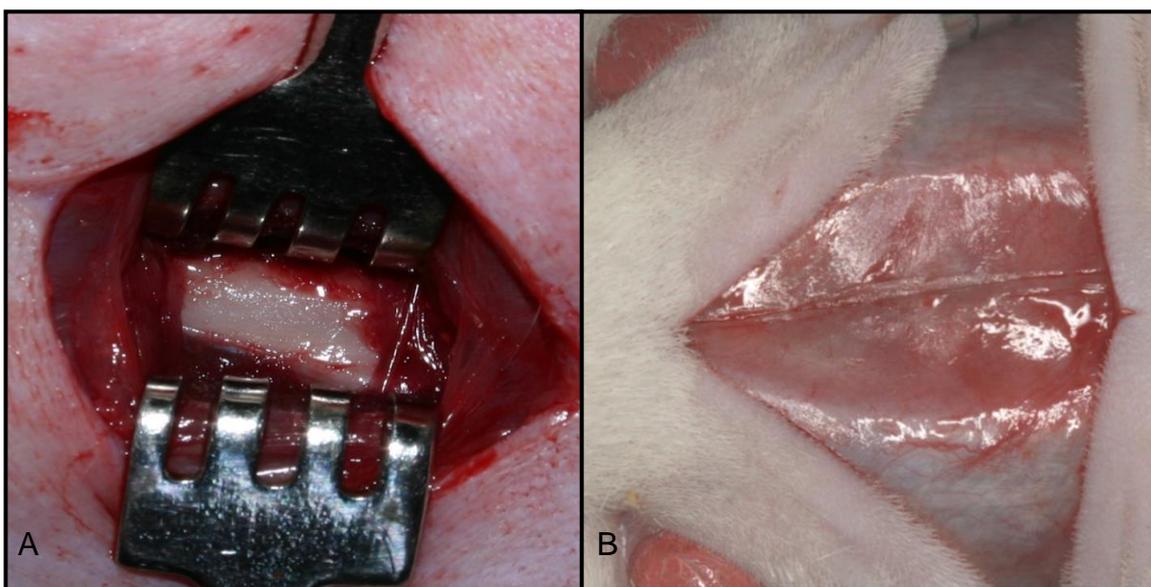


Fig 8. – Regiões mais utilizadas em experimentos de regeneração óssea em ratos. (A) Fêmur. (B) Calota craniana.

Os animais foram fornecidos e mantidos pelo biotério do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz/FIOCRUZ/BA em condições ambientais controladas de luminosidade e temperatura, longe de estímulos auditivos, alimentados com ração balanceada e água *ad libitum*, antes e durante o estudo. Todos os procedimentos cirúrgicos foram conduzidos no mesmo local e com os animais sob anestesia geral.

- Defeito ósseo em calota craniana

Para realização da cirurgia com o modelo da calota craniana (fig. 9) os animais foram submetidos à anestesia geral por via intraperitoneal com cloridrato de xilasina (5 a 10 mg/kg) + cloridrato de quetamina (50 a 75 mg/kg) misturados na mesma seringa.

Após confirmação da profundidade da anestesia por reflexo da cauda, os animais foram tricotomizados e imobilizados em decúbito ventral na mesa cirúrgica. Após a antissepsia com PVPI tópico foi feita uma incisão linear com lâmina de bisturi nº 15 no longo eixo da calota craniana expondo o periósteo, que foi incisado e descolado com espátula nº 7 para o acesso ao tecido ósseo.

Os tecidos moles foram mantidos afastados por dois afastadores tipo Volkmann e o defeito ósseo foi criado na porção mediana da calvária com uma broca trefina de 7 mm de diâmetro (FTR06-SIN, Brasil), acoplada a um contra-ângulo com redução de 1:16, ativado por um motor cirúrgico rotatório de baixa rotação Implantmed Si - 923 (WH, Áustria), sob irrigação constante com soro fisiológico estéril. Neste momento foram realizados os enxertos.

Foram realizados três tipos de tratamento: o grupo controle somente com o coágulo, o grupo com 25 mg do composto ósseo de rícínus homogeneizado com coágulo e o grupo com 25 mg do composto ósseo de rícínus homogeneizado com coágulo e 2×10^6 células da polpa dentária, previamente contadas e confirmadas em relação à viabilidade celular. A organização dos grupos está disposta na tabela 4. Os tempos de sacrifício para análise da regeneração óssea foram de 15, 30 e 60 dias.

A sutura foi realizada com fio de nylon 4.0 (Brasuture, Brasil). Após a cirurgia os animais não receberam nenhum tipo de medicação e foram mantidos em gaiolas individuais.

- Defeito ósseo em fêmur

Para o modelo de lesão em fêmur a técnica cirúrgica é modificada. Os animais foram imobilizados em decúbito lateral esquerdo e submetidos à antissepsia com PVPI tópico. A incisão foi realizada com lâmina de bisturi nº 15 na área externa do membro posterior no longo eixo do fêmur e o tecido muscular foi divulsionado com o auxílio de uma tesoura romba expondo o periósteo, que foi incisado e descolado com espátula nº 7 para o acesso ao tecido ósseo. A criação do defeito ósseo seguiu os mesmos passos do modelo em calota craniana, porém, como o osso fêmural apresenta uma espessura média de 4 a 5 mm, o defeito foi realizado com um diâmetro e profundidade de 3 mm utilizando-se a broca trefina de 3 mm

(FTR02-SIN, Brasil). A partir deste momento os passos são iguais ao modelo anterior.

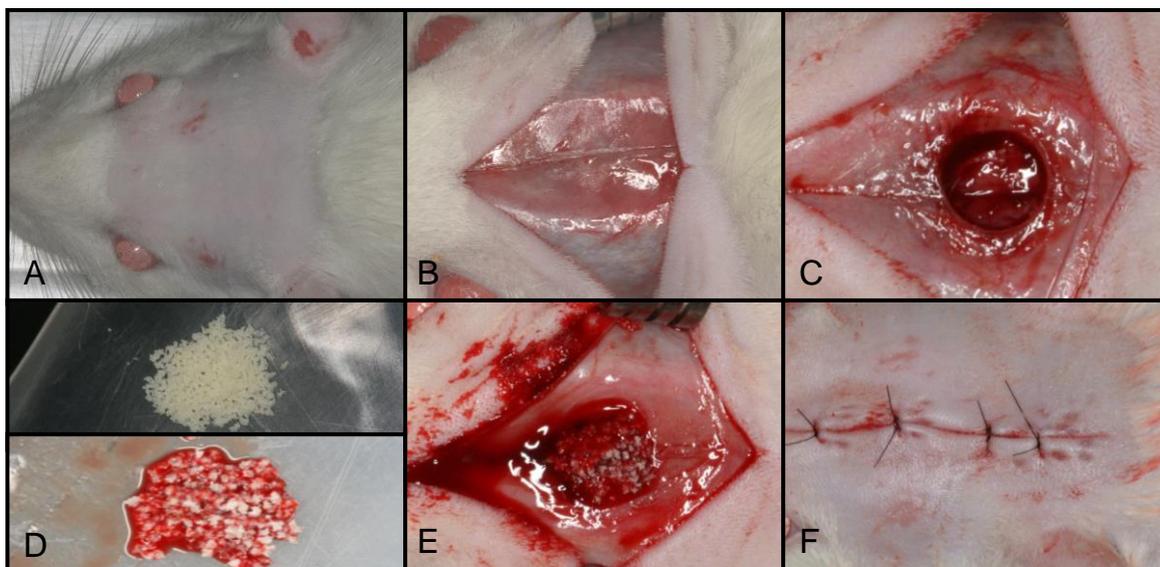


Figura 9 - Seqüência cirúrgica de realização e preenchimento dos defeitos. (A) Tricotomia. (B) Incisão e divulsão cutânea. (C) Defeito realizado com broca trefina. (D) Biomaterial seco (acima) e homogeneizado com coágulo sanguíneo (abaixo). (E) Defeito preenchido com biomaterial. (F) Sutura finalizada.

4.3.2 Delineamento experimental do experimento *in vivo*

Foram utilizados 54 animais (*Rattus norvegicus*, linhagem Wistar) adultos machos, com peso entre 400 e 450 g e idade entre 5 e 6 meses. Os animais foram selecionados de forma aleatória e divididos igualmente em três grupos, com três tempos de corte, de acordo com a tabela 4.

Tabela 4 - Delineamento experimental do estudo *in vivo*. Os tempos de corte e a descrição dos grupos.

Grupo	Avaliações	Métodos	Descrição dos grupos
I-Controle	Macroscópica	Fotografias Digitais	Preenchimento com coágulo. (controle)
	Radiopacidade	Radiografias digitais	
	Histológica	Microscopia ótica	
	Ultraestrutural	MEV	
	El. Químicos	EDS	
II-COR	Macroscópica	Fotografias Digitais	Preenchimento com 25 mg do composto ósseo de rícinus.
	Radiopacidade	Radiografias digitais	
	Histológica	Microscopia ótica	
	Ultraestrutural	MEV	
	El. Químicos	EDS	
III-COR+CTD	Macroscópica	Fotografias Digitais	Preenchimento com 25 mg do composto ósseo de rícinus associado a 2×10^6 CTD.
	Radiopacidade	Radiografias digitais	
	Histológica	Microscopia ótica	
	Ultraestrutural	MEV	
	El. Químicos	EDS	

4.3.3 Eutanásia dos animais e obtenção das amostras

Para a obtenção das amostras, os animais foram submetidos à eutanásia após 15, 30 e 60 dias, em câmara de CO₂. A remoção da peça óssea foi feita com tamanho padronizado e margem de segurança em relação ao defeito, utilizando-se discos diamantados em baixa rotação, sob irrigação constante com soro fisiológico. As peças obtidas foram acondicionadas em recipientes individuais identificados

contendo paraformaldeído tamponado a 4%, sendo fixados por sete dias em geladeira para o processamento histológico.

4.3.4 Análises realizadas

As avaliações descritas a seguir foram feitas em todas as amostras, com exceção da microscopia eletrônica de varredura e a análise por EDS que foram realizadas somente no tempo de sacrifício de 60 dias, por representar o maior período de reparo ósseo estudado.

4.3.4.1 Análise macroscópica

Após fixação, todas as peças foram fotografadas em uma visão inferior e superior (figs. 10 A e B) para análise macroscópica. Para isto utilizou-se uma máquina digital com lente macro de 100 mm (Canon, EUA) a uma mesma distância focal das peças.



Fig. 10 – Análises imaginológicas. (A) Fotografia macro com visão inferior. (B) Fotografia macro com visão superior. (C) Radiografia digital com presença do penetrômetro (canto direito).

4.3.4.2 Avaliação da radiopacidade tecidual por meio de radiografias digitais

As amostras foram colocadas em uma posição transversal diretamente sobre a placa de imagem para radiografia periapical do sistema de radiografia digital CDR USB (Schik, EUA), com a superfície interna voltada para o sensor. Foi adicionado ao conjunto um penetrômetro de alumínio de cinco degraus, com incremento de 1 mm. Em todas as tomadas, o aparelho radiográfico (70 kV) foi programado para um tempo de exposição de 0,02 seg. a uma distância focal de 10 cm e feixe perpendicular ao objeto. Após a exposição, as imagens digitais foram armazenadas

em formato TIFF (*Tagged Image File Format*) (fig. 10 C) para posterior tratamento e avaliação.

Foi utilizado o programa Photoshop® (Adobe Systems Incorporated, EUA) para correção do brilho das imagens, utilizando-se o penetrômetro como parâmetro. Buscou-se com isto a uniformização dos tons de cinza exibidos pelas imagens dos diferentes grupos avaliados, evitando que o ruído fotônico interferisse na posterior mensuração dos valores dos níveis de cinza. Para quantificação da radiopacidade tecidual, é mensurada a média e o desvio padrão dos níveis de cinza, com auxílio do programa Image Tool® (University of Texas Health Science Center, USA). Adicionalmente, calcula-se o coeficiente de variação (CV) da mesma área ($CV = (DP/média) * 100\%$).

Para aferir e comparar o incremento na radiopacidade tecidual das áreas em regeneração foram definidas duas circunferências do mesmo diâmetro, uma no local do defeito e outra no lado oposto ao penetrômetro, após o tecido ósseo residual (fig. 11). Esta área correspondeu a um controle negativo individual para cada imagem, já que nenhuma estrutura foi radiografada. Após a definição das duas áreas, utilizando-se a ferramenta histograma do programa Image Tool®, foram mensuradas a média dos níveis de cinza e o CV das mesmas. O resultado final para comparação foi obtido subtraindo-se o valor da área controle individual do valor da área do defeito. Os valores dos níveis de cinza e do CV das áreas dos defeitos não foram comparados entre si diretamente, pois mesmo com a correção do brilho, realizada anteriormente, observou-se que existiu uma diferença de contraste entre as imagens, o que poderia gerar um valor absoluto falho para a comparação entre as amostras.

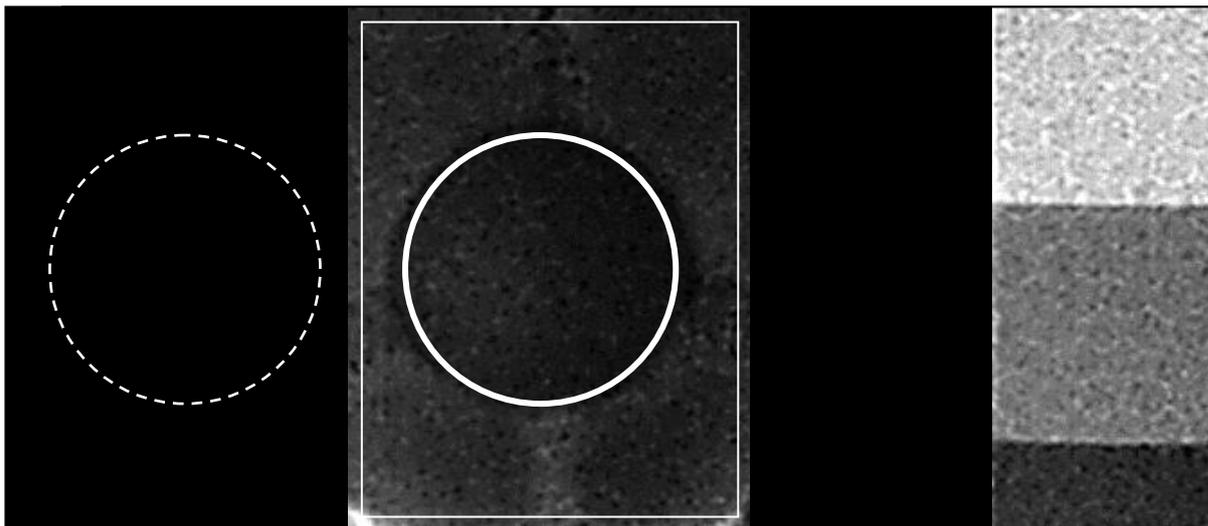


Fig. 11 – Avaliação da radiopacidade tecidual de uma das amostras. Radiografia digital exibindo o penetrômetro com diferentes graus de radiopacidade (lado direito), o fragmento ósseo da calota craniana de uma das amostras (retângulo), a região do defeito ósseo (circunferência com linha contínua) e a região utilizada como controle negativo (circunferência com linha tracejada).

4.3.4.3 Análise histológica por microscopia ótica

O processamento para microscopia ótica foi realizado no Serviço de Histotecnologia do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz. As amostras, após o período de fixação, foram descalcificadas em ácido nítrico a 7% durante 72 h. Em seguida foram seccionadas transversalmente em seu maior diâmetro e submetidas ao processamento de rotina para inclusão em parafina e cortadas em micrótomo (Leica RM 2125, Alemanha) em secções transversais à peça, com 5 μ m de espessura. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina (H&E).

Utilizando-se microscópio ótico em aumentos variados, a regeneração tecidual foi avaliada de forma descritiva. Foram relatados aspectos como presença de células inflamatórias, quantidade de fibras colágenas, interface de contato biomaterial/tecido, degradação das partículas do material e neoformação óssea.

4.3.4.4 Análise ultra-estrutural por microscopia eletrônica de varredura

Esta etapa foi realizada na Plataforma de Microscopia Eletrônica do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, utilizando-se o microscópio JSM 6390LV (JEOL, Japão). As análises foram feitas no grupo de animais com tempo de sacrifício de 60 dias por representar o maior período de reparo ósseo estudado. Obetivou-se avaliar,

de forma descritiva, a microarquitetura das áreas em regeneração. Para fixação das amostras foi utilizada a imersão por sete dias em paraformaldeído 4%, glutaraldeído 2,5%, diluído em tampão cacodilato de sódio 0,1 M.

Após a fixação, as peças foram cortadas ao meio com lâmina de bisturi nº 15 no maior diâmetro do defeito. Uma metade foi descalcificada e preparada para microscopia ótica, conforme descrito anteriormente, e a outra preparada para MEV.

O preparo para MEV foi feito no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia da UEFS (LAPEM) e consistiu de:

- Desidratação inicial: seqüência de banhos em álcool, com duração de 10 minutos cada, com a concentração iniciando-se a 50% e aumentando 10% a cada banho até 100%.
- Ponto-crítico: logo após os banhos, as amostras foram tratadas no aparelho de ponto-crítico CPD 030 (BAL-TEC, Suíça), para finalização da desidratação.
- Metalização: as peças ósseas foram fixadas com fita de carbono em suportes próprios (*stubs*) e submetidas a um aparelho metalizador SCD 050 (BAL-TEC, Suíça) para deposição de uma cobertura ultrafina de ouro que torna as amostras eletricamente condutivas.

4.3.4.5 Análise de elementos químicos por espectroscopia de dispersão de elétrons

Esta etapa foi realizada na Plataforma de Microscopia Eletrônica do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, utilizando-se o sistema EDS Nanotracer TN-JEM1230-3NUS (Termo Electron corporation, EUA), com uma distância das amostras para o detector de 10 mm e com a voltagem de 25 Kv. As análises foram feitas no grupo de animais com tempo de sacrifício de 60 dias por representar o maior período de reparo ósseo estudado.

Foram identificados os elementos químicos presentes na região central do defeito criado e mensuradas a quantidade de cálcio e fósforo para definir e comparar áreas de regeneração óssea

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística, utilizou-se o software GraphPad Prism® versão 5.01. (GraphPad Software, Inc., EUA). As diferenças entre as médias foram submetidas à análise de variância (one-way ANOVA) e avaliadas com o pós-teste de Bonferroni para comparações múltiplas, tendo-se adotado o valor de p como estatisticamente significativo quando menor que 0,05.

5. RESULTADOS

5.1 OBTENÇÃO E CULTURA DE CÉLULAS-TRONCO DA POLPA DE DENTES DECÍDUOS (CTD)

A técnica de obtenção e cultura das CTD mostrou-se rápida e relativamente simples. As CTD, após adesão à superfície plástica, apresentaram uma forma ovóide inicial que evoluiu durante as primeiras 24 h para uma forma fibroblastóide, que se manteve até a confluência total (fig. 12). As culturas foram acompanhadas até a 13ª passagem e as células não apresentaram alterações morfológicas perceptíveis. As células obtidas foram submetidas à criopreservação, o que também não influenciou nas características celulares. Uma das linhagens foi escolhida para os estudos desenvolvidos *in vitro* e *in vivo* neste trabalho. Os resultados da caracterização pelo método de Giemsa, por imunofluorescência, por citometria de fluxo e por RT-PCR da linhagem utilizada neste estudo já foram descritos anteriormente (NOGUEIRA *et al.*, 2009). Uma limitação encontrada foi a pequena quantidade de tecido pulpar obtido. Das quatro unidades dentárias extraídas uma já não continha tecido pulpar e as demais apresentaram pequena quantidade de polpa, conseqüentemente, disponibilizaram poucas células para o início do cultivo. A unidade que não apresentou tecido pulpar foi a que estava em estado de risólise mais avançado. Entretanto, a rápida velocidade de proliferação das CTD e a sua grande capacidade de formação de colônias, após a fase inicial de aderência à superfície plástica da garrafa, compensaram o baixo número inicial de células.

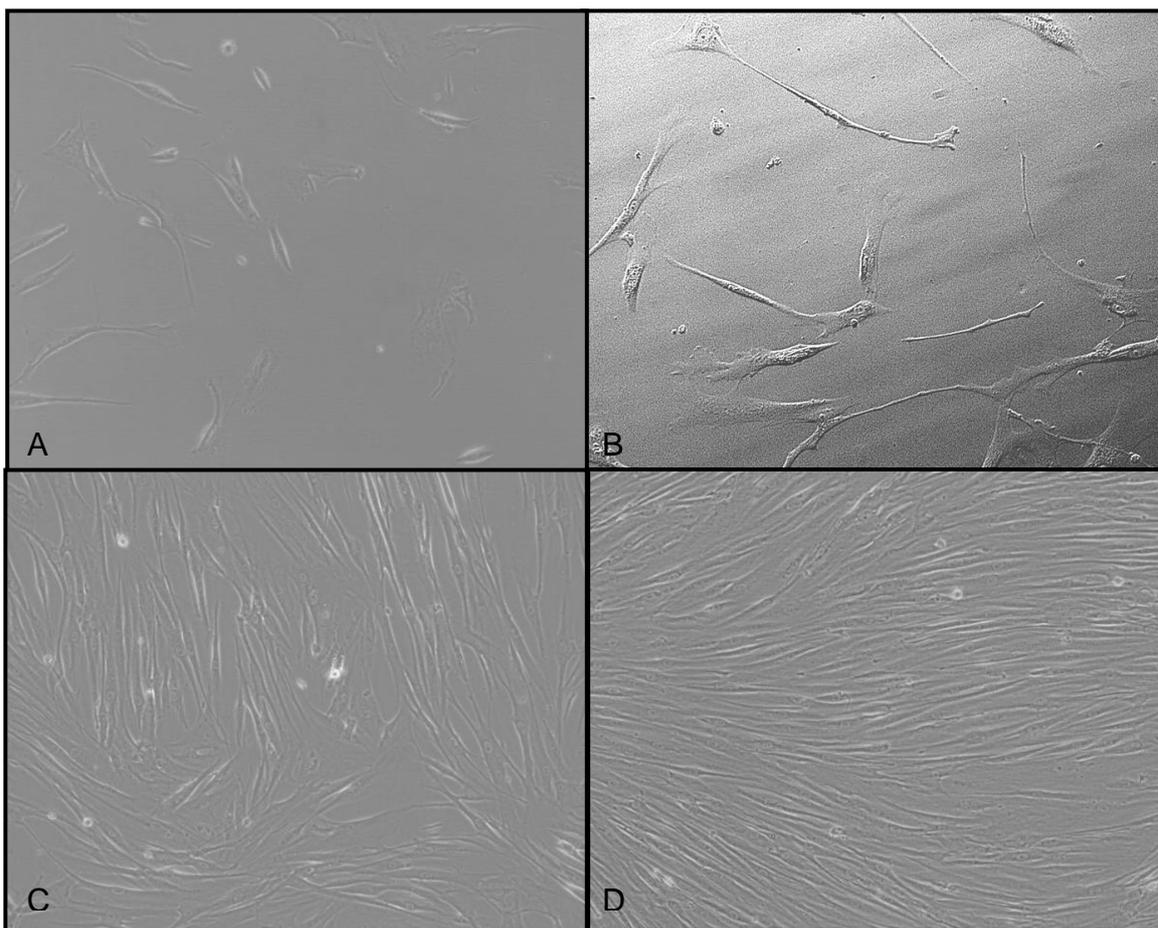


Fig. 12 – Acompanhamento da cultura primária de células-tronco proveniente de dentes decíduos por microscopia ótica. (A) Células esparsas, ainda com forma arredondada. (B) Células com características fibroblastóide, após 72 h de cultivo (C) Estabilização da morfologia celular e aumento da proliferação. (D) Cultura com confluência total.

5.2 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA INFLUÊNCIA DOS BIOMATERIAIS NAS CTD

Foi avaliada a influência dos extratos dos biomateriais Composto ósseo de rícinus (COR), Bonefill (BF) e Straumann® Boneceramic (BC), em três diluições, sobre culturas de CTD, em relação à proliferação, à morfologia e à diferenciação osteogênica. Para a caracterização dos biomateriais foi realizada a análise ultra-estrutural por MEV e a análise de elementos químicos por EDS.

5.2.1 Avaliação da proliferação celular

Após dois e quatro dias de cultivo celular sob a influência dos extratos dos três biomateriais testados, foram realizadas avaliações comparativas da proliferação celular. As culturas foram acompanhadas qualitativamente com microscópio ótico

invertido e foi utilizado o ensaio quantitativo por MTT, descrito pela norma ISO/EN 10993-5 (*International Organization for Standardization*, 2009).

- Dois dias

Após dois dias de cultivo, as culturas foram submetidas ao ensaio de MTT e os valores de densidade ótica foram determinados por espectrofotometria. Os resultados apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos testados ($p=0,0038$, one-way ANOVA). Quando comparados dois a dois (teste de Bonferroni para comparações múltiplas) a diluição 1/5 do BF foi estatisticamente inferior ($p<0,05$) ao grupo com meio de cultura (MC), e a diluição 1/250 do BC foi superior às diluições 1/5 do COR e 1/5 do BF (fig. 13). O acompanhamento por microscopia ótica corroborou os resultados obtidos por MTT. Qualitativamente, observou-se uma relação inversamente proporcional da concentração dos extratos em relação à proliferação celular nas culturas. As culturas que receberam extratos com diluição 1/5 dos três biomateriais apresentaram células mais espaçadas e foi encontrado um número considerável de células ainda com forma arredondada, evidenciando um retardo no desenvolvimento da cultura (fig. 14).

2 dias

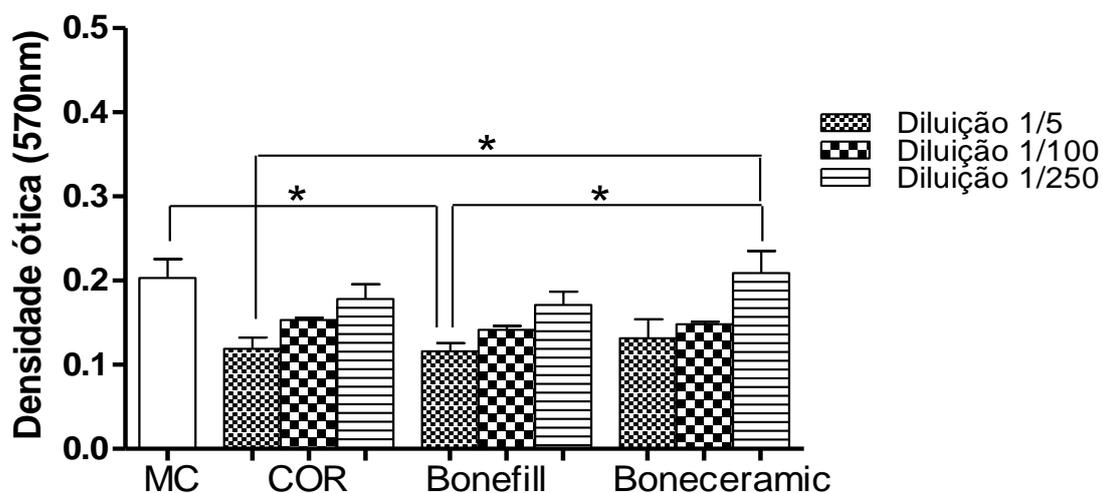


Fig. 13 – Análise da proliferação celular pelo ensaio de MTT com as culturas sob a influência dos extratos dos biomateriais COR, Bonefill e Boneceramic. As CTD foram cultivadas em placas de 96 poços na ausência ou presença dos extratos dos biomateriais, em três diluições, em triplicatas. Após 48 h de incubação, foi determinada a densidade ótica a 570 nm por espectrofotometria. Os valores representam as médias±SEM dos grupos. *P<0,05 (one-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni para comparações múltiplas).

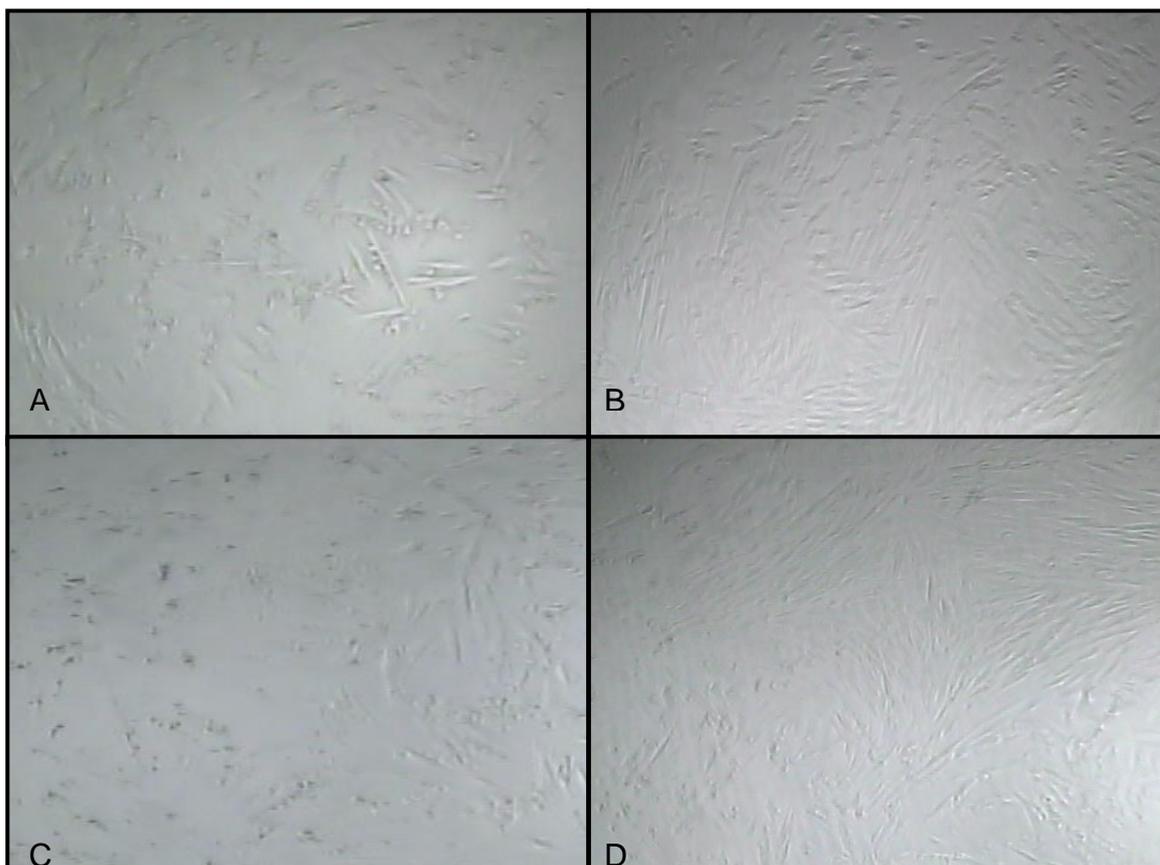


Fig. 14 – Acompanhamento da proliferação celular, com as culturas sob a influência dos extratos dos biomateriais COR, Bonfill e Bonceramic por microscopia ótica. As CTD foram cultivadas em placas de 96 poços na ausência ou presença dos extratos dos biomateriais em três diluições. Após 48 h de incubação, as culturas foram fotografadas. (A-D) Ocorreu um aumento na quantidade de células nas culturas com menor diluição em relação às com maior diluição dos extratos. (A) Cultura celular com extrato do biomaterial COR com diluição de 1/5. (B) Cultura celular com extrato do biomaterial COR com diluição de 1/250. (C) Cultura celular com extrato do biomaterial Bonceramic com diluição de 1/5. (D) Cultura celular com extrato do biomaterial Bonceramic com diluição de 1/250. Obj: 5x (A-D).

- 4 dias

Após quatro dias de cultivo, os valores de densidade ótica expressos pelas culturas foram quantificados por espectrofotometria. Os resultados apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,0009$, one-way ANOVA). Observou-se que em todos os grupos houve um incremento significativo dos níveis de densidade ótica decorrente do maior tempo de cultivo celular. Quando comparados dois a dois (teste de Bonferroni para comparações múltiplas), a diluição 1/250 do BC obteve um nítido incremento nos valores e foi estatisticamente superior ($p<0,05$) a todas as diluições de todos os materiais, incluindo as demais concentrações dele próprio (fig. 15). O acompanhamento por microscopia ótica após

quatro dias identificou em todas as culturas um incremento na quantidade de células decorrente do maior tempo de cultivo. O aspecto das células foi semelhante em todas as culturas sem apresentar alterações morfológicas perceptíveis.

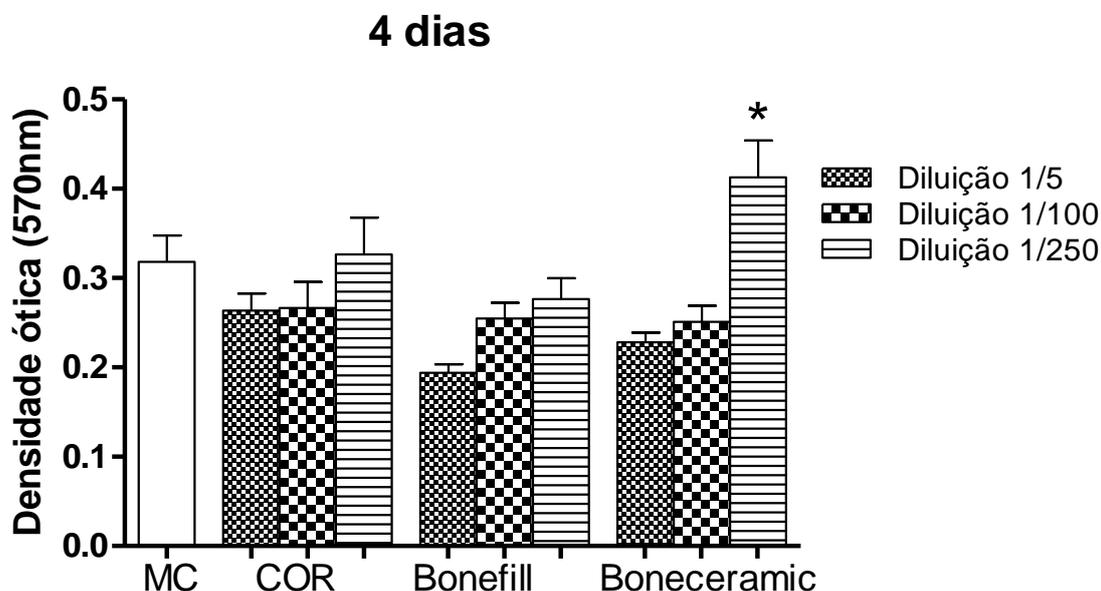


Fig. 15 – Análise da proliferação celular pelo ensaio de MTT com as culturas sob a influência dos extratos dos biomateriais COR, Bonefill e Boneceramic. As CTD foram cultivadas em placas de 96 poços na ausência ou presença dos extratos dos biomateriais, em três diluições, em triplicatas. Após quatro dias de incubação, foi determinada a densidade ótica a 570 nm por espectrofotometria. Os valores representam as médias \pm SEM dos grupos. * $P < 0,05$ em relação aos demais grupos (one-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni para comparações múltiplas).

5.2.2 Avaliação da capacidade de diferenciação osteogênica das CTD

Para verificação da capacidade de diferenciação osteogênica das CTD sob a influência dos extratos dos biomateriais, com diluição de 1/250, foi avaliada a deposição de cálcio após 21 dias de cultivo em meio osteogênico, através da marcação por alizarina vermelha. A área corada foi quantificada em %, por programa de análise de imagem, em relação à área total do poço. O grupo controle negativo (-) foi composto pela cultura convencional com meio DMEM e o controle positivo (+) pela cultura com meio de indução osteogênica, sem adição de nenhum dos extratos. A concentração dos extratos dos biomateriais escolhida para teste foi a de 1/250 devido aos melhores resultados encontrados na análise prévia de proliferação celular. Os resultados apresentaram diferença estatisticamente

significante entre os grupos testados ($p=0,0002$, one-way ANOVA). Quando comparados dois a dois (teste de Bonferroni para comparações múltiplas), o grupo controle negativo apresentou valores baixos, significativamente menores que os demais grupos ($p<0,05$), indicando que as células permaneceram indiferenciadas quando cultivadas com o meio DMEM. Os demais grupos não apresentaram diferença entre si, o que indica a ocorrência de diferenciação em todos os grupos de forma semelhante. Nenhum dos extratos dos biomateriais estimulou a deposição de cálcio, porém também não a inibiu (fig. 16).

O acompanhamento por microscopia ótica confirmou os resultados obtidos na análise com alizarina vermelha. Em todas as culturas que receberam meio osteogênico foram encontrados deposições de cálcio em tonalidade vermelha decorrente da coloração por alizarina, enquanto que no grupo controle negativo não foram encontrados depósitos de cálcio em nenhum dos poços (fig. 17).

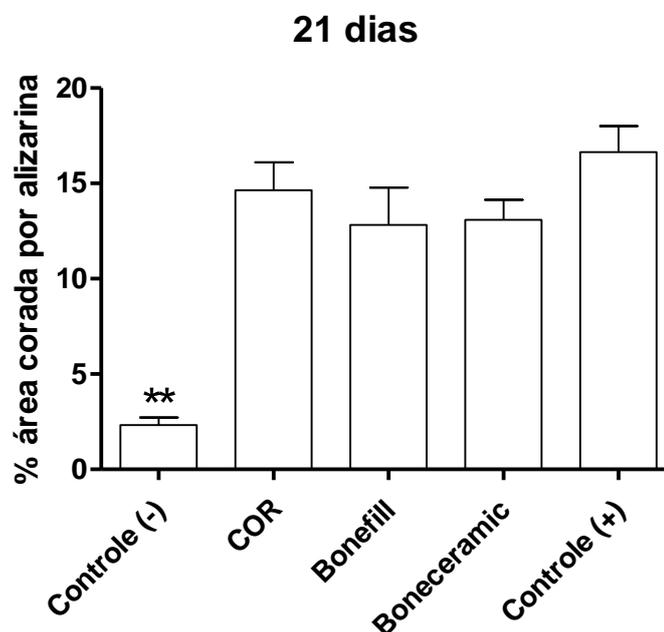


Fig. 16 – Análise da diferenciação osteogênica em culturas de CTD. As CTD foram incubadas na ausência ou presença dos extratos (diluídos em 1/250) dos biomateriais COR, Bonafill e Boneceramic, durante 21 dias em meio indutor de osteogênese. O grupo controle negativo (-) foi composto pela cultura em meio DMEM e o controle positivo (+) pela cultura em meio de indução osteogênica, sem adição de nenhum dos extratos. A % de área corada foi determinada após captura de imagem em sistema digital e quantificação pelo programa ImagePro. Os valores representam as médias \pm SEM de três determinações. ** $P<0,01$ em relação aos demais grupos (one-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni para comparações múltiplas).

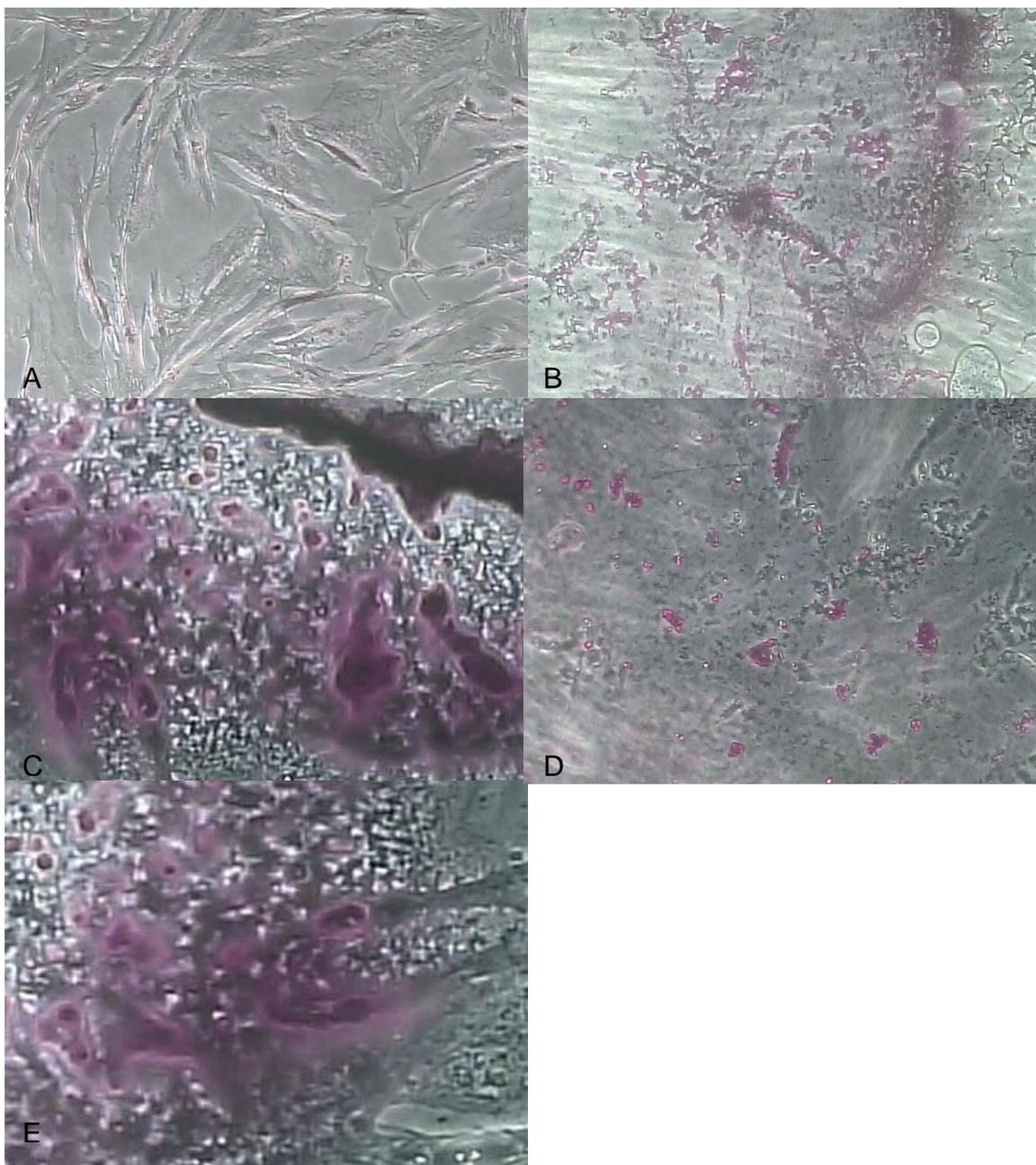


Fig. 17 – Indução da diferenciação das CTD cultivadas com meio osteogênico e extratos dos biomateriais. Análise por microscopia ótica dos depósitos de cálcio corados pela alizarina vermelha após 21 dias de cultura das CTD na ausência ou presença dos extratos dos biomateriais (1/250). (A) Controle negativo com meio DMEM, sem adição de nenhum dos extratos, sem depósitos de cálcio. (B-E) Diferenciação celular em meio de indução osteogênica, confirmada pela presença dos depósitos de cálcio. (B) Controle positivo sem adição de nenhum dos extratos. (C) Cultura na presença de extrato do biomaterial COR. (D) Cultura na presença de extrato do biomaterial Bonefill. (E) Cultura na presença de extrato do biomaterial Boneceramic. Obj: 10x (D) e 20x (A, B, C e E).

5.2.3 Análise ultra-estrutural dos biomateriais por microscopia eletrônica de varredura

A análise em microscópio eletrônico de varredura permitiu avaliar a forma, o tamanho das partículas e as características de superfície dos biomateriais testados. Para efeito comparativo, também foram realizadas análises em amostras de ossos humanos e de ratos.

- Composto ósseo de rícínus

O biomaterial COR apresentou partículas com tamanhos variados até cerca de 800 μm . A sua forma foi irregular com presença de concavidades amplas e arestas contundentes. A superfície tem aspecto não muito rugoso, com exceção das regiões em que houve fratura durante o processo de trituração (figs. 18 A e B).

- Bonefill

O biomaterial Bonefill apresentou partículas com tamanhos variados, até cerca de 1 mm. A sua forma é mais regular que os demais materiais com partículas sólidas com aspecto cilíndrico ou cúbico, sem concavidades e com extremidades arredondadas. A sua superfície foi a mais rugosa entre os materiais testados e demonstrou semelhança à superfície do osso humano (figs. 18 C e D e 19 A e B).

- Boneceramic

O biomaterial Boneceramic apresentou partículas com tamanhos variados, algumas delas maiores que 1 mm, com forma irregular e presença de concavidades amplas, arestas contundentes e grandes orifícios ocasionais. A superfície tem aspecto não muito rugoso, com exceção das regiões em que houve fratura durante o processo de trituração. O aspecto geral foi semelhante ao do material COR, porém neste não foram encontrados orifícios, enquanto que o Boneceramic apresentou orifícios (figs. 18 E e F).

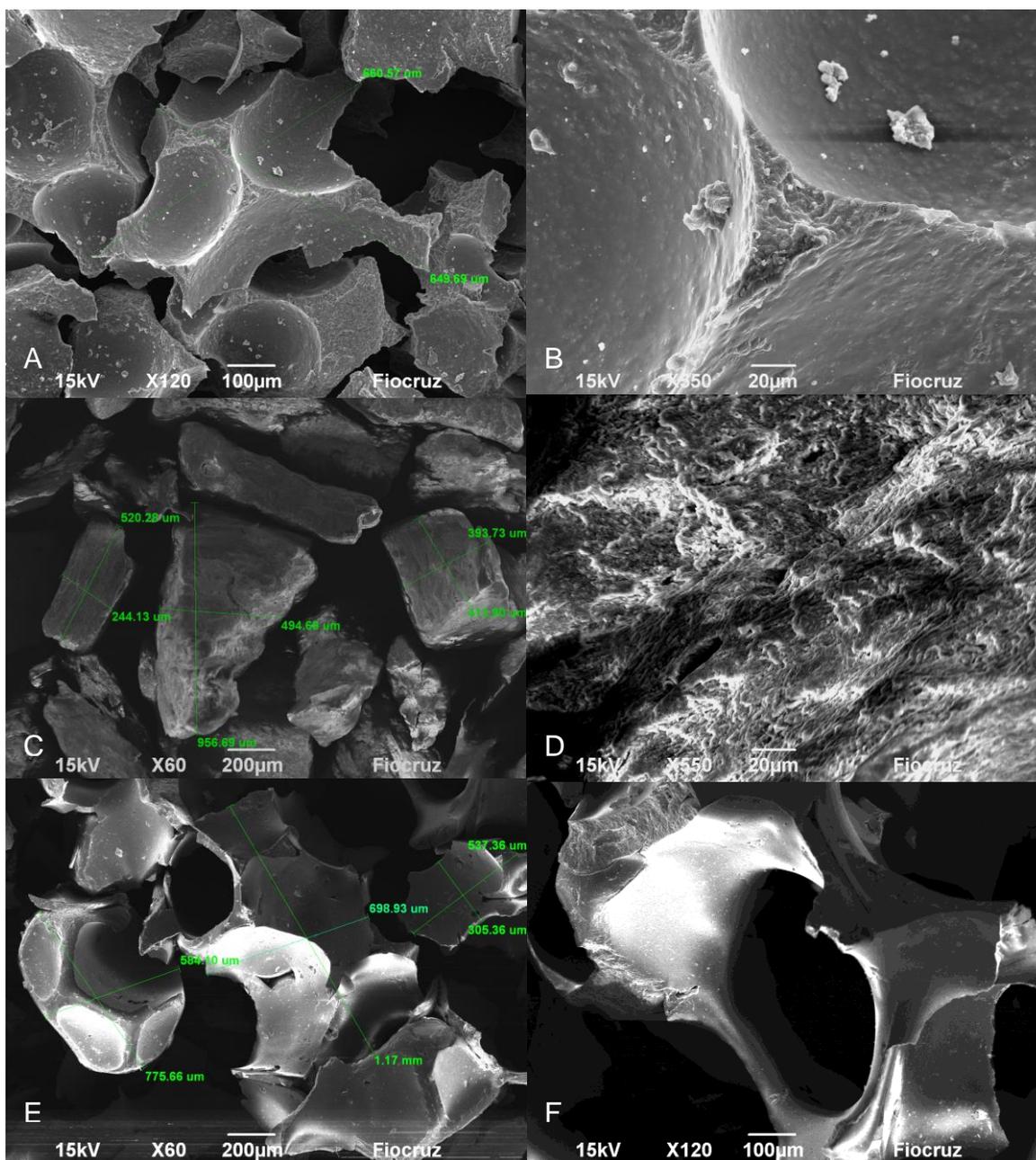


Fig. 18 – Análise ultra-estrutural dos biomateriais COR, Bonefill e Boneceramic por meio de microscopia eletrônica de varredura. (A) Partículas de diferentes tamanhos do biomaterial COR, com mensuração. (B) Detalhe da figura anterior em maior aumento evidenciando diferença de rugosidade entre a área das concavidades e área da fragmentação. (C) Partículas de diferentes tamanhos do biomaterial Bonefill, com mensuração. (D) Detalhe da figura anterior em maior aumento evidenciando superfície rugosa semelhante à osso humano. (E) Partículas de diferentes tamanhos do biomaterial Boneceramic, com mensuração. (F) Detalhe em maior aumento da figura anterior evidenciando partícula com arestas contundentes e amplo orifício.

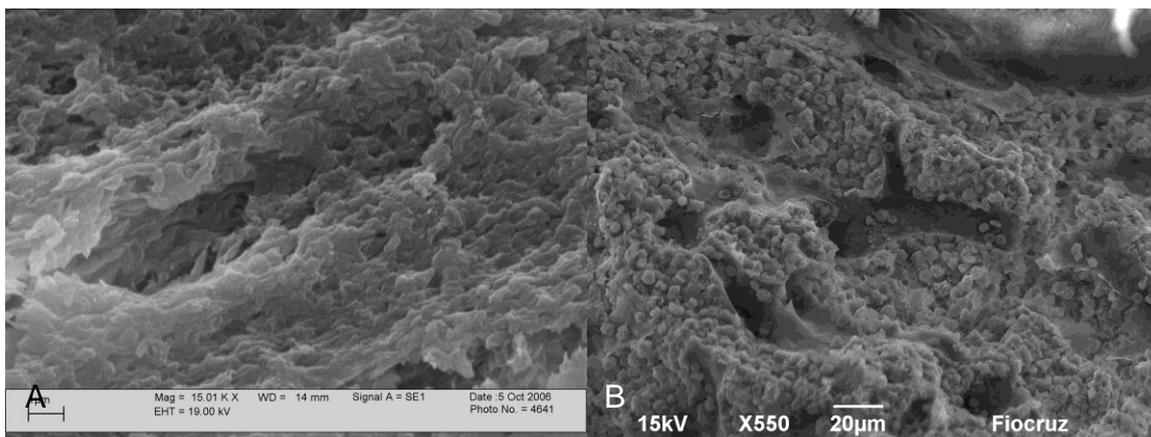


Fig. 19 – Análise ultra-estrutural de fragmentos ósseos humano e de rato por meio de microscopia eletrônica de varredura. (A) topografia da superfície de osso humano retirada mandíbula. (B) topografia da superfície de osso de rato retirado da calota craniana.

5.2.4 Análise de elementos químicos dos biomateriais por espectroscopia de dispersão de elétrons

A análise por EDS foi realizada para identificar, localizar e quantificar os elementos químicos dos biomateriais testados. Os elementos de maior interesse foram o cálcio e o fósforo.

- Composto ósseo de rícinus

A análise por EDS identificou o elemento cálcio com distribuição uniforme por todo o biomaterial avaliado. Este resultado é justificado pela adição de carbonato de cálcio à poliuretana de origem vegetal (fig. 20 e tabela 5).

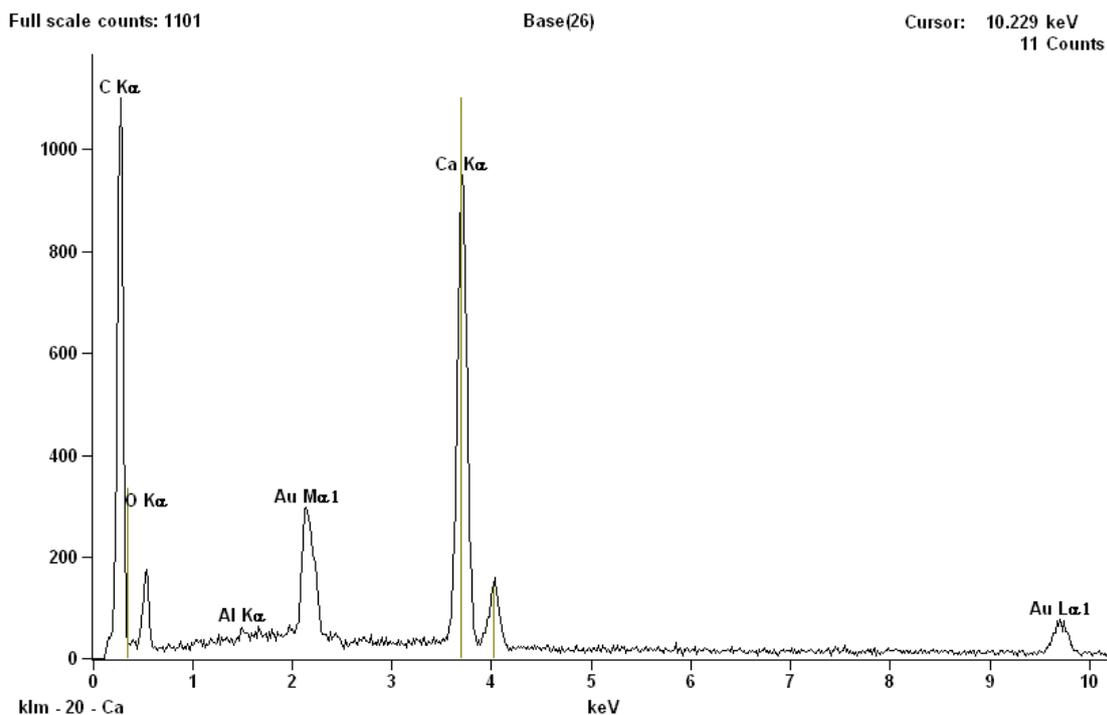


Fig. 20 – Análise dos elementos químicos presentes no biomaterial composto ósseo de rícinus por meio de análise por EDS. Identificação do elemento Ca.

Tabela 5 – Quantificação dos elementos químicos presentes no biomaterial composto ósseo de rícinus por meio de análise por EDS.

Elemento químico	Contagem	Peso %	Peso % Erro
C K	6814	23.41	+/- 0.22
O K	879	4.97	+/- 0.27
Al K	131	0.08	+/- 0.02
Ca K	11858	12.44	+/- 0.17
Au L	1780	59.11	+/- 4.85
Total		100.00	

- Bonfill

A análise por EDS identificou o cálcio e o fósforo como elementos principais, mas apresentou também pequena quantidade dos elementos sódio e magnésio, distribuídos uniformemente e com valores respectivos de 15166, 10569, 435 e 259 pontos (fig. 21 e tabela 6). A presença do sódio e do magnésio e a proporção Ca/P apresentada são características decorrentes da origem óssea animal do biomaterial.

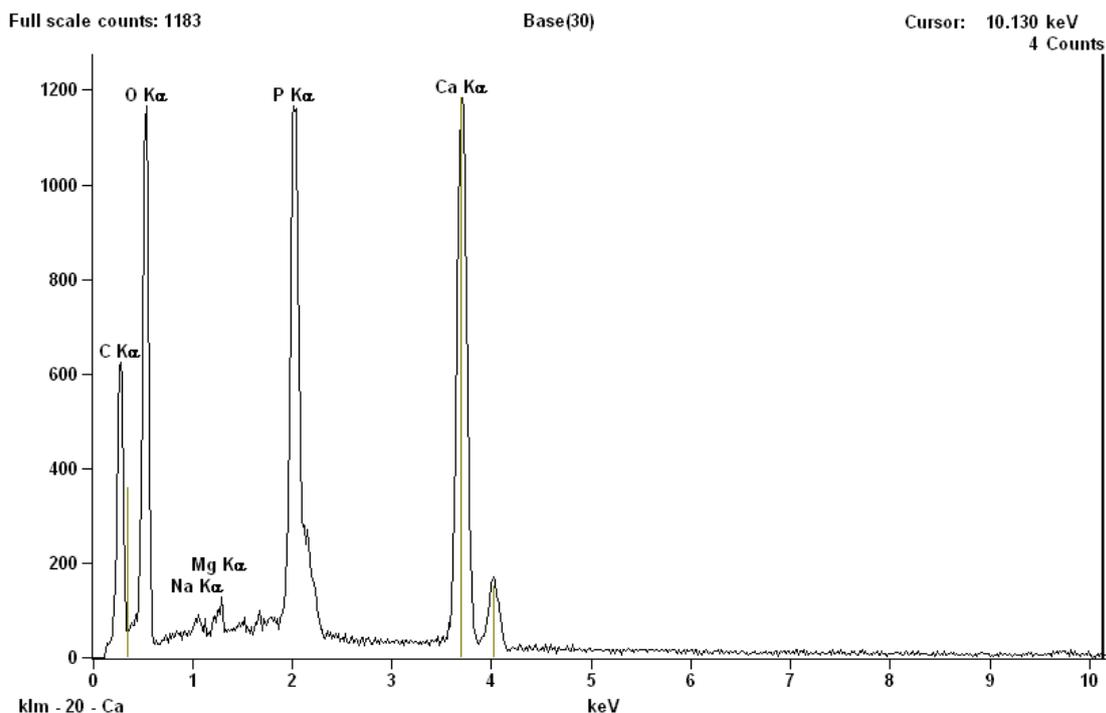


Fig. 21 – Análise dos elementos químicos presentes no biomaterial Bonafill por meio de análise por EDS. Identificação dos elementos Ca, Na, Mg e P.

Tabela 6 – Quantificação dos elementos químicos presentes no biomaterial Bonafill por meio de análise por EDS.

Elemento Químico	Contagem	Peso %	Peso % Erro
C K	3940	19.05	+/- 0.32
O K	7159	49.01	+/- 0.65
Na K	259	0.40	+/- 0.05
Mg K	435	0.48	+/- 0.04
P K	10569	8.66	+/- 0.14
Ca K	15166	22.41	+/- 0.27
Total		100.00	

- Bonoceramic

A análise por EDS demonstrou que o biomaterial apresenta o cálcio e o fosfato em sua composição, distribuídos uniformemente por todo o biomaterial testado (fig. 22 e tabela 7).

Para todos os biomateriais foi determinada a distribuição espacial dos elementos químicos (fig. 23).

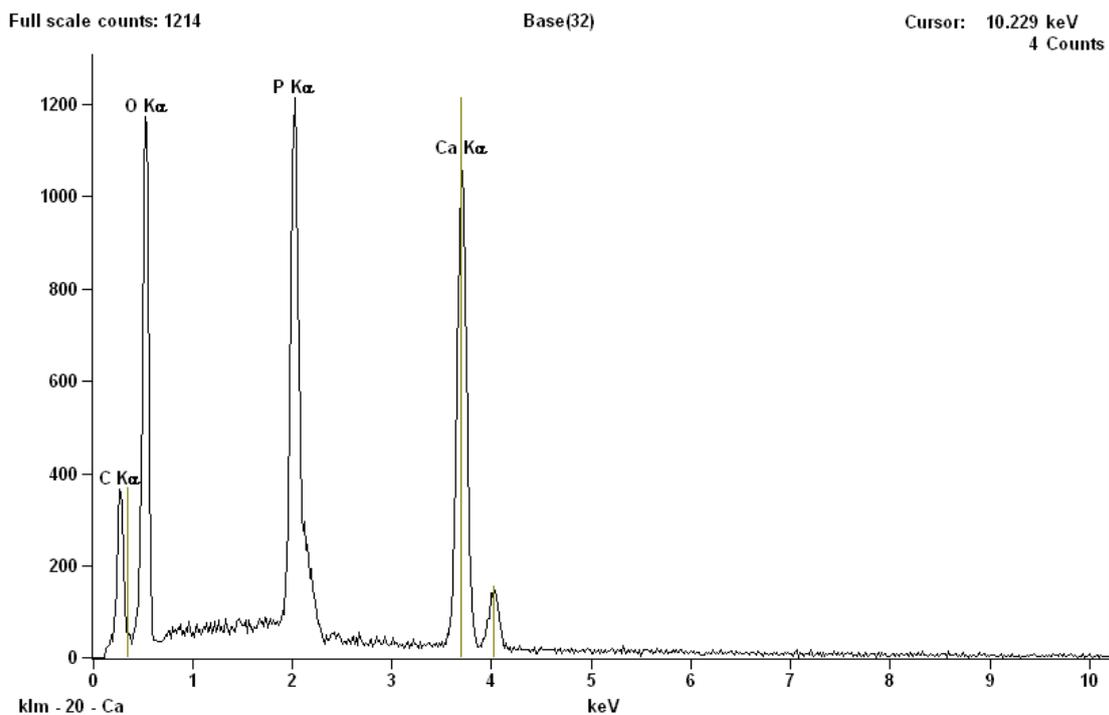


Fig. 22 – Análise dos elementos químicos presentes no biomaterial Bonoceramic por meio de análise por EDS. Identificação doselementos Ca e P.

Tabela 7 – Quantificação dos elementos químicos presentes no biomaterial Bonoceramic por meio de análise por EDS.

Elemento Químico	Contagem	Peso %	Peso % Erro
C K	2286	13.55	+/- 0.34
O K	7503	54.15	+/- 0.71
P K	10945	10.21	+/- 0.16
Ca K	13110	22.09	+/- 0.28
Total		100.00	

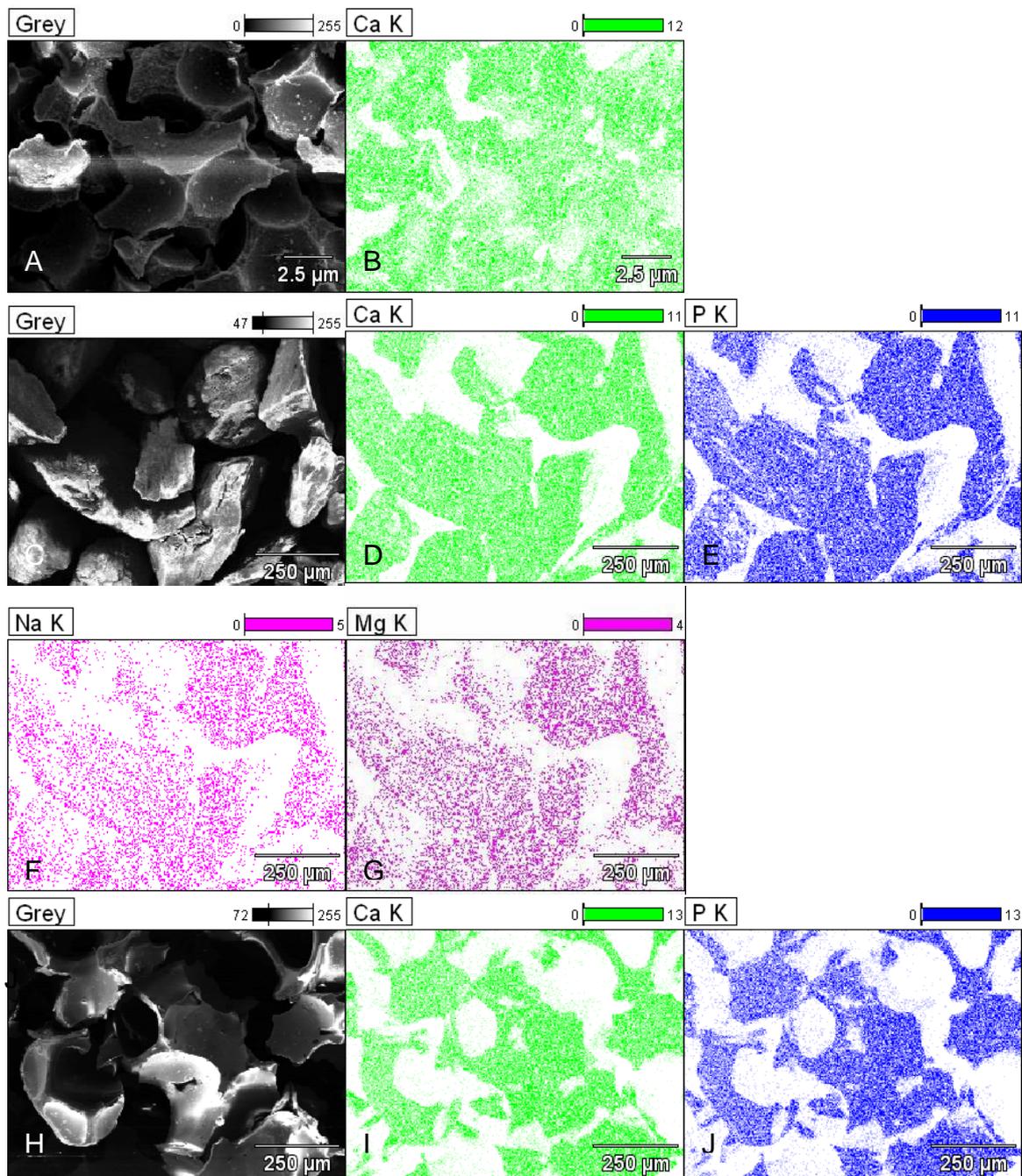


Fig. 23 – Análise por EDS dos biomateriais testados. Identificação e distribuição espacial dos elementos químicos presentes nos três biomateriais. (A) Área analisada do biomaterial COR por MEV. (B) Localização e quantificação de cálcio do biomaterial COR. (C) Área analisada do biomaterial Bonefill por MEV. (D-G) Localização e quantificação de cálcio, fosfato, sódio e magnésio do biomaterial Bonefill, respectivamente. (H) Área analisada do biomaterial Boneceramic por MEV. (I e J) Localização e quantificação de cálcio e fosfato do biomaterial Boneceramic, respectivamente.

5.3 ANÁLISE *IN VIVO* DA ASSOCIAÇÃO DO BIOMATERIAL-CTD

5.3.1 Padronização do modelo experimental

Neste estudo foram testados dois modelos experimentais de avaliação da regeneração óssea em que se fez um defeito ósseo através de brocas trefina na calota craniana e no fêmur. O modelo em calota craniana (MC) disponibilizou áreas de maior diâmetro e menor profundidade que o modelo em fêmur (MF) (fig. 24), o que permitiu a realização de defeitos críticos que não se regeneraram espontaneamente. A técnica cirúrgica mostrou-se mais complexa no MF devido ao grande volume muscular ao redor do osso femural, porém o MC apresentou maior risco de óbito ao animal por invasão da cavidade craniana pela broca trefina. Durante o período de testes um animal sofreu fratura no fêmur e teve que ser submetido à eutanásia, enquanto que os submetidos ao MC não apresentaram complicações posteriores. O pós-operatório do MC foi mais ameno. Os animais não demonstraram alteração de comportamento, enquanto que no MF ocorreu alteração na movimentação da pata operada. As suturas permaneceram mais tempo no MC. Baseando-se nas características dos modelos (tabela 8), foi selecionado o MC para a realização do estudo *in vivo*.

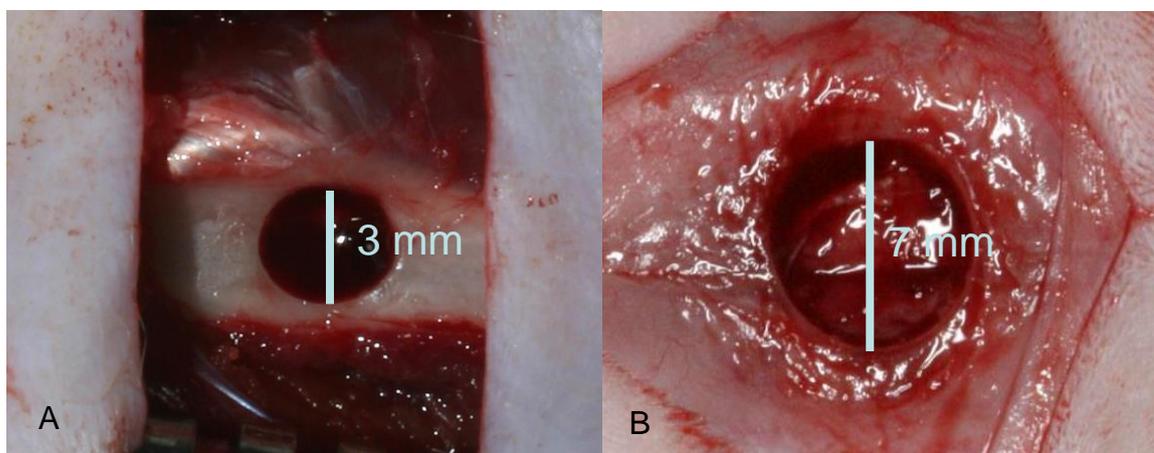


Fig. 24 - Defeitos ósseos obtidos pelos dois modelos testados. (A) Modelo em fêmur. (B) Modelo em calota craniana.

Tabela 8 – Avaliação qualitativa dos modelos cirúrgicos experimentais.

Parâmetros	Modelo de calota craniana	Modelo de fêmur
Acesso	Fácil	Intermediário, devido ao tecido muscular volumoso
Técnica cirúrgica	Delicada. Risco de penetrar na cavidade craniana	Intermediária devido ao tecido muscular volumoso
Pós-operatório	Bom, sem alteração comportamental	Regular. Animal altera movimentos
Complicações encontradas	Sem complicações	1 fratura do osso femural
Diâmetro	Até 7 mm	Até 3 mm
Regeneração	Lenta/Não espontânea	Intermediária

5.3.2 Análise macroscópica da regeneração óssea

Após a padronização do modelo experimental, três grupos de animais foram submetidos à cirurgia para realização de defeito ósseo na calota craniana que foram preenchidos por coágulo sanguíneo, por biomaterial COR ou por biomaterial COR associado à CTD. Após o sacrifício dos animais nos diferentes períodos de corte, as falhas ósseas foram observadas e fotografadas digitalmente para a avaliação visual da regeneração tecidual, incluindo análise da integridade do perióstio e do endóstio, além do registro de alterações morfológicas.

- 15 dias: análise macroscópica

Neste período foi evidenciada uma diferença entre os grupos, apesar de nenhum deles apresentar algum tipo de formação óssea visível. O grupo COR+CTD aparentemente teve melhor regeneração do perióstio e endóstio do que o grupo COR e visualmente continha uma quantidade maior de tecido, enquanto que o grupo controle (GC) apresentou a pior regeneração (fig. 25). As seis amostras GC apresentaram-se com a região do defeito bastante delgada e com o perióstio e o endóstio não formados. Quatro entre seis amostras do grupo COR+CTD

apresentaram periósteo e endósteo totalmente regenerados enquanto que no grupo COR foram duas entre seis amostras.

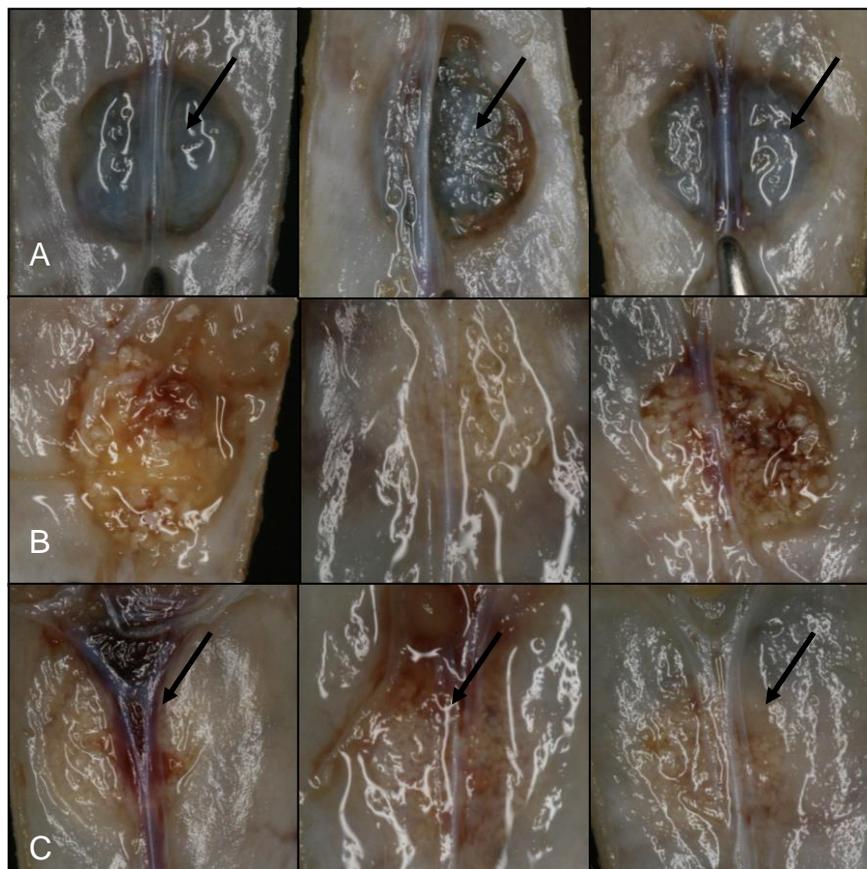


Fig. 25 – Falhas ósseas de animais sacrificados 15 dias pós-cirurgia. (A) Imagens de materiais obtidos de três animais do grupo controle, com o defeito preenchido com o coágulo sanguíneo. Tecido com pouca espessura na região do defeito (setas). (B) Imagens de materiais obtidos de três animais do grupo COR, com o defeito preenchido com 25 mg do composto ósseo de rícinus. (C) Imagens de materiais obtidos de três animais do grupo COR+CTD com o defeito preenchido com 25 mg do composto ósseo de rícinus associado a 2×10^6 CTD. Setas indicam endósteo íntegro.

- 30 dias: análise macroscópica

Neste tempo pós-cirurgia, o GC continuou com a região do defeito bastante delgada em todas as seis amostras, porém apresentou bordas irregulares não bem definidas em três delas, demonstrando algum tipo de formação de tecido aparentemente fibroso, o que pode indicar uma fase inicial de remodelação óssea. O grupo COR e o COR+CTD foram visualmente semelhantes em relação à regeneração tecidual (Fig. 26).

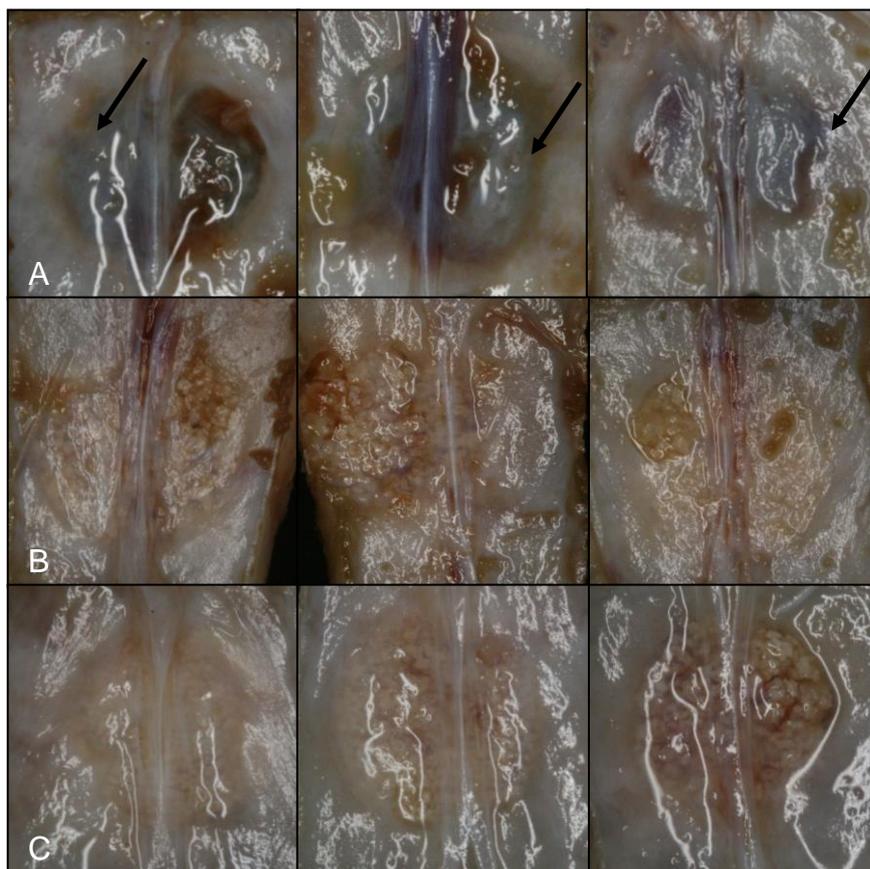


Fig. 26 – Falhas ósseas de animais sacrificados 30 dias pós-cirurgia. (A) Imagens de materiais obtidos de três animais do grupo controle, com o defeito preenchido com o coágulo sanguíneo. Presença de bordas irregulares nas três amostras (setas). (B) Imagens de materiais obtidos de três animais do grupo COR, com o defeito preenchido com 25 mg do composto ósseo de rícino. (C) Imagens de materiais obtidos de três animais do grupo COR+CTD com o defeito preenchido com 25 mg do composto ósseo de rícino associado a 2×10^6 CTD.

- 60 dias: análise macroscópica

Neste tempo pós-cirurgia, o GC apresentou amostras com leve incremento nas bordas, porém em uma das seis amostras aparentemente ocorreu um ponto de calcificação localizado próximo à borda esquerda do defeito. O grupo COR e o COR+CTD foram visualmente semelhantes. Ambos apresentaram as seis amostras com bordas com maior formação de tecido que o grupo controle (fig. 27).

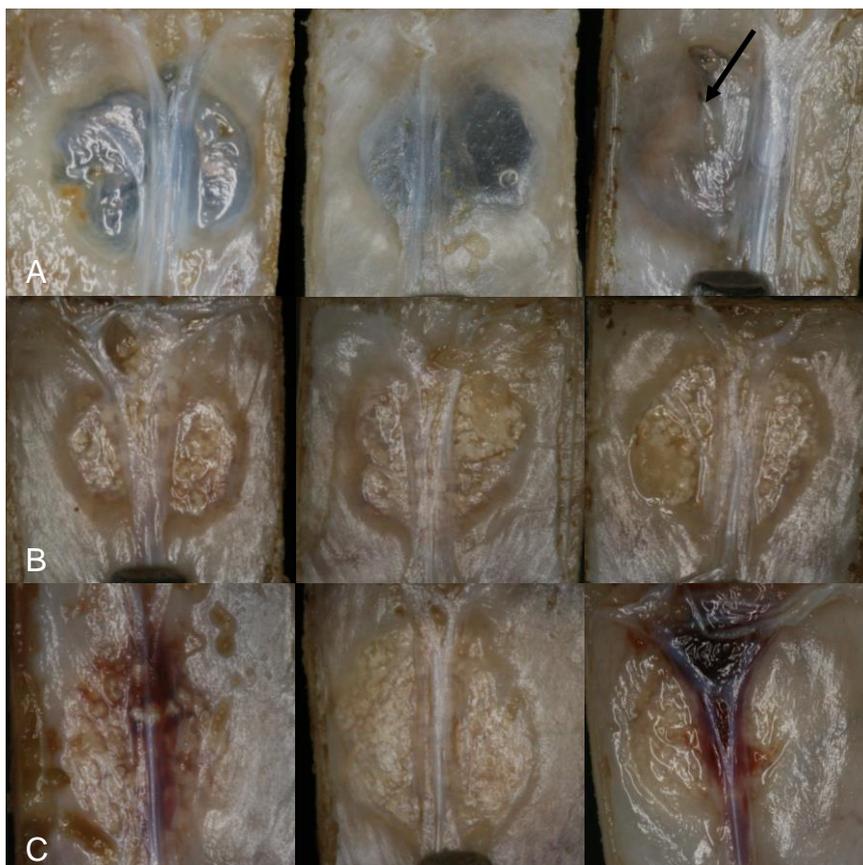


Fig. 27 – Falhas ósseas de animais sacrificados 60 dias pós-cirurgia. (A) Imagens de materiais obtidos de três animais do grupo controle, com o defeito preenchido com o coágulo sanguíneo. Presença de formação tecidual semelhante a osso na amostra da direita (seta). (B) Imagens de materiais obtidos de três animais do grupo COR, com o defeito preenchido com 25 mg do composto ósseo de rícinus. Bordas com maior incremento que nos tempos anteriores. (C) Grupo COR+CTD com o defeito preenchido com 25 mg do composto ósseo de rícinus associado a 2×10^6 CTD. Bordas com maior incremento que nos tempos anteriores.

5.3.3 Avaliação da radiopacidade tecidual por meio de radiografias digitais

Foram analisados e comparados a média dos níveis de cinza e o coeficiente de variação em radiografias digitais obtidas dos grupos nos diferentes períodos de avaliação (fig. 28). Para excluir a possibilidade de que a simples presença do biomaterial na região do defeito tenha influência sobre os resultados foram realizadas radiografias digitais somente do biomaterial, seguindo o mesmo protocolo de técnica. Os resultados demonstraram não haver interferência do biomaterial na radiopacidade das amostras (dados não publicados).

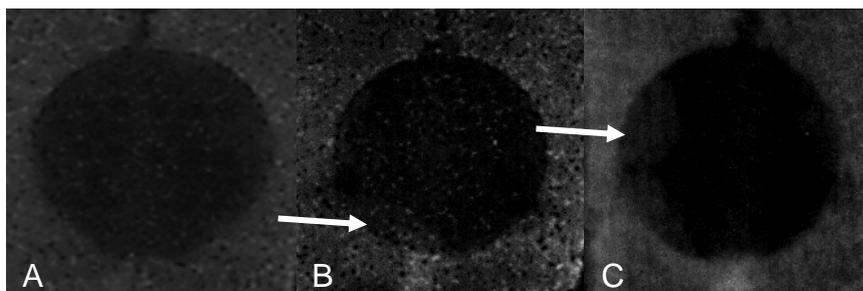


Fig. 28 - Análise radiográfica para quantificação da radiopacidade tecidual 15 dias pós-cirurgia. Áreas radiopacas indicam provável tecido calcificado (setas brancas). (A) Amostra do grupo controle. (B) Amostra grupo COR. (C) Amostra do grupo COR+CTD.

- 15 dias: análise dos níveis de cinza (NC)

Comparando-se a média dos NC dos defeitos dos grupos controle com o grupo COR e com o grupo COR+CTD, 15 dias após as cirurgias, observa-se que ocorreu uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,0003$, one-Way ANOVA) entre os três grupos (fig. 29). O resultado do grupo controle demonstrou não ter nenhuma diferença nos NC da área do defeito para a área de controle individual em qualquer uma das seis amostras, caracterizando uma ausência de radiopacidade do tecido. O grupo COR+CTD obteve maiores diferenças nos NC do que o grupo COR, além de ter resultados positivos em todas as seis amostras. No grupo COR em metade das seis amostras não ocorreu diferença entre os NC da área do defeito para o controle individual. Este resultado evidencia uma maior radiopacidade do grupo COR+CTD em relação ao grupo COR, o que poderia indicar maior deposição de tecido mineralizado. As diferenças entre as médias foram avaliadas usando-se os testes de Bonferroni para análises múltiplas e a análise de variância (one-way ANOVA), tendo-se adotado o valor de p como estatisticamente significativo quando menor que 0,05 ($p<0,05$).

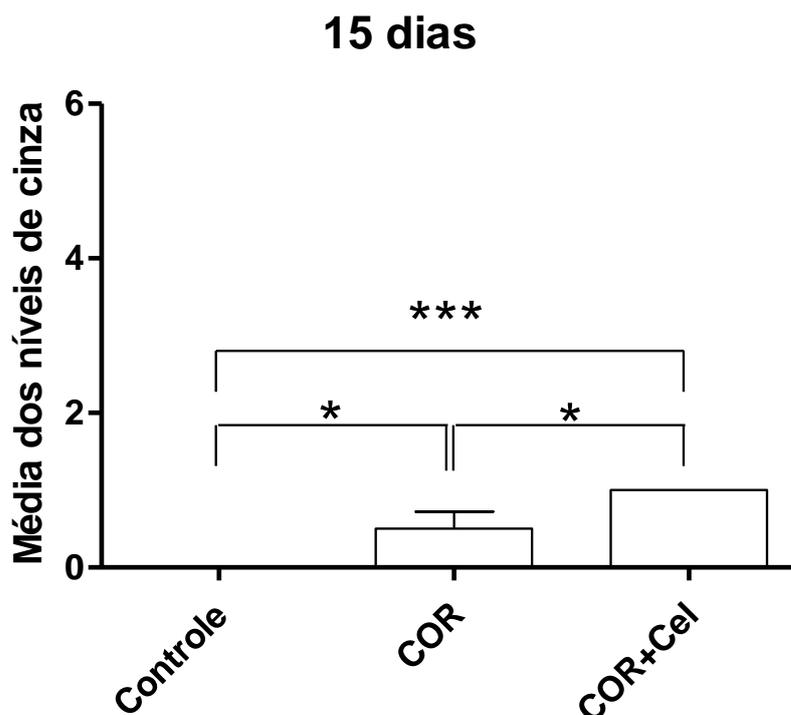


Fig. 29 – Análise da radiopacidade em animais sacrificados 15 dias pós-cirurgia por meio da quantificação dos níveis de cinza. Representação gráfica dos níveis de cinza da região dos defeitos ósseos dos três grupos experimentais: grupo controle com o defeito preenchido com o coágulo sanguíneo, grupo COR com 25 mg do composto ósseo de rícinus e o grupo COR+CTD com 25 mg do composto ósseo de rícinus associado a 2×10^6 CTD. Os valores representam as médias \pm SEM de 6 animais por grupo. * $P < 0,05$ e *** $P < 0,001$ (one-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni para comparações múltiplas).

- 15 dias: análise do coeficiente de variação (CV)

A análise do CV entre os grupos avaliados aos 15 dias pós-cirurgia demonstrou que existiu diferença estatisticamente significativa ($p = 0,0001$, one-way ANOVA) quando foram comparados os três grupos entre si (fig. 30). Valores mais altos do CV indicam uma maior heterogeneidade da radiopacidade do tecido analisado, ou seja, existem pontos pertencentes à mesma amostra com maiores diferenças nos níveis de cinza entre si. Esses pontos podem representar nódulos de calcificação. O grupo COR+CTD obteve os maiores valores, seguido pelo grupo COR e pelo grupo controle. Este resultado pode indicar um início do processo de regeneração óssea precoce no grupo COR+CTD.

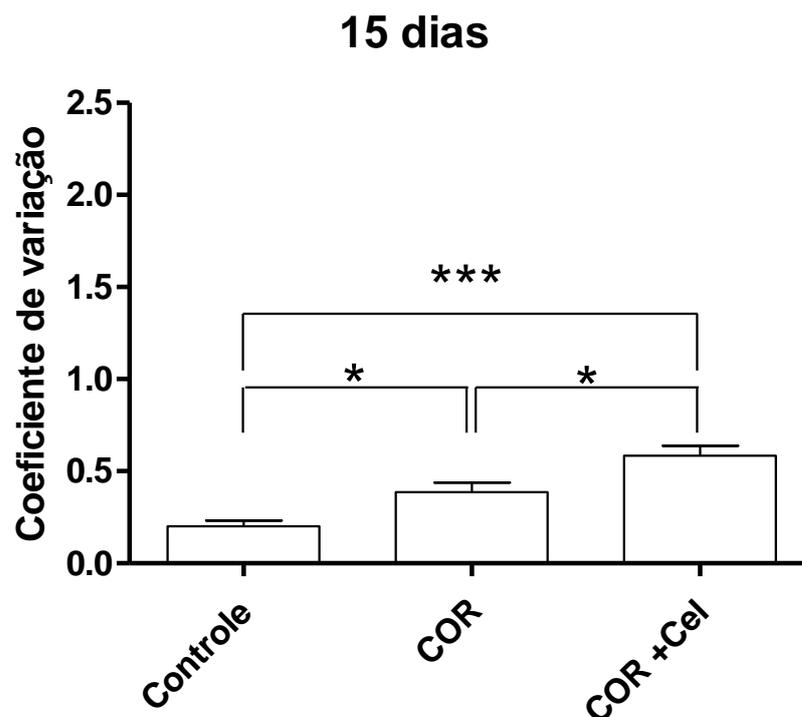


Fig. 30 – Análise da radiopacidade em animais sacrificados 15 dias pós-cirurgia por meio do coeficiente de variação. Representação gráfica do coeficiente de variação da região dos defeitos ósseos dos três grupos experimentais: grupo controle com o defeito preenchido com o coágulo sanguíneo, grupo COR com 25 mg do composto ósseo de rícínus e o grupo COR+Cel com 25 mg do composto ósseo de rícínus associado a 2×10^6 CTD. Os valores representam as médias \pm SEM de 6 animais por grupo. * $P < 0,05$ e *** $P < 0,001$ (one-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni para comparações múltiplas).

- 30 dias: análise dos níveis de cinza (NC)

Houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,0073$, one-way ANOVA) entre os grupos avaliados aos 30 dias pós-cirurgia (fig. 31). Quando comparados dois a dois (teste de Bonferroni para comparações múltiplas), ocorreu diferença entre o grupo controle e os demais ($p < 0,05$), porém entre os grupos COR e o grupo COR+CTD não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$). Ocorreu um maior incremento na radiopacidade do grupo COR, que teve os valores equiparados ao grupo COR+CTD. O grupo controle, embora com valores bem abaixo dos demais, já demonstrou sinais de radiopacidade e possível formação inicial de tecido.

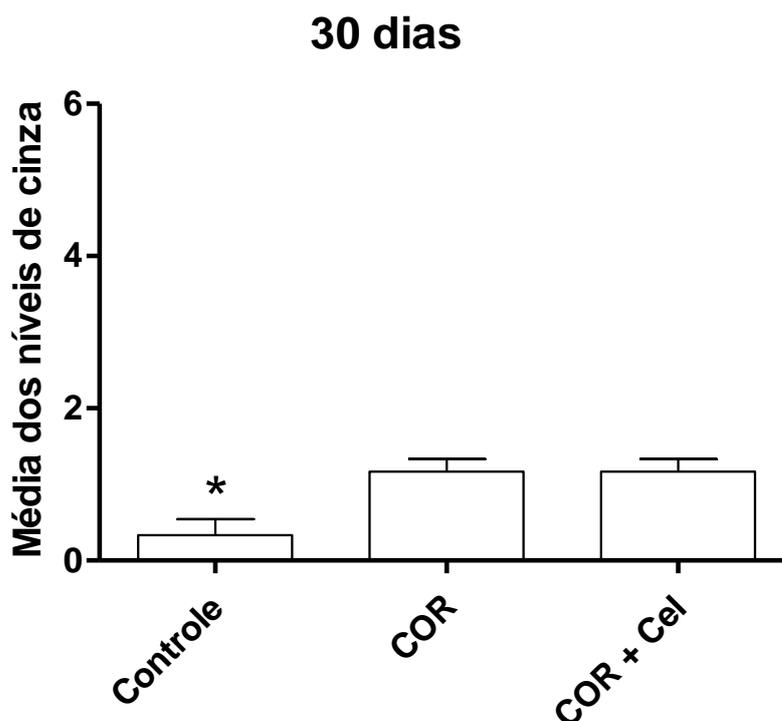


Fig. 31 – Análise da radiopacidade em animais sacrificados 30 dias pós-cirurgia por meio da quantificação dos níveis de cinza. Representação gráfica dos níveis de cinza da região dos defeitos ósseos dos três grupos experimentais: grupo controle com o defeito preenchido com o coágulo sanguíneo, grupo COR com 25 mg do composto ósseo de rícinus e o grupo COR+CTD com 25 mg do composto ósseo de rícinus associado a 2×10^6 CTD. Os valores representam as médias \pm SEM de 6 animais por grupo. Diferença estatisticamente significativa * $P < 0,05$ em relação aos demais grupos (one-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni para comparações múltiplas).

- 30 dias: análise do coeficiente de variação (CV)

A análise do CV entre os grupos avaliados aos 30 dias pós-cirurgia demonstrou que existiu diferença estatística ($p=0,0048$, one-Way ANOVA) entre os grupos (fig. 32). Quando comparados dois a dois (teste de Bonferroni para comparações múltiplas), ocorreu diferença entre o grupo controle e os demais ($p < 0,05$), porém entre os grupos COR e COR+CTD não houve diferença significativa ($p > 0,05$). O grupo COR+CTD manteve valor semelhante à avaliação aos 15 dias e ocorreu um aumento do CV no grupo COR, equiparando-o ao grupo COR+CTD. No grupo controle também ocorreu um aumento, mas seus valores continuaram mais baixos que os demais.

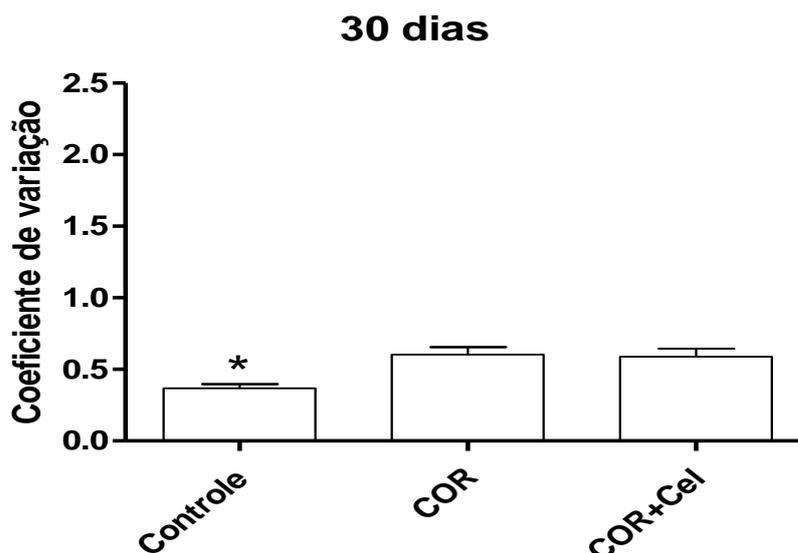


Fig. 32 – Análise da radiopacidade em animais sacrificados 30 dias pós-cirurgia por meio do coeficiente de variação. Representação gráfica do coeficiente de variação da região dos defeitos ósseos dos três grupos experimentais: grupo controle com o defeito preenchido com o coágulo sanguíneo, grupo COR com 25 mg do composto ósseo de rícinus e o grupo COR+CTD com 25 mg do composto ósseo de rícinus associado a 2×10^6 CTD. Os valores representam as médias \pm SEM de 6 animais por grupo. Diferença estatisticamente significativa ($*P < 0,05$) do grupo controle para os demais (one-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni para comparações múltiplas).

- 60 dias: análise dos níveis de cinza (NC)

Na avaliação aos 60 dias pós-cirurgia houve diferença estatisticamente significativa ($p = 0,0001$, one-way ANOVA) entre as médias dos NC dos grupos (fig. 33). Quando comparados dois a dois (teste de Bonferroni para comparações múltiplas), ocorreu diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e os demais ($p < 0,05$), porém entre os grupos COR e COR+CTD não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$). Com o transcorrer deste período mais longo ocorreu um aumento proporcional da radiopacidade nos três grupos, o que pode significar que as áreas dos defeitos tiveram acréscimo na quantidade de tecido e/ou na sua densidade.

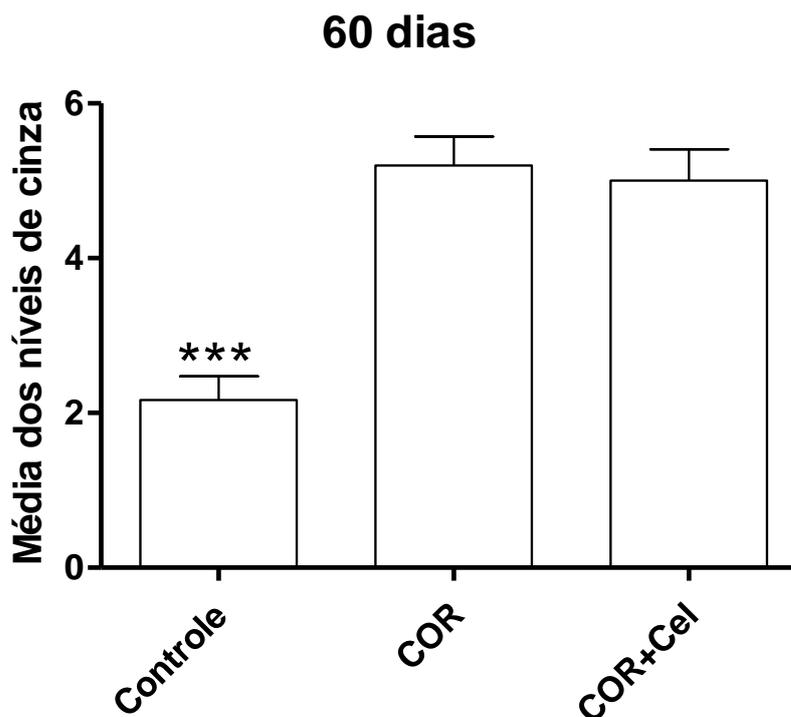


Fig. 33 – Análise da radiopacidade em animais sacrificados 60 dias pós-cirurgia por meio da quantificação dos níveis de cinza. Representação gráfica dos níveis de cinza da região dos defeitos ósseos dos três grupos experimentais: grupo controle com o defeito preenchido com o coágulo sanguíneo, grupo COR com 25 mg do composto ósseo de rícinus e o grupo COR+CTD com 25 mg do composto ósseo de rícinus associado a 2×10^6 CTD. Os valores representam as médias \pm SEM de $n=6$ para o grupo controle, $n=7$ para o grupo COR e $n=5$ para o grupo COR+CTD. $P < 0,001$ em relação aos demais grupos (one-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni para comparações múltiplas).

- 60 dias: análise do coeficiente de variação (CV)

A análise do CV entre os grupos avaliados aos 60 dias pós-cirurgia demonstrou que existiu diferença estatística ($p=0,0051$, one-way ANOVA) entre os grupos (fig. 34). Quando comparados dois a dois (teste de Bonferroni para comparações múltiplas), ocorreu diferença entre o grupo controle e o grupo COR+CTD ($p < 0,05$), porém entre os grupos COR e COR+CTD e entre o grupo controle e o grupo COR não houve diferença significativa ($p > 0,05$). Foi evidente um aumento do CV em todos os grupos decorrente do tempo maior de regeneração. O grupo COR+CTD obteve o maior incremento.

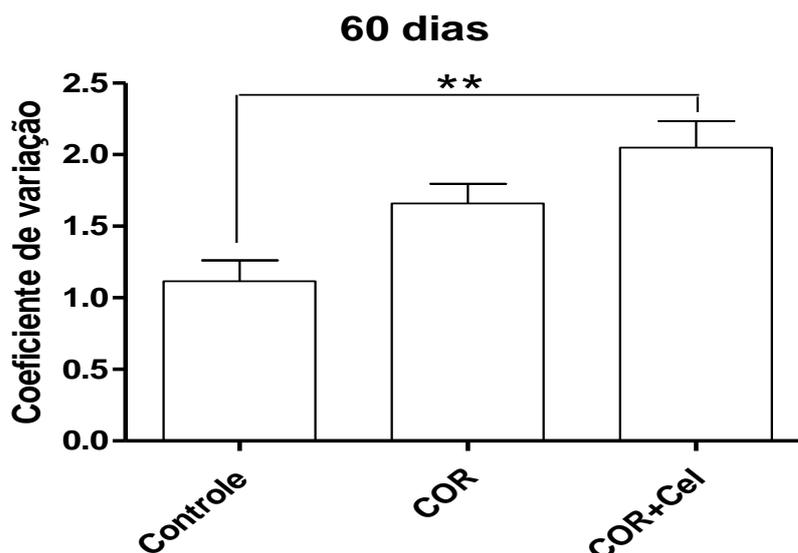


Fig. 34 – Análise da radiopacidade em animais sacrificados 60 dias pós-cirurgia por meio do coeficiente de variação. Representação gráfica do coeficiente de variação da região dos defeitos ósseos dos três grupos experimentais: grupo controle com o defeito preenchido com o coágulo sanguíneo; grupo COR com 25 mg do composto ósseo de rícino e o grupo COR+CTD com 25 mg do composto ósseo de rícino associado a 2×10^6 CTD. Os valores representam as médias \pm SEM de $n=6$ para o grupo controle, $n=7$ para o grupo COR e $n=5$ para o grupo COR+CTD. $**P<0,01$ (one-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni para comparações múltiplas).

5.3.4 Análise histológica por microscopia ótica

A análise por microscopia ótica dos cortes histológicos corados por H&E permitiu avaliar a biocompatibilidade do material enxertado e a ação do mesmo e das CTD na regeneração óssea, verificando a presença de células inflamatórias, quantidade de fibras colágenas, interface de contato biomaterial/tecido e neoformação óssea.

- Grupo controle

No momento da cirurgia os defeitos ósseos criados nos animais deste grupo foram preenchidos por coágulo sanguíneo. Em todos os períodos estudados ocorreu uma acentuada diminuição da espessura da região do defeito em direção ao endóstio. O defeito foi preenchido por tecido conjuntivo fibroso, com presença de células fusiformes dispostas horizontalmente, que evoluiu de frouxo aos 15 dias para denso aos 60 dias. Após 15 dias as bordas se apresentavam sem formação

óssea, com presença de ângulos vivos, decorrentes da cirurgia realizada, porém foi observado que nas avaliações após 30 e 60 dias as bordas já exibiam um arredondamento (fig. 35 A) e alguns pequenos prolongamentos (fig. 35 B) de osso neoformado nas quais percebe-se a diferença de maturação da matriz do osso residual mais escuro para o tecido neoformado mais claro. Estes tecidos normalmente são separados entre si por uma linha de reversão, que delimita a mudança na direção de deposição mineral óssea, que se apresenta horizontal, no osso residual, e muda para vertical ou difusa, no osso neoformado (fig. 35 B). Foram encontrados vasos sanguíneos próximos às bordas dos defeitos em todos os períodos (fig. 35 C), porém em maior número após 60 dias. Neste último período já foram encontrados vasos ocasionais dispersos pelo centro do defeito (fig. 35 D). Em relação à regeneração óssea, mesmo no maior período de tempo, foi evidenciado que o defeito realmente foi crítico e que não se regeneraria espontaneamente, porém foram encontrados dois fragmentos ósseos em duas das amostras do período após 60 dias. Um deles, de maior tamanho sem relação com a borda (fig. 35 E) e o outro de tamanho reduzido, próximo à borda (fig. 35 F). O fragmento maior já apresentava aspecto de maturação com deposição mineral elevada e presença de osteócitos no centro do mesmo. A maturação do fragmento apresentava diferentes graus, indicando que a área estava em desenvolvimento. Cogita-se a possibilidade de ter sido um fragmento residual da cirurgia de criação do defeito ósseo. Em nenhum dos períodos foram encontrados sinais significativos de inflamação crônica ou aguda decorrente do trauma cirúrgico.

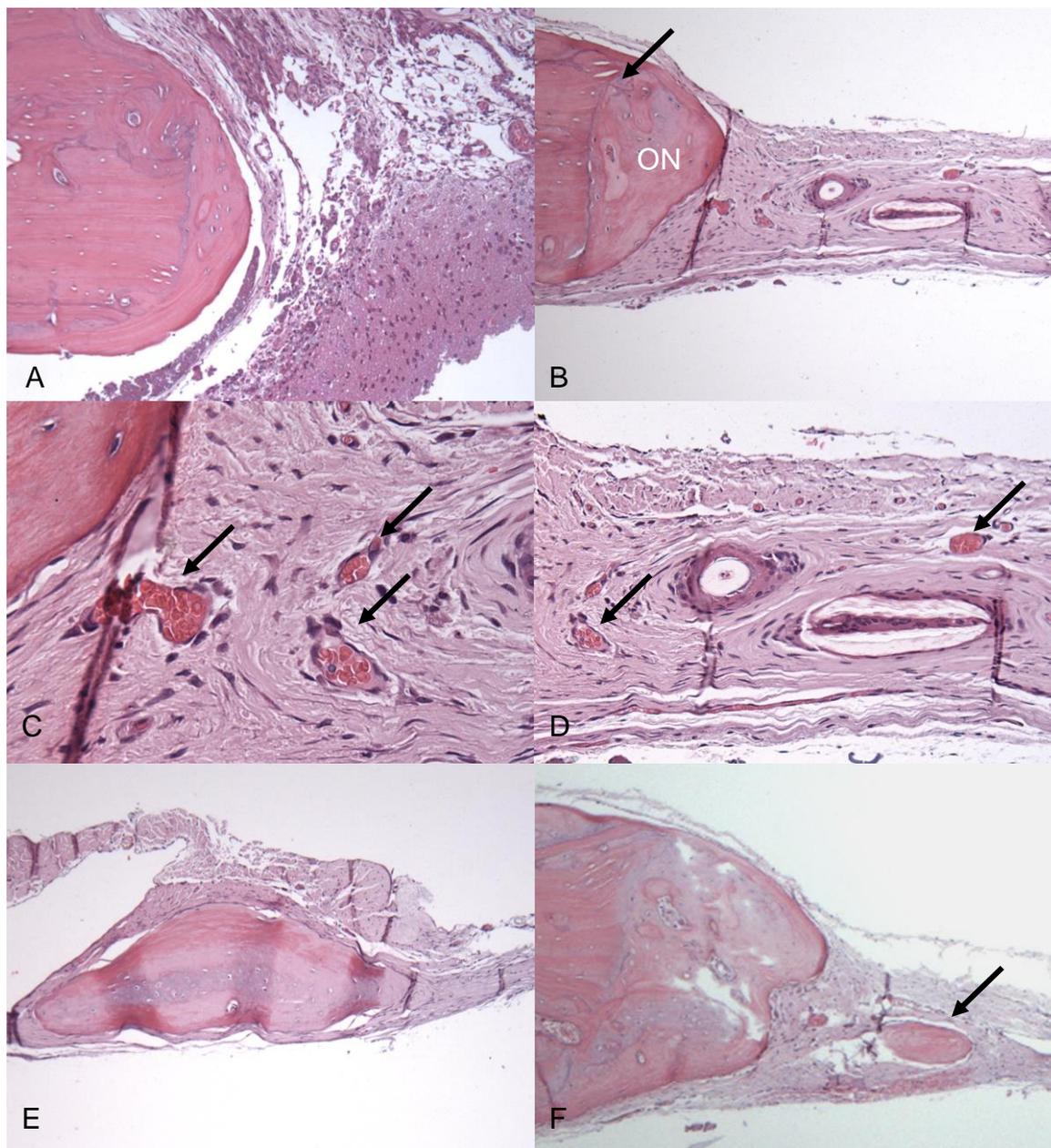


Fig. 35 – Análise histológica do grupo controle por meio de microscopia ótica. Os defeitos ósseos criados foram preenchidos com coágulo sanguíneo. (A) Borda da lesão com aspecto arredondado. Secção obtida de animal sacrificado 15 dias após cirurgia. (B) Borda da lesão com aspecto proeminente devido à neoformação óssea (ON), evidenciada pelo tom mais claro e presença de linha de reversão (seta). Secção obtida de animal sacrificado 60 dias após cirurgia. Aumento de 10x. (C) Vasos sanguíneos próximos à borda da lesão (setas). Secção obtida de animal sacrificado 15 dias após cirurgia. (D) Vasos sanguíneos no centro da lesão (setas). Secção obtida de animal sacrificado 60 dias após cirurgia, mesma amostra da imagem B. (E) Tecido ósseo encontrado no centro da lesão, com diferentes graus de maturação e presença de osteócitos em seu interior. Animal sacrificado 60 dias após cirurgia. (F) Tecido ósseo de pequeno tamanho (seta), próximo à borda da lesão. Região do defeito com pouca espessura de tecido conjuntivo. Secção obtida de animal sacrificado 60 dias após cirurgia. Obj: 10x (B e E), 20x (A e F), 40x (D) e 60x (C).

- Grupo COR

Em todos os animais que receberam o biomaterial foi possível identificar a presença das partículas do mesmo distribuídas uniformemente por todo o defeito, apesar de não terem sido efetivamente corados pela H&E. Não foram observados sinais de degradação das partículas em nenhum dos tempos estudados e a presença do biomaterial manteve a espessura do defeito criado (fig. 36 A). As partículas apresentaram variação de tamanho e aspecto irregular com presença de arestas. Estas arestas, ocasionalmente, aparentam dificultar o contato do tecido conjuntivo com a superfície do material (fig. 36 B). O espaço entre as partículas foi preenchido basicamente por tecido conjuntivo fibroso. Em contato com as suas superfícies foi observada uma camada de células com morfologia variada e de difícil identificação dos tipos celulares. Foram encontradas algumas células gigantes multinucleadas isoladas em contato com algumas das partículas, porém não foi encontrado infiltrado inflamatório, indicando biocompatibilidade do material. Em relação à regeneração óssea, foram encontradas áreas ossificadas ocasionais, em amostras do grupo após 30 e 60 dias (figs. 36 C e D). Nestas áreas em regeneração é possível identificar uma camada de osteoblastos ao seu redor e osteócitos no seu interior, indicando desenvolvimento das mesmas. Em todos os períodos foram encontrados vasos distribuídos por todo o defeito, em maior quantidade no período após 60 dias. As bordas, com o decorrer do tempo, passaram de um aspecto angulado para arredondado e posteriormente apresentaram prolongamentos com tamanhos variados, porém maiores que no grupo controle (fig. 36 E). No grupo após 60 dias foi encontrada a osseointegração de partículas do biomaterial por tecido ósseo neoformado (fig. 36 F). Pode-se visualizar tecido mineralizado em íntimo contato com as partículas do biomaterial.

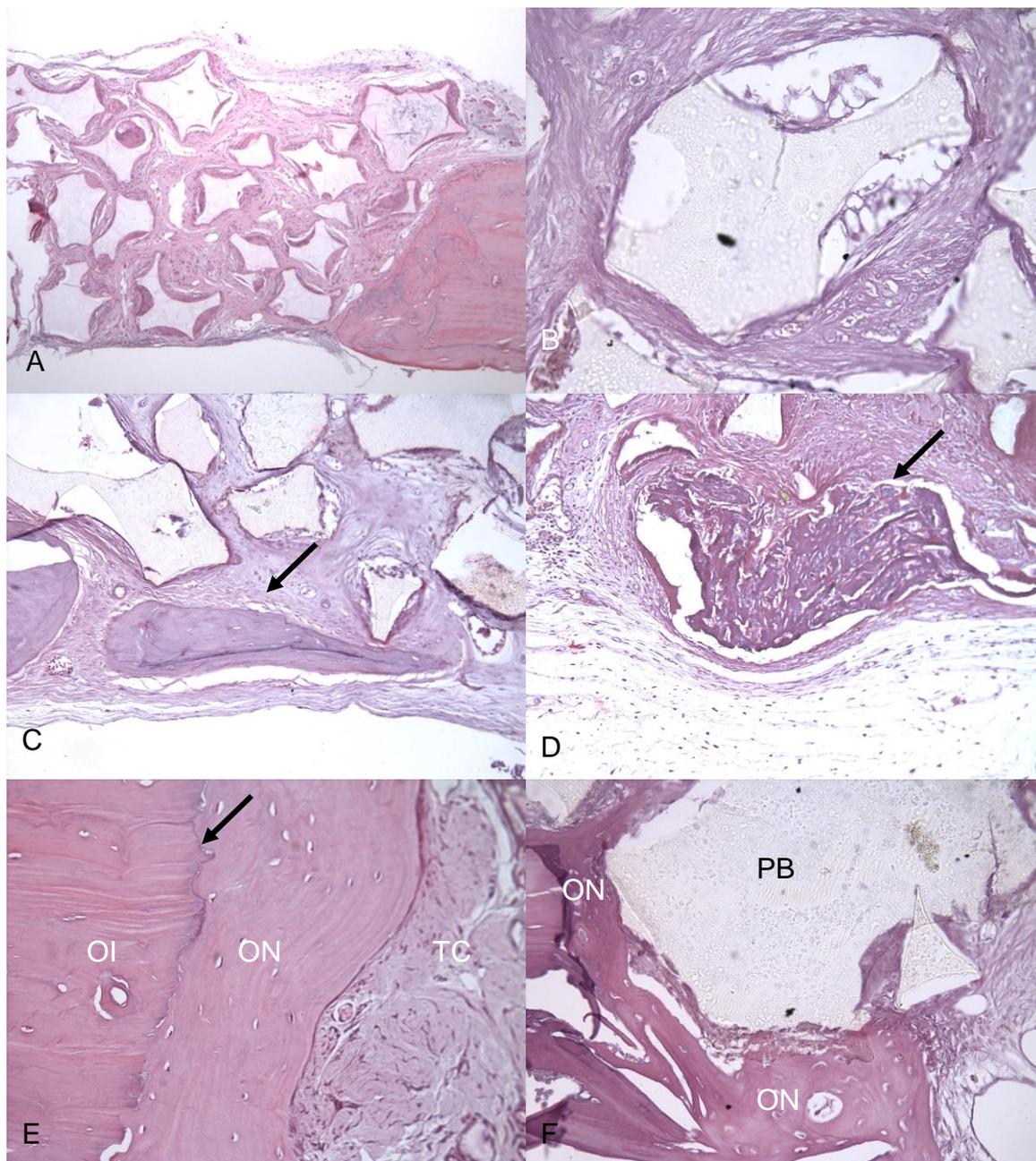


Fig. 36 – Análise histológica do grupo COR por microscopia ótica. Os defeitos foram preenchidos com 25 mg do biomaterial COR. (A) Manutenção da anatomia prévia ao defeito. Secção obtida de animal sacrificado 30 dias após cirurgia. (B) Partícula do biomaterial com arestas contundentes evitando o contato do tecido com a superfície do material. Secção obtida de animal sacrificado 60 dias após cirurgia. (C) Presença de ponto de calcificação próximo à borda (seta). Secção obtida de animal sacrificado 30 dias após cirurgia. (D) Presença de ponto de calcificação no centro da lesão (seta). Secção obtida de animal sacrificado 60 dias após cirurgia. (E) Região com três tipos de tecido: borda residual de tecido ósseo íntegro (OI) e tecido ósseo neoformado (ON), separados por linha de reversão (seta), evidenciada pela diferença de tonalidade e de deposição mineral, e tecido conjuntivo não mineralizado (TC). Presença de osteócitos no interior do tecido ósseo neoformado. Animal sacrificado 60 dias após cirurgia. (F) Indício de osseointegração de partículas do biomaterial (PB) ao osso neoformado. (ON) Secção obtida de animal sacrificado 60 dias após cirurgia. Obj: 10x (A), 40x (C, D e E) e 60x (B e F).

- Grupo COR+CTD

As características deste grupo foram bastante semelhantes às do grupo COR, porém foram encontradas algumas áreas ossificadas com maior tamanho e aspecto de maturação, além do fato das mesmas terem sido identificadas desde o período após 15 dias (figs. 37 A-D). Também foram encontradas neoformações ósseas nas bordas das lesões (fig. 37 E). Nos dois grupos foi possível relacionar as áreas ossificadas com a proximidade de um maior número de vasos e com um maior calibre dos mesmos. Acompanhando-se a evolução dos períodos estudados, percebe-se que a regeneração óssea nos dois grupos com biomaterial se limitou a áreas ocasionais, de tamanho não representativo em relação à extensão total da área do defeito, e que a maioria das partículas estava ainda envolta por tecido conjuntivo fibroso (figs. 36 A, C e D e 37 A, C, D e F). Isto é um indicativo de que a regeneração ainda estava em uma fase inicial e que seria necessário um tempo maior para confirmar se ocorreria a regeneração do defeito criado.

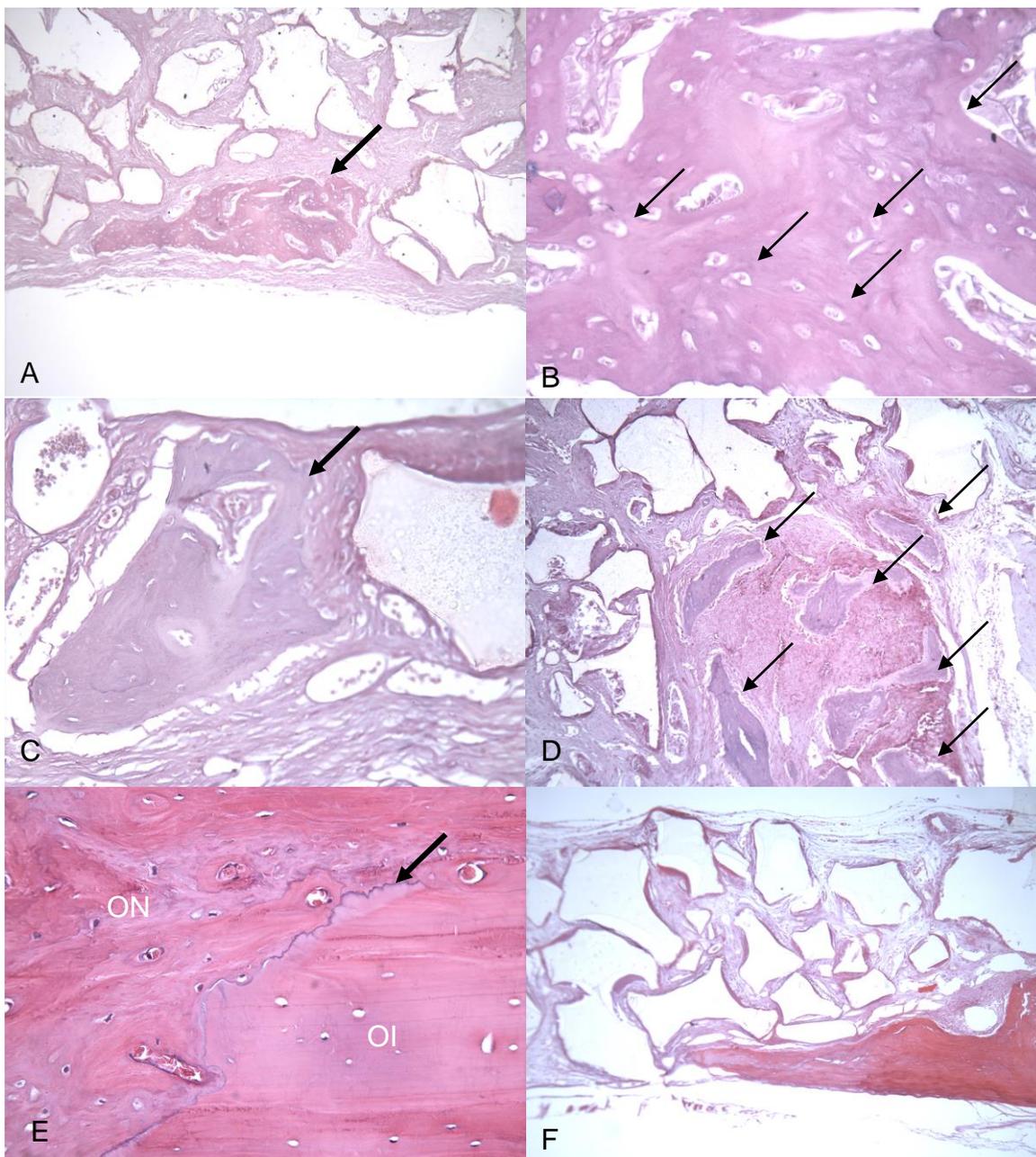


Fig. 37 – Análise histológica do grupo COR+CTD por meio de microscopia ótica. Os defeitos ósseos criados foram preenchidos com 25 mg do biomaterial composto ósseo de rícinus associado a 2×10^6 CTD. (A) Área de calcificação no centro da lesão (seta). Animal sacrificado 15 dias após cirurgia. (B) Detalhe em maior aumento da figura anterior evidenciando aspecto de maturação do tecido, com a presença de grande número de osteócitos (setas). (C) Presença de área de calcificação de grande tamanho (seta). Secção obtida de animal sacrificado 60 dias após cirurgia. (D) Região com múltiplas áreas individuais de calcificação (setas) separadas entre si. Animal sacrificado 30 dias após cirurgia. (E) Tecido ósseo neoformado (ON) maturado contínuo à borda da lesão, evidenciado pela tonalidade, diferença de deposição para o tecido ósseo íntegro (OI) e presença de linha de reversão (seta). Secção obtida de animal sacrificado 60 dias após cirurgia. (F) Longo prolongamento de tecido ósseo a partir de uma borda. Secção obtida de animal sacrificado após 30 dias. Obj: 10x (F), 20x (A e D), 40x (C e E) e 60x (B).

5.3.5 Análise ultra-estrutural por microscopia eletrônica de varredura

A análise em microscópio eletrônico de varredura permitiu avaliar e comparar qualitativamente a micro-arquitetura das regiões em regeneração, identificando a presença de pontos de calcificação, de vasos e a relação de contato biomaterial/tecido neoformado. As análises foram feitas no grupo de animais com tempo de sacrifício de 60 dias pós-cirurgia por representar o maior período de reparo ósseo estudado. Também foram realizadas análises em amostras com osso íntegro.

- Grupo controle (GC)

O GC apresentou tecido com pouca espessura em toda a extensão do defeito (figs. 38 A e B). Na maioria das bordas dos defeitos ocorreu somente um arredondamento, com pouco tecido neoformado, denotando uma remodelação óssea adaptativa ao trauma cirúrgico (fig. 38 C). Contudo, algumas das bordas apresentaram um processo inicial de neoformação óssea, evidenciada pela diferença no sentido de deposição do tecido neoformado em relação ao tecido sadio remanescente (fig. 38 D). Foram encontrados vasos sanguíneos ocasionais próximos às bordas das lesões. As amostras apresentaram tecido com aspecto fibroso caracterizando a não regeneração tecidual (fig. 38 E), porém em uma das seis amostras foi encontrado um ponto com aspecto de maturação óssea na região central do defeito sem comunicação com a borda (fig. 38 F). Cogita-se a possibilidade de ter sido um fragmento residual da cirurgia de criação do defeito ósseo. Esta foi a mesma amostra em que foi identificado o ponto de calcificação por análise macroscópica e por microscopia ótica.

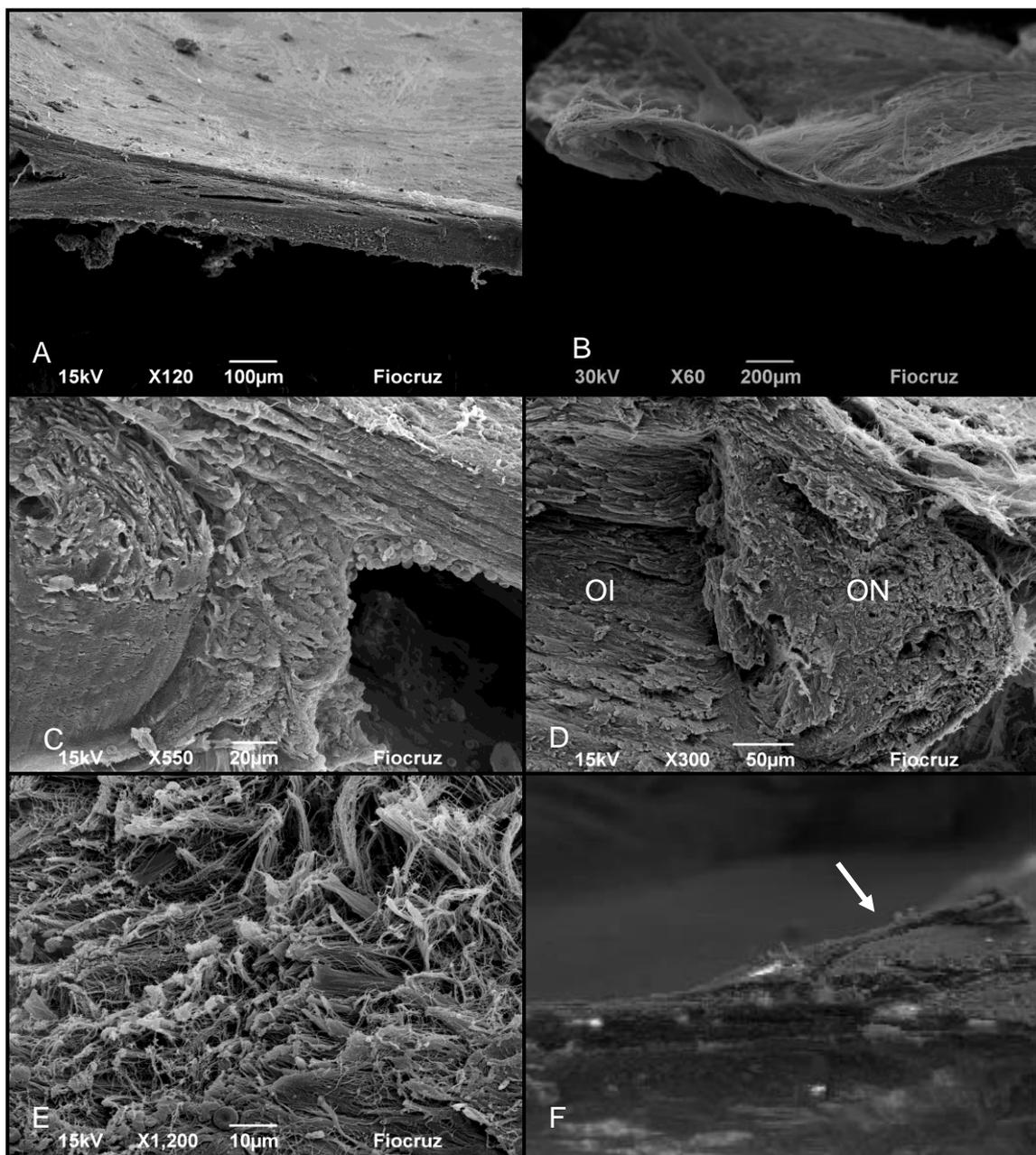


Fig. 38 – Análise ultra-estrutural do grupo controle, 60 dias pós-cirurgia, por meio de microscopia eletrônica de varredura. Os defeitos ósseos criados foram preenchidos com coágulo sanguíneo. (A e B) detalhes da pequena espessura na região do defeito ósseo em duas amostras, em diferentes aumentos. (C) Borda de lesão com aspecto arredondado, sem identificação de neoformação óssea. (D) Borda de lesão com osso neoformado (ON), evidenciado pela diferença no sentido de deposição óssea em relação ao osso íntegro (OI) remanescente. (E) Aspecto fibroso do tecido no centro do defeito ósseo. (F) Calcificação encontrada em uma das amostras (seta).

- Grupo COR

A presença do biomaterial mostrou-se útil como arcabouço, preenchendo a região do defeito, mantendo a sua espessura e exercendo papel de suporte mecânico (fig. 39 A). Percebe-se que existem regiões em que as fibras se agrupam em feixes que, com o transcorrer do tempo, poderiam evoluir para tecido ósseo (fig. 39 B). Foram encontrados vasos sanguíneos ocasionais espalhados pela região do defeito evidenciando a vascularização (figs. 39 C e D). Foram encontrados pontos de ossificação com maior maturação próximos às partículas do material enxertado (fig. 39 E). A localização destes pontos não estava necessariamente relacionada com a proximidade com as bordas. A maior parte de tecido neoformado apresentava aspecto fibroso e os pontos de regeneração não tinham contato entre si, indicando que seria necessário um tempo maior para uma regeneração total. O material não demonstrou ter sofrido alteração da sua forma após contato com o tecido por 60 dias, pois o seu aspecto foi semelhante ao aspecto do material seco não aplicado (fig. 39 F). As partículas mantiveram o mesmo tamanho e as suas arestas continuaram contundentes. A presença destas arestas aparenta dificultar um total contato da superfície do material com o tecido neoformado. Percebe-se que as fibras ocasionalmente ficam em contato somente com as arestas (figs. 40 A e B).

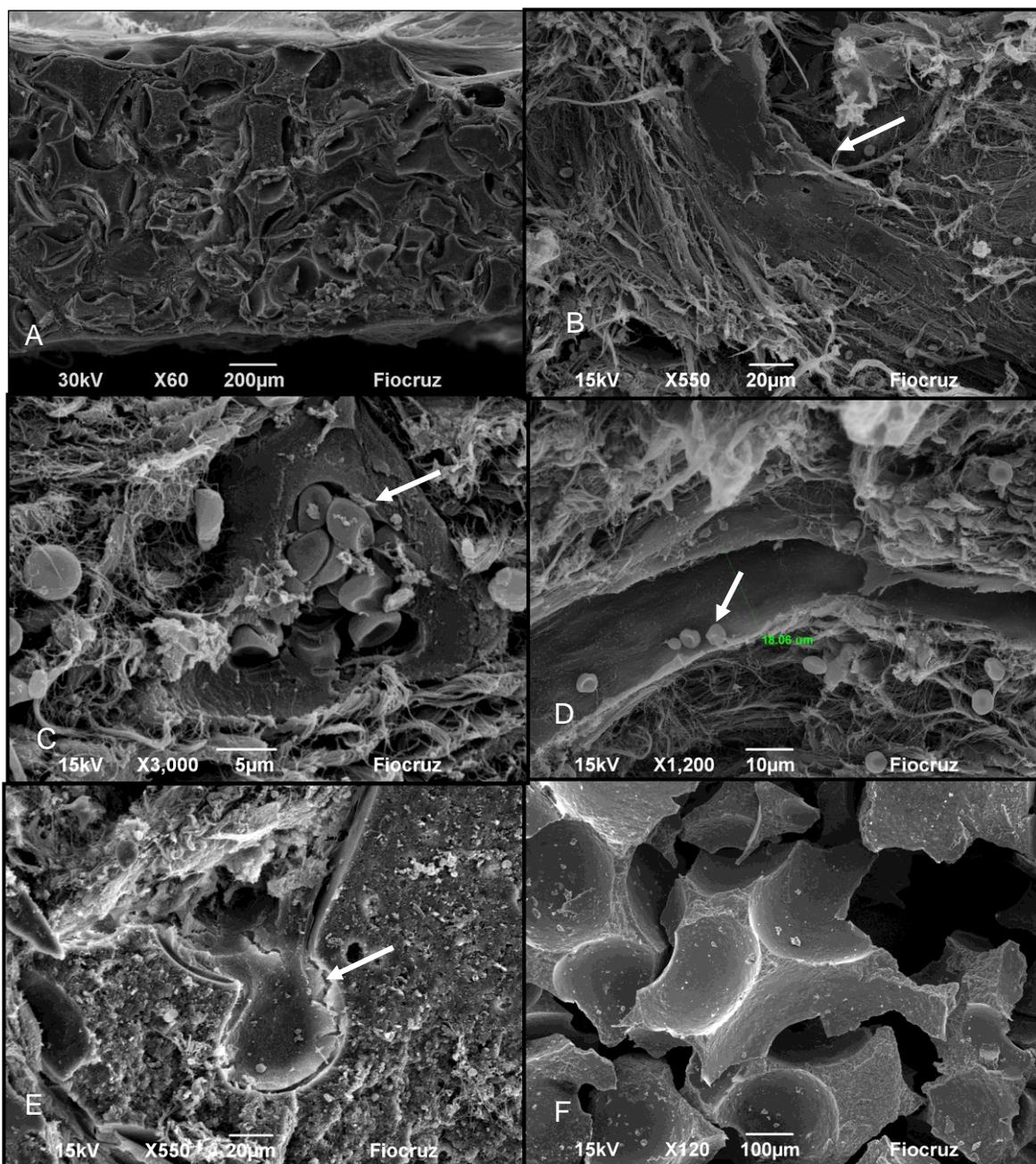


Fig. 39 – Análise ultra-estrutural do grupo COR, 60 dias pós-cirurgia, por meio de microscopia eletrônica de varredura. Os defeitos ósseos criados foram preenchidos com 25 mg do biomaterial composto ósseo de rícinus. (A) Visão da espessura do defeito ósseo, evidenciando a função de preenchimento mecânico do biomaterial. (B) Agrupamento das fibras neoformadas em feixes (seta). (C) Corte transversal de vaso sanguíneo, com presença de hemácias (seta), evidenciando vascularização, mas com tecido circundante ainda não calcificado. (D) Corte longitudinal de vaso sanguíneo mensurado, com presença de hemácias (seta), evidenciando vascularização, mas com tecido circundante ainda não calcificado. (E) Presença de ponto de calcificação em contato com superfície do biomaterial (seta). (F) Biomaterial COR antes da aplicação, evidenciando quantidade de arestas.

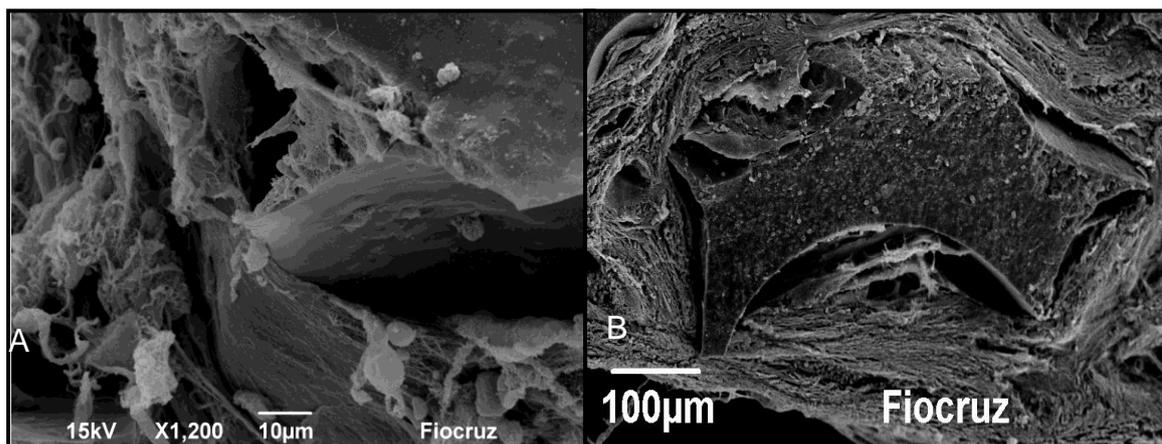


Fig. 40 – Análise ultra-estrutural do grupo COR, 60 dias pós-cirurgia, por meio de microscopia eletrônica de varredura. Os defeitos ósseos criados foram preenchidos com 25 mg do biomaterial composto ósseo de rícinus. (A e B) Relação de contato das fibras neoformadas com as arestas do material (setas).

- Grupo COR+CTD

As características relacionadas à presença do material se repetiram no grupo COR+CTD. Também foram encontradas formações de feixes de fibras, que indicam futura calcificação, mas ocorreram pontos de ossificação com maior tamanho e aspecto de maturação (figs. 41 A-D) do que no grupo COR. Contudo, da mesma forma que no grupo COR, a maior parte do tecido neoformado apresentava aspecto fibroso e a regeneração do defeito ainda estava em um estágio inicial. Foram encontrados vasos sanguíneos calibrosos e em maior número próximos às regiões de ossificação (figs. 41 A, B, E e F).

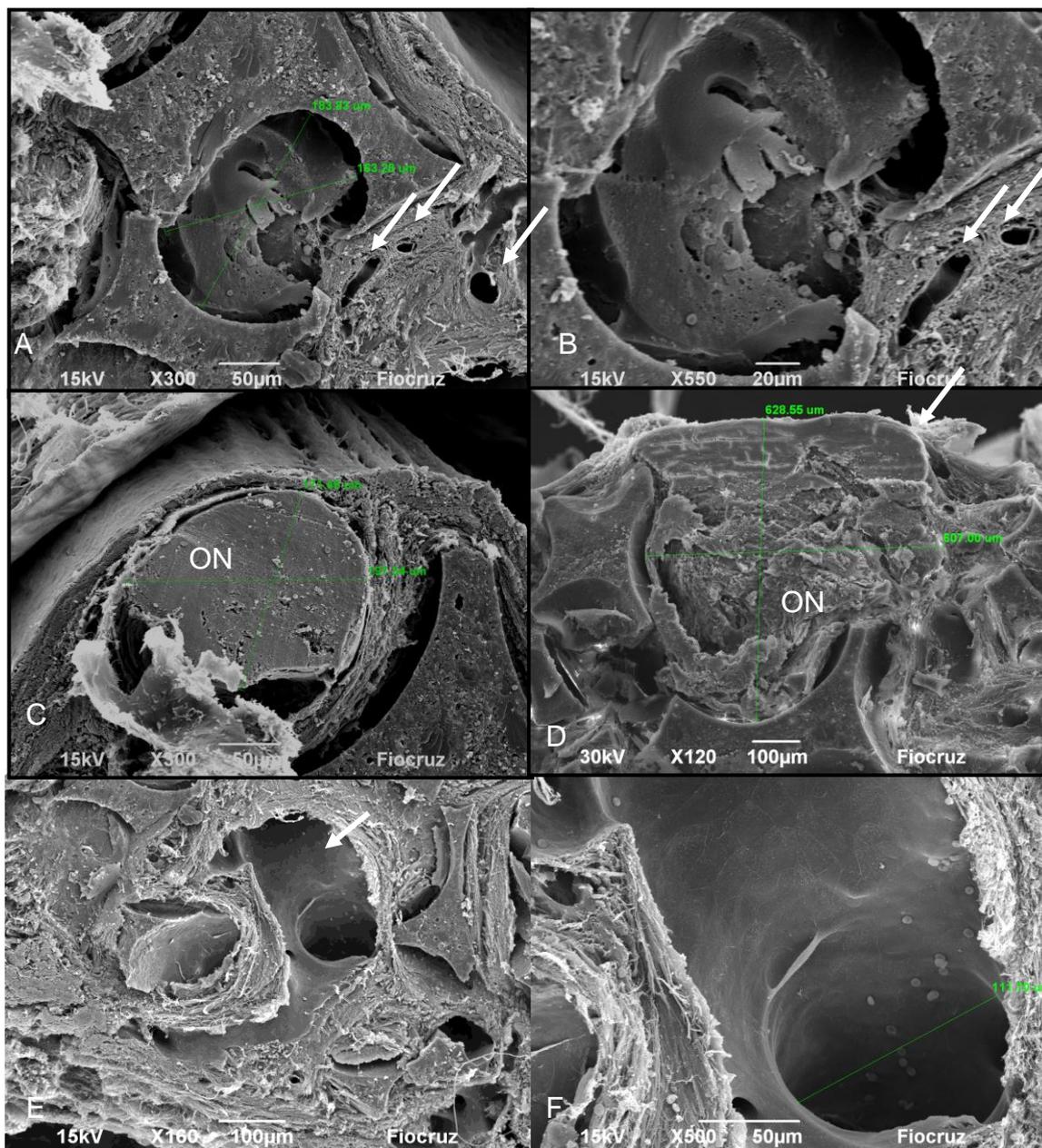


Fig. 41 – Análise ultra-estrutural do grupo COR+CTD 60 dias pós-cirurgia por meio de microscopia eletrônica de varredura. Os defeitos ósseos criados foram preenchidos com 25 mg do biomaterial composto ósseo de rícino associado a 2×10^6 CTD. (A) Ponto de calcificação (ON) próximo a vasos sanguíneos (setas). (B) Detalhe em maior aumento da figura anterior. (C) Presença de região calcificada com mensuração. (D) Presença de outra região calcificada com mensuração (seta). (E) Presença de vaso sanguíneo calibroso (seta) no centro do defeito ósseo. (F) Detalhe em maior aumento da figura anterior com mensuração.

- Osso íntegro, sem realização de defeito

Para efeito de comparação, foram realizadas avaliações de fragmentos ósseos íntegros, retirados de animais sadios, da mesma região dos defeitos realizados nos grupos anteriores. A espessura óssea foi semelhante à dos grupos com o biomaterial, evidenciando o papel de preenchimento do mesmo. O aspecto ósseo é de densidade e uniformidade. São evidentes dois tipos ósseos: um cortical mais denso, localizado nas superfícies superior e inferior, e um menos denso, preenchendo o espaço entre as corticais (figs. 42 A e B). Em um maior aumento é possível identificar a presença de vasos sanguíneos na intimidade da região interna, sempre limitados por tecido ósseo (figs. 42 C e D).

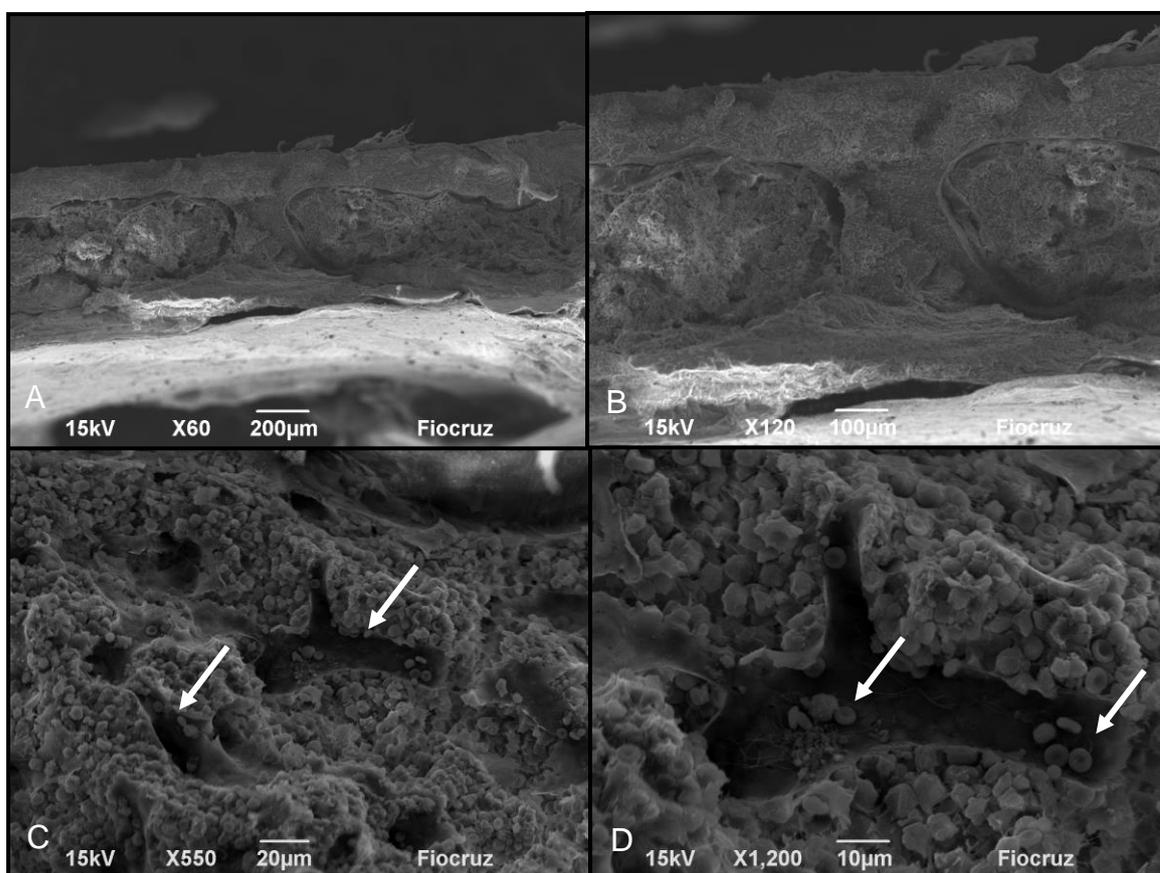


Fig. 42 – Análise ultra-estrutural por meio de microscopia eletrônica de varredura. Peça óssea íntegra, da mesma região anatômica estudada, sem realização de defeito. (A) Corte transversal da calota craniana evidenciando diferença de densidade óssea das bordas para o centro. (B) Detalhe em maior aumento da figura anterior. (C) Tecido ósseo da região interna com presença de vasos sanguíneos (setas). (D) Detalhe em maior aumento da figura anterior, com presença de hemácias no interior dos vasos sanguíneos (setas).

5.3.6 Análise de elementos químicos por espectroscopia de dispersão de elétrons (EDS)

A análise por EDS foi realizada para fornecer informações sobre os elementos químicos presentes nas regiões das amostras em regeneração. Os elementos-alvo foram o cálcio e o fósforo. As análises foram feitas no grupo de animais com tempo de sacrifício aos 60 dias pós-cirurgia por representar o maior período de reparo ósseo estudado. Também foram realizadas análises em amostras com osso íntegro. As quantificações individuais das amostras são disponibilizadas por programa específico do equipamento e expressos em forma de gráficos e tabelas (fig. 43 e tabela 9).

O equipamento, por meio de ferramentas específicas, permite além de confirmar e quantificar os elementos químicos determinar a sua disposição espacial. Especificamente, confirmou-se a presença de cálcio e fósforo associados, que caracterizam a maturação do tecido ósseo. Com isto foi possível verificar se determinada estrutura analisada era realmente tecido ósseo em regeneração (figs. 44 e 45).

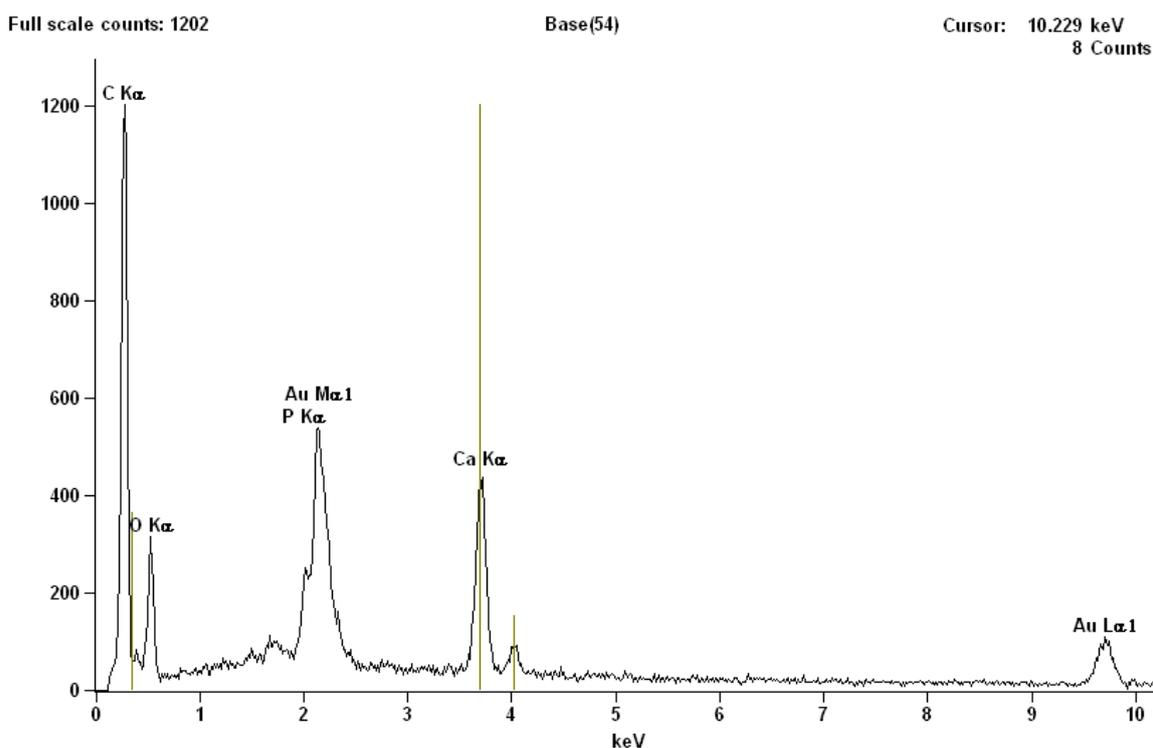


Figura 43 – Quantificação de elementos químicos presentes em uma das amostras do grupo COR+CTD por meio de análise por EDS. Nesta amostra foram identificados os elementos C, O, P, Ca e Au.

Tabela 9 – Quantificação de elementos químicos presentes em uma das amostras do grupo COR+CTD realizado por meio de análise por EDS.

Elemento Químico	Contagem	Peso %	Peso % Erro
C K	7382	22.11	+/- 0.21
O K	1564	6.50	+/- 0.17
P K	1373	0.55	+/- 0.04
Ca K	5331	4.60	+/- 0.07
Au L	2524	66.25	+/- 4.57
Total		100.00	

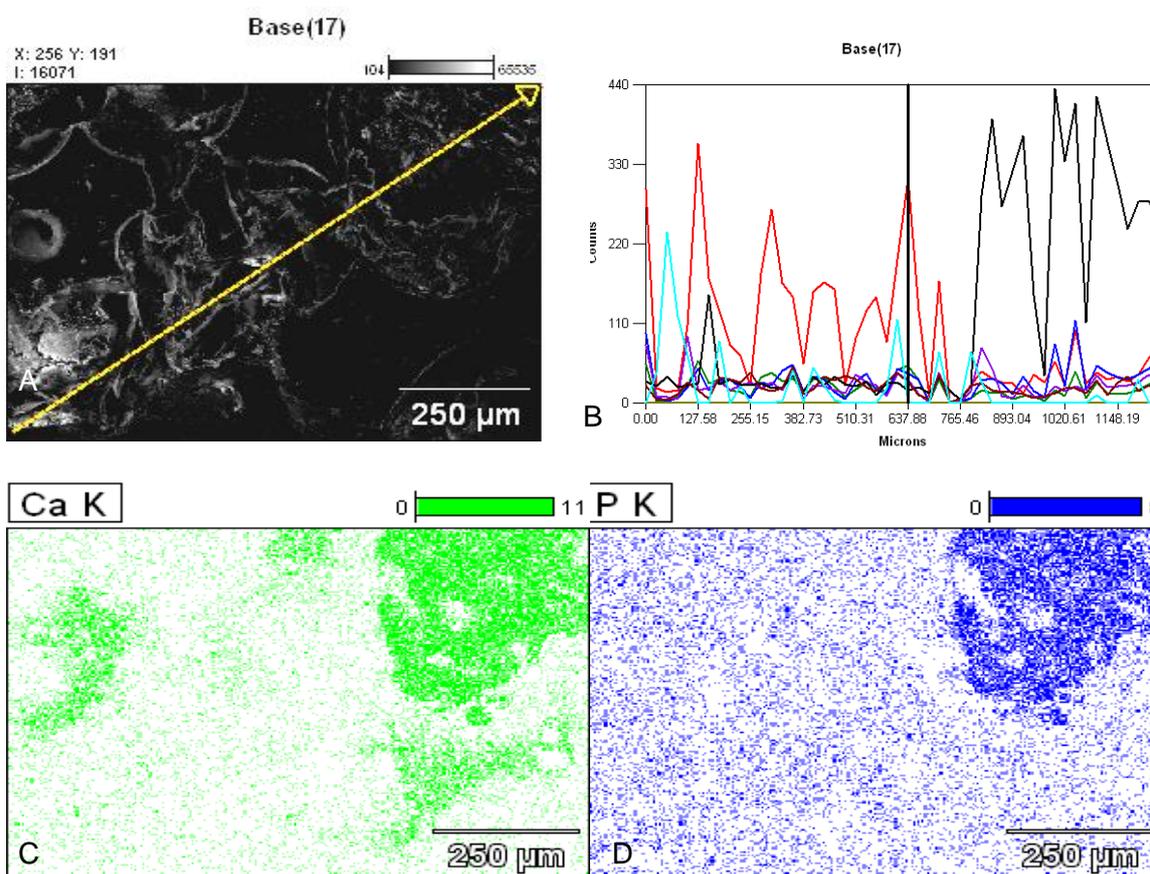


Figura 44 – Verificação da presença e determinação da localização dos elementos químicos em uma das amostras do grupo COR+CTD por meio da análise por EDS. (A) Micrografia por MEV de toda a área analisada. A linha representa as regiões que serão quantificadas. (B) Gráfico expressando as quantificações dos elementos químicos presentes nas regiões selecionadas (o eixo x corresponde à localização das regiões analisadas que foram selecionadas pela linha da fig. A. Cada linha no gráfico expressa a quantificação de um elemento químico). (C) Disposição espacial do cálcio presente em toda a área analisada. (D) Disposição espacial do fósforo presente em toda a área analisada. Os resultados confirmam presença de áreas em regeneração óssea.

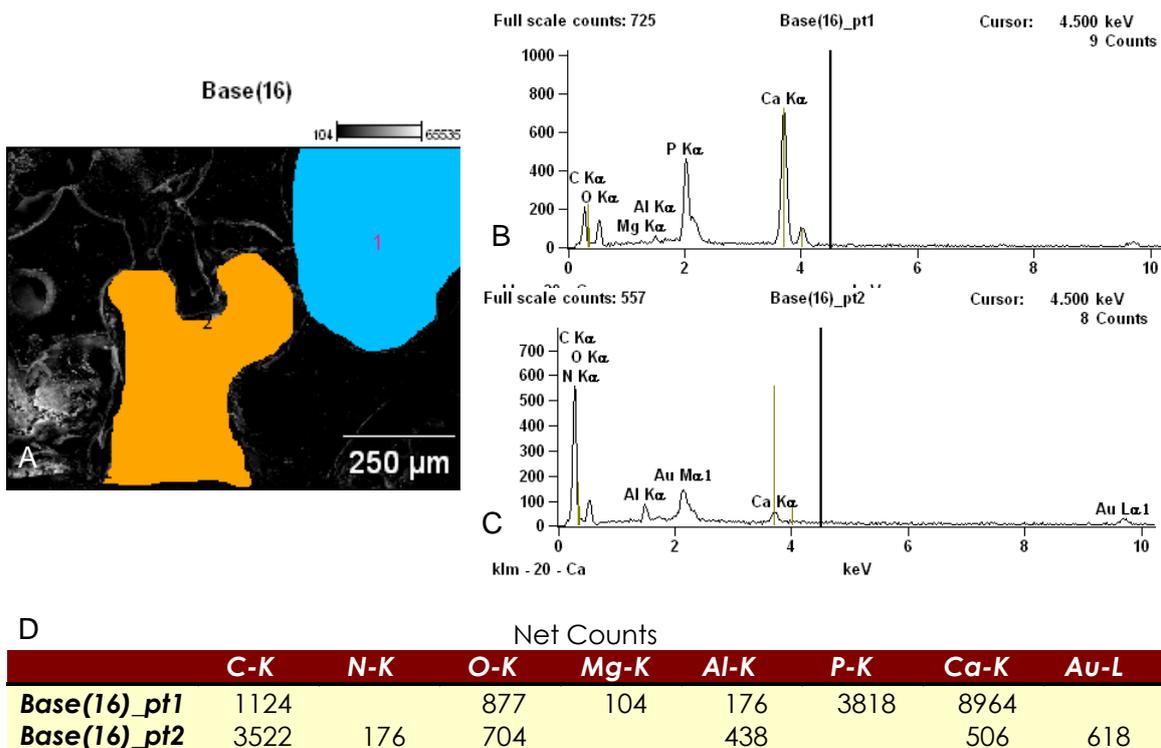


Figura 45 – Comparação da maturação óssea entre duas áreas selecionadas em uma das amostras do grupo COR+CTD por meio da análise por EDS. (A) Micrografia por MEV da área analisada. As duas áreas selecionadas estão coloridas e não englobam partículas do biomaterial. (B) Gráfico com a quantificação dos elementos químicos presentes na área 1 (cor azul). Foram identificados o cálcio e o fósforo. (C) Gráfico com a quantificação dos elementos químicos presentes na área 2 (cor laranja). Só foi identificado o cálcio. (D) Quantificação dos elementos químicos presentes nas duas áreas. A área 1 apresenta-se em estágio mais avançado de maturação óssea que a área 2 devido aos elevados níveis de cálcio e fósforo semelhantes aos do osso íntegro.

- Quantificação de cálcio 60 dias

A comparação da quantidade de cálcio presente nas amostras entre os grupos avaliados aos 60 dias demonstrou que existiu diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,0001$, one-way ANOVA). Quando comparados dois a dois (teste de Bonferroni para comparações múltiplas), ocorreu diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e o grupo com osso íntegro para os demais grupos ($p<0,05$), porém entre os grupos COR e COR+CTD não houve diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$) (fig. 46).

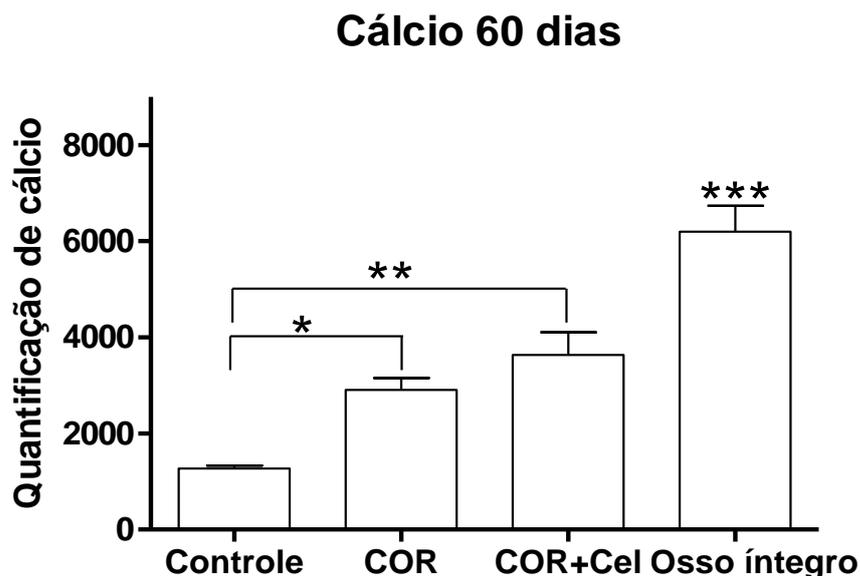


Fig. 46 – Análise por EDS da quantificação de cálcio nos defeitos ósseos dos animais sacrificados 60 dias pós-cirurgia. Representação gráfica da quantidade de cálcio dos defeitos ósseos dos quatro grupos experimentais: grupo controle com o defeito preenchido com o coágulo sanguíneo, grupo COR com 25 mg do composto ósseo de rícinus, grupo COR+CTD com 25 mg do composto ósseo de rícinus associado a 2×10^6 CTD e o grupo com amostras com osso íntegro. Os valores representam as médias \pm SEM de n=6 para o grupo controle, n=7 para o grupo COR, n=5 para o grupo COR+CTD e n=6 para o grupo com osso íntegro. *P<0,05. **P<0,01. ***P<0,001 em relação aos demais grupos (one-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni para comparações múltiplas).

- Quantificação de fosfato 60 dias

A comparação da quantidade de fosfato presente nas amostras entre os grupos avaliados aos 60 dias demonstrou que não existiu diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p > 0,05$, one-way ANOVA), pois ocorreu uma grande dispersão dos valores encontrados. Entretanto, pode-se chamar a atenção que o fosfato somente foi identificado em uma das seis amostras do grupo controle, indicando o caráter crítico do defeito criado. Esta amostra é a mesma em que foi encontrado um possível fragmento ósseo na análise por microscopia ótica. Quando comparados dois a dois (teste de Bonferroni para comparações múltiplas), ocorreu diferença estatisticamente significativa entre o grupo com osso íntegro e todos os demais, que não tiveram diferença entre si (fig. 47). A presença e a quantidade de fosfato, além da sua proporção em relação ao cálcio, indicam o grau de maturação do tecido ósseo.

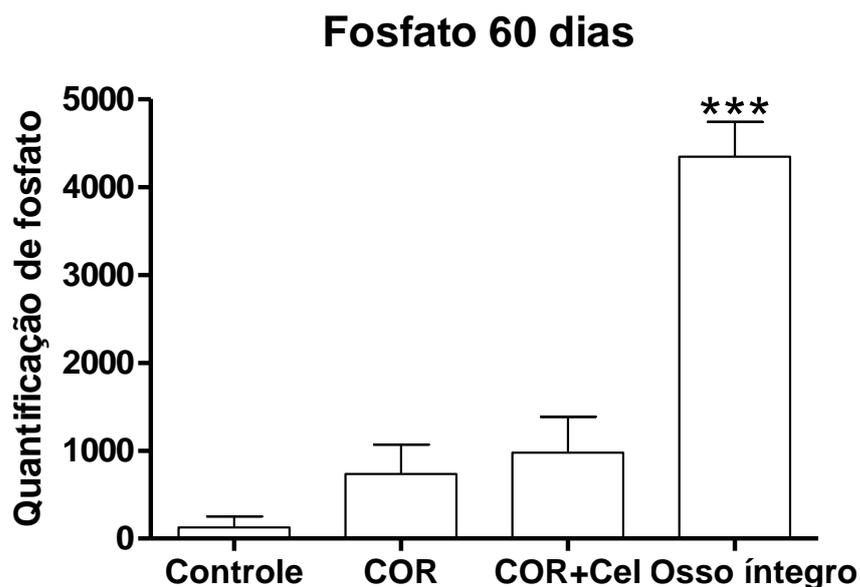


Fig. 47 – Análise por EDS da quantificação de fosfato nos defeitos ósseos dos animais sacrificados 60 dias pós-cirurgia. Representação gráfica da quantidade de fosfato dos defeitos ósseos dos quatro grupos experimentais: grupo controle com o defeito preenchido com o coágulo sanguíneo, grupo COR com 25 mg do composto ósseo de rícinus, grupo COR+CTD com 25 mg do composto ósseo de rícinus associado a 2×10^6 CTD e o grupo com amostras com osso íntegro. Os valores representam as médias \pm SEM de n=6 para o grupo controle, n=7 para o grupo COR, n=5 para o grupo COR+CTD e n=6 para o grupo com osso íntegro. ***P<0,001 em relação aos demais grupos (one-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni para comparações múltiplas).

6. DISCUSSÃO

A busca por um substituto do tecido ósseo para a resolução de defeitos e lesões ósseas é contínua e o surgimento de biomateriais e técnicas de terapia celular abrem perspectivas promissoras de encontrá-lo. Já foram publicados diversos estudos envolvendo a reconstrução óssea a partir do transplante de CT. Porém, não foram encontrados relatos que tenham avaliado a associação dos biomateriais testados neste trabalho com as CTD. Neste trabalho foi realizada uma investigação iniciada pela coleta e cultura de CTD, para a sua utilização em experimentos *in vitro* e *in vivo* que verificaram a interação destas células com diferentes biomateriais e a ação da associação de ambos na regeneração óssea.

6.1 OBTENÇÃO E CULTURA DE CÉLULAS-TRONCO DA POLPA DE DENTES DECÍDUOS (CTD)

A partir do relato da primeira fonte de CT obtidas da medula óssea, têm sido caracterizadas e submetidas a avaliações *in vitro* e *in vivo* CT obtidas de diversas outras fontes, tais como o tecido adiposo, o sangue, a pele e o cérebro, dentre outras. Conjectura-se que CT de diferentes origens podem ter diferentes características e, conseqüentemente, ter aplicações terapêuticas específicas.

Este estudo foi iniciado com a coleta e cultura das CTD. A escolha desta fonte ocorreu principalmente devido aos resultados promissores já publicados, como os de Zhang *et al.* (2008), de Koyama *et al.* (2009) e de Yamada *et al.* (2010), que confirmam a sua plasticidade e a capacidade de proliferação e de indução de regeneração tecidual. Em nosso estudo, as CTD foram obtidas com relativa facilidade. Contudo, é necessário ressaltar que a coleta do tecido tem um tempo limitado pela fase de dentição mista, normalmente situada entre os 6 e os 12 anos de idade (NOLLA, 1960), onde ocorre esfoliação dos 20 dentes decíduos para dar lugar aos dentes permanentes. Portanto, o ser humano apresenta 20 chances de coleta deste tecido por um período limitado, para posterior cultivo celular e utilização autóloga.

Uma maneira de contornar a limitação deste tempo de disponibilidade do tecido é indicar aos responsáveis do paciente a coleta do tecido e o estabelecimento da cultura no período da esfoliação e a criopreservação das células em nitrogênio

líquido. A criopreservação celular é bem estabelecida para a manutenção de vários tipos de células-tronco. Trabalhos como os de Martinello *et al.* (2010) e Ding *et al.* (2010), dentre outros, comprovam a segurança desta opção. Durante o presente estudo foram realizadas criopreservações de passagens celulares, sem identificação de alterações.

Para a mesma finalidade, existem relatos de métodos alternativos, como a criopreservação do tecido pulpar, como proposto por Perry *et al.* (2008), ou até mesmo de todo o dente, como descreve Woods *et al.* (2009), ao invés das CTD, para que, quando necessário, descongelá-los e realizar a coleta e cultura das CTD. Se for comprovado que estes métodos não induzem alterações nas células, este processo de criopreservação dos tecidos, e não das CTD, tornará o armazenamento mais simples e com menor custo, pois o procedimento laboratorial de cultura só seria feito quando indicada a utilização das células, economizando tempo, reagentes e pessoal, além de requerer uma estrutura laboratorial mais simples.

A técnica cirúrgica utilizada neste estudo para a retirada da unidade dentária não diferiu do padrão estabelecido pela clínica odontológica. Ressalta-se a importância de manutenção da cadeia asséptica, para evitar contaminações da cultura, e uma seleção criteriosa das unidades que serão utilizadas. Elas não devem apresentar lesões cáries (SOUZA *et al.*, 2008) e devem estar na fase de esfoliação com grau avançado de rizólise, porém com epitélio juncional íntegro, para não ocorrer uma contaminação prévia do tecido pulpar pelo meio bucal. É possível que unidades com raízes completamente reabsorvidas e em contato com o meio bucal não mais contenham tecido pulpar, como ocorreu em umas das unidades dentárias utilizadas neste estudo.

Os quatro dentes extraídos disponibilizaram pouco tecido pulpar e, conseqüentemente, poucas CTD, porém as mesmas apresentaram uma grande capacidade proliferativa, o que compensou esta limitação. Esta característica está de acordo com os trabalhos de Huang *et al.* (2009) e Nogueira *et al.* (2009) que compararam as CTD com células de outras origens e também encontraram altas taxas de proliferação. As culturas foram acompanhadas até a 13ª passagem e não foram observadas alterações morfológicas, assim como relatado por outros autores (KOYAMA *et al.*, 2009; NAKAMURA *et al.*, 2009; NOGUEIRA *et al.*, 2009).

6.2 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA INFLUÊNCIA DOS BIOMATERIAIS NAS CTD

Sabe-se que as CT, em qualquer espécie animal, possuem um papel importante no processo de regeneração tecidual e que atualmente existe uma série de biomateriais disponíveis que se propõem a atuar na regeneração óssea, portanto é importante avaliar *in vitro* o comportamento das CT quando em contato com estes biomateriais. Neste estudo as culturas de CTD foram submetidas a extratos dos biomateriais Composto ósseo de rícino (COR), Bonefill (BF) e Boneceramic (BC).

A escolha destes biomateriais baseou-se nas suas diferentes características e origens, além do reduzido número de publicações sobre os mesmos, especialmente associando-os à CTD. O biomaterial COR é um polímero de origem vegetal derivado de óleo de mamona (*Ricinus communis*). O BF é uma matriz inorgânica de origem bovina e o BC é uma hidroxiapatita sintética com fosfato tricálcico.

6.2.1 Avaliação da proliferação celular

A proliferação celular foi avaliada aos dois e quatro dias de cultura sob influência dos extratos dos biomateriais em três diluições. A avaliação foi feita pelo método do MTT, que é largamente utilizado em trabalhos com tipos celulares diversos, como os de Xi *et al.* (2008), Kim *et al.* (2009), Oh *et al.* (2010), dentre outros. Nos extratos são liberados íons que vão possibilitar a verificação de como a composição química dos biomateriais interfere nas CTD.

Neste trabalho foi evidenciada uma influência da concentração dos extratos na proliferação das CTD. A diluição de 1/250 exibiu melhores resultados que a diluição 1/5 em todos os biomateriais e, após dois dias de cultivo, esta diluição do extrato do BF chegou a apresentar valores menores de proliferação celular que os do grupo controle ($p < 0,05$). Estes achados estão de acordo com os trabalhos de Siyu *et al.* (2009) e de Huang *et al.* (2010) que também tiveram melhores resultados com extratos de biomateriais cerâmicos, semelhantes ao BC e ao BF, em concentrações próximas às deste estudo, e também obtiveram diferenças entre os biomateriais testados, em decorrência das suas composições. Entretanto, extratos de uma esponja de celulose e soja testada por Luo *et al.* (2010) obtiveram resultados melhores em maiores concentrações, segundo os autores devido à

liberação de conteúdo protéico, que foi nutritivo para as células. Pode-se perceber que a composição química dos biomateriais interfere na proliferação celular e que é possível um biomaterial ser utilizado como carreador de determinado componente, para que seja liberado para os tecidos após a sua enxertia.

O fator tempo respondeu como o esperado, pois houve um incremento no número de células em todos os grupos. No quarto dia de cultura, nenhum deles apresentou valores estatisticamente menores que o grupo controle. Este é um dado importante, pois demonstra que os extratos dos biomateriais testados não inibiram a proliferação das CTD neste período.

Quando os biomateriais foram comparados entre si, o BC obteve maior índice de proliferação celular, principalmente no período de quatro dias, em relação aos grupos COR e ao BF. Contudo, foram encontrados poucos relatos *in vitro* à respeito destes biomateriais, e a comparação direta dos mesmos com o presente estudo foi dificultada devido aos demais materiais e tipos celulares testados, além da metodologia empregada. Especificamente em relação ao BC, Reichert *et al.* (2009) relataram o incremento na proliferação de células de linhagem osteogênica humana quando em contato com suas partículas, apesar de, no trabalho de Sabetrsekh *et al.* (2010) a cultura com o BC ter tido menor proliferação do que um novo biomaterial cerâmico à base de dióxido de titânio. Por sua vez, os resultados do extrato do COR evidenciaram que não ocorreu estímulo à proliferação celular em nenhuma concentração, mas também não houve inibição. Estes resultados são semelhantes aos de Beloti *et al.* (2008) que acompanharam culturas de CT de medula óssea de ratos em contato com discos de poliuretana derivada do óleo da mamona com diferentes composições.

6.2.2 Avaliação da capacidade de diferenciação osteogênica das CTD

A análise da diferenciação celular foi feita pela identificação e quantificação dos depósitos de cálcio corados por alizarina vermelha após 21 dias de cultivo com meio osteogênico e com os extratos dos biomateriais diluídos em 1/250. Esta técnica é amplamente utilizada para verificar a diferenciação osteogênica de células de diferentes origens, como pode ser visto nos trabalhos de Samee *et al.* (2008), de Huang *et al.* (2009), de OH *et al.* (2010) e de Salvadè *et al.* (2010), dentre outros. A

concentração dos extratos foi selecionada devido ao melhor resultado encontrado no experimento de proliferação celular, anteriormente realizado, e o tempo de corte analisado é o mais corriqueiramente encontrado na literatura, como nos relatos de Ágata *et al.* (2009) e Salvadè *et al.* (2010), dentre outros, apesar de existirem trabalhos como o de Khojasteh *et al.* (2008) que analisaram em um menor período.

Em todas as culturas com meio osteogênico e extratos dos biomateriais foram identificadas deposições de cálcio, evidenciando a diferenciação, porém não houve diferença estatisticamente significativa da % de área corada entre os grupos nem em relação ao controle positivo. Não foram encontradas deposições de cálcio nas culturas do grupo controle negativo, indicando que não houve diferenciação osteogênica. Os valores de % de área corada encontrados neste grupo são atribuídos a resíduos de corante na superfície plástica do poço. Foi possível identificar uma leve tonalidade avermelhada nas paredes dos poços, que foi mensurada pelo programa de análise de cor. O fato de nenhum dos biomateriais ter inibido a diferenciação celular é um resultado positivo, mas não é possível afirmar que eles sejam osteoindutores somente por esta análise *in vitro*. Neste trabalho não foi avaliado o potencial de estímulo dos biomateriais à diferenciação de CT indiferenciadas. Também não foram encontrados relatos sobre a influência dos biomateriais testados neste estudo no potencial de diferenciação de CTD. Contudo, o trabalho de De Girolamo *et al.* (2008) testou biomateriais semelhantes ao BF e ao BC e encontrou tanto um estímulo da diferenciação osteogênica de CT de tecido adiposo, quanto uma maior deposição de matriz mineralizada em culturas destas células já diferenciadas. E, relacionando ao COR, Beloti *et al.* (2008) não encontraram sinais de diferenciação osteogênica em culturas celulares associadas a discos de poliuretano derivada do óleo da mamona, mesmo quando induzidas por meio osteogênico, resultado contrário ao deste estudo, porém estes discos apresentavam uma diferença importante na sua composição em relação ao COR que é a ausência do carbonato de cálcio.

6.2.3 Análise ultra-estrutural dos biomateriais por microscopia eletrônica de varredura

Nesta etapa foram analisados a forma, o tamanho das partículas e a superfície dos biomateriais testados. Albert (2002) ressalta que é importante conhecer estas características dos biomateriais para tentar relacioná-las com o seu comportamento em demais experimentos *in vitro* e *in vivo*, como foi feito no presente estudo.

Com a análise por MEV foi possível perceber que os biomateriais apresentam características distintas. Em todos eles foram encontradas partículas com variação de tamanho até cerca de cinco vezes entre elas, algumas destas fora do padrão de tamanho informado pelo fabricante. Tanto o COR quanto BC apresentaram formas irregulares e pontiagudas. Observamos que nestes biomateriais a superfície apresenta áreas com duas rugosidades diferentes. A maior parte da superfície é lisa, mas existem áreas menores mais rugosas, provavelmente decorrente do processo de fabricação, quando o biomaterial é triturado para a obtenção das partículas. O BC foi o único que apresentou grandes orifícios nas partículas, que teoricamente podem permitir a interação entre diferentes áreas e penetração de tecido ósseo neoformado. O BF possui partículas regulares e sólidas, sem a presença de arestas e poros. E, dentre os três biomateriais, é o que mais se assemelhou com o tecido ósseo humano, o que está de acordo com Figueiredo *et al.* (2010) e já era esperado, já que o BF é obtido de fêmur bovino liofilizado. Estas observações sobre as características de forma e de tamanho das partículas foram coincidentes com as descritas por Klein *et al.* (2009) à respeito de alguns biomateriais, incluindo o BC, e outros com origem semelhante ao BF, além disto, eles afirmaram que a forma que as partículas se aglutinam depende destas características e interfere no comportamento biológico dos biomateriais.

6.2.4 Análise de elementos químicos dos biomateriais por espectroscopia de dispersão de elétrons

A análise de elementos químicos dos biomateriais por EDS confirmou as informações sobre a composição química dos biomateriais fornecidas pelos fabricantes.

Não foram identificados elementos químicos fora do esperado em nenhum dos biomateriais. A composição deles diferiu de acordo com a sua origem. O COR não apresentou fosfato, mas confirmou a adição de cálcio, que, segundo Beloti *et al.*

(2003) e Pereira Junior *et al.* (2007), melhora as propriedades biológicas de polímeros derivados do óleo da mamona. O BC, mesmo sendo sintético, apresentou cálcio e fosfato em uma proporção semelhante ao osso natural, que é uma característica das hidroxiapatitas com fosfato tricálcico, como chamam a atenção LeGeros (2002) e Araújo e Santos Filho (2008). O BF, que é de origem bovina, foi o único a ter na sua composição o sódio e magnésio, pois são elementos característicos do tecido ósseo natural (ANSELME, 2000). Foi possível confirmar que os elementos estavam dispostos de forma homogênea por toda a superfície das partículas dos biomateriais, o que é favorável para uma regeneração óssea equilibrada por toda a área do defeito.

6.3 AVALIAÇÃO *IN VIVO* DA ASSOCIAÇÃO BIOMATERIAL-CTD

O estudo *in vivo* possibilitou complementar os achados do estudo *in vitro* e buscou avaliar o modelo experimental de regeneração óssea, a biocompatibilidade tecidual do biomaterial e a sua capacidade osteogênica, além de investigar a influência da utilização de CTD na regeneração óssea.

Apesar dos resultados *in vitro* do BC terem apresentado maiores índices de proliferação que os do COR e os do BF, não testamos este biomaterial no experimento *in vivo*, pois já foram publicados estudos sobre o mesmo. Dentre os estudos analisados, o BC apresentou bons resultados na maioria deles, como nos relatos de Zafiroopoulos *et al.* (2007), Artzi *et al.* (2008) e Cordaro *et al.* (2008), dentre outros. Contudo, são encontrados relatos de não-regeneração óssea em estudos com animais (CHAN, 2010) e clínicos (DECOSTER *et al.*, 2009). Estudos com hidroxiapatita de origem animal, como o BF, também são encontrados na literatura.

A escolha do biomaterial COR, para a realização desta etapa do trabalho, ocorreu por ser um material de origem vegetal, o que evita possíveis inconvenientes relacionados aos biomateriais de origem humana e animal, como contaminações e a resistência do paciente ao uso por conceitos pessoais (WENZ *et al.*, 2001), e por ser um derivado do óleo de mamona, que é um recurso renovável, de baixo custo e pode ser encontrado em abundância no Brasil e em outros países (OHARA, 1995). Além disto, não foram encontrados relatos de avaliações *in vivo* da sua associação

à CTD na regeneração óssea, e a ausência de fosfato em sua composição facilitou a identificação de áreas de regeneração óssea pelo método de EDS utilizado neste estudo. Os outros biomateriais testados no experimento *in vitro* apresentam o fosfato em sua composição, pois são biomateriais cerâmicos.

6.3.1 Padronização do modelo experimental

Inicialmente buscou-se selecionar e padronizar um modelo experimental que permitisse avaliar a influência do biomaterial e das CTD na regeneração óssea. Foram utilizados ratos neste estudo por possuírem características fisiológicas compatíveis com as humanas, serem de fácil manuseio e custo relativamente baixo, comparando-se com outros animais (LIEBSCHENER, 2004). O seu porte intermediário permitiu o acesso a regiões ósseas de tamanho suficiente para suprir a quantidade de tecido necessária para as diferentes avaliações realizadas neste estudo, sem requerer grande quantidade do material testado e sem ter as dificuldades de logística e de manuseio de animais de maior porte. Para excluir qualquer viés quanto às condições de reparo ósseo, os animais selecionados foram todos da linhagem Wistar, adultos machos, com peso entre 400 e 450 g e idade entre 5 e 6 meses. A utilização de camundongos foi descartada devido à dificuldade de criar o defeito ósseo e de obter resultados consistentes por meio de radiografias digitais, apesar de existirem relatos na literatura que utilizam este modelo experimental, com métodos distintos de avaliação da regeneração óssea, como os de SEO *et al.* (2008) e de Koob *et al.* (2010), dentre outros.

Existem duas áreas principais disponíveis para a realização de defeitos ósseos em ratos: nos membros posteriores, com a tíbia ou o fêmur, e na calota craniana. Os dois modelos foram testados nesse estudo e optou-se pela calota craniana, pois ela apresentou uma técnica simples e permitiu a realização de um defeito de maior tamanho. Por ser uma região de pouca movimentação muscular resultou em um melhor pós-operatório e minimizou o risco de abertura da ferida cirúrgica e consequentes infecções. Durante o teste do modelo de fêmur com defeitos de 3 mm de diâmetro, além das desvantagens já citadas quando comparado ao modelo de calota craniana, ocorreu uma fratura após a cirurgia. Este tipo de complicação já foi relatada em defeitos de 3,5 mm por Prado *et al.* (2006) e de 2 mm por Corsetti (2005).

Para avaliar o real potencial osteogênico de biomateriais, o defeito ósseo criado deve ser crítico, ou seja, não deve ocorrer regeneração espontânea (SCHMITZ e HOLLINGER, 1986) ou pelo menos não ocorrer durante o tempo de realização do estudo (GOSAIN *et al.*, 2000). Os resultados das diferentes avaliações deste trabalho, com a utilização do modelo de calota craniana, confirmaram que o defeito foi crítico e que o modelo é válido para avaliar o potencial osteogênico do material e das células testadas. Corroborando com a escolha, é encontrado na literatura que os defeitos críticos são bem caracterizados na região craniomaxilofacial em várias espécies animais (KABAN E GLOWACKI, 1981; SCHMITZ e HOLLINGER, 1986; GOSAIN *et al.*, 2000). No entanto, o mesmo não acontece com relação a defeitos realizados em ossos longos (EINHORN e LANE, 1999).

Após 60 dias, que foi o período máximo de avaliação do estudo, a regeneração óssea dos animais do grupo controle, em que o defeito foi preenchido com coágulo sanguíneo, estava limitada às bordas das lesões e no centro dela ocorreu somente a formação de tecido conjuntivo fibroso. Estes resultados estão de acordo com os trabalhos de Miguel *et al.* (2008), Khojasteh *et al.* (2008) e Young *et al.* (2009), dentre outros. A não regeneração do centro da lesão em defeitos críticos ocorre principalmente devido à dificuldade de vascularização e à falta de estrutura tecidual que sirva de arcabouço para as atividades e interações celulares. Superar estas limitações é a meta a ser alcançada com a associação dos biomateriais a CT.

6.3.2 Análise macroscópica da regeneração óssea

Para avaliar macroscopicamente a regeneração tecidual da região dos defeitos ósseos, foram realizadas e analisadas fotografias digitais de todas as amostras, nos três tempos estudados. É fato que a avaliação visual não permite aferir o grau de maturação óssea nem identificar os eventos celulares que estão ocorrendo, mas é possível verificar e registrar a quantidade e a qualidade de tecido neoformado, o grau de regeneração do periósteo e endósteo e a forma da região do defeito. Existem trabalhos na literatura que utilizaram fotografias como um dos parâmetros de avaliação da regeneração óssea, tanto em pacientes (JEMT e LEKHOLM, 2003; ZWAHLEN *et al.*, 2009), quanto em modelos experimentais em animais (MARTINS *et al.*, 2010).

A avaliação das fotografias evidenciou que o biomaterial testado cumpriu a função de preenchimento mecânico do defeito, pois deu suporte ao tecido neoformado e manteve a anatomia da região, tanto no grupo COR quanto no grupo COR+CTD, e que o defeito criado foi realmente crítico, pois foi possível identificar que não ocorreu regeneração espontânea nos grupos controle em nenhum dos tempos avaliados. O incremento da regeneração tecidual observado no grupo COR+CTD, mesmo não sendo tecido ósseo maduro, em relação ao GC e ao grupo COR na avaliação após 15 dias, foi coincidente com o resultado das radiografias digitais no mesmo período, reforçando a idéia de uma ação regenerativa das CTD, ao menos na fase inicial de regeneração limitada aos primeiros 15 dias.

6.3.3 Avaliação da radiopacidade tecidual por meio de radiografias digitais

A análise por radiografias digitais permitiu avaliar os níveis de cinza (NC) e o coeficiente de variação (CV) das regiões dos defeitos ósseos submetidos aos diferentes tratamentos. As áreas de maior conteúdo mineral apresentam pixels com NC mais altos e o CV indica o grau de homogeneidade do tecido pela determinação da diferença de intensidade entre os NC dentro da mesma amostra (SARMENTO *et al.*, 2005).

Pode-se entender esta forma de avaliação do seguinte modo: em um defeito recém-criado, os NC e o CV se apresentariam baixos, pois os tons de cinza são escuros e homogêneos. Em um estágio intermediário de regeneração os NC também seriam intermediários, pois já existe parte do tecido mineralizado e radiopaco, e o CV seria alto, devido à presença de pixels com grande variação dos tons de cinza. Já em um estágio final de regeneração, com o osso totalmente formado, os NC seriam altos, decorrente da grande radiopacidade do tecido mineralizado, e o CV diminuiria, pois os pixels, mesmo com valores mais altos, voltariam à homogeneidade de tons.

Os resultados deste experimento demonstraram, nos três tempos avaliados, que o grupo controle apresentou valores do NC e do CV significativamente menores do que os dois grupos que receberam biomaterial, comprovando a ação de suporte mecânico para os tecidos em regeneração, observada durante a avaliação macroscópica. A possibilidade de que a simples presença do biomaterial tenha aumentado a radiopacidade da região do defeito foi excluída pela realização e

análise dos NC e do CV de radiografias digitais da mesma quantidade de biomaterial, seguindo o mesmo protocolo de técnica. A análise após 15 dias evidenciou maiores valores dos NC e do CV no grupo COR+CTD do que nos demais ($P < 0,05$). Isto foi decorrente da presença de pixels mais radiopacos nas amostras deste grupo e pode indicar que ocorreu uma regeneração óssea precoce, possivelmente influenciada pela ação das CTD sobre o tecido. Este aumento da radiopacidade também foi observado por Del Carlo *et al.* (2003) no grupo dos animais que receberam uma poliuretana de mamona associada a um aspirado de medula óssea autóloga para regeneração de defeitos ósseos no rádio de coelhos, quando comparado com o grupo que recebeu a poliuretana sem o aspirado de medula. Corroborando com esses resultados, a avaliação macroscópica deste grupo no mesmo ponto de corte também indicou uma melhor regeneração. Contudo, como ressaltado por Figueiredo *et al.* (2004), somente com a análise radiográfica não é possível afirmar qual foi o tipo de tecido formado nos defeitos ósseos. É possível que a amostra se torne mais radiopaca não pelo surgimento de tecido ósseo, mas sim por um aumento na quantidade de tecido mole. De qualquer maneira, uma possível formação tecidual, que aumente a radiopacidade da região, pode representar uma atividade regenerativa, que poderá ser confirmada e melhor compreendida quando analisada em conjunto com as análises por microscopia como realizado neste estudo e no de Pereira Junior *et al.* (2007), onde foram correlacionados os achados radiográficos com os histológicos.

Após 30 dias o grupo COR equilibrou os valores do NC e do CV com o grupo COR+CTD e aos 60 dias todos os grupos obtiveram acréscimo, evidenciando uma formação tecidual gradativa ao tempo decorrido, com destaque para um maior valor do CV do grupo COR+CTD, porém sem diferença estatística ($P > 0,05$). Seria necessário um novo período de avaliação para verificar se esta tendência de aumento do CV se manteria e indicaria um início da maturação óssea, devido à presença de novos pontos mais radiopacos. A identificação deste aumento paulatino dos valores dos NC e do CV em todos os grupos com o decorrer do tempo avalia a acuidade e a capacidade de análise por radiografias digitais.

Sabe-se que os resultados obtidos pela análise de radiografias possuem limitações, principalmente por serem imagens bidimensionais onde não é possível determinar a quantidade e qualidade óssea da estrutura pesquisada, como destacado por Figueiredo *et al.* (2004). Uma opção para minimizar esta limitação

neste estudo seria a análise das amostras por meio de tomografias computadorizadas, pois elas permitiriam imagens mais fidedignas e em terceira dimensão, porém seria necessário o acesso a um equipamento especial de microtomografia para pequenos animais, como os utilizados nos trabalhos de Park *et al.* (2009) e de Young *et al.* (2009). Contudo, mesmo que a análise por radiografias não seja o método de imagem mais preciso disponível, ele é comprovadamente útil e pode ser encontrado em diversos relatos na literatura sobre sua aplicação em estudos de regeneração óssea, como os de Corsetti (2005), de Pereira Junior *et al.* (2007), de Azoubel *et al.* (2008), de Martins *et al.* (2009), de Martins *et al.* (2010) e de Queiroz *et al.* (2010), dentre outros. Um fator que contribuiu para a ampla utilização deste método de avaliação da regeneração óssea foi o advento das radiografias digitais, que possuem uma maior definição de imagem e apresentam mais recursos de análise. Em alguns dos trabalhos citados anteriormente, as radiografias foram a única análise realizada para avaliar a regeneração do tecido ósseo, enquanto que, no presente estudo, elas foram complementares às análises por microscopia ótica e de varredura e por espectroscopia de dispersão de elétrons.

6.3.4 Análise histológica por microscopia ótica e ultra-estrutural por microscopia eletrônica de varredura

A associação das análises por microscopia ótica e por MEV permitiu avaliar as características histológicas e microestruturais do tecido, identificando áreas de ossificação e a forma que o biomaterial e o tecido se relacionaram. A análise por MEV já está bem descrita na literatura por trabalhos como os de Ghanaati *et al.* (2010) e de Salvadè *et al.* (2010), dentre outros. Ela serviu de complementação para a avaliação histológica. O MEV não tem ampliações pré-determinadas e permite rotacionar e inclinar as amostras para se obter uma visão das estruturas analisadas sob diferentes ângulos, o que não é possível na microscopia ótica convencional. Esta análise foi realizada no ponto de corte de 60 dias após cirurgia por representar o maior tempo de regeneração estudado. As avaliações foram qualitativas, porém, quando ocorreram dúvidas, ao se utilizar a microscopia ótica e a MEV, se determinada estrutura era realmente decorrente de regeneração óssea, foram realizadas análises por espectroscopia por dispersão de raios-X para determinar e

quantificar os elementos químicos presentes na estrutura em questão e se estes elementos eram compatíveis com a composição de tecido ósseo.

Diante dos resultados obtidos, ficou evidente a diferença de volume tecidual entre o grupo controle e os grupos que receberam o biomaterial. As amostras do grupo controle mesmo após 60 dias não demonstraram sinais de que ocorreria uma regeneração da região, pois mesmo ocorrendo um incremento de volume e de organização, com o decorrer do tempo, de um tecido conjuntivo frouxo para denso, as suas características foram sempre de tecido fibroso, o que ratifica o caráter de defeito crítico do modelo experimental escolhido. Ocorreu uma exceção em uma das amostras, onde foi identificada por microscopia ótica e por MEV, uma área de tecido ossificado maturado, cuja composição foi confirmada pela análise por EDS como composta por cálcio e fosfato em proporções semelhantes às de tecido ósseo. Não é possível afirmar, mas este pode ter sido um fragmento residual decorrente da cirurgia de criação do defeito ósseo. Esta hipótese também foi aventada por Miguel *et al.* (2008) que encontraram um fragmento ósseo não compatível em uma amostra do grupo controle preenchido por coágulo sanguíneo, que foi a mesma condição utilizada para o grupo controle deste trabalho.

Nos dois grupos avaliados, o biomaterial cumpriu os requisitos básicos de ser biocompatível (OLIVIER *et al.*, 2004), pois não foi encontrado infiltrado inflamatório significativo em nenhuma das amostras, e de servir de suporte para os tecidos neoformados, permitindo a manutenção da arquitetura da região do defeito.

Algumas áreas de regeneração apresentaram relação com a superfície das partículas do biomaterial, demonstrando algum tipo de influência do mesmo neste processo, porém somente em uma amostra do grupo COR foi detectado um contato íntimo entre ambos, denotando um potencial de osseointegração. Esta informação, sobre a ação da superfície do biomaterial na regeneração óssea, está bem descrita nos trabalhos de Guastaldi (2004), Olivier *et al.* (2004) e AlGhamdi *et al.* (2010).

Os resultados obtidos não certificam o biomaterial como osteocondutor, com ou sem a associação de CTD, pois a regeneração do defeito, em ambos os grupos, estava em nível inicial nos tempos de corte estudados. Apesar do período de acompanhamento de dois meses ser descrito como suficiente para mensurar a regeneração óssea (COSTA, 2009), seria necessário acompanhar os animais por um período maior para verificar se ocorreria a total regeneração do defeito, quando ela ocorreria e compará-la ao grupo controle, que não recebeu o biomaterial. Sabe-

se que o ideal seria que o biomaterial fosse osteogênico e/ou osteoindutor (ZAFIROPOULOS *et al.*, 2007; REICHERT *et al.*, 2009; OH *et al.*, 2010).

Ao se comparar o grupo COR+CTD com o grupo COR, as amostras demonstraram características bastante semelhantes, porém foram encontradas diferenças qualitativas. As áreas ossificadas foram mais precoces e pontualmente exibiram maior tamanho no grupo COR+CTD, o que pode indicar um efeito benéfico das CTD à regeneração tecidual. Um fator limitador para determinar a atuação das CTD é que, analisando-se as demais avaliações feitas, foram encontradas diferenças entre o grupo COR+CTD e os demais desde o ponto de corte de 15 dias, porém, as análises por MEV e por EDS só foram feitas no ponto de corte de 60 dias. A realização destas análises nos tempos de corte anteriores poderia ter sido útil para ajudar no entendimento da ação das CTD no processo regenerativo tecidual. É possível que as células tenham tido uma ação regenerativa ou uma durabilidade pós-enxerto por tempo limitado. Este aspecto foi estudado por Giannoni *et al.* (2009) e os resultados demonstraram que o número de células, após aplicação para regeneração óssea, foi reduzido significativamente com o decorrer do tempo. A hipótese é que isto ocorra devido à baixa celularidade do tecido ósseo e dificuldade de vascularização.

Em relação à vascularização, ocorreu um incremento com o transcorrer do tempo em todos os grupos, porém os defeitos que receberam os biomateriais apresentaram vasos em toda a sua extensão nos três períodos estudados, enquanto que, no grupo controle, os vasos foram encontrados predominantemente próximos às bordas, com exceção do período de 60 dias. Esta vascularização provavelmente é um fator positivo (PENG *et al.*, 2005; CENTRULLO *et al.*, 2005), porém não é uma garantia de regeneração óssea, como ocorreu neste estudo e como pode ser visto no relato de Koob *et al.* (2010).

Um ponto que merece discussão é a influência da degradação do biomaterial testado e da geometria das suas partículas na regeneração óssea. Não existe um consenso sobre o tempo ideal de degradação dos biomateriais. A tendência é de buscar biomateriais que sejam substituídos gradativamente por tecido ósseo neoformado. Porém, sabe-se que este equilíbrio não é fácil de controlar e que depende de fatores como a composição, porosidade e condições do leito receptor e, quando isto não ocorrer, o biomaterial deveria ser incorporado aos tecidos receptores (OLIVIER *et al.*, 2004; HAIYAN *et al.*, 2005; NI e CHANG, 2009; ZHANG

et al., 2010). As partículas do biomaterial utilizado não demonstraram ter sofrido alteração de qualquer tipo em seu volume, em nenhum dos tempos estudados e apresentaram boa relação com os tecidos. Este achado, de não-degradação do biomaterial, está de acordo com a maioria dos relatos na literatura sobre biomateriais poliméricos derivados do óleo da mamona (MENDONÇA *et al.*, 2006; PEREIRA JUNIOR *et al.*, 2007; LAUREANO FILHO *et al.*, 2009). Entretanto, existem relatos de sinais de reabsorção das partículas e substituição por tecido ósseo (CAVALIERE, 2000; LEONEL *et al.* 2003 MENDONZA-BARRERA *et al.*, 2003). O tempo de acompanhamento deste trabalho não permitiu afirmar que o biomaterial tem degradação nula, nem mesmo mais lenta que o ideal, pois a regeneração total do defeito não ocorreu e, conseqüentemente, a sua presença ainda era necessária à regeneração tecidual. Um tempo maior de acompanhamento teria sido útil para esclarecer esta questão, verificando se este comportamento de não-degradação das partículas seria mantido e, se isto ocorresse, se elas seriam incorporadas a um possível tecido ósseo neoformado.

Este comportamento dos biomateriais também deve ser analisado por outro prisma. Os resultados de Laureano Filho *et al.* (2009) demonstraram que os defeitos ósseos preenchidos com dois biomateriais que foram degradados durante a regeneração óssea, tiveram uma diminuição da espessura da região, mesmo após a total regeneração óssea, enquanto que os defeitos que receberam o polímero de mamona, apesar de não terem as partículas degradadas, também foram regenerados, porém mantiveram a mesma espessura e estrutura anterior à realização do defeito. A manutenção da anatomia da região em regeneração também foi observada no presente estudo, confirmada tanto pela análise macroscópica, quanto pela microscópica. É válido ressaltar que isto pode ser uma vantagem em diversas situações, como a correção de defeitos ósseos craniofaciais, pois a manutenção do volume do enxerto é indispensável para o restabelecimento da estética. Já existe um relato (DIAS *et al.*, 2009) de trabalho experimental em macacos testando-se um biomaterial com composição semelhante ao utilizado neste estudo para a reconstrução de defeitos ósseos nasais.

Em relação à geometria, as partículas apresentaram e mantiveram, devido ao fato de não terem sido degradadas, um aspecto de superfície irregular com presença de arestas contundentes. Baseando-se na importância, já citada anteriormente, do contato da superfície do biomaterial com os tecidos para induzir a

regeneração, pode-se cogitar que esta forma irregular das partículas pode ser prejudicial à regeneração óssea. As análises por microscopia ótica e por MEV evidenciaram áreas em que as fibras neoformadas se encontravam esticadas, devido ao contato com as arestas, e por isso não tinham contato com a superfície côncava das partículas do biomaterial, mantendo assim espaços vazios sem formação tecidual. Esta hipótese já foi aventada por Calixto *et al.* (2001) como sendo um dos fatores que influenciaram negativamente na regeneração de alvéolos de ratos preenchidos com grânulos irregulares de poliuretana derivada do óleo de mamona. Os resultados de Ghanaati *et al.* (2010) corroboram com a hipótese, pois também encontraram interferência da forma e do tamanho das partículas de biomateriais cerâmicos, desta feita no grau de inflamação tecidual.

A discussão destes tópicos chama a atenção para a importância dos profissionais conhecerem a fundo os biomateriais que utilizam. A escolha do mesmo deverá ser feita relacionando as suas características e o seu comportamento biológico com a finalidade cirúrgica do enxerto a ser realizado. Entretanto, nem sempre é isto que acontece. Bugarin Júnior e Garrafa (2007) realizaram uma pesquisa com 95 cirurgiões sobre a utilização de biomateriais, e foi possível verificar que uma parte significativa destes profissionais não tinha o conhecimento necessário a respeito dos biomateriais que utilizavam na clínica diária.

6.3.5 Análise de elementos químicos por espectroscopia de dispersão de elétrons

Com a análise por EDS foi possível identificar os elementos químicos presentes no tecido da região do defeito, permitindo compará-lo com o tecido ósseo íntegro e verificar o seu grau de maturação, de acordo com o seu conteúdo mineral.

A deposição de cálcio e de fosfato sobre uma matriz orgânica, composta por fibras de colágeno produzidas pelos osteoblastos, é a etapa final do processo de ossificação (ANSELME, 2000). Por isto, neste estudo, o foco principal da investigação por EDS foi a identificação destes elementos químicos. O COR não contém fosfato em sua composição, e, portanto, a possível identificação deste elemento nas amostras analisadas confirmaria a presença de tecido ossificado e a sua quantificação definiria o grau de maturação da área em questão.

A análise por EDS tem sido utilizada para a avaliação de processos regenerativos ósseos por vários pesquisadores como Araújo e Santos Filho (2008) e Raucci *et al.* (2010), dentre outros. São análises rápidas, não-destrutivas e que requerem a mesma preparação realizada para a análise por MEV.

Os resultados da avaliação realizada em relação ao conteúdo de cálcio após 60 dias demonstraram uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e o grupo com osso íntegro para os demais. Contudo, esta análise apresenta um viés já esperado, pois o biomaterial apresenta cálcio em sua composição. Por isso não é possível afirmar que os maiores valores de cálcio encontrados nos grupos com biomaterial, em relação ao grupo controle, foram decorrentes de uma regeneração óssea. Deve-se ressaltar que, mesmo com o cálcio em sua composição, os valores dos grupos com o biomaterial foram significativamente mais baixos que os do grupo com osso íntegro, demonstrando que a possível regeneração ainda estava em uma fase inicial.

Os valores da contagem de fosfato apresentaram uma grande variação e causaram uma dispersão numérica grande. Entretanto, esta avaliação, mesmo não tendo diferença estatística, foi útil para determinar as regiões que estavam em regeneração e para verificar uma possível influência positiva das CTD. É possível entender isto ao verificar que o fosfato só foi identificado em uma área de uma das amostras do grupo controle, e que a mesma pode ter sido decorrente de um fragmento ósseo residual da cirurgia de criação do defeito. Este resultado corrobora com as demais avaliações e indica que o defeito ósseo foi crítico e que a presença do biomaterial influenciou na formação de estruturas ossificadas.

Os resultados encontrados nas avaliações realizadas durante o estudo *in vivo* deixam claro que seria necessário um tempo maior para verificar se ocorreria a regeneração total do defeito ósseo criado.

6.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Existem diversos estudos *in vitro* e *in vivo* que mostram resultados positivos da utilização de CT na regeneração óssea, como os de Khojasteh *et al.* (2008), de Seo *et al.* (2008), de Steinhardt *et al.* (2008), e de Yamada *et al.* (2010), dentre outros. Porém, este conhecimento ainda não evoluiu para uma aplicação clínica padronizada e comprovadamente eficaz.

Isto pode ser explicado pela complexidade do processo e pelo grande número de variáveis envolvidas. Os resultados dos experimentos podem ser influenciados por fatores como a origem, a passagem, a forma de utilização e enxertia das células utilizadas, a espécie animal e o leito receptor e se as células serão associadas a algum biomaterial e/ou fator de crescimento, dentre outras variáveis. Além disto, é importante salientar que o mecanismo de ação das células na regeneração tecidual ainda não está totalmente esclarecido.

Todo este processo investigativo sobre a utilização da terapia celular para a regeneração de tecido ósseo é válido e mantém a perspectiva de se obter uma aplicação clínica viável e segura. As pesquisas devem continuar principalmente no intuito de se estabelecer a fonte ideal de CT, com uma padronização da forma de utilização, e identificar, dentre os biomateriais, os que melhor se adequam às necessidades inerentes de cada situação clínica.

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo permitiram relatar as seguintes conclusões:

- A coleta e cultura de células-tronco originárias de dentes decíduos (CTD) é simples, de fácil reprodutibilidade e é viável para a utilização em avaliações *in vitro* e *in vivo*. As células apresentaram grande capacidade de proliferação e se diferenciaram em linhagem osteogênica quando cultivadas com meio específico.
- Os biomateriais testados não impediram a diferenciação osteogênica das CTD, quando cultivadas com meio específico. O biomaterial Boneceramic estimulou a proliferação de CTD por meio da adição de seu extrato, diluído em 1/250, às culturas celulares.
- O modelo experimental de criação de defeito em calota craniana de ratos, utilizado neste estudo, foi crítico e é uma opção viável para avaliar a regeneração óssea.
- A metodologia de análise da regeneração óssea, utilizada no estudo *in vivo* através da associação dos métodos de radiografias digitais, microscopia ótica e de varredura e análise de elementos químicos, mostrou-se útil para identificar áreas de regeneração óssea.
- O biomaterial Composto ósseo de rícinus foi biocompatível e apresentou boa capacidade de preenchimento do defeito ósseo, sem sinais de degradação de suas partículas. Foram identificadas áreas esparsas de regeneração óssea associadas às suas partículas, contudo, até o final do período avaliado, não foi comprovada uma ação osteoindutora ou osteogênica deste biomaterial, mesmo quando associado à CTD.

REFERÊNCIAS

- ADHIKARI, R.; GUNATILLAKE, P. A.; GRIFFITHS, I.; TATAI, L.; WICKRAMARATNA, M.; HOUSHYAR, S. Biodegradable injectable polyurethanes: synthesis and evaluation for orthopaedic applications. **Biomaterials**. v. 29, n. 28, p. 3762–70, 2008.
- AFONSO, A. D. **Interacção entre Biomateriais e Tecido Ósseo**. 1998. 208f. Tese (Doutorado). Fac. Do Porto. Portugal.
- ALBERT, D. E. The Growing Importance of Materials Characterization in biocompatibility Testing. **Medical Device & Diagnostic Industry**, 2002. Disponível em < <http://www.namsa.com/documents/authored-papers/Albert.pdf>>. Acesso em 23/10/2010.
- ALGHAMDI, A. S.; SHIBLY, O.; CIANCIO, S. G. Osseous grafting part II: xenografts and alloplasts for periodontal regeneration: a literature review. **J Int Acad Periodontol**. v. 12, n. 2, p. 39-44, 2010.
- ANGELOVA, N.; HUNKELER, D. Rationalizing the design of polymeric biomaterials. **Trends Biotechnol**. v. 17, p. 409–421, 1999.
- ANSELME K. Osteoblast adhesion on biomaterials. **Biomaterials**. v. 21, n. 7, p. 667-81, 2000.
- ANVISA, **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, 2010. Disponível em <<http://websphere.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home/sanguetecidoorgaos>>. Acesso em 23/10/2010.
- ARAÚJO, T. S.; SANTOS FILHO, J. B. **Produção de hidroxiapatita Pura e Dopada para Aplicação em Biosensores**. 2008. 99f. Dissertação (Mestrado em Física). Universidade Federal de Sergipe. Brasil.
- ARTZI, Z.; WEINREB, M.; CARMELI, G.; LEV DOR, R.; DARD, M.; NEMCOVSKY, C. E. Histomorphometric assessment of bone formation in sinus augmentation utilizing a combination of autogenous and hydroxyapatite/biphasic tricalcium phosphate graft materials at 6 and 9 months in humans. **Clin Oral Implants Res.**, v. 19, p. 686-692, 2008.
- AZOUBEL, M. C. F.; SARMENTO, V. A.; CANGUSSÚ, V.; AZOUBEL, E.; BITTENCOURT, S.; CUNHA, F. Q.; RIBEIRO, R. A.; BRITO, G. A. C. Adjunctive Benefits of Systemic Etoricoxib in Non-Surgical Treatment of

- Aggressive Periodontitis: Short-Term Evaluation. **J. Periodontol.**, v. 79, n. 9, p. 1719-1725, 2008.
- BAUER, T. W.; MUSCHLER, G. F. Bone graft materials. An overview of the basic science. **Clin Orthop Relat Res**, v. 371, p.10-27, 2000.
 - BELOTI, M. M.; OLIVEIRA, P. T.; TAGLIANI, M. M.; ROSA, A. L. Bone cell responses to the composite of Ricinus communis polyurethane and alkaline phosphatase. **J Biomed Mater Res A.**, v. 84, n. 2, p.435-41, 2008.
 - BELOTI, M. M.; HIRAKI, K. R.; BARROS, V. M.; ROSA, A. L. Effect of the chemical composition of Ricinus communis polyurethane on rat bone marrow cell attachment, proliferation, and differentiation. **J Biomed Mater Res A.**, v. 64, n. 1, p. 171-6, 2003.
 - BUCK, B. E., MALININ, T. I.; BROWN, M. D. Bone transplantation and human immunodeficiency virus. An estimate of risk of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). **Clin Orthop Relat Res**, v. 240, p. 129-136,1989.
 - BUGARIN JÚNIOR, J. G.; GARRAFA, V. Bioética e biossegurança: uso de biomateriais na prática odontológica. **Rev Saúde Pública**, v. 41, n. 2, p. 223-228, 2007.
 - CALIXTO, R. F. E.; TEÓFILO, J. M.; BRENTGANI, L. G.; LAMANO CARVALHO, T. L. Implante de um floculado de resina de mamona em alvéolo dental de rato. **Pesqui Odontol Bras**, v. 15, n. 3, p. 257-262, 2001.
 - CANTER, H. I.; VARGEL, I.; KORKUSUZ, P.; ONER, F; GUNGORDUK, D. B.; CIL, B.; KARABULUT, E.; SARGON, M. F.; ERK, Y. Effect of use of slow release of bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor-Beta-2 in a chitosan gel matrix on cranial bone graft survival in experimental cranial critical size defect model. **Ann Plast. Surg.**, v. 64, n. 3, p. 342-350, 2010.
 - CAVALIERI, I. **Estudo do processo de reparação óssea entre os implantes do polímero de mamona, resina acrílica termicamente ativada e cimento ósseo em tíbias de coelhos.** 2000. 110p. Dissertação. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Odontologia de São José dos Campos. Brasil.
 - CENTRULO, C. L., K. R. KNOX, D. J. BROWN, *et al.* Stem cells and distraction osteogenesis: endothelial progenitor cells home to ischemic

- generate activation and consolidation. **Plastic Reconstruct. Surg.**, v. 116, p. 1053–1061, 2004.
- CHAN, R. C. W. **Effect of growth factors on the osteoinductive potential of hydroxiapatite b-tricalcium phosphate (HA-TCP)**. 2010. 177f. Tese (Clinical Dentistry). The University of Adelaide. Austrália.
 - CHRISTOU, Y. A.; MOORET, H. D.; SHAW, P. J.; MONK, P. N. Embryonic stem cells and prospects for their use in regenerative medicine approaches to motor neurone disease. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v. 33, p. 485–498, 2007.
 - CLARKE, D. L.; *et al.* Generalized potential of adult neural stem cells. **Science**, n. 288, p. 1660-1663, 2000.
 - CLAVERO, J.; LUNDGREN, S. Ramus or chin grafts for maxillary sinus inlay and local onlay augmentation: comparison of donor site morbidity and complications. **Clin Implant Dent Relat Res.**, v. 5, p. 154-160, 2003.
 - COELHO P. G, GRANATO R, MARIN C, BONFANTE EA, FREIRE JN, JANAL MN, GIL JN, SUZUKI M. Biomechanical evaluation of endosseous implants at early implantation times: a study in dogs. **J Oral Maxillofac Surg.**, v. 68, n. 7, p. 1667-75, 2010.
 - CORDARO, L., BOSSHARDT, D.; PALATTELLA, P.; RAO, W.; SERINO, G.; CHIAPASCO, M. Maxillary sinus grafting with Bio-Oss® or Straumann® BoneCeramic: histomorphometric results from a randomized controlled multicenter clinical trial. **Clin Oral Implants Res.**, v. 19, p. 796–803. 2008.
 - CORSETTI, A. **Avaliação do reparo ósseo em fêmures de ratos após implante de blocos de cimento de fosfato de cálcio e enxerto ósseo autógeno**. 2005. 122f. Dissertação (Mestrado em Odontologia). UFRS. Porto Alegre, Brasil.
 - COSTA, A. M. **Reconstrução de defeitos ósseos cranianos em ratos com células-tronco de polpa dentária humana: estudo experimental de neoformação óssea**. 2009. 96f. Tese (Doutorado em Ciências). Fac. de Medicina da USP. São Paulo, Brasil.
 - CUMINGS, B.J.; UCHIDA, N.; TAMAKI, S.J.; ANDERSON, A.J. Human neural stem cell differentiation following transplantation into spinal cord

- injured mice: association with recovery of locomotor function. **Neurol Res.**, v. 28, n. 5, p. 474-481, 2006.
- DAI, W. *et al.* Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in postinfarcted rat myocardium: short- and long-term effects. **Circulation**, v. 112, n. 2, p. 214-223, 2005.
 - DE COSTER, P.; BROWAEYS, H.; DE BRUYN, H. Healing of Extraction Sockets Filled with BoneCeramic(R) Prior to Implant Placement: Preliminary Histological Findings. **Clin Implant Dent Relat Res.**, 2009 Aug 3. [Epub ahead of print].
 - DE GIROLAMO, L.; SARTORI, M. F.; ARRIGONI, E.; RIMONDINI, L.; ALBISETTI, W.; WEINSTEIN, R. L.; BRINI, A. T. Human adipose-derived stem cells as future tools in tissue regeneration: osteogenic differentiation and cell-scaffold interaction. **Int J Artif Organs.**, v. 31, n. 6, p.467-79, 2008.
 - DE GROOT, K. Bioceramics consisting of calcium phosphate salts. **Biomaterials**, v. 1, n. 47, p. 47-50, 1980.
 - DeICARLO, R.J.; KAWATA, D.; VILORIA, M.I.V.; OLIVEIRA, D.R.; SILVA, A.S.; MARCHESI, D.R.; GALVÃO, S.R.; AZEVEDO, P.; MONTEIRO, B.S. Polímero de mamona acrescido de cálcio, associado ou não à medula óssea autógena na reparação de falhas ósseas. **Ciênc. Rural**, v. 33, n.6, p.1081-1088, 2003.
 - DEVELIOGLU, H., SARAYDIN, S. U., DUPOIRIEUX, L.; SAHIN, Z. D. Histological findings of longterm healing of the experimental defects by application of a synthetic biphasic ceramic in rats. **J Biomed Mater Res.**, v. 80, p. 505-508, 2007.
 - DIAS, P. C.; GRANATO, L.; RAMALHO, L. D. E. T.; OLIVEIRA, J. A., PRETEL, H. Ricinus communis biocompatibility histological study in the nose of Cebus apella monkeys. **Braz J Otorhinolaryngol.**, v. 75, n. 3, p. 350-355, 2009.
 - DING, G.; WANG, W.; LIU, Y; AN, Y.; ZHANG, C.; SHI, S.; WANG, S. Effect of cryopreservation on biological and immunological properties of stem cells from apical papilla. **J Cell Physiol.**, v. 223, n. 2, p. 415-22, 2010.
 - DOHERTY P. J.; WILLIAMS R. L.; WILLIAMS D. F. *et al.*, Advances in biomaterials: biomaterial-tissue interfaces, v. 10, p. 525-522, 1992.

- DOMINICI, M.; *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, p. 315-317, 2006.
- EINHORN, T; LANE, J. M. Clinically applied models of bone regeneration in tissue engineering research. **Clin Orthop.**, v. 367, p. 59-67, 1999.
- EUROPEAN COMMISSION HUMAN TISSUE-ENGINEERED PRODUCTS. **Human tissue-engineered products Today's markets and future prospects. p. 1-60**, 2003. Disponível em <
http://agrillife.jrc.ec.europa.eu/documents/TE_WP1_Annex_FinalReport.pdf>. Acesso em 23/10/2010.
- FIGUEIREDO, A.S.; FAGUNDES, D.J.; NOVO, N.F.; INOUE, C.M.; TAKITA, L.C.; SASSIOTO, M.C.P. Osteointegração de osso bovino desvitalizado, hidroxiapatita de coral, poliuretana de mamona e enxerto ósseo autógeno em coelhos. **Acta Cir Bras.**, v.19, n.4, 2004.
- FIGUEIREDO, M.; HENRIQUES, J.; MARTINS, G.; GUERRA, F.; JUDAS, F.; FIGUEIREDO, H. Physicochemical characterization of biomaterials commonly used in dentistry as bone substitutes--comparison with human bone. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater.**, v. 92, n. 2, p. 409-19, 2010.
- FLECKENSTEIN, K. B., CUENIN, M. F., PEACOCK, M. E., BILLMAN, M. A., SWIEC, G. D., BUXTON, T. B., SINGH, B. B.; MCPHERSON, J. C. Effect of a hydroxyapatite tricalcium phosphate alloplast on osseous repair in the rat calvarium. **J Periodontol**, v. 77, n. 1, p. 39-45, 2006.
- FRAME, J. W. A convenient animal model for testing bone substitute materials. **J. Oral Surg.**, v. 38, p. 176-180, 1980.
- FRAZILIO, F. O.; ROSSI, R.; NEGRINI NETO, J. M.; FACCO, G. G.; OVANDO, T. M.; FIALHO, M. P. F. Use of castor oil polyurethane in an alternative technique for medial patella surgical correction in dogs. **Acta Cir Bras.**, v. 21, n. 4, p. 74-79, 2006.
- FRIEDENSTEIN, A.J., CHAILAKHJAN, R.K., LALYKINA, K.S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. **Cell Tissue Kinet.**, v. 3, n. 4, p. 393-403, 1970.

- GALANTE, J. O.; LEMONS, J.; SPECTOR, M.; WILSON, P. D.; WRIGHT, T. M. The biologic effects of implant materials. **Orthop. Res.**, v. 9, p. 760-775, 1991.
- GHANAATI, S.; BARBECK, M.; ORTH, C.; WILLERSHAUSEN, I.; THIMM, B. W.; HOFFMANN, C.; RASIC, A.; SADER, R. A; UNGER, R. E.; PETERS, F; KIRKPATRICK, C. J. Influence of beta-tricalcium phosphate granule size and morphology on tissue reaction *in vivo*. **Acta Biomater.**, 2010 Jul 23. [Epub ahead of print].
- GIANNONI, P.; SCAGLIONE, S; DAGA, A.; ILENGO, C.; CILLI, M.; QUARTO, R. Short-Time Survival and Engraftment of Bone Marrow Stromal Cells in an Ectopic Model of Bone Regeneration **TISSUE ENGINEERING: Part A.**, v. 15, n. 00, p. 1-11, 2009.
- GOSAIN, A. K.; SONG, L.; YU, P.; MEHRARA, B. J.; MAEDA, C. Y.; GOLD, L. I.; LONGAKER, M. T. Osteogenesis in cranial defects: reassessment of the concept of critical size and the expression of TGF-(beta) isoforms. **Plastic Reconstr Surg**, v. 106, n. 2, p. 360-371, 2000.
- GRONTHOS, S.; MANKANI, M.; BRAHIM, J.; ROBEY, P. G.; SHI, S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. **Proc Natl Acad Sci.**, v. 97, p. 13625-13630, 2000.
- GUASTALDI, A. C. Biomaterial - Ponderações sobre as Publicações Científicas. **Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent**, v. 58, n.3, p.205-206, 2004.
- GUELCHEER, S. A. Biodegradable Polyurethanes: Synthesis and Applications in Regenerative Medicine **TISSUE ENGINEERING: Part B**, v. 14, n. 1, p. 3-17, 2008.
- HAIYAN, L. I.; RUILIN, D. U.; CHANG, J Fabrication, characterization, and *in vitro* Degradation of Composite Scaffolds Based on PHBV and Bioactive Glass. **Journal Of Biomaterials Applications**, v. 20, p. 137-155, 2005.
- HIGASHI, S.; YAMAMURO, T.; NAKAMURA, T.; IKADA, Y.; HYON, S-H;; JAMSHIDI, K. Polymer-hydroxyapatite composites for biodegradable bone fillers. **Biomaterials**, v. 7, p. 183-187, 1986.
- HUANG, G. T. J; GRONTHOS, S; SHI, S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology

- and role in regenerative Medicine. **J Dent Res.**, v. 88, n. 9, p. 792-806, 2009.
- HUANG, Y.; JIN, X.; ZHANG, X.; SUN, H.; TU, J.; TANG, T.; CHANG, J.; DAI, K. *In vitro* and *in vivo* evaluation of akermanite bioceramics for bone regeneration. **Biomaterials**, v. 30, n. 28, p. 5041–5048, 2009.
 - IKADA, Y. Challenges in tissue engineering. **J. R. Soc. Interface**, v. 3, p. 589-601, 2006.
 - INT ANKER, P.S.; *et al.* Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. **Stem Cells**, v. 22, p. 1338-1345, 2004.
 - **INTERNATIONAL SOCIETY FOR STEM CELL RESEARCH – ISSCR.** Disponível em: <<http://www.isscr.org/public/regions/index.cfm>> Acesso: mar. 2007.
 - **ISO/EN 10993–5.** Biological Evaluation of Medical Devices - Part 5 Tests for Cytotoxicity, in vitro Methods: 8.2 Tests on Extracts, 2009.
 - JACKSON, K. A.; MI, T.; GOODELL, M. A. Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 96, p.14482-14486, 1999.
 - JANG, H Y; KIM, H. C.; LEE, S. C.; LEE, J. Y. Choice of graft material in relation to maxillary sinus width in internal sinus floor augmentation. **J Oral Maxillofac Surg.**, n. 68, n. 8, p. 1859-68, 2010.
 - JARCHO, M. Biomaterial aspects of calcium phosphates. Properties and applications. **Dent Clin North Am.**, v. 30, p. 25-47, 1986.
 - JEMT, T.; LEKHOLM, U. Measurements of buccal tissue volumes at single-implant restorations after local bone grafting in maxillas: a 3-year clinical prospective study case series. **Clin Implant Dent Relat Res.**, v. 5, n. 2, p. 63-70, 2003.
 - JENSEN, S. S., BORNSTEIN, M. M., DARD, M., BOSSHARDT, D. D.; BUSER, D. Comparative study of biphasic calcium phosphates with different HA/TCP ratios in mandibular bone defects. A longterm histomorphometric study in minipigs. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 90, n. 1, p. 171-181, 2009.
 - JENSEN, S. S., YEO, A., DARD, M., HUNZIKER, E., SCHENK, R.; BUSER, D. Evaluation of a novel biphasic calcium phosphate in standardized bone

- defects: a histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs. **Clin Oral Implants Res.**, v. 18, n. 6, p. 752-760, 2007.
- JUNKER, R.; MANDERS, P. J.; WOLKE, J.; BORISOV, Y.; JANSEN, J. A. Bone-supportive behavior of microplasma-sprayed CaP-coated implants: mechanical and histological outcome in the goat. **Clin Oral Implants Res.**, v. 21, n. 2, p. 189-200, 2010.
 - KABAN, L. B.; GLOWACKI, J. Induced osteogenesis in the repair of experimental mandibular defects in rats. **J Dent Res.** v., 60, n. 7, p. 1356-1364, 1981.
 - KAUSCHKE, E.; RUMPEL, E; FANGHÄNEL, J.; BAYERLEIN, T; GEDRANGE, P. The in vitro viability and growth of fibroblasts cultured in the presence of different bone grafting materials (NanoBone® and Straumann Bone Ceramic®) **Folia Morphol.**, v. 65, n. 1, p. 37-42, 2006.
 - KERKIS, I.; *et al.* Isolation and Characterization of a Population of Immature Dental Pulp Stem Cells Expressing OCT-4 and Other Embryonic Stem Cell Markers. **Cells Tissues Organs**, v. 184, p. 105-116, 2006.
 - KHOJASTEH,A.; ESLAMINEJAD,M. B. NAZARIAN, H. Mesenchymal stem cells enhance bone regeneration in rat calvarial critical size defects more than platelete-rich plasma. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**, v. 106, p. 356-363, 2008.
 - KIM, H. K.; KIM, J. H.; ABBAS, A. A.; KIM, D. O.; PARK, S. J.; CHUNG, J. Y.; SONG, E. K.; YOON, T. R. Red light of 647 nm enhances osteogenic differentiation in mesenchymal stem cells. **Lasers Med Sci.**, v. 24, n. 3, p. 465-466, 2009.
 - KLEIN, M.; GOETZ, H.; PAZEN, S.; AL-NAWAS, B.; WAGNER, W.; DUSCHNER, H. Pore characteristics of bone substitute materials assessed by microcomputed tomography. **Clin. Oral Impl. Res.**, v. 20, p. 67-74, 2009.
 - KLIJN, R. J.; MEIJER, G. J.; BRONKHORST, E. M.; JANSEN, J. A. Sinus floor augmentation surgery using autologous bone grafts from various donor sites: a meta-analysis of the total bone volume. **Tissue Eng. Part B Rev.**, v. 16, n. 3, p. 295-303, 2010.
 - KOOB, S.; TORIO-PADRON, N.; STARK, B.; HANNIG, C.; STANKOVIC, Z.; FINKENZELLER, G. Bone formation and neovascularization mediated by

- mesenchymal stem cells and endothelial cells in critical-sized calvarial defects. **Tissue Eng Part A**, Aug. 2010 [Epub ahead of print].
- KORBLING, M.; ESTROV, Z. Adult stem cells for tissue repair – a new therapeutic concept? **N Engl Med**, v. 349, n. 6, p. 570-582, 2003.
 - KOYAMA, N.; OKUBO, Y.; NAKAO, K.; BESSHO, K. Evaluation of pluripotency in human dental pulp cells. **J Oral Maxillofac Surg.**, v. 67, p. 501-506, 2009.
 - LACERDA, S. L.; LANZONI, J. F. A.; BOMBONATO-PRADO, K. F.; CAMPOS, A. A.; PRATA, C. A.; BRENTGANI, L. G. Osteogenic Potential of Autogenous Bone Associated with Bone Marrow Osteoblastic Cells in Bony Defects: A Histomorphometric Study. **IMPLANT DENTISTRY**, v. 18, n. 6, p. 521-527, 2009.
 - LAUREANO FILHO, J. R.; ANDRADE, E. S.; ALBERGARIA-BARBOSA, J. R.; CAMARGO, I. B.; GARCIA, R. R. Effects of demineralized bone matrix and a 'Ricinus communis' polymer on bone regeneration: a histological study in rabbit calvaria. **J Oral Sci.**, v. 51, n. 3, p. 451-456, 2009.
 - LECHNER, A. Stem cells and regenerative medicine for the treatment of type 1 diabetes: the challenges lying ahead. **Pediatric Diabetes**, v. 5, p. 88-93, 2004.
 - LEGEROS, R. Z. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. **Clin Orthop Relat Res**, v. 395, p. 81-98, 2002.
 - LEITE, F. R. M.; RAMALHO, L. T. O. BONE REGENERATION AFTER DEMINERALIZED BONE MATRIX AND CASTOR OIL (RICINUS COMMUNIS) POLYURETHANE IMPLANTATION. **J Appl Oral Sci.**, v. 16, n. 2, p.122-6, 2008.
 - LEONEL, E.C.F.; MANGILLI, P.D.; RAMALHO, L.T.O.; ANDRADE SOBRINHO, J. A. importância da porosidade interna do polímero de mamona durante a neoformação óssea. Estudo em ratos. **Cienc. Odontol. Bras.**, v. 6, n.3, p.19-25, 2003.
 - LI, B.; YOSHII, T.; HAFEMAN, A. E.; NYMANB, J. S.; WENKE, J. C.; GUELCHER, S. A. The effects of rhBMP-2 released from biodegradable polyurethane/microsphere composite scaffolds on new bone formation in rat femora **Biomaterials**, v. 30, p. 6768–6779, 2009.

- LIEBSCHENER, M. A. K. Biomachanical considerations of animal models used in tissue engineering of bone. **Biomaterials**, v. 25, p. 1697-1714, 2004.
- LUO, L. H.; ZHANG, Y. F.; WANG, X. M.; WAN, Y.; CHANG, P. R.; ANDERSON, D. P.; CHEN, Y. Cellulose/Soy Protein Isolate Composite Sponges Preparation, Characterization, and In Vitro and *In Vivo* Evaluation **J Biomater Appl.**, v. 24, n. 6, p. 503-526, 2010.
- LYRA, A. C.; SOARES, M. B. P.; SILVA, L. F. M.; FORTES, M.; ANDRÉ GOYANNA, A.; MOTA, A.; OLIVEIRA, S. A.; BRAGA, E. L.; CARVALHO, W.; GENSER, B.; SANTOS, R. R.; LYRA, L. G. C. Feasibility and safety of autologous bone marrow mononuclear cell transplantation in patients with advanced chronic liver disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 13, p. 1067-1073, 2007.
- MALER, J.M.; SPITZER, P.; LEWCZUK, P.; KORNHUBER, J.; HERRMANN, M. WILTFANG, J. Decreased circulating CD34⁺ stem cells in early Alzheimer's disease: evidence for a deficient hematopoietic brain support? **Mol Psychiatry**, v. 11, n. 12, p. 1113-1115, 2006.
- MANKANI, M. H.; KUZNETSOV, S. A.; MARSHALL, G. W.; ROBEY, P. G. Creation of new bone by the percutaneous injection of human bone marrow stromal cell and HA/TCP suspensions. **Tissue Eng Part A**, v. 14, n.12, p. 1949-58, 2008.
- MARQUIS, M. E.; LORD, E.; BERGERON, E., DREVELLE, O.; PARK, H.; CABANA, F.; SENTA, H.; FAUCHEUX, N. Bone cells-biomaterials interactions. **Front Biosci.**, v. 1, n. 14, p. 1023-1067, 2009.
- MARTIN, G.R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. **Proc Natl. Acad. Sci.**, v. 78, p. 7634-7638, 1981.
- MARTINELLO, T.; BRONZINI, I.; MACCATROZZO, L.; IACOPETTI, I.; SAMPAOLESI, M.; MASCARELLO, F. PATRUNO, M. Cryopreservation Does Not Affect the Stem Characteristics of Multipotent Cells Isolated from Equine Peripheral Blood. **Tissue Engineering: Part C**, v. 16, n. 4, p. 771-781, 2010.
- MARTINS, M. C. F.; COSTA, C; ABRÃO, J; BORRI, M. L. Expansão Rápida da Maxila: análise da densidade radiográfica da sutura palatina mediana e sua correlação nos estágios de neoformação óssea, por meio de imagem

- digitalizada. **R Dental Press Ortodon Ortop Facial**, v. 14, n. 5, p. 38.e1-38.e9, 2009.
- MARTINS, R.; KINOSHITA, A. M. O; CARVALHO, N. T. A; GUIMARÃES, S.A.C. Comparative study of bone response guided tissue regeneration technique - macroscopic evaluation. Part 1. **FULL Dentistry in Science**, v. 1, n. 3, p. 224-230, 2010.
 - MENDONÇA J. C. G.; ROSSI, R.; INOUE, C. M.; BAZAN, D. R. P.; MONTEIRO, J. C. C.; MENDONÇA, J. P. Morphology of autogenous bone graft and castor oil polyurethane in the infraorbital rim of rabbits: a comparative study. **Acta Cir Bras.**, v. 21, n. 5, p. 341–347, 2006.
 - MENDOZA-BARRERA, C.; MELÉNDEZ-LIRA, M.; ALTUZAR, V.; TOMÁS, S. A. Ricinus communis-based biopolymer and epidermal growth factor Regulations on bone defect repair: A rat tibia model. **Rev. Sci. Instrum.**, v. 74, n. 1, p. 390-392, 2003.
 - MIGUEL, F. B. **Avaliação do potencial osteogênico de matrizes tridimensionais colagênicas aniônicas, reticuladas ou não em glutaraldeído, na regeneração de defeitos críticos, em calvária de rato.** 2008. 158 p. Tese (Doutorado em Patologia). Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz. Salvador, Brasil.
 - MIKI, T.; *et al.* Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. **Stem Cells**, v. 23, n. 10, p. 1549-1559, 2005.
 - MINGUELL, J. J.; ERICES, A.; CONGET, P. Mesenchymal stem cells. **Exp. Biol. Med.**, v. 226, n. 6, p. 507-520, 2001.
 - MISZTA-LANE, H.; MIRBOLOOKI, M.; SHAPIRO, A.M.; LAKEY, J.R. Stem cell sources for clinical islet transplantation in type 1 diabetes: Embryonic and adult stem cells. **Med Hypotheses**, v. 67, n. 4, p. 909-913, 2006.
 - MIURA, M.; GRONTHOS, S.; ZHAO, M.; LU, B.; FISHER, L.; ROBEY, P.; SHI, S. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v. 100, n. 10, p. 5807–5812, 2003.
 - MOOREN, R. E.; DANKERS, A. C.; MERKX, M. A.; BRONKORST, E. M.; JANSEN, J. A.; STOLINGA, P. J. The effect of platelet-rich plasma on early and late bone healing using a mixture of particulate autogenous cancellous

- bone and Bio-Oss: an experimental study in goats. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 39, n. 4, p. 371-378, 2010.
- MORIGI, M.; *et al.* Human bone marrow mesenchymal stem cells accelerate recovery of acute renal injury and prolong survival in mice. **Stem Cells**, v. 26, n. 8, p. 2075-2082, 2008.
 - MURATA, M.; INOUE, M.; ARISUE, M.; KUBOKI, Y; NAGAI, N. Carrier-dependency of cellular differentiation induced by bone morphogenetic protein in ectopic sites. **Int J Oral Maxillofac Surg.**, v. 27, n. 5, p.391-6, 1998.
 - NAKAMURA, S., YAMADA, Y, KATAGIRI, W., SUGITO, T., ITO, K., UEDA, M. Cell proliferation Pathways Comparison between Human Exfoliated Deciduous Teeth and Dental Pulp Stem Cells by Gene Expression Profile from Promising Dental Pulp **J Endod.**, v. 35, p. 1536–1542, 2009.
 - NAKASHIMA, M. Bone morphogenetic proteins in dentin regeneration for potential use in endodontic therapy. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 16, n. 3, p. 369–376, 2005.
 - National Institutes of Health. The Adult Stem Cell . In **Stem Cell Information**, 2009. Disponível em <<http://stemcells.nih.gov/info/scireport/chapter4>>. Acesso em 23/10/2010.
 - Ni, S.; CHANG, J. Dimagnesium Silicate, and Tricalcium Phosphate Bioceramics In vitro Degradation, Bioactivity, and Cytocompatibility of Calcium Silicate, **J. Biomater Appl.**, v. 24, n. 139, p. 139-158, 2009.
 - NOGUEIRA, R. C. **Isolamento, caracterização e análise da estabilidade citogenética após expansão in vitro de células tronco mesenquimais derivadas do epitélio amniótico, tecido adiposo e polpa de dente decíduo humano.** 2009. 70F. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). UEFS/FIOCRUZ.
 - NOLLA, C. M. The development of the permanent teeth. **J. Dent. Child**, v. 27, p. 254-266, 1960.
 - NONAKA, C. F.; WEEGE; G. F.; JOÃO AUGUSTO V.; COSTA, A. L. P.; GALVÃO, H. C.; CARVALHO, R. A.. Histologia da polpa dentária - uma revisão dos achados atuais / Pulp histology - A review of the present aspects. **Brás. Patol. Oral**, v. 4, n. 1, p. 42-49, 2005.

- NORDSTRÖM, E.G.; KARLSSON, K.H. Carbonate-doped hydroxyapatite. **J. Mater. Med**, v. 1, n.3, p. 182-184, 1990.
- ODORICO, J. S.; KAUFMAN, D. S.; THOMSON, J. A. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. **Stem Cells**, v. 19, n. 3, p. 193-204, 2001.
- OH, C. H.; HONG, S. J.; JEONG, I.; YU, H. S.; JEGAL, S. H.; KIM, H. W. Development of robotic dispensed bioactive scaffolds and human adipose-derived stem cell culturing for bone tissue engineering. **Tissue Eng Part C Methods.**, v. 16, n. 4, p. 561-571, 2010.
- OHARA, G. H.; KOJIMA, K. E.; ROSSI, J. C.; TELLES, M.; SOARES, T.V.C, SALOMÃO, C.; SANDRA, M. Estudo experimental da biocompatibilidade do polímero poliuretano da mamona implantada intra-óssea e intra-articular em coelhos. **Acta Orthop Bras.**, v. 3, p. 62-68, 1995.
- OLIVIER, V.; FAUCHEUX, N.; HARDOUIN, P. Biomaterial challenges and approaches to stem cell use in bone reconstructive surgery. **DDT**, v. 9, n. 18, p. 803-811, 2004.
- ORBAN, J.M. *et al.* Composition options for tissue-engineered bone. **Tissue Eng.**, v. 8, n. 4, p. 529–539, 2002.
- ORSI, V. V.; COLLARES, M. V. M.; NARDI, N. B.; PINTO, R. A.; MEIRELLES, L. S.; MEURER, L.; PILLA, C.; PORTINHO, C. P; RIBOLDI, M.; AULER, T. B. Bovine non-demineralized lyophilized bone with mesenchymal stem cells for tissue engineering: experimental study in heterotopic sites. **Rev Soc Bras Cir Craniomaxilofac**, v. 10, n. 4, p. 133-9, 2007.
- PARK, S.H.; BROOKS, S.L.; OH, T.H.; WANG H.L. Effect of ridge morphology on guided bone regeneration outcome: conventional tomographic study. **J Periodontol.**, v. 80, n. 8, p. 1231-6, 2009.
- PENG, H., A. USAS, A. OLSHANSKI, *et al.*. VEGF improves, whereas sFlt1 inhibits, BMP2-induced bone formation and bone healing through modulation of angiogenesis. **J. Bone Miner. Res.**, v. 20, p. 2017–2027, 2005.
- PEREIRA-JUNIOR, O. C.; RAHAL, S. C; IAMAGUTI, P.; FELISBINO, S. L.; PAVAN, P. T.; VULCANO, L. C. Comparison Between Polyurethanes Containing Castor Oil (Soft Segment) and Cancellous Bone Autograft in the

- Treatment of Segmental Bone Defect Induced in Rabbits. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 21, n. 3, p. 283-297, 2007.
- PERRY B.C., ZHOU D., WU X., YANG F..C, BYERS M..A, CHU T.M, HOCKEMA J.J., WOODS E.J., GOEBEL W.S. Collection, cryopreservation, and characterization of human dental pulp-derived mesenchymal stem cells for banking and clinical use. **Tissue Eng Part C Methods.**, v. 14, n. 2, p. 149-56. 2008.
 - PIERI, F.; LUCARELLI, E.; CORINALDESI, G.; IEZZI, G.; PIATTELLI, A.; GIARDINO, R.; BASSI, M.; DONATI, D.; MARCHETTI, C. Mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma enhance bone formation in sinus grafting: a histomorphometric study in minipigs. **J Clin Periodontol**, v. 35, p. 539–546, 2008.
 - PITTENGER, M.F.; *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v. 284, p. 143-147, 1999.
 - PRADO, F. A.; ANBINDER, A .L.; JAIME A. P. G; LIMA, A. P.; BALDUCCI, I; ROCHA, R. F . Defeitos ósseos em tíbias de ratos: padronização do modelo experimental. **Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo**, v. 18, n. 1, p. 7-13, 2006.
 - PRENTICE, D.A.; TARNE, G. Treating Diseases with Adult Stem Cells. **Science**, v. 315, n. 5810, p. 328, 2007.
 - PROBST, A.; SPIEGEL, H. U. Cellular mechanisms of bone repair. **J Invest Surg.**, v. 10, n. 3, p. 77-86, 1997.
 - QUEIROZ, C. S.; SARMENTO, V. A.; VASCONCELOS, S. J. A. Estudo comparativo entre a fixação interna e a fixação intrmaxilar no reparo ósseo de fraturas mandibulares por meio de avaliação da média dos níveis de cinza em radiografias digitais. **ABO Nac.**, v. 19, n. 1, p. 44-48, 2010.
 - RAUCCI MG, D'ANTÒ V, GUARINO V, SARDELLA E, ZEPPESELLI S, FAVIA P, AMBROSIO L. Biomaterialized porous composite scaffolds prepared by chemical synthesis for bone tissue regeneration. **Acta Biomater.** v. 6, n. 10, p. 4090-9, 2010.
 - REDDI, A. H. Bone morphogenetic proteins: an unconventional approach to isolation of first mammalian morphogens. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v. 8, n. 1, p. 11-20, 1997.

- REICHERT, C.; AL-NAWAS, B.; SMEETS, R.; KASAJ, A.; R GÖTZ, W.; KLEIN, M. In vitro proliferation of human osteogenic cells in presence of different commercial bone substitute materials combined with enamel matrix derivatives. **Head & Face Medicine**, v. 5, n. 23, 2009.
- RICARDO, S. D.; DEANE, J. A. Adult stem cells in renal injury and repair. **Asian Pacific Society of Nephrology**, v. 10, p. 276–282, 2005.
- RICE, C. M.; HALFPENNY, C. A.; SCOLDING, N. J. Stem cells for the treatment of neurological disease. **Transfusion Medicine**, v. 13, p. 351–361, 2003.
- RISBUD, M. V.; SHAPIRO, I. M. Stem cells in craniofacial and dental tissue engineering. **Orthod Craniofacial Res**, v. 8, n. 2, p. 54–59, 2005.
- ROMANOV, Y.A., SVINTSSISKAYA, V.A, SMIRNOV, V.N. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from human umbilical cord blood. **Stem Cells**, v. 21, p. 105-110, 2003.
- SABETRASEKH, R.; TIAINEN, H.; LYGSTADAAS, S. P.; RESELAND, J., HAUGEN H. A Novel Ultra-porous Titanium Dioxide Ceramic with Excellent Biocompatibility. **J Biomater Appl**. 2010. [Epub ahead of print].
- SALVADÈ, A; DELLA MINA, P.; GADDI, D.; GATTO, F.; VILLA, A.; BIGONI, M.; PERSEGHIN, P.; SERAFINI, M.; ZATTI, G.; BIONDI, A.; BIAGI, E. Characterization of platelet lysate cultured mesenchymal stromal cells and their potential use in tissue-engineered osteogenic devices for the treatment of bone defects. **Tissue Eng Part C Methods.**, v. 16, n. 2, p. 201-214, 2010.
- SALVI, G. E.; BRÄGGER, U. . Mechanical and technical risks in implant therapy. **J Oral Maxillofac Implants**, v. 24, p. 69-85, 2009.
- SAMEE, M.; KASUGAI, S.; KONDO, H.; OHYA, K.; SHIMOKAWA, H.;KURODA, S. Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) and Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Transfection to Human Periosteal Cells Enhances Osteoblast Differentiation and Bone Formation. **J Pharmacol Sci**, v. 108, p. 18–31, 2008.
- SANTERRE, J. P.; WOODHOUSE, K.; LAROCHE, G.; LABOW, R. S. Understanding the biodegradation of polyurethanes: from classical implants to tissue engineering materials. **Biomaterials**, v. 26, n. 35, p. 7457-70, 2005.

- SANTOS, R. R.; SOARES, M. B. P.; CARVALHO, A. C. C. transplante de células da medula óssea no tratamento da cardiopatia chagásica crônica. **Rev Bras Med Trop.**, v. 37, n. 6, p. 490-495, 2004.
- SARMENTO, V. A.; LAMBERTI, P. L. R; MEGA ROCHA, J. R.; GURGEL, C. A. S. Avaliação do emprego de ferramentas digitais na detecção radiográfica de lesão periapical artificialmente produzida, em radiografias obtidas de filmes de diferentes sensibilidades. **Rev. odonto ciênc.** v. 20, n. 48, p. 163-169, 2005.
- SCHMITZ, J. P.; HOLLINGER, J.O. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. **Clin Orthop**, p. 205, 1986.
- SCHUKERT, K. H.; JOPP, S.; OSADNIK, M. Modern Bone Regeneration Instead of Bone Transplantation: A Combination of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 and Platelet-Rich Plasma for the Vertical Augmentation of the Maxillary Bone-A Single Case Report. **Tissue Eng. Part C Methods**, 2010 Apr 26. [Epub ahead of print].
- SEO, B. M.; SONOYAMA, W.; YAMAZA, T.; COPPE, C; KIKUIRI, T; AKIYAMA, K; LEE, J. S; SHI, S. SHED repair critical-size calvarial defects in mice. **Oral Diseases**, v. 14, p. 428–434, 2008.
- SEPÚLVEDA, P.; PANDOLFELLI, V. C.; ROGERO, S. O.; HIGA, O. Z.; BRESSIANI, J. C. Hidroxiapatita porosa produzida através do gelcasting de espumas visando aplicações biomédicas. **Cerâmica**, v. 45, n. 296, p.6-15, 1999.
- SHI, S.; GRONTHOS, S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. **J Bone Miner Res.**, v. 18, p. 696-704, 2003.
- SINGH, P.; KAUSHIK, A.; GUPTA, P. Characterization of Castor Oil and Diphenyl Methane Diisocyanate-based Polyurethane–Polystyrene Interpenetrating Networks. **Journal of REINFORCED PLASTICS AND COMPOSITES**, v.. 24, n. 14, 2005.
- SIYU, N. I.; CHANG, J. *In vitro* Degradation, Bioactivity, and Cytocompatibility of Calcium Silicate, Dimagnesium Silicate, and Tricalcium

- Phosphate Bioceramics. **Journal Of Biomaterials Applications**, v. 24, p. 139-158, 2009.
- SNYKERS, S.; *et al.* In vitro differentiation of embryonic and adult stem cells into hepatocytes: state of the art. **Stem Cells**, v. 27, n. 3, p. 577-605, 2009.
 - SOARES, A. P.; KNOP, L. A. H.; JESUS, A. A.; ARAÚJO, T. M. Células-tronco em Odontologia. **R Dental Press Ortodon Ortop Facial.**, v. 12, n. 1, p. 33-40, 2007.
 - SOARES, M.B.P.; LIMA, R.S.; ROCHA, L.L.; TAKYIA, C.M.; PONTES-DE-CARVALHO, L.C.; CARVALHO, A.C.C.; SANTOS, R. R. Transplanted bone marrow cells repair heart tissue and reduce myocarditis in chronic chagasic mice. **American Journal of Pathology**, v. 164, n. 2, p. 441-447, 2004.
 - SOLTER, D. From teratocarcinomas to embryonic stem cells and beyond: a history of embryonic stem cell research. **Nat. Rev. Genet.**, v. 7, n. 4, p. 319-327, 2006.
 - SOUZA, L. M.; TOLEDO, O. A.; BRÍGIDO, M. M. **Caracterização de células-tronco de polpa dental humana obtida de dentes decíduos e permanentes.** 2008. 126f. Dissertação (mestrado em Ciências da Saúde). Universidade de Brasília. Brasil.
 - STEINHARDT, Y.; ASLAN, H.; REGEV, E.; ZILBERMAN, Y; KALLAI, I.; GAZIT, D.; GAZIT, Z. Maxillofacial-Derived Stem Cells Regenerate Critical Mandibular Bone Defect. **TISSUE ENGINEERING: Part A.**, v.14, n. 11, p. 1763-1772, 2008.
 - STENDERUP, K.; *et al.* Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. **Bone**, v. 33, n. 6, p. 919-926, 2003.
 - TAKAHASHI, N.; AKATSU, T.; UDAGAWA, N.; *et al.* Osteoblastic cells are involved in osteoclast formation. *Endocrinology*, v. 123, p.2600-2, 1988.
 - TEITELBAUM, S. L.; ABU-AMER, Y.; ROSS, F. P. Molecular mechanisms of bone resorption. **J Cell Biochem.**, v. 59, p.1-10, 1995.
 - THOMSON, J.A.; *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science**, v. 282, p. 1145-1147, 1998.

- TOMA, J.G.; *et al.* Isolation of multipotent adult stem cells from dermis of mammalian skin. **Nat. Cell Biol.**, v. 3, p. 778-784, 2001.
- VERHEYEN, C. C. P. M.; KLEIN, C. P. A. T.; BLIECK-HOGERVORST, J. M. A.; VVOLKE, J. G. C.; BLITTERSWIJN, C. A.; GROOT, K.: Evaluation of hydroxylapatite/poly(L-lactide) composites: Physico-chemical properties **J. Mater. Sci.: Mater. Med.**, v. 4, p. 58-65, 1993.
- WENZ, B., OESCH, B.; HORST, M. Analysis of the risk of transmitting bovine spongiform encephalopathy through bone grafts derived from bovine bone. **Biomaterials**, v. 22, n. 12, p. 1599-1606, 2001.
- WOODS, E. J.; PERRY, B. C.; HOCKEMA, J. J.; LARSON, L.; ZHOU, D.; GOEBEL, W. S. Optimized cryopreservation method for human dental pulp-derived stem cells and their tissues of origin for banking and clinical use. **Cryobiology**, v. 59, n. 2, p. 150-7, 2009.
- XI, J.; ZHANG, L.; ZHENG, Z. A.; CHEN, G.; GONG, Y; ZHAO, N.; ZHANG, X. Preparation and evaluation of porous poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) hydroxyapatite composite scaffolds. **J Biomater Appl.** v. 22, n. 4, p. 293-307, 2008.
- YAMADA, Y; NAKAMURA, S; ITO, K; SUGITO, T.; YOSHIMI, R.; NAGASAKA, T; UEDA, M. A feasibility of useful cell-based therapy by bone regeneration with deciduous tooth stem cells, dental pulp stem cells, or bone marrow-derived mesenchymal stem cells for clinical study using tissue engineering technology. **Tissue Engineering, Part A.**, v. 16, n. 6, p. 1891-1900, 2010.
- YANG, L *et al.* *In vivo* trans-differentiation of adult hepatic stem cells into pancreatic endocrine hormone-producing cells. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 99, p. 8078-8083, 2002.
- YOUNG, M. J. Stem cells in the mammalian eye: a tool for retinal repair. **APMIS.**, v. 113, p. 845–57, 2005.
- YOUNG, S.; PATEL, Z. S.; KRETLOW, J. D.; MURPHY, M. B.; MOUNTZIARIS, P. M.; BAGGETT, L. S.; UEDA, H.; TABATA, Y.; JANSEN, J. A.; WONG. M.; MIKOS, A. G. Dose effect of dual delivery of vascular endothelial growth factor and bone morphogenetic protein-2 on bone

- regeneration in a rat critical-size defect model. **Tissue Eng Part A.**, v. 15, n. 9, p. 2347-62, 2009.
- ZAFIROPOULOS, G. G.; HOFFMANN, O.; KASAJ, A.; WILLERSHAUSEN, B.; WEISS, O.; VAN DYKE, T.E. Treatment of intrabony defects using guided tissue regeneration and autogenous spongiosa alone or combined with hydroxyapatite/beta tricalcium phosphate bone substitute or bovine-derived xenograft. **J Periodontol**, v. 78, p. 2216-2225, 2007.
 - ZHANG, Q.; MOCHALIN, V. N.; NEITZEL, I.; KNOKE, I. Y.; HAN, J.; KLUG, C. A.; ZHOU, J. G.; LELKES, P. I.; GOGOTSI, Y. Fluorescent PLLA-nanodiamond composites for bone tissue engineering. **Biomaterials.**, 2010 Sep 23. [Epub ahead of print].
 - ZHANG, W.; X. WALBOOMERS, F.; VAN OSCH, G.; VAN DEN DOLDER, J.; JANSEN, J. A. Hard tissue formation in a porous ha/tcp ceramic scaffold loaded with stromal cells derived from dental pulp and bone marrow. **Tissue Engineering Part A**, v. 14, n. 2, 2008.
 - ZHANG, W.; SHEN, Y.; PAN, H.; LIN, K.; LIU, X.; DARVELL, B. W.; LU, W. W.; CHANG, J.; DENG, L.; WANG, D.; HUANG, W. Effects of strontium in modified biomaterials. **Acta Biomater.** 2010 Sep 3. [Epub ahead of print].
 - ZHU, Y. *et al.* Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC. **Cell. Biochem. Funct.**, v. 26, n. 6, p. 664-675, 2008.
 - ZUK, P.A. *et al.* Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue Eng.**, v. 7, p. 211-228, 2001.
 - ZWAHLEN, R. A.; CHEUNG, L. K.; ZHENG, L. W.; CHOW, R. L.; LI, T.; SCHUKNECHT, B; GRÄTZ, K. W.; WEBER, F. E. Comparison of two resorbable membrane systems in bone regeneration after removal of wisdom teeth: a randomized-controlled clinical pilot study. **Clin Oral Implants Res.**, v. 20, n. 10, p. 1084-91, 2009.

ANEXOS

ARTIGO 1

Alan Araujo de Jesus*, Milena Botelho Pereira Soares**, Ana Prates Soares***, Renata Campos Nogueira****, Elisalva Teixeira Guimarães*****, Telma Martins de Araujo*****, Ricardo Ribeiro dos Santos***** Collection and culture of stem cells derived from dental pulp of deciduous teeth: Technique and clinical case report **Dental Press J Orthod**, v.16, n. 6, p. 111-118, 2011.

ORIGINAL ARTICLE

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43

Collection and culture of stem cells derived from dental pulp of deciduous teeth: Technique and clinical case report

Alan Araujo de Jesus*, Milena Botelho Pereira Soares**, Ana Prates Soares***, Renata Campos Nogueira****, Elisalva Teixeira Guimarães*****, Telma Martins de Araujo*****, Ricardo Ribeiro dos Santos*****

44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86

Abstract

Introduction: Stem cells (SCs) are capable of inducing tissue regeneration and are, therefore, potentially therapeutic. Similarly to bone marrow and umbilical cords, dental pulp is one of the available sources of SCs. The fact that these cells are easily accessible and that deciduous teeth are not vital organs, and are normally discarded after exfoliation, make them particularly attractive for use in safety and viability tests. **Objective:** To describe the collection, isolation and culture of SCs obtained from the pulp of deciduous teeth as well as their characterization by flow cytometry, and the induction of differentiation into osteogenic and adipogenic lineages. **Methods:** SCs were obtained in a relatively straightforward manner and showed good proliferative capacity, even from a small amount of pulp tissue. **Results:** Analysis by flow cytometry confirmed the characteristics of mesenchymal SCs with low expression of CD34 and CD45 antigens, which are markers for hematopoietic cells, and high levels of expression of CD105, CD166, CD90 and CD73 antigens, which are markers for mesenchymal SCs. Cell plasticity was confirmed by identifying calcium deposits in cultures that received osteogenic medium, and intracellular lipid accumulation in adipogenic cultures that received adipogenic medium. **Conclusions:** SCs collected from deciduous teeth show promising potential for application in tissue regeneration. Therefore, it is important that knowledge about the existence and characteristics of this source of stem cells be disseminated among dentists and that the technique, its limitations and possible indications are highlighted and discussed.

Keywords: Stem cells. Tissue therapy. Cell culture techniques. Deciduous teeth.

How to cite this article: Jesus AA, Soares MBP, Soares AP, Nogueira RC, Guimarães ET, Araujo TM, Santos RR. Collection and culture of stem cells derived from dental pulp of deciduous teeth: Technique and clinical case report. *Dental Press J Orthod*. 2011 Nov-Dec;16(6):110-7.

* The authors report no commercial, proprietary, or financial interest in the products or companies described in this article.

* PhD in Biotechnology, Federal University of Pernambuco (UFPE) / Oswaldo Cruz Institute Foundation (FIOCRUZ).

** Head Researcher, FIOCRUZ, Bahia. Head of the Tissue Engineering and Immunopharmacology Laboratory (LITE).

*** Dentist.

**** MSc in Biotechnology, UFPE / FIOCRUZ.

***** PhD in Pathology, FIOCRUZ, Bahia.

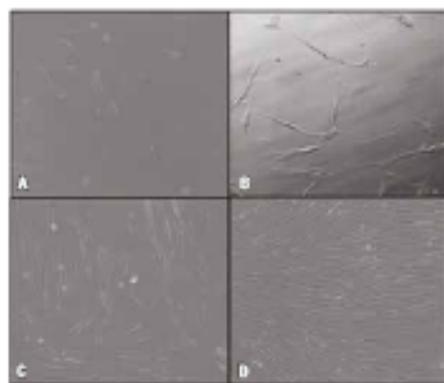
***** Head Professor in Orthodontics, Federal University of Bahia (UFBA), President of the Brazilian Board of Orthodontics and Facial Orthopedics (BBO).

***** Head Researcher of the Gorgolho Morais Research Center, FIOCRUZ, Bahia. Head of Basic Research São Rafael Hospital (HSR).

87	INTRODUCTION	
88	Science has taken a keen interest in stem cells	130
89	(SCs) given their ability to stimulate tissue re-	131
90	generation, which raises exciting and promising	132
91	therapeutic prospects. ¹⁻¹² This fact makes SCs a	133
92	viable alternative in dentistry. ¹⁴ However, there	134
93	are still limitations in how they are obtained, grow	135
94	and controlled in terms of proliferation and dif-	136
95	ferentiation, which encourages the search for new	137
96	sources, techniques and applications.	138
97	SCs can have an embryonic or adult origin. ^{2,6,15}	139
98	Adult SCs are present in a wide range of tissues	140
99	such as the pancreas, bone marrow, adipose tis-	141
100	sue and umbilical cord. Because they are obtained	142
101	from the patients themselves, these cells have the	143
102	advantages of not triggering immune rejection, re-	144
103	sponding to growth factors inherent in the host,	145
104	and not incurring ethical or moral objections. ⁶	146
105	The foundation for cell therapy is the isolation	147
106	of high quality adult human SCs from different	148
107	sources as these cells feature peculiar character-	149
108	istics, and there may be preferred SC sources for	150
109	each specific need. ^{16,12,17}	151
110	Recently, it has been discovered a new source	152
111	of SCs deriving from the pulp of deciduous	153
112	teeth. The fact that these cells are easily acces-	154
113	sible and that deciduous teeth are not vital or-	155
114	gans, being normally discarded after exfoliation,	156
115	make them attractive for safety and viability	157
116	tests. Studies conducted with these cells under-	158
117	score their outstanding capacity to proliferate	159
118	and induce tissue regeneration ^{12,17,18,19} although	160
119	limitations still exist regarding the amount of	161
120	available cells as well as the techniques used for	162
121	SC collection and culture. ^{16,20}	163
122	Although there is still the need to standardize	164
123	techniques and to conduct clinical studies in or-	165
124	der to determine their potential application, this	166
125	study aims to disseminate among dentists knowl-	167
126	edge about SCs obtained from the pulp of decidu-	168
127	ous teeth, discussing the technique, its limitations	169
128	and possible therapeutic potential through the	170
129	description of a technique and a clinical case re-	171
	port. This will allow professionals to inform pa-	172
	tients and/or their legal guardians that although	
	this is still an experimental technique it shows	
	promise and that this tissue — which is usually	
	discarded — can be collected and cryopreserved	
	for future use.	
	TECHNIQUE AND CLINICAL CASE REPORT	
	Tissue collection	
	An eight-year-old female patient with mixed	
	dentition has been monitored since five years old	
	by an orthodontist and was selected as pulp tis-	
	sue donor after authorization by her legal guard-	
	ians. Radiographic and photographic exams were	
	requested and, in conjunction with the orthodon-	
	tist, teeth 6.3, 7.3, 7.5 and 8.3 were defined as tar-	
	gets as they were in the phase of exfoliation and	
	did not show any carious lesions.	
	The surgery was performed in two stages with	
	a 15-day interval. The procedure requires strict	
	control of the aseptic chain due to widespread	
	presence of microorganisms in the oral environ-	
	ment. Extraoral asepsis and intraoral prophylaxis	
	were performed and 2% chlorhexidine rinses ap-	
	plied. Next, infiltrating and gingival anesthesia	
	was applied, followed by syndesmotomy and re-	
	moval of the teeth with a pedodontic forceps as	
	quickly as possible to avoid saliva contamination.	
	Soft tissue remnants were removed and the teeth	
	were immediately placed in individual containers	
	filled with Dulbecco Modified Eagle medium —	
	DMEM — (Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo,	
	USA) culture medium with 50 mg/ml of genta-	
	micin (Novafarma, Anápolis, Brazil), stored under	
	controlled temperature, between 4 °C and 8 °C,	
	and sent to a laboratory for cell isolation.	
	Isolation, selection and expansion	
	of mesenchymal SCs	
	The entire procedure of pulp removal and	
	cell culture was performed in a vertical laminar	
	flow unit. Whenever necessary, access to the pulp	
	chamber was made using diamond discs (KG	

173 Sorensen, São Paulo, Brazil] at low speed, under
 174 constant irrigation, and the pulp tissue removed
 175 with the aid of curettes and endodontic files. Only
 176 a small amount of pulp tissue was obtained. One
 177 of the four deciduous teeth extracted no longer
 178 contained pulp tissue and the others had a small
 179 amount of pulp. Therefore, few cells were available
 180 to begin cultivation. Once collected, the tissue
 181 was immediately placed in culture bottles contain-
 182 ing (DMEM) supplemented with 10% fetal
 183 bovine serum (FBS - Cultilab, Campinas, Brazil)
 184 and stored at 37 °C and 5% CO₂ for cell prolif-
 185 eration and adherence to the bottle. The medium
 186 was completely replaced every three days during
 187 a period of approximately 10 days, when culture
 188 reached about 80-90% confluence. The culture
 189 was monitored by means of an inverted optical
 190 microscope. After adherence to the plastic surface,
 191 SCs initially exhibited an ovoid shape that evolved
 192 early during the first 24 hours to a fibroblastoid
 193 form, which remained until confluence (Fig 1). As
 194 the culture was replaced, the adherent mesenchy-
 195 mal SCs were selected while cells suspended in
 196 culture medium were gradually discarded.

197 After culture confluence cells were released



198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
 FIGURE 1 - Light microscopy follow-up of primary culture of SCs derived from deciduous teeth. A) Scattered cells still showing a rounded shape. B) Cells with fibroblastoid features after 72 hours of culture. C) Stabilization of cell morphology and increased proliferation. D) Culture with total confluence.

216 from the plastic surface to allow the continued pro-
 217 liferation and cryopreservation of part of the cells.
 218 To release the cells, the medium was replaced twice
 219 with sterile saline solution and, after removing the
 220 saline solution, 0.25% trypsin (Invitrogen, São Pau-
 221 lo, Brazil) was added for 2-5 minutes to allow the
 222 connections between cells and extracellular matrix
 223 to be broken, thereby enabling the detachment of
 224 cells from the surface of the plastic culture flask.

225 After ascertaining that cells had been released
 226 through observation with an inverted optical mi-
 227 croscope, the enzyme was inactivated by adding
 228 a complete medium. The medium of the bottle
 229 containing the cells was then collected using a
 230 pipette and centrifuged at 1500 rpm for 10 min-
 231 utes. The supernatant was discarded and the cell
 232 pellet resuspended in 1 mL of DMEM suppl-
 233 emented with 10% fetal bovine serum (FBS). At
 234 this point, some of the cells were set aside for
 235 cryopreservation in liquid nitrogen for further
 236 studies and potential therapeutic uses, while the
 237 remaining was used for continuity of culture, al-
 238 lowing *in vitro* characterization.

239 For cryopreservation, the maximum concen-
 240 tration of 106-107 cells per tube was observed,
 241 with a final volume of 1 mL being added, i.e.,
 242 900 µL of complete medium containing cells and
 243 100 µL of dimethyl sulfoxide (DMSO). Cryo-
 244 preservation tubes had their cryostatic tempera-
 245 ture lowered, ranging from 4 to -80 °C for 24 h,
 246 with subsequent storage in liquid nitrogen.

247 Characterization of mesenchymal SCs

248 Cell characterization was performed by anal-
 249 ysis of flow cytometry and confirmation of cell
 250 plasticity through the induction of differentiation
 251 into osteogenic and adipogenic lineages.

252 Flow cytometry

253 The sample cells were labeled with specific
 254 monoclonal antibodies linked to fluorochromes.
 255 Reading was performed in a flow cytometer. The
 256 following antibodies were used: FITC anti-human
 257
258

259 CD90, APC anti-human CD45, PE anti-human
260 CD166, PE anti-human CD73 (BD PharMingen),
261 PE anti-human CD34 (Becton Dickinson) and
262 FITC anti-human CD105 (R&D Systems).

263 Cells with less than 100% confluence were
264 trypsinized as described above. Immediately after
265 detachment, cells were resuspended in DMEM
266 supplemented with 10% FBS and remained at rest
267 in the oven for 2 hours. After the rest period, the
268 cells were washed twice with saline at 4 °C, at
269 3000 rpm for 2 minutes at 10 °C and resuspended
270 in 1 mL of saline solution. Two-hundred µL of the
271 solution were placed in tubes which received 2 µL
272 of antibodies. The tubes were incubated at 4 °C in
273 the dark for 30 minutes and washed twice with
274 saline at 4 °C (1 mL) by centrifugation at 2000
275 rpm, 10 °C for 2 minutes. After this procedure,
276 CellQuest software was used for data acquisition
277 and analysis with a FACSCalibur flow cytometer
278 (Becton Dickinson, San Diego, CA, USA). At least
279 50,000 events were collected and analyzed.

280 Results confirmed the characteristics of mes-
281 enchymal SCs (Table 1) with low level expression
282 of CD34 and CD45 antigens, which are markers
283 for hematopoietic cells, and high levels of expres-
284 sion of CD105, CD166, CD90 and CD73 anti-
285 gens, which are markers for mesenchymal SCs.²⁰

287 Osteogenic differentiation

288 The cells were cultivated in a 24-well plate
289 in DMEM supplemented with 10% fetal bovine

302 serum for two days until 50% confluence was
303 reached. From this point on, osteogenesis in-
304 ducing medium was employed, which is com-
305 posed of: DMEM containing 10% fetal bovine
306 serum, 100 nM dexamethasone, 0.05 mM of
307 L-ascorbic acid 2 - phosphate and 10 mM of
308 β-glycerophosphate (Sigma-Aldrich, USA). Cul-
309 ture time was 21 days. Control group cells were
310 grown in DMEM supplemented with 10% fetal
311 bovine serum. The experiments were conducted
312 in triplicate, culture medium was changed every
313 three days and the evolution of differentiation
314 was monitored daily by light microscopy.

315 Osteogenic differentiation capacity was veri-
316 fied by alizarin red staining, which identifies the
317 deposition of calcium in the culture. After 21 days
318 of cultivation, the cultures were washed with PBS,
319 fixed with 4% paraformaldehyde (Electron Mi-
320 croscopy Sciences, USA) for 30 minutes, washed
321 twice with distilled water, and 2% alizarin red
322 staining was applied (Sigma-Aldrich, USA) for
323 three minutes. After removing the alizarin, the
324 cultures were washed three times with distilled
325 water to remove residue and the stained areas
326 were analyzed with optical microscopy to confirm
327 color and quality evaluation.

328 In all cultures that received osteogenic me-
329 dium, red calcium deposition was found due to
330 staining with alizarin, whereas in the negative
331 control group calcium deposits were not found in
332 any of the wells, confirming the plasticity of the
333 cultured cells (Fig 2).

335 Adipogenic differentiation

336 The cells were cultivated in a 6-well plate in
337 DMEM supplemented with 10% fetal bovine se-
338 rum until 100% confluence was reached. They
339 were then stimulated for up to three weeks with
340 modified DMEM containing: 10% fetal bovine se-
341 rum, 60 µM of indomethacin (Sigma - Aldrich),
342 0.5 µM of isobutylmethylxanthine (Sigma - AL-
343 drich) and 0.5 µM hydrocortisone (Sigma - AL-
344 drich). Throughout the experiments a control

293 TABLE 1 - Analysis by flow cytometry of SCs collected from decidua-
294 rous teeth. Percentage of cells positive for CD90, CD73, CD34, CD45,
295 CD166 and CD105 in the total population.

296 MARKERS	297 CYTOMETRY
298 CD 90	99.92%
299 CD 73	99.95%
300 CD 34	0.08%
301 CD 45	2.4%
CD 166	96.8%
CD 105	97%

group was maintained cultivated in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum. The culture medium was replaced every three days.

The evolution of differentiation was monitored daily under an inverted microscope. To allow observation of fat deposition the wells were washed with PBS, cells were fixed with 4% PFA for 1 hour at room temperature, stained with Oil Red O solution (Sigma - Aldrich) (3 volumes of 3.75% Oil Red O in isopropanol and 3 volumes of distilled water) for 5 minutes and washed with distilled water to remove residue.

After 14 days intracellular lipid accumulation were found in the culture, confirming the plasticity of the cultured cells (Fig 3), whereas in the negative control group droplets were not found in any of the wells.

DISCUSSION

The scientific community has conducted research that underscores the importance and prospects of therapy with SCs in several areas, such as medullary damage,²² neurological changes, such as in Parkinson's⁸ and Alzheimer's diseases,²¹

autoimmune diseases such as diabetes type 1,^{15,5} liver diseases,⁷ kidney damage,⁷ and retina degeneration.²² In some cases, such as coronary heart disease, consistent clinical results have already been found,^{9,10} indicating SCs safety and viability.

In dentistry, experiments have focused on the use of cell therapy in oral tissue regeneration^{12,14,23} and on the collection, isolation, culture and characterization of SCs derived from the pulp of teeth.^{16-18,24} Some studies indicate that the SCs obtained from deciduous teeth have greater regenerative and proliferative potential when compared to permanent teeth,^{16,17,18} besides being more easily accessible. Furthermore, deciduous teeth are not vital organs and are usually disposed after exfoliation. It is conjectured that SCs from different sources may have different characteristics and therefore specific indications for therapeutic application.

Exfoliation of deciduous teeth, however, is one of the factors hindering their use as it limits the time during which deciduous teeth remain available, i.e., from 6 to about 12 years of age.²⁵ This hurdle can be circumvented by informing the

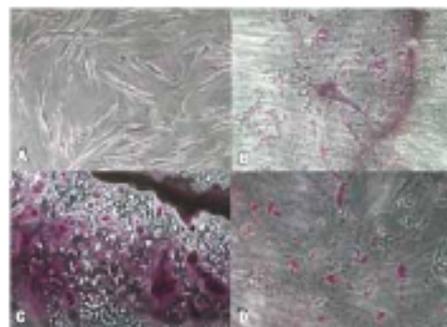


FIGURE 2 - Induction of differentiation of SCs collected from deciduous teeth cultured with osteogenic medium. Analysis by optical microscopy of calcium deposits stained with Alizarin red after 21 days of culture. A) Negative control with DMEM with no calcium deposits. B-C) cell differentiation in osteogenic induction medium, confirmed by presence of calcium deposits stained with Alizarin red.

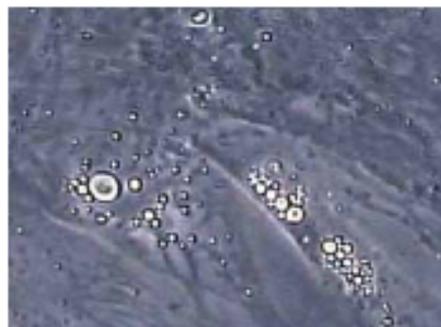


FIGURE 3 - Induction of differentiation of SCs collected from deciduous teeth cultured with adipogenic medium. Analysis by optical microscopy of intracellular lipid accumulation after 14 days of culture, confirming differentiation.

431 patient's legal guardian that tissue can be collect- 474
 432 ed during the exfoliation period while the cells 475
 433 can be cultivated and kept by cryopreservation in 476
 434 liquid nitrogen. This technique is well established 477
 435 and described in the literature, and allows the 478
 436 maintenance of SC characteristics.^{26,27} 479
 437 There have been recent attempts at cryo- 480
 438 preservation of dental pulp, or even of the whole 481
 439 tooth — instead of just SCs — with the purpose 482
 440 of thawing and growing them at a later date.^{28,29} 483
 441 Once proved that these cells do not change with 484
 442 time, either in quality or quantity in this process of 485
 443 tissue (not SCs) cryopreservation, storage would 486
 444 be simpler and cheaper as lab cultures would only 487
 445 be performed when the use of cells was indicated, 488
 446 thereby saving time, reagents and personnel re- 489
 447 quiring a simpler laboratory structure. 490
 448 In this study, the technique for collecting and 491
 449 cultivating SCs obtained from deciduous teeth 492
 450 proved to be relatively simple and fast. However, 493
 451 there was only a small amount of pulp tissue to 494
 452 start the cell culture. This condition can pose an ob- 495
 453 stacle to the effective therapeutic use of SCs since 496
 454 a longer time may be required for cell culture and 497
 455 divisions, which can lead to changes in the charac- 498
 456 teristics of these cells.²⁰ Thus, an alternative solu- 499
 457 tion to this shortcoming would be to request the 500
 458 evaluation and monitoring of patients with mixed 501
 459 dentition by an orthodontist, who would indicate a 502
 460 greater number of tooth extractions without inter- 503
 461 fering with the normal development of dentition. 504
 462 Another problem to be avoided given the char- 505
 463 acteristics of the oral environment is the risk of 506
 464 507
 465 508
 466 509
 467 510
 468 511
 469 512
 470 513
 471 514
 472 515
 473 516

contamination of cultures by microorganisms.^{28,29}

In addition to the typically careful handling inherent in cell culture techniques, it is necessary to observe criteria such as absence of extensive carious lesions in the selected teeth, control of the aseptic chain during surgical procedure, and preventing that the pulp from the removed deciduous teeth has contact with oral fluids. Selected teeth should be in an advanced stage of root resorption, but with intact junctional epithelium to avert prior contamination of the pulp tissue.

The American Academy of Pediatric Dentistry recently published a text²⁰ advising dentists to monitor the progress of investigations published about SCs collected from deciduous teeth so they can educate parents about the collection, cultivation, preservation and potential uses of these cells.

CONCLUSIONS

The technique for collecting and cultivating SCs obtained from deciduous teeth proved to be relatively simple and fast. Although very promising, the use of these cells is not yet suitable for everyday clinical use. Therefore, further *in vitro* and *in vivo* experiments and clinical studies are necessary to confirm SCs safety and viability. Nevertheless, this finding should be disseminated among dentists in order to make them aware of the potential of cell therapy and allow them to inform their patients and/or legal guardians about this source of stem cells, since tissue from deciduous teeth is only available for a short period of time.

REFERENCES

- 517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
1. Becker C, Jäke G. Stem cells for regeneration of urological structures. *Eur Urol*. 2007;51(5):1217-20. Epub 2007 Jan 18.
 2. Christou YA, Moore HD, Shaw PJ, Monk PH. Embryonic stem cells and prospects for their use in regenerative medicine approaches to motor neuron disease. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2007;33(5):485-93.
 3. Cummings BJ, Uchida N, Tamaki SJ, Anderson AJ. Human neural stem cell differentiation following transplantation into spinal cord injured mice: association with recovery of locomotor function. *Neural Res*. 2006;28(5):474-81.
 4. Krebsbach PH, Robey PG. Dental and skeletal stem cells: potential cellular therapeutics for craniofacial regeneration. *J Dent Educ*. 2002;66(2):766-73.
 5. Lechner A. Stem cells and regenerative medicine for the treatment of type 1 diabetes: the challenges lying ahead. *Pediatr Diabetes*. 2004;5 Suppl 2:88-93.
 6. Prentice DA, Tame G. Treating diabetes with adult stem cells. *Science*. 2007;315(5810):328.
 7. Ricardo SD, Deane JA. Adult stem cells in renal injury and repair. *Nephrology (Carlton)*. 2005;10(3):276-82.
 8. Rice CM, Halpenry CA, Scolding NJ. Stem cells for the treatment of neurological disease. *Transfus Med*. 2000;13(5):351-61.
 9. Santos RR, Soares MBP, Carvalho ACC. Transplante de células da medula óssea no tratamento da cardiopatia chagásica crônica. *Rev Bras Med Trop*. 2004;37(6):490-5.
 10. Soares MBP, Lima RS, Rocha LL, Talcia CM, Pontes-de-Carvalho LC, Carvalho ACC, et al. Transplanted bone marrow cells repair heart tissue and reduce myocarditis in chronic chagasic mice. *Am J Pathol*. 2004;164(2):441-7.
 11. Zhan Y, Wang Y, Wei L, Chen H, Cong X, Fei R, et al. Differentiation of hematopoietic stem cells into hepatocytes in liver fibrosis in rats. *Transplant Proc*. 2006;38(9):3082-5.
 12. Yamada Y, Nakamura S, Ito K, Sugito T, Yoshimi R, Niigasaki T, et al. A feasibility of useful cell-based therapy by bone regeneration with deciduous tooth stem cells, dental pulp stem cells, or bone marrow-derived mesenchymal stem cells for clinical study using tissue engineering technology. *Tissue Eng Part A*. 2010;16(6):1891-900.
 13. Lysn AC, Soares MB, da Silva LJ, Pontes MF, Silva AG, Mota AC, et al. Feasibility and safety of autologous bone marrow mononuclear cell transplantation in patients with advanced chronic liver disease. *World J Gastroenterol*. 2007;13(7):1067-73.
 14. Soares AP, Knop LAH, Jesus AA, Araújo TM. Células-tronco em Odontologia. *Rev Dental Press Ortod Ortop Facial*. 2007;12(1):33-40.
 15. Mizuta-Lane H, Miralolocki M, James Shapiro AM, Lakay JR. Stem cell sources for clinical islet transplantation in type 1 diabetes: embryonic and adult stem cells. *Med Hypotheses*. 2006;67(4):909-13. Epub 2006 Jun 9.
 16. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, et al. Shed. Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(10):5807-12. Epub 2003 Apr 25.
 17. Nakamura S, Yamada Y, Katagiri W, Sugito T, Ito K, Ueda M. Stem cell proliferation pathways comparison between human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells by gene expression profile from promising dental pulp. *J Endod*. 2009;35(11):1536-42. Epub 2009 Sep 20.
 18. Koyama N, Okubo Y, Nakao K, Benito K. Evaluation of pluripotency in human dental pulp cells. *J Oral Maxillofac Surg*. 2009;67(3):501-6.
 19. Huang GT, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res*. 2009;88(9):792-806.
- 560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602

603	20. Nogueira RC. Isolamento, caracterização e análise da estabilidade clonogênica após expansão in vitro de células tronco mesenquimais derivadas do epitélio amelótico, tecido adiposo e polpa de dente decíduo humano [dissertação]. Feira de Santana (BA): Universidade Federal de Feira de Santana; 2009.	646
604	21. Maler JM, Spitzer P, Lewczuk P, Kornhuber J, Hermann M, Wittling J. Decreased circulating CD34 ⁺ stem cells in early Alzheimer's disease: evidence for a deficient hematopoietic brain support? <i>Mol Psychiatry</i> . 2006;11(12):1113-5.	647
605	22. Young MJ. Stem cells in the mammalian eye: a tool for retinal repair. <i>APMS</i> . 2005;113(11-12):545-57.	648
606	23. Batouli S, Mizra M, Ibrahim J, Tsuboi TR, Fisher LW, Gronthos S, et al. Comparison of stem-cell-mediated osteogenesis and dentinogenesis. <i>J Dent Res</i> . 2003;82(12):976-81.	649
607	24. Gronthos S, Ibrahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyd A, et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. <i>J Dent Res</i> . 2002;81(8):531-5.	650
608	25. Nolla CM. The development of the permanent teeth. <i>J Dent Child</i> . 1960;27:254-66.	651
609	26. Martinello T, Bronzini I, Maccatrozzo L, Iacopetti I, Sampaolosi M, Mascarello F, et al. Cryopreservation does not affect the stem characteristics of multipotent cells isolated from equine peripheral blood. <i>Tissue Engineering: Part C</i> . Forthcoming 2009.	652
610	27. Ding G, Wang W, Liu Y, An Y, Zhang C, Shi S, Wang S. Effect of cryopreservation on biological and immunological properties of stem cells from apical papilla. <i>J Cell Physiol</i> . 2010;223(2):415-22.	653
611	28. Perry BC, Zhou D, Wu X, Yang FC, Byam MA, Chu TM, et al. Collection, cryopreservation, and characterization of human dental pulp-derived mesenchymal stem cells for banking and clinical use. <i>Tissue Eng Part C Methods</i> . 2008;14(2):149-56.	654
612	29. Woods LJ, Perry BC, Hockema JJ, Larson L, Zhou D, Goebel WS. Optimized cryopreservation method for human dental pulp-derived stem cells and their tissues of origin for banking and clinical use. <i>Cryobiology</i> . 2009;59(2):150-7. Epub 2009 Jun 16.	655
613	30. American Academy of Pediatric Dentistry. Policy on stem cell. <i>Reference Manual</i> . 2008;31(4):54.	656
614		657
615		658
616		659
617		660
618		661
619		662
620		663
621		664
622		665
623		666
624		667
625		668
626		669
627		670
628		671
629		672
630		673
631		674
632		675
633		676
634		677
635		678
636		679
637		680
638		681
639		682
640		683
641		684
642		685
643		686
644		687
645		688

Submitted: February 21, 2011
 Revised and accepted: June 30, 2011

Contact address
 Alan Araujo de Jesus
 Av. ACM, 585, bloco A, sala 806
 41.825-000 - Salvador / BA - Brazil
 E-mail: araujoalan@yahoo.com.br

ARTIGO 2:

GUIMARAES, E. T.; Cruz, Gabriela Silva; de Jesus, Alan Araújo; Lacerda de Carvalho, Acácia Fernandes; Rogatto, Silvia Regina; Pereira, Lygia da Veiga; Ribeiro-dos-Santos, Ricardo; Soares, Milena Botelho Pereira. Mesenchymal and embryonic characteristics of stem cells obtained from mouse dental pulp. *Archives of Oral Biology* **JCR**, v. 15, p. 1-9, 2011.

Abstract

Recent studies have demonstrated that human dental pulp is a source of mesenchymal stem cells. To better to understand the biological properties of these cells we isolated stem cells from the dental pulp of EGFP transgenic mice. The pulp tissue was gently separated from the roots of teeth extracted from male C57BL/6 mice, and cultured under appropriate conditions. Flow cytometry, RT-PCR, light microscopy (staining for alkaline phosphatase) and immunofluorescence were used to investigate the expression of stem cell markers. The presence of chromosomal abnormalities was evaluated by GTG-banding. The mouse dental pulp stem cells (mDPSC) were highly proliferative, plastic-adherent, and exhibited a polymorphic morphology predominantly with stellate or fusiform shapes. The presence of cell clusters was observed in cultures of mDPSC. Some cells were positive for alkaline phosphatase. The karyotype was normal until the 5th passage. The *Pou5f1/Oct-4* and *ZFP42/Rex-1*, but not *Nanog* transcripts were detected in mDPSC. Flow cytometry and fluorescence analyses revealed the presence of a heterogeneous population positive for embryonic and mesenchymal cell markers. Adipogenic and osteogenic differentiation was achieved after two weeks of culture under chemically defined *in vitro* conditions. After 30 days of culture, some elongated cells acquired a spontaneous contraction capacity. Thus, mDPSC are an accessible source of stem cells to be employed in the development of therapeutic protocols in experimental disease models.

Keywords: Stem cells; Dental Pulp; Mouse; Phenotype; Differentiation

Introduction

During the embryonic developmental stage, epithelial-mesenchymal interactions determine the formation of all the dental components, including the pulp [1]. The pulp is divided into four layers: the external layer is constituted by odontoblasts which produce the dentin. The dentin keeps and protects the inner dental pulp chamber, comprised by the second layer, a zone poor in cells and rich in extracellular matrix, and the third layer containing compact connective tissue. The last layer is infiltrated by a vascular area and a nervous plexus [2,3]. The presence of undifferentiated cells around the vessels, responsible for the new dentin formation after dental injuries such as cavities or mechanical trauma, has highlighted the dental pulp as a source of mesenchymal stem cells [1,2].

The first identification and isolation of precursors of functional odontoblasts known as human dental pulp stem cells (DPSC) was reported in 2000 by Gronthos et al. These cells were characterized by their highly proliferative capacity, the typical fibroblast-like morphology, multipotent differentiation, the expression of mesenchymal stem cells markers *in vitro*, as well as by dentin regeneration induction *in vivo* [4]. Several other populations of human dental stem cells have been characterized, such as stem cells obtained from deciduous teeth [5,6], apical papilla [7], and periodontal ligament stem cells [8,9]. A recent study demonstrated that cell populations obtained from rat dental pulp contain STRO-1 positive cells with multilineage potential of differentiation *in vitro* [10].

Although there is substantial evidence for essential roles of proliferation, differentiation, and regeneration of stem cells obtained from human dental pulp, only little is known about their effects *in vivo*. Therefore, in order to understand the properties of dental pulp stem cells, here we isolated and characterized stem cells from the dental pulp of wild-type and EGFP transgenic C57BL/6 mice. GFP expression constitutes an important tool for the study of stem cells *in vitro* and *in vivo*. These results confirm that mDPSC retain cells with properties that effectively define them as stem cells and indicate their therapeutic use in experimental models for the investigation of human diseases.

Materials and Methods

Mice

Specific-pathogen-free, 8-week-old female C57BL/6 and male C57BL/6 EGFP mice were maintained at the animal facilities at the Gonçalo Moniz Research Center-FIOCRUZ, and provided with rodent diet and water *ad libitum*. The present study was approved by the Institution's Animal Ethics Committee.

Isolation and cell culture

The incisors teeth were dissected carefully from the mandibles of male EGFP transgenic C57BL/6 mice after removal of the heads under deep anesthesia in the CO₂ chamber. Special care was taken to avoid contamination by adjacent tissues. Dental pulp tissue was gently collected with the aid of a stereotactic microscope (Olympus, Tokyo, Japan). Explants were cultured into 24-well plates (Nunc A/S, Roskilde, Denmark) with DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Cultilab, Campinas, SP, Brazil), 7.5% sodium bicarbonate (Sigma, St. Louis, Mo., USA), 1 M HEPES (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), 1 mM sodium pyruvate (Sigma), 2 mM L-glutamine (Sigma), 0.05 mM 2-mercaptoethanol, 50 µg/ml gentamycin (Sigma), and incubated at 37°C with 5% CO₂. When confluence was achieved (usually after 12-14 days), the adherent cells were released with 0.25% trypsin solution (Invitrogen/Molecular Probes, Eugene, OR, USA) and re-plated or used in experimental assays, as described below. For cryopreservation, cells were centrifuged and the pellet was resuspended in DMEM medium supplemented with 10% FBS and 10% dimethylsulfoxide (Sigma). Aliquots (5x10⁶ cells/ml) were transferred to cryogenic tubes and cooled slowly until -80°C and, after 24 h, the cryotubes were transferred to a liquid nitrogen container for long-term storage.

Karyotype analysis

Cytogenetic analysis of mDPSC cultures was taken during the first and 5th passages, after expansion on DMEM medium supplemented with 10% FBS (Cultilab). Cells undergoing active cell division were blocked at metaphase by 0.3

$\mu\text{g/mL}$ colcemid (Cultilab), detached from the growth surface by 0.25% trypsin solution (Invitrogen), and subsequently swollen by exposure to hypotonic 0.075 M KCl solution (Merck). The cells were then fixed in methanol/acetic acid solution (3:1) for slide preparation. Cytogenetic analysis of metaphase chromosomes was performed for GTG-banding [11] and images captured on BX61 microscope (Olympus, Tokyo, Japan), Spectral Imaging Band View software (Applied, Vista, CA, USA). For each passage, the ranges of fifteen to twenty cells were analyzed.

Flow cytometric analysis

For detection of surface antigen, adherent cells were detached with 0.25% trypsin solution (Invitrogen), washed with saline and incubated at 4°C for 30 minutes with following antibodies diluted 1:100: biotin anti-mouse CD31 (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA), biotin anti-human STRO-1 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), PE anti-mouse CD34 (Invitrogen), PE anti- mouse/human oct-4 (BD Pharmingen), PE anti-mouse CD73 (BD Pharmingen), PE anti-mouse CD90 (Invitrogen), PE anti-mouse CD11b (BD Pharmingen), PE anti-mouse CD44 (BD Pharmingen), PE anti-mouse CD117 (Invitrogen), APC anti-mouse CD45 (Invitrogen), PE-Cy5.5 anti-mouse Sca-1 (Invitrogen) or 0.5 $\mu\text{g/mL}$ propidium iodide (BD Pharmingen). Excess antibody was removed by washing. Streptavidin PE-Cy5.5 diluted 1:100 (BD Pharmingen) was used after biotin antibody. Cells were fixed with 1% formaldehyde. Carboxyfluorescein succinimidyl ester - CFSE assays (Invitrogen/Molecular Probes) were performed according to methodology described previously [12]. The acquisition and analysis were done using a FACScalibur cytometer (Becton Dickinson, San Diego, CA, USA) with the CellQuest software. At least 50,000 events were collected.

Cytochemistry

Alkaline phosphatase expression was evaluated in monolayers of cells cultivated in 24 well plates. USP-1, a mouse embryonic stem cell line [13], was used as a positive control. Cultures were washed with PBS (phosphate buffered saline), fixed with 4% paraformaldehyde (Sigma) in PBS, washed with rinse buffer, and stained with a mix fast red violet (FRV) with naphthol phosphate solution and water

as described in the protocol of the embryonic stem cell characterization kit, Millipore Corporation, Billerica, MA. Positive alkaline phosphatase expression was identified by red cell colonies visualized using an inverted optic microscope (Olympus).

Immunofluorescence

For immunofluorescence analysis, 13-mm diameter glass coverslips (Knittel, Braunschweig, Germany) were placed in a 24-well plate and mDPSC (5×10^6) were added to each well. Cells were washed in PBS 1x, fixed with 4% paraformaldehyde and permeabilized with 0.1% triton X-100 for 10 minutes. After blocking with PBS containing 5% BSA (Sigma), the cells were incubated with primary antibodies diluted 1:100. The embryonic stem cell characterization kit (Chemicon, Temecula, CA, USA) was used for detection of the following primary antibodies: SSEA-1 (IgM monoclonal antibody), SSEA-4 (IgG monoclonal antibody), TRA-1-60 (IgM monoclonal antibody). After washing, appropriate secondary antibodies goat anti-mouse IgG or IgM Alexa Fluor 568 (Invitrogen/Molecular Probes) diluted 1:200 were added in the well. Incubations with both primary and secondary antibodies were performed for 1 hour at room temperature. The slides were cover slipped using Vectashield mounting medium with DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Images were analyzed in confocal microscope Fluoview 1000 (Olympus) using appropriate filters.

RT-PCR to undifferentiated stem cell phenotype

Total RNA was extracted using Rneasy® Mini Kit (Qiagen GmbH; Valencia, CA, USA) according to the manufacturer's recommendations. RNA extraction and complementary DNA (cDNA) synthesis were carried out as described previously [6].

Differentiation assays

The potential of differentiation into osteogenic and adipogenic lineages was examined. To promote osteogenesis, the cells were incubated with DMEM supplemented with 10 mM β -glycerol phosphate (Sigma), 0.05 mM ascorbate-2-phosphate (Sigma) and 100 nM dexamethasone (Sigma). The culture medium was

changed twice a week for up to two weeks. To calcium detection, the cells were fixed with methanol for 10 minutes at room temperature and stained with alizarin red with pH 4.0 for 5 minutes at room temperature. For adipogenesis, the cultured cells were incubated in adipogenic medium DMEM supplemented with 60 mM indomethacin, 0.5 mM dexamethasone, and 0.5 mM isobutylmethylxanthine (Sigma). The culture medium was changed two times per week for up to three weeks. The cells then were fixed in methanol for 45 minutes and stained with Oil Red (Sigma).

Results

Morphological features of the mDPSC culture and cytogenetic analysis

Dental pulp stem cells were isolated and expanded *in vitro* from GFP-transgenic mice. The cells are plastic-adherent and showed rapid expansion and proliferation capacity *in vitro* after isolation. A polymorphic morphology was observed in the cell populations obtained. Initially the cells had rounded or fusiform shapes (Fig. 1A). Cells with elongated (Fig. 1B) and stellate shape (Fig. 1C) began to appear among fusiform cells after 20-28 days of culture. Curiously, in one batch of cells, some elongated cells acquired the contraction capacity (see supplemental material). The genetic integrity was evaluated by karyotype analysis by GTG banding. Proliferative mDPSC showed a normal karyotype in the fifth passage (Fig. 1D). In only one isolate, tetraploidy was found in 40% of the cells in the sixth passage (data not shown). Quantitative evaluation of the exponential cell expansion was estimated by CFSE staining. Approximately 80% of the cells proliferated after 48 h of culture (Fig. 2). The formation of cell clusters *in vitro* was also observed (data not shown). More than 90% of the cells expressed GFP (Figs. 2 and 3C). After long term cryopreservation, mDPSC are capable of quickly restarting proliferation in culture, in a manner similar to the recently isolated cells.

Flow cytometric, immunofluorescence, and PCR analyses

To investigate the phenotypic characteristics of the mDPSC, cell cultures were analyzed using antibodies against several cell surface and intracellular antigens. In the third passage, flow cytometric analysis revealed the expression of cell surface molecules that characterize mesenchymal stem cells, such as CD90,

CD73, STRO-1 and Ly6a/Sca-1 (Fig. 2). In contrast, the percentage of hematopoietic cell markers was low (CD117) or undetectable (CD34, CD11b, or CD45), indicating that the isolated mDPSC cells are not contaminated with hematopoietic stem cells. Approximately 80% of the cells were positive for the endothelial cell marker CD31 (Fig. 2). Similar results were observed with cells cultured until the 18th passage (data not shown). Cells were positive for alkaline phosphatase (Fig. 3A) such as observed in the positive control, a culture of embryonic stem cells (Fig. 3B). Curiously, the expression of others embryonic stem cells markers, such as SSEA-1, was strongly positive in mDPSC cultures (Fig. 3D), whereas SSEA-4 and TRA-1-60 markers were not detected by immunofluorescence analysis (Fig. 3E and F). The transcript *ZFP42/Rex-1*, but not *Nanog* was detected in undifferentiated stem cells by RT-PCR (Fig. 4). Flow cytometry analysis confirmed that approximately 25% of the cells were positive for *Pou5f1/Oct-4* (Fig. 2).

Adipogenic and Osteogenic Differentiation

Confluent monolayers of the mDPSC were submitted to conditions known to promote osteogenesis and adipogenesis. Control mDPSC were cultured with standard medium (Fig. 5B and 5D). Cultures of mDPSC in osteoinductive medium had altered cell morphology with a formation of mineral nodules after three weeks of culture. Substantial calcium deposits were seen by Alizarin red-S staining, which localized specifically in the mineral nodules (Fig. 5A). Adipogenic differentiation appeared after 2 weeks of incubation. Lipid-rich vesicles within the cytoplasm of the cells were evidenced by positive Oil Red O staining (Fig. 5B).

Discussion

Several studies have demonstrated that the human dental pulp is a source of stem cells [2-6]. These cells obtained from deciduous or permanent teeth presents several mesenchymal and embryonic markers, retain the capacity of expansion and differentiation in diverse cell types under chemical defined conditions *in vitro* [4-6] and repair *in vivo* [4,6]. Here we isolated, characterized and differentiated stem cells obtained from dental pulp of EGFP transgenic mice. For the immunophenotyping we used similar methodologies employed in the isolation of bone marrow and human dental pulp stem cells (hDPSC) [4,5,14], which are characterized by a typical

fibroblast-like morphology [4-6], and present no changes in the morphology during 25 passages [6]. In contrast, in the present study it was observed morphology alteration of mDPSC, according to the culture time. Initially, rounded or fusiform shapes were observed. The elongated and stellate cells began to appear among fusiform cells after 28 days of culture. Distinct cell shapes were also observed in other human and murine mesenchymal stem cells, such as bone marrow derived [14,15] and cord blood stem cells [16]. Moreover, mDPSC have capability of colony-forming *in vitro*, a common feature among different stem cell populations [2]. Similarly, stem cells obtained from human dental pulp also have this property [4,6] and the frequency of colony-forming cells derived from dental pulp tissue was significantly higher than that observed in the stem cells obtained from bone marrow [4].

For clinical applications, an adequate number of cells are necessary and an extensive expansion *ex-vivo* is required. In the third passage, 80% of the mDPSC proliferated after 48 h of culture. This data corroborates with Gronthos et al (2000) data, which demonstrated that approximately 72% of the stem cells obtained from adult human dental pulp proliferate after 24 h of culture. This proliferation index was significantly higher when compared with the stem cells obtained from bone marrow. The authors explained this fact by the extensive fibrous tissue amount in the dental pulp, whereas about 99% of the cells in marrow aspirates are hematopoietic populations [4]. In addition, the stem cells obtained from deciduous dental pulp are more proliferative because of their immature profile [5].

The proliferative rate can be associated with a progressive chromosomal instability. Malignant transformation of mesenchymal stem cells after expansion in culture has been reported in human and animals models [17-21]. In this case, cytogenetic analysis using G-banding is essential for detecting numerical and structural chromosome aberrations in stem cell cultures [22]. We verified that mDPSC had a normal karyotype until the fifth passage. In only one isolate, tetraploidy was found in 40% of the cells in the sixth passage. Some studies have demonstrated that long-term culture and cryopreservation of mouse embryonic stem cells can lead to a decrease in pluripotency and gains of distinct chromosomal abnormalities [17-19]. Rat mesenchymal stem cells from bone marrow presented an aneuploid karyotype and a progressive chromosomal instability in all the passages [22]. In addition, transplanted nude mice with mouse mesenchymal stem cells from

bone marrow developed rapidly growing tumors at the injection site after 4 weeks [23]. Miura et al. (2006) associated these abnormalities with a gradual increase in telomerase activity and c-myc expression. Time and culture conditions are determinant factors of *in vitro* selection, and it is possible that a clone of cells showing tetraploidy was selectively maintained in mDPSC by cell fusion, for example, resulting in 2n/4n karyotype. This is a relevant aspect to be taken into consideration for future studies using mDPSC *in vivo* and in experimental models of diseases.

The mDPSC expressed *Pou5f1/Oct-4* and *ZFP42/Rex-1*, transcripts known to be required for self renewal and pluripotency [25]. In contrast, *Nanog* expression was not detected. *Pou5f1/Oct-4* and *Sox2* participates directly of the *Nanog* regulation. However, both *Pou5f1/Oct-4* and *Sox-2* are present in the nuclei of *Nanog*-negative cells of the morula and other precursors, indicating that other molecular signals are required for expression of *Nanog* [26]. We also report that mDPSC express SSEA-1 and alkaline phosphatase, markers of undifferentiated embryonic stem cells. These results confirm the undifferentiated nature of the cells obtained of the mouse dental pulp. Similar results were found in stem cells obtained from human deciduous dental pulp, adipose tissue, bone marrow, heart, and dermis [6,27]. The mesenchymal stem cell markers CD90, STRO-1, Sca-1, and CD73 were also found expressed in mDPSC. The expression of hematopoietic stem cell markers was detected in the first passage. Several mesenchymal stem cell lines present hematopoietic contaminants in the initial passages of culture [28]. In addition, a small percentage of mDPSC expressed CD117. The low frequency of this marker is also observed in the umbilical cord or bone marrow stem cells populations [28-30].

Another property that effectively defines a stem cell is the differentiation potential. The formation of lipid droplets in the cytoplasm and mineral nodules in the mDPSC culture after chemical defined conditions confirmed the adipogenic and osteogenic differentiation, respectively. Not all the cells in mDPSC cultures had the differentiation capability and, in fact, a uniform induced differentiation free of non-responsible cells is very difficult to achieve in mesenchymal stem cell cultures [31]. Interestingly, some elongated cells spontaneously acquired a contractile capacity. In addition of the induced differentiation described in this study, in one isolate it was observed spontaneous differentiation in adipocyte lineage (data not shown). These data retract the high plasticity of the mDPSC even in the absence of specific stimuli.

This study provides the first detailed description of stem cells obtained from mouse dental pulp, generating cell lines positive for GFP that can be used to track the fate of these cells when injected into different mouse models of disease. The data presented herein demonstrate that mDPSC comprise a morphologically heterogeneous population of cells that exhibit some phenotypic and functional features of both embryonic and mesenchymal stem cells, such as observed in the human dental pulp. The ability to expand and differentiate opens the futures possibilities in the study of the cell therapies in animal models.

Acknowledgements

This work was supported by CNPq, FAPESB, FINEP, and FIOCRUZ.

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

1. Yen AH and PT Sharpe. (2008). Stem cells and tooth tissue engineering. *Cell Tissue Res* 331:359-372.
2. Shi S and S Gronthos. (2003). Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res* 18:696-704.
3. d'Aquino R, G Papaccio, G Laino and A Graziani. (2008). Dental pulp stem cells: a promising tool for bone regeneration. *Stem Cell Rev* 4:21-26.
4. Gronthos S, M Mankani, J Brahim, PG Robey and S Shi. (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 97:13625-13630.
5. Miura M, S Gronthos, M Zhao, B Lu, LW Fisher, PG Robey and S Shi. (2003). SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 13:5807-5812.
6. Kerkis I, A Kerkis, D Dozortsev, GC Stukart-Parsons, SM Gomes Massironi, LV Pereira, AI Caplan and HF Cerruti. (2006). Isolation and characterization of a

population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. *Cells Tissues Organs* 184:105-116.

7. Sonoyama W, Y Liu, T Yamaza, RS Tuan, S Wang, S Shi and GT Huang. (2008). [Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study.](#) *J Endod* 34:166-171.
8. Seo BM, M Miura, S Gronthos, PM Bartold, S Batouli, J Brahim, M Young, PG Robey, CY Wang and S Shi. (2004). Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 16:149-155.
9. Jo YY, HJ Lee, SY Kook, HW Choung, JY Park, JH Chung, YH Choung, ES Kim, HC Yang and PH Choung. (2007). Isolation and characterization of postnatal stem cells from human dental tissues. *Tissue Eng* 13:767-773.
10. Yang X, W Zhang, J van den Dolder, XF Walboomers, Z Bian, M Fan and JA Jansen. (2007). Multilineage potential of STRO-1+ rat dental pulp cells *in vitro*. *J Tissue Eng Regen Med* 1:128-135.
11. Sanchez O, JI Escobar and JJ Yunis. (1973). A simple G-banding technique. [Lancet](#) 2:269.
12. Glimm H and CJ Eaves . (1999). Direct evidence for multiple self-renewal divisions of human *in vivo* repopulating hematopoietic cells in short-term culture. [Blood](#) 94:2161-2168.
13. Sukoyan MA, AY Kerkis, MRB Mello, IE Kerkis, JA Visintin and LV Pereira. (2002). Establishment of new murine embryonic stem cell lines for the generation of mouse models of human genetic diseases. *Brazilian of Journal Medical and Biological Research* 35: 535-542.
14. Jones EA, SE Kinsey, A English, RA Jones, L Straszynski, DM Meredith, AF Markham, A Jack, P Emery and D McGonagle. (2002). Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells. *Arthritis Rheum* 46:3349-3360.
15. Nadri S, M Soleimani, RH Hosseni, M Massumi, A Atashi and R Izadpanah. (2007). An efficient method for isolation of murine bone marrow mesenchymal stem cells. *Int J Dev Biol* 51:723-729.
16. Gang EJ, SH Hong, JA Jeong, SH Hwang, SW Kim, IH Yang, C Ahn, H Han and H Kim. (2004). *In vitro* mesengenic potential of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 321:102-108.

17. Meisner LF and JA Johnson. (2008). Protocols for cytogenetic studies of human embryonic stem cells. *Methods* 45:133-141.
18. Longo L, A Bygrave, FG Grosveld and PP Pandolfi. (1997). The chromosome make-up of mouse embryonic stem cells is predictive of somatic and germ cell chimaerism. *Transgenic Res* 6:321-328.
19. Draper JS, K Smith, P Gokhale, HD Moore, E Maltby, J Johnson, L Meisner, TP Zwaka, JA Thomson and PW Andrews. (2004). [Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells](#). *Nat Biotechnol* 22:53-54.
20. Rubio D, J Garcia-Castro and MC Martín. (2005). Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res* 65:3035–3039.
21. Aguilar S, E Nye and J Chan. (2007). Murine but not human mesenchymal stem cells generate osteosarcoma-like lesions in the lung. *Stem Cells* 25:1586–1594.
22. [Foudah D](#), [S Redaelli](#), [E Donzelli](#), [A Bentivegna](#), [M Miloso](#), [L Dalprà](#) and [G Tredici](#). (2009). Monitoring the genomic stability of *in vitro* cultured rat bone-marrow-derived mesenchymal stem cells. *Chromosome Res* 17:1025-1039.
23. Zhou YF, M Bosch-Marce and H Okuyama. (2006). Spontaneous transformation of cultured mouse bone marrow-derived stromal cells. *Cancer Res* 66:10849–10854.
24. Miura M, Y Miura and HM Padilla-Nash. (2006). Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stem cells leads to malignant transformation. *Stem Cells* 24:1095–1103.
25. Niwa H, S Masui, I Chambers, AG Smith and J Miyazaki. (2002). Phenotypic complementation establishes requirements for specific POU domain and generic transactivation function of Oct-3/4 in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 22:1526-36.
26. [Avilion AA](#), [SK Nicolis](#), [LH Pevny](#), [L Perez](#), [N Vivian](#) and [R Lovell-Badge](#). (2003). Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev* 17:126-40.
27. [Riekstina U](#), [I Cakstina](#), [V Parfejevs](#), [M Hoogduijn](#), [G Jankovskis](#), [I Muiznieks](#), [R Muceniece](#) and [J Ancans](#). (2009). Embryonic Stem Cell Marker Expression Pattern in Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow, Adipose Tissue, Heart and Dermis. *Stem Cell Rev Rep* 5:378-86.

28. da Silva Meirelles L, PC Chagastelles and NB Nardi. (2006). Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci* 119: 2204-2213.
29. Hong SH, EJ Gang, JA Jeong, C Ahn, SH Hwang, IH Yang, HK Park, H Han and H Kim. (2005). *In vitro* differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 330:1153-1161.
30. [Shin JW](#), [DW Lee](#), [MJ Kim](#), [KS Song](#), [HS Kim](#) and [HO Kim](#). (2005). Isolation of endothelial progenitor cells from cord blood and induction of differentiation by ex vivo expansion. *Yonsei Med J* 46:260-267.
31. Rohwedel J, K Guan and AM Wobus. (1999). Induction of cellular differentiation by retinoic acid *in vitro*. *Cells Tissues Organs* 165:190-202.

Figures

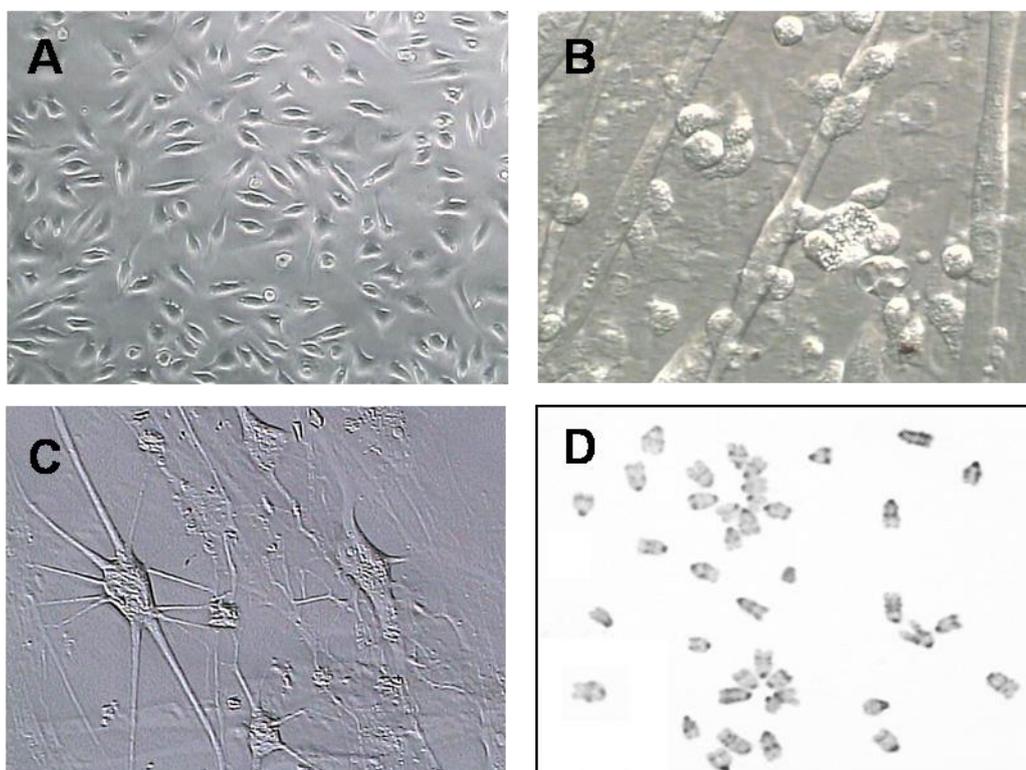


FIG. 1. Morphologic aspects of mDPSC. Adherent cells cultured *in vitro* present heterogeneity in the morphology. Phase-contrast micrographs were taken on day 5 (**A**) and day 28 (**B** and **C**) of culture. Normal karyotype was observed in mDPSC cultured in fifth passage (**D**). Magnifications, X200 (**A**), X600 (**B**) and X400 (**C**).

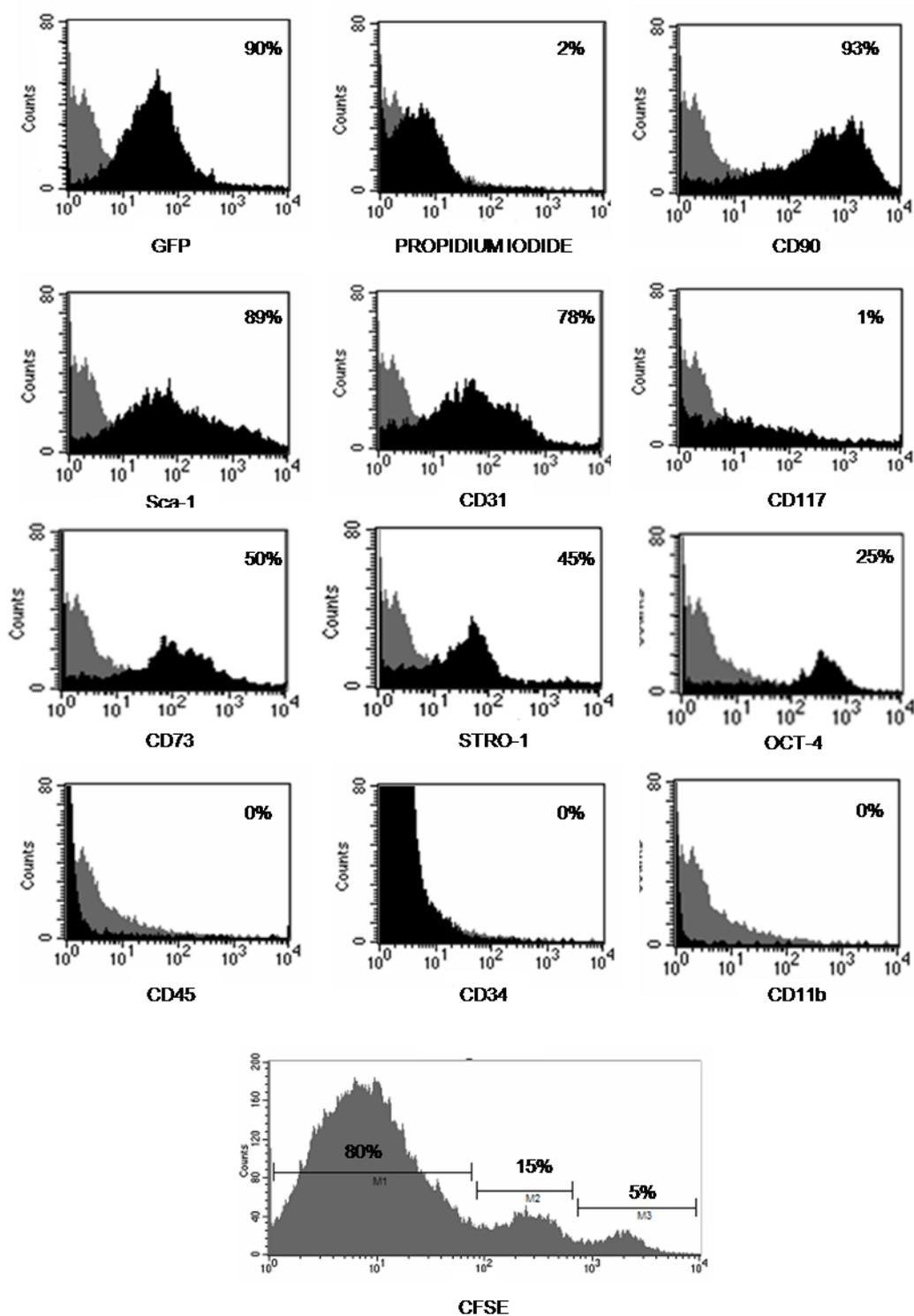


FIG. 2. Expression of mesenchymal and embryonic, but not hematopoietic stem cells markers in mDPSC. The expression of surface markers in mDPSC cultured at the third passage was evaluated by flow cytometry. Histograms show isotype control (grey peaks) versus specific antibody (black peaks) staining, and the percentages of cells positive for the selected molecules (A-I). Proliferative activity of mDPSC by CFSE analysis (J). Results shown were obtained in one representative of three experiments performed.

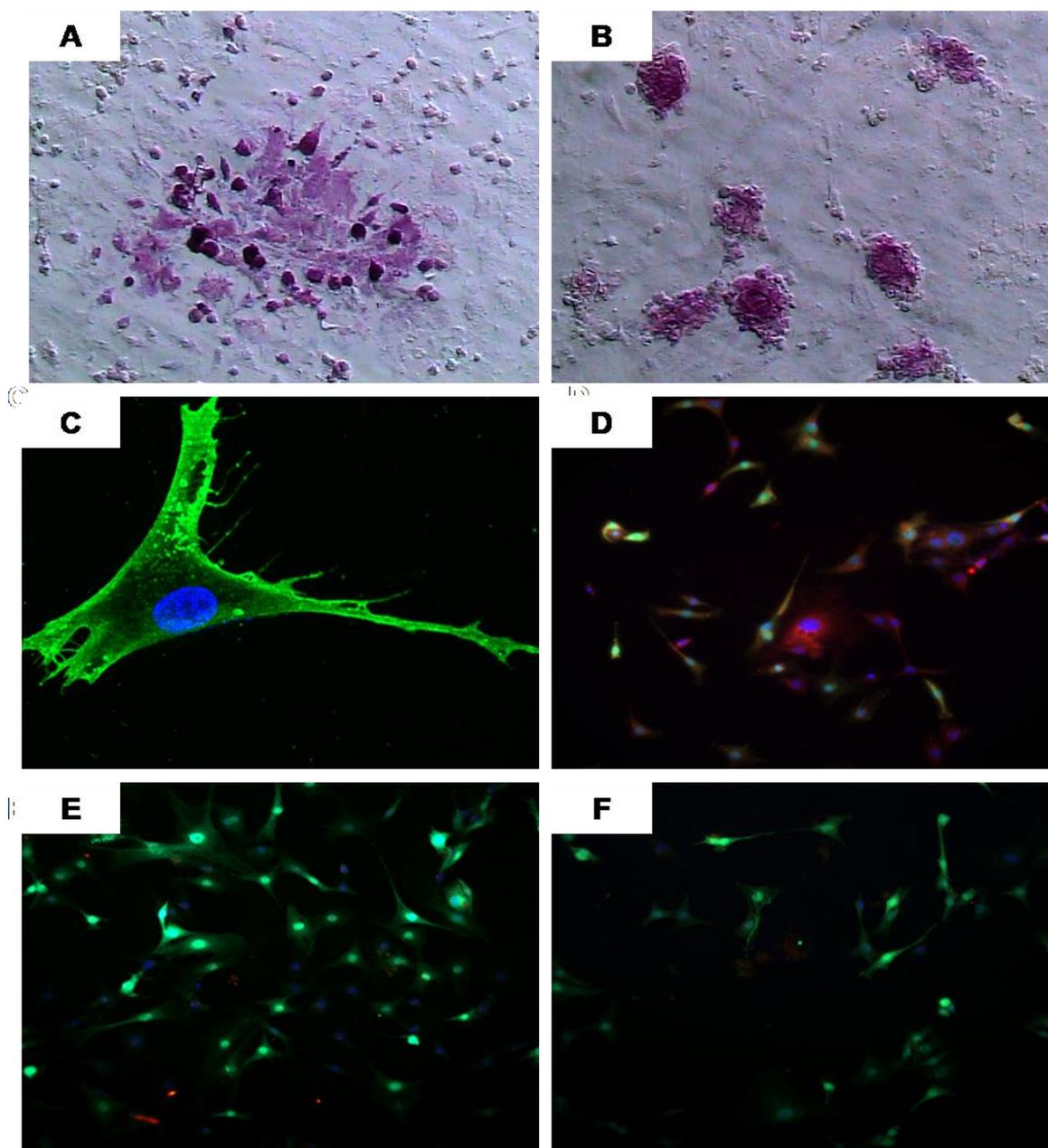


FIG. 3. Analysis of cell surface markers by cytochemistry and fluorescence. Positivity for alkaline phosphatase staining was evaluated in mDPSC (**A**) and mouse embryonic stem cells (**B**), as positive controls. GFP⁺ expression in mDPSC (**C**). The expression of SSEA-1 was positive (red; **D**), whereas SSEA-4 (**E**) and TRA-1-60 (**F**) were not detected. DAPI-stained nuclei are shown in blue. Magnifications, X100 (**A**, **B**, **D**, **E**, and **F**) and X600 (**C**).

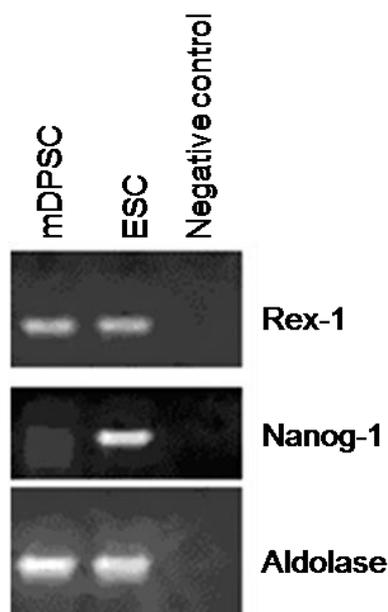


FIG. 4. Expression of mRNA for pluripotency cell markers. RT-PCR assay for levels of nanog-1 and rex-1 mRNA in mDPSC and embryonic stem cells (ESC) were performed. Aldolase was used as housekeeping gene.

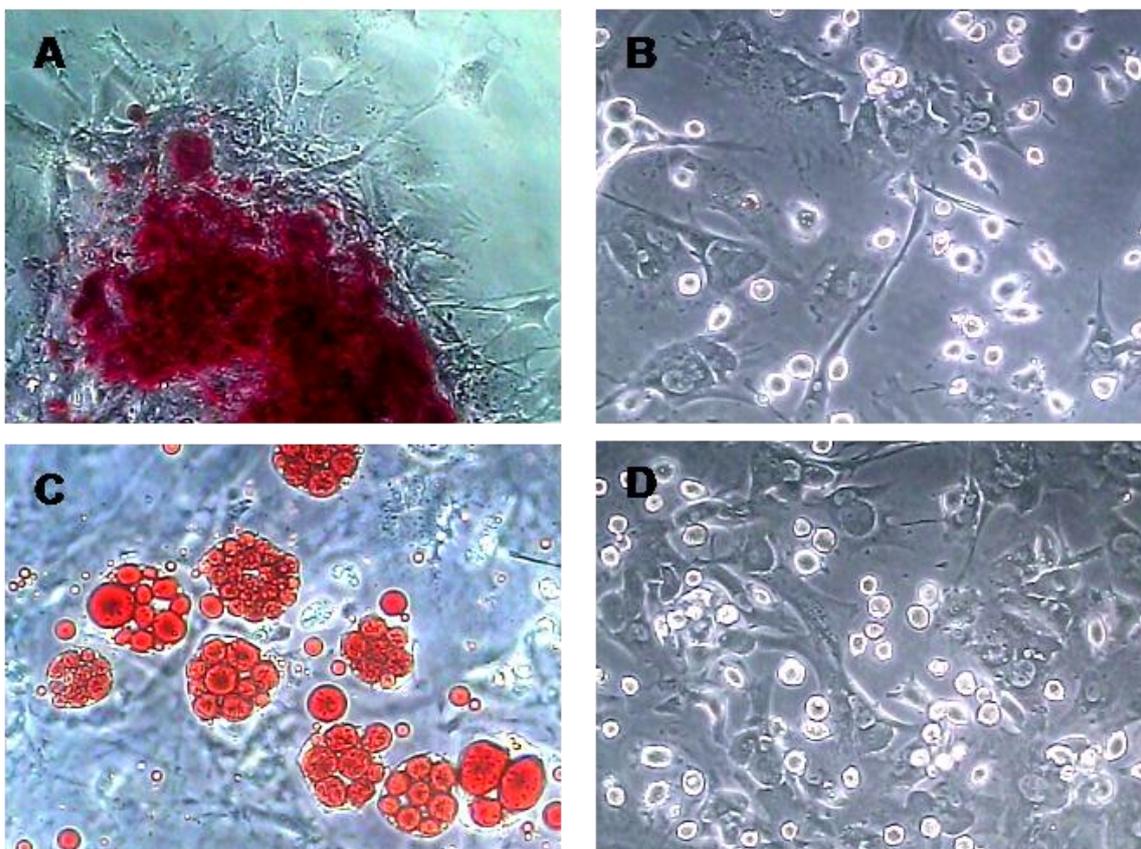


FIG. 5. Differentiation potential of mDPSC. The mDPSC cells were cultured in media to induce the differentiation into osteogenic or adipogenic lineages. Deposition of a mineralized matrix can be seen stained in red by alizarin staining (**A**). Lipid vacuoles of differentiated cells are stained with oil red (**C**). The control cultures in non-inducing medium are shown in **B** and **D**. Magnifications X200 (**A**, **B**, and **D**) and 320X (**C**).