

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

REGENERAÇÃO ÓSSEA ALVEOLAR UTILIZANDO OSSO LIOFILIZADO,  
MATRIGEL<sup>®</sup> E CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS EM COELHOS  
(*Oryctolagus cuniculus*)

Víviam Nunes Pignone

PORTO ALEGRE

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

REGENERAÇÃO ÓSSEA ALVEOLAR UTILIZANDO OSSO LIOFILIZADO,  
MATRIGEL<sup>®</sup> E CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS EM COELHOS  
(*Oryctolagus cuniculus*)

Autora: Víviam Nunes Pignone

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias na área de Morfologia, Cirurgia e Patologia Animal

Orientador: Prof. Dr. Emerson Antonio Contesini

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elizabeth Obino Cirne-Lima

PORTO ALEGRE

2011

Víviam Nunes Pignone

AVALIAÇÃO DA REGENERAÇÃO ÓSSEA ALVEOLAR UTILIZANDO OSSO  
LIOFILIZADO E CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS EM COELHOS NOVA  
ZELÂNDIA (*Oryctolagus cuniculus*)

APROVADO POR

---

Prof. Dr. EMERSON ANTONIO CONTESINI

Orientador e Presidente da Banca

---

Profa. Dra. VANESSA GRACIELA GOMES CARVALHO

Membro da Banca (USP – São Paulo)

---

Prof. Dr. MARCOS ANTÔNIO TORRIANI

Membro da Banca (UFPEL)

---

Prof. Dr. MARCELO MELLER ALIEVI

Membro da Banca (UFRGS)

## DEDICATÓRIA

Dedico este meu trabalho à minha família, que sempre me orientou e apoiou em todos os momentos difíceis, compreendendo minha ausência devido às horas preenchidas com meu trabalho e estudo durante esta caminhada. A coragem, a educação, o amor e a fé depositados em mim foram fundamentais para vencer os obstáculos da vida.

Dedico especialmente ao meu avô Oscar Pignone Filho (*in memoriam*), que foi um dos seres humanos mais solidários que conheci e que ao primeiro olhar a primeira frase era sempre a mesma: - Meu amor! – amor este que levarei por toda a minha vida junto com a eterna saudade. Obrigada pelas orações diárias e tenho certeza, que mesmo em outro plano espiritual, continuarás me iluminando.

Por fim, dedico ao meu inseparável companheiro Rafael Salim, que me acompanhou durante esta trajetória desde a seleção de mestrado ao término desta dissertação, me dando todo apoio, amor, carinho e fidelidade. Obrigada por dar-me força e tornar este sonho realidade.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu pai Oscar Antônio Pignone, minha mãe Gladis Beatriz Nunes Pignone, a minha irmã Aline Nunes Pignone, à tia Rose Marie Acosta Pignone, ao tio João e aos meus avós Juana Acosta Pignone e Oscar Pignone Filho (*in memoriam*), os quais me deram apoio emocional e racional para enfrentar os desafios durante esta jornada. Obrigada por sempre estarem ao meu lado torcendo e vibrando com as minhas conquistas, pois vocês são meus maiores incentivadores. Espero que eu possa proporcionar-lhes ainda mais alegrias.

Ao meu namorado Rafael Salim por todo apoio e confiança depositados. Sem dúvida é uma pessoa muito especial e espero um dia me dedicar tantas horas quanto forem necessárias a você também. Obrigada pelo amor, carinho e compreensão nos momentos em que estive ausente para tornar meus sonhos realidade, como finalizar esta dissertação. Às caronas ao Hospital de Clínicas Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (HCV-UFRGS) e ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) foram incontáveis e importantíssimas, principalmente devido ao desgaste físico e emocional ao término de uma ou várias cirurgias.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Emerson Antonio Contesini pela confiança depositada em mim ao longo dos anos durante o mestrado. Ao término desta fase ficará a eterna amizade e aprendizados adquiridos, e sem dúvida, o desejo de publicar e contribuir para ciência.

À minha co-orientadora e amiga Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elizabeth Obino Cirne-Lima que me recebeu de braços abertos no Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular e por assumir este desafio de isolar células-tronco mesenquimais em um tecido nunca antes realizado no laboratório. Você ensinou-me a ter esperança nos mais diversos tratamentos utilizando a terapia celular. Obrigada pelo apoio em todos os momentos deste experimento.

Às minhas colegas de mestrado Lanucha Fidelis da Luz Moura, Priscilla Mörchbacher, Tuane Garcez, Verônica Noriega Torres e a doutoranda Anelise Bonilla Trindade por se colocarem à disposição durante as coletas para isolamento das células-tronco mesenquimais e durante as cirurgias nos animais experimentais. Amigas, contem sempre com minha ajuda para o que precisarem. Não tenho palavras para agradecer todo o apoio e tempo dedicado a mim e podem ter certeza que torço pelo sucesso de todas vocês.

Ao apoio do Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular, em especial a Marta Pasin, Paula Terraciano, Ana Helena Paz e Fabiany

Gonçalves, que colaboraram no cultivo das células, nas diferenciações celulares, nas análises de PCR e pela amizade construída neste período.

Aos estagiários Karina Magano Guimarães, Mônica Midon, Eduardo Santos, Daiane Negreiros, Rafaela Hennig, Silvana Bellini Vidor, Daniel Luz, agradeço de coração por toda ajuda durante a parte prática do experimento. Sem a dedicação de vocês, nada seria possível.

À equipe da Unidade de Experimentação Animal (UEA) por toda ajuda e apoio durante a fase experimental, em especial à enfermeira Marta e à médica veterinária Fabíola Schons Meyer que não pouparam esforços em conseguir os coelhos e por todo carinho e cuidado com os animais. Aos funcionários Eduardo e Juliana agradeço toda dedicação e manejo higiênico-sanitário e nutricional com os animais.

Ao dentista Prof. Dr. João Batista e à patologista Profa. Dra. Luise Meurer que realizaram as avaliações histopatológicas e pelo auxílio na interpretação dos resultados.

À Flavia Rejane Giusti Grossmann por ajudar na confecção das lâminas histológicas almejando sempre a perfeição. Suas histórias e os dias de ginástica laboral foram de alguma forma, importantes para diminuir o estresse durante a fase experimental do projeto.

À Dra. Vânia Regina Camargo Fontanella que aceitou o desafio de ajudar nas análises radiográficas deste experimento, mesmo com pouco tempo disponível.

Aos físicos Prof. Dr. Roberto Hübler e ao André Marins Vargas, que me receberam na Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), por toda dedicação e paciência em ensinar-me a confeccionar as amostras para as análises microscópicas sem desmineralização.

Agradeço ao Hospital de Clínicas Veterinárias, na pessoa do Prof. Dr. Marcelo Meller Alievi, seu diretor, por permitir a realização dos procedimentos odontológicos nos animais da comunidade mais carente, contribuindo para meu crescimento profissional e pessoal. É uma honra tê-lo como membro da banca.

A todos os colegas veterinários, tanto técnicos, residentes e profissionais de Porto Alegre e Região Metropolitana por encaminhar seus pacientes e pela confiança em mim depositada. Espero continuar contribuindo com o setor odontológico junto com a colega veterinária Cláudia Faraco.

Por fim e não menos importantes, agradeço às minhas filhas caninas Katy e Tininha por todas as horas de solidariedade e companheirismo junto ao computador, passando incontáveis noites ao meu lado, me apoiando até o término desta dissertação.

## RESUMO

A regeneração óssea alveolar tem sido um dos principais alvos de estudo na odontologia, tanto humana como veterinária, principalmente na implantodontia e nas cirurgias periodontais e buco-maxilo-faciais. Em função disto, este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a regeneração óssea alveolar, utilizando como enxerto osso liofilizado e células-tronco mesenquimais (MSCs), oriundas da polpa dentária de um doador macho para enxerto alogênico. Foram utilizados 57 coelhas, Nova Zelândia, sendo um coelho doador das MSCs, distribuídos em sete grupos: controle (G1), osso liofilizado (G2), Matrigel® (G3), Matrigel® e MSC (G4), osso liofilizado e Matrigel (G5), Osso liofilizado, Matrigel® e MSC (G6) e somente MSC (G7). Após a exodontia do incisivo inferior esquerdo, o alvéolo recebia o implante de acordo com cada grupo e avaliados em sete dias. As amostras foram coletadas para análise microscópica, desmineralizadas e não desmineralizadas, PCR, além de terem sido submetidas à análise radiográfica, a qual também era realizada no pré e no pós-operatório imediato. Macroscopicamente, foi observado espessamento do ramo mandibular dos animais dos grupos que receberam Matrigel® e aceleração do crescimento dos dentes incisivos remanescentes nos animais que receberam terapia celular. Na análise microscópica, constatou-se que, todos os grupos que receberam como enxerto o osso liofilizado, o tempo de regeneração foi menor, embora o grupo controle tenha apresentado melhor organização na regeneração óssea, sendo que o tratamento com Matrigel® resultou ainda em uma reação inflamatória exacerbada, dado este confirmado também nas amostras não desmineralizadas. As radiografias periapicais também apontaram que os grupos que foram tratados com osso liofilizado apresentavam maior área de radiopacidade, sugerindo aceleração do processo de regeneração. Porém, o teste de PCR não detectou a presença do cromossomo Y do doador nas fêmeas receptoras das MSCs. Os resultados sugerem que o uso da terapia celular diminui o tempo de regeneração óssea alveolar e, quando aliada ao osso liofilizado, acelera este processo. Entretanto, decorridos sete dias da aplicação do Matrigel®, houve aumento da espessura do ramo mandibular no alvéolo onde foi aplicado, necessitando maior tempo de avaliação para melhor elucidar seu uso clínico.

**Palavras-chave:** odontologia, alvéolo dentário, *scaffold*, células-tronco mesenquimais, polpa dentária, *Lagomorfo*

## ABSTRACT

The alveolar bone regeneration has been a major focus of study in dentistry, both human and veterinary medicine, especially in implant and periodontal surgery and in the bucco-maxillo facial. Because of this, this study was to evaluate alveolar bone regeneration, using lyophilized bone and implant as mesenchymal stem cells (MSCs) derived from the dental pulp of a male donor for allogeneic graft. We used 57 female New Zealand rabbits, one rabbit MSCs from donor, divided into seven groups: control (G1), lyophilized bone (G2), Matrigel<sup>®</sup> (G3), Matrigel<sup>®</sup> and MSC (G4), lyophilized bone and Matrigel<sup>®</sup>(G5), lyophilized bone, MSC and Matrigel<sup>®</sup> (G6) and MSC only (G7). After extraction of the left lower incisor, the socket receiving the implant according to each group and evaluated in seven days. The samples were collected for microscopic analysis, demineralized and non-demineralized, PCR, and they have been subjected to X-ray analysis, which was also held in pre-and post-operatively. Grossly, there was thickening of the mandibular branch of animals that received and accelerate growth of the incisor teeth remaining in the Matrigel<sup>®</sup> animals that received cell therapy. Under microscopic analysis, we found that all groups that received the bone graft as lyophilized, regeneration time was lower, although the control group had a better organization in bone regeneration, and treatment with still resulted in a Matrigel<sup>®</sup> exaggerated inflammatory response, since this is also confirmed in samples not demineralized. The periapical radiographs also showed that the groups were treated with lyophilized bone had a greater area of radiopacity, suggesting acceleration of the regeneration process. However, the PCR test failed to detect the presence of Y chromosome in female recipients of the donor of MSCs. The results suggest that the use of cell therapy reduces the duration and alveolar bone regeneration when combined with lyophilized bone, accelerates this process. However, Matrigel<sup>®</sup>, there was increased thickness after seven days of applying of the mandibular alveolus in which it was applied, requiring longer evaluation to elucidate its clinical use.

**Key words:** dentistry, dental socket, *scaffold*, mesenchymal stem cells, dental pulp, *Lagomorph*



## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - Fórmula dentária do *Lagomorfo* (*Oryctolagus cuniculus*).....24
- FIGURA 2 - Normoclusão dos dentes incisivos na espécie *Oryctolagus cuniculus*. (B) Vista ventrodorsal da maxila indicando os dentes pré-molares e molares; (C) Vista dorsoventral da mandíbula mostrando os dentes pré-molares e molares. (Fonte: <http://www.lavoceideiconigli.it/malattie/patologiedenti.htm>) .....25
- FIGURA 3 - Denominação anatômica do dente incisivo do coelho (*Oryctolagus cuniculus*) .....25
- FIGURA 4 - Desenho ilustrativo da propriedade fundamental de divisão assimétrica das células-tronco (Fonte: ZAGO & COVAS, 2006).....33
- FIGURA 5 - Desenho ilustrativo dos diferentes sítios para obtenção de células-tronco (Fonte: SEONG et al., 2010).....37
- FIGURA 6 - Desenho ilustrativo das possíveis diferenciações a partir do isolamento das células-tronco oriundas da polpa dental (Fonte: SEONG et al., 2010).....38
- FIGURA 7 - Fotomicrografias demonstrando a capacidade das células isoladas de polpa dentária de coelho de formar CFU-F. Em A e B pode-se observar, 12 dias após o início da cultura, a formação de colônia em contraste de fase e aumento de 10X. 14 dias após o isolamento das células, estas foram fixadas e coradas por Panótico®. Em C e D observa-se a capacidade de formação de colônias típicas do CFU-F em aumento de 4X. E, em E e F, em aumento de 40X, fica claramente demonstrada a natureza fibroblástica das células .....52
- FIGURA 8 - Realização do exame clínico da cavidade oral, com auxílio do afastador de bochechas, com o animal sob anestesia geral inalatória, na mesa cirúrgica odontológica de Roedores e *Lagomorfos*.....54
- FIGURA 9 - Representação dos grupos de acordo com cada implante recebido .57

- FIGURA 10 - Sequência do procedimento cirúrgico. (A) Luxação do ligamento periodontal com alavanca na face lingual; (B) na face mesial; (C) na face distal; e (D) na face vestibular; (E) avulsão dentária com fórceps; (F) curetagem do alvéolo; (G) síntese com padrão isolado simples e fio poliglactina 910; e (H) corte dos dentes incisivos remanescentes com disco diamantado .....58
- FIGURA 11 - Tubo contendo fragmento de osso liofilizado bovino e meio de cultura (DMEM) .....59
- FIGURA 12 - Preenchimento do alvéolo dentário do incisivo inferior esquerdo com osso liofilizado .....60
- FIGURA 13 - (A) Seringa contendo Matrigel®. Notar a curvatura na agulha acompanhando o alvéolo dentário; (B) Aspecto gelificado do Matrigel®, após aplicação deste no alvéolo dentário do incisivo inferior esquerdo.....61
- FIGURA 14 - Aplicação de MSCs no alvéolo dentário com uma seringa de 1mL e agulha 23G, ressuspendidas em meio DMEM puro, representando o grupo 7 (MSC).....62
- FIGURA 15 - Mensuração da coroa clínica com sonda periodontal de 10mm sete dias pós-operatório. (A) Incisivo superior direito medindo 6mm; (B) Incisivo superior esquerdo medindo 7mm, (C) Incisivo inferior direito medindo 5mm.....64
- FIGURA 16 - Técnica da Bissetriz sendo realizada para radiografar o incisivo inferior esquerdo no pós-operatório imediato com o animal intubado e anestesiado com anestesia inalatória .....66
- FIGURA 17 - (A) Radiografia periapical ventrodorsal dos dentes incisivos inferiores no pós-operatório imediato; (B) Radiografia periapical látero-lateral do ramo mandibular esquerdo logo após a exodontia do incisivo inferior. Região escolhida para fazer análise comparativa pré e após sete dias (quadrado verde). Região pré-determinada para subtrair a diferença entre as radiografias (quadrado roxo) .....67

- FIGURA 18 - Cortes transversais da porção mandibular, contendo o alvéolo dentário, sendo colocados nos *cassetes* para melhor penetração do ácido nítrico 5% .....69
- FIGURA 19 - Delimitação da região mandíbula (quadrado preto) onde foram realizados os cortes na região rostral (traço amarelo) e na região distal (traço verde). No lado direito observa-se a amostra após realização do corte transversal do ramo mandibular esquerdo envolvendo o alvéolo que será avaliado .....71
- FIGURA 20 - Avaliação macroscópica do crescimento dos dentes incisivos remanescentes após sete dias do procedimento cirúrgico. Notar a irregularidade dos desgastes e crescimentos durante o mesmo período de tempo (A, B e C) .....80
- FIGURA 21 - Valores da mediana e escores máximo e mínimo do crescimento dos dentes incisivos superiores esquerdos (IES) (Teste de Tukey). Notar em destaque (elipse verde) os grupos que apresentaram maior crescimento dos ISE, e os grupos com os menores índices (elipse vermelha). \* = diferença estatística ( $p=0,049$ ). C = controle; O = osso liofilizado bovino; M = Matrigel®; MMSC = Matrigel® + célula-tronco mesenquimal; MSC = célula-tronco mesenquimal; OM = osso liofilizado + Matrigel®; OMMSC = osso liofilizado + Matrigel® + célula-tronco mesenquimal .....81
- FIGURA 22 - Aumento de volume do ramo mandibular esquerdo correspondente ao segmento do alvéolo que recebeu como enxerto osso liofilizado bovino e Matrigel® (seta amarela). (A) Vista ventrodorsal; (B) Vista látero-lateral esquerda. Observação: todos os animais dos grupos OMMSC (osso liofilizado bovino + Matrigel® + célula tronco mesenquimal) e do M (Matrigel®) também apresentaram esta mesma alteração.....82
- FIGURA 23 - Realização da técnica de subtração radiográfica digital, utilizando o programa Photoshop CS4 com sobreposição da radiografia final sobre a inicial mostrando o registro no histograma (elipse vermelha)....  
.....83
- FIGURA 24 - Imagens das radiografias periapicais, após sete dias, na incidência dorsoventral e látero-lateral, primeira e segunda linha, respectivamente. C, C' = grupo controle; O, O' = grupo osso liofilizado bovino; M, M' = grupo Matrigel®. Notar em C' e O' preservação das paredes do osso alveolar; e perda da definição no M'. Preenchimento alveolar homogêneo com osso liofilizado nas imagens O e O' resultando em maior radiopacidade .....84

- FIGURA 25 - Imagens das radiografias periapicais, após sete dias, na incidência dorsoventral e látero-lateral, primeira e segunda linha, respectivamente. MSC, MSC': grupo célula-tronco mesenquimal; MMSC, MMSC': Matrigel® + grupo célula-tronco mesenquimal; OM: osso liofilizado .....84
- FIGURA 26 - Gráfico da mediada obtido com os valores médios do histograma, após análise das radiografias periapicais na incidência látero-lateral (Teste SNK – gráfico Boxplot). Notar que a mediana, em todos os grupos, apresentou valores negativos, resultando em perda da densidade óssea, sem diferença estatística significativa entre todos os grupos (traço preto dentro da barra verde). Porém, os grupos O (osso liofilizado bovino) e MSC (célula-tronco mesenquimal) apresentaram valores positivos, o que indica aumento da densidade óssea (acima da linha vermelha) .....85
- FIGURA 27 - (A-G)Imagens de cortes histológicos corados com HE (obj 50x). C: grupo controle; O: grupo osso liofilizado bovino; M: grupo Matrigel®; OM: grupo osso liofilizado bovino + Matrigel®; MSC: grupo célula-tronco mesenquimal; MMSC: grupo célula-tronco mesenquimal + Matrigel®; OMMSC: osso liofilizado bovino + Matrigel® + célula-tronco mesenquimal. GD = germe dentário; TO = trabécula óssea; \* = Neoformação óssea; OL = osso liofilizado bovino; AI = absorção do implante; AO = atividade osteoblástica .....86
- FIGURA 28 - Representação gráfica de variância apontando menor atividade osteoblástica nos animais do grupo OMMSC (Teste de Kruskal-Wallis).....88
- FIGURA 29 - Amostras não desmineralizadas emblocadas com resina de poliéster cristal na coluna da direita, e análise microscópicas correspondentes na coluna da esquerda. C e C': grupo controle; O e O': grupo osso liofilizado bovino; M e M': grupo Matrigel®; OM e OM': grupo osso liofilizado bovino + Matrigel®. (\*) osso liofilizado bovino; (\*) presença do Matrigel® na região extra-alveolar.....90
- FIGURA 30 - Amostras não desmineralizadas emblocadas com resina de poliéster cristal na coluna da direita, e análise microscópicas correspondentes na coluna da esquerda. MSC e MSC': grupo célula-tronco mesenquimal; MMSC e MMSC': grupo célula-tronco mesenquimal + Matrigel®; OMMSC e OMMSC': osso liofilizado bovino + Matrigel® + célula-tronco mesenquimal. (\*) presença do Matrigel® na região extra-alveolar; (v) regeneração alveolar semelhante dos grupos MSC' e MMSC' .....91

FIGURA 31 - Análise da expressão do cromossoma Y. Na imagem em gel superior pode ser visualizada a expressão do gene constitutivo (GADPH), que comprova a eficácia do PCR na amplificação gênica (controle positivo). Enquanto que na imagem inferior, o gel demonstra a não detecção da expressão do cromossoma Y nas amostras de tecidos, dos diferentes tratamentos. Notar que na última coluna do gel inferior, a imagem demonstra a expressão do cromossoma Y na amostra de tecido de um animal macho, como controle positivo, comprovando a eficácia da técnica.....92

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b>	-	Requisitos para regeneração óssea.....	28
<b>TABELA 2</b>	-	Detalhamento da pontuação da escala histológica .....	70
<b>TABELA 3</b>	-	Desenho dos <i>primers</i> e sequência do DNA .....	74

## LISTA DE ABREVIATURAS

BID	Duas vezes ao dia
CFU-F	Unidades formadoras de colônias de fibroblastos
C	Controle
DPSCs	<i>Dental Pulp Stem Cells</i>
EHS	Engelbreth-Holm-Swarm
ES	Células-tronco embrionárias
FCS	Soro fetal bovino
°C	Graus Celsius
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HCV	Hospital de Clínicas Veterinárias
HE	Hematoxilina-eosina
IM	Intramuscular
IV	Intravenoso
kg	Quilograma
M	Matrigel®
MSCs	<i>Mesenchymal stem cells</i>
MSC	Grupo células-tronco mesenquimais
MMSC	Grupo Matrigel® + <i>Mesenchymal stem cells</i>
µL	Microlitros
mL	Mililitros
®	Marca registrada
O	Ossos liofilizados
OMMSC	Ossos liofilizados + Matrigel + <i>Mesenchymal stem cells</i>
PBS	Solução salina tamponada
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PRP	Plasma rico em plaquetas

ROG	Regeneração óssea guiada
RTG	Regeneração tecidual guiada
SID	Uma vez ao dia
SRD	Subtração radiográfica digital
UEA	Unidade de experimentação animal
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>20</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>22</b>
<b>2.1</b>	<b>Geral</b> .....	<b>22</b>
<b>2.2</b>	<b>Específicos</b> .....	<b>22</b>
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>24</b>
<b>3.1</b>	<b>Modelo Experimental</b> .....	<b>24</b>
<b>3.2</b>	<b>Doença Periodontal</b> .....	<b>26</b>
<b>3.3</b>	<b>Enxertos</b> .....	<b>29</b>
<b>3.4</b>	<b>Células-tronco</b> .....	<b>32</b>
3.4.1	Células-tronco aplicadas na odontologia .....	37
<b>3.5</b>	<b>Scaffolds Utilizados nas MSCs na Odontologia</b> .....	<b>41</b>
3.5.1	<i>Scaffolds</i> tridimensionais .....	41
3.5.2	<i>Scaffolds</i> fluidos .....	41
3.5.2.1	Matrigel® .....	42
<b>3.6</b>	<b>Técnica Radiográfica de Subtração</b> .....	<b>43</b>
<b>3.7</b>	<b>Teste de Reação em Cadeia da Polimerase</b> .....	<b>45</b>
3.7.1	Desnaturação térmica .....	45
3.7.2	Hibridização .....	46
3.7.3	Extensão .....	46
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>48</b>
<b>4.1</b>	<b>Animais Experimentais</b> .....	<b>48</b>
<b>4.2</b>	<b>Verificação do Volume do Alvéolo Dentário</b> .....	<b>49</b>
<b>4.3</b>	<b>Coleta da Polpa Dentária</b> .....	<b>49</b>

<b>4.4</b>	<b>Obtenção da Cultura Celular das Células-tronco Mesenquimais da Polpa Dentária</b> .....	<b>50</b>
<b>4.5</b>	<b>Caracterização das Células-tronco Mesenquimais a Partir da Polpa Dentária</b> .....	<b>51</b>
<b>4.6</b>	<b>Procedimento Anestésico</b> .....	<b>53</b>
<b>4.7</b>	<b>Procedimento Cirúrgico</b> .....	<b>53</b>
4.7.1	Procedimentos pré-operatórios .....	53
4.7.2	Exodontia do dente incisivo.....	55
<b>4.8</b>	<b>Procedimentos Terapêuticos</b> .....	<b>56</b>
4.8.1	Grupos .....	56
<b>4.9</b>	<b>Procedimentos Pós-operatórios</b> .....	<b>63</b>
<b>4.10</b>	<b>Método de Indução de Morte</b> .....	<b>63</b>
<b>4.11</b>	<b>Avaliação Macroscópica</b> .....	<b>63</b>
<b>4.12</b>	<b>Avaliação Radiográfica</b> .....	<b>63</b>
<b>4.13</b>	<b>Avaliações Microscópicas</b> .....	<b>68</b>
4.13.1	Material desmineralizado .....	68
4.13.2	Material não desmineralizado .....	70
4.13.2.1	Preparo das amostras .....	70
<b>4.14</b>	<b>Análise da Expressão do Cromossoma Y nas Amostras de Tecido das Receptoras</b> .....	<b>72</b>

4.14.1	Protocolo de extração de DNA com trizol das amostras de tecido	73
4.14.2	Amplificação do DNA .....	73
4.14.3	Desenho dos iniciadores ( <i>primers</i> ).....	74
4.14.4	Confirmação da amplificação do DNA das amostras .....	74
<b>4.15</b>	<b>Análise Estatística .....</b>	<b>75</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>76</b>
<b>5.1</b>	<b>Modelo Experimental .....</b>	<b>76</b>
<b>5.2</b>	<b>Procedimento Anestésico .....</b>	<b>76</b>
<b>5.3</b>	<b>Coleta da Polpa Dentária .....</b>	<b>77</b>
<b>5.4</b>	<b>Procedimento Cirúrgico .....</b>	<b>77</b>
<b>5.5</b>	<b>Exodontia do Dente Incisivo .....</b>	<b>78</b>
<b>5.6</b>	<b>Procedimentos Terapêuticos .....</b>	<b>78</b>
<b>5.7</b>	<b>Avaliação Macroscópica.....</b>	<b>79</b>
<b>5.8</b>	<b>Avaliação Radiográfica.....</b>	<b>82</b>
<b>5.9</b>	<b>Avaliação Microscópica.....</b>	<b>85</b>
5.9.1	Análises histológicas de material desmineralizado .....	85
5.9.2	Análises histológicas de material não desmineralizado .....	89
<b>5.10</b>	<b>Análise da Expressão do Cromossoma Y nas Amostras de Tecido das Receptoras .....</b>	<b>91</b>

<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>93</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>105</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>107</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A doença periodontal consiste em uma das afecções de grande prevalência, tanto em humanos como animais, a qual tem como consequência destruição dos tecidos conectivos responsáveis em manter o dente, denominado periodonto. Com o avanço da doença periodontal, ocorre maior reabsorção óssea, que aliada à ausência do dente, prejudica tratamentos reconstrutivos, como por exemplo, colocação de implantes, predispondo inclusive à fraturas, tanto em mandíbula quanto em maxila.

Nos últimos anos, diversos procedimentos foram desenvolvidos com a finalidade de regeneração tecidual, incluindo regeneração tecidual guiada com aplicação de vários fatores de crescimento, como osso, plasma rico em plaquetas e uso de membranas biológicas. Para o preenchimento do alvéolo dentário pode-se optar por enxerto autólogo, heterólogo ou xenólogo, que tem como objetivo recuperar a altura, espessura e manter a qualidade óssea. Os xenoenxertos bovinos são comercializados como material inerte, livre de antígenos e, quando liofilizado, parece não afetar sua capacidade osteoindutiva.

Entretanto, pesquisas mais recentes utilizando células-tronco têm sido discutidas para tratamento periodontal e implantodontia dental na regeneração óssea, assim como qual seria a melhor fonte para coleta dessas células. As células-tronco podem ser obtidas de diversos tecidos como medula óssea, tecido adiposo e, atualmente, a polpa dentária, tanto de dentes decíduos como de dentes permanentes, tem ganhado destaque. Estudos realizados com células-tronco provenientes da polpa dentária (DPSCs) têm mostrado

capacidade de diferenciação em odontoblastos, em linhagem osteoblástica e regeneração do complexo dentina-polpa e ósseo. Além disso, as DPSCs podem também apresentar potencial para uso em doenças sistêmicas, como doenças cardíacas e neurológicas, e apresentar melhora nos casos de doenças isquêmicas.

Todavia, as células-tronco têm sido aplicadas no local da lesão associadas à *scaffolds* e têm demonstrado interatividade com biomateriais tornando-as ideal para reconstrução tecidual.

O presente trabalho tem como objetivo avaliar a regeneração óssea alveolar após exodontia do incisivo inferior esquerdo e preenchimento do alvéolo com osso liofilizado bovino, células-tronco mesenquimais obtidas a partir da polpa dental e avaliar qual a influência do Matrigel® como *scaffold* das MSCs e de seus fatores de crescimento.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Avaliar a regeneração óssea alveolar após exodontia do dente incisivo de coelhos Nova Zelândia que receberam como enxerto osso liofilizado, Matrigel® e células-tronco mesenquimais, separadamente e em associação, de acordo com cada grupo.

### 2.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar a influência do Matrigel® como *scaffold* das MSCs e de seus fatores de crescimento.
- Comparar radiograficamente a regeneração óssea no alvéolo dentário após utilização de enxerto com osso liofilizado e MSCs oriundas da polpa dentária.
- Comparar o crescimento dos incisivos remanescentes, após sete dias, entre os grupos através da mensuração das coroas clínicas com sonda periodontal.
- Avaliar histologicamente o processo de cicatrização do alvéolo dentário após enxerto com o osso liofilizado, associado ou não com as células-tronco mesenquimais oriundas da polpa dentária.

- Comparar os resultados das avaliações histopatológicas do material desmineralizado com o não desmineralizado, através da análise microscópica.
- Verificar a presença do cromossomo Y do doador nas fêmeas representadas nos grupos receptores das células-tronco mesenquimais através da reação de polimerização em cadeia (PCR).



### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Modelo Experimental

Atualmente, diversas pesquisas têm sido realizadas na área da odontologia, utilizando o coelho como modelo experimental, principalmente para avaliar regeneração óssea alveolar (LALANI et al., 2005); cicatrização óssea, utilizando enxertos ósseos para reconstrução de maxila, especialmente em casos de reabsorção óssea (KAHNBERG et al., 1998); distração osteogênica (HWANG & CHOI, 2010; CLARK et al., 2006); osteointegração de implantes dentários (MORI et al., 1997) e regeneração do complexo dentina-polpa (EL-BACKLY et al., 2008).

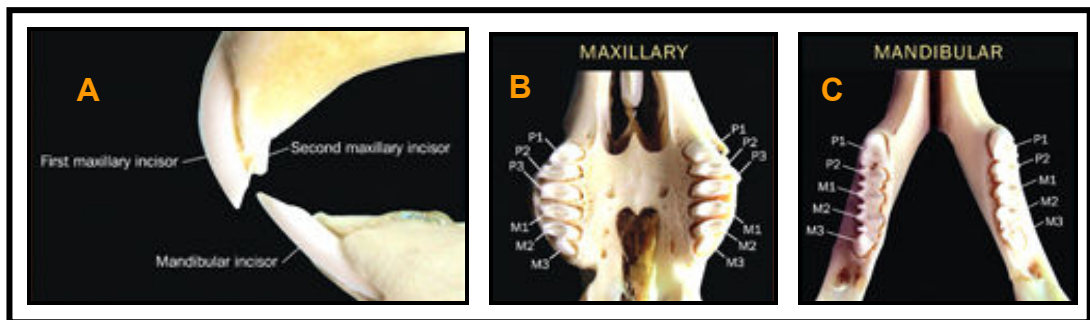
Os coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) pertencem à Ordem *Lagomorfa*, da Família *Leporidae*, e caracterizam-se por serem animais difiodontes, caracterizando-se por apresentar dentição decídua e permanente, e heterodontes, ou seja, possui incisivos, pré-molares e molares distintos. A erupção da dentição permanente ocorre entre a terceira e a quinta semana de vida nesta espécie, embora possa ocorrer ainda na vida intra-uterina (CAPELLO et al., 2005). A fórmula dentária permanente da espécie está representada logo abaixo (FIGURA 1) (WIGGS & LOBPRISE, 1997).

**Fórmula dentária da dentição permanente:**

$$2 \times (I2/1, PM3/2, M3/3) = 28 \text{ dentes}$$

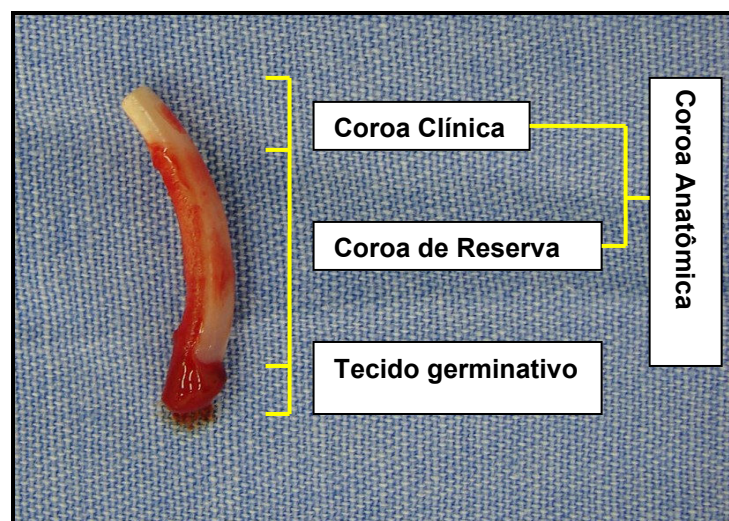
FIGURA 1 – Fórmula dentária do *Lagomorfo* (*Oryctolagus cuniculus*)

Os lagomorfos diferem dos roedores por apresentarem quatro incisivos superiores com crescimento contínuo (elodonte), sendo um dente em cada hemiarco dentário, denominado de duplicitentata (FIGURA 2). Devido a não distinção entre coroa e raiz dos dentes, são denominados hipsodonte, ou seja, possuem uma coroa clínica (supragengival) e uma coroa de reserva (subgengival), cuja extremidade é semelhante a um ápice aberto, onde existem células germinativas responsáveis pela produção das estruturas dentárias e crescimento contínuo dos dentes (FIGURA 3). O conjunto das coroas clínica e de reserva é denominado coroa anatômica (WIGGS & LOBPRISE, 1997).



**FIGURA 2** - Normoclusão dos dentes incisivos na espécie *Oryctolagus cuniculus*. (B) Vista ventrodorsal da maxila indicando os dentes pré-molares e molares; (C) Vista dorsoventral da mandíbula mostrando os dentes pré-molares e molares.

(Fonte: <http://www.lavoceideiconigli.it/malattie/patologiedenti.htm>)



**FIGURA 3** - Denominação anatômica do dente incisivo do coelho (*Oryctolagus cuniculus*).

### 3.2 Doença Periodontal

A doença periodontal é um processo progressivo que consiste na perda da sustentação dental, causada pelo acúmulo de placa bacteriana no dente e em sua estrutura de sustentação. Com o avanço desta, o quadro clínico torna-se irreversível resultando em perda dental e reabsorção do alvéolo dentário, o qual é dependente do dente (WIGGS & LOBPRISE, 1997; NEWMAN et al., 2004; BASHUTSKI & WANG, 2009).

A partir da ausência do dente, o alvéolo dentário inicia o processo de reparo e regeneração, que irá depender do tipo celular que chegar primeiro. Existem quatro populações de células que compõe o periodonto: a lâmina própria da gengiva, o ligamento periodontal, o osso alveolar e o cemento. Células do ligamento periodontal, do osso alveolar e, possivelmente, cementoblastos possuem toda capacidade de regeneração periodontal. Entretanto, células epiteliais migram aproximadamente 10 vezes mais rápido que outras células periodontais, resultando em um longo epitélio juncional, impedindo o potencial regenerativo das demais células (BASHUTSKI & WANG, 2009).

Historicamente, aumento ou “regeneração” do osso alveolar perdido, resultante de uma extração dentária, reabsorção ou trauma, representam um desafio significativo aos clínicos. Porém, quando não há intervenção de procedimentos regenerativos, defeitos dos sítios de extração cicatrizam com o tecido conjuntivo fibroso e com formação de cicatriz e frequentemente não são preenchidos por osso. Por outro lado, a exclusão de tecido epitelial e conjuntivo da ferida periodontal por um período de seis a oito semanas permite que os

tecidos adjacentes de crescimento mais lento ocupem o espaço adjacente ao dente. Osteoblastos, cementoblastos e células do ligamento periodontal podem proporcionar a oportunidade de regenerar um novo suporte periodontal (um novo osso e novas fibras de tecido conjuntivo inseridas dentro do novo cimento formado) na superfície da raiz anteriormente doente (NEWMAN et al., 2004).

A cicatrização óssea pode ser classificada em primária e secundária. Assim como ocorre nos tecidos moles, a cicatrização óssea primária implica no contato direto, ou em um espaço menor que 1mm, entre os fragmentos ósseos, onde inicia o trabalho em grupo dos osteoclastos para criar túnel com a finalidade de os osteoblastos secretarem osteóides para futura mineralização (RODEN JR, 2010).

Na cicatrização óssea secundária ocorre à formação do calo dentro do qual osteóides são produzidos e ocorre a mineralização. Este tipo de cicatrização pode ser dividido em três grandes fases: inflamatória, reparo, e remodelação. A fase inflamatória ocorre imediatamente com a formação do hematoma, que eventualmente forma o tecido de granulação. A segunda fase de reparo inicia quando as células inflamatórias e fibroblastos invadem o tecido. Estas células causam diferenciação e recrutamento dos osteoblastos e fornecem um arcabouço (*scaffold*) para aumentar neoformação vascular. Entretanto, os osteóides produzidos pelos osteoblastos formam o calo mole, o qual é eventualmente ossificado. O último estágio de remodelação ocorre ao longo de meses a anos e restaura o osso em sua forma e força original (RODEN JR, 2010).

A regeneração tecidual guiada (RTG) tem como princípio ordenar células específicas a contribuírem para a formação de tecidos específicos, enquanto que na regeneração óssea guiada (ROG) o objetivo é regenerar um único tecido, isto é, o osso. Na ROG, a absorção do enxerto ósseo no espaço alveolar deve anteceder a ocupação do osso, pois, apesar de ser o único tecido com capacidade de regenerar-se, sua estrutura calcificada rígida possui perfusão limitada, enquanto que o enxerto é dependente da estabilidade do suprimento sanguíneo. A tabela abaixo ilustra os requisitos mínimos para regeneração óssea (NEWMAN et al., 2004).

**TABELA 1** - Requisitos para regeneração óssea.

<b>Requisitos Biológicos</b>	<b>Procedimentos Cirúrgicos</b>
Suprimento sanguíneo	Perfurações na cortical
Estabilização	Parafusos de fixação
Osteoblastos	Enxerto ósseo (autólogo)
Espaço confinado	Membrana
Manutenção do espaço	Efeito tenda, materiais de enxerto ósseo
Cobertura da ferida	Manuseio do retalho, sutura sem tensão

(Fonte: NEWMAN et al., 2004)

HUJA et al. (2006) afirmam ainda que o *turn over* ósseo pode sofrer influência dentro do processo alveolar, na mandíbula e na maxila, e entre dentes anteriores e posteriores, indicando provável interferência do envolvimento mecânico na regeneração.

Em humanos, a reabsorção óssea alveolar também prejudica tratamentos estéticos, como colocação de implante, e posterior prótese, devido à ausência de suporte ósseo, necessitando realizar enxerto ósseo, autólogo ou sintético (MORSCZECK et al., 2008).

Na tentativa de reconstrução total ou parcial das estruturas perdidas desenvolveram-se técnicas com o objetivo de recuperar o contorno anatômico normal, eliminar espaços mortos, favorecer a cicatrização, além de prevenir a invaginação de tecidos moles para o interior dessa cavidade, reduzindo assim as chances de infecções secundárias (IAMAGUTI & BRANDÃO, 2007).

### 3.3 Enxertos

Os enxertos são definidos como a transferência de tecido vivo e são classificados quanto a sua estrutura em enxerto ósseo esponjoso e cortical (MILLIS & MARTINEZ, 2007).

Com relação a histocompatibilidade, os enxertos são classificados em (MILLIS & MARTINEZ, 2007):

- **Auto-enxerto:** transplante do enxerto de um ponto do indivíduo para outro local no mesmo indivíduo;
- **Aloenxerto (homoenxerto):** tecido obtido de um indivíduo e transplantado para outro da mesma espécie;
- **Aloimplante:** é um osso não viável preparado de enxertia por congelamento, congelamento-dessecação, irradiação, ou substâncias químicas, e implantados em outro indivíduo;
- **Xenoenxerto (heteroenxerto):** transplante de tecido de um indivíduo a outro de espécie diferente.
- **Isoenxerto (sinenxerto):** tecidos transplantados de um indivíduo para outro geneticamente idêntico.

A composição de enxertos ósseos pode incluir osso esponjoso, osso cortical, osso corticoesponjoso, medula óssea ou osso e cartilagem articular (osteocondral). Um enxerto ósseo ideal ou um substituto ósseo tem como função propiciar (1) células osteogênicas que produzem osso novo, (2) fatores osteoindutores que induzem à diferenciação de células ósseas a partir de células mesenquimais indiferenciadas, (3) uma matriz osteocondutora que atua como estrutura para crescimento interno de osso novo e (4) suporte estrutural para a coluna óssea (MILLIS & MARTINEZ, 2007).

Normalmente, dependendo do tipo de enxerto ósseo eles, acabam realizando uma ou mais funções quando incorporado ao tecido do hospedeiro. Entretanto, a escolha do enxerto ósseo substituto dependerá das funções requeridas: osteogênese (formação de novo osso), osteoindução (células mesenquimais indiferenciadas são estimuladas a se diferenciarem em osteoblastos e condroblastos), osteocondução (crescimento de capilares, tecido perivascular e células mesenquimais dentro do osso novo) ou suporte estrutural (promovem resistência e estrutura aos enxertos em grandes defeitos ósseos) (MILLIS & MARTINEZ, 2007; GONÇALVES, 2010).

Acredita-se que o sucesso do tratamento de perda óssea requer uma combinação de sinais osteoindutivos, de matriz osteocondutiva e de resposta celular ao potencial osteogênico (OAKES et al., 2003; GONÇALVES, 2010).

Biologicamente, a melhor fonte para a obtenção desse material seria, o próprio animal, com a utilização do enxerto autólogo. Entretanto, o transplante autólogo, considerado o padrão ouro na regeneração óssea, tem taxa de insucesso acima de 30%. Porém, tal opção acaba sendo muitas vezes

preterida por aumentar a morbidade, a dor, os tempos cirúrgico e anestésico e, principalmente, por não fornecer volume suficiente para a reconstrução de uma grande falha óssea (ALIEVI et al., 2007; MILLIS & MARTINEZ, 2007; KRETLOW, 2009). Gonçalves (2010) acrescenta como desvantagens dos enxertos autólogos riscos de infecção, hematoma e hipersensibilidade do tecido.

O enxerto ósseo xenógeno tem sido uma opção viável, desde que tratado adequadamente para redução da antigenicidade. Todavia, as técnicas de esterilização utilizadas diminuem as propriedades osteoindutivas destes enxertos (OLIVEIRA et al., 2005; RIZZO et al., 2005; GONÇALVES, 2010).

O osso liofilizado bovino tem sido utilizado como enxerto ósseo em humanos e apresenta osteointegração similar ao enxerto liofilizado humano. Além disso, apresenta como vantagem a fácil obtenção e a grande quantidade de material disponível, considerando o porte do animal (GALIA et al., 2009; GONÇALVES, 2010).

Biomateriais à base de fosfato de cálcio também podem ser utilizados como enxerto alveolar e têm como característica a excelente compatibilidade tecidual e não desencadeiam qualquer resposta inflamatória ou reação a corpo estranho. Esses materiais são osteocondutivos, e não osteoindutivos, significando que eles conduzirão a formação óssea quando colocados próximo de osso viável, porém não quando cercados por um tecido que não induzem formação óssea. Os dois tipos de cerâmicas mais utilizados são a hidroxiapatita e o fosfato de tricálcio (NEWMAN et al., 2004).

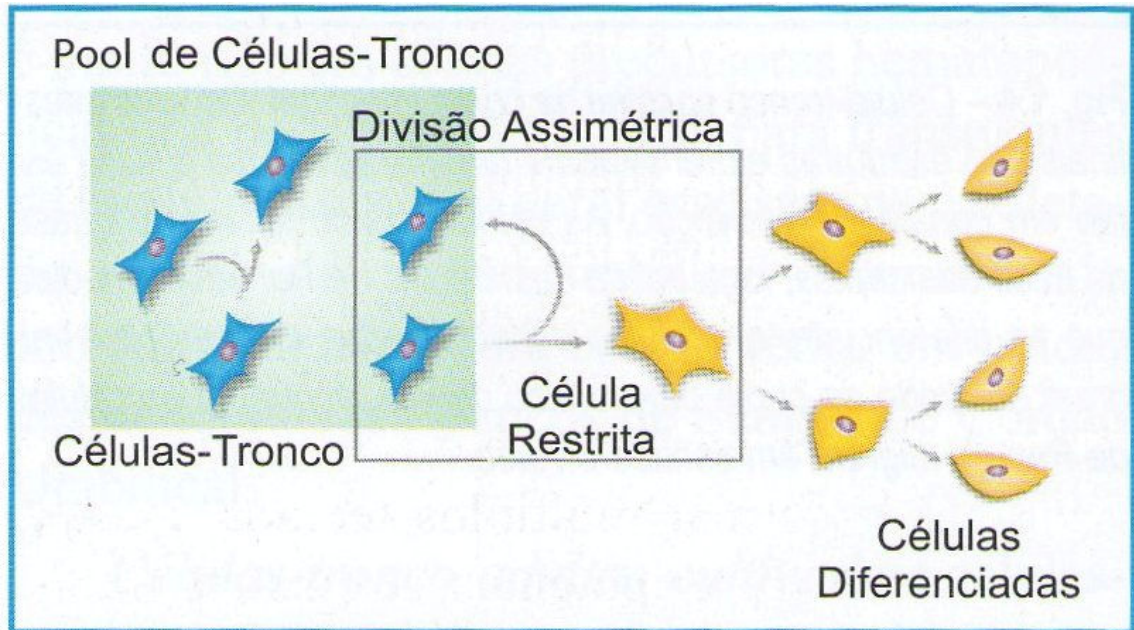


A combinação de técnicas costuma ser realizada frequentemente, como por exemplo, a regeneração tecidual guiada com enxertos ósseos e outros métodos, enxertos e membranas (NEWMAN et al., 2004).

### **3. 4 Células-tronco**

A célula-tronco é definida como um tipo de célula indiferenciada, capaz de se multiplicar mantendo-se indiferenciadas por longos períodos, tanto *in vitro* como *in vivo*, mas que diante de estímulos específicos podem diferenciar-se em células maduras e funcionais. Além disso, tem a propriedade fundamental de divisão assimétrica, ou seja, ao mesmo tempo que originam células precursoras com capacidade de diferenciação restrita a um determinado tecido, produzem células indiferenciadas que repõe a população de células-tronco (ZAGO & COVAS, 2006) (FIGURA 4).

As células-tronco têm sido o principal alvo de estudo e trabalhos experimentais devido a sua plasticidade, a qual permite a diferenciação dessas células em diversos tecidos como fígado, sistema nervoso central, rins, pâncreas, pulmões, pele, trato gastrointestinal, coração, músculo esquelético (RIZZO et al., 2005; NAKAGE & SANTANA, 2006). Portanto, a plasticidade é definida como a capacidade de uma célula de originar vários tipos celulares diferentes, como por exemplo, células-tronco hematopoiéticas dando origem a células musculares cardíacas ou hepatócitos, ou seja, a capacidade de transdiferenciação (ZAGO & COVAS, 2006; KOLYA & CASTANHO, 2007).



**FIGURA 4** - Desenho ilustrativo da propriedade fundamental de divisão assimétrica das células-tronco (Fonte: ZAGO & COVAS, 2006).

Com relação à potencialidade dessas células denominam-se totipotentes, pluripotentes e multipotentes. Alternativamente, quanto a origem podem ainda ser classificadas como embrionárias e adultas (OKAMOTO & SANTOS, 2004; CIRNE-LIMA, 2007).

As células-tronco embrionárias são derivadas de estágios iniciais de embriões. As células-tronco embrionárias obtidas de embriões de 2 ou 4 células possuem a capacidade de se diferenciar em todos os tipos celulares que compõe um organismo adulto, além dos anexos embrionários, por isso são denominadas de *totipotentes*. Entretanto, quando as ES são derivadas de um estágio embrionário mais avançado, o blastocisto, estas possuem a capacidade de originar as três camadas germinativas embrionárias – mesoderme, ectoderme e endoderme – passam a ser classificadas como *pluripotentes*. As células *pluripotentes* possuem capacidade de dar origem a qualquer tipo

celular, que compõe um indivíduo adulto; porém, nunca a um novo indivíduo, pois não possuem a capacidade de gerar os anexos embrionários (SLACK, 2000; CIRNE-LIMA, 2007; FONTANA, 2009).

Para manutenção e expansão das células-tronco embrionárias e adultas faz-se necessária a realização de repiques conservando as linhagens específicas desejadas, com perda de algumas células (NARDI & MEIRELLES, 2006).

Até o presente momento, as células-tronco adultas, que podem ser obtidas de diferentes tecidos que compõem um indivíduo adulto, melhor estudadas, são as células presentes na fração mononuclear da medula óssea, que contém as células tronco hematopoiéticas e as células-tronco mesenquimais (MSCs), podendo ser encontradas tanto no sangue periférico como no sangue de cordão umbilical, correspondendo a 0,1-1% do total de células (OKAMOTO & SANTOS, 2004; NAKAGE & SANTANA, 2006).

As células-tronco mesenquimais podem ser isoladas de medula óssea, de tecido adiposo, de vários tecidos fetais e numerosos outros tecidos de adultos. A propriedade básica que permite o isolamento e a cultura dessas células é a sua facilidade de aderir a superfícies como vidro e plástico, e possuem a capacidade de se diferenciar *in vitro* e *in vivo* em osteoblastos, em adipócitos, em condroblastos e em mioblastos (ZAGO & COVAS, 2006).

As células-tronco mesenquimais apresentam pluripotencialidade para células derivadas do mesoderma: células contráteis, células endoteliais, condrócitos (OKAMOTO & SANTOS, 2004; CHEN et al., 2008). Através destas células descobriu-se que as células-tronco mesenquimais aderem-se às placas

de cultura, e apresentam morfologia semelhante a fibroblastos *in vitro*, formando colônias após um determinado período de cultivo. Todas as células terminalmente diferenciadas acabam morrendo, exceto as células aderentes, que sobrevivem, que são por definição, as células-tronco mesenquimais (NARDI & MEIRELLES, 2006; ZAGO & COVAS, 2006; BYDLOWSKI et al., 2009; HWANG & CHOIN, 2010).

Durante o crescimento inicial *in vitro*, as MSCs fibroblastóides, ou seja, com formato fusiforme, formam colônias denominadas, em analogia com as células-tronco hematopoiéticas, de unidades formadoras de colônias de fibroblastos (CFU-F). Apesar de não serem imortais, as MSCs têm capacidade de se expandir numerosas vezes em cultura, mantendo seu potencial de crescimento e pluripotencialidade. Entretanto, estas células apresentam inibição do crescimento ao atingir a confluência, levando à necessidade de várias passagens sucessivas para se obterem quantidades de MSCs altamente enriquecidas, com ausência de outros tipos celulares. Porém, em humanos, após as primeiras três semanas de cultura e cerca de 12 a 15 duplicações, passagens sucessivas levam à diminuição das taxas de proliferação celular, e as células progressivamente mostram perda da multipotencialidade. Essas alterações são mais pronunciadas quando se utiliza material originário de indivíduos adultos do que as células derivadas de indivíduos jovens (BYDLOWSKI et al., 2009).

As células-tronco mesenquimais correspondem a uma pequena população celular da medula óssea, compondo cerca de 0,01% a 0,0001% de todas as células nucleadas medulares. Entretanto, podem ser isoladas e

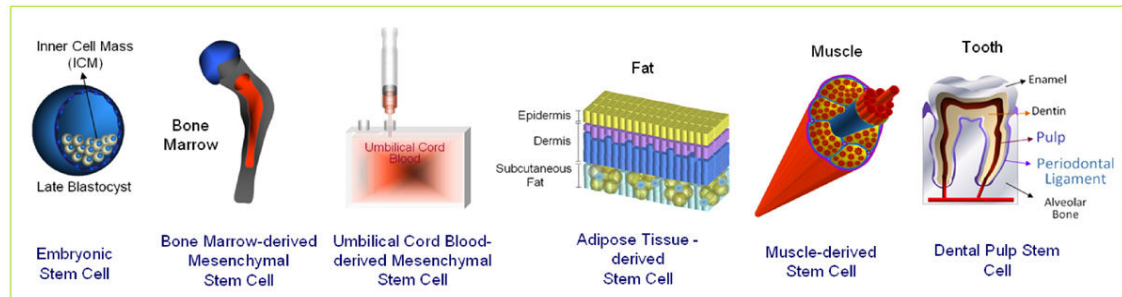
expandidas com alta eficiência e induzidas a se diferenciarem em múltiplas linhagens em condições de culturas definidas. O interesse neste tipo celular cresceu exponencialmente nos últimos anos devido ao seu grande potencial de uso na regeneração de tecidos e órgãos lesados (ZAGO & COVAS, 2006; BYDLOWSKI et al., 2009).

Embora as MSC possuam aptidão de diferenciação mais limitada que as células-tronco embrionárias, apresentam grandes vantagens, considerando a facilidade de isolamento destas células, sua capacidade de propagação em cultura, e de não serem imunogênicas, podendo ser teoricamente empregadas em transplantes alogênicos (BYDLOWSKI et al., 2009).

Estas células podem ser derivadas da medula óssea, além de outros órgãos como rim, baço, pulmão, pâncreas, fígado, aorta, veia cava, e musculatura estriada esquelética (NARDI & MEIRELLES, 2006). Entre os sítios de colheita de células-tronco provenientes da medula óssea pode-se destacar: a crista dorsal do ílio, o trocanter maior do fêmur, a abordagem trans-ílica e a região epifisária proximal do úmero (RASKIN, 2007).

A utilização de sangue de cordão umbilical (OKAMOTO & SANTOS, 2004) e da gordura de lipoaspirados também apresentaram células aderentes com aspecto de célula-tronco mesenquimal, sendo que “células-tronco adiposo-derivadas” têm sido aplicadas no reparo de lesões cutâneas e outras cirurgias plásticas (ZUK et al., 2002; NARDI & MEIRELLES, 2006; SÁNDOR & SUURONE, 2008). O tecido adiposo consiste em uma fonte alternativa para obtenção de células-tronco mesenquimais autólogas adultas, presente em grandes quantidades nestes tecidos podendo ser coletada com o paciente sob

anestesia local gerando mínimo desconforto (ZUK et al., 2002). Abaixo segue uma figura representativa das possíveis fontes de MSCs (FIGURA 5).



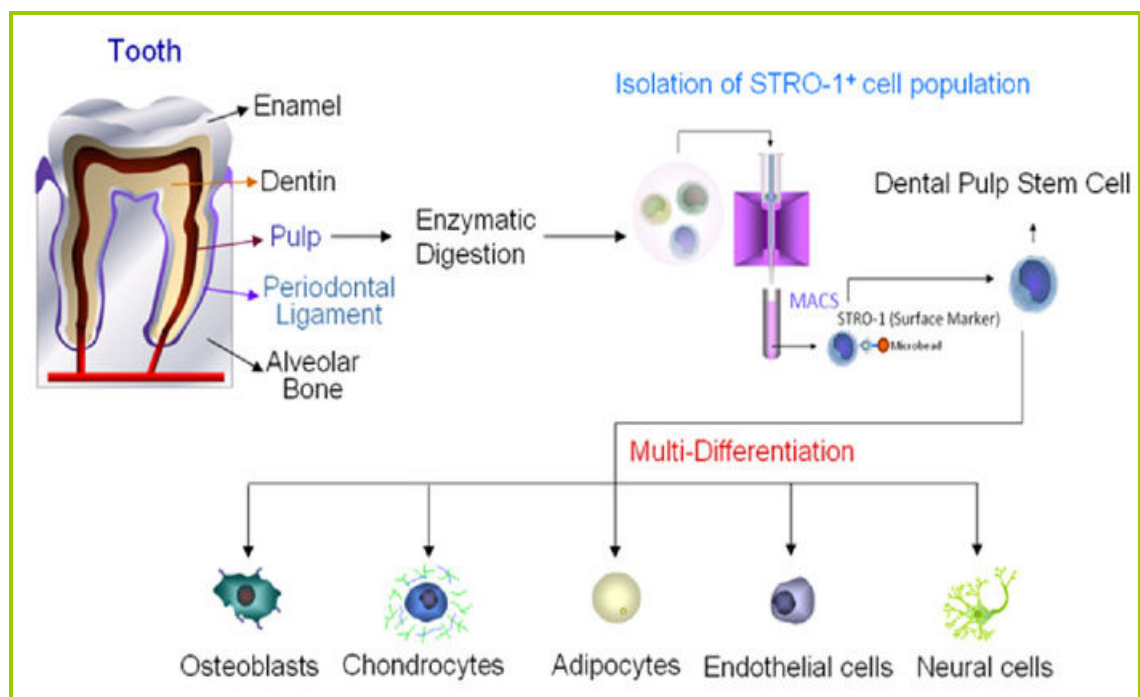
**FIGURA 5** - Desenho ilustrativo dos diferentes sítios para obtenção de células-tronco (Fonte: SEONG et al., 2010).

Apesar das evidências de que as MSCs podem transdiferenciar em múltiplos tipos celulares, *in vivo*, a real contribuição ao reparo tecidual das MSCs ainda não é claro. Por exemplo, na ortopedia, que tem sido proposto que as MSCs poderiam ser utilizadas para regenerar qualquer tecido; porém, as evidências mostram que o uso destas células na reconstrução exclusivamente através de mecanismos de diferenciação serviria somente para o reparo ósseo (BYDLOWSKI et al., 2009).

#### 3.4.1 Células-tronco aplicadas na odontologia

Atualmente as pesquisas no campo da odontologia estão voltadas para as células-tronco, seja na formação dental ou na regeneração de tecido bucal (KOLYA & CASTANHO, 2007), devido ao seu alto poder osteoindutor (RASKIN, 2007).

Algumas fontes dessas células são bastante exploradas, onde pode-se destacar as MSCs, as quais têm sido isoladas da medula óssea, tecido adiposo e dentes decíduos e permanentes. As MSCs podem diferenciar-se em fibroblastos, cementoblastos, osteoblastos, componentes de tecido conjuntivo e odontoblastos envolvidos na formação da dentina (FIGURA 6) (KOLYA & CASTANHO, 2007; SEONG et al., 2010).



**FIGURA 6** - Desenho ilustrativo das possíveis diferenciações a partir do isolamento das células-tronco oriundas da polpa dental (Fonte: SEONG et al., 2010).

Porém, análises recentes do epitélio dental e da variedade ectomesenquimal dos tipos celulares dentais revelaram existir células-tronco na polpa dentária (DPSCs), no ligamento periodontal, no precursor do folículo dental e na papila apical (MORSCZECK et al., 2008).

Duas grandes categorias de células-tronco são discutidas na odontologia:

(1) as células-tronco embrionárias, e (2) as células-tronco somáticas ou

adultas. O isolamento e a aplicação das células-tronco embrionárias em humanos possuem controvérsias éticas, mas esses primeiros estudos experimentais mostraram o caminho para os tratamentos atuais. Precusores de células dentais têm sido grande atrativo para novos tratamentos por serem de fácil acesso, comparando-se com os procedimentos para obtenção das MSCs derivadas da medula óssea, evitando preocupações éticas e manipulações extras (OHAZAMA et al., 2004; MORSCZECK et al., 2008).

As células-tronco provenientes da polpa dos dentes decíduos permanecem vivas por um curto período de tempo, após sua exfoliação, podendo ser armazenadas e cultivadas (GRONTHOS et al., 2000; MIURA et al., 2003).

A presença de células-tronco indiferenciadas no ectomesenquima oral, após a erupção dentária em humanos, serviu como marco para o isolamento dessas células na polpa dentária. Em contraste, as células-tronco derivadas da medula óssea são capazes de se diferenciar em odontoblastos. As DPSCs podem induzir também a diferenciação em células musculares esqueléticas, neurônios, cartilagem e células ósseas a partir de culturas definidas quimicamente. As células-tronco extraídas da polpa dentária de incisivo decíduo humano têm capacidade de se diferenciar em odontoblasto, adipócitos e células neurais (MORSCZECK et al., 2008). D'Aquino et al. (2008) acrescentam fácil acesso e coleta de células da polpa dentária, além de baixa morbidade.

El-Backly et al. (2008) afirmam que a polpa dentária contém células que podem se diferenciar em tecido duro após o dano. Os odontoblastos que foram



lesados podem ser substituídos por uma nova população regenerativa de células tipo odontoblastos derivadas de células-tronco residentes na polpa dentária.

Muitos estudos têm sido realizados com as DPSCs e descobriram principalmente que estas células estromais multipotentes podem ser criopreservadas com segurança, usadas com diversos *scaffolds*, e podem proliferar extensivamente, com grande longevidade e construir *in vitro* osso de adulto com canais de Havers e vascularização adequada (D'AQUINO et al., 2008).

Diversos estudos estão sendo feitos com o objetivo de reduzir o tempo da consolidação óssea incluindo ultra-som, pulso eletromagnético, calcitonina, ED-71, rFGF-2, rpOP-1, BMP-4, rhBMP-2, exposição ao oxigênio hiperbárico, células da medula óssea autóloga e plasma rico em plaquetas (PRP) (HWANG & CHOIN, 2010).

Atualmente, muitos estudos têm sido feitos sobre a regeneração óssea com MSC. Todavia, a regeneração óssea usando a engenharia tecidual pode apresentar desvantagens de enxerto ósseo autógeno como uma limitação da quantidade e a necessidade de novas intervenções cirúrgicas. Muitos fatores da regeneração óssea usando engenharia tecidual incluem MSC indiferenciadas, fatores de crescimento e *scaffolds* 3D (HWANG & CHOIN, 2010).

### **3.5 Scaffolds Utilizados nas MSCs na Odontologia**

Os *scaffolds* são materiais utilizados como “arcabouço”, que servem de sustentação para algum material, como por exemplo, as células-tronco (SEONG et al., 2010).

As MSCs derivadas da polpa dentária possuem grande eficiência, habilidade de diferenciação extensiva e tem demonstrado interatividade com biomateriais tornando-as ideal para reconstrução tecidual (D’AQUINO et al., 2008).

#### **3.5.1 Scaffolds tridimensionais**

Estudos recentes de engenharia de tecidos ósseos têm mostrado grande potencial da utilização das células-tronco mesenquimais da polpa dental em combinação com uma matriz de suporte 3D, como por exemplo, a associação destas células, isoladas a partir de polpa dental de dente de coelho, com PLGA (poliácido láctico glicólico), que foram transplantadas via subcutânea. Histologicamente, a evolução deste transplante heterólogo relevou grande formação de tecido mineralizado, sugerindo que as DPSCs possuem potencial para regeneração tecidual óssea para uso clínico (EL-BACKLY et al., 2008; SEONG et al., 2010).

#### **3.5.2 Scaffolds fluidos**

Além dos requisitos básicos para qualquer biomaterial poder ser aplicado clinicamente, como biocompatibilidade, eles devem apresentar três requisitos

fundamentais: 1) capacidade de ajuste ao defeito anatômico, 2) fornecem suporte mecânico para regenerar e sustentar os tecidos circundantes, e (3) entregar fatores bioativos para auxiliar a regeneração do tecido (KRETLOW et al., 2009).

Atualmente, o *scaffold* injetável mais utilizado tem sido o plasma rico em plaquetas (PRP), que visa acelerar o reparo de ferida cirúrgica e regeneração óssea, pois estão presentes fatores de crescimento derivado das plaquetas que assumem propriedades antiinflamatórias e regenerativas. A ação conjunta dos fatores de crescimento resulta na sinalização para as células mesenquimais e epiteliais migrarem para o local lesado. O PRP é obtido pela centrifugação dupla em baixa velocidade de uma amostra de sangue, que pode ser retirada do próprio paciente (DUSSE et al., 2008).

#### 3.5.2.1 Matrigel<sup>®</sup>

O Matrigel<sup>®</sup> (BD, CA, USA) é uma preparação de membrana solubilizada extraída do sarcoma do EHS (Engelbreth-Holm-Swarm) do rato, um tumor rico em proteínas da matriz extracelular, que possui a laminina como seu maior componente, além de fatores de crescimento, que ocorrem naturalmente no tumor de EHS. O Matrigel<sup>®</sup> tem como objetivo fornecer substrato necessário para o estudo da angiogênese, tanto *in vitro* como *in vivo* (KEMPTON et al., 2009).

As indicações de uso deste produto são: (a) crescimento e diferenciação celular; (b) estudos sobre metabolismo e potencial toxicológico; (c) ensaios

sobre invasão *in vitro* e em ensaios de angiogênese *in vivo*; (d) estudos de angiogênese *in vivo* e aumento de tumores em camundongos imunossuprimidos (Bula Matrigel® - [http://www.bdbiosciences.com/external\\_files/dl/doc/manuals/live/web\\_enabled/354248\\_Guidelines.pdf](http://www.bdbiosciences.com/external_files/dl/doc/manuals/live/web_enabled/354248_Guidelines.pdf)).

O fabricante alerta sobre a importância de manter o produto à -20°C, e quando for aliquotar para ser utilizado deve-se deixá-lo *overnight* à 4°C. Estes dados tornam-se fundamentais para o uso do Matrigel®, uma vez que este adquire a forma de gel, quando atinge temperatura entre 22°C e 35°C (Bula Matrigel® - [http://www.bdbiosciences.com/external\\_files/dl/doc/manuals/live/web\\_enabled/354248\\_Guidelines.pdf](http://www.bdbiosciences.com/external_files/dl/doc/manuals/live/web_enabled/354248_Guidelines.pdf)).

### **3.6 Técnica de Radiografia de Subtração**

A radiografia convencional exibe imagens bidimensionais resultantes das diferenças entre as densidades dos tecidos que são atravessados pelos raios X (FERREIRA et al., 1999). Entretanto, a imagem digital tem sido utilizada para acompanhamento de alterações ósseas, por meio de subtração radiográfica digital (SRD) (HAUSMANN, 2000; SCHMITD, 2005).

A técnica de subtração digital oferece a possibilidade de eliminação da superposição estrutural, o que aumenta a sensibilidade visual para a detecção de modificações sutis, as quais são imperceptíveis no exame de radiografias convencionais (FERREIRA et al., 1999).

A técnica de SRD consiste no alinhamento perfeito de duas imagens obtidas com um intervalo de tempo, as quais são subtraídas matematicamente. As regiões onde não apresentam mudanças são eliminadas da imagem subtraída, de forma a ressaltar visualmente as diferenças entre elas. Desta forma, pequenas alterações nos tecidos seriam prontamente visualizadas nas imagens subtraídas (HAUSMANN, 2000; SCHMITD, 2005).

Os tons de cinza de uma radiografia podem ser quantificados, especialmente nas radiografias digitais ou digitalizadas, com o auxílio de um *software*. O olho humano é capaz de visualizar apenas 32 tons de cinza, enquanto que o computador identifica 256. Esta escala vai de zero a 255, sendo que zero corresponde à área mais radiolúcida (preto) e 255 a área mais radiopaca (branco). Vários *softwares* têm sido usados na manipulação de imagens, tais como Adobe Photoshop<sup>®</sup>, Digora<sup>®</sup>, Image Tool<sup>®</sup>, VixWin<sup>®</sup> (LÉDA 2010).

Além de ser expressa de forma visual (subjetiva e qualitativa), a SRD pode ser expressa de forma numérica (objetiva ou quantitativa). A SRD quantitativa, expressa em unidades relativas aos valores dos *pixels* é denominada CADIA (Computed Assisted Densitometric Image Analysis – análise densitométrica assistida por computador) (HAUSMANN, 2000; SCHMITD, 2005).

No CADIA, a área ou região de interesse selecionada tem a média dos valores dos *pixels* medida e multiplicada pelo número de *pixels* da área onde ocorreu a mudança, na imagem subtraída, dando como resultado um valor numérico que pode ser positivo ou negativo. Valores negativos indicam

diminuição da densidade óssea e valores positivos o aumento desta (SCHMITD, 2005).

Além da avaliação através dos valores de *pixels*, pode-se utilizar o histograma e tons de cinza para mensurar a densidade óptica pré-selecionando uma ou mais áreas de interesse, mantendo fixo o valor de *pixels* a ser utilizado (LÉDA, 2010).

### **3.7 Teste de Reação em Cadeia da Polimerase**

A Reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica de biologia molecular, que permite a replicação *in vitro* do DNA de forma extremamente rápida, que amplifica quantidades mínimas de material genético em milhões de vezes, para posterior detecção dos marcadores desejados (PINHO, 2006).

A realização deste teste consiste em três passos, que em conjunto se designam como um ciclo e que se repete em número específico de vezes. A ordem dos passos para fazer a PCR são desnaturação, hibridização e extensão (PINHO, 2006; FONTANA, 2009).

#### **3.7.1 Desnaturação térmica**

A desnaturação térmica consiste na elevação da temperatura, geralmente acima de 90°C, e tem como objetivo desfazer as ligações químicas fracas (hidrogênio) da cadeia dupla de DNA. Portanto, as ligações covalentes mais

fortes entre as moléculas de fosfato e desoxirribose, permanecem intactas (PINHO, 2006; FONTANA, 2009).

### 3.7.2 Hibridização

A fase de hibridização tem como objetivo replicar apenas a sequência de interesse de DNA. Para isto são utilizados iniciadores, os quais são denominados de *primers*, que são curtas sequências sintéticas de nucleotídeos (PINHO, 2006; FONTANA, 2009).

Em uma reação de PCR são incluídos dois *primers*, um para cada cadeia simples de DNA, que foi produzida no processo de desnaturação. O início da sequência de DNA alvo é marcada pelos *primers*, que se ligam (hibridizam) com a sequência complementar. Para isto, a temperatura encontra-se entre 40 e 65°, dependendo do comprimento dos *primers* e da sequência que será avaliada (PINHO, 2006; FONTANA, 2009).

### 3.7.3 Extensão

Após a ligação dos *primers* a temperatura eleva-se a aproximadamente 72°C e a enzima Taq polimerase replica a cadeia de DNA. A Taq polimerase é uma enzima, que ao contrário de outras polimerases, se mantém ativa à temperaturas elevadas. O processo de síntese inicia-se em uma zona de cadeia dupla (onde estão ligados os *primers*), incorporando os nucleotídeos complementares à sequência alvo e utilizando os dNTPs em solução (PINHO, 2006; FONTANA, 2009).

Ao final do primeiro ciclo da PCR são obtidas duas novas cadeias de DNA idênticas à original; porém com a inclusão do *primer*. A partir desta etapa, realiza-se um novo ciclo, que irá servir de molde à síntese da nova cadeia até a obtenção de uma cadeia amplificada. Em outras palavras, a sequência flaqueada pelos *primers* é a secção do DNA que se amplifica e que será analisada (PINHO, 2006; FONTANA, 2009).

Desta forma, a técnica de PCR viabiliza a amplificação *in vitro* de sequências específicas de DNA. Em experimentos de terapia celular, a técnica de PCR tem sido utilizada para avaliar a presença das células transplantadas nos receptores. Para tanto, utiliza-se um doador macho e a receptora deve ser uma fêmea. Com este esquema é possível aplicar-se a técnica de PCR com o intuito de verificar a presença das células do doador, em tecidos da receptora, através da amplificação do cromossomo Y (CIRNE-LIMA, 2007).

Esta técnica tem sido adotada, uma vez que as células-tronco apresentam a capacidade de expulsar os corantes vitais, como Hoesh, por exemplo, perdendo a marcação. Neste sentido, a detecção da presença do cromossomo Y, por exemplo, viabiliza a detecção das células de macho transplantadas para fêmeas (TORRES, 2009).



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Animais Experimentais

Foram utilizados 57 coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) da ordem *Lagomorfa*, da raça Nova Zelândia albinos, sendo um doador macho e o restante fêmeas, com idade variando entre 4 e 5 meses, com peso corporal entre de 2,5 a 3 kg, provenientes de cabanhas cadastradas à Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (UEA-HCPA).

Os animais foram encaminhados à UEA-HCPA, em dia e horário previamente acordado, pois todos os coelhos passaram por um período de adaptação, que variava de três a cinco dias, antes do procedimento cirúrgico. Estes permaneceram em gaiolas individuais sob temperatura controlada de 18°C e umidade de ar média de 68%, sendo sua alimentação à base de ração comercial peletizada específica para a espécie, eventualmente verduras, e a água *ad libitum*.

Todos os animais foram mantidos e manipulados segundo normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), antes do início do projeto este foi avaliado e aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), onde está cadastrado sob o protocolo número 09-541.

## 4.2 Verificação do Volume do Alvéolo Dentário

Antes de iniciar os procedimentos cirúrgicos, foi verificado qual o volume ocupado pela coroa de reserva no alvéolo dentário do dente incisivo, utilizando um cadáver de um coelho, com tamanho compatível com os animais que seriam operados. Para isto foi utilizado uma micropipeta de 100 $\mu$ L, contendo contraste à base de bário e Azul de Trypan para avaliar radiograficamente e macroscopicamente o volume, a fim de definir o volume de enxerto a ser utilizado.

Com este teste foi possível saber o volume aproximado do alvéolo dentário, que registrou 200 $\mu$ L. Entretanto, por tratar-se de um cadáver, o sangramento após a exodontia deste elemento dentário foi descontado do volume a ser administrado, estipulando-se o volume final de 120 $\mu$ L, para que não ocorresse perda de material, seja MSCs ou BD Matrigel<sup>®</sup>.

## 4.3 Coleta da Polpa Dentária

Para realizar a coleta da polpa dentária, foi utilizado um único doador da mesma espécie, de 30 dias de idade, pesando 170g, macho. O animal foi pré-medocado com cloridrato de petidina (2mg.kg<sup>-1</sup>), midazolam (0,1mg.kg<sup>-1</sup>) e quetamina (7mg.kg<sup>-1</sup>) por via intramuscular (IM) e, posteriormente, foi induzido e mantido sob plano anestésico cirúrgico com isoflurano ao efeito através de máscara confeccionada com seringa de 10mL.

Antes de iniciar a coleta, posicionou-se o doador em decúbito lateral para realizar uma radiografia látero-lateral do crânio, a fim de identificar se o germe dentário era decíduo ou permanente. Para isto foi utilizado um filme oclusal, onde sua revelação mostrou que os dentes incisivos já eram permanentes, mas os dentes posteriores ainda estavam esfoliando.

Para a obtenção da polpa dentária, foi realizada anti-sepsia com gluconato de clorexidina 0,12% e promoveu-se exodontia do incisivo inferior esquerdo a partir da luxação do ligamento periodontal com uma agulha 40X12 e avulsão com fórceps pediátrico. Finalizada a extração, o dente era colocado dentro de um tubo de plástico estéril com fundo cônico de 15mL (Falcon<sup>®</sup>, Brasil) contendo Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Invitrogen, CA, USA) e enviado ao Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular localizado ao lado da UEA no Centro de Pesquisa Experimental (CPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

#### **4.4 Obtenção da Cultura Celular das Células-tronco Mesenquimais da Polpa Dentária**

A amostra de dente decíduo obtido foi processado no Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular do CPE, HCPA. Assim, em capela de fluxo laminar, a polpa era dissociada mecanicamente com auxílio de pipeta e meio de cultura completo (DMEM low glucose suplementado com 10% de soro fetal bovino – FCS, 1% de solução de antibiótico e antimicótico, fornecido pela

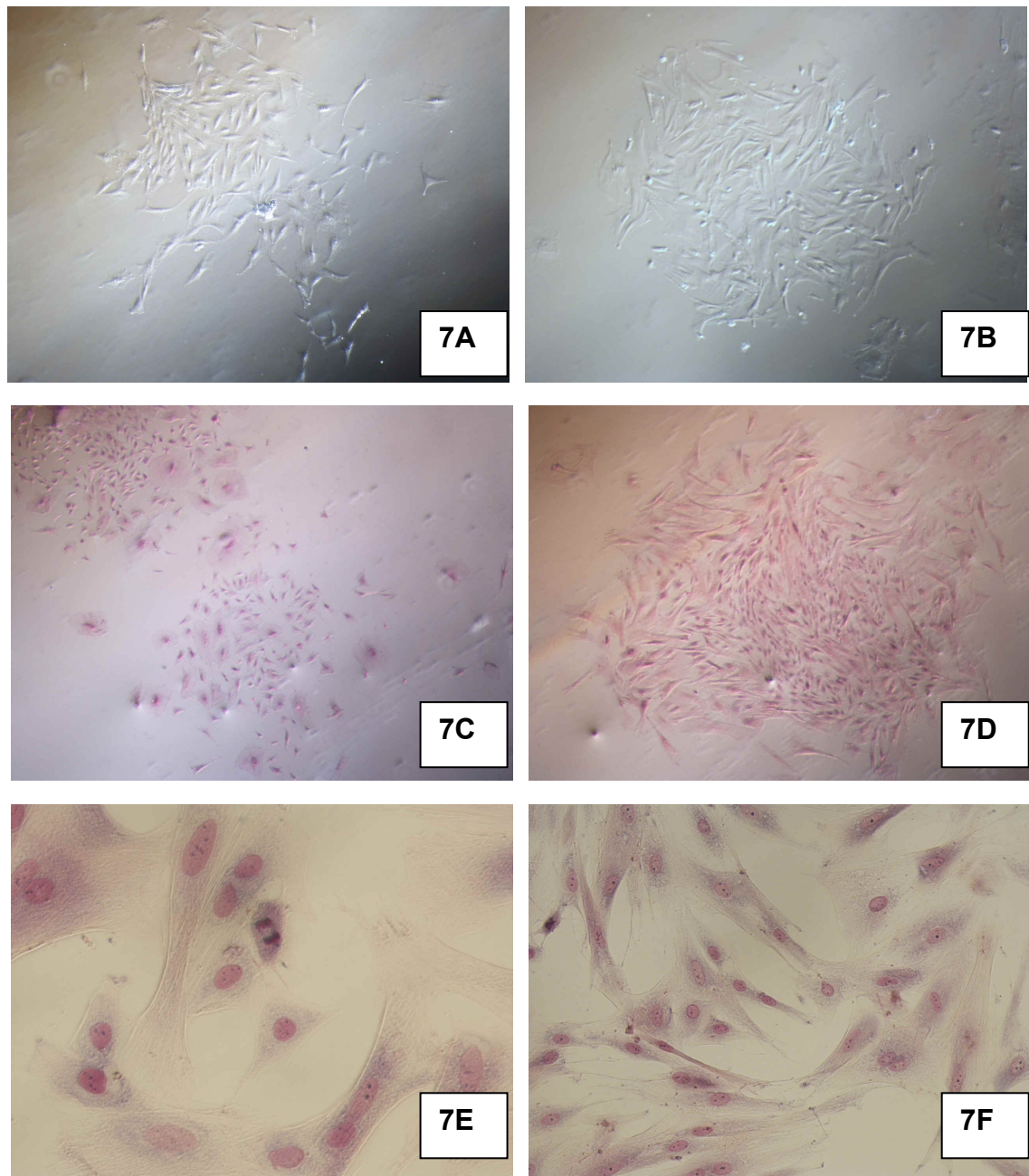
GIBCO). Ao final, a suspensão celular obtida era plaqueada em um poço de placa de seis poços com meio completo acrescido de 10% de FCS.

Após 24 horas, o meio de cultura era trocado e posteriormente o meio era trocado com uma periodicidade de dois dias. Quando a cultura celular atingia 80% de confluência, esta era repicada com solução de Tripsina/EDTA (GIBCO) numa proporção de 1:3, até a obtenção do número de células necessárias para a realização das intervenções de terapia celular.

#### **4.5 Caracterização das Células-tronco Mesenquimais a partir da Polpa Dentária**

A caracterização de uma cultura de células como células-tronco mesenquimais está relacionada com a capacidade destas de formarem colônias fibroblastóides (Ensaio de CFU-F); capacidade de diferenciação *in vitro* para adipócitos, condrócitos e osteócitos; ou através da imunofenotipagem, técnica de pesquisa de marcadores presentes nas membranas celulares.

Neste sentido, foi realizado o ensaio de CFU-F, no momento do isolamento das células, a partir da dentária, onde  $4,5 \times 10^5$  células foram plaqueadas, por poço, em placas de cultivo de seis poços, em meio de cultura completo. O meio era trocado com intervalos de três dias. Quinze dias após o início da cultura, as células eram lavadas, três vezes, com PBS estéril e fixadas e coradas por Panótico rápido LB, segundo as instruções do fabricante Laborclin® (FIGURA 7).



**FIGURA 7** – Fotomicrografias demonstrando a capacidade das células isoladas de polpa dentária de coelho de formar CFU-F. Em A e B pode-se observar, 12 dias após o início da cultura, a formação de colônia em contraste de fase e aumento de 10X. 14 dias após o isolamento das células, estas foram fixadas e coradas por Panótico®. Em C e D observa-se a capacidade de formação de colônias típicas do CFU-F em aumento de 4X. E, em E e F, em aumento de 40X, fica claramente demonstrada a natureza fibroblastóide das células.

## **4.6 Procedimento Anestésico**

Para realizar o procedimento cirúrgico de exodontia, os pacientes foram escolhidos aleatoriamente e receberam como medicação pré-anestésica a associação de cloridrato de petidina ( $5\text{mg.kg}^{-1}$ ), midazolam ( $0,2\text{mg.kg}^{-1}$ ) e quetamina ( $15\text{mg.kg}^{-1}$ ) por via intramuscular. Decorridos 10 minutos, procedia-se a indução anestésica com isoflurano na máscara. Antes de realizar a intubação, foi instilado 0,2mL de lidocaína 2%, sem vasoconstritor, na entrada da glote e seguia-se com o anestésico volátil até atingir o relaxamento suficiente para permitir a intubação, sendo geralmente utilizado o número 2,5 ou 3,0 sem balonete.

O método de intubação realizado variava de acordo com a preferência do anestesista. O primeiro método consistia em posicionar o paciente em decúbito dorsal e oclusão do esôfago com o polegar para direcionar o tubo para a traquéia. Já no segundo método, o animal ficava suspenso com o pescoço em sentido vertical, onde o tubo era introduzido no momento da expiração. O tubo traqueal era fixado com atilho que passava atrás das orelhas e em seguida era colocado em decúbito lateral direito para realização da radiografia intra-oral inicial.

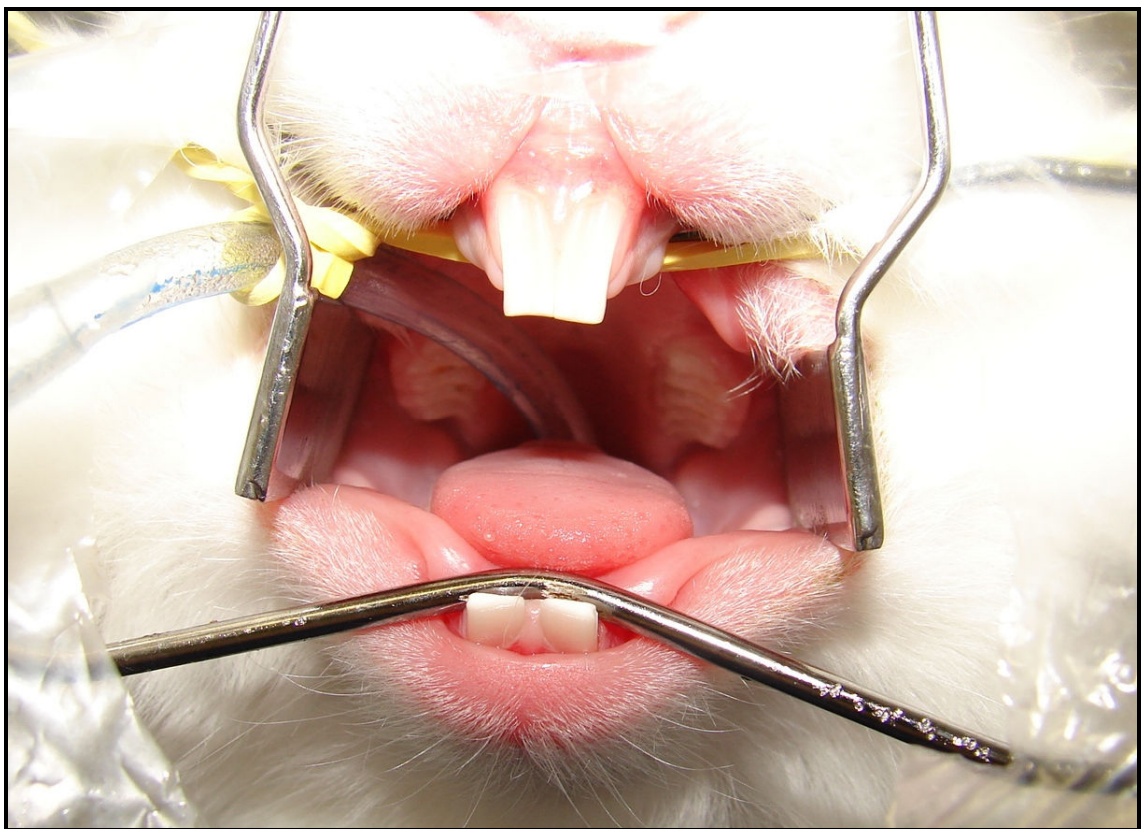
Todos os animais foram acompanhados com auxílio de um monitor multiparamétrico, que registrava a frequência cardíaca, frequência respiratória, capnometria, oximetria e temperatura corporal durante o trans-operatório.

## **4.7 Procedimento Cirúrgico**

### **4.7.1 Procedimentos pré-operatórios**

Com o animal sob anestesia geral inalatória realizava-se a radiografia inicial dos incisivos inferiores e logo posicionava-se o paciente na mesa cirúrgica odontológica em decúbito ventral com os dentes incisivos presos no abre-boca preexistente nesta.

A anti-sepsia foi realizada com gluconato de clorexidina 0,12% aquoso e gaze estéril, seguido da colocação do campo plástico e confecção de uma janela para abordagem à cavidade oral (FIGURA 8). Esta foi avaliada com auxílio de um afastador de bochechas e de um afastador de língua, seguido da sondagem do sulco gengival dos dentes incisivos com a sonda periodontal. Além disso, todas as coroas clínicas dos dentes incisivos eram medidas com o mesmo instrumental.



**FIGURA 8** - Realização do exame clínico da cavidade oral, com auxílio do afastador de bochechas, com o animal sob anestesia geral inalatória, na mesa cirúrgica odontológica de Roedores e *Lagomorfos*.

#### 4.7.2 Exodontia do dente incisivo

Finalizado o exame clínico oral, realizava-se a exodontia do incisivo inferior esquerdo. Para luxar o ligamento periodontal duplo foi utilizada uma alavanca apical própria para a espécie, evitando traumas aos tecidos adjacentes e para preservar o alvéolo íntegro para posterior análise. A alavanca era posicionada entre o dente e o osso alveolar ao redor de todo o dente, para posterior avulsão com fórceps pediátrico. Antes da avulsão dental, era realizada uma pressão em direção apical a fim de destruir a camada de células germinativas e em seguida extraía-se o incisivo. Além da pressão apical exercida, curetava-se o alvéolo para remover qualquer resquício de tecido germinativo e formar o coágulo para auxiliar na cicatrização.

Após a curetagem, cada alvéolo recebia o implante de acordo com cada grupo, exceto o grupo 1, que era o controle.

Para manter o coágulo e/ou implante, realizava-se duas incisões em trapézio com lâmina de bisturi nº 15, para confeccionar o *flap* mucoperiostal e divulsão com tesoura de íris curva, mesmo instrumental utilizado para reavivar os bordos. A síntese foi realizada com fio poliglactina 910 5-0 agulhado e padrão isolado simples.

Finalizada a síntese, todos os incisivos remanescentes tinham parte de sua coroa clínica amputada com auxílio de um disco diamantado acoplado em um micromotor. O limite era predeterminado pela superfície palatina, na arcada superior, e pela superfície lingual, na arcada inferior, sem haver lesão na gengiva e na mucosa oral, mantendo a mesma angulação anatômica na face






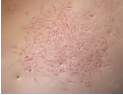




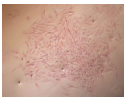
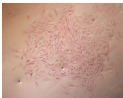
incisal destes dentes. E por fim, realizava-se mais uma medição da coroa clínica de cada incisivo.

## **4.8 Procedimentos Terapêuticos**

### **4.8.1 Grupos**

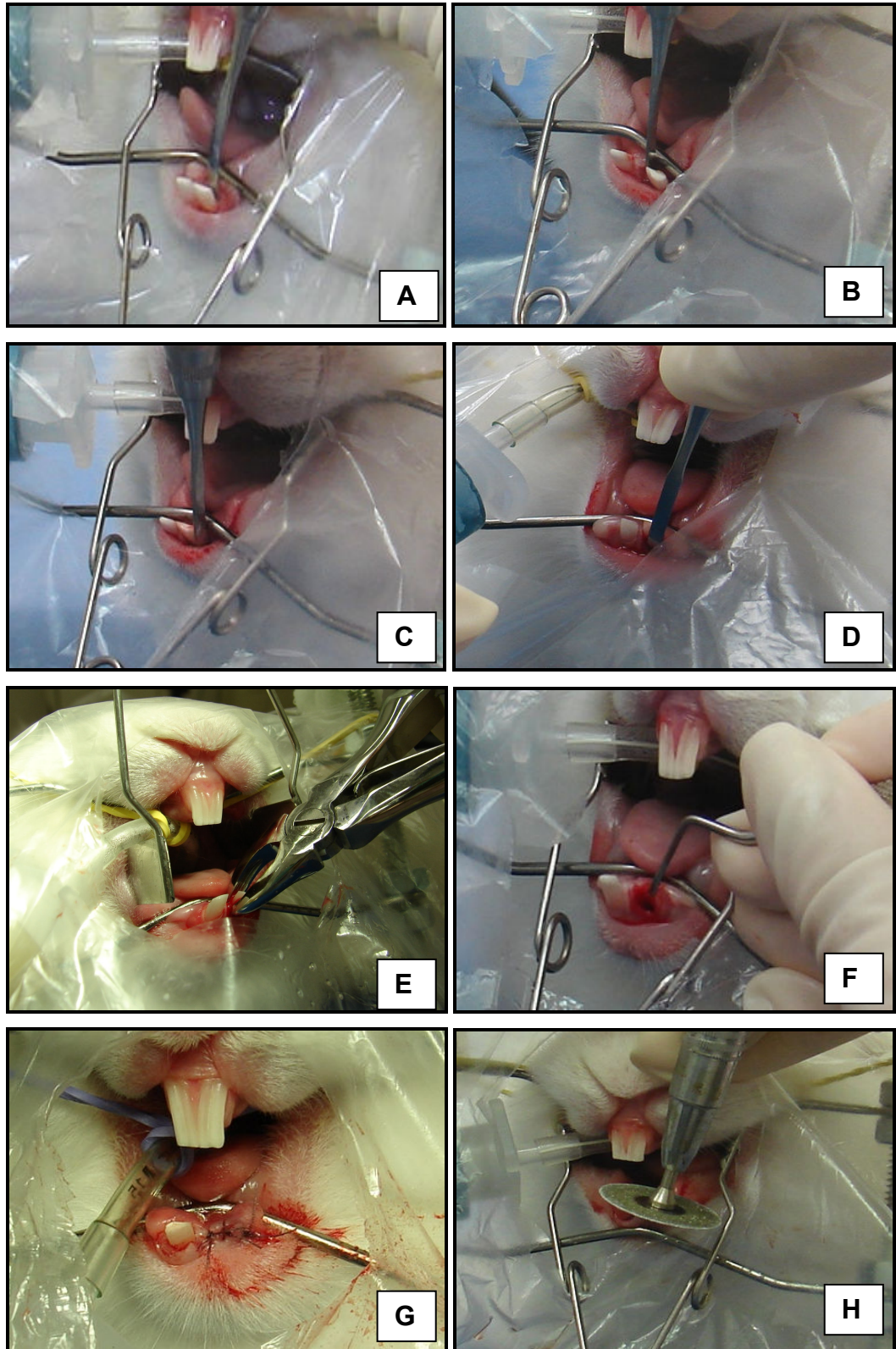
As coelhas foram divididas em sete grupos, contendo oito animais cada, totalizando 56 animais (FIGURA 9).

Os animais do grupo controle tinham seu incisivo inferior esquerdo extraído, seguido da curetagem do alvéolo dentário, finalizando com a confecção do *flap* mucoperiostal, o qual era realizado em todos os grupos. Entretanto, a diferença dos animais dos grupos dois ao sete foi o preenchimento deste alvéolo com diferentes implantes (FIGURA 10).

<b>GRUPO 1</b> <b>(C)</b>	<b>CONTROLE</b>		
<b>GRUPO 2</b> <b>(O)</b> <b>Osso</b> <b>liofilizado</b>	 *		
<b>GRUPO 3</b> <b>(M)</b> <b>Matrigel®</b>	 **		
<b>GRUPO 4</b> <b>(MMSC)</b> <b>Matrigel®</b> <b>MSCs</b>		 ***	
<b>GRUPO 5</b> <b>(OM)</b> <b>Osso</b> <b>liofilizado</b> <b>Matrigel®</b>			
<b>GRUPO 6</b> <b>(OMMSC)</b> <b>Osso</b> <b>liofilizado</b> <b>Matrigel®</b> <b>MSCs</b>			
<b>GRUPO 7</b> <b>(MSC)</b> <b>MSCs</b>			

\*: Osso liofilizado bovino; \*\*: Matrigel® (BD, CA, USA); \*\*\*: MSCs

**FIGURA 9** - Representação dos grupos de acordo com cada implante recebido.

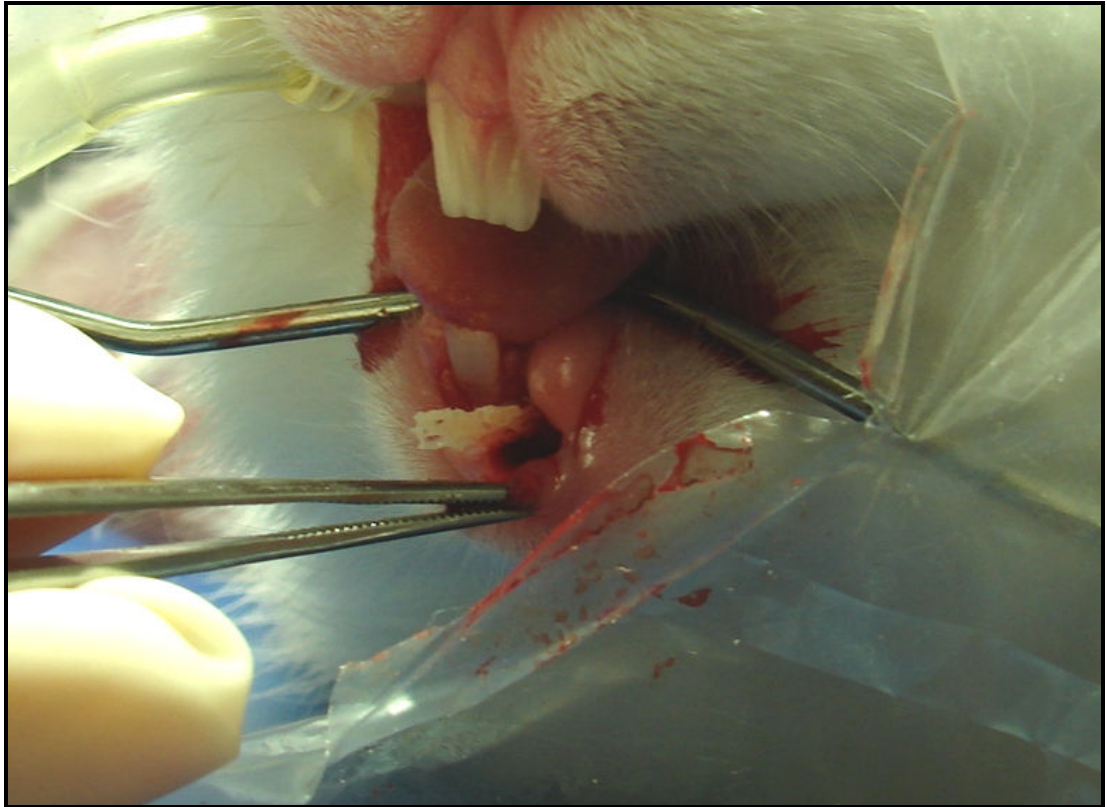


**FIGURA 10** – Sequência do procedimento cirúrgico. (A) Luxação do ligamento periodontal com alavanca na face lingual; (B) na face mesial; (C) na face distal; e (D) na face vestibular; (E) avulsão dentária com fórceps; (F) curetagem do alvéolo; (G) síntese com padrão isolado simples e fio poliglactina 910; e (H) corte dos dentes incisivos remanescentes com disco diamantado.

O grupo 2 (O) era representado pelos animais que recebiam como implante o osso liofilizado bovino tridimensional (3D). Os fragmentos ósseos a serem utilizados nas cirurgias eram colocados em meio de cultura DMEM completo (FIGURA 11) a 37°C por, pelo menos, 30 minutos antes da cirurgia, em capela de fluxo laminar. O alvéolo era preenchido com vários fragmentos de osso liofilizado, pré-cortados e esterilizados em autoclave, com auxílio de uma pinça de dissecação simples e com a alavanca utilizada na luxação do ligamento periodontal devido a sua curvatura. A quantidade de osso utilizada dependia do volume do alvéolo desde a região apical até a crista alveolar (FIGURA 12).

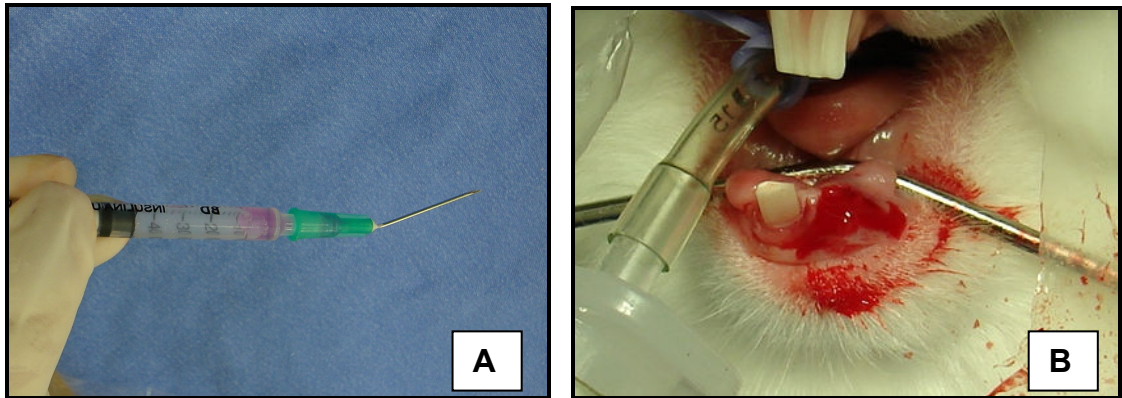


**FIGURA 11** - Tubo contendo fragmento de osso liofilizado bovino e meio de cultura (DMEM).



**FIGURA 12** - Preenchimento do alvéolo dentário do incisivo inferior esquerdo com osso liofilizado.

Já no grupo 3 (M) o alvéolo era preenchido com 120  $\mu$ L de Matrigel<sup>®</sup> (BD, CA, USA), o qual era aliquotado de forma estéril e a frio, a fim de que este não solidificasse, visto que o Matrigel<sup>®</sup> (BD, CA, USA) é um composto que mantém-se líquido, quando mantido à 4°C, e que gelifica rapidamente, quando atinge temperatura de 22°C a 35°C. O Matrigel<sup>®</sup> (BD, CA, USA) (0,5ml) era aplicado com seringa de 1 mL e agulha 08X25 21G. Com a agulha voltada para baixo fazia-se uma curvatura acompanhando a anatomia do alvéolo, para facilitar sua administração (FIGURA 13A), sendo que após sua aplicação passava a apresentar consistência de gel, permanecendo no sítio cirúrgico (FIGURA 13B).



**FIGURA 13** - (A) Seringa contendo Matrigel<sup>®</sup>. Notar a curvatura na agulha acompanhando o alvéolo dentário; (B) Aspecto gelificado do Matrigel<sup>®</sup>, após aplicação deste no alvéolo dentário do incisivo inferior esquerdo.

Os animais do grupo 4 (MMSC) recebiam em seu alvéolo dentário Matrigel<sup>®</sup> associado às células-tronco mesenquimais, oriundas da polpa dentária. As células foram ressuspensas em 120µL de Matrigel<sup>®</sup>. O número de MSCs em média utilizado era  $3 \times 10^5$  céls./animal. Utilizando também seringa de 1ml, mesma agulha e pré-curvatura citadas anteriormente, aspirava-se as MSC com Matrigel<sup>®</sup> e realizava-se sua administração.

Os animais do grupo 5 (OM) tinham o alvéolo dentário preenchido com osso liofilizado e Matrigel<sup>®</sup>. Aplicava-se primeiramente 50µL de Matrigel<sup>®</sup>, seguido dos fragmentos ósseos previamente aquecidos a 37°C por 30 minutos.

Os animais do grupo 6 (OMMSC) recebiam osso liofilizado em associação com Matrigel<sup>®</sup> e MSC, representando o grupo que recebia a maior quantidade de material enxertado. As MSCs eram ressuspensas em 50µL de Matrigel<sup>®</sup> e, na recomposição do alvéolo, eram aplicadas antes dos fragmentos de ossos liofilizados.

E por fim, o grupo 7 (MSC) era composto pelos animais que recebiam apenas uma suspensão de MSCs em meio de cultura. Em função da consistência mais fluida do DMEM (meio de cultura), quando comparada com o Matrigel<sup>®</sup>, o volume administrado da suspensão celular foi reduzido para evitar extravasamento do material. Assim, a suspensão celular, para aplicação no alvéolo dentário, era de 90 $\mu$ L, aplicada com a mesma seringa e agulha (FIGURA 14).



**FIGURA 14** - Aplicação de MSCs no alvéolo dentário com uma seringa de 1mL e agulha 23G, ressuspendidas em meio DMEM puro, representando o grupo 7 (MSC).

#### **4.9 Procedimentos Pós-operatórios**

No pós-operatório imediato, todos os animais eram medicados com cloridrato de tramadol ( $2\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), via subcutânea (SC) e enrofloxacina ( $10\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) via IM. A aplicação de cloridrato de tramadol era mantida durante 48h em intervalos de 12 horas (BID) e a enrofloxacina, durante três dias, a cada 24 horas (SID). Os animais eram observados diariamente, para avaliar apreensão dos alimentos e mastigação, além da ferida cirurgia.

#### **4.10 Método de Indução de Morte**

Ao término do período de avaliação (sete dias), todos os coelhos foram mortos. Os animais eram sedados previamente com cloridrato de ketamina ( $15\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) e xilazina ( $2\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) via IM, e após 10 minutos, realizava-se a venóclise na veia marginal da orelha com cateter nº24, para aplicação intravenosa do propofol até a parada respiratória, seguida da administração do cloreto de potássio, pela mesma via, até a parada cardíaca.

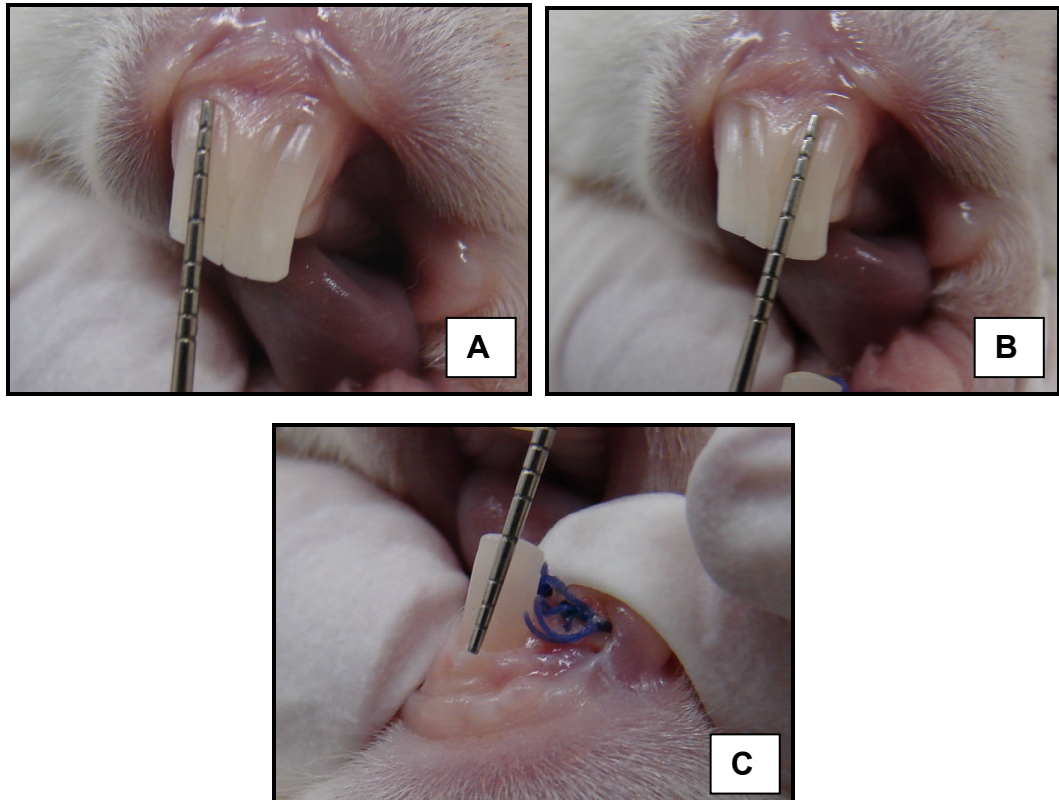
Tal procedimento foi realizado seguindo as normas estipuladas para morte dos animais pela CEUA. Após a coleta das amostras, as carcaças eram descartadas juntamente com o lixo hospitalar do HCPA.

#### **4.11 Avaliação Macroscópica**

A primeira etapa das avaliações *post mortem* consistia-se em medir a área da coroa clínica dos dentes incisivos remanecentes, com a sonda periodontal e avaliar a ferida cirúrgica (FIGURA 15). Em seguida, dissecava-se



a mandíbula desde a região rostral até o segundo molar inferior, onde esta era cortada transversalmente com o disco diamantado no ramo horizontal direito e esquerdo.



**FIGURA 15** - Mensuração da coroa clínica com sonda periodontal de 10mm sete dias pós-operatório. (A) Incisivo superior direito medindo 6mm; (B) Incisivo superior esquerdo medindo 7mm, (C) Incisivo inferior direito medindo 5mm.

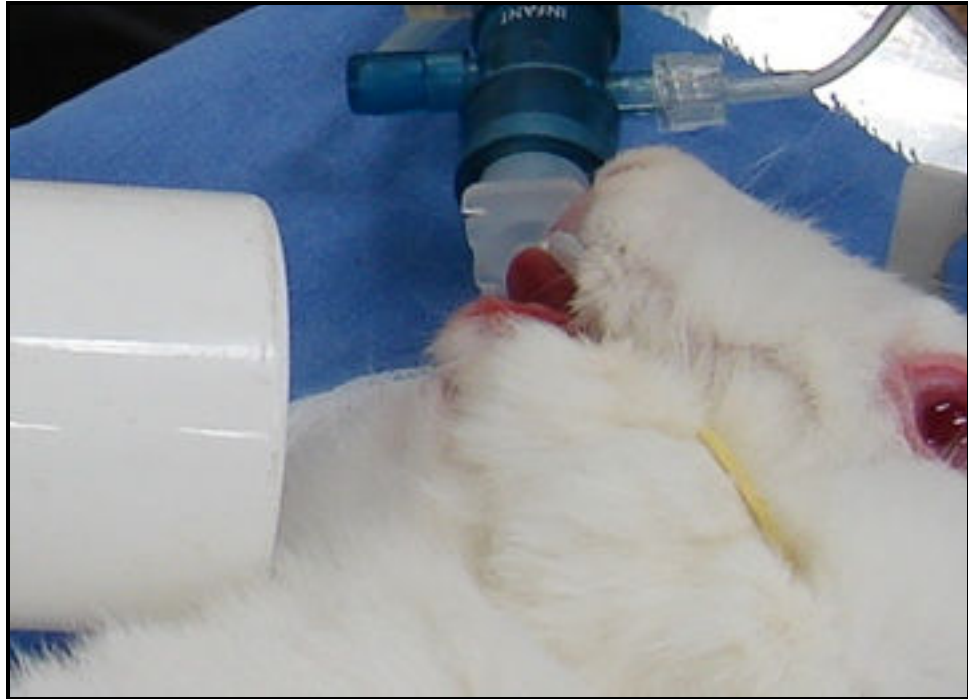
#### 4.12 Avaliação Radiográfica

Para realizar as radiografias intra-orais, foi utilizado um aparelho de raio X odontológico modelo Odontomax 70/7P (Astex<sup>®</sup>, SP, Brasil) de 70kV e 7mA. O tempo de exposição utilizado foi 0,8 segundos. As películas odontológicas utilizadas foram, na maioria, as de número dois, também denominadas de periapicais. Entretanto, em alguns animais, foram utilizadas as películas

radiográficas pediátricas ou número zero, devido ao relaxamento insuficiente do coelho ou por este apresentar comissura labial muito pequena.

A técnica radiográfica utilizada no trans-operatório foi a bissetriz, a qual o raio deve incidir sobre a linha média formada entre o filme radiográfico e o dente formando um ângulo de 90°. Entretanto para realizar as radiografias *post mortem* foi adotado o método do paralelismo, em que o raio incide paralelamente ao filme e à mandíbula. Finalizada a radiografia, procedia-se a revelação em câmara escura. O processo de revelação iniciava-se colocando o filme no revelador, que permanecia nesta solução até formar a imagem, seguido de banho de água e posteriormente o filme era colocado no fixador, sendo que a câmara escura era aberta após 2 minutos. Cada película radiográfica permanecia no fixador durante 20 minutos e logo era lavada em água corrente, e após totalmente seca, era arquivada.

Para a realização das radiografias intra-orais, todos os animais estavam sob anestesia geral inalatória, sendo radiografados no pré-operatório e no pós-operatório imediato, e após sete dias. Com o coelho anestesiado, este era colocado em decúbito lateral direito, posicionava-se a película radiográfica dentro da cavidade oral com o marcador em direção coronal, geralmente até o primeiro molar inferior, para obter a imagem radiográfica do ápice dos incisivos inferiores incidindo-se o raio no sentido ventrodorsal. Finalizada a primeira radiografia, o lagomorfo era colocado na mesa cirúrgica odontológica e ao término do procedimento era posicionado novamente em decúbito lateral e repetia-se todo o processo para a captura das imagens (FIGURA 16).



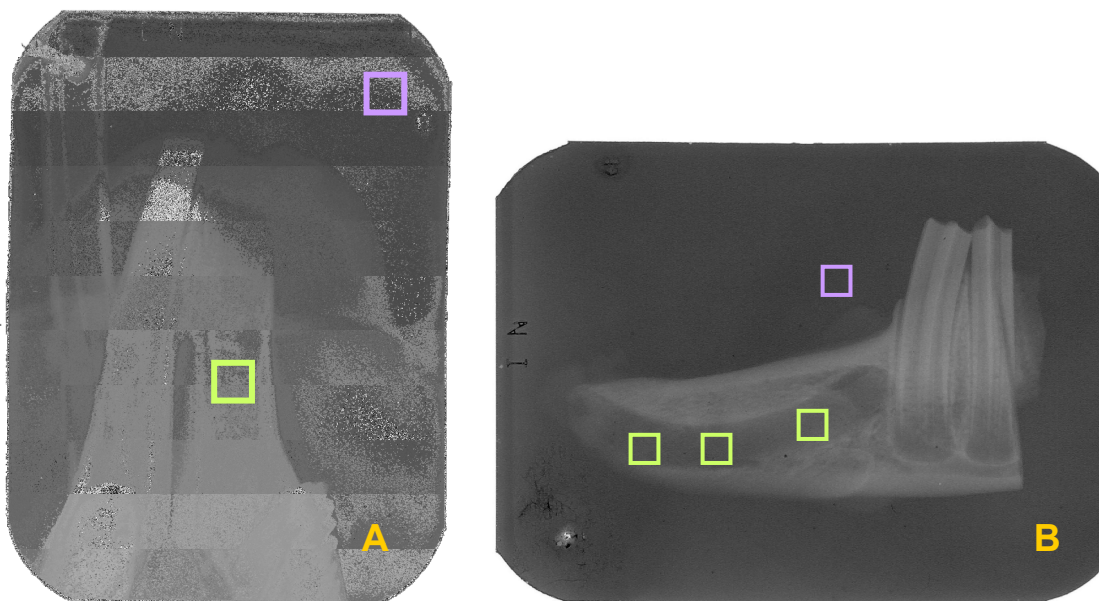
**FIGURA 16** - Técnica da Bissetriz sendo realizada para radiografar o incisivo inferior esquerdo no pós-operatório imediato com o animal intubado e anestesiado com anestesia inalatória.

Decorrido sete dias do pós-operatório, os animais eram mortos e removia-se o segmento mandibular, conforme descrito anteriormente, e realizava-se a terceira radiografia dorsoventral e finalizava-se com outra radiografia látero-lateral, após disjunção da sínfise mandibular, somente do segmento esquerdo, com a finalidade de evitar sobreposição na imagem.

Para avaliar as radiografias foi utilizada a técnica de subtração radiográfica digital. Porém, inicialmente todas as radiografias realizadas foram digitalizadas no *scanner* Afga ARGUSII para conseguir fazer a sobreposição da imagem final sobre a inicial. O programa utilizado para aplicar a SRD foi o Photoshop CS4, onde primeiramente padronizavam-se todas as imagens em 300dpi, escala de cinza e salvava-se em JPEG.

Nas radiografias realizadas ventrodorsais, padronizou-se como área de avaliação 30X30 *pixels*, enquanto nas látero-laterais foi padronizado 25X25 *pixels*, sendo medida uma e três áreas, respectivamente. Na incidência látero-lateral optou-se em realizar três medidas, já que no pré-operatório não era possível obter esta imagem, e validava a média destas aferições (FIGURA 17).

Devido às pequenas diferenças entre as películas radiográficas, no momento da revelação, mensurava-se também uma área padrão sem qualquer imagem (preta), após inverter e unir as imagens, para descontar a diferença e para obter resultados confiáveis (quadrado roxo na FIGURA 17).



**FIGURA 17** - (A) Radiografia periapical ventrodorsal dos dentes incisivos inferiores no pós-operatório imediato; (B) Radiografia periapical látero-lateral do ramo mandibular esquerdo logo após a exodontia do incisivo inferior. Região escolhida para fazer análise comparativa pré e após sete dias (quadrado verde). Região pré-determinada para subtrair a diferença entre as radiografias (quadrado roxo).

Portanto, foram analisadas doze radiografias de cada grupo, sendo seis de cada posição, totalizando 84 novas imagens sobrepostas. O protocolo

utilizado para obter apenas uma imagem com perfeito encaixe tinha como objetivo realizar o encaixe perfeito do alvéolo dentário do pós- imediato (dia zero) com o alvéolo que recebeu o enxerto (sete dias após o transplante).

Ao término das radiografias, as amostras que seriam encaminhadas para análises microscópicas eram identificadas e colocadas em recipientes individuais contendo formol 10%. As amostras que seriam analisadas por PCR eram criopreservadas.

### **4.13 Avaliações Microscópicas**

#### 4.13.1 Material desmineralizado

Três amostras de cada grupo eram destinadas para avaliação histológica totalizando 21 lâminas. Após a remoção do segmento mandibular, cada uma era colocada em recipientes individuais contendo formol tamponado 10% e permaneciam nesta solução durante 48 horas. Para a desmineralização das amostras, estas eram posteriormente lavadas em água corrente e mantidas em ácido nítrico 5% durante sete dias com trocas diárias. Entretanto, no sexto dia eram realizados cortes transversais de aproximadamente 1,5mm de espessura e as amostras de tecido resultantes eram acondicionadas em cápsulas, denominadas *cassetes*, onde recebiam também a identificação da amostra (FIGURA 18). No sétimo dia, as amostras ficavam imersas em álcool absoluto *overnight*, para serem incluídas nos blocos de parafina. Posteriormente, cortes de tecidos eram obtidos com 3 µm de espessura e estes eram corados com hematoxilina-eosina (HE) para avaliação microscópica da estrutura do tecido.



**FIGURA 18** - Cortes transversais da porção mandibular, contendo o alvéolo dentário, sendo colocados nos *cassetes* para melhor penetração do ácido nítrico 5%.

As análises dos cortes de tecidos foram executadas pelo Serviço de Patologia do HCPA. Para esta análise foi utilizada a escala de Paz (2006), que permitiu uma análise histológica quantitativa, utilizando os seguintes critérios (TABELA 2).

A captação das imagens foi realizada com câmara fotográfica digital acoplada no microscópio modelo Olympus BX51 e o programa de captura utilizado foi o Q Capture Pro<sup>®</sup>.

**TABELA 2** – Detalhamento da pontuação da escala histológica.

<b>Critério</b>	<b>Pontuação</b>	<b>Descrição da Pontuação</b>
Trabéculas Ósseas Neoformadas	0	Ausência de trabéculas neoformadas
	1	Trabéculas finas, isoladas, não ultrapassando 1/3 do campo microscópico
	2	Trabéculas isoladas ou anastomosadas ocupando entre 1/ e 2/3 do campo microscópico
	3	Trabéculas espessas, ocupando mais de 2/3 do campo microscópico
Atividade Osteoblástica	0	Atividade inexistente
	1	Menos de 1/3 das trabéculas ósseas neoformadas com atividade osteoblástica
	2	Atividade observada entre 1/3 e 2/3 das trabéculas ósseas neoformadas
	3	Mais de 2/3 das trabéculas neoformadas apresentam atividade osteoblástica
Absorção do Implante	0	Ausência de áreas de lise óssea
	1	Reabsorção até 1/3 do transplante
	2	Reabsorção entre 1/3 e 2/3 do transplante
	3	Reabsorção de mais de 2/3 do transplante

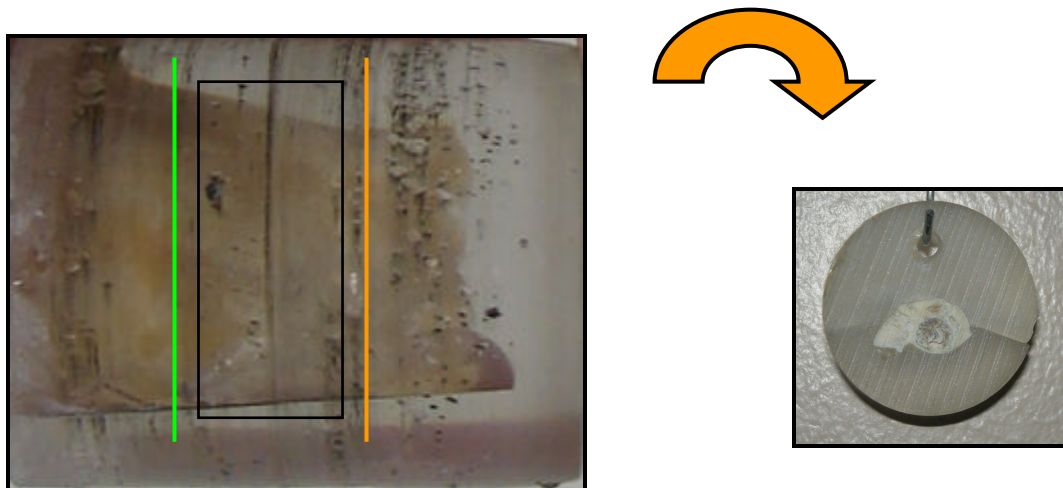
#### 4.13.2 Material não desmineralizado

##### 4.13.2.1 Preparo das amostras

As análises de microscopia óptica foram realizadas no LMN / GEPSI – Laboratório de Materiais e Nanociências - Grupo de Estudos de Propriedades de Superfícies e Interfaces e Nanotecnologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), localizado na Av. Ipiranga, nº 6681, prédio 96A, sala 103, Bairro Partenon, Porto Alegre – RS.

Para esta análise, as mandíbulas preservadas em um recipiente contendo formol 10%, foram mantidas em água durante 48 horas, a fim de remover o excesso de formol. Após este período, as amostras foram colocadas em uma estufa à vácuo com temperatura controlada de 60°C durante 10 minutos apenas para extrair a umidade das mesmas. Após a secagem, estas foram emblocadas com resina de poliéster cristal como mostrado na Figura 19, onde permaneceram em vácuo até sua cura total. O processo de polimerização completo durou em torno de uma hora para o volume das amostras utilizado.

Todas as mandíbulas emblocadas na resina de poliéster foram desgastadas de forma homogênea permanecendo com um diâmetro de 30 mm. Com a resina transparente era possível observar a amostra no seu interior e assim realizar os cortes pré-estabelecidos do segmento a ser avaliado, procurando deixar todas as peças com uma altura de 8mm (FIGURA 19).



**FIGURA 19** – Delimitação da região mandíbula (quadrado preto) onde foram realizados os cortes na região rostral (traço amarelo) e na região distal (traço verde). No lado direito observa-se a amostra após realização do corte transversal do ramo mandibular esquerdo envolvendo o alvéolo que será avaliado.



Para permitir a observação das estruturas biológicas do osso a ser estudado, as amostras sofreram um processo de lixamento e polimento. Este processo consistiu de uma sequência de lixas com gramatura de: 180, 220, 400, 600, 1200 e 2500, sempre aplicadas em duas direções diferentes para garantir a planicidade das amostras. Após o processo de lixamento foi iniciado o polimento com soluções diamantadas com diâmetros de  $9\mu\text{m}$ ,  $1\mu\text{m}$  e  $0,25\mu\text{m}$  respectivamente. O acabamento final foi realizado com solução coloidal de carbeto de silício com diâmetro de  $50\mu\text{m}$ .

Todas as amostras foram limpas em um Becker contendo álcool isopropílico P.A. e permaneciam suspensas por um gancho de metal em um orifício confeccionado e colocadas no aparelho de ultra-som de limpeza durante 10 minutos.

#### **4.14 Análise da Expressão do Cromossoma Y nas Amostras de Tecido das Receptoras**

A coleta das amostras de tecido, para análise de PCR, era realizada sempre com luvas e materiais estéreis. Para tanto, removia-se uma pequena porção do *flap* mucogengival, com tesoura de íris, expondo o alvéolo dentário, para coletar o material a ser analisado buscando identificar a presença do cromossomo “Y”, oriundo das MSCs do doador.

O material era colocado em tubo de microcentrífuga (Eppendorf®) e levado para o Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular, onde permanecia na microcentrífuga durante 5 minutos com rotação de 2.000rpm, a

fim de sedimentar-se a amostra, a qual era criopreservada à -20°C, para posterior análise molecular.

#### 4.14.1 Protocolo de extração de DNA com trizol das amostras de tecido

Na ocasião da extração do DNA das amostras, o material era descongelado e homogeneizado com trizol em equipamento para dissociação de tecido do Laboratório de Psiquiatria Molecular do HCPA. A seguir, as amostras eram incubadas com clorofórmio e centrifugadas, para a separação das frações que contém o DNA daquela que contém RNA. Após a retirada e descarte da fração que contém RNA, a fração que contém o DNA das amostras foi incubada por uma seqüência de soluções alcoólicas e centrifugações, com o objetivo de retirar o fenol das amostras. Ao final, as amostras eram ressuspendidas em água.

#### 4.14.2 Amplificação do DNA

As reações de polimerização em cadeia (PCR) foram realizadas em aparelho termociclador DNA “Thermal Cycler” (MJ Research), modelo PTC 100. As reações continham 1 µg de DNA, 0,2 mM de cada oligonucleotídeo iniciador, 0,2 mM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen) em 10x (Tris-Hcl 200 mM pH 8,4; KCl 500 mM) em um volume de um décimo do volume final da reação. A reação foi incubada por um minuto, a 94 °C, seguida de 40 ciclos de incubações a 94°C, por um minuto, a 55°C, por um minuto (para os dois iniciadores utilizados) e a 72°C, por um a dois minutos. Por último, seguiu-se incubação a 72° C, por 10 minutos.

#### 4.14.3 Desenho dos Iniciadores (*primers*)

Os iniciadores utilizados para as reações de PCR foram desenhados com base nas seqüências codificadores dos genes: GAPDH e SRY (TABELA 3).

**TABELA 3** - Desenho dos *primers* e seqüência do DNA.

Nome do primer	Seqüência do DNA
GAPDH (65 bp)	5' GGA TTT GGC CGC ATT GG -3'
	5'- CAA CAT CCA CTT TGC CAG AGT TAA -3'
SRY (600bp)	5'- ATG TAT GCC CTT ATG TTC GG -3'
	5'- TCA CGG CTG TAA TTT ATG GTA -3'

#### 4.14.4 Confirmação da amplificação do DNA das amostras

A eletroforese de DNA foi realizada em gel de agarose 1% (SRY) e 2% (GAPDH) em 0,5X TAE (Tris-Hcl 44,5 mM, ácido bórico 44,5 mM, EDTA 1 mM). As amostras de DNA foram adicionadas de tampão de amostra (azul de bromofenol 0,25%, glicerol 30%, EDTA 1 mM), e aplicadas no gel contendo 0,5 µg/ml de Gel Red®. O gel foi submetido à voltagem de 80–100V em tampão 0,5X TAE. O DNA foi visualizado por iluminação ultravioleta, a 512 nm, e fotografado em máquina digital (Nikon).

#### **4.15 Análise Estatística**

Após tabulação dos dados, realizou-se a análise estatística aplicando-se a análise de variância (ANOVA) para todas as análises. Para avaliação comparativa do crescimento dos dentes incisivos remanescentes foi aplicado o teste de Tukey.

Entretanto, para as análises histológicas de atividade osteoblástica, formação de trabécula óssea e absorção do implante aplicou-se o teste de Kruskal-Wallis; enquanto para as análises radiográficas, através da técnica de subtração, foi utilizado o teste Student Newman Keuls, também conhecido como SNK. Para todos os testes considerou-se um nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

## **5 RESULTADOS**

### **5.1 Modelo Experimental**

A utilização de coelhos da raça Nova Zelândia, selecionados para a realização deste trabalho, mostrou-se satisfatória, visto seu dócil temperamento e facilidade de manipulação. Além disto, seu amplo alvéolo dentário permitiu excelente estrutura anatômica para elaboração dos procedimentos cirúrgicos e radiográficos.

### **5.2 Procedimento Anestésico**

O protocolo anestésico empregado nos animais mostrou-se adequado em todos os procedimentos cirúrgicos, visto não ter morrido nenhum animal, tanto no pré como no trans e pós-operatório. A recuperação pós-operatória dos coelhos foi excelente e rápida após a suspensão do anestésico volátil, assim como a analgesia, onde pode-se constatar retorno à alimentação logo que retornavam para seu alojamento.

A utilização de um relaxante muscular como medicação pré-anestésica auxiliou na colocação das películas radiográficas e no posicionamento do paciente na mesa cirúrgica odontológica com ampla abertura da cavidade oral.

Apesar da utilização de dois métodos distintos para intubação, ambos foram eficientes e de fácil realização, de acordo com a prática do anestesista, não influenciando os resultados finais.

### **5.3 Coleta da Polpa Dentária**

A coleta da polpa dentária em um filhote de coelho, com 30 dias de idade, foi realizada facilmente a partir da exodontia do dente incisivo, considerando também o fácil acesso por tratar-se de um dente anterior em evidência.

### **5.4 Procedimento Cirúrgico**

A escolha do alvéolo dentário do incisivo inferior esquerdo proporcionou a avaliação da regeneração óssea, visto seu amplo comprimento, que variava entre 15 e 18 mm, de acordo com o tamanho do dente incisivo do coelho.

A utilização de uma mesa odontológica, específica para a espécie, permitiu uma fácil abordagem cirúrgica e bom posicionamento do paciente.

As amputações das coroas dos incisivos remanescentes mostraram-se eficientes, uma vez que não foi observado deiscência dos pontos no sítio cirúrgico, que poderiam ser causados por trauma no local.

Durante a realização do experimento houve a exclusão, e posterior substituição, de um animal, que apresentava aumento de volume, de consistência firme, na região rostral da mandíbula. Radiograficamente, a imagem revelou tratar-se de um abscesso periapical, confirmado após drenagem da região com uma seringa, onde visualmente tinha coloração e aspectos físicos característicos de secreção purulenta para a espécie.

## 5.5 Exodontia do dente incisivo

A extração do dente incisivo foi considerada um procedimento de fácil e rápida execução, não apresentando qualquer complicação trans-operatória. Por outro lado, apesar da pressão aplicada em direção apical, para destruição das células da camada germinativa, estas nem sempre estavam presentes ao realizar a avulsão dentária. Nestes casos específicos, a curetagem alveolar era realizada de maneira mais cuidadosa e intensa para não influenciar futuramente nos resultados obtidos.

Após a realização da exodontia pode-se observar que os hábitos alimentares não sofreram quaisquer mudanças, seja pela boa analgesia ou por tratar-se de um procedimento cirúrgico pouco invasivo e pouco doloroso, quando comparado a cirurgias bucomaxilofaciais mais extensas, como por exemplo, mandibulectomia.

## 5.6 Procedimentos Terapêuticos

Com exceção do grupo controle (C), os demais grupos tiveram seu alvéolo dentário preenchido com diferentes enxertos, conforme descrito anteriormente.

O emprego do osso liofilizado bovino em um alvéolo longo e curvo, como o do coelho, foi considerado, em relação à dificuldade de execução, moderado. Todavia, quando o implante era colocado em banho-maria à 37°C, dentro de um tubo contendo DMEM, este tornou-se mais maleável, facilitando sua

introdução no sítio cirúrgico. Porém, houve uma pequena variação do volume e da quantidade de osso liofilizado aplicados nos animais, uma vez que os fragmentos foram confeccionados manualmente, buscando realizar cortes finos e alongados; onde se tomava como base o preenchimento até crista alveolar e a saturação da área de trabalho.

Por outro lado, a aplicação do Matrigel<sup>®</sup> foi de fácil realização, sendo que, logo após a sua administração, adquiria consistência mais gelificada à medida que a temperatura ambiente aumentava, permanecendo assim dentro do alvéolo. Por esse motivo, este *scaffold* era aliquotado sobre uma barra de gelo e somente saía do refrigerador no momento de sua aplicação.

Ainda com relação à aplicação, pode-se concluir que a administração, tanto do Matrigel<sup>®</sup> como das MSCs, utilizando uma seringa de 1 mL e agulha 08X25 21G foi eficiente. Porém, devido à consistência mais fluida das células-tronco mesenquimais contendo DMEM, aumentava-se a cautela no momento da aplicação para não haver extravasamento e, conseqüentemente, perda do material.

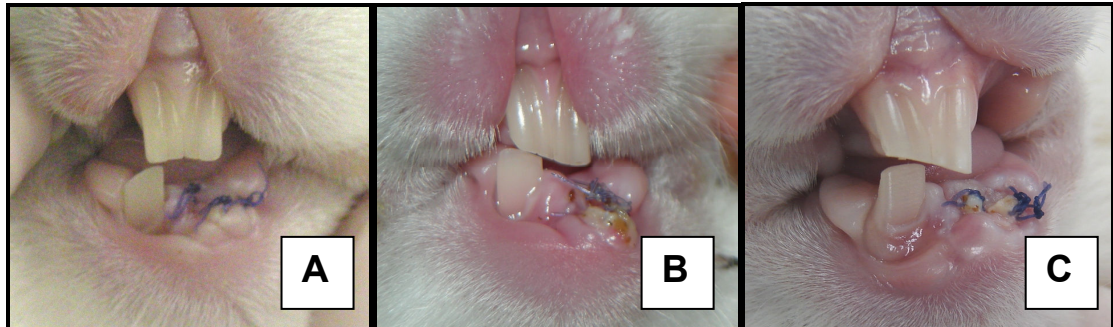
Devido à utilização apenas de um único doador da polpa dentária durante o experimento, foram utilizadas diferentes passagens nos grupos que receberam a terapia celular, oscilando no intervalo P4-P11.

## **5.7 Avaliação Macroscópica**

Na avaliação macroscópica, após sete dias do procedimento cirúrgico, foi observado a cicatrização do sítio cirúrgico, e o crescimento dos dentes



incisivos remanescentes, o qual apresentou um padrão bem variado (FIGURA 20). Apesar dos desgastes não terem sido de forma homogênea, não houve alteração na obtenção dos resultados da avaliação da regeneração óssea alveolar.

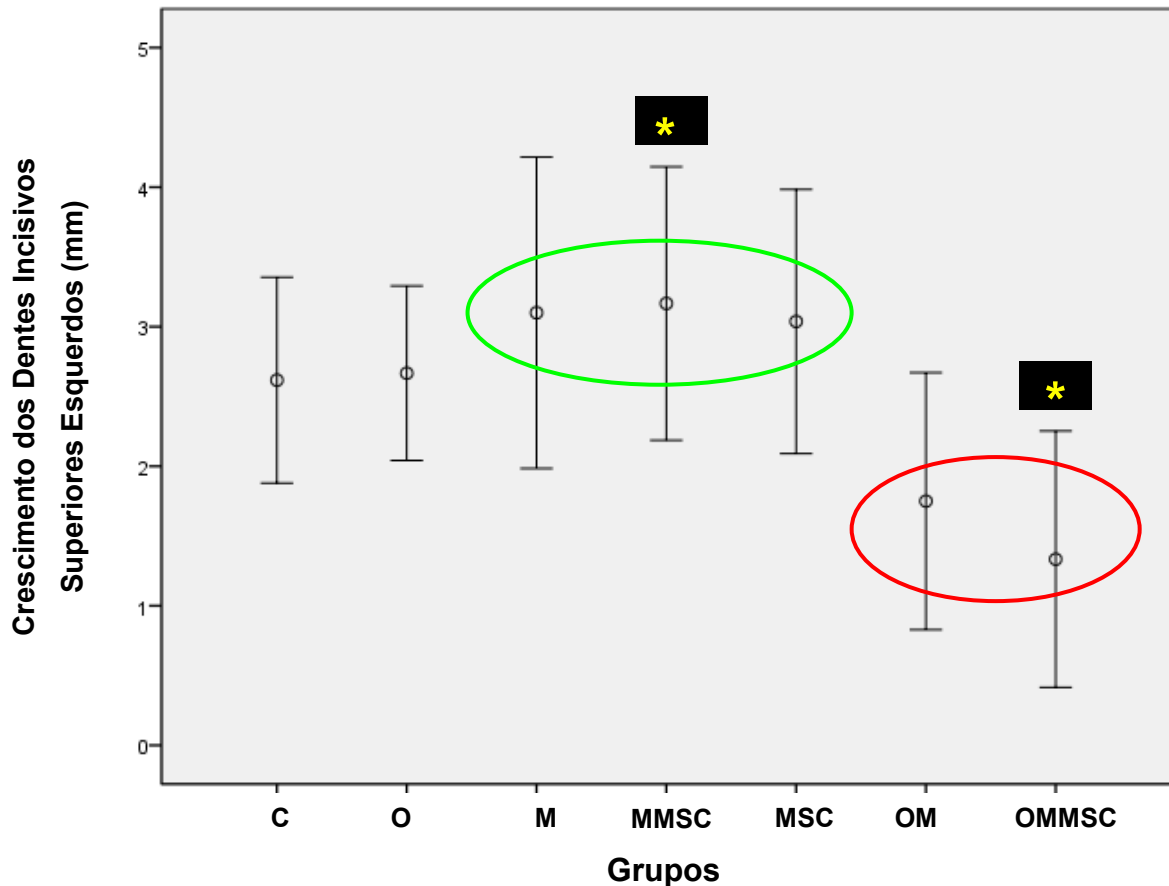


**FIGURA 20** - Avaliação macroscópica do crescimento dos dentes incisivos remanescentes após sete dias do procedimento cirúrgico. Notar a irregularidade dos desgastes e crescimentos durante o mesmo período de tempo (A, B e C).

As coroas clínicas dos incisivos superiores e do incisivo inferior direito foram medidas novamente e os resultados subtraídos do valor inicial no dia zero, no período pós-operatório. Após análise estatística de variância pode-se concluir que, os animais pertencentes aos grupos MSC, MMSC e M apresentaram maior crescimento dos dentes incisivos superiores esquerdos, quando comparados aos demais grupos (FIGURA 21 – elipse verde). Em contra partida, os coelhos dos grupos OM e OMMSC apresentaram a menor média de crescimento das coroas clínicas após sete dias (FIGURA 21 – elipse vermelha). Porém, somente houve diferença estatística dos animais do grupo MMSC com os do grupo OMMSC ( $p=0,049$ ).

Apesar do grupo OMMSC ter recebido enxerto com dois *scaffolds* distintos, sendo um 3D e outro fluido, além das células-tronco mesenquimais,

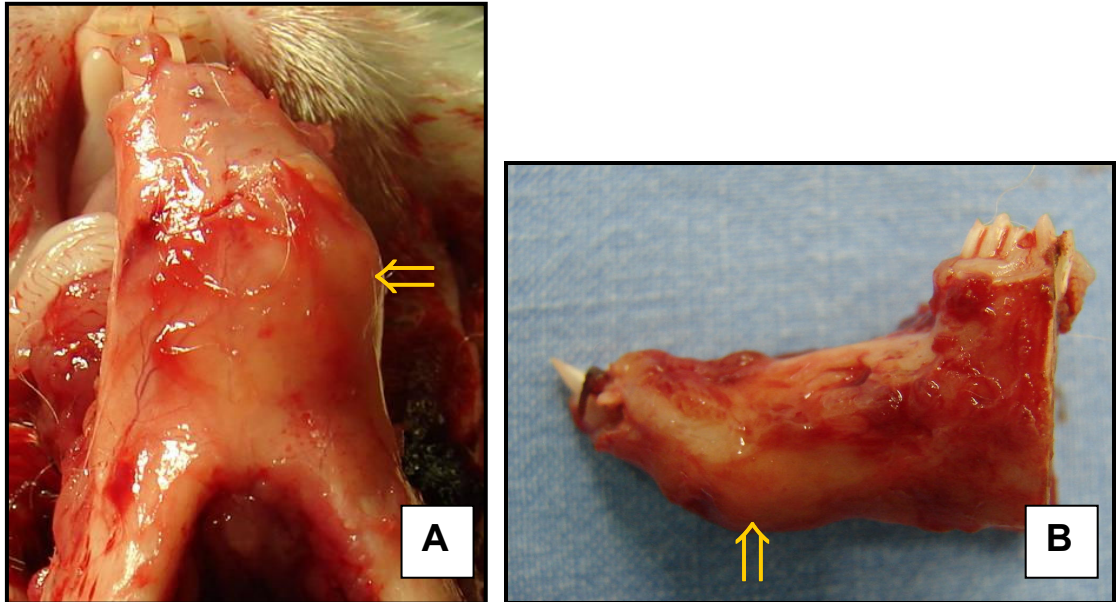
foram os animais que apresentaram menor crescimento deste dente, seguidos dos grupos OM, C e O.



**FIGURA 21** - Valores da mediana e escores máximo e mínimo do crescimento dos dentes incisivos superiores esquerdos (IES) (Teste de Tukey). Notar em destaque (elipse verde) os grupos que apresentaram maior crescimento dos IES, e os grupos com os menores índices (elipse vermelha). \* = diferença estatística ( $p=0,049$ ). C = controle; O = osso liofilizado bovino; M = Matrigel<sup>®</sup>; MMSC = Matrigel<sup>®</sup> + célula-tronco mesenquimal; MSC = célula-tronco mesenquimal; OM = osso liofilizado + Matrigel<sup>®</sup>; OMMSC = osso liofilizado + Matrigel<sup>®</sup> + célula-tronco mesenquimal.

Outro dado relevante observado, com relação à avaliação macroscópica das amostras, foi o crescimento exacerbado do ramo mandibular esquerdo correspondente ao segmento do alvéolo que recebeu o enxerto. Todos os animais que tiveram o sítio cirúrgico preenchido com a associação de osso

lioofilizado e Matrigel<sup>®</sup>, como os grupos OM e OMMSC, apresentaram esta alteração (FIGURA 22).



**FIGURA 22** - Aumento de volume do ramo mandibular esquerdo correspondente ao segmento do alvéolo que recebeu como enxerto osso liofilizado bovino e Matrigel<sup>®</sup> (seta amarela). (A) Vista ventrodorsal; (B) Vista látero-lateral esquerda. Observação: todos os animais dos grupos OMMSC (osso liofilizado bovino + Matrigel<sup>®</sup> + célula tronco mesenquimal) e do M (Matrigel<sup>®</sup>) também apresentaram esta mesma alteração.

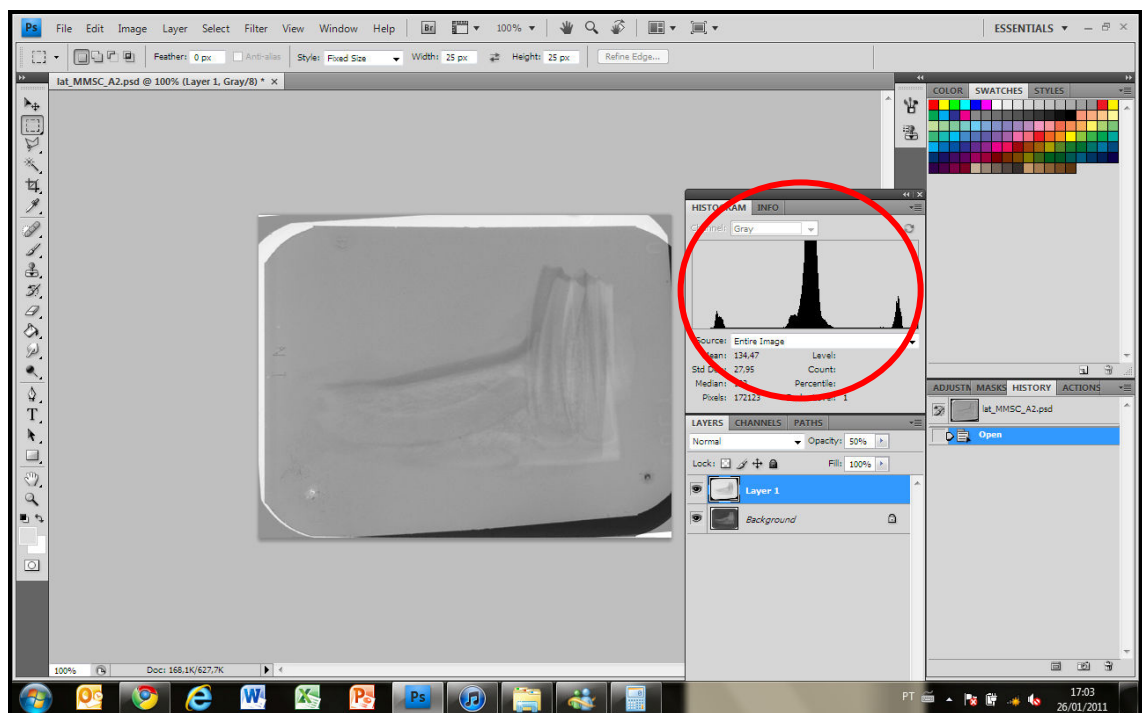
### 5.8 Avaliação Radiográfica

Nos estudos radiográficos comparativos, entre todos os grupos, não houve diferença estatística. Por outro lado, observou-se uma maior radiopacidade nos grupos que receberam o implante de osso liofilizado, quando comparado com os grupos C, M, MSC e MMSC.

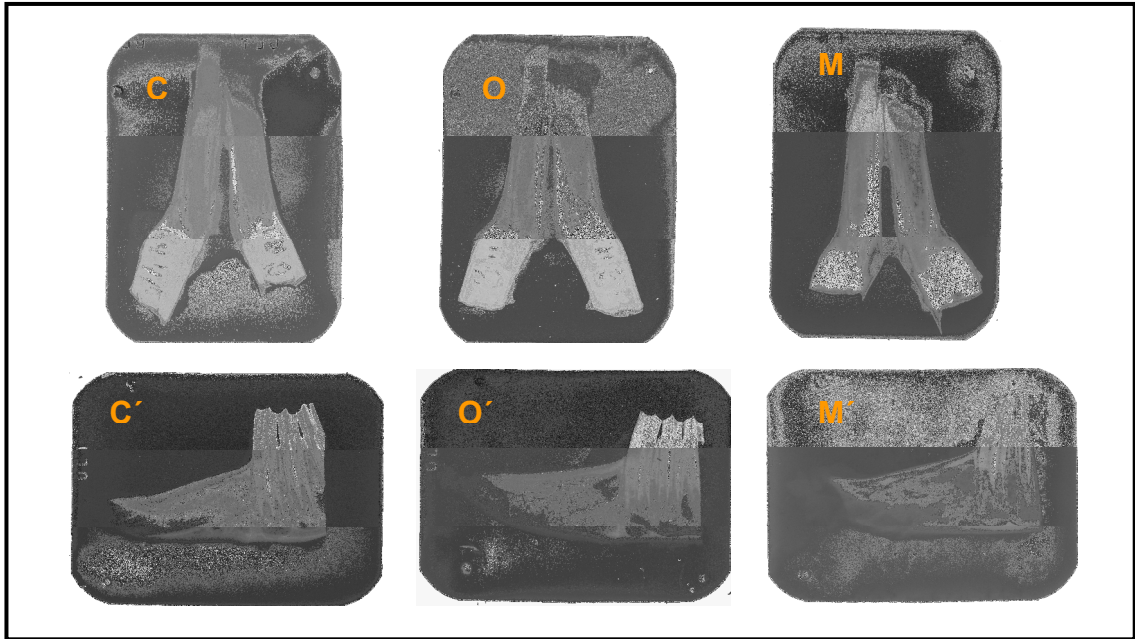
A técnica da subtração (FIGURA 23) utilizada para as avaliações mostrou-se eficiente nas duas incidências – ventrodorsal e látero-lateral. Porém, devido à presença do tubo traqueal no pós-operatório imediato, a área avaliada foi restringida a 30X30 *pixels*, a fim de evitar alterações no resultado

da sobreposição deste no alvéolo. Na incidência LL, realizada no *post mortem*, após separar o ramo mandibular esquerdo do direito na região da sínfise mandibular, foi possível mensurar uma área de 25X25 *pixels* em três pontos distintos, onde a média destas medidas foram utilizadas na análise. Além da técnica de subtração, as radiografias também foram avaliadas individualmente, conforme ilustra as Figuras 24 e 25.

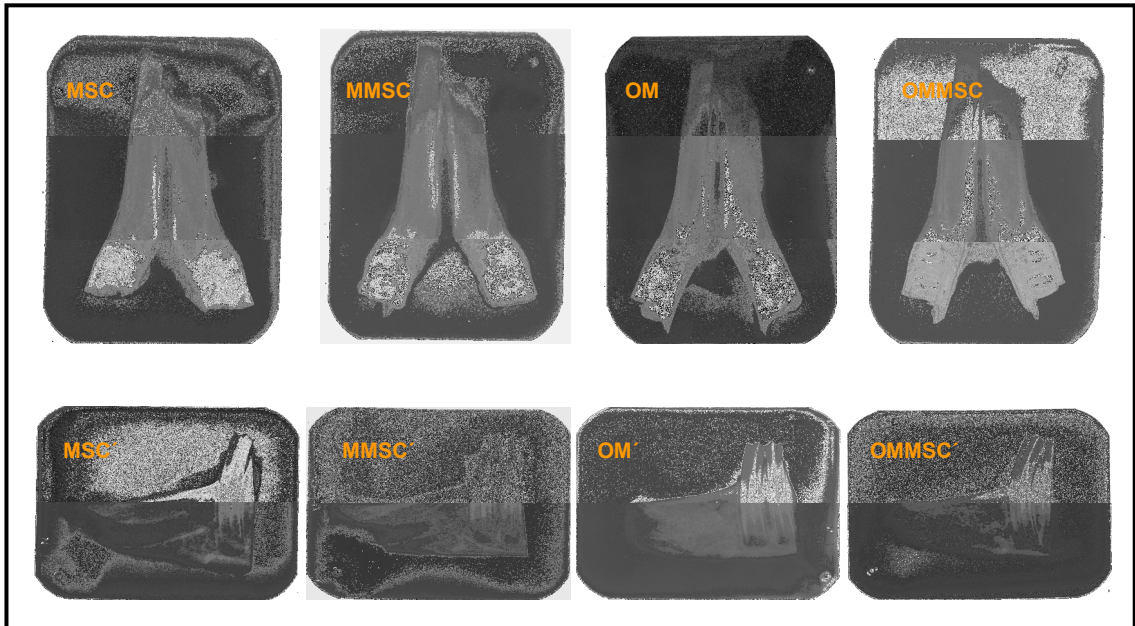
A Figura 26 ilustra os resultados obtidos após análise estatística dos valores da média dos histogramas em todos os grupos.



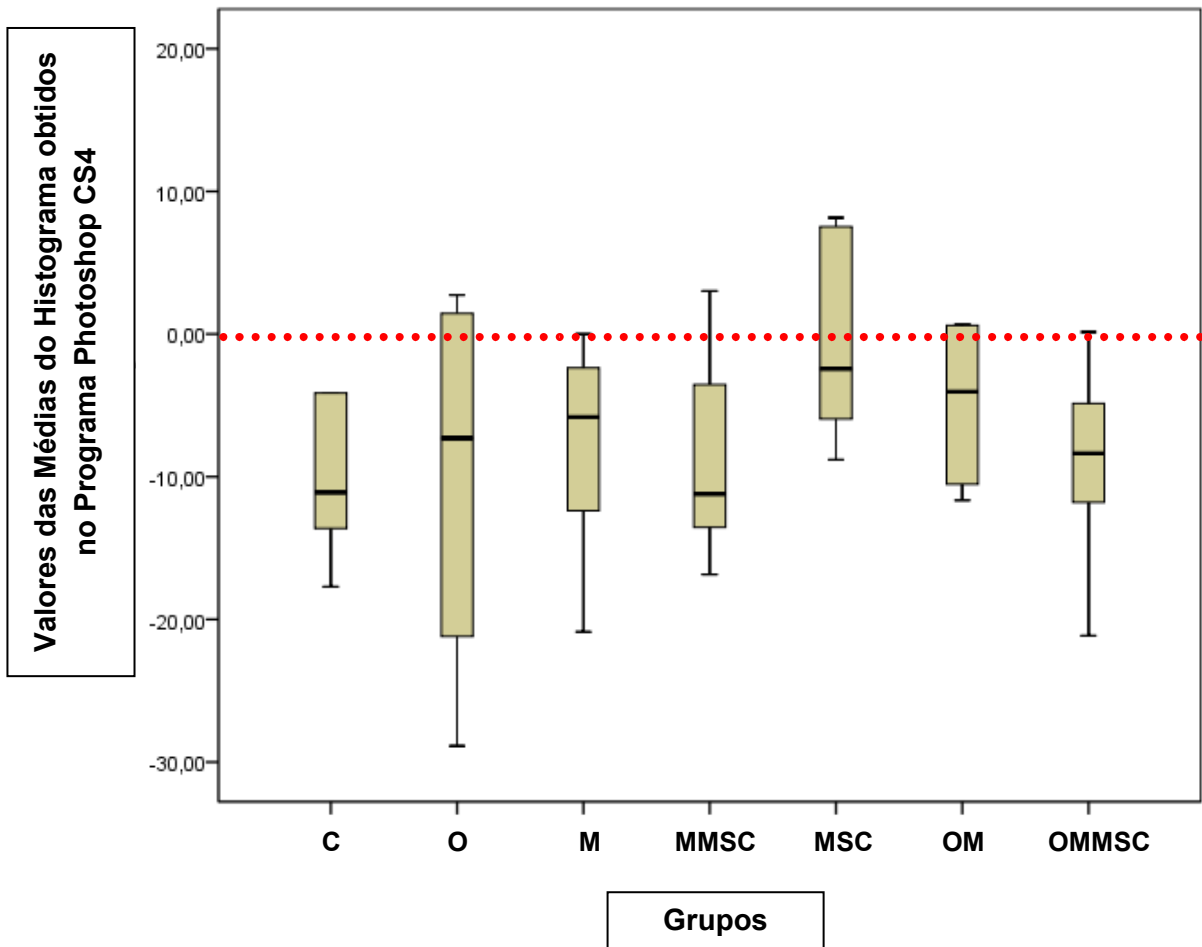
**FIGURA 23** – Realização da técnica de subtração radiográfica digital, utilizando o programa Photoshop CS4 com sobreposição da radiografia final sobre a inicial mostrando o registro no histograma (elipse vermelha).



**FIGURA 24** - Imagens das radiografias periapicais, após sete dias, na incidência dorsoventral e látero-lateral, primeira e segunda linha, respectivamente. C, C' = grupo controle; O, O' = grupo osso liofilizado bovino; M, M' = grupo Matrigel®. Notar em C' e O' preservação das paredes do osso alveolar; e perda da definição no M'. Preenchimento alveolar homogêneo com osso liofilizado nas imagens O e O' resultando em maior radiopacidade.



**FIGURA 25** - Imagens das radiografias periapicais, após sete dias, na incidência dorsoventral e látero-lateral, primeira e segunda linha, respectivamente. MSC, MSC': grupo célula-tronco mesenquimal; MMSC, MMSC': Matrigel® + grupo célula-tronco mesenquimal; OM: osso liofilizado bovino + Matrigel®; OMMSC: osso liofilizado bovino + Matrigel® + célula-tronco mesenquimal. Notar maior radiopacidade nas paredes do osso alveolar no MSC', início da perda da definição no MMSC', e ausência da delimitação desta estrutura nos grupos OM' e OMMSC'. Espessamento do ramo mandibular nos grupos OM' e OMMSC'.



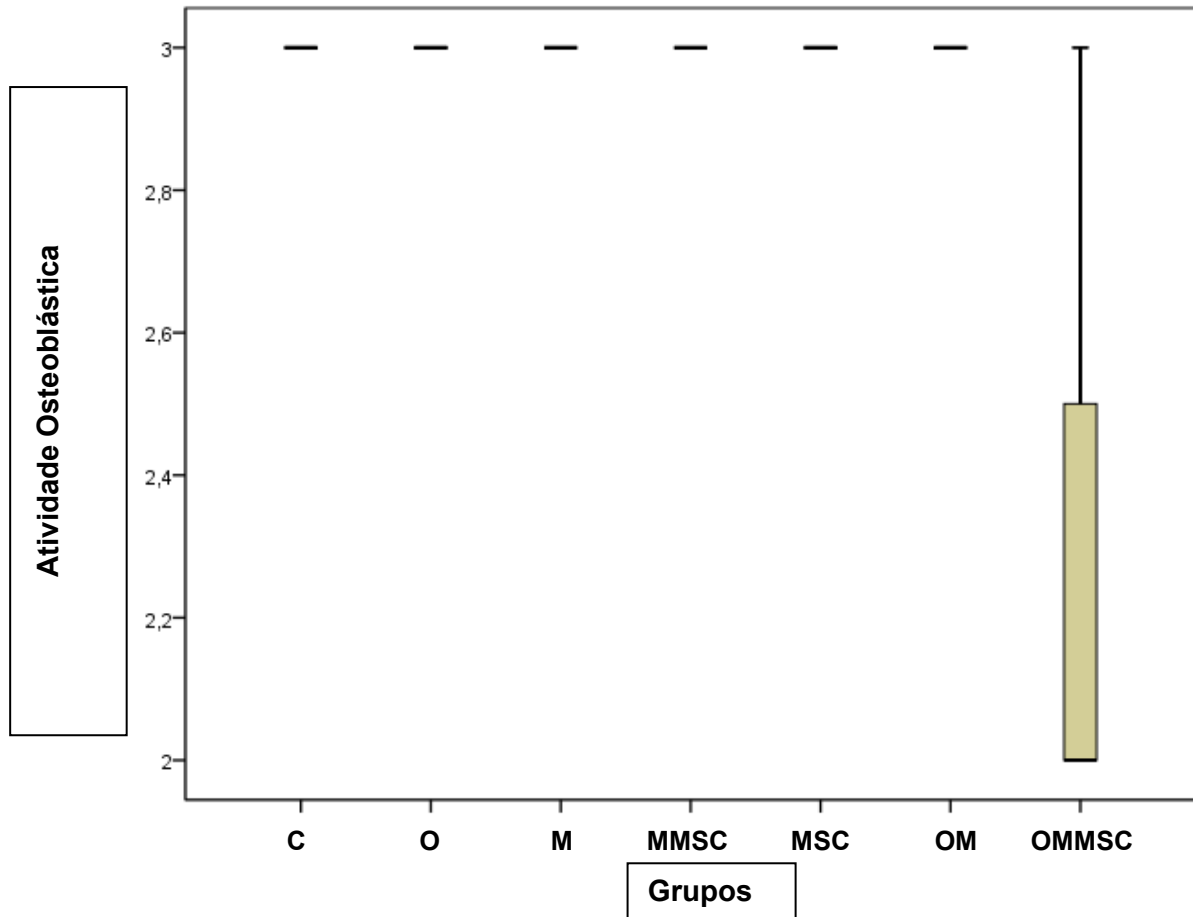
**FIGURA 26** - Gráfico da mediada obtido com os valores médios do histograma, após análise das radiografias periapicais na incidência látero-lateral (Teste SNK – gráfico Boxplot). Notar que a mediana, em todos os grupos, apresentou valores negativos, resultando em perda da densidade óssea, sem diferença estatística significativa entre todos os grupos (traço preto dentro da barra verde). Porém, os grupos O (osso liofilizado bovino) e MSC (célula-tronco mesenquimal) apresentaram valores positivos, o que indica aumento da densidade óssea (acima da linha vermelha).

## 5.9 Avaliação Microscópica

### 5.9.1 Análises histológicas de material desmineralizado

Histologicamente, devido ao curto período de avaliação de sete dias, não foi possível acompanhar a regeneração óssea alveolar completa. No entanto, somente houve diferença estatística quanto à avaliação da atividade

osteoblástica, que foi menor no grupo OMMSC (FIGURA 27), visto ainda que foi descartado um animal deste grupo, que apresentou formação de abscesso.



**FIGURA 27** - Representação gráfica de variância apontando menor atividade osteoblástica nos animais do grupo OMMSC (Teste de Kruskal-Wallis).

Entretanto, a partir desta análise, foi possível observar que no grupo controle houve uma melhor organização tecidual, quando comparado com os demais grupos (FIGURA 28A), e muito semelhante ao grupo que recebem apenas terapia celular (MSC) (FIGURA 28B).

Com relação à atividade osteoblástica, todos dos grupos atingiram a pontuação máxima (3), mostrando que no período de avaliação de sete dias

mais de 2/3 apresentavam neoformação de trabéculas ósseas. A única exceção foram dois animais do grupo OMMSC, onde foi observada uma atividade osteoblástica moderada (FIGURA 28F).

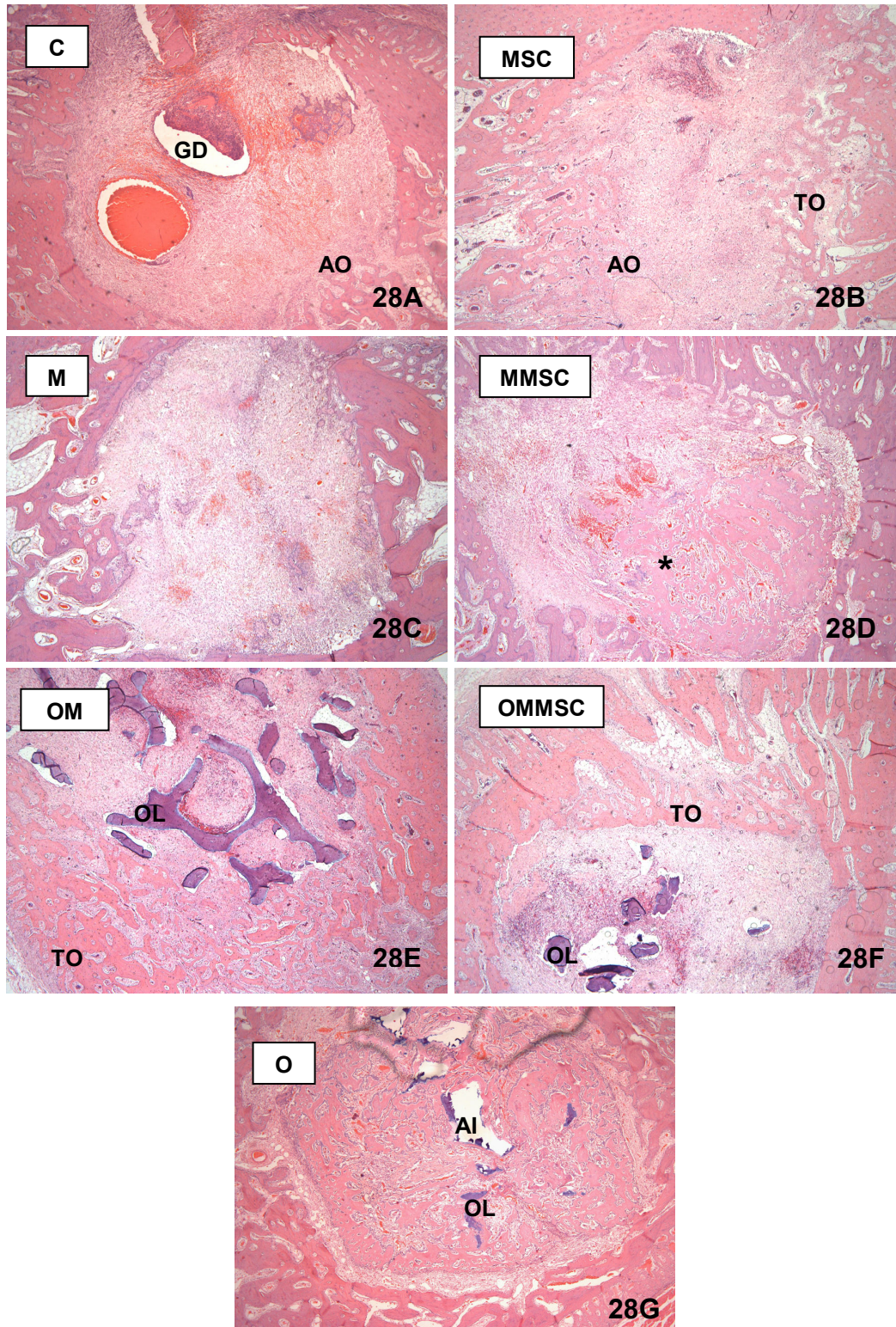
Devido ao curto período de avaliação, todos os implantes de osso liofilizado bovino encontravam-se presentes, sendo classificados com relação à absorção do implante como moderado, tanto no grupo OM como no grupo OMMSC e no O (FIGURAS 28E, 28F e 28G).

Já os animais, que receberam como implante o Matrigel<sup>®</sup>, apresentaram degeneração hialina e presença de hemáceas na região central do alvéolo (FIGURA 28C).

Os grupos tratados somente com terapia celular, ou em associação com o Matrigel<sup>®</sup>, apresentaram resultados muito semelhantes nas análises histológicas indicando uma possível aceleração no processo de regeneração óssea (FIGURA 28B e 28C).

Por outro lado, os alvéolos dentários que foram preenchidos com o Matrigel<sup>®</sup> evidenciaram presença de hemácias, como pode-se observar nos grupos M, MSC e, com menor intensidade, no grupo OM.





**FIGURA 28 – (A-G)** Imagens de cortes histológicos corados com HE (obj 50x). C: grupo controle; O: grupo osso liofilizado bovino; M: grupo Matrigel®; OM: grupo osso liofilizado bovino + Matrigel®; MSC: grupo célula-tronco mesenquimal; MMSC: grupo célula-tronco mesenquimal + Matrigel®; OMMSC: osso liofilizado bovino + Matrigel® + célula-tronco mesenquimal. GD = germe dentário; TO = trabécula óssea; \* = Neoformação óssea; OL = osso liofilizado bovino; AI = absorção do implante; AO = atividade osteoblástica.

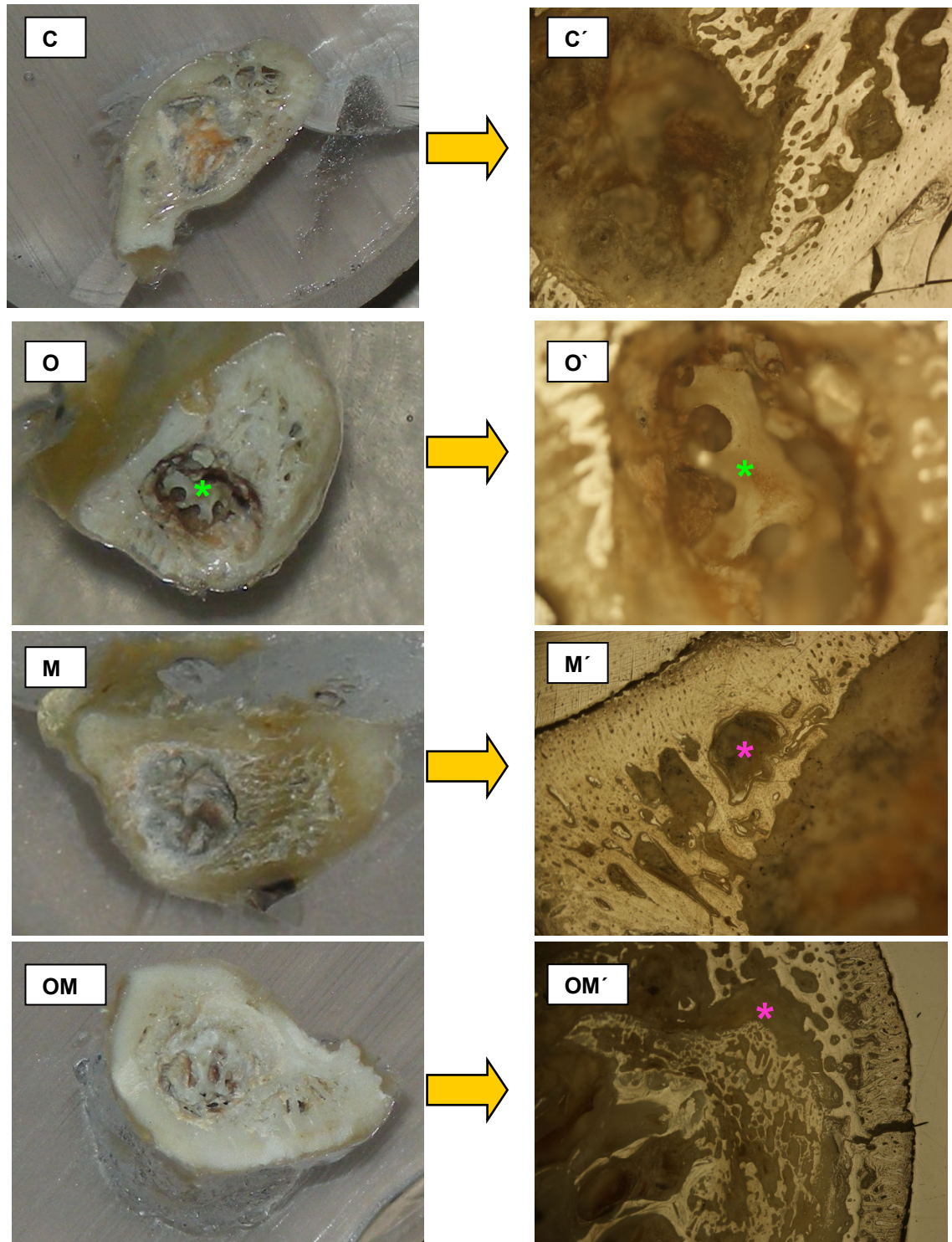
### 5.9.2 Análises histológicas de material não desmineralizado

A análise de amostras não desmineralizadas mostraram ser um excelente método comparativo com as análises histológicas de material desmineralizado, principalmente no auxílio da interpretação dos resultados.

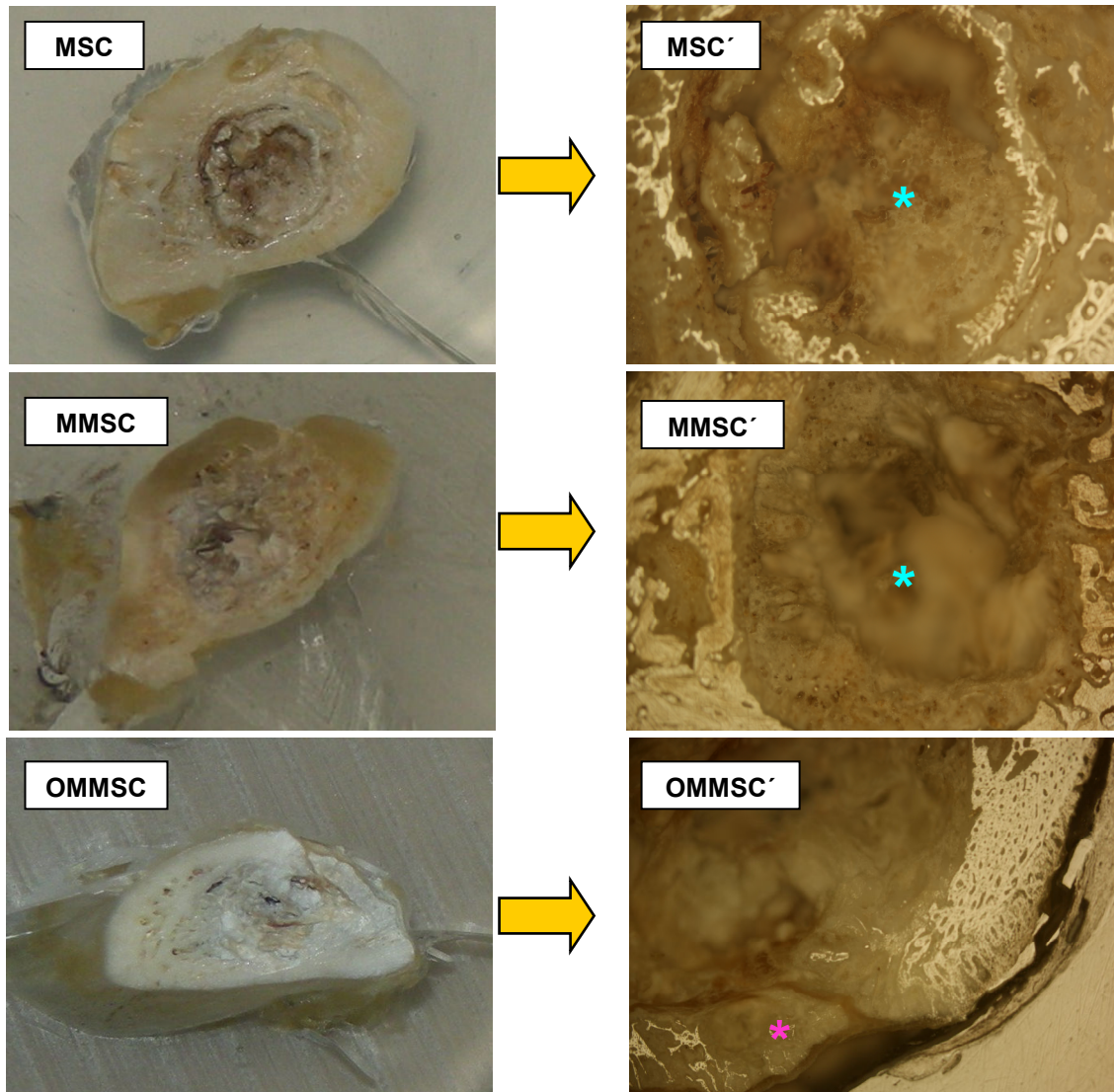
A escolha da região central (FIGURA 29 e 30) para avaliação do enxerto em cada grupo foi adequada, visto que nas extremidades, rostral e distal, poderia haver um preenchimento incompleto do alvéolo com os diferentes enxertos. Entretanto, no processo de lixamento e polimento das mandíbulas, foram perdidos alguns enxertos devido à fragilidade do alvéolo em um período cicatricial de sete dias. Nestes casos, as superfícies, que apresentaram perda parcial do enxerto no alvéolo dentário, foram substituídas, a fim de não prejudicar os resultados.

No grupo controle, o coágulo encontrava-se dentro do alvéolo com suas margens bem definidas, assim como no grupo O, exceto pela presença do osso liofilizado. No grupo MSC houve uma aceleração do processo de regeneração óssea, assim como nos demais grupos. Entretanto, os grupos que receberam o Matrigel<sup>®</sup> apresentaram extravasamento deste material para o osso mandibular estimulando a medula óssea, que nas lâminas de HE revelaram hemorragia, e nesta análise espessamento do ramo mandibular do alvéolo que recebeu o implante.

Além disso, houve perda da delimitação entre o alvéolo e o osso mandibular nos grupos OM, MMSC e OMMSC sugerindo uma aceleração do processo de cicatrização.



**FIGURA 29** - Amostras não desmineralizadas emblocadas com resina de poliéster cristal na coluna da direita, e análises microscópicas correspondentes na coluna da esquerda. C e C': grupo controle; O e O': grupo osso liofilizado bovino; M e M': grupo Matrigel®; OM e OM': grupo osso liofilizado bovino + Matrigel®. (\*) osso liofilizado bovino; (\*) presença do Matrigel® na região extra-alveolar.



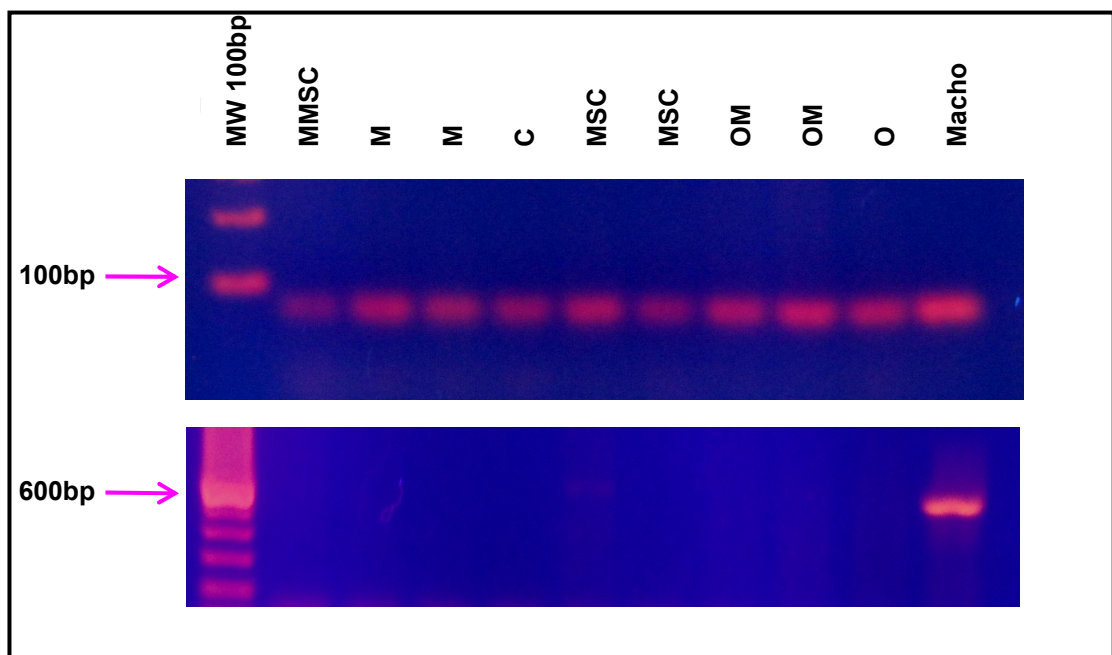
**FIGURA 30** - Amostras não desmineralizadas emblocadas com resina de poliéster cristal na coluna da direita, e análise microscópicas correspondentes na coluna da esquerda. MSC e MSC': grupo célula-tronco mesenquimal; MMSC e MMSC': grupo célula-tronco mesenquimal + Matrigel®; OMMSC e OMMSC': osso liofilizado bovino + Matrigel® + célula-tronco mesenquimal. (\*) presença do Matrigel® na região extra-alveolar; (\*) regeneração alveolar semelhante dos grupos MSC' e MMSC'.

### 5.10 Análise da Expressão do Cromossoma Y nas Amostras de Tecido das Receptoras

O comprimento longo do alvéolo do dente incisivo permitiu realizar as coletas para as análises de PCR de maneira satisfatória, embora a quantidade

deste material não tenha sido grande, por tratar-se de um tecido ainda friável após uma semana.

A eficácia do *primer*, que foi especialmente desenhado para a análise da expressão do cromossoma Y no teste de PCR, mostrou-se satisfatória, conforme ilustra a Figura 31. Porém, a identificação do cromossoma Y, não foi observada em nenhuma das amostras, provavelmente devido a fusão, transdiferenciação ou ação parácrina das células-tronco, que ainda não está completamente elucidada.



**FIGURA 31** – Análise da expressão do cromossoma Y. Na imagem em gel superior pode ser visualizada a expressão do gene constitutivo (GADPH), que comprova a eficácia do PCR na amplificação gênica (controle positivo). Enquanto que na imagem inferior, o gel demonstra a não detecção da expressão do cromossoma Y nas amostras de tecidos, dos diferentes tratamentos. Notar que na última coluna do gel inferior, a imagem demonstra a expressão do cromossoma Y na amostra de tecido de um animal macho, como controle positivo, comprovando a eficácia da técnica.

## 6 DISCUSSÃO

A escolha da espécie como modelo experimental atendeu as expectativas e necessidades do presente projeto, bem como foi ao encontro das últimas pesquisas realizadas em odontologia (LALANI et al., 2005; ZAHID, 2002), inclusive quando associadas à terapia celular (MORI et al., 1997; CLARK et al., 2006; EL-BACKLY, 2008; HWANG & CHOI, 2010). Estes animais têm como vantagem seu temperamento dócil, fácil manipulação, exigem pouco espaço para alojamento e possuem porte físico adequado para experimentação cirúrgica (GOMES, 2008).

Embora nenhum autor tenha mencionado a presença das células germinativas na região apical nos dentes desta espécie, o resquício deste tecido pode interferir nos resultados finais uma vez que pode desenvolver novo germe dentário (WIGGS & LOBPRISE, 1997). Por este motivo, a curetagem alveolar após a avulsão dentária representou uma etapa importante do experimento.

Entre todos os dentes presentes nos *Lagomorfos*, o dente incisivo inferior é o elemento dentário que possui o maior alvéolo dentário, sendo a melhor opção para avaliação da regeneração alveolar (ZAHID, 2002; LALANI et al., 2005). Além disso, o incisivo inferior possui uma curvatura menos acentuada quando comparada ao incisivo superior, que aliada à força da gravidade, torna-se mais favorável para avaliar a cicatrização alveolar com ausência ou menores índices de perda do material enxertado.

A maioria dos protocolos anestésicos utilizados em animais desta espécie são injetáveis e dissociativos, e não realizam a intubação endotraqueal (EL-BACKLY, 2008; HWANG & CHOI, 2010). Porém, foram encontrados somente dois trabalhos experimentais que mantiveram os animais anestesiados com fármaco volátil, tanto halotano como isoflurano, através de tubo traqueal (FONSECA et al, 1999; ZAHID, 2002). Em contra partida, em um destes trabalhos não foi mencionado o uso de medicações pré-anestésicas para auxiliar na contensão química, e posteriormente mecânica, dos animais, assim como diminuir a quantidade fornecida de anestésico volátil, que possivelmente foi requerida.

A intubação orotraqueal, realizada pelo anestesista veterinário, exige treinamento, independente do método adotado devido às particularidades anatômicas do coelho, como a pequena rima labial, protrusão da parte dorsal da base da língua e laringe oblíqua, que dificultam a visualização direta da abertura da glote. A inclusão de um relaxante muscular na medicação pré-anestésica assume um papel importante, considerando as particularidades das estruturas anatômicas citadas anteriormente. Provavelmente este seja o principal motivo da não utilização desta via para manutenção anestésica neste modelo experimental. O uso de traqueotubo sem balonete torna-se fundamental para alcançar o êxito no processo de intubação (FONSECA et al, 1999). A taxa de mortalidade de 0% obtida durante o experimento mostrou a eficácia do protocolo anestésico juntamente com o fornecimento de oxigênio através do tubo traqueal.

A escolha do dente incisivo como fonte de obtenção das células-tronco mesenquimais seguiu o protocolo realizado por El-Backly (2008), assim como a

necessidade de realizar a exodontia para alcançar a polpa dentária, que diferente de outras espécies, se localiza na região subgingival e não apresenta um tecido conjuntivo frouxo organizado (WIGGS & LOBPRISE, 1997). A extração dentária foi considerada um procedimento de fácil execução conforme descrito por outros autores. Em relação ao sítio de obtenção das MSCs, D'Aquino et al. (2008) fizeram um comparativo com as células isoladas a partir do tecido adiposo, afirmando que este não possui grande quantidade de células-tronco, quanto a polpa dentária, embora este problema possa ser resolvido no momento em que aumenta-se o volume de tecido coletado.

O posicionamento do paciente em decúbito ventral, aliado à utilização de uma mesa cirúrgica odontológica própria para roedores e lagomorfos, proporcionou um excelente acesso cirúrgico, conforme as ilustrações encontradas nos materiais e métodos desta dissertação, também citado por Capello et al. (2005). Apesar dos trabalhos publicados não fazerem referência a este fato, a literatura mostra tal importância, inclusive beneficiando a postura do cirurgião.

Com relação aos procedimentos cirúrgicos, a etapa inicial, representada pela exodontia do dente incisivo, apresentou controvérsia quanto à inclusão do tecido germinativo no momento da pressão exercida em direção apical para sua destruição (WIGGS & LOBPRISE, 1997; CAPELLO et al.; 2005). Foi observado, na maioria das vezes, que quando esta pressão não era exercida, este tecido acompanhava o germe dentário. Uma possível explicação seria a força realizada sobre o dente em conjunto com o movimento de avulsão dentária, embora não tenha sido encontrado referência justificando tal fato.



A regeneração tecidual guiada consiste em uma modalidade de tratamento regenerativo que requer a colocação de uma barreira física sobre o defeito ósseo, de modo que a proliferação de tecidos moles adjacentes para dentro do alvéolo protegido seja evitada (IAMAGUTI & BRANDÃO, 2007). Esta técnica pode não ser totalmente vantajosa para a cicatrização de feridas, pois acaba comprometendo o periósteo, um importante fornecedor de células osteogênicas em processo de formação óssea (NAMPO et al., 2010), o que justifica a não utilização destas no experimento.

A enxertia óssea alveolar representa um procedimento frequentemente realizado nas diferentes espécies, como em cães (DUARTE et al., 2006; HUJA et al., 2006; SIMSEK et al., 2010) e em seres humanos (NEWMAN et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2005). Apesar do enxerto autólogo ser conhecido como o padrão ouro, principalmente devido a biocompatibilidade, e por promover a osteogênese, osteocondução e osteoindução, a necessidade de outra abordagem cirúrgica pode resultar em infecção, dor, hematoma e apresenta limitação quando necessitar um grande volume para reconstrução de uma grande falha óssea (MILLIS & MARTINEZ, 2003; ALIEVI et al., 2007; GONÇALVES, 2010; HWANG & CHOI, 2010). Talvez, o preparo do enxerto, utilizando o dente extraído do próprio paciente, possa ser uma excelente alternativa, com baixo custo, biocompatível, e ainda contar com a presença de células-tronco da polpa dentária, como o experimento realizado por Nampo et al. (2010), que mostra resultados satisfatórios com este método.

A escolha do osso liofilizado bovino como implante xenógeno veio ao encontro do uso deste material na rotina clínica (OLIVEIRA et al., 2005).

Porém, na odontologia, este comumente é comercializado em forma de pó para preenchimento alveolar, enquanto o *scaffold* 3D, é frequentemente utilizado para reconstruções ósseas maiores, como por exemplo, fratura com perda óssea significativa.

Nampo et al. (2010) relataram que o tamanho das partículas do enxerto influencia futuramente na formação óssea, visto que acabam aumentando o tempo de reabsorção quando são utilizadas partículas muito grandes. Entretanto, o *scaffold* 3D tem como objetivo servir como um arcabouço e auxiliar na regeneração óssea alveolar, tendo em vista ser o último tecido a ser reparado, impedindo a invaginação do epitélio neste local. Estas características distintas entre os enxertos particulados e os em 3D resultam em diferentes tempos de reabsorção do implante, assim como suporte sanguíneo. Fisher et al. (2004) afirmaram ainda sua dificuldade em preencher o sítio cirúrgico com biomateriais, principalmente particulado, devido à extensão e curvatura alveolar nesta espécie.

A colocação do osso liofilizado no sítio cirúrgico foi sucedida de maneira eficiente, sendo comprovada nas radiografias no pós-operatório imediato. Até o presente momento não foi relatado à utilização deste *scaffold* em específico no alvéolo dentário. As análises das amostras, tanto desmineralizadas como não desmineralizadas, após sete dias, mostrou que o implante ainda encontrava-se presente, e quando associado às MSCs e ao Matrigel<sup>®</sup>, apresentou um espessamento do ramo mandibular esquerdo. Este fato pode ser justificado pela composição de Matrigel<sup>®</sup> (fatores de crescimento e sarcoma de rato, este rico em matriz proteica extracelular) que pode ter aumentado a permeabilidade

vascular e ativação da medula óssea, uma vez que foi observado presença de hemorragia no alvéolo dentário.

Tendo em vista o uso do Matrigel<sup>®</sup> como substrato no processo de angiogênese, optou-se em utilizá-lo neste experimento com o objetivo de aumentar a neovascularização, principalmente pela necessidade requerida pelo implante de osso liofilizado de suporte sanguíneo (KEMPTON et al., 2009). Além disso, este material também serve como *scaffold* para as MSCs. A transformação da consistência fluida, quando em baixa temperatura, para a gelificada, quando atinge temperaturas entre 22°C e 35°C, foi observada rapidamente no trans-operatório, contendo inclusive a hemorragia intra-alveolar. O diâmetro da agulha utilizada de 21G atendeu às informações do fabricante (Bula Matrigel<sup>®</sup> - [http://www.bdbiosciences.com/externalfiles/dl/doc/manuals/live/webenabled354248\\_Guidelines.pdf](http://www.bdbiosciences.com/externalfiles/dl/doc/manuals/live/webenabled354248_Guidelines.pdf)), que indica um diâmetro mínimo de 19G, mas quando este faz referência ao uso adjuvante com as células-tronco cultivadas, recomenda-se um diâmetro da agulha de 23G. Apesar de ter utilizado um diâmetro menor, o meio de cultura, que também estava presente, tornou a solução final um pouco mais fluida, facilitando sua aplicação.

Quando foi lançado mão do uso das células-tronco mesenquimais, diversos trabalhos surgiram em busca de alternativas terapêuticas com o objetivo de acelerar o reparo ósseo alveolar, que normalmente pode levar de 90 a 120 dias em humanos (OLIVEIRA et al., 2005). As fontes de MSCs mais exploradas atualmente provêm da medula óssea (HWANG & CHOIN, 2010), do tecido adiposo (NARDI & MEIRELLES, 2006; SÁNDOR & SUURONE, 2008) e

da polpa dentária (MORSCZECK et al., 2007; MIURA et al. 2003; EL-BACKLY et al., 2008; NAKAMURA et al., 2009).

Nakamura et al. (2009) realizaram um estudo comparativo utilizando células-tronco mesenquimais de medula óssea, com àquelas derivadas de polpa dentária de dente decíduo e de dente permanente. Os resultados deste experimento apontaram que a polpa dentária de dente decíduo possui uma grande proliferação significativa de MSCs, além de ser considerado indolor e minimamente invasivo. Devido à rápida troca, da dentição decídua pela permanente, nos coelhos, e o alto índice de mortalidade em filhotes, optou-se em isolar células-tronco da polpa dentária de um dente permanente recém erupcionado. A manutenção anestésica com isoflurano via máscara resultou no rápido retorno anestésico, sendo que após a extração dentária este doador alimentou-se normalmente.

As células-tronco mesenquimais oriundas da polpa dentária vão ao encontro da descrição da literatura, que são facilmente obtidas (MIURA et al., 2003; MORSCZECK et al., 2007; D'AQUINO et al., 2008; EL-BACKLY et al., 2008; NAKAMURA et al., 2009; HONDA et al., 2010). Porém, quando comparadas com as culturas de MSCs da medula óssea, parecem apresentar uma redução da capacidade de manutenção por longos períodos em cultura. Embora ainda sem comprovação experimental ou científica, observou-se uma diminuição do vigor das culturas de MSCs provenientes da polpa dentária em torno da vigésima passagem.

A utilização de terapia celular associada aos diferentes *scaffolds* tem sido foco de muitas pesquisas, porém nem sempre os resultados obtidos *in*

*vitro* seguem àqueles aplicados *in vivo*. Em 2010, Gonçalves (2010) realizou um trabalho comparativo utilizando osso liofilizado bovino em co-cultura com células-tronco mesenquimais isoladas a partir da medula óssea com e sem movimentos rotatórios, o que resultou em superior capacidade destas células em se fixarem ao enxerto. O autor ressalta ainda que no método convencional de co-cultivo, a baixa quantidade e viabilidade das MSCs provavelmente ocorreram por tratar-se de um cultivo bidimensional em um *scaffold* 3D, onde as células permaneceram somente na camada superior que foram colocadas. O autor levanta ainda a hipótese da associação entre células-tronco e osso liofilizado, que poderia promover uma melhor regeneração óssea, já que esta possui capacidade osteoindutiva.

Apesar da ausência, neste experimento, de um grupo que tivesse como enxerto a associação de osso liofilizado com MSCs, talvez a própria movimentação do animal em conjunto com os movimentos mastigatórios poderia substituir estes movimentos rotatórios citados no experimento acima.

El-Backly et al. (2008) levantaram a hipótese da influência do tamanho dos poros do *scaffold*. Apesar do implante com tamanho de poros grandes suportar uma maior quantidade substancial de regeneração dos tecidos mineralizados, talvez um *scaffold* com menor diâmetro destes poros possa proporcionar uma matriz mais organizada favorecendo a angiogênese. Embora não tenha sido realizada uma análise do diâmetro dos poros do osso liofilizado utilizado neste experimento, acredita-se que haja uma diversidade de diâmetros, indo ao encontro da afirmação realizada por estes mesmos autores, onde o ideal seria uma combinação de tamanho dos poros para atender as

duas necessidades, ou seja, suportar os tecidos que estão regenerando não prejudicando a neovascularização.

Tendo em vista a reparação de um tecido, as células-tronco geralmente são administradas na forma indiferenciada. Em contra partida, Seong (2010); Hwang & Choi (2010) passaram a diferenciar estas células na linhagem osteogênica para posterior aplicação, tendo como objetivo acelerar a neoformação óssea, como em casos de distração osteogênica. Este protocolo apresenta premissas diferentes, pois é um protocolo de terapia celular, visando incrementar a regeneração de tecidos; porém, utilizando para tal células diferenciadas, que não poderão realizar as importantes e potencias funções de ação parácrina, por exemplo, mediadas pelas MSC, tendo em vista justamente sua característica celular indiferenciada (CHEN et al., 2008).

Em relação ao desenho do projeto experimental, optou-se em realizar o desgaste das coroas clínicas dos dentes incisivos remanescentes, a fim de evitar trauma e deiscência dos pontos no *flap* mucoperiostal após sete dias. A existência de células indiferenciadas no tecido germinativo dos dentes dos *Lagomorfos* (WIGGS & LOBPRISE, 1997; CAPELLO et al., 2005) pode justificar o crescimento destes incisivos nos animais que foram, por nós, tratados com terapia celular e/ou Matrigel<sup>®</sup> (MSC, MMSC e M), apesar de não ter sido realizado nenhum teste que comprove tal hipótese.

As avaliações radiográficas foram realizadas cautelosamente utilizando a técnica de subtração para a análise estatística (FERREIRA et al., 1999; LÉDA, 2010). A ausência de um aparelho de radiografia digital tornou esta análise mais trabalhosa, havendo também uma pequena variação na técnica,

justificada pela singular anatomia oral desta espécie, que dificulta inclusive o posicionamento do filme periapical intra-oral. Outro fato relevante foi a variação no tempo de revelação destas películas radiográficas, que sofria grande influência da temperatura ambiente e dos líquido propriamente ditos – revelador e fixador. Para corrigir esta diferença de contraste foi estipulada uma área da imagem radiográfica para subtrair e excluir e não alterar os resultados.

A presença do tubo traqueal acabou prejudicando algumas imagens quando foram realizadas as radiografias iniciais e no pós-operatório imediato, sendo que esta última sempre acabava apresentando maior facilidade de colocação do filme radiográfico dentro da boca do animal devido ao bom relaxamento muscular (FONSECA et al., 1999).

Assim, foi possível demonstrar que os grupos de animais que foram tratados com fragmentos de ossos liofilizados apresentaram os melhores resultados radiográficos, quando foram comparados individualmente, devido ao aumento da radiopacidade, que significa aumento da densidade óssea (LÉDA, 2010). Já quando as radiografias eram sobrepostas, na técnica de SRD, os melhores resultados foram obtidos nos animais que foram tratados com MSCs e fragmentos ósseos.

As análises dos resultados histológicos das amostras de tecido que não foram desmineralizadas não apontaram qualquer alteração frente à formação neoplásica (KEMPTON, 2009); porém os animais tratados somente com o Matrigel® apresentaram um espessamento do ramo mandibular pertencente ao alvéolo que recebeu o enxerto. Este resultado, que foi observado em um intervalo de apenas sete dias após o tratamento, recomenda cautela para a

adoção e uso clínico da utilização de Matrigel<sup>®</sup> nestes casos, necessitando mais estudos para melhor compreensão e esclarecimentos sobre o espessamento do ramo mandibular observado nos animais que receberam tal tratamento.

Ainda nas análises histológicas dos tecidos desmineralizados, a descalcificação com ácido nítrico 5% foi eficiente; porém, o tempo de permanência foi maior do que relatado por Hwang & Choi (2010), ou seja, sete dias e não cinco. No 5º dia de imersão nesta solução, as mandíbulas eram cortadas transversalmente e posteriormente permaneciam nesta solução por mais dois dias, com o objetivo do ácido nítrico penetrar internamente nas amostras e evitar perda do material utilizado no enxerto alveolar.

Decorridos sete dias, os resultados histopatológicos revelaram a presença do início da formação de um germe dentário no grupo controle, indo ao encontro da citação inicial da importância da curetagem alveolar para remoção do tecido germinativo. Os grupos que receberam somente células-tronco mesenquimais ou associadas ao Matrigel<sup>®</sup> apresentaram maior formação de osso no alvéolo dentário, com intensa atividade osteoblástica e formação de trabécula óssea. Todavia, os grupos que receberam osso liofilizado apresentaram excelentes resultados nas amostras não desmineralizadas, inclusive com perda na delimitação do osso alveolar nos grupos que foram tratados com osso e Matrigel<sup>®</sup> e fragmentos ósseos em associação com Matrigel<sup>®</sup> e células-tronco mesenquimais. Nesta análise, os grupos controle, e tratados somente com MSCs e destas associadas com Matrigel<sup>®</sup> encontravam-se muito semelhantes. Lalani et al. (2010)



desenvolveram um trabalho sobre a cicatrização do alvéolo dentário, após a extração dentária em coelho, a fim de localizar os fatores de crescimento de fibroblastos (FGF-2) e de crescimento vascular endotelial (VEGF). Embora ainda não tenha sido realizada a avaliação por imuno-histoquímica nas amostras dos animais deste experimento, os achados histopatológicos desses autores, com duas semanas de avaliação, onde existe início de formação de osso, são muito semelhantes às deste trabalho em apenas sete dias.

Segundo Seong et al. (2010) a evolução histológica dos transplantes de DPSCs juntamente com *scaffold* tem revelado grande formação de tecido mineralizado, que sugere grande potencial dessas células para regeneração tecidual óssea clínica.

A utilização do teste de PCR para detectar a expressão do cromossomo Y, nas amostras de tecidos avaliadas, após sete dias, vai ao encontro dos resultados encontrados na literatura. Atualmente, pesquisadores têm conseguido este isolamento, quando realizam precocemente este teste, sugerindo que talvez a influência das MSCs na regeneração tecidual ocorre, aproximadamente, nas primeiras 24 horas, através da ação parácrina. Os resultados positivos obtidos no processo regenerativo mostram que há uma aceleração da regeneração dos tecidos, quando os animais foram tratados com as MSCs

## 7 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho é possível concluir que:

- ✓ O Matrigel<sup>®</sup> como *scaffold* das MSCs parece ser eficiente; porém, seu uso clínico exige cautela, visto que existem fatores de crescimento em sua formulação, o que pode justificar o espessamento ósseo, verificado no presente trabalho, no grupo de animais, que foi tratado somente com Matrigel<sup>®</sup>.
- ✓ A avaliação radiográfica através da técnica de subtração é um método comparativo eficiente, pois permite sobrepor a imagem final sobre a inicial e avaliar qual o grau de regeneração de tecido ósseo. Entretanto, há limitação quando é realizada a sobreposição das imagens, visto não existir posicionadores para a espécie.
- ✓ A avaliação radiográfica dos alvéolos dentários dos animais dos grupos que receberam o implante de fragmentos de ossos liofilizados, apresentaram imagem compatível com maior densidade óssea, após sete dias de tratamento, quando comparadas com as imagens radiográficas dos animais que receberam outros tratamentos.
- ✓ Histologicamente, a utilização das células-tronco mesenquimais oriunda da polpa dentária acelerou o processo de regeneração óssea alveolar, uma vez que nesses grupos é observado maior atividade osteoblástica nos grupos MSC e Matrigel<sup>®</sup> em sete dias.

- ✓ Os resultados das análises microscópicas dos tecidos não desmineralizados são compatíveis àqueles apresentados nas amostras dos tecidos desmineralizados corados com HE.
  
- ✓ Sete dias após os transplantes, não foi possível detectar a presença de cromossoma Y nas amostras de tecidos analisadas. O que sugere que as células MSC, de doador macho, transplantadas, deixaram o local antes da coleta das amostras de tecidos.

## 8 REFERÊNCIAS

ALIEVI M.M.; SCHOSSLER J.E.W.; GUIMARÃES L.D.; OLIVEIRA A.N.C.; TRAESLEL C.K. & FERREIRA P.A. Implante ósseo cortical alógeno conservado em mel na reconstrução de falha óssea diafisária em fêmur de cães: avaliação clínica e radiográfica. **Ciência Rural**, v.37, n.2, p. 450-457, 2007.

BASHUTSKI J.D. & WANG H.L. Periodontal and Endodontic Regeneration. **Journal of Endodontics**, v. 35, n.3, p.321-328, 2009.

BYDLOWSKI S.P.; DEBES A.A.; MASELLI L.M.F.; JANZ F.L. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v. 31, n.1, p. 25-35, 2009.

CAPELLO V.; GRACIS M.; LENNOX A.M. **Rabbit and Rodent Dentistry Handbook**. Blackwell: Angela M. Lennox, 2005, 273p.

CHEN L.; TREDGET E.E. & WU P.Y.G. Paracrine Factors of Mesenchymal Stem Cells Recruit Macrophages and Endothelial Lineage Cells and Enhance Wound Healing. **Plos One**, v. 3, n. 4, 2008.

CIRNE-LIMA E.O. Stem Cells. **Revista HCPA**, v.27, n.3, p.66-73, 2007.

CLARK C.L. Distraction osteogenesis in irradiated rabbit mandibles with adjunctive hyperbaric oxygen therapy. **Journal of Oral Maxillofacial Surgery**, v.64, p. 589-593, 2006.

D'AQUINO, R.; PAPACCIO, G.; LAINO, G.; GRAZIANO, A. Dental Pulp Stem Cell: A Promising Tool for Bone Regeneration. **Stem Cell Review**. 2008. v. 4, p.21-26.

DUSSE, L.M.S.; MACEDO, A. P.; BATSCHAUER, A.P. CARVALHO, M.G. Plasma Rico em Plaquetas (PRP) e sua aplicação em Odontologia. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**. 2008, 40(3), p.193-197.

DUARTE T.S.; BORGES A.P.B.; LAVOR M.S.L.; FILGUEIRAS R.; TSIOMIS A.C.; OLIVEIRA K.C.S.; PONTES K.C.S. Osteointegração da hidroxiapatita sintética no processo alveolar da mandíbula de cães: aspectos histológicos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.5, p.849-853, 2006.

EL-BACKLY R.M.; MASSOUD A.G.; AZZA M. EL-BADRY; SHERIF R.A. & MAREI A.M.K. Regeneration of dentine/pulp-like tissue using a dental pulp stem cell/poly(lactic-co-glycolic) acid scaffold construct in New Zealand white rabbits. **Australian Endodontic Journal**. v. 34, n. 2, p. 52-67, 2008.

FERREIRA R.I.; ARRIAGA M.L.; CAMPOS P.S.F.; PANELLA J. Radiografia de subtração digital. **Revista da Pós-graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo**, v.6, n.3, p.249-252, 1999.

FISHER J.P.; LALANI Z.; BOSSANO C.M.; DEMIAN N.; JOHNSTON C.; DEAN D.; JANSEN J.A.; WONG M.E.; MIKOS A.G. Effect of biomaterial properties on bone healing in rabbit tooth extraction socket model. **Journal of Biomedical Materials Research – Part A**. v. 68A, n. 3, p.428-438, 2004.

FONSECA N.M.; REIS M.R.C.; FERNANDES L.M.A.; REZENDE E.S. Esforça respiratório do coelho com diferentes sistemas de anestesia: T de Ayre, Bain-Spoerel e Fonseca-Goldenberg. **Revista Brasileira de Anestesiologia**. v. 49, n. 4, p.249-256, 1999.

FONTANA V. **Análise da expressão gênica em células-tronco mesenquimais de medula óssea humana durante o comprometimento com a linhagem osteogênica**. 128f. (Dissertação de Mestrado) Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

GALIA C.R.; MACEDO C.A.S.; ROSITO R.; MOREIRA L.F. Osteointegração de enxertos liofilizados impactados. **Acta Ortopédica Brasileira**, v.17, n. 2, p. 24-28, 2009.

GOMES C. **Avaliação da cicatrização óssea em falha mandibular com auto-enxerto ósseo associado a suspensão celular de medula óssea autógena: estudo experimental.** 76f. (Dissertação de Mestrado) Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

GONÇALVES, F.C. **Associação de células-tronco mesenquimais e fragmentos ósseos liofilizados: desenvolvimento de um método alternativo de cultivo.** 38f. (Trabalho de Conclusão de Curso) Faculdade de Biologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

GRONTHOS S.; MANKANI M.; BRAHIM J.; ROBEY G.; SHI S. Postnatal human dental pulp stem cell (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 97, n. 25, p.13625-13630, 2000.

HAUSMANN E. Radiographic and digital imaging in periodontal practice. **Journal of Periodontology**, v.71, n.3, p.497-503, 2000.

HONDA M.J.; IMAIZUMI M.; TSUCHIYA S.; MORSCZECK C. Dental follicle stem cells and tissue engineering. **Journal of Oral Science**, v.52, n.4, p.541-552, 2010.

HUJA S.S.; FERNANDEZ S.A.; HILL K.J.; LI Y. Remodeling dynamics in the alveolar process in skeletally mature dogs. **The anatomical record: Part A Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology**, v. 288, n. 12, p.1243-1249, 2006.

HWANG Y.J.; CHOI J.Y. Addition of Mesenchymal Stem Cell to Scaffold of Plaquet-Rich Plasma Is Beneficial for the Reduction of the Consolidation Period in Mandibular Distraction Osteogenesis. **Journal of Oral Maxillofacial Surgery**, v.68, n.5, p. 1112-1124, 2010.

IAMAGUTI L.S.; BRANDÃO C.V.S. Uso de membrana bio sintética a base de celulose na regeneração tecidual guiada. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.28, n.4, p.701-708, 2007.

KAHNBERG K.E.; RASMUSSEN L.; MOHAMMADI S. An experimental rabbit model for studying the healing of onlay bone grafts. **Swedish Dental Journal**, v.22, n.1, p.15-21, 1998.

KEMPTON L.B.; GONZALES M.H.; LEVEN R.M.; HUGHES W.F.; BEDDOW S.; SANTHIRAJ Y.; ARCHIBALD S.J.; HASSAN B.E.; SHOTT S.; KERNS J.M. Assessment of axonal growth into collagen nerve guides containing VEGF-transfected stem cells in Matrigel. **The Anatomical Record**, v.292, n.2, p.214-224, 2009.

KOLYA C.L. & CASTANHO F.L., Células-tronco e a Odontologia. **ConSientiae Saúde**, São Paulo, v.6, n.1, p. 165-171, 2007.

KRETLOW, J.D.; YOUNG, S.; KLOUDA, L.; WONG, M.; MIKOS, A.G. Injectable Biomaterials for Regenerative Complex Craniofacial Tissues. **Advanced Materials**. v.21, 32-33), p. 3368-3393, 2009.

LALANI Z.; WONG M.; BREY E.M.; MIKOS A.G.; DUKE P.J.; MILLER M.J.; JOHNSTON C.; MONTUFAR-SOLIS D. Spacial and Temporal Localization of FGF-2 and VEGF in Healing Tooth Extraction Sockets in a Rabbit Model. **Journal of Oral Maxillofacial Surgery**, v.63, n.10, p.1500-1508, 2005.

LÉDA L.M. **Avaliação radiográfica da dentina de molares decíduos com lesões de cárie profundas submetidos ao tratamento restaurador atraumático: densidade óptica e interpretação clínica visual**. 63f. (Dissertação de Mestrado) Faculdade de Odontologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2010.

MILLIS D.L.; MARTINEZ S. A. Enxertos Ósseos. In: SLATTER D. **Manula de cirurgia de pequenos animais**. São Paulo: Manole, 2007, 3<sup>a</sup>. ed., v.2, p. 1875-1890.

MIURA M.; GRONTHOS S.; ZHAO M.; LU B; FISHER L.W.; ROBEY P.G.; SHI S. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **Cell Biology**. v.100, n.10, p. 5807-5812, 2003.

MORI H.; MANABE M.; KURACHI Y. & NAGUMO M. Osseointegration of dental implants in rabbit bone with low mineral density. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 55, n. 4, p. 351-361, 1997.

MORSCZECK C.; SCHMALZ G.; REICHERT T.E.; VÖLLNER F.; GALLER K. & DRIEMEL O. Somatic stem cells for regenerative dentistry. **Clin Oral Invest**, v.12, p.113-118, 2008.

NAKAGE A.P.M. & SANTANA A.E. Células-tronco hematopoiéticas em cães. **Ciência Rural**, v. 36, n. 1, p. 325-329, 2006.

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. **Journal of Endodontics**, v.35, n.11, p.1536-1542, 2009.

NAMPO T.; WATAHIKI J.; ENOMOTO A.; TAGUCHI T.; ONO M.; NAKANO H.; YAMAMOTO G.; IRIE T.; TACHIKAWA T.; MAKI K. A New Method for Alveolar Bone Repair Using Extracted Teeth for the Graft Material. **Journal of Periodontology**, v.81, n.9, p.1264-1272, 2010.

NARDI N.B.; MEIRELLES L.S. Mesenchymal Stem Cells: Isolation, In Vitro Expansion and Characterization. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 174, p.249-282, 2006.

NEWMAN M.G.; TAKEI H.H.; CARRANZA F.A. **Periodontia Clínica**, 9a. edição, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2004, 899 p.

OAKES D.A.; LEE C.C.; LIEBERMAN J.R. An evaluation of human demineralized bone matrices in a rat femoral defect model. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v.413, p. 281-290, 2003.

OHAZAMA A.; MODINO S.A.; MILETICH I. & SHARPE P.T. Stem-cell-based tissue engineering of murine teeth. **Journal of Dental Research**, v.7, n.83, p. 518-522, 2004.



OKAMOTO O.K. & SANTOS A.H. Perspectivas em terapia células: células-tronco. **Einstein** v.2, n. 4, p. 355-358, 2004.

OLIVEIRA R.B.O.; SILVEIRA R.L.; MACHADO R.A. Uso do enxerto desmineralizado homólogo em alvéolo pós-extração: Relato de casos. **Revista de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial**, v. 5, n.4, p. 31-36, 2005.

PINHO M.S.L. Pesquisa em Biologia Molecular: Como fazer? **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v.26, n.3, p.331-336, 2006.

RASKIN R. Medula Óssea. In: SLATTER D. **Manula de cirurgia de pequenos animais**. São Paulo: Manole, 2007, 3<sup>a</sup>. ed., v.2, p.1038-1045.

RIZZO D.; DEL CARLO R.J.; SILVA A.S.A. Matriz óssea homóloga desmineralizada associada à medula óssea autógena fresca na artrodese vertebral dorsolateral lombar em coelhos. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Belo horizonte, v. 57, n. 2, p.163-170, 2005.

RODEN JR R.D. Principles of bone grafting. **Oral Maxillofacial Surgery Clinics of North America**, v.22, n.3, p.295-300, 2010.

SÁNDOR G. K. B. & SUURONE R. Combining Adipose-Derived Stem Cells, Resorbable Scaffolds and Growth Factors: An Overview of Tissue Engineering. **Journal of Canadian Dental Association**, v.74, n. 2, p.167-170, 2008.

SCHMITD L.B. **Avaliação da reabsorção óssea periodontal por meio de valor de pixel e comparação com análise histopatológica**. 110f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, Bauru, 2005.

SEONG J.M.; KIM B.C; PARK J.H.; KWON I.K.; MANTALARIS A.; HWANG Y.S. Stem cells in bone tissue engineering. **Biomedical Materials**. v.6, n.5, p. 2010.

SIMSEK S.B.; KELES G.C.; BARIS S.; CETINKAYA B.O. Comparison of mesenchymal stem cells and autogenous cortical bone graft in treatment of class II furcation defect in dogs. **Clinical Oral Investigation**, Published online: 18 de novembro, 2010. DOI 10.1007/s00784-010-0486-7.

SLACK J.M. Stem cell in epithelial tissue. **Science**, Washington, v.287, n. 5457, p. 1431-1433, 2000.

TORRES F.C. **Panículo Adiposo Interescapular de Coelho da espécie *Oryctolagus cuniculus* como Fonte de Células-tronco**. 2009. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 107f. 2009.

WIGGS R.B. & LOBPRISE H.B. Oral and Dental Disease in Large Animals. In: \_\_. **Veterinary dentistry – principles & practice**. Philadelphia: Lippincott – Raven, 1997, p.559-579.

ZAGO M.A.; COVAS D.T. **Células-tronco – A fronteira da Medicina**. São Paulo: Atheneu, 2006, 245p.

ZUK P.A.; ZHU M.; ASHJIAN P.; UGARTE D.A.D.; HUANG J.I.; MIZUNO H.; ALFONSO Z.C.; FRASER J.K.; BENHAIM P.; HEDRICK M.H. Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. **Molecular Biology of the Cell** v. 13, n.12, p. 4279–4295, 2002.

**Anatomia dentária coelho**. Disponível em: <Fonte: <http://www.lavocedeiconigli.it/malattie/patologiedenti.htm>> Acesso em: 15 jan. 2011.

**Bula Matrigel®**. Disponível em: <[http://www.bdbiosciences.com/external\\_files/dl/doc/manuals/live/web\\_enabled/354248\\_Guidelines.pdf](http://www.bdbiosciences.com/external_files/dl/doc/manuals/live/web_enabled/354248_Guidelines.pdf)> Acesso em: 03 jan. 2011.