

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**  
**MESTRADO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA**  
**ODONTOPEDIATRIA**

**DISSERTAÇÃO**

**Regeneração óssea, em calota craniana de ratos, com a utilização de matrizes de nanofibras poliméricas semeadas com células-tronco provenientes de tecido pulpar de dentes decíduos.**

**GERSON ARISOLY XAVIER ACASIGUA**

**Porto Alegre, 2011.**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**  
**MESTRADO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA – ODONTOPEDIATRIA**  
**Linha de Pesquisa**  
**Biomateriais e Técnicas Terapêuticas em Odontologia**

**DISSERTAÇÃO**

**Regeneração óssea, em calota craniana de ratos, com a utilização de matrizes de nanofibras poliméricas semeadas com células-tronco provenientes de tecido pulpar de dentes decíduos.**

**GERSON ARISOLY XAVIER ACASIGUA**

**Orientação:**

**Profa. Dra. Anna Christina Medeiros Fossati**

**Co-orientação:**

**Profa. Dra. Patricia Pranke**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Nível Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como pré requisito final para a obtenção do título de Mestre em Clínica Odontológica – Odontopediatria.**

**Porto Alegre, 2011.**

## **Agradecimentos**

Aos meus pais, Elen e Javier, ao meu padrasto, Sebastião, e meus irmãos  
Emerson, Ana Carla, Maria Luísa e Vítor Emanuel,

Obrigado pelo incentivo, pelo companheirismo, por todo o amor, por todo o  
tempo investido em minha educação e acima de tudo pelo exemplo positivo  
que vocês foram e continuam sendo em minha vida.

À Profa. Dra. Anna Christina Medeiros Fossati,

Obrigado pelo tempo dedicado à minha orientação durante a elaboração  
desta dissertação, pelo modelo singular de orientadora e por todo crescimento  
científico e maturidade que me fez adquirir durante as fases de graduação e  
pós-graduação.

À Profa. Dra. Patricia Pranke,

Obrigado pelo crédito dado a mim, inclusive em meus momentos de  
desânimo. Pela dedicação e incentivo durante o mestrado, abrindo muitas  
portas para meu crescimento científico.

Ao Prof. Dr. Fernando Borba de Araujo,

Obrigado por aprimorar o meu senso de organização, respeito e  
dedicação para com os pacientes. Além de proporcionar conhecimentos  
imprescindíveis para a excelência clínica ao me receber e permitir o meu  
convívio na Odontopediatria da UFRGS.

À Mestre Lisiane Bernardi,

Obrigado pelo coleguismo, conselhos e paciência. Por todos os ensinamentos e pelas muitas horas dedicadas a execução de nossos experimentos. Com certeza absoluta o trabalho não teria sido realizado sem a sua ajuda.

Ao Prof. Dr. Manoel Sant'Ana Filho,

Obrigado pela orientação e ensinamentos que foram fundamentais para a metodologia empregada neste estudo. Pela confiança em dispor o laboratório de Histopatologia possibilitando a execução deste trabalho.

À Bióloga Isabel Lauxen,

Obrigado por toda atenção, paciência e delicadeza com a qual trata a todas as pessoas. Também pelo valioso tempo dedicado a confecção das lâminas histológicas deste estudo.

Ao Prof. Dr. Marcelo Lamers,

Obrigado pelos ensinamentos acerca da biologia celular e pelo aceite de engrandecer este trabalho com suas sugestões e conclusões como membro da banca avaliadora.

Ao Prof. Dr. Luciano Casagrande,

Obrigado pelo companheirismo nos momentos de descontração e futebol. Também pelos ensinamentos acerca da Odontoediatria e principalmente por aceitar o convite para compor a banca avaliadora.

Ao Prof. Dr. Vinícius Coelho Carrard,

Obrigado pelo aceite e por engrandecer este trabalho com suas sugestões e conclusões como membro da banca avaliadora.

À Profa. Dra. Nance Beyer Nardi,

Pela disposição em aceitar fazer parte da banca avaliadora e, como pesquisadora exemplar para o meio científico, engrandecer o trabalho com suas sugestões e conclusões.

Aos integrantes da Odontopediatria/ UFRGS,

Muito obrigado por todo apoio durante o mestrado.

A todos os integrantes do Laboratório de Hematologia e Células-tronco da Faculdade de Farmácia/ UFRGS,

Muito obrigado pelas repetidas explicações e toda paciência ao me ensinar os diferentes POPs do laboratório. Obrigado pelos momentos de descontração e lazer que passamos juntos.

Ao Instituto de Pesquisa com Células-tronco,

Por fomentar e permitir a realização deste trabalho.

A CAPES,

Pela bolsa de estudos durante o mestrado.

## Sumário

<b>Lista de Abreviaturas .....</b>	<b>07</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>09</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>11</b>
<b>Antecedentes e Justificativas .....</b>	<b>12</b>
<b>Objetivos .....</b>	<b>24</b>
<b>Artigo 1 .....</b>	<b>25</b>
<b>Artigo 2 .....</b>	<b>46</b>
<b>Considerações Finais .....</b>	<b>75</b>
<b>Perspectivas .....</b>	<b>77</b>
<b>Referências Bibliográficas.....</b>	<b>78</b>
<b>Anexo .....</b>	<b>95</b>

## Lista de Abreviaturas

<	menor
>	maior
$\leq$	menor ou igual
$\geq$	maior ou igual
%	por cento
°C	graus Celsius
$\mu\text{g/mL}$	micrograma por mililitro
$\mu\text{L}$	microlitro
$\mu\text{M}$	micromolar
BMP-2	<i>bone morphogenetic protein 2</i>
BMSC	<i>bone marrow stem cell</i>
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CT	célula-tronco
CTA	células-tronco adultas
CTM	células-tronco mesenquimais
DMEM	meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DP	desvio padrão
DPSC	<i>dental pulp stem cell</i>
Fig	figura
$\text{h}^{-1}$	por hora

HE	hematoxilina e eosina
kV	quilo volt
M	molar
M/V	massa/volume
MEC	matriz extracelular
mg/mL	miligrama por mililitro
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	minuto
mL	mililitro
mm	milímetros
mM	milimolar
MW	<i>molecular weight</i>
MTT	<i>(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>
N	número de amostra
nM	nanomolar
P5	quinta passagem
P7	sétima passagem
PLGA	ácido poli (lático-co-glicólico)
SCDT	<i>stem cell from deciduos tooth</i>
SFB	soro fetal bovino
SHED	<i>stem cells from human exfoliated deciduos teeth</i>
TA	temperatura ambiente
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul



## Resumo

As perdas ósseas representam um desafio à cirurgia reparadora, onde a utilização de diferentes fontes de enxertos ósseos com limitações físicas, químicas e biológicas é frequente. Atualmente, a bioengenharia alia os conhecimentos de diferentes áreas para o estudo de novas formas de produção de tecidos, inclusive para uso em cirurgias reparadoras. O objetivo deste estudo foi associar a nanotecnologia e as células-tronco, para estudar a neoformação óssea na região de defeitos ósseos criados em calota craniana de ratos. Dois estudos foram conduzidos. No primeiro, confeccionaram-se matrizes de nanofibras (*scaffolds*) a partir do ácido poli (lático-co-glicólico) (PLGA) pela técnica de *electrospinning*, as quais apresentaram propriedades morfológicas adequadas para seu emprego no estudo. Após, cinco amostras de *Stem Cell from Deciduous Tooth* (SCDT) de humanos, em processo de rizólise, foram obtidas e cultivadas até atingirem entre 5ª e 7ª passagem, momento no qual foram empregadas no estudo. As SCDT foram semeadas em placas de cultura (grupo controle) e nos *scaffolds* (grupo teste) para os ensaios de adesão, viabilidade e proliferação celular. Observou-se que a capacidade das SCDT em realizar adesão no grupo teste foi semelhante à sua capacidade de adesão no grupo controle, sem diferença estatística entre os grupos. Verificou-se que as células mantiveram-se viáveis durante todos os dias do experimento (21 dias) nos grupos teste e controle, não apresentando diferença estatística entre os grupos. Em ambos os grupos ocorreu o aumento gradativo da viabilidade celular a partir do início do experimento até o 14º dia de cultura, seguido pela sua diminuição quando analisada no 21º dia. O segundo trabalho objetivou avaliar a capacidade da associação *scaffolds*/SCDT em promover neoformação óssea em ratos. Para isso utilizou-se 15 ratos Wistar, nos quais foram confeccionados defeitos críticos de 8,0 mm de diâmetro nas calotas cranianas. Os animais foram divididos em três grupos experimentais com 5 animais cada: grupo 1 – implante no defeito ósseo de *scaffolds*; grupo 2 – implante no defeito ósseo de *scaffolds* semeados com SCDT; grupo 3 – implante no defeito ósseo de *scaffolds* semeados com SCDT que foram mantidas durante 13 dias em meio de diferenciação osteogênica prévio a sua implantação. Decorrido 60 dias pós operatório, foi realizada a análise

histométrica, a qual avaliou a quantidade de tecido ósseo formado no interior do defeito produzido. Observou-se que a associação *scaffold*/SCDT mantida em meio osteogênico previamente à implantação apresentou uma maior neoformação óssea em relação aos demais grupos, sendo esta diferença estatisticamente significativa. Em vista dos resultados obtidos, conclui-se que, obedecidos os parâmetros utilizados, os *scaffolds* de PLGA apresentam resultados favoráveis em relação à interação com as SCDT. Ainda, a utilização de meio de diferenciação osteogênico associado ao *scaffold*/SCDT, prévio a implantação, mostrou que essa associação possui a capacidade de promover neoformação óssea, sendo a sua utilização adequada para o uso na bioengenharia.

Palavras-chave: bioengenharia, células-tronco, nanotecnologia, dentes decíduos.

## **Abstract**

Bone loss is a challenge to reconstructive surgery, where the use of different sources of bone grafts with physical, chemical and biological limitations is common. Currently, bioengineering combines knowledge from different fields to study new forms of tissue production, including for use in reconstructive surgery. The aim of this study was to associate nanotechnology and stem cells in relation to the study of bone formation in the area of bone defects created in rat calvaria. Two studies were conducted. Firstly, nanofiber matrices (scaffolds) were made from acid poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) by the electrospinning technique, which showed morphological properties suitable for use in the study. Following this, five samples from Deciduous Tooth Stem Cells (SCDT) from human, in the process of rhizolysis, were obtained and grown until they reached between the 5th and 7th passage, at which point they were used in the study. The SCDT were seeded onto culture plates (control group) and scaffolds (test group) for adhesion assays, cell viability and proliferation. It was observed that the ability of SCDT to adhere in the test group was similar to their ability to adhere in the control group. There was no statistical difference between the groups. It was found that the cells remained viable for every day of the experiment (21 days) in the test and control groups. There was no statistical difference between the groups. In both groups there was a gradual increase in cell viability from the start of the experiment until the 14th day of culture, followed by their decrease when analyzed on day 21. The second study evaluated the ability of the association scaffolds / SCDT to promote new bone formation in rats. For this, 15 Wistar rats were used, in which were induced critical defects of 8.0 mm diameter in the skulls. The animals were divided into three groups of five: group 1 - bone defect of the implant scaffolds, group 2 - implant in the bone defect of scaffolds seeded with SCDT, group 3 - implant in the bone defect of scaffolds that were seeded with SCDT and kept for 13 days in osteogenic differentiation medium prior to implantation. After 60 days postoperatively, histometric analysis was performed, which assessed the amount of bone formed within the imposed defect. It was observed that the scaffold association/SCDT maintained in osteogenic medium prior to implantation showed greater bone formation than the other groups. This

difference was statistically significant. In the light of these results, it can be concluded that, in compliance with the parameters used, the PLGA scaffolds have favorable results in relation to the interaction with the SCDT. Furthermore the use of osteogenic differentiation associated with scaffold / SCDT, prior to implantation showed that this association has the ability to promote bone formation and its use is therefore appropriate for use in bioengineering.

Keywords: bioengineering, stem cells, nanotechnology, deciduous teeth.

## **Antecedentes e Justificativas**

As perdas ósseas causadas por malformações congênitas, ressecção de tumores, infecções ou traumas representam um desafio na cirurgia reparadora da face (TAKAGI; URIST, 1982; SHANG *et al.*, 2001; HENG *et al.*, 2004; MEIJER *et al.*, 2007; DE MENDONÇA COSTA *et al.*, 2008; REICHERT *et al.*, 2009). Nesses procedimentos, a utilização de enxertos ósseos é frequente (SHANG *et al.*, 2001), sendo que o enxerto selecionado deve possuir características adequadas para seu emprego. Os requisitos para um material de substituição óssea ideal são: estimular a regeneração e consolidação óssea, proporcionar resistência fisiológica, permanecer observável (ter contraste radiográfico), ser obtido prontamente, ser fácil de usar, não causar reação inflamatória intensa em tecidos adjacentes, não estimular a encapsulação pelo tecido conjuntivo, não desencadear transformação maligna, não produzir subprodutos tóxicos, não ter propriedades galvânicas ou eletrolíticas e não proporcionar mecanismos facilitadores de infecções (SAILER; PAJAROLA, 2000). Dessa maneira, ao utilizar-se um enxerto ósseo, busca-se a aproximação à morfofisiologia do tecido ósseo original.

### **1. Tecido Ósseo**

O osso é um tecido conjuntivo especializado mineralizado, sendo composto por 33% de matriz orgânica, dos quais 28% é de colágeno tipo I e 5% é de proteínas não colagenosas, tais como osteonectina, osteocalcina, proteína morfogenética óssea, proteoglicanas ósseas e sialoproteína óssea. A matriz orgânica é permeada por cristais de hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ), que constituem 67% do tecido ósseo. Pelo alto conteúdo mineral em sua composição, o tecido ósseo possui certa resistência a tensões e compressões, servindo como suporte para as partes moles e protegendo órgãos vitais. Como componentes celulares constituintes do tecido ósseo há os osteoblastos, células que sintetizam colágeno e proteínas não colagenosas, fundamentais para formação do tecido ósseo. Essas células formam uma camada celular sobre a superfície óssea em formação constituindo um osso membranoso que controla o fluxo de entrada e saída de íons no osso. À medida que os

osteoblastos secretam a matriz óssea, alguns deles ficam aprisionados em lacunas do tecido recém formado. Com o aprisionamento, gradativamente diminuem sua maquinaria formadora de matriz, tornando-se reduzidos em tamanho, passando a se chamar osteócitos. Os osteócitos encontram-se no interior da matriz óssea e mantêm sua comunicação com outros osteócitos e osteoblastos de revestimento na superfície óssea. Assim, formam um complexo osteoblasto-osteócito necessário para manutenção e vitalidade da matriz óssea. Uma terceira variedade celular são os osteoclastos, que são células móveis, gigantes, extensamente ramificadas e com 6 ou mais núcleos. Por sua função de reabsorção óssea, são encontrados acoplados à superfície óssea, ocupando escavações rasas criadas pela sua própria atividade, denominadas Lacunas de Howship. Junto com os osteoblastos e osteócitos, essas três variedades celulares são responsáveis pelo processo de remodelamento ósseo, o qual passa por períodos de formação e reabsorção óssea (KATCHBURIAN; ARANA, 1999; TEN CATE, 2001; FIGUEIREDO; BREW, 2003; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008)

### **1.1. Regeneração do Tecido Ósseo**

Em locais de fratura óssea, ocorre hemorragia, pela lesão de vasos sanguíneos, destruição de matriz e morte de células ósseas. Para que o reparo ósseo inicie, o coágulo sanguíneo e os restos celulares e da matriz devem ser removidos pelos macrófagos. O perióstio e o endóstio próximos à área afetada respondem com uma intensa proliferação, formando um tecido muito rico em células osteoprogenitoras. Nas extremidades ósseas afetadas, surge um tecido ósseo imaturo, a partir de onde iniciará o surgimento do “calo ósseo”. O calo ósseo é constituído por tecido ósseo imaturo que tende a unir as extremidades de tecido ósseo lesadas, ocorrendo posteriormente a completa maturação do tecido neoformado (TEN CATE, 2001; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

### **1.2. Enxertos Ósseos**

Na busca por fontes de tecido ósseo, pode-se recorrer a áreas doadoras como regiões da maxila e mandíbula, costelas ou crista íliaca (FERREIRA, 1997; LEMPERLE *et al.*, 1998; SILVA *et al.*, 2000; SWAN; GOODARCE, 2006). No entanto, a disponibilidade de áreas doadoras de osso pode se tornar restrita em alguns pacientes (LUCARELLI *et al.*, 2004; BRODIE *et al.*, 2005). Existe como alternativa à busca de regeneração óssea, a utilização dos bancos de ossos, que por sua vez são tecidos provenientes de pacientes com morbidade inerente (LEONG *et al.*, 2006; DE MENDONÇA COSTA *et al.*, 2008; ZHENG *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2010). Há os xenoenxertos bovinos que, apesar de corretamente comercializados como materiais inertes e livres de antígenos, apresentam respostas insatisfatórias (FUKUTA *et al.*, 1992). Os biomateriais de hidroxiapatita são biocompatíveis, apresentam, contudo, um desempenho biofísico inadequado em termos de remodelação, podendo haver migração, deiscência, ulceração e extrusão. A ossificação com esses materiais costuma ocorrer nos limites das zonas receptoras, sem ocorrência nas áreas mais internas do enxerto (FERREIRA, 1997). O osso homólogo não é um tecido privilegiado imunologicamente, como já foi pensado. Ao contrário, tem se demonstrado a ocorrência de resposta imunológica mediada por células e reação antígeno-anticorpo ao enxerto (HARDIN *et al.*, 1994; DE MENDONÇA COSTA *et al.*, 2008). A técnica de liofilização para o tecido ósseo é utilizada há mais de 50 anos, tornando-se um dos métodos mais satisfatórios na preservação óssea (ANGERMANN; JEPSEN, 1991). Essa técnica parece não alterar de forma adversa a capacidade osteoindutiva do transplante, porém pode alterar significativamente a biomecânica desses enxertos, quando utilizados como implantes estruturais (CONRAD *et al.*, 1993; MACEDO *et al.*, 1999; PERRY, 1999).

Diferentes estudos têm sido realizados no intuito de procurar materiais de substituição óssea adequados. No entanto, além de limitações de técnica, as limitações físicas, químicas e biológicas podem ser fatores limitantes para o emprego do enxerto. Assim, o crescente interesse no estudo da bioengenharia é justificado, sendo esta uma ciência que estuda uma nova alternativa para a criação e reposição de tecidos (BRUDER *et al.*, 1998; SHANG *et al.*, 2001; GROGER *et al.*, 2003; SCHANTZ *et al.*, 2003; XIAO *et al.*, 2003; ABUKAWA *et*

*al.*, 2004; DE KOK *et al.*, 2005; ITO *et al.*, 2005; OHYA *et al.*, 2005; PIERDOMENICO *et al.*, 2005; REN *et al.*, 2005; WU *et al.*, 2006; XI *et al.*, 2006; YOON *et al.*, 2007; YUAN *et al.*, 2007; DE MENDONÇA COSTA *et al.*, 2008; KERKIS *et al.*, 2008; BEN-DAVID *et al.*, 2009; MONTEIRO *et al.*, 2009; NIEMEYER *et al.*, 2010; LIPPENS *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2010).

## **2. Bioengenharia**

Atualmente, uma área de pesquisa biomédica, denominada engenharia de tecidos, ou bioengenharia, estuda novas formas de produção de tecidos, inclusive para uso em cirurgias reparadoras (CHANG *et al.*, 2003; ZHANG *et al.*, 2010). A Engenharia de Tecidos é multidisciplinar e compreende todos os métodos e esforços para projetar, produzir, modificar, expandir e manter tecidos vivos específicos em locais específicos (GOESSLER; HORMANN; RIEDEL, 2005). Essa área de estudo compila conhecimentos de biologia, medicina e engenharia de materiais, com o objetivo de propor técnicas alternativas aos tratamentos clínicos para reparação tecidual. O uso de métodos de bioengenharia pode ser um caminho apropriado na geração ou regeneração tecidual *in vitro* e *in vivo* para tratamentos de lesões.

### **2.1 Matrizes Biodegradáveis – Scaffolds**

Diversas técnicas e diferentes variedades de biomateriais vêm sendo estudados e utilizados na prática da engenharia de tecidos (SCHLIEPHAKE *et al.*, 2001; SHANG *et al.*, 2001; XIAO *et al.*, 2003; YAMADA *et al.*, 2004; EDWARDS *et al.*, 2005; MAREI *et al.*, 2005; PIERDOMENICO *et al.*, 2005; YOON *et al.*, 2007; DE MENDONÇA E COSTA *et al.*, 2008; KERKIS *et al.*, 2008; BEN-DAVID *et al.*, 2009; MONTEIRO *et al.*, 2009; LIPPENS *et al.*, 2010; NIEMEYER *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2010). Entre as técnicas, destaca-se a utilização de estruturas, ou moldes, que simulam uma matriz extracelular (MEC) em sua morfologia e, quando associadas à terapia celular, funcionam como arcabouço para a adesão e proliferação das células (MIKOS; TEMENOFF, 2000; LI *et al.*, 2002; HE *et al.*, 2005; AGARWAL; WENDORFF;



GREINER, 2009). Uma das formas de produzir esses moldes é por meio da nanotecnologia, onde essas matrizes são chamadas *scaffolds*. Esse biomaterial pode ser produzido a partir de diferentes materiais orgânicos, tais como colágeno e ácido hialurônico, ou compostos químicos, sendo estruturas biocompatíveis que se degradam quando introduzidos no organismo animal. Os *scaffolds* auxiliam o processo de regeneração e/ou construção de tecidos, guiando as células, propiciando sua adesão e proliferação. Ao mesmo tempo em que auxiliam na reorganização celular, essas estruturas se degradam dando lugar aos tecidos que são formados (BARBANTI *et al.*, 2005; BOUDRIOT *et al.*, 2005).

Os *scaffolds* podem ser obtidos pelo método de *electrospinning*, o qual apresenta diversas vantagens. Por esse método, as nanofibras formadas mimetizam a estrutura da MEC, em termos de variabilidade de topologia, textura e diâmetro das fibras, e, de modo limitado, também em termos de propriedades mecânicas (SHIN *et al.*, 2001). O método de *electrospinning* funciona pelo princípio eletrostático, onde são processados polímeros derretidos ou soluções de polímeros de vários solventes. Os polímeros são posicionados entre eletrodos que durante o processo passam a ter uma alta tensão. A solução forma um fio que, devido ao campo de alta tensão, colapsa e forma um jato acelerado em direção ao eletrodo oposto. Durante o aceleração o solvente irá evaporar e o que restará será uma fibra de dimensões pequenas, até nanométricas, que durante um processo contínuo constituirá uma matriz de nanofibras. Dentre os polímeros investigados para produção de matrizes pela técnica de *electrospinning*, os poliésteres alifáticos têm sido utilizados por serem biodegradáveis, apresentarem adequada biocompatibilidade e ainda permitirem o controle do perfil de degradação (NAIR; LAURENCIN, 2007). Como exemplo, temos o ácido poli (lático-co-glicólico) (PLGA), que possui uma cinética versátil de degradação, não toxicidade e biocompatibilidade (YOON *et al.*, 2007).

Na engenharia de tecidos, o uso de matrizes de nanofibras associado a células-tronco é uma ferramenta promissora que pode ser utilizada como suporte para o desenvolvimento de diferentes tecidos (DUALIBI *et al.*, 2004;

BOUDRIOT *et al.*, 2005). Com isso a engenharia tecidual está se tornando uma realidade clínica.

### **3. Células-tronco**

As células-tronco são um tipo celular não-especializado, que podem fazer auto-renovação, bem como manter-se por um longo período de tempo com o potencial de derivar em uma linhagem celular ou tecidual com funções especializadas (CONRAD; HUSS, 2005). As células-tronco tecido específicas, ou adultas, têm sido consideradas como uma alternativa ao uso das células-tronco embrionárias, devido a sua disponibilidade, facilidade de obtenção e cultivo. Assim, o estudo de populações de células-tronco adultas, com plasticidade similar às células-tronco embrionárias, tem sido alvo de inúmeros pesquisadores (GRONTHOS *et al.*, 2000; CATERSON *et al.*, 2001; YAMAGUCHI *et al.*, 2001; HOU *et al.*, 2003; MIURA *et al.*, 2003; ROMANOV *et al.*, 2003; SEO *et al.*, 2004; JU *et al.*, 2005; MORSZECK *et al.*, 2005; HU *et al.*, 2006; KERKIS *et al.*, 2006; PRANKE *et al.*, 2006; YU *et al.*, 2007; SECCO *et al.*, 2008; BERNARDI *et al.*, 2011). Nos últimos anos, o conceito do uso potencial das células-tronco pós natais, introduziu novas perspectivas na terapia celular para o reparo e regeneração de tecidos e órgãos (JONES; TRAINOR, 2004; SYLVESTER; LONGAKER, 2004; PASSIER; MUMMERY, 2005).

#### **3.1. Nichos de Células-tronco Adultas**

As células-tronco adultas (CTA) residem em todos os tecidos do organismo, onde mantêm a homeostase e respondem aos estímulos nocivos (HALL; WATT, 1999; FORBES *et al.*, 2002; WALKER; PATEL; STAPPENBECK, 2009). O microambiente específico em que as CTA residem, controlando a sua auto-renovação e produção de progenitores, é definido como nicho (SPRADLING; DRUMMOND-BARBOSA; KAI, 2001; WALKER; PATEL; STAPPENBECK, 2009). O ser humano possui diferentes nichos de CTA, cuja plasticidade e capacidade regenerativa têm sido avaliadas. Entre as

populações de CTA estudadas há as células-tronco mesenquimais (CTM), as quais foram encontradas em diversos tecidos humanos. As principais fontes de CTM usadas na clínica são as de medula óssea (CATERSON *et al.*, 2001; HOU *et al.*, 2003; MIURA *et al.*, 2003; ROMANOV *et al.*, 2003; JU *et al.*, 2005), as de sangue de cordão umbilical (YAMAGUCHI *et al.*, 2001; PRANKE *et al.*, 2006) e as do próprio cordão umbilical (SECCO *et al.*, 2008). No entanto, outras fontes celulares têm sido investigadas, como populações de células-tronco identificadas na polpa de dentes permanentes (GRONTHOS *et al.*, 2000) e decíduos (MIURA *et al.*, 2003; KERKIS *et al.*, 2006; YU *et al.*, 2007; BERNARDI *et al.*, 2011), no ligamento periodontal (SEO *et al.*, 2004) e no fóliculo dentário de terceiros molares (MORSZECK *et al.*, 2005).

### **3.2. Células-tronco de Polpa de Dentes Decíduos**

De particular interesse, citamos as células-tronco provenientes de dentes decíduos em processo de rizólise. Em estudo de Bernardi e colaboradores (2011), os pesquisadores isolaram uma população de células-tronco a partir do tecido pulpar de dentes decíduos humanos exfoliados, e procederam a sua cultura *in vitro*. Miura e colaboradores em 2003 atribuíram a estas células maior potencialidade significativa de proliferação e clonogenicidade, quando comparadas às células-tronco de polpa de dentes permanentes e às células-tronco da medula óssea. Como essas células podem ser facilmente colhidas e potencialmente cultivadas *ex vivo*, esse novo conceito abre amplas possibilidades de seu uso em medicina regenerativa, nos sistemas autólogos e, portanto, não apresentando problemas de rejeição imunológica (PIERDOMENICO *et al.*, 2005; DE MENDONÇA E COSTA *et al.*, 2008; KERKIS *et al.*, 2008; MONTEIRO *et al.*, 2009).

### **4. Defeitos Críticos**

Defeitos ósseos, cirurgicamente criados, são utilizados com o intuito de avaliar o processo de reparo ósseo (SCHMITZ; HOLLINGER, 1986; FERREIRA *et al.*, 2004; PURICELLI *et al.*, 2006), avaliar materiais que possam substituir

da melhor forma o tecido lesado (POU, 2003; DEL CARLO *et al.*, 2003; GISEP *et al.*, 2004; TAÑAG; YANO; HOSOKAWA, 2004; CAREY *et al.*, 2005; SINIKOVIĆ *et al.*, 2007), bem como avaliar mecanismos capazes de acelerar o reparo ósseo e a consolidação de fraturas (BARKER; LUNT, 1983; GIORDANO *et al.*, 2001; PRYOR *et al.*, 2005). Contudo, para que essas avaliações sejam possíveis, é frequente a utilização de modelos experimentais em animais, visando avaliar novas técnicas, a eficácia terapêutica ou consequências fisiopatológicas decorrentes dos procedimentos (FAGUNDES; TAHA, 2004). Estudos em calotas cranianas de ratos são exemplos de defeitos ósseos induzidos que permitem análises morfológicas, histométricas e bioquímicas (SCHMITZ; HOLLINGER, 1986; VIEIRA, 1999; BRANDÃO *et al.*, 2002; HADDAD *et al.*, 2006; MARZOUK *et al.*, 2007; DA SILVA *et al.*, 2007; MAI *et al.*, 2008). Para aferição de regeneração óssea há uma grande variedade de modelos animais disponíveis, onde os estudos têm sido realizados com o conceito de “defeito crítico mínimo” (SCHMITZ; HOLLINGER, 1986; FERREIRA *et al.*, 2004; HADDAD *et al.*, 2006; RIJNEN *et al.*, 2007). Em tecido ósseo, “defeito crítico mínimo” ou também chamado “defeito de tamanho mínimo” é um defeito criado por uma ostectomia (remoção de tecido ósseo). Quando criado um defeito crítico, durante toda a vida do animal, não ocorre a reparação óssea completa e espontânea da região, apenas a formação de um tecido conjuntivo fibroso (SCHMITZ; HOLLINGER, 1986). Somente nessa situação o real potencial osteogênico de um material implantado como substituto ósseo ou estimulador de reparação poderá ser avaliado. O padrão e o tempo de reparo variam de acordo com a espécie do animal utilizado e de acordo com a região anatômica deste defeito em uma mesma espécie animal (SCHMITZ; HOLLINGER, 1986). Podem existir portanto, diferentes tamanhos e diferentes localizações anatômicas para o defeito ser considerado crítico (GOSAIN *et al.*, 2000; PRADO *et al.*, 2006; MOKBEL *et al.*, 2008). Como exemplo dessa variedade de locais em diferentes modelos animais cita-se estudos em mandíbulas (SOCCOL *et al.*, 2006), fêmures (YAN; TOMITA; IKADA, 1998; VOGELIN *et al.*, 2005) e calotas cranianas (GOSAIN *et al.*, 2004; HADDAD *et al.*, 2006; DA SILVA *et al.*, 2007; MARZOUK *et al.*, 2007; YOON *et al.*, 2007; ASCHERMAN *et al.*, 2008). A região da calota craniana de ratos, de particular interesse do estudo, possui uma capacidade limitada de regeneração de um

defeito ósseo craniano devido ao suprimento inadequado de sangue e uma deficiência relativa na medula óssea da região (PROLO *et al.*, 1982).

A partir do conceito de defeito crítico, pode-se fazer uma adequada análise do potencial osteogênico do material implantado/enxertado (SCHMITZ; HOLLINGER, 1986; BOSCH *et al.*, 1998). No presente estudo, selecionou-se a região da calota craniana de ratos pela facilidade de manipulação do animal, adequado acesso ao tecido ósseo, devido à ausência de camadas musculares, e boas condições de estabilização do ferimento pós operatório. Além das características morfológicas e fisiológicas do rato, trata-se de um animal de fácil alojamento e alimentação, representando uma cobaia menos dispendiosa quando comparada a animais de grande porte (MOKBEL *et al.*, 2008).

## **5. Células-tronco em modelos animais**

Estudos envolvendo modelos animais de xenotransplantes, nos quais utilizam-se células de origem mesenquimal de uma espécie em outra, têm sido utilizado por pesquisadores (PIERDOMENICO *et al.*, 2005; YOON *et al.*, 2007; DE MENDONÇA E COSTA *et al.*, 2008; KERKIS *et al.*, 2008; BEN-DAVID *et al.*, 2009; MONTEIRO *et al.*, 2009; NIEMEYER *et al.*, 2010) não apresentando problemas em relação à resposta imunológica do hospedeiro. Os animais no presente estudo não foram imunossuprimidos, uma vez que a literatura justifica essa metodologia (PIERDOMENICO *et al.*, 2005; DE MENDONÇA E COSTA *et al.*, 2008; KERKIS *et al.*, 2008; MONTEIRO *et al.*, 2009). Pierdomenico e colaboradores (2005) ao avaliarem os efeitos da co-cultura de células-tronco provenientes de polpa dental com células T, verificaram que, apesar das últimas estarem sendo estimuladas a proliferar na presença de um fator específico, o evento não ocorria. Demonstrou-se a ocorrência de um potencial modulador na atividade proliferativa das células T, devido à presença das células pulpares. Os autores concluíram que esse achado poderia ser uma vantagem em relação à problemática da rejeição do enxerto pelo hospedeiro. A partir desse conhecimento, estudos foram realizados aplicando células-tronco de polpa de dentes decíduos humanos em animais, sem a realização de imunossupressão. Os animais não apresentaram reação imune aos enxertos

(DE MENDONÇA E COSTA *et al.*, 2008; KERKIS *et al.*, 2008; MONTEIRO *et al.*, 2009). O presente estudo seguiu a metodologia similar à literatura, a qual aplicou as mesmas células em matrizes de material não nanotecnológico, para a reconstrução de defeitos ósseos de calota craniana (DE MENDONÇA E COSTA *et al.*, 2008).

Pesquisas envolvendo células-tronco e matrizes biodegradáveis têm sido o foco de alguns pesquisadores, onde ensaios *in vitro* e *in vivo* reforçam e sustentam essa associação para utilização na bioengenharia (BRUDER *et al.*, 1998; SHANG *et al.*, 2001; GROGER *et al.*, 2003; SCHANTZ *et al.*, 2003; XIAO *et al.*, 2003; ABUKAWA *et al.*, 2004; DE KOK *et al.*, 2005; ITO *et al.*, 2005; OHYA *et al.*, 2005; REN *et al.*, 2005; WU *et al.*, 2006; YUAN *et al.*, 2007; BEN-DAVID *et al.*, 2010). Alguns desses estudos realizam a diferenciação celular prévia a aplicação *in vivo*, objetivando uma formação maior de tecido especializado (YOON *et al.*, 2007; PARK *et al.*, 2009; BEN-DAVID *et al.*, 2010; LIPPENS *et al.*, 2010; NIEMEYER *et al.*, 2010). O constante estudo acerca das propriedades biológicas das células-tronco, no sentido de esclarecer melhor o mecanismo de ação relacionado à diferenciação celular, bem como o tipo ideal a ser empregado em protocolos clínicos, é necessário. Dessa forma, diversos estudos devem ser feitos nas mais diversas áreas biológicas. No caso das reconstruções ósseas, é preciso compreender também a interação entre as células e as matrizes ósseas ou seus substitutos (YOSHIKAWA *et al.*, 2003; PASSIER *et al.*, 2005).

O presente estudo visa utilizar células-tronco provenientes de uma fonte de fácil acesso, a polpa dos dentes decíduos, associada a *scaffolds* biodegradáveis produzidos a partir de nanotecnologia. Com isso, objetiva-se restaurar as condições estruturais e funcionais dos tecidos desejados, associando duas ciências revolucionárias: - a nanotecnologia e a terapia com células-tronco.

### **Considerações Éticas**

Este trabalho foi realizado seguindo princípios do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) (Anexo 1) e foi aprovado pela Comissão de Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Comitê de Ética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Anexo 2). Os procedimentos cirúrgicos aqui descritos seguiram preceitos técnicos consagrados e amplamente divulgados (URIST *et al.*, 1984; RIPAMONTI *et al.*, 1992; TAKAGI; URIST, 1982; HOLLINGER; KLEINSCHMIDT, 1990).

## **Objetivos**

### **Objetivo Geral**

Analisar a capacidade de células-tronco de polpa de dentes decíduos, em processo de rizólise, semeadas em *scaffolds* biodegradáveis em promover a regeneração óssea em calota craniana de ratos.

### **Objetivos Específicos**

1 – Produzir *scaffolds* de nanofibras pela técnica de *electrospinning*.

2 – Caracterizar os *scaffolds* produzidos;

3 – Gerar informações acerca da adesão e viabilidade e proliferação de células-tronco semeadas nos *scaffolds*;

4 – Comparar a regeneração óssea obtida entre os grupos experimentais: Grupo I – Implante somente de *scaffolds* (controle); Grupo II – Implante de *scaffolds* semeados com SCDT; Grupo III – Implante de *scaffolds* semeados com SCDT mantidas previamente em meio de diferenciação osteogênico.



## **Artigo 1**

**A ser submetido ao periódico “Journal of Histochemistry & Cytochemistry”.**

**Análise da associação de *scaffolds* de ácido poli (lático-co-glicólico), produzidos pela técnica de *electrospinning*, com células-tronco provenientes de dentes decíduos humanos, em processo de rizólise, para utilização na bioengenharia.**

**Autores:**

**Gerson Arisoly Xavier Acasigua;**

**Lisiane Bernardi;**

**Daikelly Iglesias Braghirolli;**

**Patricia Pranke;**

**Anna Christina Medeiros Fossati.**

## Resumo

A engenharia de tecidos, ou medicina regenerativa, associa biomateriais e terapia celular, buscando-se alternativas à reposição e regeneração tecidual. Visando sua aplicação futura como fonte para reposição de tecidos, o objetivo deste estudo foi verificar a interação das Stem Cell from Deciduous Tooth (SCDT), em processo de rizólise, com *scaffolds* produzidos por nanotecnologia. Por meio da técnica de *electrospinning* foram fabricados *scaffolds* de ácido poli (lático-co-glicólico) (PLGA), os quais apresentaram características morfológicas adequadas para seu emprego no estudo. Cinco amostras de SCDTs foram obtidas e cultivadas até atingirem entre 5ª e 7ª passagem, momento no qual foram empregadas no estudo. As SCDT foram semeadas em placas de cultura (grupo controle) e nos *scaffolds* (grupo teste) para os ensaios de adesão, viabilidade e proliferação celular. Observou-se que a capacidade das SCDT em realizar adesão no grupo teste foi semelhante à sua capacidade de adesão no grupo controle, não havendo diferença estatística entre os grupos. Verificou-se que as células mantiveram-se viáveis durante todos os dias do experimento (21 dias) nos grupos teste e controle, não apresentando diferença estatística entre os grupos. Em ambos os grupos ocorreu o aumento gradativo do metabolismo celular a partir do início do experimento até o 14º dia de cultura, seguido por sua diminuição quando analisada ao 21º dia. Assim, a interação entre os *scaffolds* de PLGA e as SCDT mostrou-se adequada, sendo essa associação uma alternativa promissora para o emprego em medicina regenerativa.

Palavras-chave: bioengenharia, células-tronco, nanotecnologia, dentes decíduos.

## Introdução

Atualmente, uma área de pesquisa biomédica, denominada engenharia de tecidos, ou bioengenharia, associa conhecimentos de biologia, medicina e engenharia de materiais, estudando novas formas de produção de tecidos, inclusive para uso em cirurgias reparadoras (Chang *et al.* 2003; Zhang *et al.* 2010). A bioengenharia alia a utilização de biomateriais à terapia celular e a

fatores de sinalização, buscando alternativas à reposição e regeneração tecidual (Duailibi *et al.* 2004).

Entre os biomateriais utilizados na engenharia de tecidos, há a utilização de matrizes, ou *scaffolds*, que fisicamente simulam uma matriz extracelular e podem ser associados à terapia celular, funcionando como arcabouço para a adesão e proliferação das células (Mikos e Temenoff 2000; Li *et al.* 2002; He *et al.* 2005; Agarwal *et al.* 2009). Os *scaffolds* podem ser produzidos a partir de diferentes materiais orgânicos, tais como colágeno e ácido hialurônico, ou compostos químicos que são biocompatíveis e se tornam biodegradáveis quando introduzidos no organismo animal.

Entre os polímeros utilizados para a fabricação de *scaffolds*, há o copolímero PLGA, que é uma associação entre os polímeros de ácido lático e de ácido glicólico. Entre as propriedades do PLGA, observa-se uma cinética versátil de degradação, não toxicidade e biocompatibilidade (Yoon *et al.* 2007). Quando produzidos pela técnica de *electrospinning*, os *scaffolds* de PLGA podem apresentar elevada porosidade. Essa técnica permite a produção de uma estrutura altamente porosa, o que por sua vez é fundamental, pois fornece mais espaço estrutural para a acomodação celular e promove trocas mais eficientes de nutrientes e resíduos metabólicos entre o *scaffold* e o ambiente (Li *et al.* 2002). Esse polímero representa uma boa matéria prima para a produção de *scaffolds* pelo método de *electrospinning*, por meio do qual é possível produzir fibras em escalas nanométricas (Li *et al.* 2002; Huang *et al.* 2003; Venugopal e Ramakrishna 2005; Kumbar *et al.* 2006). A morfologia das nanofibras pode ser controlada por parâmetros ligados a solução (viscosidade, condutividade, peso molecular do polímero, ao processo de *electrospinning* (taxa de alimentação, distância da agulha ao coletor, diferença de voltagem) e a condições ambientais (temperatura e umidade) (Pham *et al.* 2006). Sabe-se que para que possam se desenvolver e diferenciar-se de maneira adequada, as células devem aderir e organizar-se em torno de fibras com diâmetros menores do que os seus (Laurencin *et al.* 1999). Além do mais, acredita-se que a expressão celular de marcadores fenotípicos não ocorre adequadamente se o diâmetro das fibras é equivalente ou maior que as dimensões das células (Xu *et al.* 2004; Murugan *et al.* 2006).

Um dos ramos importantes da bioengenharia é a terapia celular, por meio da utilização de células-tronco. As células-tronco são um tipo celular não especializado, que podem fazer auto-renovação e manter-se por um longo período de tempo com o potencial de se diferenciar em linhagens celulares com funções especializadas (Conrad e Huss 2005). O ser humano possui diferentes nichos de células-tronco adultas, entre as quais encontram-se as células-tronco da polpa de dentes decíduos (Miura *et al.* 2003; Kerkis *et al.* 2006; Yu *et al.* 2007; Bernardi *et al.* 2011; Taghipour *et al.* 2011). Essas células são provenientes de uma fonte de fácil acesso, representando um nicho de células-tronco com alto potencial para aplicação na bioengenharia.

O objetivo do presente estudo foi caracterizar os *scaffolds* produzidos pela técnica de *electrospinning* e utilizá-los como suporte para semear células-tronco provenientes de polpa de dentes decíduos, em processo de rizólise (SCDT). Com isso, analisou-se a interação das SCDT aos *scaffolds* de PLGA, gerando subsídios científicos para estudos *in vivo* desse biomaterial para a engenharia de tecidos.

## **Materiais e Métodos**

### **Preparo dos *scaffolds***

Os *scaffolds* foram preparados utilizando-se poli(D,L-ácido lático-co-ácido glicólico) (75:25) (PLGA) (P1941–Sigma Aldrich). O polímero foi dissolvido em 1,1,1,3,3,3 – hexafluoro-2-propanol (Sigma Aldrich) de modo que a concentração final da solução foi de 12% (m/v). A seguir, a solução foi mantida em agitador magnético durante 24 horas para completa homogeneização. A solução de PLGA 12% (m/v) foi colocada em uma seringa de 1 mL equipada com agulha de diâmetro interno de 0,8 mm e então submetida ao processo de *electrospinning*. Para tal, foi utilizada uma diferença de voltagem de 12 kV e vazão de 0,24 mL h<sup>-1</sup>. As matrizes foram formadas sobre lamínulas de vidro de 15mm de diâmetro, dispostas em placa coletora de alumínio, fixada a uma distância de 15 cm da agulha. O tempo de

*electrospinning* foi de 3 horas. Todos os experimentos foram realizados à temperatura ambiente (~25°C) e com umidade relativa (UR) do ar em torno de 35%.

### **Caracterização dos *scaffolds***

A morfologia dos *scaffolds* de PLGA foi analisada em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) (JEOL JSM-6060). As imagens foram obtidas utilizando tensão de aceleração de 10 kV, após as amostras terem sido metalizadas com camada de ouro. O diâmetro médio das fibras foi determinado utilizando o software ImageJ 1.38x, por meio da medida de 30 fibras de cada uma das imagens obtidas por MEV, (n=3). A espessura dos *scaffolds* foi medida com Digimatic Micrometer MDC-25MY (Mitutoyo).

### **Amostras de tecidos pulpares de dentes decíduos**

Com o objetivo de isolar as células de tecido pulpar e estabelecer a sua cultura, polpas dentárias foram removidas a partir de 5 dentes decíduos em processo de rizólise. Após as suas extrações, os dentes foram imersos em 1mL de meio de cultivo DMEM/Hepes (Sigma Aldrich), 10% soro fetal bovino (Laborclin), 100U/mL de penicillina, 100µg/mL de estreptomicina (Gibco) e 0.45µg/mL de gentamicina (Gibco), em temperatura ambiente, para o transporte até a capela de fluxo laminar. Os responsáveis pelos pacientes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, cadastrado do projeto nº 19273.

### **Cultivo Celular**

A manipulação do tecido pulpar removido foi realizada seguindo protocolo estabelecido no laboratório (Bernardi *et al.* 2011). Para cada amostra de SCDT, a suspensão de células em meio de cultura foi semeada em 1 poço

de placa de cultura de 12 poços e então incubadas a 37°C com atmosfera umidificada a 5% CO<sub>2</sub>. O meio de cultura foi trocado após 24 horas do plaqueamento inicial e, após este primeiro momento, a cada 3 dias. A cultura foi mantida nestas condições até atingir confluência de aproximadamente 90%, quando foi então realizada a sua primeira passagem. Nos repiques, as células em cultura foram colhidas com solução de tripsina–EDTA 0,5% (Sigma-Aldrich) e transferidas para subculturas no respectivo meio de cultivo. A subcultura foi mantida em monocamada até ser necessário seu próximo repique. Quando as células atingiram aproximadamente 90% de confluência entre a 5<sup>a</sup> e 7<sup>a</sup> passagem (P5 – P7), a viabilidade das células foi avaliada com Azul de Tripán 4% (Gibco) em câmara de Neubauer e os ensaios para verificação da interação entre células e *scaffolds* foram realizados. Os experimentos foram realizados com cada uma das 5 amostras do estudo (P5 – P7).

### **Ensaio de Adesão Celular**

Para cada amostra de SCDT, as células foram semeadas em cada *scaffold* a uma densidade de  $5 \times 10^4$  células viáveis concentradas em 50µL de meio de cultura (em triplicata) e incubadas a 37°C com atmosfera umidificada a 5% CO<sub>2</sub>. Após 6 horas de cultivo, o meio de cultura foi retirado e as amostras foram lavadas três vezes com solução tampão salina fosfato para retirada das células não aderidas aos *scaffolds*. As células aderidas aos *scaffolds* foram então fixadas com paraformaldeído 4%, por 20 min. Em seguida, foi realizada a coloração com 0,5 µg/mL de 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), um marcador fluorescente que se liga fortemente ao DNA, evidenciando núcleos celulares. De cada amostra foram obtidas sete imagens (Olympus CX50, magnificação de 400x) correspondendo a sete campos microscópicos diferentes distribuídos aleatoriamente. Assim, foi possível quantificar o número de células aderidas por meio da relação número de células/campo. Como grupo controle, para cada amostra, semeou-se de maneira semelhante a mesma quantidade de células em placas de cultura celular de 24 poços (em triplicata), sem *scaffolds*, e realizou-se os mesmos procedimentos para coleta dos dados.

## **Ensaio de Viabilidade Celular**

Para o estudo da viabilidade celular durante os 21 dias de cultura, de maneira semelhante ao realizado para o ensaio de adesão, as células foram semeadas em cada *scaffold* (em triplicata) e então incubadas a 37°C com atmosfera umidificada a 5% de CO<sub>2</sub>. Para coleta da viabilidade inicial das células semeadas, realizou-se a análise da viabilidade de 5 x 10<sup>4</sup> células, 6 horas após sua semeadura em placas de cultura. A seguir, realizou-se a análise 7, 14 e 21 dias após o início do cultivo das células no biomaterial. Decorrido cada período experimental, realizou-se o experimento da viabilidade celular pelo método do sal de tretazólium, um ensaio colorimétrico que utiliza o brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Decorrido os tempos estabelecidos, removeu-se o meio de cultura e adicionou-se 200 µL de MTT (0,25 µg/mL) durante 2 horas. Após, retirou-se o MTT e adicionou-se 200µL de dimetilsulfóxido (DMSO) para dissolver os cristais formados pela reação. Utilizando placas de 96 poços, a absorbância da solução final foi analisada por um espectrofotômetro (Wallac EnVision – Perkin Elmer). Os dados foram calculados por meio da diferença de absorbância entre os comprimentos de onda (560nm – 630nm). Como grupo controle de cada amostra, semeou-se de maneira semelhante a mesma quantidade de células em placas de 24 poços (em triplicata), sem *scaffolds*, mantidas pelos mesmos períodos experimentais e realizando os mesmos procedimentos para coleta dos dados.

## **Análise em Microscópio Confocal**

Para análise com microscópio de varredura confocal a laser, as amostras foram obtidas de maneira semelhante aos ensaios anteriormente descritos. Após 14 dias de cultivo, o meio de cultura foi retirado e as amostras foram lavadas uma vez com PBS. As células aderidas aos *scaffolds* foram então fixadas com paraformaldeído 4% por 20 min. Em seguida, foi realizada a coloração com 0,5 µg/mL de DAPI por 1 minuto, após o qual as amostras foram lavadas com PBS. A seguir foi realizada a coloração com 0,5 µg/mL de faloidina conjugada com rodamina por 20 minutos, para evidenciar o

citoesqueleto de actina. De cada amostra, aleatoriamente, foram obtidas imagens (Olimpus SV1000) com objetiva de 10x. A partir dessas imagens capturadas, em alguns locais foram obtidas imagens com zoom digital de 4x.

### **Análise Estatística**

Os dados estão expressos como média  $\pm$  DP (desvio padrão) e referidos para significância estatística por análise de variância (ANOVA) de uma via com pós-teste para múltiplas comparações (teste de Tukey). Para o resultado de adesão celular, os resultados foram analisados por teste *t* de student. Todos os dados foram analisados usando o software GraphPad Software, San Diego, CA, USA. Diferenças entre as médias foram consideradas significativas quando  $P < 0,05$ .

### **Resultados**

#### **Caracterização dos scaffolds**

Por meio das imagens obtidas por MEV, pôde-se observar que as fibras formadas distribuíram-se de maneira aleatória por toda a estrutura do *scaffold*, o qual apresentou um grande número de poros interconectados (Fig. 1). As fibras apresentaram superfície lisa e diâmetro médio de  $315,9 \pm 70,2$  nanômetros (Fig. 2). Por meio da análise da espessura dos *scaffolds*, verificou-se que os mesmos possuíam espessura de  $37 \pm 5,3$   $\mu\text{m}$ . Também foi observada a presença de *beads* nas nanofibras.

#### **Ensaio de adesão**

Por meio da coloração dos núcleos celulares com DAPI (Fig. 3), foi possível verificar que a capacidade das SCDT em realizar adesão sobre os *scaffolds* foi semelhante a sua capacidade de adesão às placas de cultura



(grupo controle),  $44,8 \pm 23,1$  e  $51,6 \pm 20$  células por campo, respectivamente, não havendo diferença estatística entre os grupos (Fig. 4).

### **Ensaio de Viabilidade Celular**

Como pode ser observado na figura 5, aos sete dias de cultura, ocorreu um aumento na viabilidade celular em ambos os grupos (teste e controle) quando comparado ao dia inicial dos experimentos. Da mesma forma, no 14º dia, a viabilidade celular de ambos os grupos aumentou em relação à viabilidade apresentada no 7º dia. No entanto, vinte e um dias após o início da cultura, em ambos os grupos, a viabilidade celular apresentou uma diminuição em relação ao 14º dia. A viabilidade celular manteve-se semelhante entre os grupos teste e controle para os diferentes períodos experimentais (0, 7, 14 e 21 dias de cultura), não havendo diferença estatística entre eles (Fig. 6).

### **Análise em Microscópio Confocal**

Por meio da captura de imagens no microscópio confocal, com aumento de 100x, pôde-se observar que 14 dias após as células terem sido semeadas nos *scaffolds*, estas se encontravam distribuídas de maneira homogênea e por toda a estrutura do *scaffold* (Fig.7-A). Ao aplicar zoom digital de 4x nas imagens capturadas com 100x de aumento, foi possível observar a morfologia das células e que as mesmas estavam aderidas aos *scaffolds*. Na Figura 7-B observa-se os núcleos celulares marcados em azul (seta amarela) e o citoesqueleto em vermelho (seta verde) (Fig.7-B).

### **Discussão**

A utilização de matrizes de nanofibras associadas à terapia celular é alvo de interesse por parte dos pesquisadores que se dedicam a essa área (Mikos e Temenoff 2000; Li *et al.* 2002; He *et al.* 2005; Agarwal *et al.* 2009; De Moraes *et al.* 2010; Lionzo *et al.* *In press*; Zanatta *et al.* *In press*). Assim, a

caracterização dos *scaffolds* é necessária para verificar a sua estrutura e determinar se o mesmo preenche os requisitos necessários para sua aplicação com as células-tronco provenientes de dentes decíduos, em processo de rizólise, utilizadas no estudo. Como descrito por Pham, em 2006, a morfologia das nanofibras é resultado da combinação de diferentes fatores. Nesse estudo, confeccionaram-se fibras com dimensões nanométricas, com poros interconectados e elevada área superficial, como estabelecido pela literatura (Laurencin *et al.* 1999; Xu *et al.* 2004; He *et al.* 2005; Murugan e Ramakrishna 2006; Agarwal *et al.* 2009), como requisitos básicos para sua utilização. Supõe-se que o sucesso na fabricação dos *scaffolds*, foi devido ao adequado estabelecimento dos diferentes parâmetros envolvidos em sua produção. Também observou-se a presença de *beads* nas fibras, fato que está fortemente relacionado à concentração da solução. Essas estruturas são frequentemente observadas em nanofibras produzidas a partir de soluções poliméricas de mais baixas concentrações (Zhao *et al.* 2008). No presente estudo observou-se pouca presença de *beads*. Ainda não existe uma definição quanto aos efeitos biológicos dessas estruturas, quanto à adesão, crescimento e proliferação celular. No entanto, acredita-se que os *beads* possam ser úteis como reservatórios de princípios ativos que favoreçam o desenvolvimento celular (Lannutti *et al.* 2007). Outros autores sugerem que os *beads* possam auxiliar na migração da célula tridimensionalmente pelo *scaffold*, por favorecer o espaçamento entre as nanofibras.

As células utilizadas no estudo foram provenientes de uma fonte de fácil acesso, os dentes decíduos humanos, em processo de rizólise, os quais possuem um ciclo biológico definido. Comumente, os dentes decíduos passarão pelo processo de reabsorção de suas raízes ainda durante a infância, sendo assim, uma fonte de células com pouca ou nenhuma morbidade ao paciente (Seo *et al.* 2008).

Para o sucesso da aplicação dos *scaffolds* na engenharia de tecidos, uma característica crucial é que as matrizes promovam a adesão celular. Segundo Andrews, em 2007, a adesão celular é mediada: primeiramente, pela adsorção de proteínas da matriz extracelular elaborada pelas células à superfície do *scaffold*. Em seguida, vias de sinalização são ativadas e ocorre a

adesão das células aos moldes por meio de receptores. Logo, o acomodamento e comportamento celular são bastante afetados pela estrutura dos *scaffolds*. Por esse motivo, realizou-se o ensaio de adesão celular, com o objetivo de determinar se os *scaffolds* apresentavam uma boa estrutura para a interação inicial com as células. O ensaio demonstrou que a média do número de células por campo analisado, quando comparado o grupo teste e o grupo controle foi semelhante, não apresentando diferença estatística. Tal fato demonstra a qualidade das nanofibras em permitir que as células realizem sua adesão, uma vez que a adesão foi semelhante a situação onde as mesmas foram semeadas em poços de placas de cultura, o que é considerado o padrão ouro para adesão celular.

A atividade metabólica foi avaliada por meio da medição da atividade da enzima succinato desidrogenase mitocondrial (ensaio de MTT), o qual é amplamente utilizado na avaliação *in vitro* da viabilidade celular (Leong *et al.* 2008; Saad *et al.* 2008; Zhao *et al.* 2008; Wu *et al.* 2009). Aplicou-se o ensaio para análise do desempenho celular ao longo do tempo, permitindo o acompanhamento da viabilidade celular durante os períodos experimentais. Observou-se um aumento na viabilidade do início do experimento até o 14º dia de cultura, tanto no grupo teste quanto controle, porém no 21º dia, em ambos os grupo, uma considerável diminuição na viabilidade foi verificada. Assim, pode-se afirmar que as  $5 \times 10^4$  células semeadas inicialmente proliferaram até o 14º dia, ocorrendo uma diminuição em número quando analisadas aos 21 dias de cultura. Essa diminuição pode ser atribuída ao período prolongado em que as células foram mantidas em cultivo. Essa situação parece ter levado a atingir uma confluência maior do que a ideal para o cultivo celular, tornando-se, dessa maneira, o ambiente hostil e prejudicial ao seu metabolismo, inibição por contato (Swat *et al.* 2009). Com estes dados, pode-se sugerir que, seguindo os parâmetros descritos no presente estudo, e com *scaffolds* nas dimensões utilizadas, a associação entre *scaffolds* de PLGA e SCDT é favorável até o 14º dia após a semeadura.

A análise por microscopia confocal permite, em uma mesma região, avaliar diversos planos das diferentes estruturas celulares marcadas por fluoróforos. Por meio das imagens obtidas no estudo, verificou-se que as

células, após 14 dias de cultura, ocupavam toda a área do *scaffold*, confirmando o dado obtido pelo ensaio com MTT. Quando analisado em maior aumento, também se observou a estrutura íntegra do citoesqueleto, em toda a extensão citoplasmática, conferindo à célula um aspecto fusiforme, semelhante a fibroblasto. Esse dado confirma os achados de Bernardi e colaboradores (2011) que ao isolar células-tronco da polpa de dentes decíduos em processo de reabsorção, relataram a mesma morfologia celular.

Concluindo, nesse estudo demonstrou-se que os *scaffolds* produzidos pela técnica de *electrospinning* apresentaram características adequadas para associação com SCDT. E, Com os resultados obtidos, podemos afirmar que, obedecidos os parâmetros utilizados, os *scaffolds* de PLGA e as SCDT apresentam resultados favoráveis em relação à sua interação, sendo a sua associação adequada para utilização na bioengenharia.

### **Agradecimentos**

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul) e IPCT (Instituto de Pesquisa com Células-tronco), que financiaram este projeto.

### **Bibliografia**

1. Agarwal S, Wendorff JH, Greiner A (2009) Progress in the field of electrospinning for tissue engineering applications. *Adv Mater* 21:3343-3351
2. Andrews KD, Hunt JA, Black RA (2007) Effects of sterilisation method on surface topography and in-vitro cell behaviour of electrostatically spun scaffolds. *Biomaterials* 28:1014-1026
3. Bernardi L, Luisi SB, Fernandes R, Dalberto TP, Valentim L, Chies JAB, Fossati ACM, Pranke P (2011) The isolation of stem cells from human

deciduous teeth pulp is related to the physiological process of resorption.  
J Endod 37:973-979

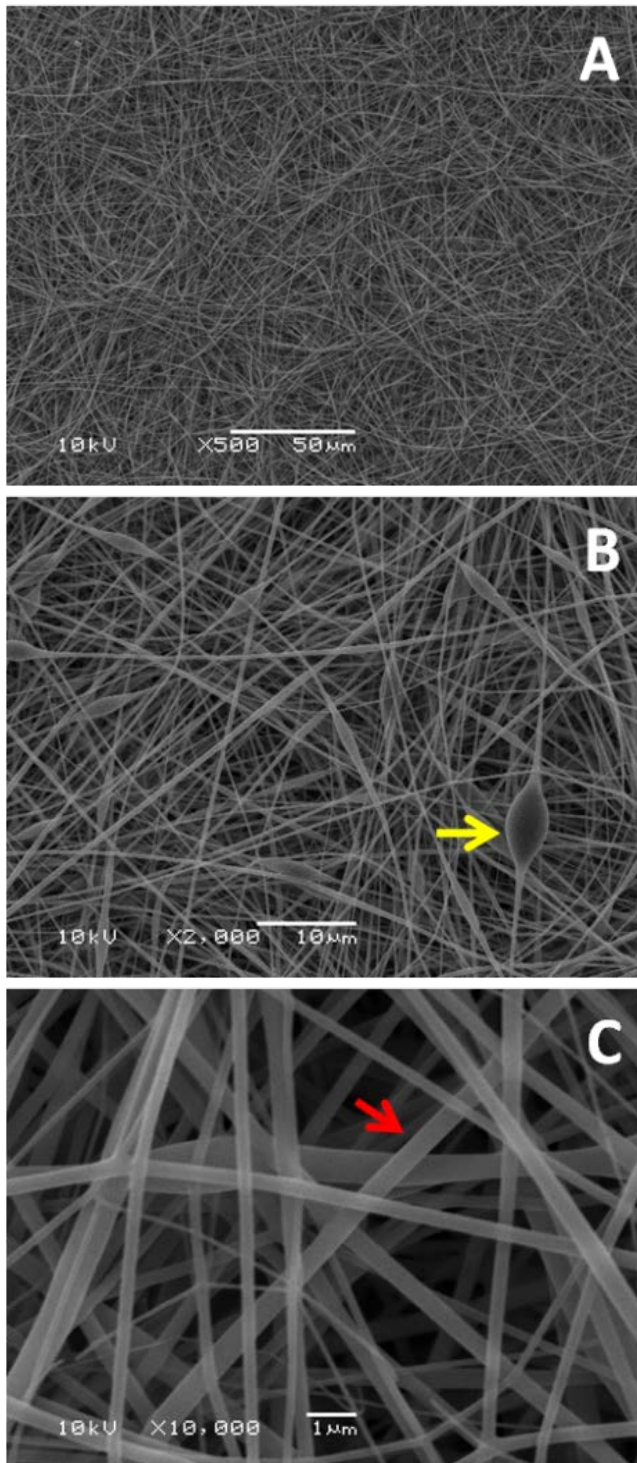
4. Chang SC, Wei FC, Chuang H, Chen YR, Chen JK, Lee KC, Chen PK, et al. (2003) Ex vivo gene therapy in autologous critical-size craniofacial bone regeneration. *Plast Reconstr Surg* 112:1841-1850
5. Conrad C, Huss R (2005) Adult stem cell lines in regenerative medicine and reconstructive surgery. *J Surg Res* 124:201-208
6. De Morais MG, Stillings C, Dersch R, Rudisile M, Pranke P, Costa JA, Wendorff J (2010) Preparation of nanofibers containing the microalga *Spirulina* (*Arthrospira*). *Bioresour Technol* 101:2872-2876
7. Duailibi MT, Duailibi SE, Young CS, Bartlett JD, Vacanti JP, Yelick PC (2004) Bioengineered teeth from cultures rat tooth bud cells. *J Dent Res* 83:523-528
8. He W, Ma ZW, Yong T, Teo WE, Ramakrishna S (2005) Fabrication of collagen-coated biodegradable polymer nanofiber mesh and its potential for endothelial cells growth. *Biomaterials* 26:7606-7615
9. Huang ZM, Zhang YZ, Kotaki M, Ramakrishna S (2003) A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Compos Sci Technol* 63:2223-2253
10. Kerkis I, Kerkis A, Dozortsev D, Stukart-Parsons GC, Massironi SMG, Pereira LV, Caplan AI, et al. (2006) Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. *Cells Tissues Organs* 184:105-116
11. Kumbar SG, Nair LS, Bhattacharyya S, Laurencin CT (2006) Polymeric nanofibers as novel carriers for the delivery of therapeutic molecules. *J Nanosci Nanotechnol* 6:2591-2607
12. Lannutti J, Reneker D, Ma T, Tomasko D, Farson D (2007) Electrospinning for tissue engineering scaffolds. *Mater Sci Eng C* 27:504-509

13. Laurencin CT, Ambrosio AMA, Borden MD, Cooper JA (1999) Tissue engineering: orthopedic applications. *Annu Rev Biomed Eng* 1:19-46
14. Leong NL, Jiang J, Lu HH (2006) Polymer–ceramic composite scaffold induces osteogenic differentiation of humanmesenchymal stem cells. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 1:2651-2654
15. Li WJ, Laurencin CT, Caterson EJ, Tuan RS, Ko FK (2002) Electrospun nanofibrous structure: a novel scaffold for tissue engineering. *J Biomed Mater Res* 60:613-621
16. Lionzo MIZ, Lorenzini GC, Tomedi J, Pranke P, Silveira NP Preparation and characterization of chitosan films containing chondroitin-modified chitosomes. *J Biomed Nanotechnol* (in press)
17. Mikos AG, Temenoff JS (2000) Formation of highly porous biodegradable scaffolds for tissue engineering. *Electron J Biotechnol* 3:114-119
18. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S (2003) SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:5807-5812
19. Murugan R, Ramakrishna S (2006) Nano-featured scaffolds for tissue engineering: a review of spinning methodologies. *Tissue Eng* 12:435-447
20. Pham QP, Sharma U, Mikos AG (2006) Electrospun poly(epsilon-caprolactone) microfiber and multilayer nanofiber/microfiber scaffolds: Characterization of scaffolds and measurement of cellular infiltration. *Biomacromolecules* 7:2796-2805
21. Saad B, Abouatta BS, Basha W, Hmade A, Kmail A, Khasib S, Said O (2008) *Hypericum triquetrifolium*—Derived Factors Downregulate the Production Levels of LPS-Induced Nitric Oxide and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  in THP-1 Cells. *Evid Based Complement Alternat Med* 14:1-7
22. Taghipour Z, Karbalaie K, Kiani A, Niapour A, Bahramian H, Esfahani MHN, Baharvand H (2011) Transplantation of Undifferentiated and Induced Human Exfoliated Deciduous Teeth-derived Stem Cells Promote

Functional Recovery of Rat Spinal Cord Contusion Injury Model. *Stem Cells Dev* 4

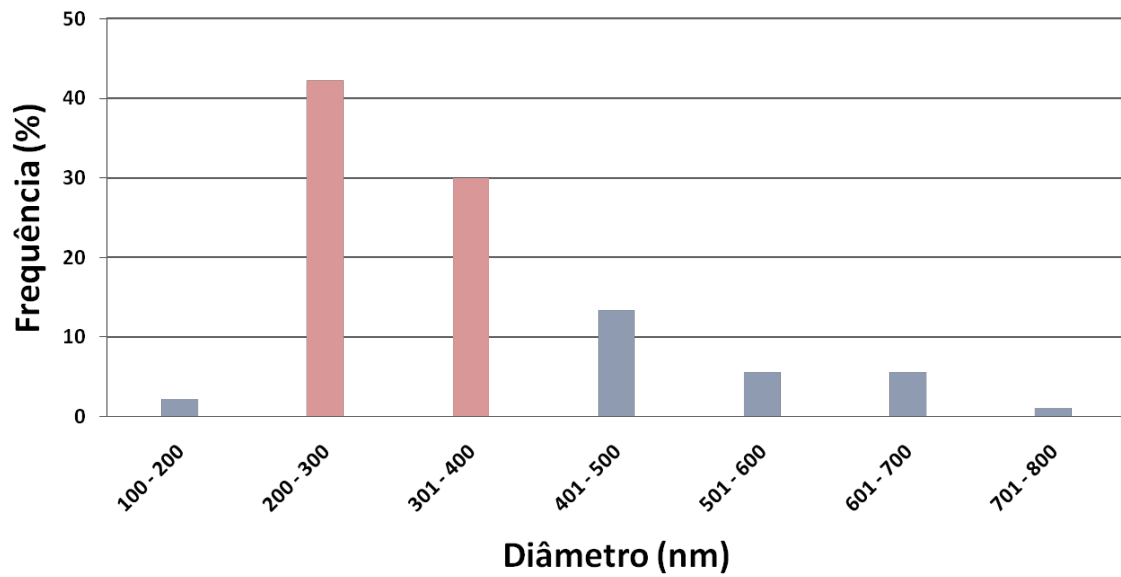
23. Venugopal J, Ramakrishna S (2005) Applications of polymer nanofibers in biomedicine and biotechnology. *Appl Biochem Biotechnol* 125:147-158
24. Wu G, Dong C, Wang G, Gao W, Fan H, Xiao W, Zhang L (2009) Preparation of three-dimensional porous scaffold of PLGA-silk fibroin-collagen nanofiber and its cytocompatibility study. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi* 23:1007-1011
25. Xu C, Inai R, Kotaki M, Ramakrishna S (2004) Electrospun nanofiber fabrication as synthetic extracellular matrix and its potential for vascular tissue engineering. *Tissue Eng* 10:1160-1168
26. Yoon E, Dhar S, Chun DE, Gharibjanian NA, Evans GR (2007) In Vivo Osteogenic Potential of Human Adipose-Derived Stem Cells/Poly Lactide-Co-Glycolic Acid Constructs for Bone Regeneration in a Rat Critical-Sized Calvarial Defect Model. *Tissue Engineering* 13:619-627
27. Yu J, Wang Y, Deng Z, Tang L, Li Y, Shi J, Jin Y (2007) Odontogenic capability: bone marrow stromal stem cells versus dental pulp stem cells. *Biol Cell* 99:465-474
28. Zanatta G, Rudisile M, Camassola M, Wendorff J, Nardi N, Gottfried C, Pranke P, et al. (in press) Mesenchymal stem cell adherence on Poly (D, L-lactide-co-glycolide) nanofibers scaffold is integrin- $\beta$ 1 receptor dependent. *J Biomed Nanotechnol*
29. Zhang ZY, Teoh SH, Chong MS, Lee ES, Tan LG, Mattar CN, Fisk NM, et al. (2010) Neo-vascularization and bone formation mediated by fetal mesenchymal stem cell tissue-engineered bone grafts in critical-size femoral defects *Biomaterials* 31:608-620
30. Zhao L, He C, Gao Y, Cen L, Cui L, Cao Y (2008) Preparation and cytocompatibility of PLGA scaffolds with controllable fiber morphology and diameter using electrospinning method. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 87:26-34

## Figuras do Artigo

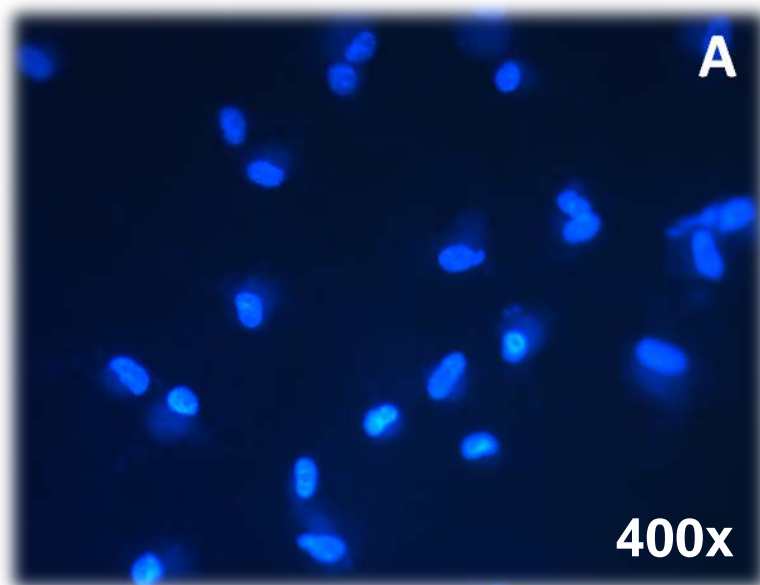


**Figura 1.** Análise em microscopia eletrônica de varredura. Micrografia eletrônica de nanofibras de PLGA: 500x (A); 2.000x (B); 10.000x (C). A seta amarela indica um *bead* e a seta vermelha indica uma fibra.



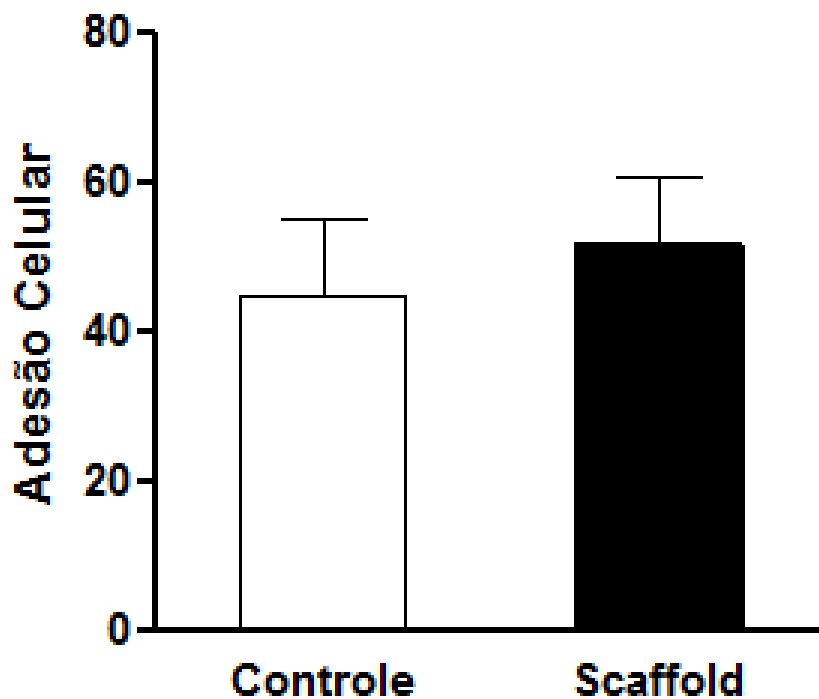


**Figura 2.** Distribuição do diâmetro das fibras. Aproximadamente 70% das fibras apresentavam entre 200 e 400 nm.

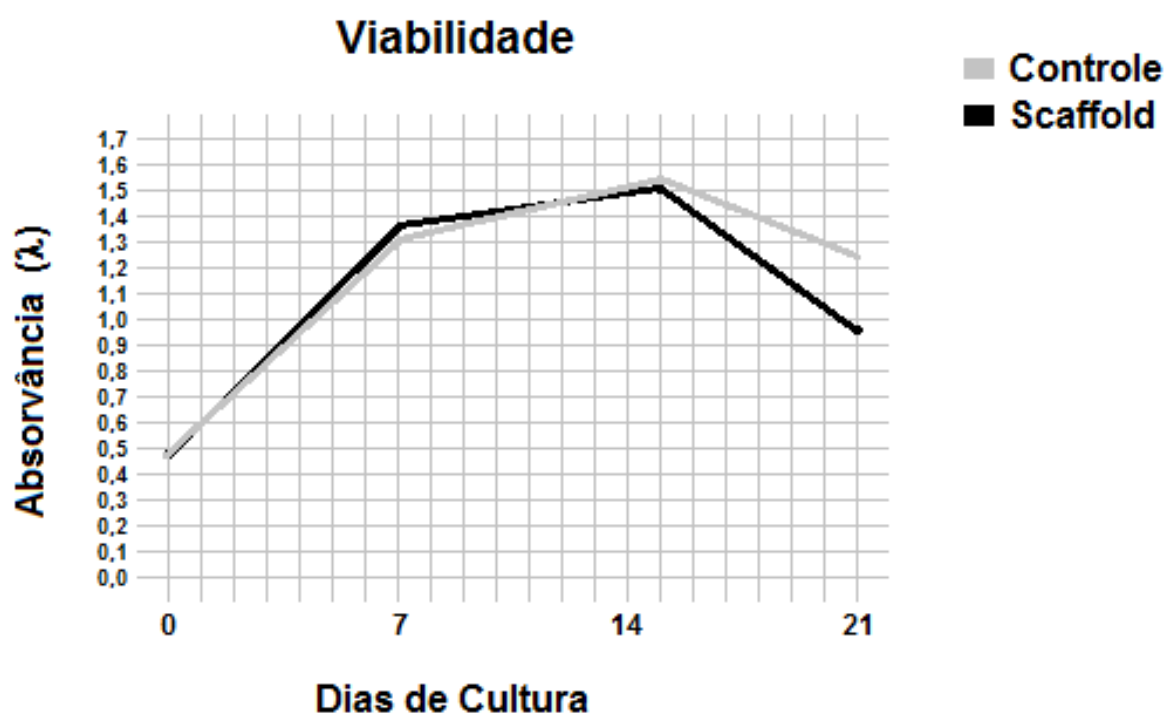


**Figura 3.** Imagem capturada em microscópio de fluorescência. Marcação com DAPI dos núcleos de células semeadas sobre os *scaffolds*.

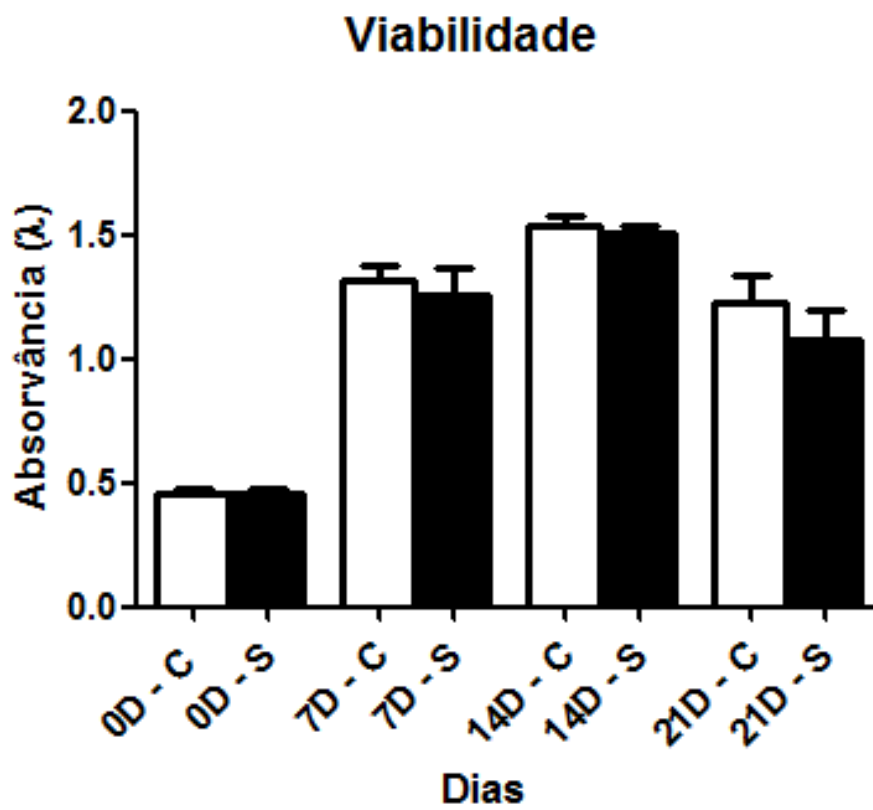
## Ensaio de Adesão Celular



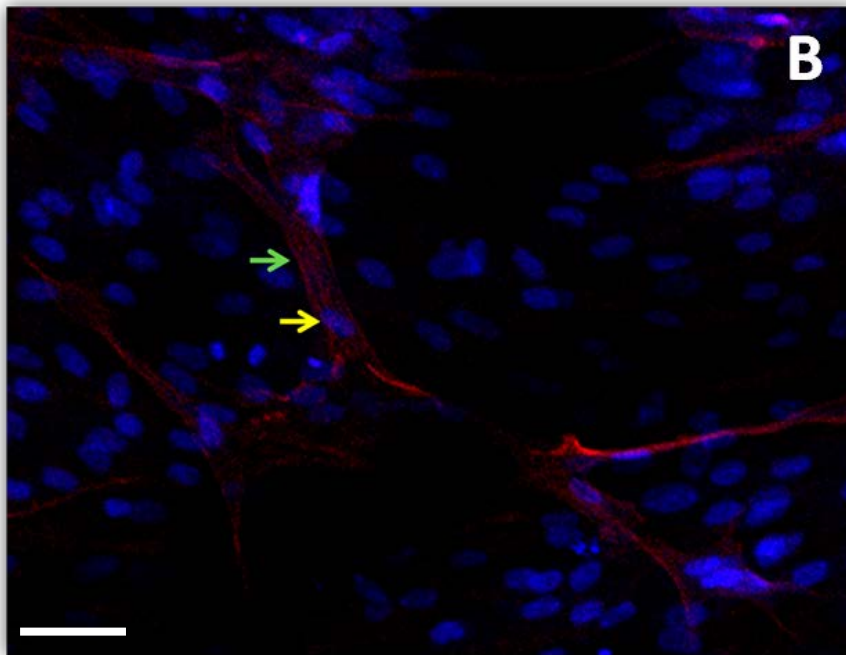
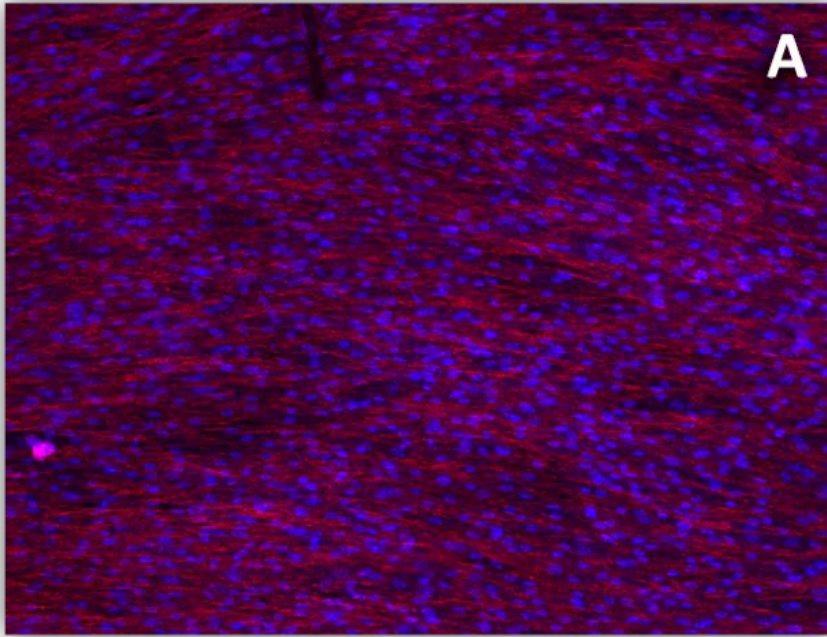
**Figura 4.** A adesão celular ocorreu de maneira semelhante no grupo controle e grupo teste,  $44,8 \pm 23,1$  e  $51,6 \pm 20$  células por campo respectivamente, não havendo diferença estatística entre os grupos.



**Figura 5.** Aumento progressivo da viabilidade celular do início do experimento até o 14º dia, seguido pela sua diminuição no 21º dia.



**Figura 6.** A viabilidade celular manteve-se a semelhante entre os grupos teste e controle nos diferentes períodos experimentais, sem diferença estatística.



**Figura 7.** Imagem capturada em microscópio confocal. Em A, a captura com objetiva de 10x mostra a marcação nuclear com DAPI e a marcação do citoesqueleto com faloidina/rodamina. Em B, aumento de região da figura A evidenciando o núcleo celular (seta amarela) e o citoesqueleto (seta verde) – barra de escala: 50 $\mu$ m.

## **Artigo 2**

**A ser submetido ao periódico "Tissue Engineering, Part A".**

**Regeneração óssea, em calota craniana de ratos, com a utilização de matrizes de nanofibras poliméricas semeadas com células-tronco provenientes de tecido pulpar de dentes decíduos.**

**Autores:**

**Gerson Arisoly Xavier Acasigua;**

**Lisiane Bernardi;**

**Manoel Sant'Ana Filho;**

**Patricia Pranke;**

**Anna Christina Medeiros Fossati.**

## Resumo

Estudos têm mostrado que os dentes decíduos possuem células-tronco pluripotentes, sugerindo sua capacidade em promover a formação óssea. O objetivo do presente estudo foi avaliar a capacidade de células-tronco provenientes de dentes decíduos, em processo de rizólise (SCDT), associadas a *scaffolds* de nanofibras produzidos a partir de ácido poli (lático-co-glicólico) (PLGA) em promover a regeneração óssea quando implantadas em defeitos críticos na calota craniana de ratos. Quinze ratos foram randomicamente divididos em 3 grupos: I) PLGA somente (controle), II) PLGA semeado com SCDT indiferenciadas, e III) PLGA semeado com SCDT estimuladas em meio osteogênico. Um defeito crítico circular de 8 mm de diâmetro foi confeccionado na calvária de cada rato, onde então foi implantado o material referente a cada grupo experimental. Após 8 semanas os animais foram mortos e as calotas removidas para análise histológica. A análise histológica demonstrou que o grupo no qual foram implantados *scaffolds* semeado com SCDT estimuladas em meio osteogênico apresentou  $17 \pm 4,31\%$  de neoformação óssea no local referente ao defeito original, apresentando diferença estatística em relação aos demais grupos ( $10,7 \pm 3,22\%$  – grupo II e  $9,39 \pm 2,55\%$  – grupo I). Os dados sugerem que a associação de *scaffolds* de PLGA com SCDT estimuladas em meio osteogênico possuem significativa capacidade de promover regeneração óssea em defeitos críticos, sendo essa associação uma alternativa promissora para o emprego em medicina regenerativa.

Palavras-chave: bioengenharia, células-tronco, nanotecnologia, dentes decíduos, ratos.

## Introdução

Perdas ósseas causadas por malformações congênitas, ressecção de tumores, infecções ou traumas representam um desafio na cirurgia reparadora da face.<sup>1-6</sup> Como parte integrante do tratamento dessas perdas, a utilização de enxertos ósseos é frequente.<sup>2</sup> Atualmente, uma variedade de técnicas para enxertia óssea vem sendo utilizada, lançando mão, para isso, de diferentes

fontes de tecido ósseo e biomateriais. Entre essas fontes, podemos citar: tecido ósseo autólogo,<sup>7,8</sup> tecido ósseo homólogo,<sup>9</sup> tecido ósseo proveniente de bancos de ossos,<sup>9,10</sup> tecido ósseo liofilizado,<sup>11</sup> xenoenxertos bovinos<sup>12</sup> e os biomateriais da hidroxiapatita.<sup>12-15</sup> Apesar de bastante utilizadas, as fontes citadas apresentam limitações, sejam elas relacionadas à disponibilidade, à técnica, ou ainda, a fatores imunológicos, justificando, assim, a busca incessante por novas alternativas de reposição óssea.

Atualmente, uma área de pesquisa biomédica, denominada bioengenharia, ou engenharia de tecidos, estuda novas formas de produção de tecidos, inclusive para uso em cirurgias reparadoras, fornecendo abordagens alternativas e contribuindo com a medicina regenerativa.<sup>16,17</sup> A engenharia de tecidos alia o uso de biomateriais à terapia celular, podendo ser essa associação uma solução adequada e viável à reposição óssea.<sup>18</sup>

Muitos estudos têm avaliado a capacidade de células em promover a reparação óssea, inclusive a reconstrução da área craniofacial em modelos pré-clínicos.<sup>2,19-29</sup> Para a realização desses estudos, numerosos biomateriais foram utilizados como arcabouços celulares, apresentando composição e arquitetura variável. Foram utilizados polímeros biodegradáveis,<sup>30</sup> osso alógeno desmineralizado,<sup>21</sup> osso bovino inorgânico<sup>31</sup> e matrizes colagenosas.<sup>32</sup> Nesses estudos foram utilizadas células diferenciadas e não, semeadas em seus respectivos arcabouços, para que então ocorressem suas implantações em regiões craniofaciais. Tais associações apresentaram resultados satisfatórios em relação à neoformação óssea, quando comparados aos seus respectivos controles.<sup>21,30-32</sup> Ainda, em estudo de Yoon e colaboradores (2007), comparando arcabouços semeados com células indiferenciadas e células diferenciadas em meio osteogênico, previamente à implantação em animais, observou-se resultados superiores em relação à neoformação óssea com a utilização de células diferenciadas em osteoblastos, quando comparados ao grupo onde as células permaneceram indiferenciadas e ao grupo controle.

Dessa maneira, o presente estudo utiliza células-tronco provenientes de uma fonte de fácil acesso, polpa dos dentes decíduos em processo de rizólise, associadas a *scaffolds* biodegradáveis de PLGA produzidos a partir de



nanotecnologia. Com isso, objetiva-se a reparação de defeitos críticos (8 mm) previamente confeccionados em calota craniana de ratos.

## **Materiais e Métodos**

### **Animais**

Quinze ratos Wistar machos (112 dias de idade, pesando 300-350g cada) foram obtidos do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Os animais foram mantidos em gaiolas individuais em estantes ventiladas, com temperatura controlada ( $22\pm 1$  °C) e ciclo claro-escuro de 12 h. Foi fornecido ração e água filtrada *ad libitum*. O estudo foi realizado de acordo com as recomendações do Guia de Uso e Cuidado com Animais Laboratoriais do National Institutes of Health dos Estados Unidos da América e aprovado pela Comissão de Ética na Utilização de Animais da UFRGS (nº19273).

### **Preparo dos Scaffolds pelo Método de *Electrospinning***

Os *scaffolds* foram preparados utilizando-se 75/25 PLGA (P1941–Sigma Aldrich). O polímero foi dissolvido em 1,1,1,3,3,3 – hexafluoro-2-propanol (Sigma Aldrich) de modo que a concentração final da solução foi de 12% (m/v). A solução foi mantida em agitador magnético durante 24 horas, a seguir foi colocada em uma seringa de 1 mL equipada com agulha de diâmetro interno de 0,8 mm e submetida ao processo de *electrospinning*. Para tal, foi utilizada uma diferença de voltagem de 12 kV e vazão de  $0,24 \text{ mL h}^{-1}$ . As matrizes foram formadas sobre lamínulas de vidro de 15 mm de diâmetro, dispostas em placa coletora de alumínio, fixada a uma distância de 15 cm da agulha. O tempo de *electrospinning* foi de 3 horas. Os experimentos foram realizados à temperatura ambiente (TA) ( $\sim 25^\circ\text{C}$ ) e com umidade relativa (UR) do ar em torno de 35%. Após sua confecção, os *scaffolds* foram esterilizados em luz ultravioleta por 1 hora.

## **Cultura Celular**

As células foram obtidas de tecido pulpar de 2 dentes decíduos humanos em processo de rizólise (SCDTs), obedecendo o protocolo estabelecido por Bernardi e colaboradores (2011). Após a obtenção, cada dente foi imerso em 1 mL de meio de cultivo DMEM/Hepes (Sigma Aldrich), acrescido de 10% de soro fetal bovino (Laborclin), 100U/mL de penicillina, 100µg/mL de estreptomicina (Gibco) e 0,45µg/mL de gentamicina (Gibco), em TA, para o transporte até a capela de fluxo laminar. O responsável pelo paciente assinou um termo de consentimento livre e esclarecido aprovado pelo Comitê de Ética da UFRGS. As células foram cultivadas até atingirem sua 5ª passagem, momento no qual foram empregadas no estudo.

## **Procedimentos Cirúrgicos e Grupos Experimentais**

Os animais foram anestesiados com cloridrato de ketamina e cloridrato de xilazina (100mg/kg e 10mg/kg respectivamente). Com o auxílio de uma broca trefina instalada em um motor cirúrgico e sob irrigação constante com solução de 0,9% de NaCl em água destilada, um defeito ósseo crítico de 8 mm de diâmetro foi confeccionado na calota craniana de cada animal. Após a confecção do defeito, cada animal foi alocado em um dos seguintes grupos experimentais: Grupo I – Implante somente de *scaffolds* (controle); Grupo II – Implante de *scaffolds* semeados com SCDT; Grupo III – Implante de *scaffolds* semeados com SCDT que foram mantidos previamente em meio de diferenciação osteogênico. Independente do grupo ao qual o animal pertencia, em cada defeito ósseo criado foi implantado 3 *scaffolds* empilhados, com 37 µm cada, objetivando o preenchimento da área do defeito. Cada grupo foi composto por cinco animais.

## **Semeadura das Células sobre os *Scaffolds***

Para os grupos II e III, as células, em sua 5ª passagem, foram semeadas nos *scaffolds* a uma densidade de  $5 \times 10^4$  células viáveis

concentradas em 1000µL de meio de cultura DMEM. A seguir, os *scaffolds* com células semeadas foram incubadas a 37°C com atmosfera umidificada a 5% CO<sub>2</sub>, durante 14 dias, prévios a sua implantação nos animais, para o grupo II. Para o grupo III, após 24 horas da semeadura inicial, foi retirado o meio de cultura DMEM e adicionado meio de cultura para estimulação osteogênica (DMEM/Hepes suplementado com 10% de soro fetal bovino, 10% de β-glicerofosfato, 10mM, 1% de ácido ascórbico 2-fosfato 5mg/mL e 0,1% de dexametasona 10<sup>-5</sup>M),<sup>33</sup> permanecendo 14 dias em meio de cultura antes de serem implantados nos animais.<sup>18</sup> A confirmação da linhagem osteogênica foi realizada com coloração de Alizarin Red.<sup>33</sup> Para o grupo controle (grupo I), mantiveram-se os *scaffolds*, sem células semeadas, imersos em meio de cultura DMEM durante 14 dias antes de serem implantados nos animais.

### **Remoção das Calotas**

Decorrido 60 dias após a criação dos defeitos e implante dos *scaffolds*, os ratos foram sacrificados por meio de decapitação e suas calotas cranianas removidas para análise.

### **Avaliação Histológica**

Após removidas, as calotas cranianas permanecerem por 24 horas em formalina neutra tamponada 10%. Em seguida as calotas passaram por um processo de descalcificação em ácido fórmico 50% e citrato de sódio 20%, por sete dias. Cada peça descalcificada foi seccionada longitudinalmente na linha média da calvária com o uso de uma navalha descartável, sendo que o traço longitudinal da secção incluiu a parte central da osteotomia criada, dividindo o defeito ósseo em duas metades iguais. A seguir, cada metade da peça foi processada conforme protocolo de inclusão em parafina e coloração por meio de Hematoxilina de Harris e Eosina (HE). Uma das metades das peças coletadas foi utilizada para realização de cortes histológicos sagitais com 4 µm de espessura e confecção das lâminas. Cada lâmina foi analisada em microscopia ótica e toda sua extensão foi capturada no aumento de 100x, por

meio de uma câmera de vídeo Olympus® (modelo Qcolor 5, Coolet, RTV) acoplada a um microscópio binocular Olympus Optical Co. modelo CX41RF e a um computador Dell® (modelo Dimension 5150) da Unidade de Morfometria e Histometria da Patologia da Faculdade de Odontologia da UFRGS<sup>1</sup>, utilizando o software Qcapture® (versão 2.81; Quantitative Imaging Corporation, Inc.; 2005). As imagens capturadas foram analisadas no software Image J (versão 1,44o; National Institutes of Health, 2011), o qual permitiu a determinação das áreas de neoformação óssea. A análise histométrica englobou toda a área do defeito ósseo original, o que permitiu que áreas de neoformação óssea, obtidas pelo software, fossem expressas como porcentagem em relação à área total do defeito crítico. A captura das imagens, bem como a manipulação do programa de imagem, foi repetida em períodos de tempo definidos, mantendo o treinamento do examinador, o qual se manteve cego em relação aos grupos do estudo.

### **Análise Estatística**

Os dados estão expressos como média  $\pm$  DP (desvio padrão) e referidos para significância estatística por análise de variância (ANOVA) de uma via com pós-teste para múltiplas comparações (teste de Tukey). Todos os dados foram analisados usando o software GraphPad Software, San Diego, CA, USA. Diferenças entre as médias foram consideradas significativas quando  $P < 0,05$ .

### **Resultados**

#### **Cultura Celular**

As SCDT aderiram nos *scaffolds* de PLGA, sem apresentar qualquer efeito negativo sobre o crescimento celular durante os 14 dias nos quais permaneceram em meio de cultura convencional ou em meio de cultura

---

1- Edital Fapergs Proap 04/2005 processo 0410882, sob responsabilidade do Prof. Dr. Manoel Sant'Ana Filho

osteogênico. As células cultivadas em meio osteogênico (grupo III) apresentaram alterações morfológicas, apresentando marcação positiva quando submetidas a coloração de Alizarin Red, evidenciando sua diferenciação para linhagem osteogênica (Fig. 2).

### **Resposta Macroscópica ao Implante**

Todos os animais sobreviveram aos procedimentos cirúrgicos e apresentavam-se em condições de avaliação ao final do período experimental (60 dias). Nesse período não ocorreu sinais de infecção ou de qualquer alteração na região da ferida.

### **Análise Histológica**

Por meio da coloração com HE pôde-se verificar que nos três grupos experimentais ocorreu neoformação óssea. O percentual de neoformação óssea foi de  $9,39 \pm 2,55\%$ ,  $10,7 \pm 3,22\%$  e  $17 \pm 4,31\%$  nos grupos I, II e III respectivamente (Fig. 3). Sendo estatisticamente significativa uma maior neoformação ocorrida no grupo III quando comparado aos demais grupos. Não houve diferença estatística entre os grupos I e II. Em todos os grupos a neoformação óssea ocorreu na região periférica, junto as bordas de tecido ósseo remanecente (Fig. 4). No grupo III, além da periferia, também pôde-se observar neoformação óssea como ilhas dentro da área do defeito (Fig. 5). Ainda, nas amostras do grupo III observou-se tecido ósseo neoformado justaposto ao *scaffold*/osteoblasto que ainda não havia sido totalmente reabsorvido pelo organismo do animal (Fig. 5 e Fig. 6).

### **Discussão**

A abordagem da engenharia de tecidos para a promoção da reparação tecidual está baseada na associação de biomateriais e terapia celular. A possibilidade de utilização de células-tronco embrionárias humanas, a partir

de blastocistos obtidos por fecundação *in vitro*, permitiu a proposta de sua utilização em terapias celulares para o reparo e regeneração de tecidos e órgãos.<sup>34</sup> Contudo, a possibilidade em relação à formação de teratomas, ainda requer muita cautela e estudos. Assim, a utilização de células-tronco adultas (CTA) é uma via promissora alternativa à das células-tronco embrionárias. Por esse motivo, as CTA têm sido extensamente estudadas.<sup>33,35-48</sup> Entre as populações de CTA, as células-tronco mesenquimais (CTM) da medula óssea recebem uma atenção especial, representando uma fonte rica células-tronco.<sup>36,38-40,42</sup> Essas CTA apresentam um grande potencial regenerativo, sendo essas células muito bem caracterizadas para aplicação clínica. No entanto, elas só podem ser obtidas por meio de biópsia de medula óssea, que é um procedimento invasivo e potencialmente doloroso. Outros grupos de pesquisadores também obtiveram sucesso em isolar células-tronco de tecido adiposo,<sup>49-51</sup> que assim como as células-tronco de medula óssea, possuem propriedades adequadas para seu emprego clínico. Porém, de maneira semelhante às de medula óssea, para que essas células sejam coletadas existe a necessidade de submeter os pacientes a procedimentos cirúrgicos. Tais procedimentos exigem uma estrutura física complexa, bem como um acompanhamento/monitoramento do paciente antes, durante e após a cirurgia, o qual permanece temporariamente privado de suas atividades.<sup>52</sup>

Por outro lado, por se tratar de uma fonte potencial de CTA, os dentes decíduos vêm sendo amplamente estudados.<sup>33,39,45,47,53,54</sup> Em estudo de Miura e colaboradores (2003), ao isolar células-tronco a partir de dentes decíduos, as quais nomeou SHEDs (*Stem Cells From Human Exfoliated Deciduous Teeth*), os autores verificaram uma maior capacidade proliferativa e clonogênica dessas células quando comparadas as células-tronco da medula óssea (BMSC – bone marrow stem cells) e células-tronco da polpa dental (DPSC – dental pulp stem cells). Em 2011, Bernardi e colaboradores, ao comparar o isolamento de células-tronco de dentes decíduos que estavam e não estavam em processo avançado de rizólise, verificaram que a possibilidade de obtenção de células-tronco a partir destes dentes, somente era possível quando o mesmo encontrava-se em processo avançado desse fenômeno. No presente trabalho, foram utilizadas células de dentes decíduos em processo de rizólise.

é um evento pelo qual os dentes decíduos têm a reabsorção de sua raiz levando posteriormente a sua exfoliação (queda do dente).<sup>55</sup> Por se tratar de um processo fisiológico e geneticamente programado, não apresenta morbidade ao doador, sendo um evento indolor e com baixos custos.<sup>56</sup> Apesar de ser pouco provável o uso clínico dessas células em larga escala, trata-se de uma excelente fonte de CTA para pesquisa.

A densidade de células semeadas nos *scaffolds* pode influenciar o desempenho de reparação do sistema utilizado, porém poucos dados são apresentados na literatura para suportar essa conclusão. Yuan e colaboradores em 2002, demonstraram que *scaffolds* semeados com  $5 \times 10^4$  células mostraram significativamente mais formação óssea quando comparado a *scaffolds* semeados com  $5 \times 10^3$  células. Ainda em 2002, Wilson e colaboradores compararam *scaffolds* com diferentes densidades de semeadura e observaram que *scaffolds* com maior densidade de semeadura promoveram mais neoformação óssea do que *scaffolds* com menor densidade. Tomados em conjunto, esses achados determinaram a densidade de células utilizadas no presente estudo.

Todos os grupos experimentais apresentaram um centro ocupado por tecido fibroso denso, confirmando o que foi determinado por Schimitz e Hollinger (1986). Esses últimos autores estabeleceram o “defeito crítico mínimo” como a “ferida intra-óssea de menor tamanho que não cicatriza espontaneamente durante o tempo de vida do animal” e, portanto, pode ser considerado como o modelo para estudos de neoformação óssea. O defeito crítico mínimo em calota craniana de ratos é circular, com 8mm de diâmetro,<sup>1,59,60</sup> apresentando vantagem em relação aos modelos de defeitos em ossos longos, uma vez que elimina os efeitos do movimento e elimina a necessidade de confecção de dispositivos de fixação interna.<sup>61</sup> O período pós operatório de 60 dias foi determinado com a expectativa de que uma boa variedade de cicatrização óssea entre os grupos seria alcançada. Um período menor poderia acarretar dificuldade na diferenciação da capacidade osteogênica dos materiais utilizados, uma vez que poderia não haver o tempo hábil para o processo inflamatório promover a regeneração.

Embora todos os grupos tratados tenha sido promovida um certo grau de neoformação óssea, o grupo que utilizou as células induzidas em meio osteogênico (grupo III) apresentou maior neoformação. Esse potencial osteogênico coincide com os achados de outros autores.<sup>18,62-64</sup> Esses mesmos autores obtiveram sucesso na promoção da regeneração óssea ao manter as células em meio indutor osteogênico por um período igual ou menor ao presente estudo (14 dias). Esse fato mostra que nesse tempo de incubação a célula já preparou e organizou seu maquinário de síntese, tornando-se capacitada a produzir matriz orgânica óssea.

No presente estudo não foi observada diferença estatística significativa entre a formação óssea encontrada no grupo I em relação ao grupo II, em ambos os grupos uma pequena formação óssea foi observada. Esse fato sugere que a presença física do *scaffold* no defeito ósseo por si só, pode ser capaz de promover a formação óssea a partir do estímulo de células indiferenciadas do perióstio, endóstio e medula óssea, que então se tornam capazes de formar uma pequena porção de tecido ósseo encontrado. O emprego de células submetidas a indução osteogênica associadas aos *scaffolds*, mostrou uma formação óssea estatisticamente maior em relação aos demais grupos. Além da neoformação óssea na região periférica, junto aos bordos de tecido ósseo, que ocorreu nos 3 grupos, no grupo III também pôde-se observar ilhas de tecido dentro da área do defeito, bem como tecido neoformado justaposto ao *scaffold* remanecente. Assim, pode-se atribuir esse fato à presença de células induzidas à linhagem osteoblástica. A observação de restos de biomaterial junto ao tecido neoformado, indica que a formação óssea foi mais acelerada nesses casos do que nos outros grupos, inclusive não permitindo a reabsorção total do material. Esse aspecto mais rápido da regeneração pode ser desejável no caso de cirurgias reparadoras.

O presente estudo obteve sucesso na promoção de regeneração óssea, gerando dados consistentes com outros experimentos envolvendo biomateriais e células-tronco para reparação óssea.<sup>5,17,18,31,64-70</sup> Esses dados estão em acordo com os resultados obtidos por YOON em 2007, que usando o mesmo modelo animal, também constatou uma formação óssea maior quando utilizou células induzidas associadas a *scaffolds*. O diferencial do presente estudo, em



relação ao autor citado, é que naquele estudo os autores utilizaram células-tronco provenientes de tecido adiposo, as quais exigem uma técnica de obtenção mais complexa e uma invasividade cirúrgica, o que não ocorre para o dente esfoliado.

Mesmo com uso de células-tronco mesenquimais humanas, os animais utilizados no presente estudo não foram imunossuprimidos, uma vez que a literatura justifica essa metodologia.<sup>5,71-73</sup> Não foram observadas alterações clínicas em relação à resposta imunológica do hospedeiro pela utilização de células provenientes de uma espécie em outra. Esse fenômeno decorre provavelmente de dois itens: a não expressão de moléculas MHC (*major histocompatibility complex*) de classe dois nas CTM<sup>74</sup> e da baixa vascularização presente no tecido ósseo<sup>75</sup>. Além disso, tem sido sugerido que as CTM tem um efeito imunomodulador, inclusive diminuindo a reação do enxerto contra o hospedeiro, fenômeno que ocorre no transplante de células-tronco hematopoética no transplante de medula óssea.<sup>71,76</sup>

## **Conclusão**

A associação de SCDT com *scaffolds* biodegradáveis de PLGA, quando submetida ao meio osteogênico, é capaz de aumentar significativamente a quantidade de formação óssea em um defeito de 8 milímetros após 60 dias de cicatrização. Assim, a engenharia de tecidos apresenta alternativas para os tratamentos no campo da medicina regenerativa, onde as atuais estratégias cirúrgicas para a reconstrução óssea poderão, em breve, ser aperfeiçoadas por meio da compreensão e utilização de biomateriais e CTA, e o mais importante, em um sistema de enxerto autólogo.

## **Agradecimentos**

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio

Grande do Sul) e IPCT (Instituto de Pesquisa com Células-tronco), que financiaram este projeto.

### **Bibliografia**

1. Takagi, K., and Urist, M.R. The reaction of the dura to bone morphogenetic protein (BMP) in repair of skull defects. *Ann Surg* **196**, 100, 1982.
2. Shang, Q., Wang, Z., Liu, W., Shi, Y., Cui, L., and Cao, Y. Tissue-engineered bone repair of sheep cranial defects with autologous bone marrow stromal cells. *J Craniofac Surg* **12**, 586, 2001.
3. Heng, B.C., Cao, T., Stanton, L.W., Robson, P., and Olsen, B. Strategies for directing the differentiation of stem cells into the osteogenic lineage in vitro. *J Bone Miner Res* **19**, 1379, 2004.
4. Meijer, G.J., De Bruijn, J.D., Koole, R., and Van Blitterswijk, C.A. Cell-based bone tissue engineering. *PloS Med* **4**, 260, 2007.
5. De Mendonça Costa, A., Bueno, D.F., Martins, M.T., Kerkis, I., Kerkis, A., Fanganiello, R.D., *et al.* Reconstruction of large cranial defects in nonimmunosuppressed experimental design with human dental pulp stem cells. *J Craniofac Surg* **19**, 204, 2008.
6. Reichert, J.C., Saifzadeh, S., Wullschleger, M.E., Epari, D.R., Schütz, M.A., Duda, G.N., *et al.* The challenge of establishing preclinical models for segmental bone defect research. *Biomaterials* **30**, 2149, 2009.
7. Conrad, E.U., Ericksen, D.P., Tencer, A.F., Strong, D.M., and Mackenzie, A.P. The effects of freeze-drying and rehydration on cancellous bone. *Clin Orthop Rel Res* **290**, 279, 1993.
8. Lemperle, S.M., Calhoun, C.J., Curran, R.W., and Holmes, R.E. Bone healing of large cranial and mandibular defects protect from soft tissue interposition: a comparative study of spontaneous bone regeneration, osteoconduction, and cancellous autografting in dogs. *Plast Reconstr Surg* **101**, 660, 1998.

- 9 Hardin, C.K. Banked bone. *Otolaryngol Clin North Am* **27**, 911, 1994.
- 10 Ozaki, W., and Buchman, S.R. Volume maintenance of onlay bone graft in the cranial skeleton: microarchitecture versus embryologic origin. *Plast Reconstr Surg* **102**, 291, 1998.
- 11 Angermann, P., and Jepsen, O.B. Procurement, banking and decontamination of bone and collagenous tissue allografts: guidelines for infection control. *J Hosp Infect* **17**, 159, 1991.
- 12 Fukuta, K., Har-Shai, Y., Collares, M.V., Lichten, J.B., and Jackson, I.T. Comparison of inorganic bovine bone mineral particles with porous hydroxyapatite granules and cranial bone dust in the reconstruction of full-thickness skull defect. *J Craniofac Surg* **3**, 25, 1992.
- 13 Ferreira, G.R., Cestari, T.M., Granjeiro, J.M., and Taga, R. Lack of repair of rat skull critical size defect treated with bovine morphometric protein bound to microgranular bioabsorbable hydroxyapatite. *Braz Dent J* **15**, 175, 2004.
- 14 Yoshikawa, T., Iida, J., Ueda, Y., Koizumi, M., Takakura, Y., and Nonomura, A. Bone regeneration by grafting of an autogenous cultured bone/ceramic construct. *J Biomed Mater Res* **15**, 1427, 2003.
- 15 Cheng, M.H., Brey, E.M., Allori, A., Satterfield, W.C., Chang, D.W., Patrick, C.W., *et al.* Ovine model for engineering bone segments. *Tissue Eng* **11**, 214, 2005.
- 16 Chang, S.C., Wei, F.C., Chuang, H., Chen, Y.R., Chen, J.K., Lee, K.C., *et al.* Ex vivo gene therapy in autologous critical-size craniofacial bone regeneration. *Plast Reconstr Surg* **112**, 1841, 2003.
- 17 Zhang, Z.Y., Teoh, S.H., Chong, M.S., Lee, E.S., Tan, L.G., Mattar, C.N., *et al.* Neo-vascularization and bone formation mediated by fetal mesenchymal stem cell tissue-engineered bone grafts in critical-size femoral defects. *Biomaterials* **31**, 608, 2010.
- 18 Yoon, E.M.D., Dhar, S., Chun, D.E., Gharibjanian, N.A., and Evans, G.R. In Vivo Osteogenic Potential of Human Adipose-Derived Stem Cells/Poly Lactide-

Co-Glycolic Acid Constructs for Bone Regeneration in a Rat Critical-Sized Calvarial Defect Model. *Tissue Eng* **13**, 619, 2007.

- 19 Bruder, S.P., Kraus, K.H., Goldberg, V.M., and Kadiyala, S. The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. *J Bone Joint Surg A* **80**, 985, 1998.
- 20 Schantz, J.T., Hutmacher, D.W., Lam, C.X., Brinkmann, M., Wong, K.M., Lim, T.C., *et al.* Repair of calvarial defects with customised tissue engineered grafts II. Evaluation of cellular efficiency and efficacy in vivo. *Tissue Eng*: **9**, 127, 2003.
- 21 Xiao, Y., Qian, H., Young, W.G., and Bartold, P.M. Tissue engineering for bone regeneration using differentiated alveolar bone cells in collagen scaffolds. *Tissue Eng* **9**, 1167, 2003.
- 22 Abukawa, H., Shin, M., Williams, W.B., Vacanti, J.P., Kaban, L.B., and Troulis M.J. Reconstruction of mandibular defects with autologous tissue-engineered bone. *J Oral Maxillofac Surg* **62**, 601, 2004.
- 23 de Kok, I.J., Drapeau, S.J., Young, R., and Cooper, L.F. Evaluation of mesenchymal stem cells following implantation in alveolar sockets: A canine safety study. *Int J Oral Maxillofacial Impl* **20**, 511, 2005.
- 24 Ito, K., Yamada, Y., Nagasaka, T., Baba, S., and Ueda, M. Osteogenic potential of injectable tissue-engineered bone: a comparison among autogenous bone, bone substitute (Bio-oss), platelet-rich plasma, and tissue engineered bone with respect to their mechanical and histologic findings. *J Biomed Mater Res* **73**, 63, 2005.
- 25 Ohya, M., Yamada, Y., Ozawa, R., Ito, K., Takahashi, M., and Ueda, M. Sinus floor elevation applied tissue-engineered bone. Comparative study between mesenchymal stem cells/platelet-rich plasma (PRP) and autogenous bone with PRP complexes in rabbits. *Clin Oral Impl Res* **16**, 622, 2005.
- 26 Ren, T., Ren, J., Jia, X., and Pan, K. The bone formation in vitro and mandibular defect repair using PLGA porous scaffolds. *J Biomed Mater Res A* **74**, 562, 2005.

- 27 Wu, W., Chen, X., Mao, T., Chen, F., and Feng, X. Bone marrow-derived osteoblasts seeded into porous beta-tricalcium phosphate to repair segmental defect in canine's mandibula. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg* **12**, 268, 2006.
- 28 Xi, Q., Bu, R.F., Liu, H.C., and Mao, T.Q. Reconstruction of caprine Mandibular segmental defect by tissue engineered bone reinforced by titanium reticulum. *Chin J Traumatol* **9**, 67, 2006.
- 29 Yuan J, Cui L, Zhang WJ, Liu W, and Cao Y. Repair of canine Mandibular bone defects with bone marrow stromal cells and porous beta-tricalcium phosphate. *Biomaterials* **28**, 1005, 2007.
- 30 Marei, M.K., Nouh, S.R., Saad, M.M., and Ismail, N.S. Preservation and regeneration of alveolar bone by tissue-engineered implants. *Tissue Eng* **11**, 751, 2005.
- 31 Schliephake, H., Knebel, J., Aufderheide, M., and Tauscher, M. Use of cultivated osteoprogenitor cells to increase bone formation in segmental mandibular defects - an experimental pilot study in mini pigs. *Int J Oral Maxillofac Surg* **30**, 531, 2001.
- 32 Edwards, P.C., Ruggiero, S., Fantasia, J., Burakoff, R., Moorji, S.M., Paric, E., *et al.* Sonic hedgehog gene-enhanced tissue engineering for bone regeneration. *Gene Ther* **12**, 75, 2005.
- 33 Bernardi, L., Luisi, S.B., Fernandes, R., Dalberto, T.P., Valentim, L., Chies, J.A.B., *et al.* The isolation of stem cells from human deciduous teeth pulp is related to the physiological process of resorption. *J Endod* **37**, 973, 2011.
- 34 Sylvester, K.G., and Longaker, M.T. Stem Cells: Review and Update. *Arch Surg* **139**, 93, 2004.
- 35 Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P.G., and Shi, S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 13625, 2000.

- 36 Caterson, E.J., Nesti, L.J., Albert, T., Danielson, K., and Tuan, R. Application of mesenchymal stem cells in the regeneration of musculoskeletal tissues. *MedGenMed* **5**, E1, 2001.
- 37 Yamaguchi, M., Hirayama, F., Kanai, M., Sato, N., Fukazawa, K., Yamashita, K., *et al.* Serum-free coculture for ex-vivo expansion of human cord blood primitive progenitors and SCID mouse-reconstituting cells using human bone marrow primary stromal cells. *Exp Hematol* **29**, 174, 2001.
- 38 Yamaguchi M, Hirayama F, Kanai M, Sato N, Fukazawa K, Yamashita K, *et al.* Induction of umbilical cord blood mesenchymal stem cells into neuron-like cells in vitro. *Int J Hematol* **78**, 256, 2003.
- 39 Miura, M., Gronthos, S., Zhao, M., Lu, B., Fisher, L.W., Robey, P.G., *et al.* SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 5807, 2003.
- 40 Romanov, Y.A., Svintsitskaya, V.A., and Smirnov, V.N. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cells* **21**, 105, 2003.
- 41 Seo, B.M., Miura, M., Gronthos, S., Bartold, P.M., Batouli, S., Brahimi, J., *et al.* Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* **364**, 149, 2004.
- 42 Ju, X.L., Huang, Z.W., Shi, Q., Hou, H.S., and Duan, C.H. Biological characteristics and induced differentiation ability of in vitro expanded umbilical cord blood mesenchymal stem cells. *Zhonghua Er Ke Za Zhi* **43**, 499, 2005.
- 43 Morscbeck, C., Götz, W., Schierholz, J., Zeilhofer, F., Kühn, U., Möhl, C., *et al.* Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol* **24**, 155, 2005.
- 44 Hu, B., Unda, F., Bopp-Kuchler, S., Jimenez, L., Wang, X.J., Häikel, Y., *et al.* Bone Marrow Cells Can Give Rise to Ameloblast-like Cells. *J Dent Res* **85**, 416, 2006.

- 45 Kerkis, I., Kerkis, A., Dozortsev, D., Stukart-Parsons, G.C., Massironi, S.M.G., Pereira, L.V., *et al.* Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. *Cells Tissues Organs* **184**, 105, 2006.
- 46 Pranke, P., Hendriks, J., Alespeiti, G., Nardi, N., Rubinstein, P., and Visser, J. Comparative quantification of umbilical cord blood CD34+ and CD34+ bright cells using the ProCount-BD and ISHAGE protocols. *Braz J Med Biol Res* **39**, 901, 2006.
- 47 Yu, J., Wang, Y., Deng, Z., Tang, L., Li, Y., Shi, J., *et al.* Odontogenic capability: bone marrow stromal stem cells versus dental pulp stem cells. *Biol Cell* **99**, 465, 2007.
- 48 Secco, M., Zucconi, E., Vieira, N.M., Fogaça, L.L., Cerqueira, A., Carvalho, M.D., *et al.* Multipotent Stem Cells from Umbilical Cord: Cord Is Richer than Blood! *Stem Cells* **26**, 146, 2008.
- 49 Agorogiannis, G.I., Alexaki, V.I., Castana, O., and Kymionis, G.D. Topical application of autologous adipose-derived mesenchymal stem cells (MSCs) for persistent sterile corneal epithelial defect. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **20**, 2006.
- 50 Park, S.J., Lee, K.W., Lim, D.S., and Lee, S. The sulfated polysaccharide fucoidan stimulates osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells. *Stem Cells Dev* **3**, 2011.
- 51 Ra, J.C., Kang, S.K., Shin, I.S., Park, H.G., Joo, S.A., Kim, J.G., *et al.* Stem cell treatment for patients with autoimmune disease by systemic infusion of culture-expanded autologous adipose tissue derived mesenchymal stem cells. *J Transl Med* **21**, 181, 2011.
- 52 Nakamura, S., Yamada, Y., Katagiri, W., Sugito, T., Ito, K., and Ueda, M. Stem cell proliferation pathways comparison between human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells by gene expression profile from promising dental pulp. *J Endod* **35**, 1536, 2009.

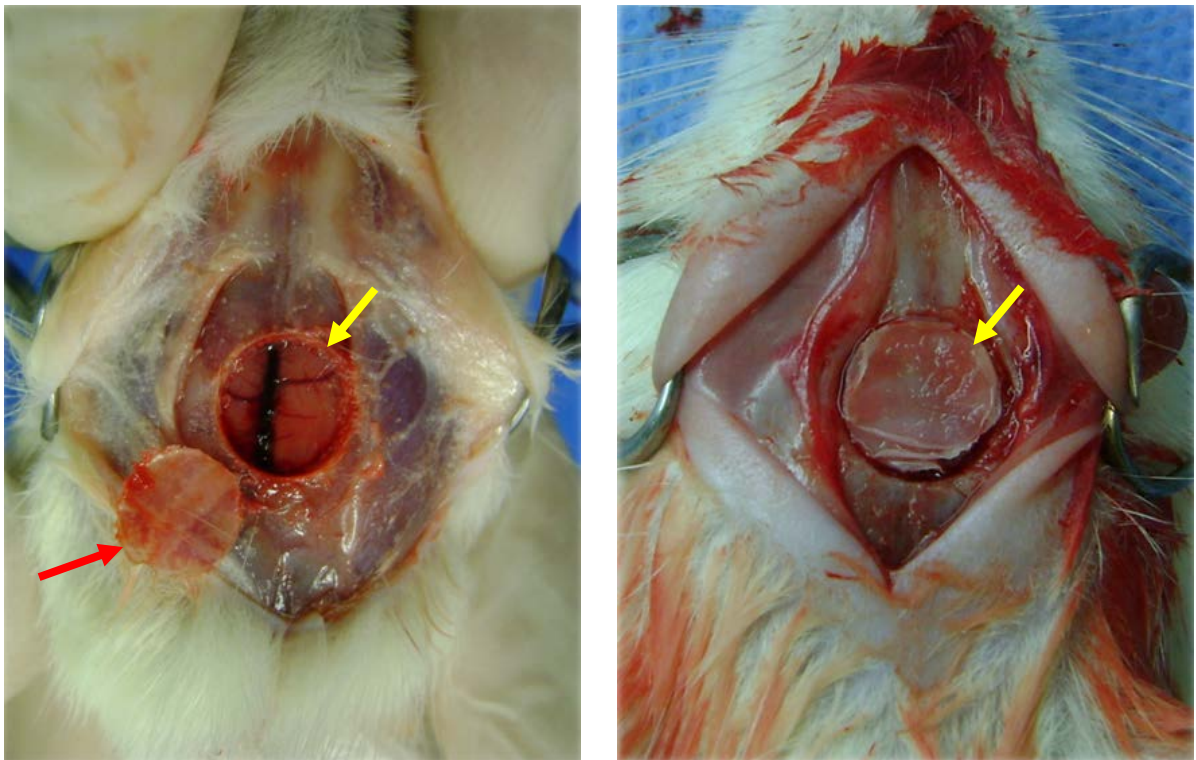
- 53 Lu, J.Y., Gao, J., Ma, D.D., and Chen, T. Stem cell factor promotes the proliferation and osteogenic differentiation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* **31**, 531, 2011.
- 54 Taghipour, Z., Karbalaie, K., Kiani, A., Niapour, A., Bahramian, H., Esfahani, M.H.N., *et al.* Transplantation of Undifferentiated and Induced Human Exfoliated Deciduous Teeth-derived Stem Cells Promote Functional Recovery of Rat Spinal Cord Contusion Injury Model. *Stem Cells Dev* **4**, 2011.
- 55 Bucci, E., and Zarone, F. Root resorption. I. Physiological rhizolysis. *Minerva Stomatol* **33**, 779, 1984.
- 56 Seo, B.M., Sonoyama, W., Yamaza, T., Coppe, C., Kikuri, T., Akiyama, K., *et al.* SHED repair critical-size calvarial defects in mice. *Oral Dis* **14**, 428, 2008.
- 57 Yuan, H., Van Den Doel, M., Li, S., Van Blitterswijk, C.A., De Groot, K., and De Bruijn, J.D. A comparison of the osteoinductive potential of two calcium phosphate ceramics implanted intramuscularly in goats. *J Mater Sci Mater Med* **13**, 1271, 2002.
- 58 Wilson, C.E., Dhert, W.J.A., Van Blitterswijk, C.A., Verbout, A.J., and de Bruijn, J.D. Evaluating 3D bone tissue engineered constructs with different seeding densities using the alamarBlue assay and the effect on in vivo bone formation. *J Mater Sci Mater Med* **13**, 1265, 2002.
- 59 Schmitz, J.P., and Hollinger, J.O. The critical size defects as an experimental model for craniomandibularfacial nonunions. *Clin Orthop Rel Res* **205**, 299, 1986.
- 60 Schmitz, J.P., Schwartz, Z., Hollinger, J.O., and Boyan, B.D. Characterization of rat calvarial nonunion defects. *Acta Anat* **138**, 185, 1990.
- 61 Wang, J., Mah, J., Glimcher, M., and Salih, E. Biochemical changes during new bone formation in the cranial and subcutaneous tissue environments. In: Davidovitch, Z., and Mah, J., eds. *Biological Mechanisms of Tooth Eruption, Resorption and Replacement by Implants*. Birmingham, AL: Harvard Society for the Advancement of Orthodontics, EBSCO Media, 123, 1998.



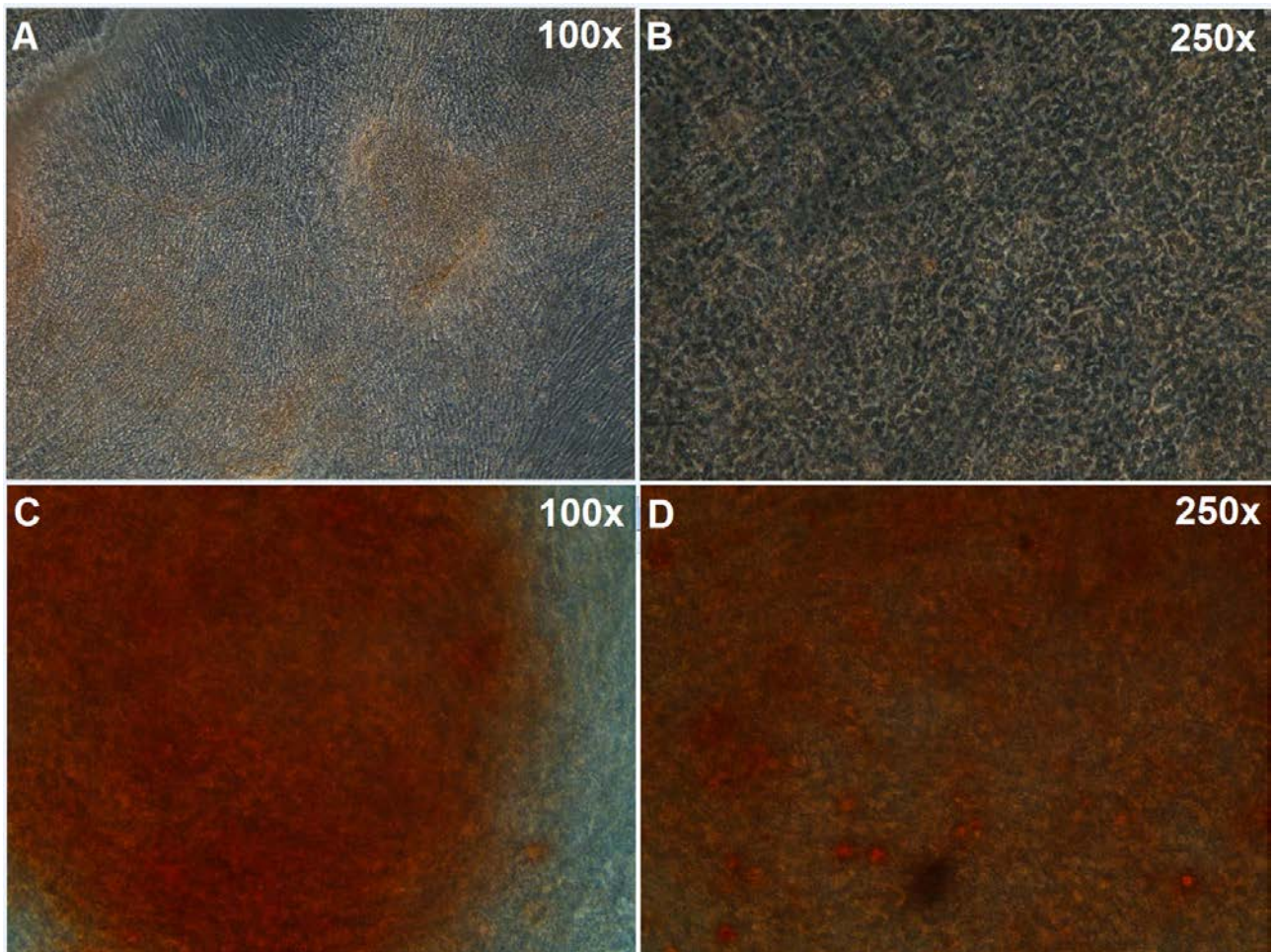
- 62 Viateau, V., Guillemin, G., Bousson, V., Oudina, K., Hannouche, D., Sedel, L., *et al.* Long-bone critical-size defects treated with tissue-engineered grafts: a study on sheep. *J Orthop Res* **25**, 741, 2007.
- 63 Zheng, Y., Liu, Y., Zhang, C.M., Zhang, H.Y., Li, W.H., Shi, S., *et al.* Stem cells from deciduous tooth repair mandibular defect in swine. *J Dent Res* **88**, 249, 2009.
- 64 Lippens, E., Vertenten, G., Gironès, J., Declercq, H., Saunders, J., Luyten, J., *et al.* Evaluation of bone regeneration with an injectable, in situ polymerizable Pluronic F127 hydrogel derivative combined with autologous mesenchymal stem cells in a goat tibia defect model. *Tissue Eng Part A* **16**, 617, 2010.
- 65 Kim, S.S., Park, M.S., Jeon, O., Choi C.Y., and Kim, B.S. Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* **27**, 1399, 2006.
- 66 Dong, S.W., Ying, D.J., Duan, X.J., Xie, Z., Yu, Z.J., Zhu, C.H., *et al.* Bone regeneration using a acellular extracellular matrix and bone marrow mesenchymal stem cell expressing Cbfa 1. *Biosci Biotechnol Biochem* **73**, 2226, 2009.
- 67 Kang, J.M., Kang, S.W., La, W.G., Yang, Y.S., and Kim, B.S. Enhancement of in vivo bone regeneration efficacy of osteogenically undifferentiated human cord blood mesenchymal stem cells. *J Biomed Mater Res A* **93**, 666, 2010.
- 68 Niemeyer, P., Szalay, K., Luginbühl, R., Südkamp, N.P., and Kasten, P. Transplantation of human mesenchymal stem cells in a nonautogenous setting for bone regeneration in a rabbit critical-size defect model. *Acta Biomaterialia* **6**, 900, 2010.
- 69 Lin, C.Y., Chang, Y.H., Lin, K.J., Yen, T.C., Tai, C.L., Chen, C.Y., *et al.* The healing of critical-sized femoral segmental bone defects in rabbits using baculovirus-engineered mesenchymal stem cells. *Biomaterials* **31**, 3222, 2010.
- 70 Ben-David, D., Kizhner, T., Livne, E., and Srouji, S. A tissue-like construct of human bone marrow MSCs composite scaffold support in vivo ectopic bone formation. *J Tissue Eng Regen Med* **4**, 30, 2010.

- 71 Pierdomenico, L., Bonsi, L., Calvitti, M., Rondelli, D., Arpinati, M., Chirumbolo, G., *et al.* Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. *Transplantation* **27**, 836, 2005.
- 72 Kerkis, I., Ambrosio, C.E., Kerkis, A., Martins, D.S., Zucconi, E., Fonseca, A.S.S., *et al.* Early transplantation of human immature dental pulp stem cells from baby teeth to golden retriever muscular dystrophy (GRMD) dogs: Local or systemic? *J Transl Med* **3**, 6, 2008.
- 73 Monteiro, B.G., Serafim, R.C., Melo, G.B., Silva, M.C., Lizier, N.F., Maranduba, C.M., *et al.* Human immature dental pulp stem cells share key characteristic features with limbal stem cells. *Cell Prolif* **42**, 587, 2009.
- 74 Le, B.K., and Ringden, O. Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* **11**, 321, 2005.
- 75 Mokbel, N., Serhal, C.B., Matni, G., and Naaman, N. Healing patterns of critical size bony defects in rat following bone graft. *Oral Maxillofac Surg* **12**, 73, 2008.
- 76 Krstevska, S., Genadieva-Stavric, S., Pivkova, A., Stojanovski, Z., Georgievski, B., and Balkanov, T. Acute graft versus host disease in hematopoietic stem cell allotransplant recipients. *Med Arh* **65**, 260, 2011.

## Figuras do Artigo

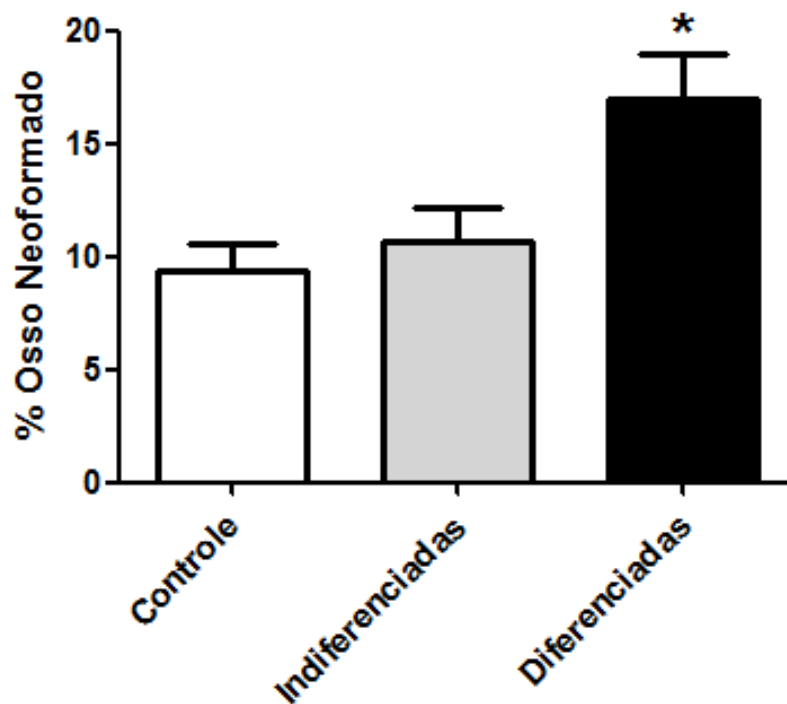


**Figura 1.** Em A, o defeito ósseo crítico de 8 mm de diâmetro confeccionado na calota craniana de cada animal ( seta amarela) e o tecido ósseo removido pela ostectomia (seta vermelha). Em B, o defeito preenchido com 3 scaffolds empilhados (seta amarela).

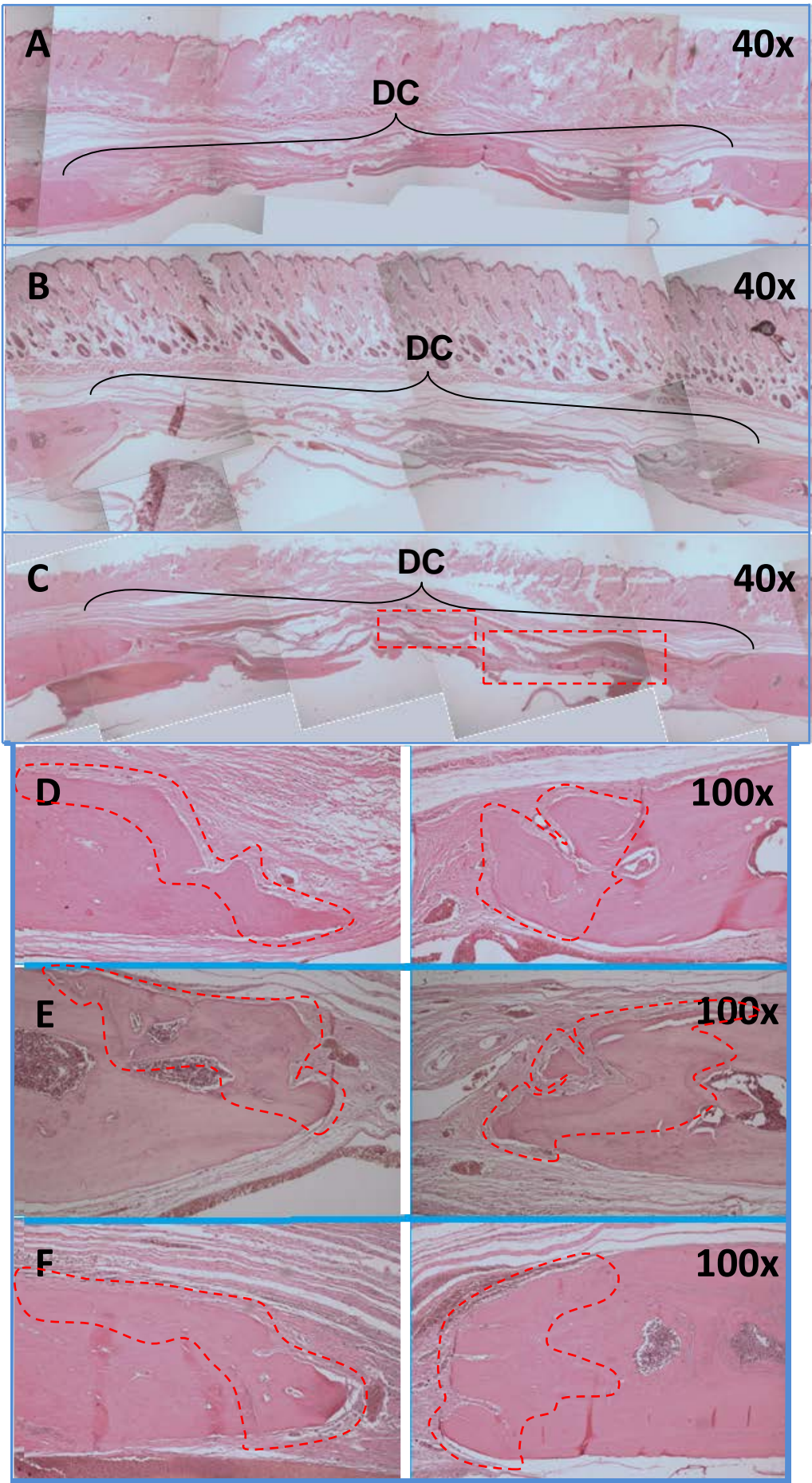


**Figura 2.** Imagens capturadas em microscópio de luz invertido. Imagens A e B, com aumentos de 100x e 250x respectivamente, mostrando o grupo controle sem marcação para *Alizarin Red*. Imagens C e D, com aumentos de 100x e 250x respectivamente, mostrando o grupo teste com marcação positiva para *Alizarin Red*.

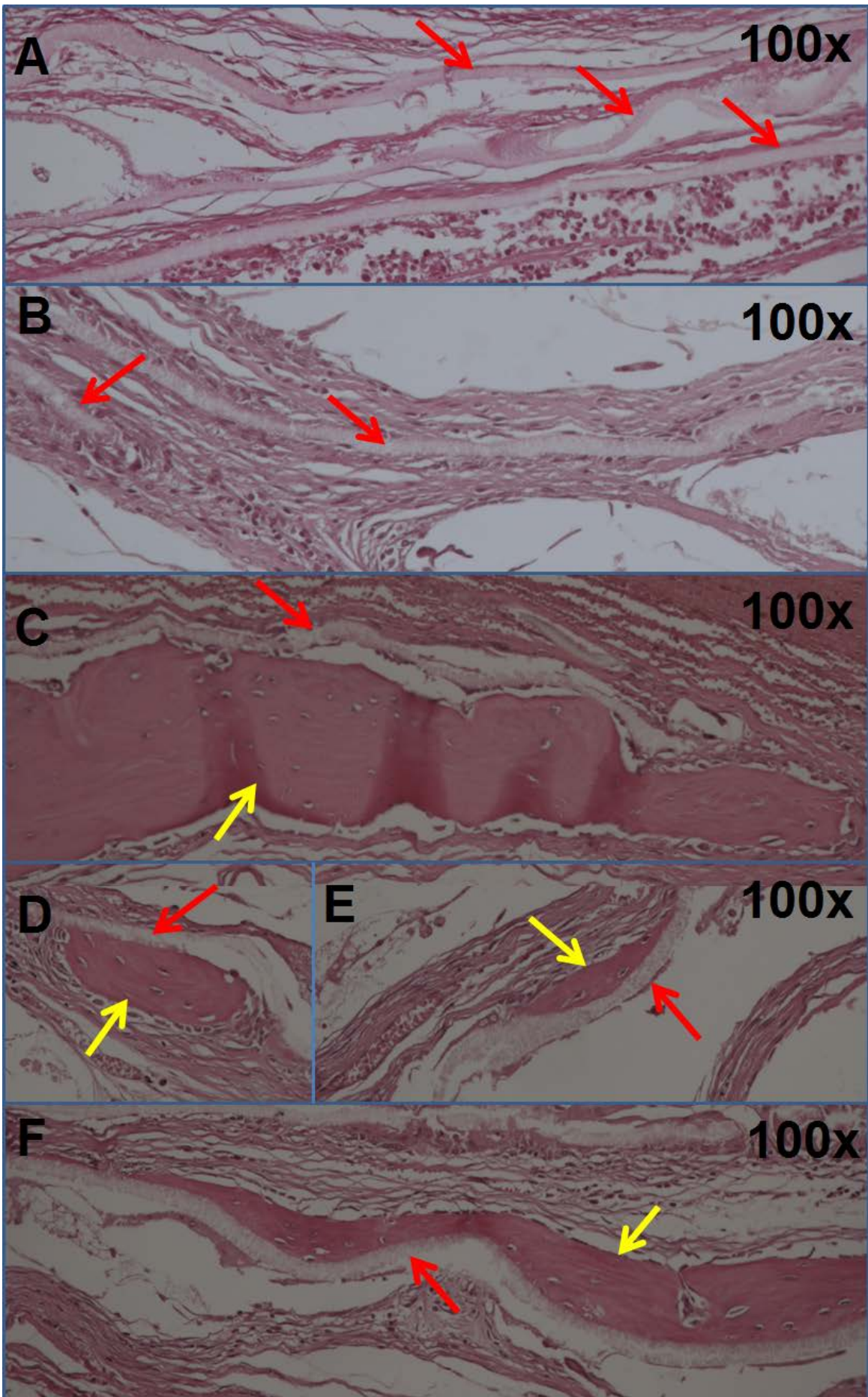
### Histomorfometria



**Figura 3.** Análise histomorfométrica. Gráfico demonstrando uma maior neoformação óssea no grupo III, onde se utilizou células mantidas em meio osteogênico, em relação aos demais grupos experimentais. Neoformação de  $9,39 \pm 2,55\%$ ,  $10,7 \pm 3,22\%$  e  $17 \pm 4,31\%$  nos grupos I, II e III respectivamente.

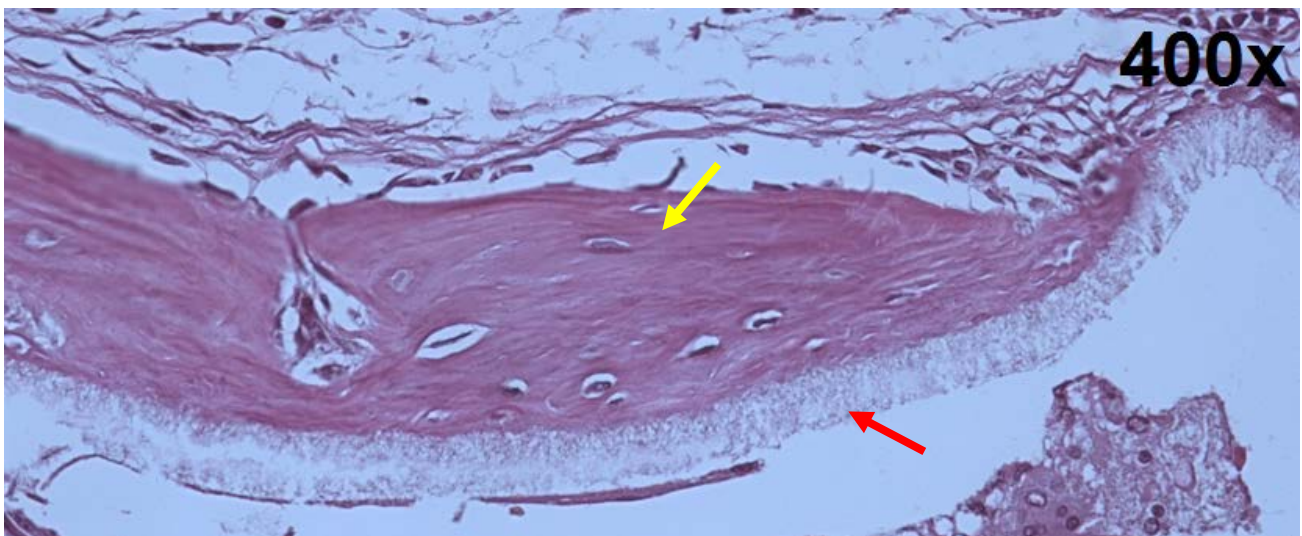


**Figura 4.** Imagens capturadas com câmera acoplada em microscópio ótico de luz. Imagem A e B, grupos I e II respectivamente, não se observa tecido ósseo no interior do defeito crítico (DC). Imagem C (grupo III) com retângulos evidenciando regiões de neoformação óssea como “ilhas” no interior do defeito crítico. Imagens D, E e F, grupos I, II e III respectivamente, contornando os locais de neoformação óssea na região dos bordos de tecido ósseo.





**Figura 5.** Imagens capturadas com câmera acoplada em microscópio ótico de luz. Imagens A e B, grupo I e II respectivamente, mostrando *scaffolds* (setas vermelhas) não reabsorvidos e sem tecido ósseo ancorado. Imagens C, D, E e F evidenciando neoformação óssea (flechas amarelas) ancorada nos *scaffolds* (flechas vermelhas) ocorrida na região central do defeito crítico, fato que somente ocorreu em amostras do grupo III.



**Figura 6.** Imagem capturada com câmera acoplada em microscópio ótico de luz. Imagem evidenciando neoformação óssea (flecha amarela) ancorada em um *scaffold* (flecha vermelha) ocorrida na região central do defeito crítico de amostra do grupo III.

## Considerações Finais

Atualmente, situações onde as perdas ósseas irreversíveis ocorrem representam um desafio à cirurgia reparadora, uma vez que as fontes de enxertos ósseos disponíveis possuem limitações físicas, químicas e biológicas, além das dificuldades que se referem à técnica. Quando se aborda tais limitações, não se pensa em contra-indicar essas fontes, pelo contrário, tratam-se de alternativas clínicas viáveis, sendo muitas delas consagradas pela literatura. Por outro lado, as pesquisas na busca por alternativas com cada vez menos limitações, ou ideais, devem existir. Nesse contexto, a bioengenharia estuda novas formas de produção de tecidos para uso na medicina regenerativa por meio de biomateriais e terapia celular, buscando a regeneração tecidual em um sistema autólogo.

No presente trabalho, pôde-se verificar que *scaffolds* de PLGA, produzidos pela técnica de *electrospinning*, foram fabricados e caracterizados com sucesso quanto as suas propriedades morfológicas. Tais *scaffolds* apresentaram características adequadas e compatíveis com as descritas pela literatura, podendo, portanto, ser empregados nas etapas seguintes do estudo.

Na etapa seguinte, o isolamento de cinco amostras de *Stem Cell from Deciduous Tooth* (SCDT) em processo de rizólise, foi realizado, as quais foram cultivadas até atingirem entre 5<sup>a</sup> e 7<sup>a</sup> passagem, momento no qual foram empregadas no estudo. Ao realizar os estudos de interação entre SCDT e *scaffolds*, verificou-se que o desempenho das SCDT mostrou-se semelhante para a situação onde foram semeadas em *scaffolds* de PLGA (teste) e placas de cultura (controle). Pelo ensaio de adesão celular, observou-se que não houve diferença estatística em relação ao número de células aderidas por campo em ambos os grupos. Pela análise da viabilidade celular ao longo dos 21 dias de cultivo, pôde-se verificar que o desempenho das SCDT semeadas nas situações teste e controle mostraram-se semelhantes, não havendo diferença estatística entre ambos os grupos. A partir dos dados obtidos, conclui-se que os *scaffolds* permitem que as SCDT realizem sua adesão inicial, e tão importante quanto esse fato, as SCDT são capazes de realizar a sua

proliferação e manutenção ao longo do tempo, quando semeadas nos *scaffolds*.

Com os dados favoráveis em relação à morfologia dos *scaffolds* e interação *scaffold/SCDT*, partiu-se para a etapa de aplicação *in vivo*, onde o objetivo foi avaliar a capacidade da associação *scaffolds/SCDT* em promover neoformação óssea em ratos. A seleção da calota craniana de ratos como modelo experimental se deu pela facilidade de manipulação do animal, adequado acesso ao tecido ósseo, devido à ausência de camadas musculares, e boas condições de estabilização do ferimento pós-operatório.

Decorrido 60 dias do pós-operatório, foi realizada a análise histométrica das calotas, a qual avaliou a quantidade de tecido ósseo formado no interior do defeito produzido. Observou-se que a associação *scaffold/SCDT* mantida em meio osteogênico previamente à implantação apresentou uma maior neoformação óssea em relação aos demais grupos, sendo esta diferença estatisticamente significativa. Esse dado concorda com outros estudos, onde quando comparado biomateriais associados com células-tronco (CT) indiferenciadas e CT diferenciadas em meio osteogênico, demonstrou-se uma maior capacidade de promoção da reparação óssea com CT diferenciadas (Viateau, 2007; Zheng, 2009; Yoon, 2007; Keogh, 2010; Lippens, 2010).

Em vista dos resultados obtidos, conclui-se que, obedecidos os parâmetros utilizados, os *scaffolds* de PLGA apresentam resultados favoráveis em relação à interação com as SCDT. Ainda, a utilização de *scaffold/SCDT* diferenciados em meio de diferenciação osteogênico, prévio a implantação no animal, mostrou que essa associação possui a capacidade de promover reparação óssea, sendo a sua utilização adequada para o uso na medicina regenerativa.

## Perspectivas

Os *scaffolds* do presente trabalho foram produzidos pela técnica de *electrospinning*, a qual permite a agregação de diferentes compostos na solução precursora das nanofibras. Dessa maneira, pensa-se em investigar o potencial de promoção da reparação óssea pela incorporação na composição das nanofibras de:

- hidroxiapatita em partículas nanométricas;
  
- proteína morfogenética óssea – *bone morphogenetic protein 2* (BMP-2).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUKAWA, H. et. al. Reconstruction of mandibular defects with autologous tissue-engineered bone. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 62, n. 5, p. 601-6, may. 2004.

AGARWAL, S.; WENDORFF, J. H.; GREINER, A. Progress in the field of electrospinning for tissue engineering applications. **Adv Mater**, v.21, n. 32-33, p. 3343-51, sep. 2009.

AGOROGIANNIS, G. I. et al. Topical application of autologous adipose-derived mesenchymal stem cells (MSCs) for persistent sterile corneal epithelial defect. **Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol**, 2011. v.20

ANDREWS, K. D.; HUNT, J. A.; BLACK, R. A. Effects of sterilisation method on surface topography and in-vitro cell behaviour of electrostatically spun scaffolds. **Biomaterials**, v. 28, n. 6, p.1014-26, feb. 2007.

ANGERMANN, P.; JEPSEN, O. B. Procurement, banking and decontamination of bone and collagenous tissue allografts: guidelines for infection control. **J Hosp Infect**, v.17, n. 3, p. 159-69, mar. 1991.

ASCHERMAN, J. A. et al. Reconstruction of cranial bone defects using a quick-setting hydroxyapatite cement and absorbable plates. **J Craniofac Surg**, v.19, n.4, p.1131-5, jul. 2008.

BARBANTI, S. H.; ZAVAGLIA, C. A. C.; DUEK E. A. R. Polímeros reabsorvíveis na engenharia de tecidos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, n. 1, p. 13-21, 2005.

BARKER, A.T.; LUNT, M. J. The effects of pulsed magnetic fields os the type used in the simulation of bone fracture healing. **Clin Phys Physiol Meas**. v. 4, n. 1, p. 1-27, feb. 1983.

BEN-DAVID, D.; et al. A tissue-like construct of human bone marrow MSCs composite scaffold support in vivo ectopic bone formation. **J Tissue Eng Regen Med**, v. 4, n. 1, p.30-7, jan. 2010.

BERNARDI, L. et al. The isolation of stem cells from human deciduous teeth pulp is related to the physiological process of resorption. **J Endod**, v. 37, n. 7, p.973-9, jul. 2011.

BOSCH, C.; MELSEN, B.; VARGERVIK, K. Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials. **J Craniofac Surg**, v. 9, n. 4, p. 310-6, jul. 1998.

BOUDRIOT, U. et al. Role of electrospun nanofibers in stem cell technologies and tissue engineering. **Macromol Symp**, v. 225, n. 1, p 9-16, may. 2005.

BRANDÃO, A. C. Histomorphometric analysis of rat alveolar wound healing with hydroxyapatite alone or associated to BMPs. **Braz Dent J**, v. 13, n. 3, p. 147-54, 2002.

BRODIE, J. C. et al. Osteoblast interactions with calcium phosphate ceramics modified by coating with type I collagen. **J Biomed Mater Res A**, v. 73, n. 4, p. 409-21, jun. 2005.

BRUDER, S. P. et al. The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. **J Bone Joint Surg Am**, v. 80, n. 7, p.985-96, jul. 1998.

BUCCI, E.; ZARONE, F. Root resorption. I. Physiological rhizolysis. **Minerva Stomatol**, v. 33, n. 5, p. 779-82, sep.-oct. 1984.

CAREY, L. E. et al. Premixed rapid-setting calcium phosphate composites for bone repair. **Biomaterials**, v. 26, n. 24, p. 5002-14, aug. 2005.

CATERSON, E. J. et al. Application of mesenchymal stem cells in the regeneration of musculoskeletal tissues. **MedGenMed**, v. 5, n.E1, feb. 2001.

CHANG, S. C. et al. Ex vivo gene therapy in autologous critical-size craniofacial bone regeneration. **Plast Reconstr Surg**, v. 112, n. 7, p. 1841-50, dec. 2003.

CHENG, M. H. et al. Ovine model for engineering bone segments. **Tissue Eng**, v. 11, n. 1-2, p.214-25, Jan.-Feb. 2005.

CONRAD, C.; HUSS, R. Adult stem cell lines in regenerative medicine and reconstructive surgery. **J Surg Res**, v. 124, n. 2, p. 201-8, 2005.

CONRAD, E. U. et al. The effects of freeze-drying and rehydration on cancellous bone. **Clin Orthop Relat Res**, n. 290, p. 279-84, may.1993.

CONSOLARO A. Reabsorção Dentária Fisiológica: a rizólise dos dentes decíduos. In:\_\_\_**Reabsorções Dentárias nas Especialidades Clínicas**. Maringá: Dental Press. p. 203-219, 2007.

COSTA, A. de M. et al. Reconstruction of large cranial defects in nonimmunosuppressed experimental design with human dental pulp stem cells. **J Craniofac Surg**, v. 19, n. 1, p. 204-10, jan. 2008.

DEL CARLO, R. J. D. et al. Polímero derivado da mamona acrescido de cálcio, associando ou não à medula óssea autógena na reparação de falhas ósseas. **Ciência Rural**, v.33, n.6, p.1081-1083. 2003.

DE KOK, I. J. et al. Evaluation of mesenchymal stem cells following implantation in alveolar sockets: A canine safety study. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 20, n. 4, p. 511-8, jul.-aug. 2005.

DONG, S. W. et al. Bone regeneration using a acellular extracelular matrix and bone marrow mesenchymal stem cell expressing Cbfa 1. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 73, n. 10, p. 2226-33, oct. 2009.



DUALIBI et al. Bioengineered teeth from cultures rat tooth bud cells. **J Dent Res**, v. 83, n. 7, p. 523-8, 2004.

EDWARDS, P. C. et al. Sonic hedgehog gene-enhanced tissue engineering for bone regeneration. **Gene Ther**, v. 12, n. 75, 2005.

FAGUNDES, D. J.; TAHA, M. O. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. **Acta Cir Bras**, v.19, n.1, p.59-65. 2004.

FERREIRA, J. C. R. **Avaliação cintilográfica e histopatológica de transplantes ósseos autogenos, homogenos frescos e homogenos congelados do arco zigomatico.** Estudo experimental em coelhos (Tese de Doutorado). São Paulo: Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina; 1997. 128p.

FERREIRA, G. R. et al. Lack of repair of rat skull critical size defect treated with bovine morphometric protein bound to microgranular bioabsorbable hydroxyapatite. **Braz Dent J**, v. 15, n. 175, 2004.

FIGUEIREDO, J. A. P.; BREW, C. M. **Histologia Geral para a Odontologia.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

FORBES, S. J. et al. Adult stem cell plasticity: new pathways of tissue regeneration become visible. **Clin Sci (Lond)**, London, v. 103, n.4, p. 355-69. oct. 2002.

FUKUTA, K. et al. Comparison of inorganic bovine bone mineral particles with porous hydroxyapatite granules and cranial bone dust in the reconstruction of full-thickness skull defect. **J Craniofac Surg**, v. 3, n. 25, 1992.

GIORDANO, V. et al. Influência do laser de baixa energia no processo de consolidação de fratura de tíbia: estudo experimental em ratos. **Rev. Bras Ortop**, v. 36, n.5, p.174-178. 2001.

GISEP, A. et al. Mechanical characterization of bone defect model filled with ceramic cements. **J Mater Sci Mater Med**, v.15, n.10, Oct, p.1065-71. 2004.

GOESSLER, U. R.; HORMANN, K.; RIEDEL, F. Tissue engineering with adult stem cells in reconstructive surgery. **Int J Mol Med**, v. 15, n. 6, p. 899-905, 2005.

GOSAIN, A. K. et al. Osteogenesis in cranial defects: reassessment of the concept of critical size and the expression of TGF-beta isoforms. **Plast Reconstr Surg**, v. 106, n. 2, p. 360-71, discussion 372. aug. 2000.

GOSAIN, A. K. et al. A 1-year study of osteoinduction in hydroxyapatite-derived biomaterials in an adult sheep model: part II. Bioengineering implants to optimize bone replacement in reconstruction of cranial defects. **Plast Reconstr Surg**, v.114, n.5, p.1155-63, discussion 1164-5, oct. 2004.

GROGER, A. et al. Tissue engineering of bone for mandibular augmentation in immunocompetent minipigs: preliminary study. **Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg**, v. 37, p. 129-133, 2003.

GRONTHOS, S. et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 13625, 2000.

HADDAD, A. J. et al. Closure of rabbit calvarial critical-sized defects using protective composite allogenic and alloplastic bone substitutes. **J Craniofac Surg**, v. 17, n. 5, p. 926-34, sep. 2006.

HALL, P. A.; WATT, F. M. Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity. **Development**, London, v. 106, n. 4, p. 619-33, ago. 1999.

HARDIN, C.K. **Banked bone**. *Otolaryngol Clin North Am*, 1994. v. 27, 911p.

HE, W, et al. Fabrication of collagen-coated biodegradable polymer nanofiber mesh and its potential for endothelial cells growth. **Biomaterials**, v. 26, p. 7606-15, 2005.

HENG, B.C. et al. Strategies for directing the differentiation of stem cells into the osteogenic lineage in vitro. **J Bone Miner Res**, v. 19, n. 1379, 2004.

HOU, L. et al. Induction of umbilical cord blood mesenchymal stem cells into neuron-like cells in vitro. **Int J Hematol**, v. 78, n. 3, p. 256-61, 2003.

HU, B. et al. Bone Marrow Cells Can Give Rise to Ameloblast-like Cells. **J Dent Res**, v. 85, n. 416, 2006.

HUANG, Z. M. et al. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. **Compos Sci Technol**, v. 63, p. 2223-2253, 2003.

ITO, K. et al. Osteogenic potential of injectable tissue-engineered bone: a comparison among autogenous bone, bone substitute (Bio-oss), platelet-rich plasma, and tissueengineered bone with respect to their mechanical and histologic findings. **J Biomed Mater Res**, v.73, n. 63, 2005.

JONES, N. C.; TRAINOR, P. A. The Therapeutic Potential Of Stem Cells In The Treatment Of Craniofacial Abnormalities. **Expert Opinion Biol Ther**, v. 4, n. 5, p. 645-57, 2004.

JU, X. L. et al. Biological characteristics and induced differentiation ability of in vitro expanded umbilical cord blood mesenchymal stem cells. **Zhonghua Er Ke Za Zhi**, v. 43, n. 499, 2005.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KANG, J.M. Enhancement of in vivo bone regeneration efficacy of osteogenically undifferentiated human cord blood mesenchymal stem cells. **J Biomed Mater Res A**, v. 93, n. 666, 2010.

KATCHBURIAN, E.; ARANA, V. **Histologia e Embriologia Oral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

KERKIS, I. et al. Early transplantation of human immature dental pulp stem cells from baby teeth to golden retriever muscular dystrophy (GRMD) dogs: Local or systemic? **J Transl Med**, v. 3, n. 6, 2008.

KERKIS, I. et al. Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. **Cells Tissues Organs**, v. 184, n. 105, 2006.

KIM, S. S. et al. Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 27, n. 1399, 2006.

KRSTEVSKA, S. Acute graft versus host disease in hematopoietic stem cell allotransplant recipients. **Med Arh**, v. 65, n. 260, 2011.

KUMBAR, S. G. et al. Polymeric nanofibers as novel carriers for the delivery of therapeutic molecules. **J Nanosci Nanotechnol**, v. 6, p.2591–607, 2006.

Lannutti, J.; Reneker, D.; Tomasko, D.; Farson, D.; *Mater. Sci. Eng. C*, 2007, 27, 504.

LANNUTTI, J. et al. Electrospinning for tissue engineering scaffolds. *Mater Sci Eng: C* 27, 504, 2007. **Materials Science and Engineering**, v. 27, n. 3, p. 504-9, april. 2007.

LAURENCIN, C. T. et al. Tissue engineering: orthopedic applications. **Annu Rev Biomed Eng**, v. 1, p.19, 1999.

LE, B. K.; RINGDEN, O. Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation. **Biol Blood Marrow Transplant**, v. 11, n. 321, 2005.

LEMPERLE, S.M. et al. Bone healing of large cranial and mandibular defects protect from soft tissue interposition: a comparative study of spontaneous bone regeneration, osteoconduction, and cancellous autografting in dogs. **Plast Reconstr Surg**, v. 101, n. 660, 1998.

LEONG, N. L.; JIANG, J.; LU, H. H. Polymer–ceramic composite scaffold induces osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. **Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc**, v. 1, p. 2651-4, 2006.

LI, W. J. et al. Electrospun nanofibrous structure: a novel scaffold for tissue engineering. *J Biomed Mater Res*, v. 60, p. 613–21, 2002.

LIN, C.Y. et al. The healing of critical-sized femoral segmental bone defects in rabbits using baculovirus-engineered mesenchymal stem cells. **Biomaterials**, 31, n. 3222, 2010.

LIONZO, Maria I. Z. et al. Preparation and characterization of chitosan films containing chondroitin-modified chitosomes *Journal of Biomedical Nanotechnology* (in press)

LIPPENS, E. et al. Evaluation of bone regeneration with an injectable, in situ polymerizable Pluronic F127 hydrogel derivative combined with autologous mesenchymal stem cells in a goat tibia defect model. **Tissue Eng Part A**, v. 16, n. 617, 2010.

LU, J.Y. et al. Stem cell factor promotes the proliferation and osteogenic differentiation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao**, v. 31, n. 531, 2011.

LUCARELLI, E. et al. Bone reconstruction of large defects using bone marrow derived autologous stem cells. **Transfus Apher Sci**, v. 30, n. 2, p.169-74, 2004.

MACEDO, C. A. S. et al. Comparação à resistência do osso bovino congelado e liofilizado. **Rev Bras Ortop**, v. 34, n. 9-10, p. 529-34, 1999.

MAI, R. et al. Histologic study of incorporation and resorption of a bone cement-collagen composite: an in vivo study in the minipig. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 105, n. 3, p. 9-14, mar. 2008.

MAREI, M. K. et al. Preservation and regeneration of alveolar bone by tissue-engineered implants. **Tissue Eng**, v. 11, n. 751, 2005.

MARZOUK, K. M, et al. Osteoconductive effects of vinyl styrene microbeads in rat calvarial defects. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 65, n. 8, p. 1508-16, aug. 2007.

MEIJER, G. J. et al. Cell-based bone tissue engineering. **PloS Med**, v. 4, n.260, 2007.

MIKOS, A. G.; TEMENOFF, J. S. Formation of highly porous biodegradable scaffolds for tissue engineering. **Electron J Biotechnol**, v. 3, p. 114-9, 2000.

MIURA, M. et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 5807, 2003.

MOKBEL, N. et al. Healing patterns of critical size bony defects in rat following bone graft. **Oral Maxillofac Surg**, v. 12, n. 73, 2008.

MONTEIRO, B. G. et al. Human immature dental pulp stem cells share key characteristic features with limbal stem cells. **Cell Prolif**, v. 42, n. 587, 2009.

MORAIS, M. G. de. et al. Preparation of nanofibers containing the microalga *Spirulina* (Arthrospira). **Bioresour Technol**, v. 101, n. 8, p. 2872-6, apr. 2010. Epub 2009 Dec 28.

MORSCZECK, C. et al. Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. **Matrix Biol**, v. 24, n. 155, 2005.

MURUGAN, R.; RAMAKRISHNA S. Nano-featured scaffolds for tissue engineering: a review of spinning methodologies. **Tissue Eng**, v. 12, p. 435-47, 2006.

NAIR, L. S.; LAURENCIN, C. T. *Progr. Polym. Sci*, v. 32, n. 762, 2007.

NAKAMURA, S. et al. Stem cell proliferation pathways comparison between human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells by gene expression profile from promising dental pulp. **J Endod**, v. 35, n. 1536, 2009.

NIEMEYER, P. et al. Transplantation of human mesenchymal stem cells in a nonautogenous setting for bone regeneration in a rabbit critical-size defect model. **Acta Biomaterialia**, v. 6, n. 900, 2010.

OHYA, M. et al. Sinus floor elevation applied tissue-engineered bone. Comparative study between mesenchymal stem cells/platelet-rich plasma (PRP) and autogenous bone with PRP complexes in rabbits. **Clin Oral Impl Res**, v. 16, n. 622, 2005.

OZAKI, W.; BUCHMAN, S. R. Volume maintenance of onlay bone graft in the cranial skeleton: microarchitecture versus embryologic origin. **Plast Reconstr Surg**, v. 102, n. 291, 1998.

PARK, S. J. et al. The sulfated polysaccharide fucoidan stimulates osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells. **Stem Cells Dev**, v.3, 2011.

PASSIER, R.; MUMMERY, C. Cardiomyocyte differentiation from embryonic and adult stem cells. **Curr Opin Biotechnol**, v.16, p. 498-502, 2005.

PERRY, C. R. Bone repair techniques, bone graft and bone graft substitutes. **Clin Orthop Rel Res**, v. 360, p. 71-86, 1999.

PHAM, Q. P.; SHARMA, U.; MIKOS, A. G. Electrospun poly(L-lactide) microfiber and multilayer nanofiber/microfiber scaffolds: Characterization of scaffolds and measurement of cellular infiltration. **Biomacromolecules**, v. 7, p. 2796-2805, 2006.

PIERDOMENICO, L. et al. Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. **Transplantation**, v. 27, n. 836, 2005.

PRADO, F. A. et al. Defeitos ósseos em tíbias de ratos: padronização do modelo experimental. **Revista de Odontologia da Universidade da Cidade de São Paulo**, v.18, n.1, p.7-13. 2006.

PRANKE, P. et al. Comparative quantification of umbilical cord blood CD34+ and CD34+ bright cells using the ProCount-BD and ISHAGE protocols. **Braz J Med Biol Res**, v. 39, n. 901, 2006.

PROLO, D. J. et al. Superior osteogenesis in transplanted allogenic canine skull following chemical sterilization. **Clin Orthop**, v. 168, p. 230-242, 1982.

PRYOR, M. E. et al. Analysis of rat calvaria defects implanted with a platelet-rich plasma preparation: histologic and histometric observations. **J Clin Periodontol**, v. 32, n. 9, p. 966-72, sep. 2005.

POU, A. M. Update on new biomaterials and their use in reconstructive surgery. **Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 11, n. 4, p. 240-4, aug. 2003.

PURICELLI, E. et al. Histological analysis of the effects of a static magnetic field on bone healing process in rat femurs. **Head Face Med**, v.2, p.43. 2006.



RA, J.C. et al. Stem cell treatment for patients with autoimmune disease by systemic infusion of culture-expanded autologous adipose tissue derived mesenchymal stem cells. **J Transl Med**, v. 21, n. 181, 2011.

REICHERT, et al. The challenge of establishing preclinical models for segmental bone defect research. **Biomaterials**, v. 30, n. 2149, 2009.

REN, T. et al. The bone formation in vitro and mandibular defect repair using PLGA porous scaffolds. **J Biomed Mater Res A**, v. 74, n. 562, 2005.

RIJNEN, W. H. et al. Impacted bone and calcium phosphate cement for repair of femoral head defects: a pilot study. **Clin Orthop Relat Res**, v. 459, p. 216-21, jun. 2007.

ROMANOV, Y. A.; SVINTSITSKAYA, V. A.; SMIRNOV, V. N. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. **Stem Cells**, v. 21, n. 105, 2003.

SAAD, B. et al. Hypericum triquetrifolium-Derived Factors Downregulate the Production Levels of LPS-Induced Nitric Oxide and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  in THP-1 Cells. **Evid Based Complement Alternat Med**, Sep., 2008.

SAILER, H. F.; PAJAROLA, G. F. **Cirurgia Bucal**. Porto Alegre: Ed. Artmed, 2000.

SHANG, Q. et al. Tissue-engineered bone repair of sheep cranial defects with autologous bone marrow stromal cells. **J Craniofac Surg**, v. 12, n. 6, p. 586-93, discussion 594-5, nov. 2001.

SCHANTZ, J. T. et al. Repair of calvarial defects with customised tissueengineered grafts II. Evaluation of cellular efficiency and efficacy in vivo. **Tissue Eng**, v. 9, n. 127, 2003.

SCHLIEPHAKE, H. et al. Use of cultivated osteoprogenitor cells to increase bone formation in segmental mandibular defects - an experimental pilot study in mini pigs. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. **30**, n. 531, 2001.

SCHMITZ, J. P.; HOLLINGER, J. O. The critical size defects as an experimental model for craniomandibularfacial nonunions. **Clin Orthop Rel Res**, v. 205, n. 299, 1986.

SCHMITZ, J. P. et al. Characterization of rat calvarial nonunion defects. **Acta Anat**, v. 138, n. 185, 1990.

SECCO, M. et al. Multipotent Stem Cells from Umbilical Cord: Cord Is Richer than Blood! **Stem Cells**, v. 26, n. 146, 2008.

SEO, B. M. et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. **Lancet**, v. 364, n. 149, 2004.

SEO, B. M. et al. SHED repair critical-size calvarial defects in mice. **Oral Dis**, v. 14, n. 428, 2008.

SHANG, Q. et al. Tissue-engineered bone repair of sheep cranial defects with autologous bone marrow stromal cells. **J Craniofac Surg**, v. 12, n. 586, 2001.

SHIN, Y. M. et al. Electrospinning: a whipping fluid jet generates submicron polymer fibers. **Appl Phys Lett**, v. 78, p. 1149-51, 2001.

SILVA, A. D. B. et al. Retalho ósseo pré-fabricado com osso homogêneo: estudo da maturação óssea em um modelo experimental. **Acta Cir Bras**, v. 15, n. S3, p. 65-8, 2000.

SILVA, R. V. da. et al. Repair of cranial bone defects with calcium phosphate ceramic implant or autogenous bone graft. **J Craniofac Surg**, v. 18, n. 2, p. 281-6, mar. 2007.

SINIKOVIĆ, B. et al. Reconstruction of orbital wall defects with calcium phosphate cement: clinical and histological findings in a sheep model. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 36, n.1, p. 54-61, Epub 2006 Sep 11, jan, 2007.

SOCCOL, A. T. et al. Defect repair in rat mandible with hydroxyapatite cement compared to small intestine submucosa. **Braz J Otorhinolaryngol**, v. 72, n. 2, p. 195-9, apr.-mar. 2006.

SPRADLING, A.; DRUMMOND-BARBOSA, D.; KAI, T. Stem cells find their niche. **Nature**, London, v. 414, n. 6859, p. 98-104. nov. 2001.

SWAN, M. C.; GOODARCE, T. E. E. Morbidity at the iliac crest donor site following bone grafting of the cleft alveolus. **Br J Oral Maxillofac Surg**, v. 44, p. 129-133, 2006.

SWAT, A. et al. Cell density-dependent inhibition of epidermal growth factor receptor signaling by p38alpha mitogen-activated protein kinase via Sprouty2 downregulation. **Mol Cell Biol**, v. 29, n. 12, p. 3332-43, Epub 2009 apr. 13, jun, 2009.

SYLVESTER, K. G.; LONGAKER, M.T. Stem Cells: Review and Update. **Arch Surg**, v. 139, n. 93, 2004.

TAGHIPOUR, Z. et al. Transplantation of Undifferentiated and Induced Human Exfoliated Deciduous Teeth-derived Stem Cells Promote Functional Recovery of Rat Spinal Cord Contusion Injury Model. **Stem Cells Dev**, v. 4, 2011.

TAKAGI, K.; URIST, M. R. The reaction of the dura to bone morphogenetic protein (BMP) in repair of skull defects. **Ann Surg**, v. 196, n. 100, 1982.

TAÑAG, M. A.; YANO, K.; HOSOKAWA, K. Orbital floor reconstruction using calcium phosphate cement paste: an animal study. **Plast Reconstr Surg**, v.114, n. 7, p. 1826-31, dec. 2004.

TEN CATE, R. **Histologia bucal**: desenvolvimento, estrutura e função. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 439 p.

VENUGOPAL, J.; RAMAKRISHNA, S. Applications of polymer nanofibers in biomedicine and biotechnology. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 125, n. p.147-58, 2005.

VIATEAU, V. et al. Long-bone critical-size defects treated with tissue-engineered grafts: a study on sheep. **J Orthop Res**, v. 25, n. 741, 2007.

VIEIRA, J. G. H. Considerações sobre marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo e sua utilidade prática. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 43, n. 6, p. 415-522, 1999.

VÖGELIN, E. et al. Healing of a critical-sized defect in the rat femur with use of a vascularized periosteal flap, a biodegradable matrix, and bone morphogenetic protein. **J Bone Joint Surg Am**, v. 87, n. 6, p. 1323-31, jun. 2005.

WALKER, M. R.; PATEL, K. K.; STAPPENBECK, T. S. The Stem Cell Niche. **J Pathol**, London, v. 217, n. 2, p.169-80, jan. 2009.

WANG, J. et al. Biochemical changes during new bone formation in the cranial and subcutaneous tissue environments. In: DAVIDOVITCH, Z.; MAH, J. **Biological Mechanisms of Tooth Eruption, Resorption and Replacement by Implants**. Birmingham, AL: Harvard Society for the Advancement of Orthodontics, EBSCO Media, 1998. v. 123

WILSON, C. E. et al. Evaluating 3D bone tissue engineered constructs with different seeding densities using the alamarBlue assay and the effect on in vivo bone formation. **J Mater Sci Mater Med**, v. 13, n. 1265, 2002.

WU, G. et al. Preparation of three-dimensional porous scaffold of PLGA-silk fibroin-collagen nanofiber and its cytocompatibility study. **Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi**, v. 23, n. 8, p. 1007-11, aug. 2009.

WU, W. et al. Bone marrow-derived osteoblasts seeded into porous beta-tricalcium phosphate to repair segmental defect in canine's mandibula. **Ulus Travma Acil Cerrahi Derg**, v. 12, n. 268, 2006.

XI, Q. et al. Reconstruction of caprine Mandibular segmental defect by tissue engineered bone reinforced by titanium reticulum. **Chin J Traumatol**, v.9, n. 67, 2006.

XIAO, Y. et al. Tissue engineering for bone regeneration using differentiated alveolar bone cells in collagen scaffolds. **Tissue Eng**, v. 9, n. 1167, 2003.

XU, C. et al. Electrospun nanofiber fabrication as synthetic extracellular matrix and its potential for vascular tissue engineering. **Tissue Eng**, v. 10, p. 1160-8, 2004.

YAMADA, Y. et al. Translational research for injectable tissue-engineered bone regeneration using mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma: from basic research to clinical case study. **Cell Transplant**, v. 13, p. 343-355, 2004.

YAMAGUCHI, M. et al. Serum-free coculture for ex-vivo expansion of human cord blood primitive progenitors and SCID mouse-reconstituting cells using human bone marrow primary stromal cells. **Exp Hematol**, v. 29, n.174, 2001.

YAMAGUCHI, M. et al. Induction of umbilical cord blood mesenchymal stem cells into neuron-like cells in vitro. **Int J Hematol**, v. 78, n. 256, 2003.

YAN, Q. C.; TOMITA, N.; IKADA, Y. Effects of static magnetic field on bone formation of rat femurs. **Med Eng Phys**, v. 20, n. 6, p. 397-402, sep. 1998.

YOON, E. M. D. et al. In Vivo Osteogenic Potential of Human Adipose-Derived Stem Cells/Poly Lactide-Co-Glycolic Acid Constructs for Bone Regeneration in a Rat Critical-Sized Calvarial Defect Model. **Tissue Eng**, v. 13, n. 619, 2007.

YOSHIKAWA, T. et al. Bone regeneration by grafting of an autogenous cultured bone/ceramic construct. **J Biomed Mater Res**, v.15, n. 1427, 2003.

YU, J. et al. Odontogenic capability: bone marrow stromal stem cells versus dental pulp stem cells. **Biol Cell**, v. 99, n. 465, 2007.

YUAN, H. A comparison of the osteoinductive potential of two calcium phosphate ceramics implanted intramuscularly in goats. **J Mater Sci Mater Med** v. 13, n. 1271, 2002.

YUAN, J. Repair of canine Mandibular bone defects with bone marrow stromal cells and porous beta-tricalcium phosphate. **Biomaterials**, v. 28, n. 1005, 2007.

GEANCARLO, Zanatta et al. Mesenchymal stem cell adherence on Poly (D, L-lactide-co-glycolide) nanofibers scaffold is integrin- $\beta$ 1 receptor dependent. **Journal of Biomedical Nanotechnology** (in press).

ZHANG, Z. Y. et al. Neo-vascularization and bone formation mediated by fetal mesenchymal stem cell tissue-engineered bone grafts in critical-size femoral defects. **Biomaterials**, v. 31, n. 608, 2010.

ZHAO, L. Preparation and cytocompatibility of PLGA scaffolds with controllable fiber morphology and diameter using electrospinning method. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**. v. 87, n. 1, p. 26-34, oct. 2008.

ZHENG, Y. et al. Stem cells from deciduous tooth repair mandibular defect in swine. **J Dent Res**, v. 88, n. 249, 2009.

## **Anexo**

### **Anexo 1 – Princípios Éticos na Pesquisa Experimental - COBEA**

Artigo I - É primordial manter posturas de respeito ao animal, como ser vivo e pela contribuição científica que ele proporciona.

Artigo II - Ter consciência de que a sensibilidade do animal é similar à humana no que se refere a dor, memória, angústia, instinto de sobrevivência, apenas lhe sendo impostas limitações para se salvaguardar das manobras experimentais e da dor que possam causar.

Artigo III - É de responsabilidade moral do experimentador a escolha de métodos e ações de experimentação animal

Artigo IV - É relevante considerar a importância dos estudos realizados através de experimentação animal quanto a sua contribuição para a saúde humana em animal, o desenvolvimento do conhecimento e o bem da sociedade.

Artigo V - Utilizar apenas animais em bom estado de saúde.

Artigo VI - Considerar a possibilidade de desenvolvimento de métodos alternativos, como modelos matemáticos, simulações computadorizadas, sistemas biológicos "*in vitro*", utilizando-se o menor número possível de espécimes animais, se caracterizada como única alternativa plausível.

Artigo VII - Utilizar animais através de métodos que previnam desconforto, angústia e dor, considerando que determinariam os mesmos quadros em seres humanos, salvo se demonstrados, cientificamente, resultados contrários.

Artigo VIII - Desenvolver procedimentos com animais, assegurando-lhes sedação, analgesia ou anestesia quando se configurar o desencadeamento de dor ou angústia, rejeitando, sob qualquer argumento ou justificativa, o uso de agentes químicos e/ou físicos paralizantes e não anestésicos.

Artigo IX - Se os procedimentos experimentais determinarem dor ou angústia nos animais, após o uso da pesquisa desenvolvida, aplicar método indolor para sacrifício imediato.


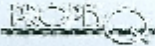
Artigo X - Dispor de alojamentos que propiciem condições adequadas de saúde e conforto, conforme as necessidades das espécies animais mantidas para experimentação ou docência.

Artigo XI - Oferecer assistência de profissional qualificado para orientar e desenvolver atividades de transportes, acomodação, alimentação e atendimento de animais destinados a fins biomédicos.

Artigo XII - Desenvolver trabalhos de capacitação específica de pesquisadores e funcionários envolvidos nos procedimentos com animais de experimentação, salientando aspectos de trato e uso humanitário com animais de laboratório.



## Anexo 2 – Parecer do Comitê de Ética

	<b>UFRGS</b> UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL	<b>PRÓ-REITORIA DE PESQUISA</b> Comitê De Ética Em Pesquisa Da Ufrgs	
---	--	---	---

**CARTA DE APROVAÇÃO**

**Comitê De Ética Em Pesquisa Da Ufrgs analisou o projeto:**

**Número:** 19273

**Título:** Avaliação da regeneração óssea, em calota craniana de ratos, com a utilização de matrizes de nanofibras poliméricas semeadas com células-tronco provenientes de tecido pulpar de dentes deciduos hígidos.


**Pesquisadores:**

**Equipe UFRGS:**

ANNA CHRISTINA MEDEIROS FOSSATI - coordenador desde 29/06/2010  
MANOEL SANTANA FILHO - pesquisador desde 29/06/2010  
PATRICIA HELENA LUCAS PRANKE - pesquisador desde 29/06/2010  
LISIANE BERNARDI - pesquisador desde 29/06/2010  
Cerson Aíadoy Xavier Acaçigua - pesquisador desde 29/06/2010  
Da kelly Iglesias Brañhitröll - pesquisador desde 29/06/2010

*Comitê De Ética Em Pesquisa Da Ufrgs aprovou o mesmo, em reunião realizada em 27/01/2011 - Sala de Reuniões do Gabinete do Reitor (Ex Salão Vermelho) - Prédio Reitoria, 6º andar, por estar adequado ético e metodologicamente e de acordo com a Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.*

Porto Alegre, Quinta-Feira, 27 de Janeiro de 2011

  
JOSE ARTUR BOSO GILIUS  
Coordenador da comissão de ética

1

### **Anexo 3 – Termo de Doação de Material Biológico**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA – NÍVEL MESTRADO  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM CLÍNICAS ODONTOLÓGICAS ODONTOPEDIATRIA**

**Termo de Doação de Material Biológico**

**Título do Projeto de Pesquisa: “Avaliação da regeneração óssea, em calota craniana de ratos, com a utilização de matrizes de nanofibras poliméricas semeadas com células-tronco provenientes de tecido pulpar de dentes decíduos hígidos em estágio de rizólise.”**

Pesquisas recentes têm indicado que existem células-tronco no nervo do dente de leite. A grande vantagem do uso do nervo do dente de leite para a obtenção destas células-tronco é que os dentes utilizados iriam cair naturalmente. Com este trabalho, irá se verificar se essas células-tronco dos dentes de leite são capazes de auxiliar na regeneração de tecido ósseo.

Esse projeto de pesquisa está vinculado ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, telefone 51 3308 3629.

Toda e qualquer dúvida será esclarecida pelos envolvidos nesta pesquisa. Fica, ainda, assegurada a liberdade dos responsáveis pelo paciente, recusarem-se a participar do estudo. Não haverá nenhuma alteração no tratamento da criança e não será necessária sua participação futura em nenhum momento da pesquisa. Não haverá qualquer tipo de remuneração ou bonificação caso haja concordância em participar do projeto, bem como custos por parte do doador. Será mantida a confidencialidade da identidade do paciente.

Eu, \_\_\_\_\_ como responsável pelo(a) menor \_\_\_\_\_, declaro que fui informado dos objetivos e procedimentos que serão realizados nesta pesquisa, tendo lido e compreendido integralmente as informações acima antes de assinar este termo, não restando dúvidas quanto ao conteúdo deste documento. E, dessa forma, autorizo meu (minha) filho (a) ou criança pela qual sou responsável a participar do estudo, estando disposto (a) a trazê-lo (a) nas consultas marcadas, assim como, doar seu dente de leite depois da extração.

Porto Alegre, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2010.

Responsável pelo Participante

Pesquisador Responsável: Anna Christina Medeiros Fossati

RG: \_\_\_\_\_

RG: 1025935386

Telefone de contato: (51) 9933.5570 ou 3308-5024