UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
PÓS-GRADUAÇÃO EM PERIODONTIA

Células tronco mesenquimais de medula óssea na regeneração periodontal.
Prova de princípios - *in vitro* e *in vivo*

Camila Alves Costa

Ribeirão Preto

2016

CAMILA ALVES COSTA

**Células tronco mesenquimais de medula óssea na regeneração
periodontal. Prova de princípios – *in vitro* e *in vivo***

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto-USP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia (Periodontia).

Área de concentração: Periodontia

Orientador: Profa Dra Daniela Bazan Palioto

Ribeirão Preto

2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação

Biblioteca Central do Campus USP – Ribeirão Preto

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Costa, Camila Alves

Células tronco mesenquimais de medula óssea na regeneração periodontal. Prova de princípios – *in vitro* e *in vivo*. Ribeirão Preto, 2016.

111 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Periodontia.

Orientador: Daniela Bazan Palioto.

1. Células tronco. 2. Proteínas do esmalte dentário. 3. Regeneração Periodontal.

COSTA, C. A. Células tronco mesenquimais de medula óssea na regeneração periodontal. Prova de princípios – *in vitro* e *in vivo*. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Odontologia (Periodontia).

Aprovado em: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

1) Prof. (a). Dr.(a).: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

2) Prof. (a). Dr.(a).: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

3) Prof. (a). Dr.(a).: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

4) Prof. (a). Dr.(a).: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

À **Deus** e à **Nossa Senhora Aparecida** sobre todas as coisas.

Aos meus pais, **Aroldo e Marina**, pelo amor e confiança incondicionais em mim depositados. Toda as minhas conquistas pertencem a vocês por sempre terem me guiado e acreditado na minha capacidade. Resta apenas dizer meu muito obrigado por todo esforço de vocês para que eu chegasse onde estou. Meu amor por vocês sempre foi e sempre será o maior desse mundo e não imagino uma vida sem o carinho de vocês. Obrigada por tudo!

Às minhas irmãs, **Natália e Gabriela**, por todo carinho, ajuda e amor de vocês, principalmente nos momentos mais difíceis. Obrigado por cuidarem dos nossos pais em minha ausência, por sempre me lembrarem a importância da família e me fazer sentir tão amada. Amo muito vocês.

Ao meu noivo, **Hernane**, por todo amor e incentivo nesses difíceis anos. Mesmo distante você se mostrou sempre presente e paciente. Obrigado por escutar minhas reclamações, angústias e alegrias nas longas conversas ao telefone. Muito obrigado também por você diminuir a minha solidão e sempre me fazer irradiar o melhor de mim. Meu amor e felicidade de estar ao seu lado são imensuráveis. Te amo hoje e sempre.

Aos meus queridos familiares, especialmente minhas avós **Santa e Cícera**, pelo apoio, preocupação e orações em mim colocadas. E dedico essa minha conquista especialmente aos meus avós **Job e Juca** (*in memoriam*), os quais infelizmente perdi durante minha trajetória no mestrado, mas que tenho absoluta certeza que acreditaram na minha vitória e que estão cuidando de mim no lugar doce onde hoje estão. À todos os meus tios, tias, primos e primas que também me acompanharam e torceram por mim todos esses anos deixo meu obrigada, e saibam que amo muito cada um de vocês!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha orientadora ***Daniela Bazan Palioto***, pelo imenso apoio e orientação durante todo o mestrado. Obrigada por ter me confiado um trabalho tão completo e difícil como esse. Agradeço muito também pelas excelentes oportunidades que você me proporcionou e por todo o carinho e atenção que teve comigo nesses anos. Muitas vezes você foi como uma mãe para mim e agradeço de todo o meu coração por isso! Desejo sempre muito sucesso a você em toda sua trajetória!

À minha co-orientadora ***Thaisângela Rodrigues***, por ser uma das pessoas mais meigas, carismáticas e atenciosas que já conheci. Você fez parte de toda minha trajetória acadêmica e hoje tenho apenas a te agradecer. Obrigada por me ensinar a fazer pesquisa, com ética e muito trabalho e por ter feito eu me apaixonar pela periodontia. Você é e sempre será uma grande inspiração para mim!

À minha parceira de equipe ***Tatiana Miranda Deliberador***, da qual tive um grande prazer em conhecer durante o mestrado. MUITÍSSIMO obrigada por toda paciência, dedicação e por ter sempre confiado em meu trabalho. Tenho certeza que sempre poderei contar com você, onde quer que estejamos!

Às minhas iniciações científicas, ***Lara e Isabela***, por toda ajuda e paciência. Orientar vocês foi uma grande honra para mim. Obrigada por trabalharem comigo até mesmo nos finais de semana e aguentarem minhas cobranças. Espero que eu tenha colaborado um pouco para a formação de vocês como pessoas, pesquisadoras e cirurgiãs-dentistas.

Às minhas grandes amigas ***Myla, Amanda A., Amanda S. e Sofia***. Nem tenho palavras pra agradecer o total apoio de vocês nesses difíceis anos! Obrigada por fazerem me sentir tão especial e diminuírem minha solidão. Confio em vocês imensamente e sei que seremos eternamente GM's, onde quer que estejamos!

AGRADECIMENTOS

Ao meu grande amigo de mestrado **Gabriel** por todos os ensinamentos clínicos que você me passou. Durante todo o mestrado você foi um grande parceiro e tenho certeza que Deus colocou você no meu caminho para me ajudar! A todos os outros **colegas de mestrado e doutorado**, deixo aqui também meu muito obrigada pela ótima convivência, troca de experiências e por todo apoio. Desejo muito sucesso a todos vocês!

Ao meu grande amigo de laboratório **Rodrigo** por toda ajuda. Você também foi um grande professor e amigo nesses anos e sempre serei muito grata por tudo! À todos os outros **colegas de laboratório** meu muito obrigado pelos bons tempos passados juntos, risadas e ajuda. Com vocês aprendi que ninguém consegue trabalhar sozinho e que uma mão amiga é essencial para o sucesso de um trabalho.

Aos técnicos de laboratório **Milla, Roger, Gustavo e Paulinho** pela ótima convivência, amizade, conversas, apoio e ensinamentos. Vocês acompanharam minhas dificuldades e me fizeram crescer e aprender com elas. Dedico a vocês grande parte da conquista desse trabalho. Vocês foram essenciais!

Ao meus amigos de especialização, **Pedro, Thais e Natália**, pela grande amizade. Meus dias em Ribeirão Preto foram muito mais alegres e prazerosos na presença de vocês! Com certeza são amigos para a vida toda!

A todos os **professores do curso de Pós-graduação em Periodontia FORP-USP**, também deixo aqui meu muito obrigada por toda paciência, ensinamentos e parceria nesses anos. Desejo a cada um de vocês cada dia mais sucesso!

Aos técnicos do biotério, Seu **Serginho e Aline** e às secretárias do departamento, **Tati, Dulce e Dani**! Muito obrigada por sempre me ajudarem em todo o meu projeto de mestrado, sempre com alegria e disposição!

À professora da FFRP-USP **Carolina Aires** por ter me ajudado em partes tão essenciais em meu trabalho e me ensinar que o auxílio ao próximo é algo fácil e prazeroso!

SUMÁRIO

PARTE 1	9
<i>Resumo</i>	10
<i>Lista de figuras</i>	14
<i>Lista de abreviações, siglas e símbolos</i>	15
<i>Introdução</i>	17
<i>Proposição</i>	19
<i>Material e Métodos</i>	20
<i>Resultados</i>	27
<i>Discussão</i>	32
<i>Conclusão</i>	36
<i>Referências Bibliográficas</i>	37
PARTE 2	41
<i>Resumo</i>	42
<i>Lista de figuras</i>	46
<i>Lista de abreviações, siglas e símbolos</i>	49
<i>Introdução</i>	51
<i>Proposição</i>	54
<i>Material e Métodos</i>	55
<i>Resultados</i>	63
<i>Discussão</i>	76
<i>Conclusão</i>	82
<i>Referências Bibliográficas</i>	83
ARTIGO EM INGLÊS	89

PARTE 1

Resumo

Efeitos da matriz derivada do esmalte e seu veículo (alginato de propileno glicol) em células tronco mesenquimais de medula óssea.

Estudos clínicos tem mostrado resultados satisfatórios na aplicação da matriz derivada de esmalte (MDE) nas superfícies radiculares. Porém, a completa regeneração de todos os tecidos periodontais perdidos permanece como um desafio. Na tentativa de alcançar esse objetivo o uso de células tronco mesenquimais derivadas de medula óssea (CTM-MO) em um veículo apropriado na engenharia tecidual vem sendo bastante estudada. Uma interessante aplicação da MDE seria como um mediador biológico específico para CTM-MO no intuito de promover a diferenciação e proliferação celular e auxiliar nos processos de regeneração periodontal. Sendo assim, o objetivo do presente estudo é avaliar a influência do Emdogain (EMD) e seu veículo alginato de propileno glicol (APG) na proliferação, diferenciação e mineralização de CTM-MO CD 45⁻90⁺. Células estromais de medula óssea (CE-MO) foram coletadas da crista ilíaca de ratos Wistar-Kyoto, isoladas pelo método Ficoll e separadas em CTM-MO CD 45⁻90⁺ por citometria de fluxo. A caracterização dessas células como células tronco se deu por meio de análise da presença de marcadores de células tronco (gene REX-1 e antígeno de superfície CD 90), habilidade de formação de colônias e capacidade de expressar fenótipo osteogênico e adipogênico. Após a caracterização, as CTM-MO CD 45⁻90⁺ foram plaqueadas com um dos seguintes tratamentos: Grupo Controle Positivo - meio contendo 10% de soro fetal bovino (SFB); Grupo Controle Negativo - meio contendo 2% de SFB; Grupo APG – meio contendo 2% de SFB associado a 25 µg/ml de APG; Grupo EMD – meio contendo 2% de SFB associado a 25 µg/ml de EMD. A avaliação da proliferação celular foi realizada por ensaio de MTT em 3, 7, 10 e 14 dias. Após diferenciação osteoblástica, a atividade de fosfatase alcalina (ALP) e a avaliação da capacidade de diferenciação celular feita por análise genética (PCR) dos genes osterix (OSX), osteopontina (OPN), ALP e RUNX2 foram mensuradas em 7, 10 e 14 dias. A mineralização de matriz extracelular foi avaliada qualitativamente por meio de ensaios de Von Kossa e Alizarina Red e quantitativamente pela mensuração

do teor de cálcio. CTM-MO CD 45⁻90⁺ apresentaram maior expressão de REX-1, maior quantidade de antígeno de superfície CD 90, e mais unidades formadoras de colônia do que CE-MO. Além disso, foram capazes de expressar fenótipos osteoblástico e adipogênico. EMD e APG não influenciaram a proliferação de CTM-MO CD 45⁻90⁺. A atividade de ALP não foi influenciada pelo EMD e foi reduzida no grupo APG. Ambos EMD e APG não influenciaram a expressão dos genes OSX e RUNX2 em 7 e 10 dias e reduziram em 14 dias. O EMD não influenciou a expressão gênica de ALP e OPN, mas a presença do gel de alginato de propileno glicol pareceu prover melhores resultados, com maiores expressões de OPN e ALP. Os grupo EMD e APG apresentaram menor mineralização de matriz extracelular em 28 dias comparados aos grupos controles. Conclui-se que o EMD não influenciou a proliferação, atividade de ALP e diferenciação de CTM-MO CD 45⁻90⁺, mas a presença do gel (APG) parece otimizar a diferenciação dessas células. Ambos, APG e EMD reduziram a mineralização de matriz extracelular.

Abstract

Effects of enamel matrix derivate and its vehicle (propylene glycol alginate) on bone marrow mesenchymal stem cells.

Clinical studies have shown satisfactory results in the application of the enamel matrix derivate (EMD) on root surfaces. However, the complete regeneration of all lost periodontal tissues remains a challenge. To achieve this aim the use of bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSCs) in an appropriate vehicle in tissue engineering has been extensively studied. An interesting application of the EMD would be like a specific biological agent for BM-MSCs in order to promote cell differentiation and proliferation and assist in periodontal regeneration processes. Therefore, the aim of this study is evaluate the influence of Emdogain (EMD) and its vehicle (Propylene Glycol Alginate - PGA) in proliferation, differentiation and mineralization of CD 45⁺90⁺ bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSCs). Rat bone marrow stromal cells (BMSCs) were collected from iliac crest of rat Wistar-Kyoto, isolated by Ficoll method and separated into CD 45⁺90⁺ BM-MSCs by flow cytometer. For cellular characterization the presence of stem cells markers (Rex-1 gen and surface antigen CD 90), capacity to form colonies (CFU) and to express osteoblast and adipogenic phenotype was assessed. Four experimental groups was plated with CD 45⁺90⁺ BM-MSCs: Positive Control group: media containing 10% of fetal bovine serum (FBS); (2) Negative Control Group: media containing 2% FBS; (3) EMD Group: 25µg/ml EMD in 2% FBS media; (4) PGA Group: 25 µg/ml PGA in 2% FBS media. Cellular proliferation was assed in 3, 7, 10 and 14 days with MTT assay. After osteogenic induction, alkaline phosphatase (ALP) activity and gene expression of osterix (OSX), osteopontin (OPN), ALP and RUNX2 by RT-PCR was assessed at 7, 10 and 14 days. Extracellular matrix mineralization was evaluated at 21 and 28 days qualitatively by Von-kossa and Alizarina Red staining, and quantitatively by calcium content. CD 45⁺90⁺ BM-MSCs presented higher Rex-1 gen expression, more surface antigen CD 90 and more CFU/well than BMSCs, and expressed osteoblast and adipogenic phenotype. EMD and PGA not influenced proliferation of CD45⁺90⁺ BM-

MSCs. ALP activity was not influenced by EMD and was reduced in PGA group. EMD and PGA not influenced expression of OSX and RUNX2 in 7 and 10 days and reduced in 14 days. EMD not influenced ALP and OPN expression, but the presence of the gel provided better results, with higher expressions of ALP and OPN genes. Both PGA and EMD groups presented less mineralized ECM in 28 days. It concludes that EMD not influenced the proliferation, differentiation and ALP activity of CD45⁻90⁺ BM-MSCs, but the presence of the gel (PGA) seems optimize the differentiation of these cells. Both reduced ECM mineralization.

Lista de Figuras

- Figura 1 - A) Marcadores de Células Tronco Mesenquimais (CTM). A₁) Análise por citometria de fluxo de antígenos de superfície celular CD 45 e CD 90 em CTM-MO CD 45⁺90⁺ e CE-MO. A₂) Expressão gênica de Rex-1 por RT-PCR em CTM-MO CD45⁺90⁺ e CE-MO em 7, 10 e 14 dias. B) Unidades formadoras de colônia (UFCs) de CTM-MO CD 45⁺90⁺ e CE-MO em 7 dias em meio de crescimento. C) Capacidade de diferenciação em 7, 10 e 14 dias de CTM-MO CD45⁺90⁺ em (C₁) fenótipo osteogênico, confirmado pela expressão do gene ALP e mineralização de matriz extracelular e em (C₂) fenótipo adipogênico, confirmado pela expressão do gene PPAR γ 2 e acúmulo lipídico. (*) Indica diferença estatisticamente significativa entre CTM-MO CD 45⁺90⁺ e CE-MO ($p < 0.05$) 28
- Figura 2 - Ensaio de proliferação celular em 3, 7, 10 e 14 dias de CTM-MO CD 45⁺90⁺ nos grupos controle positive, controle negative, APG e EMD. (*) Indica diferenças estatisticamente significantes em relação a todos os outros grupos ($p < 0.05$) 29
- Figura 3 - A) Expressão gênica de marcadores osteoblásticos (fator de transcrição RUNX2, osterix, fosfatase alcalina e osteopontina) em 7, 10 e 14 dias de CTM-MO CD 45⁺90⁺ nos grupos controle positive, controle negative, APG e EMD. B) Atividade de ALP em 7, 10 e 14 dias de CTM-MO CD 45⁺90⁺ nos grupos controle positive, controle negativo, APG e EMD. C) Mineralização de matriz extracelular de CTM-MO CD 45⁺90⁺ nos grupos controle positivo, controle negativo, APG e EMD em 21 e 28 dias, com análise qualitativa por Alizarina Red S e Von-kossa S, e quantitativa por análise do teor de cálcio. (*) Indica diferenças estatisticamente significantes em relação a todos os outros grupos ($p < 0.05$); Chaves indicam diferenças estatisticamente significantes apenas entre dois grupos. ($p < 0.05$) 31

Lista de Abreviações, Siglas e Símbolos

AMO	Aspirado de medula óssea
ALP	Fostatase alcalina
APG	Alginato de propileno glicol
CD	Grupamento de diferenciação
cDNA	DNA complementar
CE-MO	Células estromais de medula óssea
cm ²	Centímetros quadrados
CO ₂	Dióxido de carbono
Co60	Cobalto 60
CTM	Células tronco mesenquimais
CTM-MO	Células tronco mesenquimais derivadas de medula óssea
DMEM	Dulbeco's Modified Eaggles Medium
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EMD	Emdogain
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
g	Gramas
G	Força gravitacional
HCl	Ácido clorídrico
LP	Ligamento periodontal
M	Mola
MA	Meio adipogênico
MC-D	Meio de crescimento DMEM
MC- α	Meio de crescimento Alfa-MEM
MDE	Matriz derivada de esmalte
min	Minutos
mg	Miligrama
μ g	Micrograma
ml	Mililitros
μ l	Microlitro

mM	Milimolar
mmol	Milimol
MO	Meio osteogênico
MTT	(3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina)
Na ₂ CO ₃	Carbonato de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
nm	Nanômetros
Oct4	Fator de transcrição ligado ao octâmetro 4
OPN	Osteopontina
OSX	Osterix
PBS	Solução salina tamponada
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PE	Ficoeritrina
pH	Potencial hidrogeniônico
PPAR γ 2	Receptor ativado por proliferador gama 2
REX-1	Proteína <i>zinc-finger-42</i>
RIN	Integridade do RNA
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase – transcriptase reversa
RUNX2	Fator de transcrição RUNX2
SFB	Soro fetal bovino
TA	Temperatura ambiente
TGF- β 1	Fator de transformação do crescimento Beta 1
UFCs	Unidades formadoras de colônias
°C	Graus Celsius
α -MEM	Alfa Modified Eaggles Medium

Introdução

Uma sequência de eventos biológicos associados ocorrem na regeneração periodontal, incluindo proliferação, migração e diferenciação celular, síntese de matriz extracelular orgânica e sua posterior mineralização.¹ Fatores de crescimento polipeptídicos como a matriz derivada do esmalte (MDE) tem sido usada no intuito de facilitar a regeneração periodontal, devido sua habilidade de controlar eventos críticos, como a cementogênese e o desenvolvimento do aparato de inserção periodontal.^{2,3,4} O Emdogain (EMD) é derivado de proteínas de matriz de esmalte de origem suína e tem sido aplicado na superfície radicular com resultados clínicos satisfatórios, incluindo regeneração de cemento radicular, ganho de nível clínico de inserção e preenchimento ósseo radiográfico.^{2,5,6,7} Revisões sistemáticas da literatura assumiram que o EMD é a única ferramenta biológica capaz de estimular, de forma reproduzível, todos os componentes do periodonto, embora os mecanismos biológicos do EMD ainda não estejam completamente compreendidos.^{8,9}

A maioria das proteínas presentes no EMD são amelogeninas, as quais são produzidas pela bainha epitelial de Hertwig e são conhecidas por se ligar aos agregados supramoleculares, em pH fisiológico e temperatura corporal, formando uma matriz extracelular insolúvel com alta afinidade para hidroxapatita e colágeno.^{10,11} Alguns autores acreditam que o EMD também contém fatores de crescimento^{12,13} e outras proteínas diferentes das amelogeninas.¹⁴

Os avanços na engenharia tecidual permitiram o desenvolvimento de outras novas terapias como os tratamentos baseados em células. Células estromais de medula óssea (CE-MO) contém células tronco mesenquimais (CTM) as quais são capazes de se auto-renovar e se diferenciar em diversos precursores teciduais, incluindo osso, cartilagem e tecido adiposo e possuem um importante papel na remodelação normal e mecanismo de reparação desses tecidos.¹⁰ O cultivo de células estromais de medula óssea multipotentes é feito selecionando as células com a propriedade de se aderir ao plástico,¹⁵ enquanto as outras células que permanecem em suspensão são facilmente removidas. No entanto, tipos celulares concomitantes, ou seja, que também conseguem se aderir ao plástico, podem permanecer em cultura por várias passagens, como os macrófagos e células progenitoras diferenciadas.¹⁶ Dois métodos importantes descritos na literatura que são usados para isolar

células de medula óssea são: por gradiente de densidade de células mononucleares usando o método Ficoll; e por seleção imunomagnética, a qual se baseia no reconhecimento imune de antígenos de superfície usando anticorpos específicos. Sendo assim, é importante distinguir as células tronco mesenquimais de medula óssea (CTM-MO) de outras células. O Comitê para a Sociedade Internacional de Terapia Celular esclareceu que as células aderentes ao plástico frequentemente descritas como células tronco mesenquimais deveriam ser chamadas de células estromais mesenquimais multipotentes, enquanto que o termo células tronco mesenquimais (CTM) deve ser reservado para um subconjunto dessas (ou outras) células que demonstram atividade de célula tronco por critérios claramente definidos. O comitê tem proposto um critério mínimo para definição de CTM: serem aderentes ao plástico, apresentarem um padrão de expressão específico antígeno-superfície e terem um potencial de diferenciação multipotente.¹⁷ Karaoz e colaboradores¹⁸ mostraram por análise de citometria de fluxo que células tronco mesenquimais de medula óssea em ratos são positivas para a molécula de adesão celular CD 90 e negativa para CD 45 (a qual está associado com células linfo-hematopoiéticas), da passagem 3 até a passagem 25.

É conhecido que diversas proteínas, fatores de crescimento e citocinas regulam a diferenciação de CTM em progenitores de osteoblastos. Nesse sentido, o EMD pode prover o estímulo que CTM requerem para sintetizar a matriz regenerativa necessária para regeneração periodontal.

Além do componente celular, a engenharia tecidual requer um veículo apropriado para levar e manter as células nos sítios de regeneração. Além disso, uma matriz apropriada pode auxiliar no desenvolvimento de um microambiente apropriado para o cultivo de CTM, as quais irão manter sua capacidade de se auto-renovar e seu estado indiferenciado até o momento de sua aplicação.¹⁹ O EMD pode agir como uma matriz para CTM-MO em sítios de regeneração periodontal pela presença do seu veículo, o alginato de propileno glicol (APG).¹² O APG permite o contato célula-matriz e facilita a formação de agregados pelas proteínas do EMD,² os quais são responsáveis por criar um ambiente positivo para a proliferação e diferenciação de células tronco mesenquimais, em pH fisiológico e temperatura corporal.

Alguns estudos avaliaram a influência de EMD em CE-MO,^{10,11} mas até o momento, nenhum avaliou o efeito de EMD e seu veículo em CTM isoladas.

Proposição

O objetivo do presente estudo foi avaliar a influência da matriz derivada do esmalte (Emdogain) e seu veículo (alginato de propileno glicol) na proliferação, diferenciação e mineralização de CD 45⁻90⁺, como células tronco mesenquimais de medula óssea.

Material e Métodos

Aspiração de Medula Óssea

Todos os procedimentos em animais foram realizados sob a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade de São Paulo (Protocolo 2014.1.494.58.0), respeitando os princípios éticos em experimentação animal.

Dois ratos machos consanguíneos Wistar-Kyoto pesando entre 250-300 g do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (São Paulo, Brasil) foram usados para coletar o aspirado de medula óssea (AMO). Previamente, os animais foram anestesiados por uma combinação de ketamina (7 mg/100 g de peso corporal - Agener União, Embu-Guaçu, SP, Brasil) e xilazina (0.6 mg/100 g de peso corporal - Calier, Juatuba, MG, Brasil). De cada crista ilíaca do animal foram aspirados 0.5 ml de medula óssea usando uma seringa estéril de 10 ml contendo 0.1 ml de heparina para prevenir a coagulação. Assim, o AMO foi removido e estocado em microtubos estéreis.²⁰

Cultivo de Células Tronco Mesenquimais de Medula Óssea (CTM-MO)

Após a aspiração da medula óssea, as células de medula óssea foram isoladas pelo método Ficoll com uma adaptação do protocolo de Kern e colaboradores.²¹ Resumidamente, os 4 ml de AMO coletados foram diluídos em 4 ml de solução salina tamponada (PBS – Gibco-Invitrogen, Grand Island, NY), pH 7.0. Então, 2.4 ml de Ficoll-Paque PREMIUM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) foram adicionados vagarosamente e centrifugados por 30 min a 2500 rpm. A centrifugação formou uma interfase de células mononucleares, a qual foi cuidadosamente aspirada. 10 ml de PBS foram adicionados e centrifugados novamente por 10 min a 1500 rpm. O pellet formado foi cultivado a uma densidade de 1×10^6 células em meio de crescimento DMEM (MC-D), pH 7.0, contendo DMEM (Dulbecco's Modified Eaggles Medium – Gibco-Invitrogen) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB – Gibco-Invitrogen), 100 unidades/ml de penicilina (Gibco-Invitrogen), 100 µg/ml de estreptomicina (Gibco-Invitrogen) e 3 µg/ml de fungizona (Gibco-Invitrogen). CE-MO foram selecionadas por aderência ao poliestireno e expandidas no mesmo meio.

Então, as células foram selecionadas por separação celular em citômetro de fluxo (Facs ARIA - Bioscience BD, San Jose, CA) para alcançar uma população de CTM-MO

CD 45⁹⁰⁺. Resumidamente, com as culturas em subconfluência, uma solução de dissociação celular livre de enzimas (Gibco-Invitrogen) foi adicionada e obtida uma suspensão celular. Após centrifugação, as células foram ressuspensas em solução de bloqueio por 40 min e incubadas com anticorpo monoclonal anti-mouse CD 45 (Rat Anti-Mouse PE – Bioscience BD) e CD 90 (Mouse Anti-Rat FITC – Bioscience BD) por 1 hora a 4 °C, lavadas e ressuspensas em PBS. Suspensões somente com células não-marcadas foram usadas como controle negativo. Após lavagem, as amostras foram processadas em software específico (Cell Quest Software – Bioscience BD). CTM-MO CD 45⁹⁰⁺ foram cultivadas com MC-D em uma densidade de 1×10^5 células para cada garrafa de 25 cm² (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, EUA). Em todo o experimento, somente células na oitava passagem foram usadas, sendo incubadas a 37 °C em 5% de CO₂. Os meios foram trocados três vezes por semana.

Caracterização fenotípica das CTM-MO CD 45⁹⁰⁺

Separação celular ativada por fluorescência foi utilizada para avaliar a presença de marcadores de superfície celular (FITC-CD 90 e PE-CD 45) das CTM-MO CD 45⁹⁰⁺ e das CE-MO, comparativamente, do mesmo modo descrito acima, sendo os resultados processados usando software específico (Cell Quest Software). CE-MO foram obtidas por lavagem da medula do fêmur dos mesmos ratos Wistar-Kyoto e expandidas em meio de crescimento α -MEM (MC- α), contendo α -MEM (α Modified Eagle Medium – Gibco-Invitrogen), pH 7.0, suplementado com SFB, 100 unidades/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomicina e 3 μ g/ml de fungizona. Essa população celular foi selecionada apenas pela adesão ao plástico e expandidas no mesmo meio, até atingirem subconfluência. Células entre segunda e terceira passagem foram usadas.

Para avaliar a expressão do gene REX-1, CTM-MO CD 45⁹⁰⁺ e CE-MO foram cultivadas em placas de 6 poços (Fisher Scientific) a uma densidade celular de 1×10^5 células/poço em MC- α e após 7, 10 e 14 dias o RNA total foi coletado para se realizar o PCR em tempo real (RT-PCR), comparativamente.

CTM-MO CD 45⁹⁰⁺ e CE-MO foram também cultivadas em placas de 6 poços em uma densidade de 500 células/poço com MC- α para se avaliar o número de unidades formadoras de colônia (UFCs). Após 7 dias o meio foi removido e os poços fixados com formalina a 10% por 2 horas em geladeira. Os poços foram, então, lavados com água deionizada e corados com cristal violeta (Sigma-Aldrich) a 0.5% em metanol por 10 min

em temperatura ambiente (TA). O número de UFCs contendo mais de 30 células foram contados em microscópio de luz em magnificação de 10x, sendo expressas em UFC/poço.

Condições de diferenciação em cultura

Indução osteogênica. CTM-MO CD 45⁺90⁺ foram plaqueadas em meio osteogênico (MO), o qual contém MC- α suplementado com 5 μ g/ml de ácido ascórbico (Gibco-Invitrogen), 7 mM de β -glicerolfosfato (Sigma-Aldrich) e 10^{-7} mM de dexametasona (Sigma-Aldrich). Foram usadas placas de 24 poços (Fisher Scientific) em uma densidade de 2×10^4 células/poço para avaliação da mineralização de matriz extracelular em 21 dias usando ensaio de Alizarina Red S (Sigma-Aldrich).³ Para avaliação da expressão gênica de fosfatase alcalina (ALP) essas células foram cultivadas em placas de 6 poços em uma densidade celular de 1×10^5 células/poço e após 7, 10 e 14 dias o RNA total foi coletado para se realizar o RT-PCR.

Indução adipogênica. CTM-MO CD 45⁺90⁺ foram cultivadas em meio adipogênico (MA), contendo MC-D suplementado com 10^{-6} M de dexametasona, 0.5 mM 3-isobutil-1-metilxantine (Sigma-Aldrich), 10 mg/ml de insulina (Sigma-Aldrich) e 0.1 M de indometacina (Sigma-Aldrich). Foram usadas placas de 24 poços em uma densidade de 2×10^4 células/poço para avaliação do acúmulo lipídico em 10 dias usando coloração de Oil Red O.²² Resumidamente, após o período de análise os poços foram fixados com formalina a 10% por 2 horas em TA, lavadas com isopropanol (Sigma-Aldrich) a 60% e coradas com 0.3% de Oil Red O (Gibco-Invitrogen) por 10 min e deixados para secar em TA. Para avaliação da expressão gênica de PPAR γ 2 as populações celulares foram semeadas em placas de 6 poços em uma densidade de 1×10^5 células/poço e após 7, 10 e 14 dias o RNA total foi coletado para se realizar o RT-PCR.

Tratamentos

Emdogain gel (EMD - Straumann, Institute Straumann AG, Basel, Switzerland) foi dissolvido em água ácida (pH 5.9), aliquotadas e estocadas a -70 °C. O alginato de propinelo glicol (APG) foi manipulado no Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Farmácia de Ribeirão Preto (Universidade de São Paulo) em uma concentração de 40 mg/ml. Resumidamente, 4 g de pó de APG (Protanal® ester SD 8440, FMC Corporation, Philadelphia, PA) foi misturado a uma solução com água destilada em uma concentração de 40 mg/ml para alcançar uma viscosidade semelhante a do Emdogain gel. O gel de APG foi colocado em seringas de 3 ml e esterilizados por radiação gama Co60 (Rad Source:

Model RS-2000) no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (Universidade de São Paulo). APG também foi dissolvido em água ácida e estocados a -70°C . Baseado na curva de concentração de ambas as soluções nessas células específicas (dados não mostrados), o tratamento com ambos EMD e APG foi realizado em uma concentração de $25\text{ }\mu\text{g/ml}$.

Quatro condições experimentais foram estabelecidas: (1) Grupo Controle Positivo: meio contendo 10% de SFB; (2) Grupo Controle Negativo: meio contendo 2% de SFB; (3) Grupo APG: $25\text{ }\mu\text{g/ml}$ de APG em meio contendo 2% de SFB; (4) Grupo EMD: $25\text{ }\mu\text{g/ml}$ de EMD em meio contendo 2% de SFB. Para todos os grupos, dependendo do tipo de ensaio, o meio de cultura utilizado poderia ser MC- α ou MO. Em todo o experimento, os poços foram lavados três vezes por semana com PBS para se remover os depósitos de EMD e APG, e seus meios trocados.

Ensaio de Proliferação Celular

A proliferação celular foi avaliada em 3, 7, 10 e 14 dias utilizando 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT). CTM-MO CD $45^{+}90^{+}$ foram plaqueadas em placas de poliestireno de 24 poços em uma densidade de 2×10^4 células/poço e incubadas com 1 ml de MC- α e seus respectivos tratamentos. Após cada tempo de análise, as células foram incubadas com $100\text{ }\mu\text{l}$ de MTT (5 mg/ml – Sigma-Aldrich) em α -MEM a 37°C . Após 4 horas, $400\text{ }\mu\text{l}$ de isopropanol ácido (0.04 N HCl em isopropanol) foi adicionado a cada poço. As placas foram agitadas por 5 min e $150\text{ }\mu\text{l}$ da solução de cada poço foi transferida para placas de 96 poços (Fisher Scientific) as quais foram lidas em um leitor de placas (μ Quant, Biotek, Winooski, VT, EUA) com uma densidade ótica de 570 nm . Os dados foram expressos em absorbância, os quais são proporcionais ao número de células vivas e que proliferaram.

Diferenciação Osteoblástica

Após alcançar subconfluência, CTM-MO CD $45^{+}90^{+}$ foram cultivadas em placas de 24 poços em MO a uma densidade de 2×10^4 células/poço e incubadas com 1 ml de meio de seus respectivos tratamentos para realizar os ensaios de Alizarina Red, Von-Kossa e Atividade de Fosfatase Alcalina. Para análise da expressão gênica de marcadores osteoblásticos fator de transcrição RUNX2, fosfatase alcalina (ALP), osteopontina (OPN) e osterix (OSX), as células foram cultivadas em placas de 6 poços em uma densidade de 1

x 10^5 células/poço e incubadas com 2 ml de MO e seus respectivos tratamentos. Após 7, 10 e 14 dias, o RNA total foi coletado para se realizar o RT-PCR.

Atividade de Fosfatase Alcalina (ALP)

Nos dias 7, 10 e 14 a atividade de ALP em CTM-MO CD 45⁺90⁺ e seus respectivos tratamentos foi mensurada com a liberação de timolftaleína a partir do monofosfato de timolftaleína usando um kit comercial (Labtest Diagnóstica SA, Belo Horizonte, MG, Brasil). Para isso, as células foram lisadas com a adição de 0.1% de solução de lauril sulfato de sódio (Sigma-Aldrich) por 30 min. Então, 50 µl de monofosfato de timolftaleína foi misturado com 0.5 ml de 0.3 M solução de dietanolamina, pH 10.1, e deixados por 2 min a 37 °C. A solução foi adicionada a 50 µl de células lisadas obtidas de cada poço e deixadas por 10 min a 37 °C. Para o desenvolvimento de cor, 2 ml de solução de Na₂CO₃ (0.09 mmol/ml) e NaOH (0.25 mmol/ml) foi adicionado por 30 min para interromper a reação. Poços sem células foram utilizados como baseline (tempo zero) e a absorbância foi mensurada em um comprimento de onda de 590 nm usando um leitor de placa µQuant (Biotek). Atividade de ALP foi expressa a partir de uma curva usando timolftaleína para se obter um intervalo de 0.012 a 0.4 mmol de timolftaleína/h/ml e normalizado pelo teor de proteína total quantificada nos mesmos lisados celulares e determinado pelo método de Lowry,²³ nos mesmos tempos.

Para avaliar a atividade de ALP in situ, nos mesmos tempos de análise, ensaio de Fast Red foi realizado.²⁴ Para isso, o meio de cultivo foi removido dos poços e as camadas celulares lavadas duas vezes com solução salina balanceada de Hanks (Hank's Balanced Salts, Sigma-Aldrich) pré-aquecidas a 37 °C e, então, incubadas com 120 mM de solução Tris, pH 8.4, contendo 0.9 mM de fosfato de naftol AS-MX e 1.8 mM de Fast Red TR. O fosfato de naftol AS-MX foi solubilizado com N,N-dimetil formamida (Sigma-Aldrich) antes da diluição com a solução Tris. Após 30 min a 37 °C as culturas foram lavadas com água deionizada e imagens foram tomadas para análise qualitativa, usando uma câmera digital de alta resolução (Canon EOS Digital Rebel Camera, Canon, Lake Success, NY, EUA).

Mineralização da Matriz Extracelular

A mineralização da matriz extracelular foi detectada em 21 e 28 dias por coloração com vermelho de Alizarina² (Alizarina Red S) para avaliar os depósitos de cálcio, e coloração com Von-kossa para avaliar os depósitos de fosfato. No ensaio de Alizarina Red

As CTM-MO CD 45⁺90⁺ e seus respectivos tratamentos foram lavadas com PBS e fixadas em 10% de formalina por 2 horas em temperatura ambiente. As amostras foram desidratadas em uma série gradual de álcool e coradas com 2% de Alizarina Red S, pH 4.2, por 10 min. No ensaio de Von-kossa as CTM-MO CD 45⁺90⁺ com seus respectivos tratamentos foram lavadas com PBS e incubadas com 5% de AgNO₃ (BSA, Sigma-Aldrich) por 20 min em TA. Então, os poços foram lavados duas vezes com água deionizada, adicionados hidroquinona (5 mg/ml) e deixados expostos a luz até que os depósitos minerais escurecessem. A hidroquinona foi removida e a solução de tiosulfato (5%) foi adicionada por 2 min a TA. Finalmente, os poços foram lavados com água deionizada e deixados a TA para secar. A análise qualitativa da formação de nódulos minerais foi realizada através da captura de imagens com uma câmera digital de alta resolução (Canon EOS Digital Rebel Camera), observando a frequência e a aparência (densidade ou difusão) dos nódulos de cálcio (cor vermelha) ou de fosfato (coloração em escala de cinza).

O teor de cálcio foi avaliado usando um ensaio colorimétrico.²² Resumidamente, 280 ml de ácido acético a 10% foi adicionado em cada poço colorido com vermelho de alizarina, deixando-os incubados por 30 min a TA sob agitação. Essa solução foi transferida para um microtubo e homogeneizado por 1 min, aquecido a 85 °C por 10 min e transferido para gelo por 5 min. A solução formada foi centrifugada por 15 min a 13000 G e 100 ml do supernadante foi transferido para um novo microtubo. Então, 40 ml de hidróxido de amônio a 10% foi adicionado para neutralizar o ácido e a leitura foi feita em um comprimento de onda de 405 nm em um leitor de placa μ Quant (Biotek). Os dados foram expressos em absorbância.

Expressão gênica de osteoblastos

RT-PCR quantitativo foi realizado em 7, 10 e 14 dias para análise de expressão gênica. Para isso, após cada tempo de análise, os meios de cultura foram removidos dos poços e o RNA total foi extraído com o reagente Trizol (Invitrogen – Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e com o kit SV Total RNA Isolation (Promega Corporation, Madison, WI, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. A concentração e purificação de amostras de RNA foram determinadas por densidade ótica em diferentes comprimentos de onda (260, 280, 230 e 320 nm), sendo que índices superiores a 1.8 foram analisados. A integridade do RNA foi avaliada por eletroforese microfluida usando o kit Agilent 6000 RNA Nanochips e um kit Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara,

CA, EUA). Somente amostras com número de integridade de RNA (RIN) ≥ 9.0 foram usados (dados não mostrados). DNA complementar (cDNA) foi sintetizado usando 1 μg de RNA extraído através da reação de transcriptase reversa (M-MLV transcriptase reversa, Promega Corporation), de acordo com as instruções do fabricante. PCR em tempo real foi realizado no equipamento Step One Plus Real-Time PCR (Life Technologies, Grand Island, NY) usando um Master Mix Taqman PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e sondas para marcar os genes (Life Technologies). A expressão gênica relativa foi normalizada pela expressão de β -actina e as reais mudanças expressas relativas as CTM-MO CD 45⁺90⁺ usando o método comparativo threshold ($2^{-\Delta\Delta C_t}$).

Análise Estatística

Os dados apresentados representam os resultados de três experimentos independentes. Expressão gênica foi realizada em triplicata ($n = 3$) e todos os outros experimentos em quintuplicata ($n = 5$). Os dados foram analisados com um programa estatístico (SigmaPlotTM, Systat Software Inc) usando One Way Anova seguido de pós-teste de Tukey quanto ANOVA encontrou alguma diferença significativa. Somente a análise da expressão gênica de REX-1 foi feita com Teste T para suas amostras independentes. Para todos os experimentos, o nível de significância foi estabelecido em $p \leq 0.05$.

Resultados

Caracterização fenotípica das CTM-MO CD 45⁺90⁺

CTM-MO apresentaram 73.09% de células não marcadas para o antígeno de superfície celular CD 45 e marcadas para CD 90, enquanto que as CE-MO mostraram apenas 52,5% de células não marcadas para CD 45 e marcadas para CD 90 (Figura 1A₁). CTM-MO CD 45⁺90⁺ tiveram maior expressão de REX-1 em 7, 10 e 14 dias ($p < 0.05$) (Figura 1A₂) e maior quantidade de UFC/poço do que CE-MO ($p < 0.05$) (Fig 1B). Além disso, CTM-MO CD 45-90⁺ expressaram fenótipo osteoblástico, mostrado pelos depósitos de matriz mineralizada e expressão de ALP, e fenótipo adipogênico, confirmado pelo acúmulo lipídico e expressão de PPAR γ 2 (Figura 1C).

Efeitos do EMD e APG na proliferação celular

O efeito do EMD e APG na proliferação de CTM-MO CD 45⁺90⁺ foi determinado por ensaio de MTT em 3, 7, 10 e 14 dias (Figura 2). EMD e APG não influenciaram a proliferação celular em nenhum tempo de análise ($p > 0.05$) comparado ao grupo controle negativo, sendo que todos os grupos exibiram o mesmo padrão de crescimento celular. O grupo controle positivo exibiu maior proliferação celular ($p < 0.05$) do que todas as outras modalidades de tratamento em todos os tempos de análise. O número de células aumentou significativamente em 7 e 10 dias ($p < 0.05$) para todos os grupos.

A Marcadores de CTM

A1 Antígenos de superfície celular

A2 Expressão gênica

B Unidade Formadora de Colônia

C Capacidade de Diferenciação

C1 Indução Osteogênica

C2 Indução Adipogênica

Figura 1: A) Marcadores de Células Tronco Mesenquimais (CTM). A₁) Análise por citometria de fluxo de antígenos de superfície celular CD 45 e CD 90 em CTM-MO CD 45⁹⁰⁺ e CE-MO. A₂) Expressão gênica de Rex-1 por RT-PCR em CTM-MO CD 45⁹⁰⁺ e CE-MO em 7, 10 e 14 dias. B) Unidades formadoras de colônia (UFCs) de CTM-MO CD 45⁹⁰⁺ e CE-MO em 7 dias em meio de crescimento. C) Capacidade de diferenciação em 7, 10 e 14 dias de CTM-MO CD45⁹⁰⁺ em (C₁) fenótipo osteogênico, confirmado pela expressão do gene ALP e mineralização de matriz extracelular e em (C₂) fenótipo adipogênico, confirmado pela expressão do gene PPAR γ 2 e acúmulo lipídico. (*) Indica diferença estatisticamente significativa entre CTM-MO CD 45⁹⁰⁺ e CE-MO ($p < 0.05$).

Figura 2: Ensaio de proliferação celular em 3, 7, 10 e 14 dias de CTM-MO CD 45⁹⁰⁺ nos grupos controle positivo, controle negativo, APG e EMD. (*) Indica diferenças estatisticamente significantes em relação a todos os outros grupos ($p < 0.05$).

Efeitos do EMD e APG na atividade de ALP e na mineralização da matriz extracelular

Atividade de ALP nas CTM-MO CD 45⁹⁰⁺ não foi afetada pelo tratamento com EMD comparado ao controle negativo ($p > 0.05$) em 7, 10 e 14 dias (Figura 3). O grupo APG mostrou menor atividade de ALP do que ambos os grupos controles em todos os tempos de análise ($p < 0.05$). O grupo controle positivo expressou maior atividade de ALP do que todos os grupos em todos os tempos analisados ($p < 0.05$). Todos os grupos tiveram um pico de atividade de ALP em 14 dias.

Após 21 foi observado que EMD e APG não influenciaram a mineralização de matriz extracelular de CTM-MO CD 45⁹⁰⁺ (Figura 3). O grupo controle positivo produziu a matriz mais densa e regular ($p < 0.05$). O grupo APG foi similar ao grupo EMD ($p > 0.05$) em 21 e 28 dias, e ambos apresentaram menos matriz extracelular mineralizada do que os grupos controle ($p < 0.05$) em 28 dias. O tratamento com EMD reduziu a formação de nódulos minerais e uma matriz mineralizada densa não foi observada.

Efeito do EMD e APG na diferenciação celular

O grupo controle positivo mostrou a maior expressão de OSX em relação a todos os outros grupos em todos os tempos analisados ($p < 0.05$). Em 14 dias os grupos EMD e APG apresentaram similar ($p > 0.05$) e menor expressão de OSX comparado ao grupo controle negativo ($p < 0.05$). Expressão de RUNX2 foi maior no grupo controle positivo em 7 e 10 dias ($p < 0.05$). O grupo controle negativo apresentou maior expressão desse gene comparado aos grupos EMD e APG em 14 dias ($p < 0.05$). O tratamento com EMD e APG otimizaram a expressão gênica de ALP em 7 e 10 dias comparado ao grupo controle positivo, e também foram melhores que o grupo controle negativo somente em 10 dias ($p < 0.05$). Em 14 dias o grupo controle negativo obteve maior expressão de ALP em relação aos grupos EMD e APG ($p < 0.05$). Os grupos EMD e APG obtiveram maior expressão de OPN em 7 e 14 dias comparado ao grupo controle positivo ($p < 0.05$). O grupo APG mostrou maior expressão de OPN comparado ao grupo EMD em todos os tempos analisados ($p < 0.05$) e comparado ao grupo controle negativo em 7 e 10 dias ($p < 0.05$) (Figura 3).

Figura 3: A) Expressão gênica de marcadores osteoblásticos (fator de transcrição RUNX2, osterix, fosfatase alcalina e osteopontina) em 7, 10 e 14 dias de CTM-MO CD 45⁺90⁺ nos grupos controle positivo, controle negativo, APG e EMD. B) Atividade de ALP em 7, 10 e 14 dias de CTM-MO CD 45⁺90⁺ nos grupos controle positivo, controle negativo, APG e EMD. C) Mineralização de matriz extracelular de CTM-MO CD 45⁺90⁺ nos grupos controle positivo, controle negativo, APG e EMD em 21 e 28 dias, com análise qualitativa por Alizarina Red S e Von-kossa S, e quantitativa por análise do teor de cálcio. (*) Indica diferenças estatisticamente significantes em relação a todos os outros grupos ($p < 0.05$); Chaves indicam diferenças estatisticamente significantes apenas entre dois grupos. ($p < 0.05$).

Discussão

O presente estudo investigou o efeito da matriz derivada do esmalte e seu veículo (APG) em células tronco mesenquimais de medula óssea isoladas CD 45⁻90⁺. Foi observado que Emdogain não influenciou a proliferação, diferenciação e a atividade de fosfatase alcalina e reduziu a mineralização dessas células. O alginato de propileno glicol, por si só, não influenciou a proliferação, também reduziu a atividade de ALP e a mineralização, mas sua presença parece agir no processo de diferenciação, visto pela maior expressão de ALP e OPN em CTM-MO CD 45⁻90⁺ tratadas com APG.

Esses achados estão de acordo com outros estudos.^{11,25} van den Dolder e colaboradores¹¹ mostraram que uma população celular heterogênea de medula óssea tratada com EMD não apresentou diferenças na proliferação celular obtendo um crescimento celular linear e similar a do grupo não tratado. No entanto, outros estudos^{10,26} mostraram que o EMD estimulou a proliferação de células derivadas de medula óssea. A diferença nos resultados dos estudos podem ser associados com o tipo celular usado em cada estudo. Guida e colaboradores¹⁰ e Keila e colaboradores²⁶ usaram células estromais de medula óssea (CE-MO), os quais são células semelhantes a fibroblastos que formam uma monocamada no frasco de cultivo celular e podem suportar o crescimento e diferenciação de células tronco hematopoiéticas. Para nosso conhecimento, o presente estudo foi o primeiro a usar células tronco mesenquimais de medula óssea altamente isoladas, as quais conceitualmente são células de medula óssea CD 45⁻90⁺, aderentes ao plástico e capazes de se diferenciar em pelo menos 3 tipos celulares.¹⁷

A caracterização das CTM-MO CD 45⁻90⁺ no presente estudo comprovou sua capacidade de expressar fenótipo osteoblástico e adipogênico e mostrou uma maior habilidade de formar colônias, maior quantidade de antígenos celulares específicos de células tronco mesenquimais (CD 90) e maior expressão do gene REX-1 comparado a CE-MO. O gene REX-1, também chamado de proteína *zinc-finger-42* (zfp42), ajuda na regulação positiva de fatores de transcrição principais, como Oct4 e Nanog²⁷ e sua expressão aumenta a eficiência da diferenciação de células tronco mesenquimais.^{28,29} Por isso, ele tem emergido como um importante marcador de células tronco e foi reportado estar presente em células tronco embrionárias e células tronco multipotentes de medula óssea.^{27,30}

Outra razão para a diferença de resultados encontrada entre os estudos pode ser devido a variações nas concentrações de EMD usadas. Keila e colaboradores²⁶ reportaram que o EMD em concentrações de 25 µg/ml estimularam o potencial osteogênico de CE-MO. van den Dolder e colaboradores¹¹ em uma concentração de 100 µg/ml de EMD não encontraram resultados promissores na proliferação e diferenciação de CE-MO. Guida e colaboradores¹⁰ mostraram um resultado similar, nos quais altas doses de EMD não aumentaram a proliferação das células, provavelmente devido a alta formação de agregados de proteínas do EMD, os quais já são visíveis em baixas concentrações sendo, portanto, a atividade de EMD dose-dependente.

O meio de cultura deve fornecer todos os nutrientes essenciais para o metabolismo, crescimento e proliferação celular. O soro animal, o qual é frequentemente adicionado ao meio basal quimicamente definido, é uma mistura extremamente complexa contendo um grande número de constituintes, biomoléculas de baixo e elevado peso molecular, com atividades diferentes e fisiologicamente equilibradas de inibição e promoção de crescimento.³¹ No entanto, a partir de uma perspectiva de biologia celular e de uma perspectiva de estudos comparativos utilizando fatores de crescimento como drogas, como em nosso estudo, as desvantagens de suplementação de meios de cultura com SFB são múltiplas: (i) o soro é um suplemento de meio mal definido e, assim, um fator ambíguo em cultura de células,^{32,33} (ii) o soro pode conter diferentes quantidades de endotoxinas, hemoglobinas e outros fatores adversos, e (iii) o soro pode ser uma fonte potencial de contaminantes microbianos, tais como fungos, bactérias, micoplasmas, vírus ou príões.^{34,35,36} Assim, o soro introduz várias variáveis desconhecidas no sistema de cultura de tecidos.^{37,38} A partir desta perspectiva, para melhor compreender o mecanismo pelo qual o EMD exerce sua influência no mecanismo biológico de diferenciação de CTM-MO, nós tratamos nossos grupos teste com soro fetal bovino baixo (2% de SFB) para diminuir a influência do soro nos experimentos. Comparando nossos resultados com os da literatura esta é outra razão dos diferentes resultados, uma vez a maioria dos estudos na literatura tem utilizado 10% de SFB.

Nossos resultados revelaram que a atividade de ALP de CTM-MO CD 45⁺90⁺ não foi influenciada pelo tratamento com EMD e, apesar de não ter encontrado diferenças estatísticas, o grupo com a matriz derivada do esmalte mostrou menores resultados do que o grupo controle negativo. O grupo APG também mostrou menor atividade de ALP do que os outros grupos. Isto, conseqüentemente, pode reduzir ou não gerar impacto na mineralização da matriz extracelular nos grupos APG e EMD. Esses achados estão de

acordo com outros estudos os quais não encontraram efeitos consistentes da matriz derivada de esmalte na mineralização de matriz extracelular de células tronco de medula óssea.^{10,11} Além disso, Palioto e colaboradores³⁹ mostraram que células osteoblásticas humanas tratadas com EMD apresentaram menor atividade de ALP e mineralização de matriz extracelular do que células não tratadas.

Até o momento, o conhecimento a cerca do efeito da matriz derivada de esmalte na diferenciação celular não é conclusivo, com dados variáveis e conflitantes na literatura. A expressão de RUNX2 controla a maturação de osteoblastos e sua transição para osteócitos e está presente enquanto o evento de diferenciação celular ocorrer. O gene osterix (OSX) direciona células precursoras a se diferenciar em linhagem osteoblástica. A expressão de ambos os genes indica o processo de diferenciação e formação óssea. Sendo assim, a possível escassa influência do EMD no aumento da diferenciação osteoblástica de CTM-MO CD 45⁺90⁺ pode ser demonstrado pelos nossos achados de expressão gênica, uma vez que eles indicaram que a expressão de RUNX2 e OSX não foram afetados pelo EMD em 7 e 10 dias e foi reduzido em 14 dias. A fosfatase alcalina (ALP) é uma glicoproteína específica presente na superfície de osteoblastos a qual está envolvida nos estágios iniciais do processo de diferenciação celular. No nosso estudo a expressão de ALP na presença de EMD foi maior que o controle positivo em 7 e 10 dias e que o controle negativo em 10 dias, mas não mostraram nenhuma diferença em relação ao grupo APG em todos os tempos analisados. A expressão de osteopontina (OPN) suporta a mineralização estando expressa em tecidos calcificados. Nosso estudo revelou que CTM-MO CD 45⁺90⁺ na presença de APG alcançaram uma maior expressão de OPN em todos os tempos analisados. Isso pode demonstrar que a presença de um gel (alginato de propileno glicol) pode agir como uma matriz para as células influenciando positivamente no processo de diferenciação de CTM. Villa-Diaz e colaboradores⁴⁰ demonstraram que células tronco embrionárias cultivadas com um polímero sintético ou com um Matrigel suportam o estado indiferenciado a longo prazo, a ligação, proliferação e potencial e diferenciação dessas células. Além disso, nenhum estudo *in vitro* até a presente data avaliou separadamente a influência do veículo do EMD em CTM. Isso pode ser um viés, uma vez que não se sabe se o efeito produzido é devido às proteínas e fatores de crescimento presentes no Emdogain ou se é devido a presença do gel em contato com as células. No entanto, esse resultado sozinho não pode concluir que o APG tem alguma influência na diferenciação celular de CTM. Ainda, o alginato de propileno glicol não influenciou a expressão de OSX e RUNX2 em CTM-MO

CD 45⁹⁰⁺, significando que mais estudos futuros são requeridos para determinar a contribuição do gel nas propriedades de CTM.

O EMD reduziu a expressão de OPN em 10 e 14 dias estando de acordo com os nossos resultados de mineralização de matriz extracelular, os quais mostraram menor formação de nódulos minerais em células tratadas com EMD. Esses resultados estão de acordo com estudos prévios.^{10,11} van den Dolder e colaboradores¹¹ não encontraram diferenças na expressão gênica de colágeno tipo I, ALP e osteocalcina entre as células tratadas e não tratadas com matriz derivada de esmalte. Guida e colaboradores¹⁰ mostraram uma redução nos níveis de osteocalcina em células tratadas com matriz derivada do esmalte. Até mesmo em células pré-osteoblásticas (2T9), a matriz derivada do esmalte não afetou a expressão de marcadores osteogênicos.⁴¹

O presente estudo mostrou que o EMD não aumenta a proliferação, diferenciação e mineralização de matriz de CTM-MO CD 45⁹⁰⁺. Todavia, deve ser levado em consideração que este é um estudo *in vitro* e os achados em estudos em animais e clínicos são controversos. Vários estudos pré-clínicos *in vivo* tem demonstrado que a aplicação de EMD pode promover estágios precoces de formação óssea no fêmur^{42,43} e em defeitos de calvária de ratos.⁴⁴ Porém, outro estudo revelou que o EMD falhou em mostrar uma propriedade osteocondutiva em defeitos de calvária de ratos.⁴⁵ Uma razão para esses dados controversos é que, apesar da extensa literatura, a composição exata no EMD e o mecanismo pelo qual ele induz regeneração periodontal e óssea permanece incerto. Embora Gestrelius e colaboradores⁴⁶ não encontraram nenhum fator de crescimento no EMD, outros autores tem sugerido que o EMD contém TGF-β1 exógeno¹² e sialoproteína óssea,¹³ os quais podem influenciar diversos eventos celulares.

Ao contrário do pouco efeito do EMD em CTM-MO CD 45⁹⁰⁺ no presente estudo, o EMD parece ter um efeito positivo e significativa influência em células do ligamento periodontal (LP). Vários estudos mostraram um estímulo na proliferação celular, atividade de ALP, na formação de nódulos minerais e produção de TGF-β1 em células de LP cultivadas com EMD.^{3,47,48} No entanto, nos mesmos estudos o EMD inibiu ou prejudicou a ligação e propagação dessas células. Sendo assim, isto pode ser outro motivo da diferença dos efeitos do EMD em estudos *in vitro* com células tronco mesenquimais e estudos *in vivo* em defeitos periodontais: a presença de células no ligamento periodontal residual podem auxiliar o processo de regeneração e influenciar eventos de células tronco mesenquimais.

Conclusão

O presente estudo *in vitro* mostrou que o Emdogain não influenciou a proliferação, diferenciação e atividade de ALP e reduziu a mineralização de matriz extracelular de células tronco mesenquimais de medula óssea CD 45⁺90⁺. Além disso, o veículo do Emdogain, alginato de propileno glicol, não influenciou a proliferação e reduziu a atividade de ALP e mineralização, mas sua presença parece agir positivamente na diferenciação de CTM-MO CD 45⁺90⁺.

Referências Bibliográficas

- 1 – Rincon JC, Haase HR & Bartold PM. Effect of emdogain on human periodontal fibroblasts in an in vitro wound healing model. *J Periodont Res.* 2003;38(3):290–5.
- 2 – Hammarstrom L, Heijl K, Gestrelus S. Periodontal regeneration in a buccal dehiscence model in monkeys after applications of enamel matrix proteins. *J Clin Periodontol.* 1997;24(9):669-77.
- 3 – Rodrigues TLS, Marchesan JT, Coletta RD, Novaes Jr. AB, Grisi MFM, Souza SLS, Taba Jr. M, Palioto DB. Effects of enamel matrix derivative and transforming growth factor-b1 on human periodontal ligament fibroblasts. *J Clin Periodontol.* 2007;34(6):514-22.
- 4 – Zeichner-David M, Chen LS, Hsu Z, Reyna J, Caton J, Bringas P. Amelogenin and ameloblastin show growthfactor like activity in periodontal ligament cells. *Eur J Oral Sci.* 2006;114:244-53.
- 5 – Heden G, Wennstrom J, Lindhe J. Periodontal tissue alterations following Emdogain treatment of periodontal sites with angular bone defects. *J Clin Periodontol.* 1999;26(12):855-60.
- 6 – Parashis AO, Polychronopoulou A, Tsiklakis K, Tatakis DN. Enamel matrix derivative in intrabony defects: prognostic parameters of clinical and radiographic treatment outcomes. *J Periodontol.* 2012;83(11):1346-52.
- 7 – Sculean A, Nikolidakis D, Nikou G, Ivanovic A, Chapple IL, Stavropoulos A. Biomaterials for promoting periodontal regeneration in human intrabony defects: a systematic review. *Periodontol 2000.* 2015;68(1):182-216.
- 8 – Giannobile WV, Somerman MJ. Growth and amelogenin-like factors in periodontal wound healing. A systematic review. *Ann Periodontol.* 2003;8(1):193-204.
- 9 – Venezia E, Goldstein M, Boyan BD, Schwartz Z. The use of enamel matrix derivative in the treatment of periodontal defects: a literature review and meta-analysis. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004;15(6):382-402.
- 10 – Guida L, Annunziata M, Carinci F, Di Feo A, Passaro I, Oliva A. In vitro biologic response of human bone marrow stromal cells to enamel matrix derivative. *J Periodontol.* 2007;78(11):2190-6.
- 11 – Van den Dolder J, Vloon APG, Jansen JA. The effect of Emdogain on the growth and differentiation of rat bone marrow cells. *J Periodontal Res.* 2006;41(5):471-6.
- 12 – Kawase T, Okuda K, Yoshie H, Burns DM. Anti-TGFbeta antibody blocks enamel matrix derivative-induced upregulation of p21WAF1/cip1 and prevents its inhibition of human oral epithelial cell proliferation. *J Periodontal Res.* 2002;37(4):255-62.

- 13 – Suzuki N, Ohyama M, Maeno M, Ito K, Otsuka K. Attachment of human periodontal ligament cells to enamel matrix-derived protein is mediated via interaction between BSP-like molecules and integrin α (v) β 3. *J Periodontol*. 2001;72(11):1520-6.
- 14 – Song ZC, Shu R, Zhang XL. Cellular responses and expression profiling of human bone marrow stromal cells stimulated with enamel matrix proteins in vitro. *Cell Prolif*. 2010 Feb;43(1):84-94.
- 15 – Dexter TM, Testa NG, Allen TD, Rutherford T, Scolnick E. Molecular and cell biologic aspects of erythropoiesis in long-term bone marrow cultures. *Blood*. 1981;58(4):699-707.
- 16 – Javazon EH, Beggs KJ, Flake AW. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. *Exp Hematol*. 2004;32(5):414-25.
- 17 – Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop DJ, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.
- 18 – Karaoz E, Aksoy A, Ayhan S, Sariboyaci AE, Kaymaz F, Kasap M. Characterization of mesenchymal stem cells from rat bone marrow: ultrastructural properties, differentiation potential and immunophenotypic markers. *Histochem Cell Biol*. 2009;132(5):533-46.
- 19 – Nandivada H, Villa-Diaz LG, O'Shea KS, Smith GD, Krebsbach PH, Lahann J. Fabrication of synthetic polymer coatings and their use in feeder-free culture of human embryonic stem cells. *Nat Protoc*. 2011;6(7):1037-43.
- 20 - Nagata MJ, de Campos N, Messori MR, Santinoni CS, Bomfim SR, Fucini SE, Pola NM, Neves AP, de Almeida JM, Theodoro LH, Ervolino E. Platelet-rich plasma derived from bone marrow aspirate promotes new cementum formation. *J Periodontol*. 2014;85(12):1702-11.
- 21 - Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H, Bieback K. Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue. *Stem Cells*. 2006;24(5):1294–1301.
- 22 – Abuna RP, De Oliveira FS, Santos T de S, Guerra TR, Rosa AL, Beloti MM. Participation of TNF- α in Inhibitory Effects of Adipocytes on Osteoblast Differentiation. *J Cell Physiol*. 2016 Jan;231(1):204-14.
- 23 - Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193(1):265–75.
- 24 – Majors AK, Boehm CA, Nitto H, et al. Characterization of human bone marrow stromal cells with respect to osteoblastic differentiation. *J Orthop Res*. 1997;15(4):546-57.
- 25 – Gurpinar A, Onur MA, Cehreli ZC, Tasman F. Effect of enamel matrix derivative on mouse fibroblasts and marrow stromal osteoblasts. *J Biomat Appl*. 2003;18(1):25-33.

- 26 – Keila S, Nemcovsky CE, Moses O, Artzi Z, Weinreb M. In vitro effects of enamel matrix proteins on rat bone marrow cells and gingival fibroblasts. *J Dent Res.* 2004; 83(2):134-8.
- 27 – Son MY, Choi H, Han YM, Cho YS. Unveiling the critical role of REX1 in the regulation of human stem cell pluripotency. *Stem Cells.* 2013;31(11):2374-87.
- 28 – Bhandari DR, Seo KW, Roh KH, Jung JW, Kang SK, Kang KS. REX-1 expression and p38 MAPK activation status can determine proliferation/differentiation fates in human mesenchymal stem cells. *PLoS One.* 2010 May 5;5(5).
- 29 – Roche S, Richard MJ, Favrot MC. Oct-4, Rex-1, and Gata-4 expression in human MSC increase the differentiation efficiency but not hTERT expression. *J Cell Biochem.* 2007;101(2):271–80.
- 30 – Mongan NP, Martin KM, Gudas LJ. The putative human stem cell marker, Rex-1 (Zfp42): structural classification and expression in normal human epithelial and carcinoma cell cultures. *Mol Carcinog.* 2006;45(12):887-900.
- 31 – Brunner D, Frank J, Appl H, Schöffl H, Pfaller W, Gstraunthaler G. Serum-free cell culture: the serum-free media interactive online database. *ALTEX.* 2010;27(1):53-62.
- 32 – Bjare, U. Serum-free cell culture. *Pharmac Ther.* 1992;53(3):355-74.
- 33 – Gstraunthaler, G. Alternatives to the use of fetal bovine serum: serum-free cell culture. *ALTEX.* 2003;20(4):275-81.
- 34 – Dormont, D. Transmissible spongiform encephalopathy agents and animal sera. *Dev Biol Stand.* 1999;99:25-34.
- 35 - Eliot, M. Risks of virus transmission associated with animal sera or substitutes and methods of control. *Dev Biol Stand.* 1999;99:9-16.
- 36 – Wessman SJ, Levings RL. Benefits and risks due to animal serum used in cell culture production. *Dev Biol Stand.* 1999;99:3-8.
- 37 – Even MS, Sandusky CB, Barnard ND. Serumfree hybridoma culture: ethical, scientific and safety considerations. *Trends Biotechnol.* 2006;24:105-8.
- 38 – Stoll, LL and Spector AA. Changes in serum influence the fatty acid composition of established cell lines. *In Vitro.* 1984;20:732-8.
- 39 – Palioto DB, Rodrigues TL, Marchesan JT, Beloti MM, de Oliveira PT, Rosa AL. Effects of enamel matrix derivative and transforming growth factor- β 1 on human osteoblastic cells. *Head & Face Medicine.* 2011;18:7-13.
- 40 – Villa-Diaz LG, Nandivada H, Ding J, Nogueira-de-Souza NC, Krebsbach PH, O'Shea KS, Lahann J, Smith G. Synthetic polymer coatings for long-term growth of human embryonic stem cell. *Nat Biotechnol.* 2010;28(6):581-3.

- 41 – Schwartz Z, Carnes DL Jr., Pulliam R, et al. Porcine fetal enamel matrix derivative stimulates proliferation but not differentiation of pre-osteoblastic 2T9 cells, inhibits proliferation and stimulates differentiation of osteoblast-like MG63 cells, and increases proliferation and differentiation of normal human osteoblast NHOst cells. *J Periodontol.* 2000;71(8):1287-96.
- 42 – Kawana F, Sawae Y, Sahara T, et al. Porcine enamel matrix derivative enhances trabecular bone regeneration during wound healing of injured rat femur. *Anat Rec.* 2001;264(4):438-46.
- 43 – Miron RJ, Wei L, Bosshardt DD, Buser D, Sculean A, Zhang Y. Effects of enamel matrix proteins in combination with a bovine-derived natural bone mineral for the repair of bone defects. *Clin Oral Investig.* 2014;18(2):471-8.
- 44 – Yoneda S, Itoh D, Kuroda S, et al. The effects of enamel matrix derivative (EMD) on osteoblastic cells in culture and bone regeneration in a rat skull defect. *J Periodontol Res.* 2003;38(3):333-42.
- 45 – Intini G, Andreana S, Buhite RJ, Bobek LA. A comparative analysis of bone formation induced by human demineralized freeze-dried bone and enamel matrix derivative in rat calvaria critical-size bone defects. *J Periodontol.* 2008;79(7):1217-24.
- 46 – Gestrelus S, Andersson C, Johansson AC, et al. Formulation of enamel matrix derivative for surface coating. Kinetics and cell colonization. *J Clin Periodontol.* 1997;24(9):678-84.
- 47 - Palioto DB, Coletta RD, Graner E, Joly JC, de Lima AF. The influence of enamel matrix derivative associated with insulin-like growth factor-I on periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontol.* 2004;75(4):498–504.
- 48 – van der Pauw MT, van den Bos T, Everts V, Beertsen W. Enamel matrix-derived protein stimulates attachment of periodontal ligament fibroblasts and enhances alkaline phosphatase activity and transforming growth factor beta1 release of periodontal ligament and gingival fibroblasts. *J Periodontol.* 2000;71(1):31-43.

PARTE 2

Resumo

Efeitos de células tronco mesenquimais de medula óssea e matriz derivada de esmalte na regeneração de defeitos periodontais.

A completa regeneração de todos os tecidos periodontais perdidos permanece um desafio. Na tentativa de alcançar esse objetivo o uso de células tronco mesenquimais derivadas de medula óssea (CTM-MO) vem sendo bastante estudada, devido sua capacidade de diferenciação em progenitores periodontais. No contexto da engenharia tecidual, uma interessante aplicação das matriz derivada do esmalte (Emdogain) seria como um mediador biológico específico para CTM-MO no intuito de auxiliar o processo de regeneração periodontal. Sendo assim, o objetivo do presente estudo é avaliar o potencial regenerativo do uso associado ou não, de CTM-MO e Emdogain no tratamento de defeitos periodontais de fenestração em ratos. As células de medula óssea obtidas de ratos isogênicos foram isoladas e separadas por citometria de fluxo em células CTM-MO CD 45⁻90⁺. Defeitos periodontais de fenestração foram criados bilateralmente na mandíbula de 108 ratos isogênicos Wistar-Kyoto. Os animais foram aleatorizados em 6 grupos experimentais: 1) Grupo C: o defeito foi preenchido apenas pelo coágulo sanguíneo; 2) Grupo APG: o defeito foi preenchido com Alginato de Propileno Glicol; 3) Grupo EMD: o defeito foi preenchido com Emdogain; 4) Grupo CTM-MO: o defeito foi preenchido com CTM-MO CD 45⁻90⁺; 5) Grupo CTM-MO – APG: o defeito foi preenchido com CTM-MO CD 45⁻90⁺ associadas ao APG; 6) Grupo CTM-MO – EMD: o defeito foi preenchido com CTM-MO CD 45⁻90⁺ associadas ao EMD. Cada grupo experimental foi dividido em 3 subgrupos para a eutanásia aos 15, 30 ou 60 dias (N = 6). Em uma hemi-mandíbula foram feitas avaliações tridimensionais do tecido ósseo neoformado por análise microtomográfica. A outra hemi-mandíbula foi processada para avaliar quali e quantitativamente o tipo e qualidade dos tecidos neoformados através de análises histológicas e histomorfométricas. A normalidade dos dados foi verificada. As análises de microtomografia foram por ANOVA One-Way e as medidas de histomorfometria pelo teste de Kruskal-Wallis, adotando-se nível de significância de 5%. A análise microtomográfica mostrou que os grupos CTM-MO – APG,

CTM-MO – EMD e EMD alcançaram maior volume e densidade óssea e maior número de trabéculas em 15 dias. Em 30 dias, o grupo CTM-MO – EMD apresentou maior volume ósseo que os grupos C, APG e EMD; o grupo EMD apresentou maior densidade óssea e número de trabéculas; e os grupos com células alcançaram as maiores espessuras de trabéculas ósseas. Em 60 dias, o volume ósseo se igualou entre os grupos, exceto para o grupo APG. Os grupos com células apresentaram maior densidade óssea e número de trabéculas comparado aos grupos EMD e C. A análise histomorfométrica mostrou que aos 15 dias os grupos apresentaram novo osso imaturo fino preenchendo parcialmente o defeito, sendo que o grupo CTM-MO obteve menor formação óssea comparada ao grupo C. Apenas os grupo APG e CTM-MO tiveram neoformação de cimento, mas sem diferenças estatísticas e sem inserção de fibras colágenas. Em 30 dias observou-se novo osso preenchendo quase todo o defeito. O grupo CTM-MO apresentou a maior formação de cimento, mas sem fibras colágenas inseridas. Em 60 dias os defeitos estavam quase completamente preenchidos por novo osso em todos os grupos. O grupo CTM-MO apresentou maior formação de novo cimento comparado aos grupos C e EMD. Os grupos APG, CTM-MO – APG e CTM-MO – EMD também apresentaram neoformação de cimento, mas sem diferenças estatísticas. Exceto pelo grupo EMD e C, todos os outros grupos apresentaram fibras dispostas obliquamente/perpendicularmente na superfície radicular nesse período de análise. Conclui-se que o uso de CTM-MO apresenta resultados promissores na regeneração periodontal com neoformação de osso alveolar, ligamento periodontal e cimento radicular. Porém, a associação dessas células com EMD parece não adicionar resultados positivos nesse processo regenerativo.

Abstract

Effects of bone marrow mesenchymal stem cells and enamel matrix derivative in the regeneration of periodontal defects.

The complete regeneration of all lost periodontal tissues remains a challenge. To achieve this aim the use of bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSCs) has been extensively studied due their ability to differentiate into periodontal progenitors. In the tissue-engineering context, an interesting application of enamel matrix derivative (EMD) would like a specific biological agent to BM-MSCs in order to assist the periodontal regeneration. Thus, the aim of this study is to evaluate the regenerative potential of the use of BM-MSCs associate or not with EMD in the treatment of periodontal fenestration defects in rats. Bone marrow cells obtained from isogenic rats were isolated and separated by flow cytometry in CD 45⁻90⁺ BM-MSCs. Fenestration periodontal defects were created bilaterally on the mandible of 108 isogenic Wistar-Kyoto rats. The animals were randomized into 6 experimental groups: 1) C Group: the defect was filled only with blood clot; 2) PGA Group: the defect was filled with Propylene Glycol Alginate; 3) EMD Group: the defect was filled with Emdogain; 4) BM-MSCs Group: the defect was filled with CD 45⁻90⁺ BM-MSCs; 5) BM-MSCs – PGA Group: the defect was filled with CD 45⁻90⁺ BM-MSCs associated with PGA; 6) BM-MSCs – EMD Group: the defect was filled with CD 45⁻90⁺ BM-MSCs associated with EMD. Each experimental group was divided into 3 subgroups for euthanasia at 15, 30 or 60 days (N = 6). In one hemi-mandible three-dimensional evaluations of new bone were made by micro-CT analysis. Another hemi-mandible was processed to evaluate, qualitatively and quantitatively, the type and quality of the newly formed tissue by histological and histomorphometric analysis. The normality of the data was verified. The micro-CT analyses were performed by Analysis of Variance (ANOVA One-Way) and histomorphometry by Kruskal-Wallis test, adopting a significance level of 5%. The micro-CT analysis showed that BM-MSCs – PGA, BM-MSCs – EMD and EMD groups reached greater bone volume and density and greater trabecular number in 15 days. In 30 days, the BM-MSCs – EMD group showed higher

bone volume than C, PGA and EMD groups; EMD group had higher bone density and trabecular number; and the cell groups reached the greater trabecular thickness. In 60 days, the bone volume was equal between groups, except for the PGA group. The cell groups had greater bone density and trabecular number compared to EMD and C groups. Histomorphometric analysis showed that at 15 days the groups presented new thin immature bone partially filling the defect, and the BM-MSCs group had lower bone formation compared to C group. Only the PGA and BM-MSCs groups showed formation of new cementum, but without statistical differences and no insertion of collagen fibers. In 30 days new bone was observed almost filling the entire defect. The BM-MSCs group reached the highest formation of new cementum, but without insertion of collagen fibers. In 60 days, the defects were almost completely filled with new bone in all the groups. The BM-MSCs group showed higher new cementum formation compared to C and EMD groups. The PGA, BM-MSC – PGA and BM-MSC – EMD groups also showed formation of new cementum, but without statistical differences. Except for EMD and C groups, all other groups had collagen fibers arranged obliquely / perpendicularly on the root surface in 60 days. It concludes that the use of BM-MSCs shows promising results in periodontal regeneration with formation of new alveolar bone, periodontal ligament and cementum. However, the association of these cells with EMD does not seem to add positive results in this regenerative process

Lista de Figuras

Figura 1 -	A) Coleta do Aspirado de medula óssea da crista ilíaca de ratos; (B) armazenamento do volume total aspirado em microtubos estéreis.....	55
Figura 2 -	A) Interfase de células mononucleares formada após aplicação da solução de Ficoll. B) Pellet formado para cultivo após centrifugação....	57
Figura 3 -	Esquema representando as dimensões do defeito de fenestração.....	58
Figura 4 -	Criação de defeito de fenestração e aplicação da terapia. A) Incisão com lâmina de bisturi; B) Dissecção de tecidos; C) Corte de tendão sobre a mandíbula; D) osso mandibular exposto; E) Confeção de defeito de fenestração com broca diamantada; F) Defeito de fenestração periodontal finalizado; G) Aplicação da terapia; H) Sutura de tecidos em pontos simples	59
Figura 5 -	Processamento da imagem no programa CTAn: A) Escolha do ROI e interpolação da imagem, B) binarização da imagem e C) imagem processada.....	60
Figura 6 -	Esquema representando as medidas histomorfométricas. A) Medidas de área: ATD – área total do defeito; ANO – área de novo osso; ANTC – área de novo tecido conjuntivo. B) Medidas lineares: ELR – extensão linear da raiz; ELC – extensão linear de novo cemento formado; ELO – extensão linear de novo osso; ELTC – extensão linear de novo tecido conjuntivo.....	62
Figura 7 -	Gráficos de separação celular por citometria de fluxo para obtenção de uma população celular CD 45-90+. A) Isolamento de células CD 45- (73,9% da população total); B) Isolamento de células CD 90+ a partir das células CD 45- (73,9% da população total, 100% da população CD 45-).	63
Figura 8 -	Gráficos representando os resultados da análise microtomográfica de volume ósseo (em mm ³), densidade óssea (em 1-mm), número de trabéculas (em 1-mm) e espessura de trabéculas ósseas (em mm) em 15, 30 e 60 dias. (*) Indicam diferenças estatisticamente significantes	

- em relação a todos os outros grupos. Chaves representam diferenças estatisticamente significantes somente entre dois grupos..... 65
- Figura 9 - Imagens de microtomografia em 2D nos eixos longitudinal e coronal dos grupos C, APG, EMD, CTM-MO, CTM-MO – APG e CTM-MO – EMD em 15, 30 e 60 dias de pós-operatório..... 66
- Figura 10 - Imagens de microtomografia em 3D dos grupos C, APG, EMD, CTM-MO, CTM-MO – APG e CTM-MO – EMD em 15, 30 e 60 dias de pós-operatório..... 67
- Figura 11 - Imagens histológicas representando os grupos: A) C; B) APG; C) EMD; D) CTM-MO; E) CTM-MO – APG; F) CTM-MO – EMD em 15 dias de pós-operatório. G) Grupo CTM-MO em 15 dias representando formação óssea parcial no defeito com tecido conjuntivo próximo a raiz; ANO = área de novo osso; ANTC = área de novo tecido conjuntivo. H) Área aproximada de região da figura G apresentando fibras colágenas dispostas paralelamente sobre a superfície radicular. (H.E. com magnificação original de 2,5× A-F, 10× em G e 40× em H)..... 70
- Figura 12 - Imagens histológicas representando os grupos: A) C; B) APG; C) EMD; D) CTM-MO; E) CTM-MO – APG; F) CTM-MO – EMD em 30 dias de pós-operatório. G) Grupo EMD em 30 dias representando formação óssea ocupando quase toda extensão do defeito com presença de novo ligamento periodontal; ANO = área de novo osso; LP = Ligamento Periodontal. H) Área aproximada de região da figura G apresentando fibras colágenas dispostas paralelamente sobre a superfície radicular. (H.E. com magnificação original de 2,5× A-F, 10× em G e 40× em H)..... 71
- Figura 13 - Imagens histológicas representando os grupos: A) C; B) APG; C) EMD; D) CTM-MO; E) CTM-MO – APG; F) CTM-MO – EMD em 60 dias de pós-operatório. G) Grupo CTM-MO em 60 dias representando formação óssea espessa em toda extensão do defeito com presença de novo ligamento periodontal; ANO = área de novo osso. (H) Área aproximada de região da figura G apresentando fibras colágenas dispostas obliquamente/perpendicularmente sobre a

superfície radicular; LP = Ligamento Periodontal; setas amarelas indicam formação de novo cemento radicular sob a dentina adjacente. (H.E. com magnificação original de 2,5× A-F, 20× em G e 40× em H). 72

Figura 14 - Gráficos representando os resultados da análise histomorfométrica de área de novo osso e área de novo tecido conjuntivo formados (em %) em 15, 30 e 60 dias. Chaves representam diferenças estatisticamente significantes somente entre dois grupos..... 73

Figura 15 - Imagem histológica do grupo APG em 15 dias representando área com reabsorção radicular externa pontual sobre a raiz distal do primeiro molar preenchido por novo tecido conjuntivo com processo inflamatório. (HE com magnificação original de 20x)..... 73

Figura 16 - Imagens histológicas e gráficos representando os resultados da análise histomorfométrica de extensão linear de tecido conjuntivo, cemento e osso em 15, 30 e 60 dias de pós-operatório (em %). Nas imagens: (A) Grupo CTM-MO – EMD em 30 dias; setas azuis indicam tecido conjuntivo celularizado formado próximo a raiz principal do defeito; (B) Grupo CTM-MO em 60 dias; setas amarelas indicam formação de novo cemento radicular sob a superfície radicular; (C) Grupo APG em 30 dias; setas vermelhas indicam áreas de anquilose. (HE com magnificação original de 20x). Nos gráficos (*) indicam diferenças estatisticamente significantes em relação a todos os outros grupos; chaves representam diferenças estatisticamente significantes somente entre dois grupos..... 75

Lista de Abreviações, Siglas e Símbolos

AMO	Aspirado de medula óssea
ALP	Fosfatase alcalina
ANO	Área de novo osso
ANTC	Área de novo tecido conjuntivo
APG	Alginato de propileno glicol
ATD	Área total do defeito
BSP	Sialoproteína óssea
CD	Grupamento de diferenciação
CE-MO	Células estromais de medula óssea
cm ²	Centímetros quadrados
CO ₂	Dióxido de carbono
Col-1	Colágeno tipo I
CTM	Células tronco mesenquimais
CTM-MO	Células tronco mesenquimais derivadas de medula óssea
DMEM	Dulbecco's Modified Eaggles Medium
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
ELC	Extensão linear de cimento
ELO	Extensão linear de osso
ELR	Extensão linear da raiz
ELTC	Extensão linear de tecido conjuntivo
EMD	Emdogain
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
g	Gramas
G	Força gravitacional
kV	Quilovolt
LP	Ligamento periodontal
μA	Micro-amperes
MDE	Matriz derivada de esmalte
min	Minutos

µg	Micrograma
ml	Mililitros
µl	Microlitro
mm	Milímetros
µm	Micrometros
PBS	Solução salina tamponada
PE	Ficoeritrina
pH	Potencial hidrogeniônico
ROI	Região a ser analisada (ou de interesse)
rpm	Rotações por minuto
RTG	Regeneração tecidual guiada
SFB	Soro fetal bovino
VOI	Volume de interesse
2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
°C	Graus Celsius

Introdução

O objetivo final da terapia periodontal é alcançar a regeneração de todos os tecidos periodontais perdidos, incluindo neoformação de ligamento periodontal, tecido conjuntivo gengival, cemento radicular e osso alveolar para que a arquitetura e a função sejam restauradas.^{1,2,3} Contudo, a completa regeneração periodontal permanece como um dos maiores desafios da periodontia sendo muito difícil de ser alcançada devido a complexidade da arquitetura e do microambiente do periodonto.⁴

Desde a década de 80 inúmeros procedimentos tem sido descritos para promover uma completa regeneração periodontal de maneira previsível. Os princípios desses diferentes tratamentos convencionais incluem: uso de enxertos ósseos,^{3,5} uso de regeneração tecidual guiada (RTG);^{6,7} e uso de moléculas bioativas, como a matriz derivada do esmalte (MDE).^{8,9,10} Porém, tem sido demonstrado que essas estratégias de tratamento apresentam variáveis resultados clínicos em defeitos periodontais, geralmente não alcançando a completa regeneração de todos os tecidos perdidos.^{11,12}

A estratégia de terapias convencionais para tratamento de defeitos periodontais é estimular a regeneração através do recrutamento de células tronco somáticas e progenitoras endógenas, em um processo biológico conhecido como “*homing*” celular.¹³ Sendo assim, a presença do tecido remanescente/residente constitui um dos fatores mais importantes para regeneração periodontal nessa abordagem. Portanto, o uso de MDE e RTG ainda estão limitados a casos específicos, como defeitos infra-ósseos com perda óssea vertical ao redor de um dente (defeitos de duas ou três paredes) ou em lesões de bifurcações classe I ou II.¹⁴ Com isso, em muitos casos de perda de inserção e óssea horizontais, procedimentos regenerativos convencionais permanecem imprevisíveis.

A engenharia tecidual tem emergido como uma abordagem alternativa para aliviar ou suprir as deficiências das opções terapêuticas regenerativas convencionais e acelerar os mecanismos regenerativos endógenos.¹⁵ No contexto da terapia periodontal, uma potencial abordagem da engenharia tecidual envolve a incorporação de células tronco mesenquimais (CTM) em materiais biocompatíveis utilizados como veículo celular associados ou não a moléculas bioativas, os quais serão subsequentemente implantados em conjunto no defeito periodontal.^{13,15} Porém, a terapia periodontal baseada em células também tem sido usada

sem a associação com biomateriais ou veículos celulares, ou seja, apenas com a incorporação do *pellet* celular nos defeitos ósseos/periodontais.^{16,17} Ambas as estratégias de terapia celular, com ou sem um veículo, tem apresentado resultados satisfatórios^{14,16-18} e buscam otimizar uma das limitações associadas com procedimentos regenerativos convencionais, o qual seria permitir uma direta incorporação de células e fatores de crescimento no defeito, eliminando a fase de latência do recrutamento celular para o local da ferida periodontal.^{3,15} Na literatura, vários estudos utilizam CTM em seu estado indiferenciado, ou seja, mantendo o seu potencial de diferenciação em multilinhagens nos defeitos periodontais.^{15,18,19} Essa abordagem se baseia na noção de que células tronco podem participar diretamente na regeneração a partir da sua diferenciação em células progenitoras sob a influência do microambiente local.^{20,21}

As células utilizadas em terapias celulares devem ser não-imunogênicas, altamente proliferativas, fáceis de serem adquiridas, serem capazes de se auto-renovar e terem a habilidade de se diferenciar em multilinhagens de células que compreendam os tecidos periodontais.^{14,22} Dentre essas células, as CTM derivadas de medula óssea (CTM-MO) estão sendo bastante testadas em estudos pré-clínicos para regeneração periodontal.^{14,17,18,23} Essas células podem se comunicar com tecidos dentais e tornar-se células progenitoras tecido-específicas em sítios de regeneração tecidual.²⁴

O potencial de formação óssea de células tronco derivadas de medula óssea em defeitos ósseos e periodontais de modelos animais tem sido bem documentada na literatura.^{14,15,18,25-27} Ribeiro e colaboradores²⁷ mostraram que em defeitos ósseos de deiscência ao redor de implantes dentários em cães as CTM-MO são capazes de produzir deposição de nódulos minerais e expressar genes osteoblásticos nas células (ALP, BSP e Col-1) apresentando, portanto, resultados promissores na regeneração óssea de defeitos peri-implantares. É aparente que as CTM-MO tem a capacidade de aumentar a regeneração periodontal através da geração melhorada de osso alveolar maduro e neovascularização, além de contribuir para formação de novo cemento e ligamento periodontal funcionais, ou seja, com fibras inseridas no novo cemento e osso alveolar.^{15,19,23,28,29} Dados *in vitro* sugerem que esta forma de terapia tem o potencial de desenvolver as características do ligamento periodontal e se diferenciar em células com potencial de formar outros tecidos periodontais.³⁰ Simsek e colaboradores³¹ observaram que defeitos de bifurcação Classe II criados em cães foram regenerados com cemento radicular, osso alveolar e ligamento periodontal após 8 semanas do transplante de células derivadas de medula óssea.

O cultivo de células derivadas de medula óssea que a maioria dos trabalhos utilizam se dá selecionando células apenas com a propriedade de se aderir ao plástico dos frasco de cultura.³² No entanto, esse método não é suficiente para caracterizar uma célula como CTM.³³ Por isso, a separação celular a partir dessas populações aderentes ao plástico vem sendo iniciadas em alguns estudos para se obter células específicas com presença de marcadores celulares de células tronco, como CD105, CD73 e CD90 e sem expressar marcadores de células hematopoiéticas, como CD45 e CD34, além de apresentarem característica multipotente.^{33,34}

O mecanismo pelos quais as CTM transplantadas induzem a formação de novos tecidos periodontais permanece incerto. Uma grande variedade de fatores quimiotáticos, moléculas de adesão, fatores de crescimento e moléculas da matriz extracelular podem participar juntos na indução da diferenciação de CTM em progenitores de tecidos periodontais.³⁵ Portanto, a possibilidade de promover a proliferação e diferenciação de células tronco por mediadores biológicos específicos pode ser uma interessante aplicação do Emdogain na engenharia tecidual. O Emdogain (EMD) é derivado de proteínas de matriz de esmalte de origem suína e tem sido aplicado na superfície radicular com resultados clínicos satisfatórios, incluindo regeneração de cemento radicular, ganho de nível clínico de inserção e preenchimento ósseo radiográfico.³⁶⁻⁴⁰ Uma revisão sistemática da literatura Cochrane⁸ envolvendo 13 ensaios clínicos mostrou que o uso de EMD aumentou significativamente níveis de inserção clínica (média de 1.1 mm) e reduziu a profundidade de sondagem (média de 0.9 mm) em defeitos periodontais. Esse mesmo estudo revelou que os resultados encontrados com EMD foram similares aos encontrados utilizando RTG e que diferenças clínicas entre essas duas técnicas não foram encontradas.⁸ No contexto da engenharia tecidual, o EMD pode promover o estímulo requerido para as células tronco sintetizarem a matriz regenerativa necessária para regeneração periodontal, não dependendo apenas de estímulos provenientes do microambiente. Os agregados formados pelas proteínas do EMD são responsáveis por criar um ambiente positivo para a proliferação e diferenciação de células tronco, em pH fisiológico e temperatura corporal. Duan e colaboradores⁴¹ mostraram que a associação das proteínas derivadas de matriz do esmalte com células tronco pluripotentes pode ser considerada uma ferramenta valiosa para a engenharia dos tecidos periodontais, por promover a formação de novo cemento, de osso alveolar e ligamento periodontal. Até o momento, nenhum estudo avaliou a influência do EMD associado a CTM-MO na regeneração de defeitos periodontais.

Proposição

Objetivo geral

Analisar a influência do uso, associado ou não, de células tronco mesenquimais de medula óssea e Emdogain no tratamento de defeitos periodontais de fenestração em ratos.

Objetivos Específicos

- Avaliar o volume ósseo, densidade óssea, número e espessura de trabéculas por análise de microtomografia computadorizada em defeitos periodontais tratados com CTM-MO e EMD, associados ou não;
- Avaliar qualitativamente (análise histológica) e quantitativamente (histomorfometria) os novos tecidos formados (cimento radicular, ligamento periodontal e osso alveolar) nos defeitos periodontais de fenestração tratados com CTM-MO e EMD, associados ou não.

Material e Métodos

Modelo animal e grupos experimentais

O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, sob protocolo nº (2014.1.494.58.0) respeitando os princípios éticos da experimentação animal.

Foram utilizados 108 ratos isogênicos machos (*Rattus norvegicus, albinus*, Wistar Kyoto), pesando entre 250 e 300g (Universidade de São Paulo, Biotério Central do Instituto de Ciências Biológicas), os quais foram alocados em 6 grupos experimentais: Grupo C (Controle), Grupo APG (Alginato de Propileno Glicol), Grupo EMD (Emdogain), Grupo CTM-MO (Células tronco mesenquimais de medula óssea CD 45⁻90⁺), Grupo CTM-MO – APG e Grupo CTM-MO – EMD. Cada grupo foi dividido em 3 subgrupos para a eutanásia aos 15, 30 ou 60 dias de pós-operatório (n = 6).

Aspiração de Medula Óssea

Dois ratos machos isogênicos Wistar-Kyoto pesando entre 250-300 g foram usados para coletar o aspirado de medula óssea (AMO). Previamente, os animais foram anestesiados por uma combinação de ketamina (7 mg/100g de peso corporal – Agener União, Embu-Guaçu, SP, Brasil) e xilazina (0.6 mg/100g de peso corporal – Calier, Juatuba, MG, Brasil). De cada crista ilíaca do animal foram aspirados 0.5 ml de medula óssea usando uma seringa estéril de 10 ml contendo 0.1 ml de heparina para prevenir a coagulação (Figura 1). Assim, o AMO foi removido e estocado em microtubos estéreis (Figura 1).⁴²

Figura 1: A) Coleta do Aspirado de medula óssea da crista ilíaca de ratos; (B) armazenamento do volume total aspirado em microtubos estéreis.

Cultivo de Células Tronco Mesenquimais de Medula Óssea

Após a aspiração da medula óssea, células derivadas de medula óssea foram isoladas pelo método Ficoll com uma adaptação do protocolo de Kern e colaboradores.⁴³ Resumidamente, os 4 ml de AMO coletados foram diluídos em 4 ml de solução salina tamponada (PBS – Gibco-Invitrogen, Grand Island, NY), pH 7.0. Então, 2.4 ml de Ficoll-Paque PREMIUM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) foram adicionados vagarosamente e centrifugados por 30 min a 2500 rpm. A centrifugação formou uma interfase de células mononucleares (Figura 2), a qual foi cuidadosamente aspirada. 10 ml de PBS foram adicionados e centrifugados novamente por 10 min a 1500 rpm. O *pellet* formado (Figura 2) foi cultivado a uma densidade de 1×10^6 células em meio de crescimento, pH 7.0, contendo DMEM (Dulbeco's Modified Eaggles Medium – Gibco-Invitrogen) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB – Gibco-Invitrogen), 100 unidades/ml de penicilina (Gibco-Invitrogen), 100 µg/ml de estreptomicina (Gibco-Invitrogen) e 3 µg/ml de fungizona (Gibco-Invitrogen). CE-MO foram selecionadas por aderência ao poliestireno e expandidas no mesmo meio.

Então, as células foram selecionadas por separação celular em citômetro de fluxo (Facs ARIA - Bioscience BD, San Jose, CA) para alcançar uma população de CTM-MO CD 45⁺90⁺. Resumidamente, com as culturas em subconfluência, uma solução de dissociação celular livre de enzimas (Gibco-Invitrogen) foi adicionada e obtido uma suspensão celular. Após centrifugação, as células foram ressuspensas em solução de bloqueio por 40 min e incubadas com anticorpo monoclonal anti-mouse CD 45 (Rat Anti-Mouse PE – Bioscience BD) e CD 90 (Mouse Anti-Rat FITC – Bioscience BD) por 1 hora a 4 °C, lavadas e ressuspensas em PBS. Suspensões somente com células não-marcadas foram usadas como controle negativo. Após lavagem, as amostras foram processadas em software específico (Cell Quest Software – Bioscience BD). CTM-MO CD 45⁺90⁺ foram cultivadas em meio de crescimento a uma densidade de 1×10^5 células para cada garrafa de 25 cm² (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, EUA). Em todo o experimento, somente células na nona passagem foram usadas, sendo incubadas a 37 °C em 5% de CO₂. Os meios foram trocados três vezes por semana.

Figura 2: A) Interfase de células mononucleares formada após aplicação da solução de Ficoll. B) *Pellet* formado para cultivo após centrifugação.

Procedimento cirúrgico experimental

Após anestesia por injeção intramuscular, antissepsia extra e intrabucal, foi realizada uma incisão e um retalho de espessura total foi rebatido sobre o corpo da mandíbula. Defeitos periodontais de fenestração de 2 mm de altura por 4 mm de comprimento e 1 mm de profundidade foram criados bilateralmente na mandíbula de cada animal removendo o osso alveolar com pontas diamantadas em alta rotação sob constante irrigação com soro, na região das raízes mesial e distal de primeiro molar e mesial de segundo molar, em uma distância de aproximadamente 2 mm da junção cimento-esmalte (Figuras 3 e 4A-F), utilizando um microscópio cirúrgico na ampliação de 10 a 40x (Nikon SMZ800, Nikon Instruments Inc). Com auxílio de curetas periodontais a raiz distal do primeiro molar foi cuidadosamente desnuda para remoção completa de ligamento periodontal, cemento radicular e dentina superficial evitando o dano excessivo na raiz que pudesse comprometer os tecidos pulpare e a resposta cicatricial.

Após criação do defeito, os animais foram aleatorizados em 6 grupos experimentais de acordo com a terapia a ser aplicada (Figura 4G): 1) Grupo C: o defeito foi preenchido apenas pelo coágulo sanguíneo; 2) Grupo APG: o defeito foi preenchido com 25 µl de alginato de propileno glicol; 3) Grupo EMD: o defeito foi preenchido com 25 µl de Emdogain; 4) Grupo CTM-MO: o defeito foi preenchido com 25 µl de CTM-MO CD 45⁻ 90⁺ em uma concentração de 1.2×10^6 células; 5) Grupo CTM-MO – APG: o defeito foi preenchido com 25 µl de CTM-MO CD 45⁻ 90⁺ em uma concentração de 1.2×10^6 células associado a 25 µl de APG; 6) Grupo CTM-MO – EMD: o defeito foi preenchido com 25 µl

de CTM CD 45⁹⁰⁺ em uma concentração de 1.2×10^6 células associados a 25 μ l de EMD (Figura 4).

Os tecidos moles foram reposicionados e suturados com fio de sutura Seda 4-0 (Ethicon, Johnson & Johnson, São Paulo, SP, Brasil) para obter-se um fechamento primário da ferida (Figura 4H). Cada animal recebeu como medicação pós-operatória injeção intramuscular de 24.000 unidades de Penicilina G-benzatina (Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte, Fort Dodge® Saúde Animal Ltda., Campinas, SP) e 0.08 ml de analgésico Dipirona (Febrax – 0,5g/ml, Lema-injex Biologic, São Paulo, SP) para cada 100 g de animal.

Aos 15, 30 ou 60 dias de pós operatório os animais foram eutanasiados. A área original do defeito cirúrgico e os tecidos circunjacentes foram removidos em bloco, os quais foram fixados em 4% de formaldeído por 24 horas. Em uma hemi-mandíbula foi realizado processamento para as análises histológicas e histomorfométricas, enquanto que a outra foi utilizada para análise microtomográfica.

Figura 3: Esquema representando as dimensões do defeito de fenestração.

Figura 4: Criação de defeito de fenestração e aplicação da terapia. A) Incisão com lâmina de bisturi; B) Dissecção de tecidos; C) Corte de tendão sobre a mandíbula; D) osso mandibular exposto; E) Confeção de defeito de fenestração com broca diamantada; F) Defeito de fenestração periodontal finalizado; G) Aplicação da terapia; H) Sutura de tecidos em pontos simples.

Análise Microtomográfica

As amostras foram escaneadas em aparelho de Micro-tomografia computadorizada (Skyscan 1172, - Aartselaar-Belgium). As peças foram envolvidas em papel absorvente umedecido com água e acondicionadas em tubos de polipropileno para estabilização no equipamento de forma a prevenir qualquer tipo de movimentação durante o escaneamento. O escaneamento foi padronizado com um tamanho de voxel isotrópico de 6 μm , (60 kV, 165 μA , em 180°, ângulo de rotação de 0.6 e filtro de Al 0.5 mm). Depois, as projeções tomográficas foram reconstruídas com o auxílio de um programa específico (N.Recon, Version, 1.66, SkyScan), o qual gerou as imagens em 3D.

As imagens escaneadas foram analisadas em 2D nos eixos coronal, transaxial e sagital para escolha do volume de interesse (VOI) da imagem usando o programa DataViewer. Para as análises volumétricas foi escolhido o eixo coronal e utilizado um programa específico de análise 3D (CTAn v.1.10). A região a ser analisada (ROI) foi escolhida individualmente a partir da delimitação da área do defeito em 5 *slices* fixos para todas as amostras. Desta maneira, foi possível realizar a interpolação da área a ser medida (Figura 5). Em seguida, procedemos com a binarização da imagem para separação do osso em estudo (Figura 5), por diferença de densidade, utilizando a escala de níveis de cinza onde determinamos o valor de 60- para todas as amostras (grayscale threshold 0-255). Após, foi realizado o processamento do ROI e obtidos os dados para análise (Figura 5). Para cada amostra foram analisados os seguintes parâmetros: Volume Ósseo (Bv/Tv), o qual refere-se a porcentagem de volume de novo osso em relação ao volume total do defeito; Densidade da superfície óssea (Bs/Tv), a qual é medida área de superfície óssea em relação ao volume total do defeito; Espessura das trabéculas ósseas (Tb.Th); e Número de trabéculas ósseas (Tb.N).

Figura 5: Processamento da imagem no programa CTAn: A) Escolha do ROI e interpolação da imagem, B) binarização da imagem e C) imagem processada.

Análise histológica e histomorfométrica

Após fixação, as amostras utilizadas para as análises histológica e histomorfométrica foram lavadas em água corrente e descalcificadas em solução de Ácido Etilenodiaminotetracético (EDTA – Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha) a 10%. As amostras foram desidratadas em sequências crescentes de álcool, seguida de clarificação em xilol, impregnação e inclusão em parafina (Merck Millipore). Cortes seriados transversais, com 5 µm de espessura, no sentido corono-apical do defeito foram realizados e as lâminas coradas com hematoxilina-eosina (HE – Merck Millipore).

Imagens de seis secções histológicas representando o centro do defeito cirúrgico original no sentido ápico-coronal foram capturadas para análise histológica e histomorfométrica utilizando microscópio Leica DM LB2 (Leica Microsystems Wetzlar, GmbH, Germany) acoplado a uma câmera Leica DC 300F (Leica Microsystems). A análise foi realizada em um programa de análise de imagens específico (Image J) por uma examinadora calibrada e cega aos tratamentos aplicados. Para análise histológica os seguintes parâmetros qualitativos foram avaliados: tipo e qualidade dos tecidos neoformados, ou seja, neoformação óssea, formação de tecido conjuntivo e de novo cemento, assim como a presença e a orientação das fibras do ligamento periodontal. A presença ou ausência de reação inflamatória, reabsorção radicular e anquilose dento-alveolar também foram avaliadas.

As medidas histomorfométricas usadas foram uma adaptação do trabalho de Nagata e colaboradores,⁴² sendo elas (Figura 6):

Medidas Lineares: 1) Extensão linear da raiz (ELR) – extensão linear da raiz distal do primeiro molar no sentido mésio-distal; 2) Extensão linear de cemento (ELC) – extensão linear da raiz do primeiro molar coberta por novo cemento formado; 3) Extensão linear de osso (ELO) – extensão linear da raiz do primeiro molar em contato com osso alveolar; 4) Extensão linear de tecido conjuntivo (ELTC) – extensão linear da raiz do primeiro molar em contato com tecido conjuntivo.

Medidas de área: 1) Área total do defeito (ATD): corresponde a área total do defeito original; 2) Área de Novo Osso (ANO): porção de área total do defeito preenchido com ilhas de novo osso formado; 3) Área de Novo Tecido conjuntivo (ANTC): porção de área total do defeito preenchido por tecido conjuntivo.

Figura 6: Esquema representando as medidas histomorfométricas. A) Medidas de área: ATD – área total do defeito; ANO – área de novo osso; ANTC – área de novo tecido conjuntivo. B) Medidas lineares: ELR – extensão linear da raiz; ELC – extensão linear de novo cemento formado; ELO – extensão linear de novo osso; ELTC – extensão linear de novo tecido conjuntivo.

Análise Estatística

Cada animal foi considerado como uma unidade estatística e cada parâmetro foi avaliado separadamente. O tamanho amostral foi realizado baseado em estudos prévios.⁴⁴⁻

⁴⁷ A normalidade dos dados foi verificada e cada parâmetro foi avaliado separadamente. As medidas histomorfométricas de cada animal foram representadas pela média de seis secções histológicas. ELC, ELO e ELTC foram calculadas como uma porcentagem de ELR. ANO e ANTC foram calculados como uma porcentagem de ATD. As análises microtomográficas intra e inter-grupo foram realizadas pela Análise de Variância (ANOVA One-Way) e as medidas de histomorfometria intra e inter-grupo pelo teste de Kruskal-Wallis, ambos seguidos do pós teste (post hoc) Tukey quando ANOVA ou Kruskal-Wallis sugeriram diferença significativa entre os grupos ($p < 0.05$). Todas as análises foram feitas com um programa estatístico (SigmaPlotTM, Systat Software Inc).

Resultados

Separação celular por citometria de fluxo

A separação celular por citometria de fluxo mostrou que 73,9% das células de medula óssea isoladas por Ficoll foram negativas para o antígeno de superfície celular CD 45 (Figura 7). No segundo estágio de separação, 100% das células CD 45⁻ foram positivas para o antígeno de superfície celular CD 90 (Figura 7). Sendo assim, 73,9% da população inicial de células de medula óssea foram separadas em CTM-MO CD 45⁻90⁺.

Figura 7: Gráficos de separação celular por citometria de fluxo para obtenção de uma população celular CD 45⁻90⁺. A) Isolamento de células CD 45⁻ (73,9% da população total); B) Isolamento de células CD 90⁺ a partir das células CD 45⁻ (73,9% da população total, 100% da população CD 45⁻).

Análise Microtomográfica

O volume ósseo aumentou em todos os grupos em todos os tempos de análise ($p < 0.05$). Em 15 dias os grupos CTM-MO – EMD (47.76 ± 2.16), CTM-MO – APG (42.70 ± 1.79) e EMD (42.10 ± 5.72) alcançaram similar ($p > 0.05$) e maior volume ósseo ($p < 0.05$) que os grupos C (18 ± 2.47), APG (13.44 ± 2.89) e CTM-MO (24.26 ± 1.26). O grupo CTM-MO – EMD (68.51 ± 3.16) obteve maior volume ósseo ($p < 0.05$) em 30 dias comparado aos grupo EMD (53.66 ± 6.54), APG (42.03 ± 6.01) e C (29.58 ± 6.45). Em 60 dias todos os grupos tiveram similar ($p > 0.05$; C: 70.42 ± 7.41 , EMD: 74.54 ± 2.13 , CTM-MO: 74.14 ± 2.76 , CTM-MO – APG: 74.81 ± 1.64 ; CTM-MO – EMD: 77.66 ± 2.83) e maior volume ósseo ($p < 0.05$) que o grupo APG (62.01 ± 2.77) (Figuras 8, 9 e 10).

Os grupos CTM-MO – EMD (20.15 ± 1.36), CTM-MO – APG (17.27 ± 1.49) e EMD (17.01 ± 1.19) alcançaram similar ($p > 0.05$) e maior densidade óssea ($p < 0.05$) do que o grupo C (12.49 ± 3.21) em 15 dias e o grupo CTM-MO – EMD também foi maior ($p < 0.05$) que o grupo CTM-MO (14.26 ± 0.79). Além disso, em 15 dias o grupo APG (6.92 ± 1.89) obteve a menor densidade óssea comparada a todos os outros grupos ($p < 0.05$). Em 30 dias, o grupo EMD (21.89 ± 1.56) apresentou a maior densidade óssea ($p < 0.05$) comparada a todos os outros grupos (C: 16.07 ± 3.26 , APG: 16.92 ± 2.41 , CTM-MO: 14.89 ± 1.29 , CTM-MO – APG: 13.30 ± 0.64 ; CTM-MO – EMD: 18.07 ± 1.56). Os grupos CTM-MO – EMD (15.98 ± 1.32), CTM-MO – APG (16.75 ± 0.85) e CTM-MO (15.84 ± 1.33) alcançaram maiores valores de densidade óssea ($p < 0.05$) em 60 dias comparado aos grupos C (10.19 ± 0.69) e EMD (13.57 ± 1.17) (Figuras 8, 9 e 10).

O número de trabéculas dos grupos CTM-MO – EMD (6.01 ± 0.42), CTM-MO – APG (5.28 ± 0.5) e EMD (5.37 ± 0.22) foram similares ($p > 0.05$) e maiores ($p < 0.05$) em 15 dias comparados aos grupos C (2.67 ± 0.87), APG (1.88 ± 0.33) e CTM-MO (3.33 ± 0.11). Em 30 dias de pós-operatório o grupo EMD (7.96 ± 0.83) obteve mais trabéculas ($p < 0.05$) do que todos os grupos (C: 3.77 ± 1.16 , APG: 5.27 ± 1.17 , CTM-MO: 5.01 ± 0.22 , CTM-MO – APG: 5.82 ± 0.29), exceto ao grupo CTM-MO – EMD (6.68 ± 0.54), do qual foi similar ($p > 0.05$). O grupo CTM-MO – EMD também foi maior que os grupos C e CTM-MO em 30 dias ($p < 0.05$). Em 60 dias, os grupos CTM-MO – EMD (6.95 ± 0.59), CTM-MO – APG (7.17 ± 0.41) e CTM-MO (6.92 ± 0.56) alcançaram mais trabeculado ósseo ($p < 0.05$) do que os grupos C (4.58 ± 0.75) e EMD (5.43 ± 0.31) (Figura 8).

A espessura de trabéculas ósseas do grupo APG (0.11 ± 0.01) foi maior ($p < 0.05$) que todos os grupos em 15 dias (C: 0.07 ± 0.01 , EMD: 0.07 ± 0.008 , CTM-MO: 0.07 ± 0.004 , CTM-MO – APG: 0.08 ± 0.008 , CTM-MO – EMD: 0.07 ± 0.004). Em 30 dias, os grupos CTM-MO – EMD (0.1 ± 0.007), CTM-MO – APG (0.1 ± 0.003) e CTM-MO (0.1 ± 0.009) foram similares ($p > 0.05$) e alcançaram maior ($p < 0.05$) espessura de trabéculas comparado aos grupos C (0.07 ± 0.008), APG (0.08 ± 0.01) e EMD (0.06 ± 0.01). Em 60 dias os grupos C (0.15 ± 0.02) e EMD (0.14 ± 0.01) alcançaram maior espessura do trabeculado ósseo ($p < 0.05$) que os grupos CTM-MO – EMD (0.11 ± 0.01), CTM-MO – APG (0.1 ± 0.006) e CTM-MO (0.1 ± 0.008) (Figura 8).

Figura 8: Gráficos representando os resultados da análise microtomográfica de volume ósseo (em mm³), densidade óssea (em 1-mm), número de trabéculas (em 1-mm) e espessura de trabéculas ósseas (em mm) em 15, 30 e 60 dias. (*) Indicam diferenças estatisticamente significantes em relação a todos os outros grupos. Chaves representam diferenças estatisticamente significantes somente entre dois grupos.

Figura 9: Imagens de microtomografia em 2D nos eixos longitudinal e coronal dos grupos C, APG, EMD, CTM-MO, CTM-MO – APG e CTM-MO – EMD em 15, 30 e 60 dias de pós-operatório.

Figura 10: Imagens de microtomografia em 3D dos grupos C, APG, EMD, CTM-MO, CTM-MO – APG e CTM-MO – EMD em 15, 30 e 60 dias de pós-operatório.

Análise Histológica e Histomorfométrica

Aos 15 dias de pós-operatório observou-se que os grupos apresentaram novo osso imaturo com espessura fina preenchendo parcialmente o defeito periodontal (ANO: C: $90\% \pm 10\%$, EMD: $75\% \pm 29\%$, CTM-MO: $40\% \pm 34\%$, CTM-MO – EMD: $78\% \pm 17\%$, CTM-MO – APG: $76\% \pm 22\%$), das bordas para o centro, sendo que próximo à raiz havia maior presença de um tecido conjuntivo fibroso com processo inflamatório leve a moderado (ANTC: C: $10\% \pm 10\%$, EMD: $25\% \pm 29\%$, CTM-MO: $60\% \pm 34\%$, CTM-MO – EMD: $22\% \pm 17\%$, CTM-MO – APG: $24\% \pm 22\%$) (Figura 11). No grupo APG foi observada reação inflamatória mais intensa no tecido conjuntivo e apenas uma espécime apresentou formação de osso imaturo e fino (ANO: $58\% \pm 36\%$; ANTC: $42\% \pm 36\%$). Observou-se a presença de fibras colágenas dispostas paralelamente à superfície radicular em 2 espécimes do grupo CTM-MO, em 4 espécimes do grupo EMD e em todos os espécimes dos grupos CTM-MO – APG e CTM-MO - EMD (Figuras 11G e H).

Em 30 dias, pode-se observar que o grupo C apresentou neoformação óssea parcial, com osso ainda imaturo e localizado mais próximo às laterais da superfície radicular principal (ANO: $58\% \pm 38\%$) (Figura 12). O grupo APG apresentou novo osso preenchendo a maior parte do defeito periodontal (ANO: $91\% \pm 9\%$), mas ainda com características irregulares. Ambos os grupos apresentaram menor faixa de tecido conjuntivo fibroso denso próximo à raiz distal do primeiro molar, com inflamação leve (ANTC: APG: $47\% \pm 44\%$, C: $9\% \pm 9\%$), sendo que em todos os espécimes do grupo APG e em 3 espécimes do grupo C houve formação de novo ligamento periodontal (LP) rico em fibroblastos e com fibras colágenas dispostas paralelamente em relação a superfície radicular (Figura 12). Nos grupos com células, CTM-MO, CTM-MO – APG, CTM-MO – EMD, observou-se neoformação óssea preenchendo quase todo o defeito periodontal (ANO: $87\% \pm 13\%$, $80\% \pm 16\%$ e $87\% \pm 9\%$, respectivamente) com trabéculas ósseas dispostas de forma mais regular (Figura 12). O novo osso nesses grupos foi acompanhado de completa formação de ligamento periodontal altamente celularizado com fibras colágenas dispostas paralelamente à superfície radicular (Figuras 12G e H). No grupo EMD em 30 dias observou-se que o defeito periodontal estava preenchido com novo osso de espessura mais fina, mas também com disposição mais regular (ANO: $76\% \pm 18\%$), e que as fibras colágenas do novo ligamento periodontal também estavam dispostas paralelamente à superfície radicular (Figura 12).

Em 60 dias de pós-operatório os defeitos periodontais de todos os grupos estavam quase ou totalmente preenchidos por novo osso (ANO: C: $91\% \pm 2\%$, APG: $82\% \pm 26\%$,

EMD: $90\% \pm 13\%$, CTM-MO: $81\% \pm 16\%$, CTM-MO – APG: $94\% \pm 5\%$, CTM-MO – EMD: $84\% \pm 27\%$) (Figura 13). Porém, observou-se que nos grupos com células tronco mesenquimais e no grupo EMD o novo osso formado apresentava-se mais maduro, com morfologia e lamelas ósseas mais definidas que nos grupos C e APG, os quais ainda apresentavam-se parcialmente irregulares. As fibras colágenas do novo tecido conjuntivo formado estavam paralelas à superfície radicular em todos os espécimes dos grupos C e EMD e ora paralelamente ora perpendicularmente no grupo APG. Nos grupos com células houve completa formação de novo ligamento periodontal em todos os espécimes, com fibras dispostas paralelo e obliquamente/perpendicularmente em 3 espécimes do grupo CTM-MO e em 2 espécimes de cada grupo CTM-MO – APG e CTM-MO – EMD, representando uma completa regeneração periodontal (Figuras 13G e H).

A análise estatística histomorfométrica mostrou que o grupo CTM-MO apresentou menor área de novo osso ($p < 0.05$) comparado ao grupo C em 15 dias (Figura 14).

Reabsorção radicular externa pontual foi observada em uma espécime do grupo APG e EMD em 15 dias, em 2 espécimes do grupo EMD em 30 dias, em uma espécime do grupo CTM-MO – EMD em 30 e 60 dias e em 2 espécimes do grupo CTM-MO em 60 dias (Figura 15).

Figura 11: Imagens histológicas representando os grupos: A) C; B) APG; C) EMD; D) CTM-MO; E) CTM-MO – APG; F) CTM-MO – EMD em 15 dias de pós-operatório. G) Grupo CTM-MO em 15 dias representando formação óssea parcial no defeito com tecido conjuntivo próximo a raiz; ANO = área de novo osso; ANTC = área de novo tecido conjuntivo. H) Área aproximada de região da figura G apresentando fibras colágenas dispostas paralelamente sobre a superfície radicular. (H.E. com magnificação original de 2,5× A-F, 10× em G e 40× em H).

Figura 12: Imagens histológicas representando os grupos: A) C; B) APG; C) EMD; D) CTM-MO; E) CTM-MO – APG; F) CTM-MO – EMD em 30 dias de pós-operatório. G) Grupo EMD em 30 dias representando formação óssea ocupando quase toda extensão do defeito com presença de novo ligamento periodontal; ANO = área de novo osso; LP = Ligamento Periodontal. H) Área aproximada de região da figura G apresentando fibras colágenas dispostas paralelamente sobre a superfície radicular. (H.E. com magnificação original de 2,5× A-F, 10× em G e 40× em H).

Figura 13: Imagens histológicas representando os grupos: A) C; B) APG; C) EMD; D) CTM-MO; E) CTM-MO – APG; F) CTM-MO – EMD em 60 dias de pós-operatório. G) Grupo CTM-MO em 60 dias representando formação óssea espessa em toda extensão do defeito com presença de novo ligamento periodontal; ANO = área de novo osso. (H) Área aproximada de região da figura G apresentando fibras colágenas dispostas obliquamente/perpendicularmente sobre a superfície radicular; LP = Ligamento Periodontal; setas amarelas indicam formação de novo cimento radicular sob a dentina adjacente. (H.E. com magnificação original de 2,5× A-F, 20× em G e 40× em H).

Figura 14: Gráficos representando os resultados da análise histomorfométrica de área de novo osso e área de novo tecido conjuntivo formados (em %) em 15, 30 e 60 dias. Chaves representam diferenças estatisticamente significantes somente entre dois grupos.

Figura 15: Imagem histológica do grupo APG em 15 dias representando área com reabsorção radicular externa pontual sobre a raiz distal do primeiro molar preenchido por novo tecido conjuntivo com processo inflamatório. (HE com magnificação original de 20x).

O novo cemento formado foi definido como uma matriz amorfa depositada na superfície radicular com uma linha reversa distinta separando o novo cemento da dentina abaixo, podendo apresentar fibras inseridas na raiz dispostas em paliçada. Apesar de não estatisticamente significativa ($p > 0.05$), em 15 dias apenas os grupos APG ($10\% \pm 26\%$) e CTM-MO – APG ($15\% \pm 25\%$) apresentaram uma faixa de novo cemento, mas que não ocupou toda a extensão da raiz (Figura 16). Em 30 dias de pós-operatório $69\% \pm 29\%$ da extensão total da raiz foi coberta por uma fina camada de novo cemento no grupo CTM-MO, o qual foi estatisticamente significativo ($p < 0.05$) em relação a todos os outros grupos (C, APG, EMD e CTM-MO – EMD: 0%, CTM-MO – APG: $8\% \pm 19\%$) (Figura 16). Nesse mesmo período de análise a quantidade de tecido conjuntivo em contato com a raiz no grupo CTM-MO ($31\% \pm 29\%$) foi estatisticamente menor ($p < 0.05$) do que os grupos C, EMD e CTM-MO – EMD, os quais apresentaram 100% de cobertura radicular por novo tecido conjuntivo (Figura 16). O grupo CTM-MO – APG também apresentou $8\% \pm 19\%$ de cobertura por cemento, mas sem diferença estatística ($p > 0.05$) (Figura 16). Nesse mesmo período, o grupo APG apresentou anquilose em $17\% \pm 17\%$ da extensão total da raiz, mas sem diferença estatística ($p > 0.05$) com os outros grupos, os quais não apresentaram anquilose (Figura 16). Em 60 dias o grupo CTM-MO manteve a maior quantidade de novo cemento formado ($65\% \pm 42\%$) sendo estatisticamente maior ($p < 0.05$) do que os grupos C e EMD, os quais não apresentaram nenhuma formação de cemento radicular (Figura 16). Os grupos APG, CTM-MO – APG e CTM-MO – EMD também apresentaram $31\% \pm 41\%$, $18\% \pm 21\%$ e $26\% \pm 14\%$ de sua superfície radicular coberta por novo cemento, respectivamente, mas sem diferenças estatísticas (Figura 16).

Figura 16: Imagens histológicas e gráficos representando os resultados da análise histomorfométrica de extensão linear de tecido conjuntivo, cimento e osso em 15, 30 e 60 dias de pós-operatório (em %). Nas imagens: (A) Grupo CTM-MO – EMD em 30 dias; setas azuis indicam tecido conjuntivo celularizado formado próximo a raiz principal do defeito; (B) Grupo CTM-MO em 60 dias; setas amarelas indicam formação de novo cimento radicular sob a superfície radicular; (C) Grupo APG em 30 dias; setas vermelhas indicam áreas de anquilose. (HE com magnificação original de 20x). Nos gráficos (*) indicam diferenças estatisticamente significantes em relação a todos os outros grupos; chaves representam diferenças estatisticamente significantes somente entre dois grupos.

Discussão

O presente estudo avaliou a influência do uso, associado ou não, de células tronco mesenquimais de medula óssea (CTM-MO) e Emdogain (EMD) no tratamento de defeitos periodontais de fenestração em ratos. Os resultados demonstraram que abordagens terapêuticas utilizando CTM-MO tem um efeito favorável na formação de tecidos periodontais, como indicado pela influência positiva da terapia celular na formação de novo osso maduro, novo cemento e novo ligamento periodontal com fibras colágenas inseridas nos tecidos adjacentes. Uma revisão sistemática recente apresentou resultados semelhantes e concluíram que a terapêutica com CTM-MO tem uma influência positiva na completa formação tecidual periodontal em estudos em animais.¹²

O uso de CTM-MO associada a um veículo (APG ou EMD) favoreceu o ganho de volume ósseo e número de trabéculas ósseas nos estágios iniciais do processo de cicatrização, comparada aos grupos de cicatrização espontânea, APG e de células em suspensão. Nagahara e colaboradores⁴⁸ especulam que CTM-MO precisam ser transplantadas para sítios periodontais com um veículo carreador biocompatível que facilite e suporte a diferenciação dessas células em precursores celulares periodontais. Por outro lado, estudos na literatura tem mostrado que a injeção de células em suspensão na forma de pellet celular, ou seja, sem a associação com um veículo carreador, em sítios periodontais tem também apresentado resultados satisfatórios em termos de regeneração.^{16,17} Du e colaboradores¹⁷ mostraram que a injeção de células em suspensão em ratos com doença periodontal induzida por introdução de *Porphyromonas gingivalis* contribuiu significativamente para maior regeneração de tecidos periodontais, além de inibir a expressão de TNF- α , IFN- γ e IL1- β . A principal desvantagem associada ao uso de células em suspensão está na alta perda de número celular e desconhecimento do destino dessas células no defeito periodontal e tecidos locais.¹⁷ No presente estudo em 30 dias de pós-operatório os grupos de células, com ou sem um veículo, não apresentaram diferenças estatísticas entre si em relação ao volume e área óssea, mas o grupo de células injetadas na forma de pellet (grupo CTM-MO) mostrou uma maior formação de cemento radicular em relação aos outros grupos nesse mesmo período de análise.

Apesar dos resultados microtomográficos mostrarem valores significativamente melhores no volume ósseo dos grupos com células em relação aos grupos de cicatrização espontânea e APG, a análise histomorfométrica não mostrou diferenças que favoreçam a área de novo osso nos grupos com célula. Porém, observou-se que o novo osso formado nos grupos com células em 60 dias apresentou-se mais maduro que os grupos C e APG. É importante ressaltar que a análise volumétrica feita por microtomografia computadorizada constitui um método mais preciso e eficaz para avaliação de novo tecido ósseo formado.⁴⁹ Em análises histomorfométricas a informação sobre a regeneração óssea é limitada somente à análise bidimensional de novo osso formado em amostras do centro do defeito e isso pode não ser suficiente para avaliar o estado de todo o sítio.⁵⁰ Já a análise microtomográfica observa a regeneração óssea em toda extensão do defeito através da reconstrução de imagens tridimensionais.⁵¹ Além disso, a microtomografia permite quantificar aspectos qualitativos do novo osso formado, como densidade óssea, número e espessura de trabéculas formadas.⁵⁰ O presente estudo mostrou que o número de trabéculas ósseas nos grupos utilizando células associadas ao EMD ou APG foi maior em 15 e 30 dias, além de melhorar a densidade óssea em 15 e 60 dias e aumentar a espessura de trabéculas ósseas em 30 dias. Zang e colaboradores⁵² mostraram que a utilização de CTM derivadas de medula óssea de osso mandibular associadas a um veículo celular (Chitosan) apresentaram maior volume ósseo do que o grupo controle negativo (sem tratamento).

Nossos achados histológicos e histomorfométricos de neoformação óssea estão de acordo com estudos prévios, os quais também não encontraram diferenças estatísticas em relação à área de novo osso entre os grupos utilizando células e os grupos só com o veículo ou cicatrização espontânea.^{14,48,53} Kawaguchi e colaboradores¹⁴ mostraram que em defeitos de bifurcação classe III em cães a porcentagem de formação de novo osso foi de 64,7% no grupo tratado com células derivadas de medula óssea e atelocolágeno e de 54,8% no grupo utilizando apenas o atelocolágeno. Mesmo em defeitos periodontais crônicos, ou seja, que passaram por contaminação periodontal induzida prévia, foi demonstrado que a utilização de células derivadas de medula óssea isoladas por densidade celular associadas a Bio-oss não aceleraram a formação óssea comparada ao grupo apenas com Bio-oss (65% e 48% de neoformação óssea, respectivamente).⁵³ Contraditoriamente, Yang e colaboradores¹⁹ mostraram uma maior porcentagem de preenchimento ósseo de defeitos periodontais de fenestração criados cirurgicamente em ratos nos grupos com células derivadas de medula óssea associados a grânulos microcarreadores (50.6%±18.5%) comparado ao grupo somente com o veículo (26.4%±4.6%) ou com a cicatrização espontânea (23.5%±8%) após

21 dias. Essas diferenças entre esse estudo e nossos resultados pode ser devido ao tipo celular usado.

Em nosso estudo, foram utilizadas células de medula óssea definidas como células tronco mesenquimais (CTM), por serem multipotentes, aderentes ao plástico e separadas em células CD 90⁺ e CD 45⁻.³³ Na maioria dos estudos prévios, incluindo o de Yang e colaboradores,¹⁹ foram utilizadas células derivadas de medula óssea apenas aderentes ao plástico de cultura, as quais conceitualmente não podem ser definidas como CTM,³³ mas sim como células estromais de medula óssea (CE-MO). A aderência ao plástico de cultivo irá isolar células tronco hematopoiéticas,⁵⁴ porém, células concomitantes também aderentes ao plásticos como células endoteliais, osteoblastos, células progenitoras e macrófagos podem permanecer em cultura por diversas passagens, compondo o grupo de CE-MO.^{55,56} Sendo assim, essa contaminação da cultura por células acessórias, que não sejam somente CTM, pode influenciar a taxa de crescimento e potencial de diferenciação da população de CE-MO. Portanto, não se sabe se os efeitos positivos em regeneração periodontal em estudos que utilizaram CE-MO são realmente devido às células tronco ou às células concomitantes presentes na cultura celular.

Outras considerações em relação ao design do estudo que pudesse influenciar os nossos resultados seria a densidade celular e o número de passagens utilizadas. Porém, a maioria dos estudos não apresentam essas informações nos trabalhos.¹² A densidade celular é um fator importante nos processos regenerativos, uma vez que uma alta concentração celular pode perturbar a infiltração de nutrientes nas áreas mais profundas da matriz carreadora onde se encontram as células transplantadas. Sendo assim, o presente estudo utilizou uma quantidade de células que em estudos prévios foi capaz de promover atividades regenerativas em defeitos periodontais em animais.^{17,57} Dados recentes tem mostrado que a diferença entre concentrações celulares utilizadas variando de 1×10^6 a 2×10^7 não influenciaram os resultados de neoformação óssea e de cimento em defeitos críticos, alcançando resultados semelhantes.^{14,58} A expansão das CTM in vitro pode reduzir a capacidade de auto-renovação e proliferação dessas células durante as passagens.^{12,59} Porém, Karaoz e colaboradores⁶⁰ mostraram por análise de citometria de fluxo que células tronco mesenquimais de medula óssea de ratos mantém o seu estado indiferenciado da passagem 3 até a passagem 25. O presente estudo utilizou apenas células na nona passagem, uma vez que foram removidas células apenas de 2 animais para serem utilizadas em todo experimento, necessitando de mais expansões. Li e colaboradores²⁶ mostraram

que CTM-MO criopreservadas em passagem 7 podem suportar a regeneração de cimento, ligamento periodontal e osso alveolar em defeitos de fenestração em cães.

Um componente essencial para alcance de completa regeneração periodontal é a formação de novo cimento radicular, o qual possui uma limitada capacidade de auto-renovação na ausência de exposições prévias ao biofilme dental.⁴⁴ Tem sido aceito que componentes da nova matriz de cimento formada provê sinais de informações para o recrutamento, proliferação e diferenciação de células e regulam a regeneração de tecidos periodontais.³⁵ No presente estudo o grupo com cicatrização espontânea não apresentou nenhuma formação de cimento radicular em nenhum dos tempos analisados, enquanto que a terapia com CTM-MO otimizou a formação de cimento radicular sobre as superfícies radiculares. Esses resultados estão de acordo com estudos prévios.^{14,53} Kawaguchi e colaboradores¹⁴ mostraram uma porcentagem de novo cimento de 94% no grupo de células associadas a atelocolágeno e de 70.5% nos grupos apenas com atelocolágeno em defeitos de bifurcação classe III em cães. Paknejad e colaboradores⁵³ também mostraram uma maior formação de novo cimento no grupo de células com Bio-oss (80%) comparado ao grupo apenas com Bio-oss (48%) em defeitos infra-ósseos de três paredes em cães. Nosso estudo mostrou que no grupo CTM-MO houve uma formação de novo cimento em 69% da extensão radicular em 30 dias de pós-operatório.

As diferenças na taxa de formação de novo cimento entre os estudo pode ter ocorrido devido ao tipo de defeito utilizado. Os estudos de Kawaguchi e colaboradores¹⁴ e Paknejad e colaboradores⁵³ utilizaram defeitos periodontais de tamanho crítico em cães, os quais são conceitualmente definidos como o menor defeito criado cirurgicamente que não cicatrizará espontaneamente durante a vida do animal.⁶¹ Por outro lado, nosso estudo utilizou um defeito periodontal de fenestração em animal de pequeno porte, correspondendo a um defeito não-crítico. Esses defeitos possuem uma janela de cicatrização curta, com reparo rápido como modelo de cicatrização cinética e constituem um defeito agudo, ou seja, não é criado a partir de uma doença natural, estando, portanto, sem contaminação prévia. Porém, defeitos de fenestração em ratos/camundongos são amplamente empregados e aceitos como modelos confiáveis e apropriados para avaliar a cicatrização de feridas periodontais, devido a sua abordagem extraoral, a qual pode prevenir efeitos negativos como contaminação e infecção por saliva e outros microorganismos ou crescimento de tecidos gengivais na área do defeito.^{44,47} Sendo assim, esse modelo em ratos são primordialmente aceitos para se determinar a eficácia terapêutica de diversos tipos de terapias regenerativas, podendo prover prova de princípios em um

curto prazo antes de proceder com pesquisas em animais de grande porte. Além disso modelos experimentais em animais de pequeno porte são atrativos para estudos do tipo prova de princípios, devido ao seu baixo custo, intervalo curto de duração experimental, menor variação microbiológica e genética conhecida.^{12,62} O presente estudo foi cuidadoso na escolha do tipo de rato a ser utilizado. Para se evitar repetidas aspirações de medula nos animais, a qual poderia dificultar o pós-operatório e influenciar nos resultados e diminuir o tempo gasto com o cultivo e separação celular, foi escolhido utilizar ratos Wistar da linhagem isogênica (Kyoto). Esses animais são geneticamente idênticos sendo obtidos a partir de cruzamentos entre irmãos (endocruzamentos) da mesma geração, o que assegura um alto grau de consangüinidade (*inbreeding*). Sendo assim, o uso deles no presente estudo permitiu o transplante de células de um rato isogênico para outro sem riscos de rejeição às células utilizadas.

Para obtenção de completa regeneração periodontal a formação de um ligamento periodontal funcional caracterizado pela presença de fibras inseridas nos tecidos adjacentes deve ser alcançada. O presente estudo mostrou que a terapia com células com ou sem EMD favoreceu a disposição de fibras colágenas mais oblíqua e perpendicularmente em direção à superfície radicular em 60 dias de pós-operatório comparada aos grupos C e APG, os quais apresentaram mais fibras colágenas dispostas paralelamente. Esses resultados estão de acordo com estudos prévios.^{48,53} Nagahara e colaboradores⁴⁸ mostraram que a terapia celular utilizando células tronco de medula óssea com atelocolágeno associada ou não ao β -fosfatotricálcio tiveram mais fibras inseridas no cimento radicular adjacente do que os grupos sem células em defeitos de bifurcação classe III em cães. Paknejad e colaboradores⁵³ mostraram que em defeitos infra-ósseos de 3 paredes em cães houve formação de novo ligamento periodontal funcional em 80% no grupo de células de medula óssea com Bio-oss e em apenas 48% no grupo apenas com Bio-oss.

O uso de EMD sozinho otimizou o ganho de volume ósseo em 15 dias, a densidade e número de trabéculas ósseas em 15 e 30 dias e a espessura de trabéculas em 60 dias de pós-operatório. Na análise histológica o grupo com EMD não apresentou nenhuma formação de cimento nem inserção de fibras radiculares em nenhum dos tempos analisados. Estudos prévios comparando os efeitos do Emdogain em relação ao uso apenas do seu veículo (alginato de propileno glicol) não mostraram diferenças entre os grupos na formação óssea em defeitos periodontais em ratos.^{63,64} Além disso, não foram detectadas diferenças entre os grupos na formação de cimento radicular em defeitos de fenestração⁶⁴ e neoformação de cimento apenas no componente intraósseo de defeitos periodontais

supra-intraósseos ⁶³ em ratos. Mesmo em defeitos de fenestração críticos em macacos, a adicional aplicação de EMD em superfícies radiculares previamente condicionadas com EDTA pareceu não melhorar mais o processo de cicatrização comparado ao grupo com cicatrização espontânea.⁶⁵

Para alcançar sucesso a terapia celular requer um apropriado sinal celular para modular o processo de proliferação, diferenciação e neogênese tecidual.^{3,66,67} Baseado nisso, pensou-se que o EMD associado a CTM poderia promover o estímulo necessário para essas células desenvolverem suas atividades biológicas. Porém, o presente estudo observou que a associação de EMD a CTM-MO não adicionou resultados positivos em relação à neoformação de cimento, ligamento e osso alveolar. O gel de Emdogain agiu mais como uma matriz carreadora do que como uma molécula bioativa funcional propriamente dita, estando de acordo com os resultados obtidos apenas com o grupo EMD sozinho. Estudos prévios *in vitro* mostraram que o EMD não influenciou alguns eventos biológicos como diferenciação e proliferação em células estromais de medula óssea.^{68,69} Até onde sabemos, não há na literatura relatos prévios da associação de EMD com CTM-MO para regeneração de defeitos periodontais. Nosso estudo corresponde a um estudo do tipo prova de princípios e mais estudos em defeitos periodontais críticos e crônicos em animais de grande porte são necessários para examinar a influência do EMD em CTM-MO frente a presença de periodontite prévia.

Conclusão

Baseado nos resultados, e dentro das limitações do presente estudo, pode-se concluir que abordagens terapêuticas utilizando células tronco mesenquimais de medula óssea constitui uma estratégia interessante para o tratamento de defeitos periodontais, alcançando neoformação de osso alveolar, cimento radicular e ligamento periodontal. Porém, a associação dessas células com EMD parece não adicionar resultados positivos nesse processo regenerativo. O uso de um veículo celular favoreceu a formação óssea em volume, a densidade óssea e o número de trabéculas nos estágios iniciais de cicatrização. Por outro lado, o uso de CTM-MO em suspensão favoreceu a neoformação de cimento radicular em 30 dias de pós-operatório.

Referências Bibliográficas

- 1 – American Academy of Periodontology. Consensus Report Periodontal Regeneration around natural teeth. *Annals of Periodontology*. 1996; 1(1):667-670.
- 2 – Narayanan AS, Bartold PM. Biochemistry of periodontal connective tissues and their regeneration: a current perspective. *Connect Tissue Res*. 1996;34(3):191-201.
- 3 – Han J, Menicanin D, Gronthos S, Bartold PM. Stem cells, tissue engineering and periodontal regeneration. *Aust Dent J*. 2014 Jun;59 Suppl 1:117-30.
- 4 – Rios HF, Ma D, Xie Y, Giannobile WV, Bonewald LF, Conway SJ, Feng JQ. Periostin is essential for the integrity and function of the periodontal ligament during occlusal loading in mice. *J Periodontol*. 2008 Aug;79(8):1480–90.
- 5 – Aichelmann-Reidy ME, Yukna RA. Bone replacement grafts. The bone substitutes. *Dent Clin North Am*. 1998 Jul;42(3):491-503.
- 6 – Gottlow J, Nyman S, Karring T, Lindhe J. New attachment formation as the result of controlled tissue regeneration. *J Clin Periodontol*. 1984;11(8):494–503.
- 7 – Gottlow J, Nyman S, Lindhe J, Karring T, Wennström J. New attachment formation in the human periodontium by guided tissue regeneration. Case reports. *J Clin Periodontol*. 1986;13(6):604–16.
- 8 – Esposito M, Grusovin MG, Papanikolaou N, Coulthard P, Worthington HV. Enamel matrix derivative (Emdogain) for periodontal tissue regeneration in intrabony defects. *Cochrane Database Syst Rev*. 2009 Oct 7;(4):CD003875.
- 9 – Sculean A, Windisch P, Szendrői-Kiss D, et al. Clinical and histologic evaluation of an enamel matrix derivative combined with a biphasic calcium phosphate for the treatment of human intrabony periodontal defects. *J Periodontol*. 2008 Oct;79(1):1991–9.
- 10 – Bosshardt DD. Biological mediators and periodontal regeneration: a review of enamel matrix proteins at the cellular and molecular levels. *J Clin Periodontol*. 2008 Sep;35(8 Suppl):87-105.
- 11 – Needleman IG, Worthington HV, Giedrys-Leeper E, Tucker RJ. Guided tissue regeneration for periodontal infra-bony defects. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006 Apr 19;(2):CD001724.
- 12 – Yan XZ, Yang F, Jansen JA, de Vries RB, van den Beucken JJ. Cell-Based Approaches in Periodontal Regeneration: A Systematic Review and Meta-Analysis of Periodontal Defect Models in Animal Experimental Work. *Tissue Eng Part B Rev*. 2015 Oct;21(5):411-26.

- 13 – Chen FM, Sun HH, Lu H, Yu Q. Stem cell delivery therapeutics for periodontal tissue regeneration. *Biomaterials*. 2012 Sep;33(27):6320-44.
- 14 – Kawaguchi H, Hirachi A, Hasegawa N, Iwata T, Hamaguchi H, Shiba H, Takata T, Kato Y, Kurihara H. Enhancement of periodontal tissue regeneration by transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells. *J Periodontol*. 2004 Sep;75(9):1281–7.
- 15 – Lin NH, Gronthos S, Bartold PM. Stem cells and future periodontal regeneration. *Periodontology 2000*. 2009;51:239–251.
- 16 – Yang Z, Jin F, Zhang X, Ma D, Han C, Huo N, Wang Y, Zhang Y, Lin Z, Jin Y. Tissue engineering of cementum/periodontal-ligament complex using a novel threedimensional pellet cultivation system for human periodontal ligament stem cells. *Tissue Eng Part C Methods*. 2009 Dec;15(4):571-81.
- 17 – Du J, Shan Z, Ma P, Wang S, Fan Z. Allogeneic bone marrow mesenchymal stem cell transplantation for periodontal regeneration. *J Dental Res*. 2014 Feb;93(2):183–8.
- 18 – Hasegawa N, Kawaguchi H, Hirachi A, Takeda K, Mizuno N, Nishimura M, Koike C, Tsuji K, Iba H, Kato Y, Kurihara H. Behavior of transplanted bone marrow derived mesenchymal stem cells in periodontal defects. *J Periodontol*. 2006 Jun;77(6): 1003–7.
- 19 – Yang Y, Rossi FM, Putnins EE. Periodontal regeneration using engineered bone marrow mesenchymal stromal cells. *Biomaterials* 2010 Nov;31(33):8574–82.
- 20 – Mooney DJ, Vandenburgh H. Cell delivery mechanisms for tissue repair. *Cell Stem Cell*. 2008 Mar;2(3):205-13.
- 21 – Bassir SH, Wisitrasameewong W, Raanan J, Ghaffarigarakani S, Chung J, Freire M, Andrada LC, Intini G. Potential for Stem Cell-Based Periodontal Therapy. *J Cell Physiol*. 2016 Jan;231(1):50-61.
- 22 – Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. (New York NY) 1999;284:143–7.
- 23 – Kim SH, Kim KH, Seo BM, Koo KT, Kim TI, Seol YJ, Ku Y, Rhyu IC, Chung CP, Lee YM. Alveolar bone regeneration by transplantation of periodontal ligament stem cells and bone marrow stem cells in a canine peri-implant defect model: a pilot study. *J Periodontol*. 2009 Nov;80(11):1815-23.
- 24 – Zhou J, Shi S, Shi Y, Xie H, Chen L, He Y, Guo W, Wen L, Jin Y. Role of bone marrowderived progenitor cells in the maintenance and regeneration of dental mesenchymal tissues. *J Cell Physiol*. 2011 Aug;226(8):2081–90.
- 25 – Arthur A, Zannettino A, Gronthos S. The therapeutic applications of multipotential mesenchymal/stromal stem cells in skeletal tissue repair. *J Cell Physiol*. 2009 Feb;218(2):237-45.
- 26 – Li H, Yan F, Lei L, Li Y, Xiao Y. Application of autologous cryopreserved bone

marrow mesenchymal stem cells for periodontal regeneration in dogs. *Cells Tissues Organs*. 2009;190(2):94–101.

27 – Ribeiro FV, Suaid FF, Ruiz KG, Rodrigues TL, Carvalho MD, Nociti FH Jr, Sallum EA, Casati MZ. Effect of autologous bone marrow-derived cells associated with guided bone regeneration or not in the treatment of peri-implant defects. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2012 Jan;41(1):121-7.

28 – Pieri F, Lucarelli E, Corinaldesi G, Fini M, Aldini NN, Giardino R, Donati D, Marchetti C. Effect of mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma on the healing of standardized bone defects in the alveolar ridge: a comparative histomorphometric study in minipigs. *J Oral Maxillofac Surg*. 2009 Feb;67(2):265-72.

29 – Yamada Y, Ito K, Nakamura S, Ueda M, Nagasaka T. Promising cell-based therapy for bone regeneration using stem cells from deciduous teeth, dental pulp, and bone marrow. *Cell Transplant*. 2011;20(7):1003-13.

30 – Kramer PR, Nares S, Kramer SF, Grogan D, Kaiser M. Mesenchymal stem cells acquire characteristics of cells in the periodontal ligament in vitro. *J Dent Res*. 2004 Jan;83(1):27-34.

31 – Simsek SB, Keles GC, Baris S, Cetinkaya BO. Comparison of mesenchymal stem cells and autogenous cortical bone graft in the treatment of class II furcation defects in dogs. *Clin Oral Investig*. 2012 Feb;16(1):251-8.

32 – Dexter TM, Testa NG, Allen TD, Rutherford T, Scolnick E. Molecular and cell biologic aspects of erythropoiesis in long-term bone marrow cultures. *Blood*. 1981;58(4):699-707.

33 – Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.

34 – Silvério KG, Rodrigues TL, Coletta RD, Benevides L, Da Silva JS, Casati MZ, Sallum EA, Nociti FH Jr. Mesenchymal stem cell properties of periodontal ligament cells from deciduous and permanent teeth. *J Periodontol*. 2010 Aug;81(8):1207-15.

35 – Grzesik WJ, Narayanan AS. Cementum and periodontal wound healing and regeneration. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2002;13(6):474-84.

36 – Hammarstrom L, Heijl K, Gestrelus S. Periodontal regeneration in a buccal dehiscence model in monkeys after applications of enamel matrix proteins. *J Clin Periodontol*. 1997;24(9):669-77.

37 – Heden G, Wennstrom J, Lindhe J. Periodontal tissue alterations following Emdogain treatment of periodontal sites with angular bone defects. *J Clin Periodontol*. 1999;26(12):855-60.

- 38 – Parashis AO, Polychronopoulou A, Tsiklakis K, Tatakis DN. Enamel matrix derivative in intrabony defects: prognostic parameters of clinical and radiographic treatment outcomes. *J Periodontol*. 2012;83(11):1346-52.
- 39 – Sculean A, Nikolidakis D, Nikou G, Ivanovic A, Chapple IL, Stavropoulos A. Biomaterials for promoting periodontal regeneration in human intrabony defects: a systematic review. *Periodontol 2000*. 2015;68(1):182-216.
- 40 – Miron RJ, Sculean A, Cochran DL, Froum S, Zucchelli G, Nemcovsky C, Donos N, Lyngstadaas SP, Deschner J, Dard M, Stavropoulos A, Zhang Y, Trombelli L, Kasaj A, Shirakata Y, Cortellini P, Tonetti M, Rasperini G, Jepsen S, Bosshardt DD. 20 years of Enamel Matrix Derivative: The past, the present and the future. *J Clin Periodontol*. 2016 Mar 14.
- 41 – Duan X, Tu Q, Zhang J, Ye J, Sommer C, Mostoslavsky G, Kaplan D, Yang P, Chen J. Application of induced pluripotent stem (iPS) cells in periodontal tissue regeneration. *J Cell Physiol*. 2011 Jan;226(1):150–7.
- 42 – Nagata MJ, de Campos N, Messori MR, Santinoni CS, Bomfim SR, Fucini SE, Pola NM, Neves AP, de Almeida JM, Theodoro LH, Ervolino E. Platelet-rich plasma derived from bone marrow aspirate promotes new cementum formation. *J Periodontol*. 2014;85(12):1702-11.
- 43 – Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H, Bieback K. Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue. *Stem Cells*. 2006;24(5):1294–1301.
- 44 – Benatti BB, Cesar-Neto JB, Casati MZ, Sallum EA, Sallum AW, Nociti FH Jr. Periodontal healing may be affected by aging: a histologic study in rats. *J Periodont Res*. 2006 Aug;41(4):329–33.
- 45 – Corrêa MG, Gomes Campos ML, Marques MR, Casati MZ, Nociti FH Jr, Sallum EA. Histometric analysis of the effect of enamel matrix derivative on the healing of periodontal defects in rats with diabetes. *J Periodontol*. 2013 Sep;84(9):1309-18.
- 46 – Corrêa MG, Gomes Campos ML, Marques MR, Bovi Ambrosano GM, Casati MZ, Nociti FH Jr, Sallum EA. Outcome of enamel matrix derivative treatment in the presence of chronic stress: histometric study in rats. *J Periodontol*. 2014 Jul;85(7):e259-67.
- 47 – Rodrigues TL, Nagatomo KJ, Foster BL, Nociti FH, Somerman MJ. Modulation of phosphate/pyrophosphate metabolism to regenerate the periodontium: a novel in vivo approach. *J Periodontol*. 2011 Dec;82(12):1757-66.
- 48 – Nagahara T, Yoshimatsu S, Shiba H, Kawaguchi H, Takeda K, Iwata T, Mizuno N, Fujita T, Kurihara H. Introduction of a mixture of β -tricalcium phosphate into a complex of bone marrow mesenchymal stem cells and type I collagen can augment the volume of alveolar bone without impairing cementum regeneration. *J Periodontol*. 2015 Mar;86(3):456-64.

- 49 – Ebina H, Hatakeyama J, Onodera M, Honma T, Kamakura S, Shimauchi H, Sasano Y. Micro-CT analysis of alveolar bone healing using a rat experimental model of critical-size defects. *Oral Dis*. 2009 May;15(4):273-80.
- 50 – Park SY, Kim KH, Koo KT, Lee KW, Lee YM, Chung CP, Seol YJ. The evaluation of the correlation between histomorphometric analysis and micro-computed tomography analysis in AdBMP-2 induced bone regeneration in rat calvarial defects. *J Periodontal Implant Sci*. 2011 Oct;41(5):218-26.
- 51 – Park CH, Abramson ZR, Taba M Jr, Jin Q, Chang J, Kreider JM, Goldstein SA, Giannobile WV. Three-dimensional micro-computed tomographic imaging of alveolar bone in experimental bone loss or repair. *J Periodontol*. 2007 Feb;78(2):273-81.
- 52 – Zang S, Jin L, Kang S, Hu X, Wang M, Wang J, Chen B, Peng B, Wang Q. Periodontal Wound Healing by Transplantation of Jaw Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in Chitosan/Anorganic Bovine Bone Carrier Into One-Wall Infrabony Defects in Beagles. *J Periodontol*. 2016 May 6:1-20. [Epub ahead of print]
- 53 – Paknejad M, Eslaminejad MB, Ghaedi B, Rokn AR, Khorsand A, Etemad-Moghadam S, Alaeddini M, Dehghan MM, Moslemi N, Nowzari H. Isolation and Assessment of Mesenchymal Stem Cells Derived From Bone Marrow: Histologic and Histomorphometric Study in a Canine Periodontal Defect. *J Oral Implantol*. 2015 Jun;41(3):284-91.
- 54 – Owen M. The origin of bone cells in the postnatal organism. *Arthritis Rheum*. 1980 Oct;23(10):1073-80.
- 55 – Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 1991 Sep;9(5):641-50.
- 56 – Javazon EH, Beggs KJ, Flake AW. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. *Exp Hematol*. 2004;32(5):414-25.
- 57 – Tcacencu I, Karlstrom E, Cedervall J, Wendel M. Transplanted human bone marrow mesenchymal stem cells seeded onto peptide hydrogel decrease alveolar bone loss. *BioRes Open Access*. 2012; Oct;1(5):215-21.
- 58 – Burastero G, Scarfi S, Ferraris C, Fresia C, Sessarego N, Fruscione F, Monetti F, Scarfò F, Schupbach P, Podestà M, Grappiolo G, Zocchi E. The association of human mesenchymal stem cells with BMP-7 improves bone regeneration of critical-size segmental bone defects in athymic rats. *Bone*. 2010 Jul;47(1):117-26.
- 59 – Yan, X.Z., van den Beucken, J.J., Both, S.K., Yang, P.S., Jansen, J.A., and Yang, F. Biomaterial strategies for stem cell maintenance during in vitro expansion. *Tissue Eng Part B Rev*. 2014 Aug;20(4):340-54.
- 60 – Karaoz E, Aksoy A, Ayhan S, Sariboyaci AE, Kaymaz F, Kasap M. Characterization of mesenchymal stem cells from rat bone marrow: ultrastructural properties, differentiation potential and immunophenotypic markers. *Histochem Cell Biol*. 2009;132(5):533-46.
- 61 – Schmitz JP, Hollinger JO. A simple instrument for achieving accurate alignment and pre-insertion stability with mandibular bone plates. *Plast Reconstr Surg*. 1986

Dec;78(6):822-3.

62 – Wilensky A, Gabet Y, Yumoto H, Houry-Haddad Y, Shapira L. Three-dimensional quantification of alveolar bone loss in *Porphyromonas gingivalis*-infected mice using microcomputed tomography. *J Periodontol*. 2005;76:1282–6.

63 – Nemcovsky CE, Zahavi S, Moses O, Kebudi E, Artzi Z, Beny L, Weinreb M. Effect of enamel matrix protein derivative on healing of surgical supra-infrabony periodontal defects in the rat molar: a histomorphometric study. *J Periodontol*. 2006 Jun;77(6):996-1002.

64 – Chano L, Tenenbaum HC, Lekic PC, Sodek J, McCulloch CA. Emdogain regulation of cellular differentiation in wounded rat periodontium. *J Periodont Res*. 2003;38(2):164–74.

65 – Sculean A, Donos N, Brex M, Karring T, Reich E. Healing of fenestration-type defects following treatment with guided tissue regeneration or enamel matrix proteins. An experimental study in monkeys. *Clin Oral Investig*. 2000 Mar;4(1):50-6.

66 – Hughes FJ, Ghuman M, Talal A. Periodontal regeneration: a challenge for the tissue engineer? *Proc Inst Mech Eng H*. 2010 Dec;224 (12):1345–58.

67 – Hynes K, Menicanin D, Gronthos S, Bartold PM. Clinical utility of stem cells for periodontal regeneration. *Periodontol 2000*. 2012 Jun;59(1):203–27.

68 – Guida L, Annunziata M, Carinci F, Di Feo A, Passaro I, Oliva A. In vitro biologic response of human bone marrow stromal cells to enamel matrix derivative. *J Periodontol*. 2007;78(11):2190-6.

69 – Van den Dolder J, Vloon APG, Jansen JA. The effect of Emdogain on the growth and differentiation of rat bone marrow cells. *J Periodontal Res*. 2006;41(5):471-6.

ARTIGO EM INGLÊS

Enviado para publicação

Journal of Periodontology

ScholarOne Manuscripts™	Camila Costa ▼	Instructions & Forms	Help
-------------------------	----------------	----------------------	------

[Main Menu](#) / [Author Dashboard](#) / [Submission Confirmation](#)

Submission Confirmation

Thank you for your submission

Submitted to	Journal of Periodontology
Manuscript ID	JOP-16-0343
Title	Effects of enamel matrix derivative and its vehicle (propylene glycol alginate) on bone marrow mesenchymal stem cells.
Authors	Costa, Camila Abuna, Rodrigo Rodrigues, Thaisângela Miranda Deliberador, Tatiana Novaes Jr, Arthur Messora, Michel Taba Jr, Mario Souza, Sergio Palioto, Daniela B.
Date Submitted	27-May-2016

Author Dashboard

© Thomson Reuters | © ScholarOne, Inc., 2015. All Rights Reserved.
ScholarOne Manuscripts and ScholarOne are registered trademarks of ScholarOne, Inc.
ScholarOne Manuscripts Patents #7,257,767 and #7,263,655.

Effects of enamel matrix derivative and its vehicle (propylene glycol alginate) on bone marrow mesenchymal stem cells.

Camila A. Costa, DDS*; Rodrigo P. F. Abuna, DDS, MSc*, Thaisangela L. Rodrigues, DDS, PhD[†]; Tatiana M. Deliberador, DDS, PhD[‡]; Arthur B. Novaes Jr, DDS, PhD*; Michel R. Messoria, DDS, PhD*; Mario Taba Jr, DDS, PhD*; Sérgio L. S. Souza, DDS, PhD*; Daniela B. Palioto, DDS, PhD*.

Author responsible for correspondence:

Dr. Daniela Bazan Palioto

Av. Cafe, s/n 14040-904. Ribeirao Preto / Sao Paulo, Brazil

Telephone: 55-16- / Fax: 55-16- 3602-4788 (fax number can be published)

e-mail: dpalioto@forp.usp.br (e-mail can be published)

Source of Support: Sao Paulo Research Foundation (FAPESP – process #14/03516-0).
There is no conflict of interest.

Word count: 3988

Number of figures: 3

Number of tables: 0

Number of references: 44

Running title: Emdogain and its vehicle on mesenchymal stem cells.

Summary Sentence: Emdogain not influenced the proliferation, differentiation and ALP activity and reduced the mineralization of bone marrow mesenchymal stem cells, while its vehicle do not influenced the proliferation, reduced the ALP activity and mineralization, however appears to affect positively the differentiation of these cells.

ABSTRACT

Background: This study evaluated the influence of Emdogain (EMD) and its vehicle (Propylene Glycol Alginate - PGA) in proliferation, differentiation and mineralization of CD45⁻90⁺ bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSCs).

Methods: Rat bone marrow stromal cells (BMSCs) were separated into CD45⁻90⁺ BM-MSCs by flow cytometer. For cellular characterization the presence of stem cells markers, capacity to form colonies (CFU) and to express osteoblast and adipogenic phenotype was assessed. Four experimental groups was plated: Positive Control group: media containing 10% FBS; (2) Negative Control Group: media containing 2% FBS; (3) EMD Group: 25µg/ml EMD in 2% FBS media; (4) PGA Group: 25 µg/ml PGA in 2% FBS media. Cellular proliferation, alkaline phosphatase (ALP) activity, gene expression of osterix, osteopontin, ALP and RUNX2 by RT-PCR and extracellular matrix (ECM) mineralization was assessed.

Results: CD45⁻90⁺ BM-MSCs presented higher stem cells markers and more CFU/well than BMSCs, and expressed osteoblast and adipogenic phenotype. EMD and PGA not influenced proliferation of CD45⁻90⁺ BM-MSCs. ALP activity was not influenced by EMD and was reduced in PGA group. EMD and PGA not influenced expression of osterix and RUNX2 in 7 and 10 days and reduced in 14 days. EMD not influenced ALP and osteopontin expression, but the presence of the gel provided better results. PGA and EMD groups presented less mineralized ECM in 28 days.

Conclusion: EMD not influenced the proliferation, differentiation and ALP activity of CD45⁻90⁺ BM-MSCs, while the presence of the gel (PGA) seems optimize the differentiation of these cells. Both reduced ECM mineralization.

Key-Words: bone biology, cell biology, dental materials, gene expression, growth factors, osteoblast(s), tissue engineering.

INTRODUCTION

A sequence of associated biological events occurs in periodontal regeneration, including cellular proliferation, migration, differentiation and synthesis and mineralization of organic extracellular matrix.¹ Polypeptide growth factors, like enamel matrix derivative (EMD), have been used to facilitate periodontal regeneration due to its ability to control critical events, such as cementogenesis and development of the periodontal attachment apparatus.^{2,3,4} EMD, formed mainly by amelogenins, has been applied on root surfaces with clinically satisfactory results, including regeneration of cementum, gain of clinical level attachment and radiographic bone fill.^{3,5,6,7} It is assumed that EMD is the only biological tool able to stimulate, in a reproducible way, all components of periodontium, although the biological mechanisms of EMD are not yet fully understood.^{8,9}

The advances in tissue engineering enable the development of other novel therapies, including cell-based treatments. Bone marrow stromal cells (BMSCs) contain mesenchymal stem cells (MSCs) that are able to self-renew and to differentiate into precursors of several tissues, including bone, cartilage and fat.¹⁰ Multipotent BMSCs are selected by its plastic adherence property.¹¹ However, concomitant cell types that also adhere to plastic may remain in culture for several passages, such as macrophages and differentiated progenitor cells.¹² Two important methods are used to isolate BMSCs: by density gradient of mononuclear cells, using Ficoll method; and by immunomagnetic selection based on immune recognition of surface antigens using specific antibodies. Therefore, it is important to distinguish the bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSCs) between other cells types. The Committee for the International Society for Cellular Therapy has clarified that the plastic-adherent cells currently described as MSCs be termed multipotent mesenchymal stromal cells, while the term MSCs should be reserved for a subset of these (or other) cells that demonstrate stem cell activity by clearly stated criteria. Thus, MSCs should have: be plastic adherent; a specific surface-antigen expression pattern; and multipotent differentiation potential.¹³ Karaoz et al.¹⁴ showed by flow cytometer analysis that BM-MSCs in rats are positive for the cell adhesion molecule CD90 and negative for CD45 (associated with lymph hematopoietic cells), from passage 3 until 25.

It is known that several proteins, growth factors and cytokines regulate the differentiation of MSCs into osteoblast progenitors. In this sense, EMD could provide the

stimulus that BM-MSCs requires to synthesize the necessary regenerative matrix in periodontal regeneration.

Besides the cellular component, tissue engineering requires a proper vehicle to bring and maintain the cells at the regenerative site. Further, a proper matrix can help in the development of an appropriate microenvironment for the culture of MSCs, which will maintain the self-renewal and the undifferentiated state of this cells until their application.¹⁵ EMD can act like a matrix to BMSCs in periodontal regeneration sites due to the presence of its vehicle, the propylene glycol alginate (PGA).¹⁶ PGA allows the matrix-cell contact and facilitates the formation of aggregates by proteins in EMD,³ which creates a positive environment to proliferation and differentiation of MSCs, in physiologic pH and corporal temperature.

Some studies evaluated the influence of EMD in BMSCs,^{10,17} but until today, none assessed this effect on isolated MSCs. Therefore, the aim of this study is to evaluate the influence of EMD and its vehicle (PGA) in proliferation, differentiation and mineralization of CD45⁻90⁺, as bone marrow mesenchymal stem cells.

MATERIAL AND METHODS

Bone Marrow Aspirate (BMA)

All animal procedures were performed under the approval of the Committee of Ethics in Animal Research (Protocol 2014.1.494.58.0).

Two inbred male Wistar-Kyoto rats weighting 250-300 g were used to collect the BMA. Previously, the animals were anesthetized by a combination of ketamine[§] (7 mg/100 g body weight) and xylazine^l (0.6 mg/100 g body weight). From each animal's iliac crest 0.5 ml of BMA was collected using a 10 ml sterile syringe containing 0.1 ml of heparin to prevent clotting and stored in sterile microtubes.¹⁸

Culture of BM-MSCs

After collecting bone marrow, cells were isolated with Ficoll-Paque PREMIUM[¶]¹⁹ and cultured with DMEM growth medium (D-GM), pH 7.0, containing DMEM (DMEM - Dulbecco's Modified Eaggles Medium[#]) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum[#] (FBS), 100 units/ml penicillin[#], 100 µg/ml streptomycin[#] and 3 µg/ml of fungizone[#]. BMSCs were selected by plastic adherence followed by a cytometer cell sorter (FACS

ARIA^{**}) to achieve a population of CD45⁻90⁺ BM-MSCs. Briefly, with culture in sub confluence a buffer solution of enzyme-free cell dissociation medium[#] was added to obtain a cell suspension, which was centrifuged and resuspended in blocking buffer for 40 min to be incubated with anti-mouse CD45 (Rat Anti-Mouse PE^{**}) and CD90 (FITC Mouse Anti-Rat^{**}) monoclonal antibody for 1 hour at 4°C, washed and resuspended in PBS. As negative control, suspensions of unmarked cells were used. The samples were separated using FACS ARIA and the results were processed by specific software (Cell Quest Software^{**}). CD45⁻90⁺ BM-MSCs was culture with D-GM, and only cells in passages eight were used. In all experiments cells were incubated at 37 °C, 5% CO₂, and the medium was exchange three times per week.

Phenotypic characterization

Fluorescence-activate cell sorting evaluated the expression of cell surface markers (CD90 and CD45) from CD45⁻90⁺ BM-MSCs and BMSCs, comparatively, in the same way describe above. BMSCs were obtained by flushing the femur medullary of Wistar-Kyoto rats and expanded in α -MEM growth medium (α -GM), that is α -MEM (α Modified Eagle Medium[#], pH 7.0) supplemented with FBS and 100 units/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin and 3 μ g/ml of fungizone, until reach subconfluence. BMSCs were selected only by plastic adherence and only cells between second and third passage were used.

To evaluate the expression of REX-1, CD 45⁻90⁺ BM-MSCs and BMSCs were seeded in 6 well plates (1x10⁵ cells/well) in α -GM and after 7, 10 and 14 days the total RNA was collected to carry out the real-time PCR (RT-PCR), comparatively.

CD 45⁻90⁺ BM-MSCs and BMSCs were also cultured in 6 well plates in a density of 500 cells/well with α -GM to evaluate the number of colony forming units (CFUs), comparatively. After 7 days the wells were fixed with 10% formalin for 2 hours in the refrigerator, washed and stained with 0.5% crystal violet[¶] in methanol for 10 min at room temperature. The CFUs with more than 30 cells was counted under a light microscope at 10x magnification, being expressed in CFU/well.

Differentiation culture conditions

Osteogenic induction. CD45⁻90⁺ BM-MSCs were seeded in osteogenic medium (OM), containing α -GM added 5 μ g/ml of ascorbic acid[#], 7 mM of β -glycerophosphate[¶] and 10⁻⁷ mM of dexamethasone[¶]. 24 well plates (2x10⁴ cells/well) were used for assessing extracellular matrix mineralization at 21 days using Alizarin Red[¶] staining.² To evaluate

expression of alkaline phosphatase (ALP) these cells were seeded in 6 well plates (1×10^5 cells/well) and after 7, 10 and 14 days the total RNA was collected to carry out the RT-PCR.

Adipogenic induction. CD45⁻90⁺ BM-MSCs were seeded in adipogenic medium (AM), containing D-GM supplemented with 10^{-6} M of dexamethasone, 0.5 mM of 3-isobutyl-1-metilxantine[¶], 10 mg/ml of insulin[¶] and 0.1 M of indomethacin[¶]. 24 well plates (2×10^4 cells/well) were used to evaluate lipid accumulation in 10 days using Oil Red O[¶] staining.²⁰ To evaluate expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2 (PPAR γ 2) these cells were seeded in 6 well plates (1×10^5 cells/well) and after 7, 10 and 14 days the total RNA was collected to carry out the RT-PCR.

Treatments

Emdogain gel (EMD^{††}) was dissolved in acidic water (pH 5.9), aliquoted and stored at -70 °C. Propylene Glycol Alginate (PGA) was handled at 40 mg/ml. Briefly, 4 g of powder PGA^{‡‡} was mixed with 10 ml of a mixed buffer solution with distilled water at a concentration of 40 mg/ml to achieve a similar viscosity with EMD gel. PGA gel was sterilized by irradiation range Co60 (Rad Source: Model RS-2000). PGA was also dissolved in acid water and stored at -70 °C. Based on concentrated curves of both solutions in these specific cells (data not shown), the treatment with both EMD and PGA was performed at a concentration of 25 μ g/ml.

Four experimental conditions were established: (1) Positive Control Group: media containing 10% of FBS; (2) Negative Control Group: media containing 2% of FBS; (3) PGA Group: 25 μ g/ml PGA in 2% of FBS media; (4) EMD Group: 25 μ g/ml EMD in 2% of FBS media. For all groups, depending on the type of assay, the media used could be α -MEM growth media (α -GM) or osteogenic medium (OM). In all experiment, the wells were washed three times per week with PBS to remove deposits of Emdogain and PGA.

Cell Proliferation Assay

Cell proliferation was evaluated at 3, 7, 10 and 14 days with 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT[¶]). CD 45⁻90⁺ BM-MSCs were plated in a 24-well plate (2×10^4 cells/well) with 1 ml of α -GM and the respective treatments. After each time-point, the cells were incubated with 100 μ l of MTT (5 mg/ml) in α -MEM. After 4 hours, 400 μ l of acidified isopropanol (0.04 N HCl in isopropanol) was

added and the plates were agitated for 5 min. 150 μ l of this solution was moved to a 96-well plate, to read on the plate reader (μ Quant^{ss}) with the optical density at 570 nm. Data were expressed as absorbance, which is proportional to the number of proliferating and living cells.

Osteoblastic Differentiation

After reaching subconfluence, CD45⁻90⁺ BM-MSCs and their respective treatments were seeded (2×10^4 cells/well) in 24-well plates with 1 ml of OM and the respective treatments to Alizarin Red, Von Kossa and ALP Activity assays. To evaluate gene expression of osteoblast markers, runt-related transcription factor 2 (RUNX2), ALP, osteopontin (OPN) and osterix (OSX), the cells were seeded in 6 well plates (1×10^5 cells/well) with 2 ml of OM and the respective treatments. After 7, 10 and 14 days the total RNA was collected to carry out the RT-PCR.

Alkaline phosphatase (ALP) activity

At days 7, 10 and 14 the ALP activity in CD 45⁻90⁺ BM-MSCs and their respective treatments was measured as the release of thymolphthalein from thymolphthalein monophosphate using a commercial kit^{ll}.²⁰ ALP activity was expressed from a curve using thymolphthalein to yield a range from 0.012 to 0.4-mmol thymolphthalein/h/ml and normalized by the total protein content quantified in the same cell lysates by the Lowry method,²¹ at the respective time-point. To analyze ALP activity in situ, at the same time-points, Fast Red assay was carried out.²² Images for qualitative analysis were taken with a high-resolution digital camera^{¶¶}.

Extracellular Matrix Mineralization

Extracellular matrix mineralization was detected at days 21 and 28 by Alizarin Red and Von-kossa staining to analyze calcium and phosphate deposits, respectively. In the Alizarin Red S^{¶¶} wells were staining following the protocol of Rodrigues et al.² In Von-kossa staining wells were washed with PBS, incubated with 5% AgNO₃ (BSA^{¶¶}) for 20 min at room temperature, washed twice with deionized water and added hydroquinone (5 mg/ml) for 2 min exposed to the lights until the mineral darkens. The hydroquinone was removed and a thiosulfate solution (5%) was added for 2 minutes at room temperature, and the wells were washed and dried. For qualitative analysis of bone-like nodule formation, culture images were captured with a high-resolution digital camera^{¶¶}, observing the

frequency and the appearance (dense or diffuse) of the formed nodules of calcium (red color) and of phosphate (grey scale color). Calcium content was evaluated using a colorimetric assay from the wells staining with Alizarin Red.²⁰ The plate was read at 405 nm in a plate reader μ Quant^{ss} and the data expressed as absorbance.

Gene expression analyze

Quantitative RT-PCR was carried out at 7, 10 and 14 days to evaluate gene expression. For this, after each time-point the total RNA was extracted with Trizol reagent^{##} and SV Total RNA Isolation kit^{***} according to the manufacturer's instructions. The concentration and purity of RNA samples was determined by optical density at different wavelengths (260, 280, 230, and 320 nm) ratios higher than 1.8 were analyzed. The integrity of RNA was assessed by microfluidic electrophoresis using Agilent 6000 RNA Nanochips and an Agilent 2100 Bioanalyzer^{†††}. Complementary DNA (cDNA) was synthesized using 1 μ g of the extracted RNA through a reverse transcription reaction (M-MLV reverse transcriptase^{***}), using the manufactures instruction. RT-PCR was carried out in a Step One Plus Real-Time PCR^{†††} using Taqman PCR Master Mix^{sss} and probes for target genes^{†††}. The relative gene expressions were normalized to β -actin expression using the comparative threshold method ($2^{-\Delta\Delta C_t}$).

Statistical Analysis

The data are the representative results of three independent experiments. Gene expression was carried out in triplicate ($n = 3$) and all the other experiments in quintuplicate ($n = 5$). Data were analyzed with a statistic program^{||} using One Way Anova followed by a Tukey post-test when ANOVA find some difference. Only expression of Rex-1 was done with T-Test for two independent samples. For all experiments the significance level was established at $p \leq 0.05$.

RESULTS

Phenotypic characterization of CD45⁻90⁺ BM-MSCs

BM-MSCs presented 73.09% cells unmarked to CD45 and marked to CD90, and BMSCs showed only 52,5% of cells unmarked to CD45 and marked to CD90 (Fig 1A₁). CD 45⁻90⁺ BM-MSCs had higher expression of REX-1 in 7, 10 and 14 days ($p < 0.05$) (Fig 1A₂) and more CFU/well than BMSCs ($p < 0.05$) (Fig 1B). Moreover, CD 45⁻90⁺ BM-

MCSs expressed osteoblast phenotype, corroborated by matrix mineralization deposits and ALP expression, and adipogenic phenotype, confirmed by lipid accumulation and PPAR γ 2 expression (Fig 1C).

Effect of EMD and PGA on the cell proliferation

EMD and PGA groups did not influence cell proliferation in any time ($p > 0.05$) compared to negative control group, wherein all the groups exhibited the same pattern of growth. Positive control group exhibited higher proliferation ($p < 0.05$) than all the other groups at all time-points (Fig 2). The number of cells increased ($p < 0.05$) in days 7 and 10 to all the groups.

Effect of EMD and PGA on the ALP activity and extracellular matrix mineralization

ALP activity in CD45⁻90⁺ BM-MSCs was not affected by EMD compared to negative control group ($p > 0.05$) in all the time-points. PGA group showed the lower and positive control the higher ALP activity compared to all the other groups in all the time-points ($p < 0.05$). All the groups had a peak of ALP activity in day 14 (Fig 3B).

After 21 days it was observed that PGA and EMD have no influence in extracellular mineralization of CD45⁻90⁺ BM-MSCs (Fig 3C). Positive control group produced the most dense and regularly distributed matrix ($p < 0.05$). PGA group was similar to EMD ($p > 0.05$) in 21 and 28 days, and both presented less mineralized extracellular matrix than control groups ($p < 0.05$) in 28 days. EMD treatment reduced the bone-like nodule formation and dense mineralized nodules were not observed (Fig 3C).

Effect of EMD and PGA on cellular differentiation

Positive control group displayed higher OSX expression than all the others groups in all time-points ($p < 0.05$). In 14 days EMD and PGA groups presented similar ($p > 0.05$) and lower OSX expression than negative control ($p < 0.05$). RUNX2 expression was higher to positive control group in 7 and 10 days ($p < 0.05$). Negative control showed higher RUNX2 expression than EMD and PGA groups in 14 days ($p < 0.05$). EMD and PGA showed better ALP expression in 7 and 10 days than positive control group and than negative control only in 10 days ($p < 0.05$). In 14 days negative control had higher ALP expression than EMD and PGA ($p < 0.05$). EMD and PGA presented better OPN expression than positive control in 7 and 14 days ($p < 0.05$). PGA group showed higher OPN expression than EMD in all the time-points ($p < 0.05$) and than negative control

group in 7 and 10 days ($p < 0.05$) (Fig 3A).

DISCUSSION

This study investigated the effects of EMD and its vehicle (PGA) in CD45⁻90⁺ BM-MSCs. It was observed that EMD have no influence in proliferation, differentiation and ALP activity and reduced the mineralization of these cells. PGA, per se, have no influence in proliferation, also reduced ALP activity and mineralization, but its presence appears to act in the differentiation process, as seen by the higher ALP and OP expression in BM-MSCs.

These findings are in accordance with other studies.^{17,23} van den Dolder et al.¹⁷ showed that heterogeneous bone marrow cell population coated with EMD reveled no differences in cell proliferation than noncoated group. However, other studies^{10,24} showed that EMD stimulated the proliferation of bone marrow cells. The differences in these studies may be associated with the cell type used. Guida et al.¹⁰ and Keila et al.²⁴ used bone marrow stromal cells (BMSCs), which are fibroblast-like cells that form a monolayer in culture flasks and can support the growth and differentiation of hematopoietic stem cells. Our study, from our knowledge, was the first to use highly isolated bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSCs), which conceptually are CD45⁻90⁺ adherent bone marrow cells that are capable to differentiate into at least 3-cell types.¹³

The characterization of CD45⁻90⁺ BM-MSCs proved their ability to express osteoblast and adipogenic phenotype and showed better capacity to form colonies, a greater amount of specific cell antigens of MSCs (CD 90) and greater REX-1 expression than BMSCs. REX-1 gene helps in upregulation of key transcription factors such as Oct4 and Nanog,²⁵ and its expression increases the differentiation efficiency of MSCs.^{26,27} Therefore, it has emerged as an important marker of stem cells and has been reported to be present in embryonic and bone marrow multipotent stem cells.^{25,28}

Another reason for the differences in the proliferation of bone marrow cells among the studies may be due variations in EMD concentrations used. Keila et al.²⁴ reported that EMD in a concentration of 25 µg/ml stimulated the osteogenic potential of BMSCs. van den Dolder et al.¹⁷ in a concentration of 100 µg/ml of EMD not find promising results in proliferation and differentiation of BMSCs. Guida et al.¹⁰ revealed a similar results showing that high doses of EMD did not increase the proliferation, probably due to formation of the aggregates by proteins in EMD, that is already visible in lower

concentrations, being the activity of EMD dose-dependent.

The culture medium must supply all essential nutrients for cell metabolism and growth. Animal serum is an extremely complex mixture of a large number of constituents, low and high molecular weight biomolecules, with different, physiologically balanced growth-promoting and growth-inhibiting activities,²⁹ and is frequently added to chemically defined basal media. However in comparative studies using growth factors drugs, like in our study, the disadvantages of supplementation of culture media with FBS are manifold: (i) serum is an ill-defined medium supplement, and thus an ambiguous factor in cell culture,^{30,31} (ii) serum may contain different amounts of endotoxins, hemoglobin, and other adverse factors, and (iii) serum can be a potential source of microbial contaminants, such as fungi, bacteria and mycoplasma.^{32,33,34} From this perspective, to better understand the mechanism by which EMD exert their influence on biological mechanism of BM-MSCs, we treated our test groups with low fetal bovine serum (2% FBS). Comparing our results with the literature this is another reason of the different results, once most of the studies on the literature has used 10% FBS.

Our outcomes revealed that ALP activity of isolated BM-MSCs was not influenced by EMD and, despite not having found statistical difference, EMD group showed lower results than negative control. PGA group also showed lower ALP activity than all the other groups. This can reduce or not impact the extracellular matrix mineralization in PGA and EMD groups. These findings are in agreement with other studies that found no consistent effects of EMD in the differentiation and mineralization of BMSCs.^{10,17} Furthermore, Palioto et al.³⁵ showed that human osteoblastic cells coated with EMD presented less ALP activity and extracellular matrix mineralization than non coated cells.

At present, the knowledge about the effect of EMD in differentiation process is not conclusive with variable and conflicting data. RUNX2 expression controls the maturation of osteoblasts to osteocytes. Osterix (OSX) expression directs the precursor cells into osteoblasts lineage. Then, the presence of both genes indicates the process of differentiation in bone formation. The possible scarce influence of EMD in differentiation of CD45⁺90⁺ BM-MSCs could be demonstrated by our gene expression findings, which indicated that RUNX2 and OSX expressions was not affected by EMD in 7 and 10 days. ALP is a specific glycoprotein on the osteoblast surfaces that is involved in the differentiation process. In our study ALP expression in EMD group was higher than positive control in 7 and 10 days and than negative control in 10 days, but did not showed any difference from PGA group in all the time-points. Osteopontin (OPN) expression

supports the mineralization and it is expressed in calcified tissues. This study revealed that cells coated in a gel (PGA) increased the OPN expression in all the time-points. It may demonstrate that the presence of PGA can act like a matrix to cells that can positively influence the differentiation of MSCs. Villa-Diaz et al.³⁶ demonstrated that embryonic stem cells cultured with a synthetic polymer or Matrigel support long-term the undifferentiated status, attachment, proliferation and differentiation potential of these cells. Beside, no in vitro study to date evaluates separately the influence of the vehicle of EMD in MSCs. This can be a bias because we do not know if the effect is due to the proteins and growth factors in EMD or to the presence of a gel in contact with the cells. However, this result alone cannot conclude that PGA has some influence on osteoblast differentiation. Also, PGA does not influenced OSX and RUNX2 expression in CD45⁻90⁺ BM-MSC meaning that further studies to determine the contribution of gels in the properties of MSCs is required.

EMD reduced the expression of OPN in 10 and 14 days and this is in accordance with our extracellular matrix mineralization results, which showed less mineralized nodules in EMD-coated cells. Our outcomes are in accordance with previous studies.^{10,17} van den Dolder et al.¹⁷ found no clear differences in gene expression of collagen type I, ALP and osteocalcin between coated and noncoated cells. Guida et al.¹⁰ showed a reduction of osteocalcin levels in EMD-treated cell. Until in preosteoblastic cells (2T9), EMD did not affect the expression of osteogenic markers.³⁷

The present study showed that EMD did not increase the proliferation, differentiation and mineralization of CD45⁻90⁺ BM-MSCs. Nevertheless, it must be taken into consideration that this is an in vitro study and the findings in animal and clinical studies are controversial. Several pre-clinical in vivo studies have demonstrated that the application of EMD can promote early stages of bone formation in femur^{38,39} and in calvaria defects of rats.⁴⁰ Another revealed that EMD failed to show an osteoconductive property in calvaria defects of rats.⁴¹ One reason of this controversial data is that the exact composition of EMD and the mechanism that it induces periodontal regeneration remain unknown. Although Gestrelus et al.⁴² did not discover any growth factors in EMD; other authors suggested that EMD contain exogenous TGF- β 1,¹⁶ BSP,⁴³ which can influence cellular events.

Although the little effect of EMD in CD45⁻90⁺ BM-MSCs in the present study, it seems to have a significant influence in PDL cells. Several studies showed a stimulus in cellular proliferation, ALP activity, formation of mineral nodules and production of TGF-

$\beta 1$ in EMD-coated PDL cells.^{2,44,45} Nonetheless, in those studies EMD inhibited or hindered the attachment and spread of PDL cells. So, this can be another reason to the differences of the effects of EMD in vitro studies with bone marrow cells and in vivo studies in periodontal defects: the presence of PDL cells in a residual periodontal ligament can assist the regeneration process and influence events of the BM-MSCs.

CONCLUSION

This in vitro study showed that EMD have no influence in proliferation, differentiation and ALP activity and reduced the extracellular matrix mineralization of CD45⁺90⁺ bone marrow mesenchymal stem cells. Furthermore, the vehicle of EMD, PGA, has no influence in proliferation and reduced the ALP activity and mineralization, but its presence appears to act in the differentiation of BM-MSCs.

FOOTNOTES

* Department of Oral and Maxillofacial Surgery and Periodontology, School of Dentistry of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo – USP, Ribeirao Preto, Sao Paulo, Brazil.

† Laboratory of Cellular Pharmacology and Toxicology, School of Pharmacy, Federal University of Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil

‡ Graduate Program in Dentistry, Universidade Positivo, Curitiba, Paraná, Brazil

§ Agener União, Embu-Guaçu, SP, Brazil

¶ Calier, Juatuba, MG, Brazil

¶ Sigma-Aldrich, St. Louis, MO

Gibco-Invitrogen, Grand Island, NY

** Bioscience BD, San Jose, CA

†† Straumann, Institute Straumann AG, Basel, Switzerland

‡‡ Protanal® ester SD 8440, FMC Corporation, Philadelphia, PA

§§ BioTek, Winooski, VT

¶¶ Labtest Diagnostica SA, Belo Horizonte, MG, Brazil

¶¶ Canon EOS Digital Rebel Camera, Canon, Lake Success, NY

Invitrogen – LifeTechnologies, Carlsbad, CA

*** Promega Corporation, Madison, WI

††† Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA

‡‡‡ Life-Technologies, Grand Island, NY

§§§ Applied Biosystems, Foster City, CA

¶¶ SigmaPlot™, Systat Software Inc, London, UK

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the technician Roger Rodrigo Fernandes and Milla Sprone Tavares Ricoldi for the assistance in the Cellular and Biomolecular Laboratories of the Department of Oral and Maxillofacial Surgery and Periodontology (School of Dentistry of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo – USP, Ribeirao Preto, Sao Paulo, Brazil); the Coordination of the Improvement of Graduated Personnel (CAPES) for the scholarship that supported Ms Costa and the State of Sao Paulo Research Foundation for the financial support of this study (process number 14/03516-0).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflicts of interest.

SOURCE OF FUNDING

State of Sao Paulo Research Foundation (FAPESP: 14/03516-0) – Sao Paulo, SP, Brazil.

REFERENCES

- 1 - Rincon JC, Haase HR & Bartold PM. Effect of emdogain on human periodontal fibroblasts in an in vitro wound healing model. *J Periodont Res* 2003;38(3):290–5.
- 2 - Rodrigues TLS, Marchesan JT, Coletta RD, Novaes Jr. AB, Grisi MFM, Souza SLS, Taba Jr. M, Palioto DB. Effects of enamel matrix derivative and transforming growth factor-b1 on human periodontal ligament fibroblasts. *J Clin Periodontol* 2007;34(6):514-22.
- 3 - Hammarstrom L, Heijl K, Gestrelus S. Periodontal regeneration in a buccal dehiscence model in monkeys after applications of enamel matrix proteins. *J Clin Periodontol* 1997;24(9):669-77.
- 4 - Zeichner-David M, Chen LS, Hsu Z, Reyna J, Caton J, Bringas P. Amelogenin and ameloblastin show growthfactor like activity in periodontal ligament cells. *Eur J Oral Sci*

2006;114:244-53.

5 - Heden G, Wennstrom J, Lindhe J. Periodontal tissue alterations following Emdogain treatment of periodontal sites with angular bone defects. *J Clin Periodontol* 1999;26(12):855-60.

6 - Parashis AO, Polychronopoulou A, Tsiklakis K, Tatakis DN. Enamel matrix derivative in intrabony defects: prognostic parameters of clinical and radiographic treatment outcomes. *J Periodontol* 2012;83(11):1346-52.

7 - Sculean A, Nikolidakis D, Nikou G, Ivanovic A, Chapple IL, Stavropoulos A. Biomaterials for promoting periodontal regeneration in human intrabony defects: a systematic review. *Periodontol 2000* 2015;68(1):182-216.

8 - Giannobile WV, Somerman MJ. Growth and amelogenin-like factors in periodontal wound healing. A systematic review. *Ann Periodontol* 2003;8(1):193-204.

9 - Venezia E, Goldstein M, Boyan BD, Schwartz Z. The use of enamel matrix derivative in the treatment of periodontal defects: a literature review and meta-analysis. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004;15(6):382-402.

10 – Guida L, Annunziata M, Carinci F, Di Feo A, Passaro I, Oliva A. In vitro biologic response of human bone marrow stromal cells to enamel matrix derivative. *J Periodontol*. 2007;78(11):2190-6.

11- Dexter TM, Testa NG, Allen TD, Rutherford T, Scolnick E. Molecular and cell biologic aspects of erythropoiesis in long-term bone marrow cultures. *Blood* 1981;58(4):699-707.

12 – Javazon EH, Beggs KJ, Flake AW. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. *Exp Hematol* 2004;32(5):414-25.

13 – Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8(4):315-7.

14 – Karaoz E, Aksoy A, Ayhan S, Sariboyaci AE, Kaymaz F, Kasap M. Characterization of mesenchymal stem cells from rat bone marrow: ultrastructural properties, differentiation potential and immunophenotypic markers. *Histochem Cell Biol* 2009;132(5):533-46.

15 - Nandivada H, Villa-Diaz LG, O'Shea KS, Smith GD, Krebsbach PH, Lahann J. Fabrication of synthetic polymer coatings and their use in feeder-free culture of human embryonic stem cells. *Nat Protoc* 2011;6(7):1037-43.

16 - Kawase T, Okuda K, Yoshie H, Burns DM. Anti-TGFbeta antibody blocks enamel

matrix derivative-induced upregulation of p21WAF1/cip1 and prevents its inhibition of human oral epithelial cell proliferation. *J Periodontol Res* 2002;37(4):255-62.

17 – Van den Dolder J, Vloon APG, Jansen JA. The effect of Emdogain on the growth and differentiation of rat bone marrow cells. *J Periodontol Res* 2006;41(5):471-6.

18 - Nagata MJ, de Campos N, Messoria MR, Santinoni CS, Bomfim SR, Fucini SE, Pola NM, Neves AP, de Almeida JM, Theodoro LH, Ervolino E. Platelet-rich plasma derived from bone marrow aspirate promotes new cementum formation. *J Periodontol* 2014;85(12):1702-11.

19 - Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H, Bieback K. Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue. *Stem Cells* 2006;24(5):1294–1301.

20 – Abuna RP, De Oliveira FS, Santos T de S, Guerra TR, Rosa AL, Beloti MM. Participation of TNF- α in Inhibitory Effects of Adipocytes on Osteoblast Differentiation. *J Cell Physiol*. 2016 Jan;231(1):204-14.

21 - Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193(1):265–75.

22 – Majors AK, Boehm CA, Nitto H, et al. Characterization of human bone marrow stromal cells with respect to osteoblastic differentiation. *J Orthop Res*. 1997;15(4):546-57

23 - Gurpinar A, Onur MA, Cehreli ZC, Tasman F. Effect of enamel matrix derivative on mouse fibroblasts and marrow stromal osteoblasts. *J Biomat Appl* 2003;18(1):25-33.

24 - Keila S, Nemcovsky CE, Moses O, Artzi Z, Weinreb M. In vitro effects of enamel matrix proteins on rat bone marrow cells and gingival fibroblasts. *J Dent Res* 2004; 83(2):134-8.

25 - Son MY, Choi H, Han YM, Cho YS. Unveiling the critical role of REX1 in the regulation of human stem cell pluripotency. *Stem Cells* 2013;31(11):2374-87.

26 - Bhandari DR, Seo KW, Roh KH, Jung JW, Kang SK, Kang KS. REX-1 expression and p38 MAPK activation status can determine proliferation/differentiation fates in human mesenchymal stem cells. *PLoS One* 2010 May 5;5(5).

27 - Roche S, Richard MJ, Favrot MC. Oct-4, Rex-1, and Gata-4 expression in human MSC increase the differentiation efficiency but not hTERT expression. *J Cell Biochem* 2007;101(2):271–80.

28 - Mongan NP, Martin KM, Gudas LJ. The putative human stem cell marker, Rex-1 (Zfp42): structural classification and expression in normal human epithelial and carcinoma cell cultures. *Mol Carcinog* 2006;45(12):887-900.

- 29 - Brunner D, Frank J, Appl H, Schöffl H, Pfaller W, Gstraunthaler G. Serum-free cell culture: the serum-free media interactive online database. *ALTEX* 2010;27(1):53-62.
- 30 - Bjare, U. Serum-free cell culture. *Pharmac. Ther* 1992;53(3):355-74.
- 31 - Gstraunthaler, G. Alternatives to the use of fetal bovine serum: serum-free cell culture. *ALTEX* 2003;20(4):275-81.
- 32 - Dormont, D. Transmissible spongiform encephalopathy agents and animal sera. *Dev Biol Stand* 1999;99:25-34.
- 33 - Eliot, M. Risks of virus transmission associated with animal sera or substitutes and methods of control. *Dev Biol Stand* 1999;99:9-16.
- 34 - Wessman SJ, Levings RL. Benefits and risks due to animal serum used in cell culture production. *Dev Biol Stand* 1999;99:3-8.
- 35 – Palioto DB, Rodrigues TL, Marchesan JT, Beloti MM, de Oliveira PT, Rosa AL. Effects of enamel matrix derivative and transforming growth factor- β 1 on human osteoblastic cells. *Head & Face Medicine* 2011;18:7-13.
- 36 - Villa-Diaz LG, Nandivada H, Ding J, Nogueira-de-Souza NC, Krebsbach PH, O'Shea KS, Lahann J, Smith G. Synthetic polymer coatings for long-term growth of human embryonic stem cell. *Nat Biotechnol* 2010;28(6):581-3.
- 37 - Schwartz Z, Carnes DL Jr., Pulliam R, et al. Porcine fetal enamel matrix derivative stimulates proliferation but not differentiation of pre-osteoblastic 2T9 cells, inhibits proliferation and stimulates differentiation of osteoblast-like MG63 cells, and increases proliferation and differentiation of normal human osteoblast NHOst cells. *J Periodontol* 2000;71(8):1287-96.
- 38 - Kawana F, Sawae Y, Sahara T, et al. Porcine enamel matrix derivative enhances trabecular bone regeneration during wound healing of injured rat femur. *Anat Rec* 2001;264(4):438-46.
- 39 - Miron RJ, Wei L, Bosshardt DD, Buser D, Sculean A, Zhang Y. Effects of enamel matrix proteins in combination with a bovine-derived natural bone mineral for the repair of bone defects. *Clin Oral Investig* 2014;18(2):471-8.
- 40 - Yoneda S, Itoh D, Kuroda S, et al. The effects of enamel matrix derivative (EMD) on osteoblastic cells in culture and bone regeneration in a rat skull defect. *J Periodontal Res* 2003;38(3):333-42.
- 41 - Intini G, Andreana S, Buhite RJ, Bobek LA. A comparative analysis of bone formation induced by human demineralized freeze-dried bone and enamel matrix derivative in rat calvaria critical-size bone defects. *J Periodontol* 2008;79(7):1217-24.

- 42 - Gestrelus S, Andersson C, Johansson AC, et al. Formulation of enamel matrix derivative for surface coating. Kinetics and cell colonization. *J Clin Periodontol* 1997;24(9):678-84.
- 43 - Suzuki N, Ohyama M, Maeno M, Ito K, Otsuka K. Attachment of human periodontal ligament cells to enamel matrixderived protein is mediated via interaction between BSP-like molecules and integrin alpha (v) beta3. *J Periodontol* 2001;72(11):1520-6.
- 44 - Palioto DB, Coletta RD, Graner E, Joly JC, de Lima AF. The influence of enamel matrix derivative associated with insulin-like growth factor-I on periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontol* 2004;75(4):498–504.
- 45 - van der Pauw MT, van den Bos T, Everts V, Beertsen W. Enamel matrix-derived protein stimulates attachment of periodontal ligament fibroblasts and enhances alkaline phosphatase activity and transforming growth factor beta1 release of periodontal ligament and gingival fibroblasts. *J Periodontol* 2000;71(1):31-43.

FIGURE LEGENDS

Figure 1

A) Mesenchymal stem cell markers. A₁) Flow cytometry analyze of cell surfaces antigens CD45 and CD90 in CD45⁺90⁺ BM-MSCs and in BMSCs. A₂) Gene expression of Rex-1 by RT-PCR in CD45⁺90⁺ BM-MSCs and in BMSCs at 7, 10 and 14 days. B) Colony-forming units (CFUs) of CD45⁺90⁺ BM-MSCs and BMSCs in 7 days in growth medium. C) Differentiation capacity in 7, 10 and 14 days of CD45⁺90⁺ BM-MSCs into (C₁) osteogenic phenotype, confirmed by ALP gene expression and extracellular matrix mineralization and into (C₂) adipogenic phenotype, confirmed by PPAR γ 2 gene expression and lipid accumulation. (*) Indicates statistically significant differences between CD45⁺90⁺ BM-MSCs and BMSCs ($p < 0.05$).

Figure 2

Proliferation assay in 3, 7, 10 and 14 days of CD45⁺90⁺ BM-MSCs in positive control, negative control, PGA and EMD groups. (*) Indicates statistically significant differences in relation to all the other groups ($p < 0.05$).

Figure 3

A) Gene expression by RT-PCR of osteoblast markers (runt related transcription factor 2, osterix, alkaline phosphatase and osteopontin) in 7, 10 and 14 days of CD45⁺90⁺ BM-MSCs in positive control, negative control, PGA and EMD groups. B) ALP activity in 7, 10 and 14 days of CD45⁺90⁺ BM-MSCs in positive control, negative control, PGA and EMD groups. C) Extracellular matrix mineralization of CD45⁺90⁺ BM-MSCs in positive control, negative control, PGA and EMD groups at 21 and 28 days, with qualitative analyses by Alizarin Red S and Von-kossa S and quantitative by calcium content. (*) Indicates statistically significant differences in relation to all the other groups ($p < 0.05$); Braces indicates statistically significant differences only between two groups ($p < 0.05$).

Figure 1:

Figure 2:

Figure 3: