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

CARLA DE OLIVEIRA PIRES DA SILVA

AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE TECIDUAL DE LIGAMENTO PERIODONTAL
RECÉM-EXTRAÍDO SOB EFEITO DE PROTEÍNAS DA MATRIZ DO ESMALTE E
SEU POTENCIAL ANGIOGÊNICO

Ribeirão Preto

2016

CARLA DE OLIVEIRA PIRES DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE TECIDUAL DE LIGAMENTO PERIODONTAL
RECÉM-EXTRAÍDO SOB EFEITO DE PROTEÍNAS DA MATRIZ DO ESMALTE E
SEU POTENCIAL ANGIOGÊNICO**

Dissertação apresentada Faculdade de
Odontologia de Ribeirão Preto -
Universidade de São Paulo -
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Odontologia
(Periodontia)

Orientador: Prof. Dr. Mario Taba Jr.

VERSÃO CORRIGIDA

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.

Silva, Carla de Oliveira Pires da

Avaliação da viabilidade tecidual de ligamento periodontal recém-extraído sob efeito de proteínas da matriz do esmalte e seu potencial angiogênico. Ribeirão Preto, 2016. Versão corrigida da Dissertação. A versão original se encontra disponível na Unidade que aloja o Programa.

91 p.: il.; 30 cm

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

Orientador: Taba Jr, Mario.

1. Expressão gênica. 2. Ligamento periodontal. 3. Regeneração. 4. Terapia tecidual. 5. Periodontite.

Folha de Aprovação

Nome: SILVA, Carla de Oliveira Pires da

Título: Avaliação da viabilidade tecidual de ligamento periodontal recém-extraído sob efeito de proteínas da matriz do esmalte e seu potencial angiogênico.

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências, programa de: Odontologia (Periodontia)

Aprovado em: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Dedicatória

Este é um doce fruto dos diversos que pude colher das grandes árvores que foram plantadas à tempos atrás.

Primeiramente por minha vó Maria (*In memoriam*), que me ensinou por meio de seu esforço e a partir dele eu poderia alcançar o que quisesse.

E em segundo lugar ao meu pai e minha mãe, José Carlos e Emilia, que me ensinaram a ser independente e plantar minhas próprias árvores, para ter minhas próprias sombras.

E em terceiro lugar por minha irmã Geisa, que sempre me fortaleceu (regando), e que me ensinou a ser otimista: a árvore vai crescer!

A vocês, meus quatro semeadores, dedico esta dissertação.

Agradecimientos

À Deus, por ter conduzido meus passos até chegar aqui, nesse patamar.

Ao Profº Drº Mario Taba Junior, pela orientação, pelas conversas acadêmicas, por ter ideias criativas, por ser um orientador que responde e-mails, que usa Google Drive, e que é honesto. Se o pudesse escolher novamente, o faria. Muito obrigada.

Ao Profº Drº Paulo Tambasco de Oliveira, por ter sido “porteiro” desse vasto momento que se deu em minha vida, por meio de respostas de e-mails e recepção em abril de 2013. Além disso, agradeço por sempre me motivar e estar aberto a conversas sobre FAPESP, acadêmicas e dúvidas da pesquisa.

Aos Profº Drº Arthur Belem Novaes Júnior e Profº Drº Sérgio Luis Scombatti de Souza por trazerem para os seminários as suas experiências adquiridas em consultório e em pesquisa. Ao Profº Drº Mario Taba Júnior, (agora como professor, não como orientador) que com o seu raciocínio, nunca sabíamos se as perguntas eram para ser respondidas... era sempre muito complexo. A Profª Drª Daniela Bazan Palioto Bulle, pois com ela aprendemos sobre como abordar nossos temas de forma mais didática e atrativa. Ao Profº Drº Michel Reis Messoria, pois aprendi a defender uma bandeira, apenas se estiver embasado em literatura científica. Ao Profº Drº Marcio Fernando de Moraes Grisi, pois tornou humana a abordagem do paciente na clínica e didática a apresentação dos casos clínicos. Tudo se fez importante. Por isso que cada um de vocês foi importante na minha formação. Agradeço verdadeiramente.

À Profª Drª Maria José Hitomi Nagata e suas então mestrandas, Eliana Aparecida Caliente e Eduarda de Lima Graciano Belem, pela recepção em visita técnica e transmissão de conhecimento na Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, campus Araçatuba.

À Profª Drª Lucia Helena Faccioli, e seu então supervisionado de Pós-Doc, Drº Francisco Wanderley Garcia de Paula e Silva, por ter-nos recebido, tirado dúvidas pertinentes no momento que estávamos sobre padronização dos métodos, incentivado a realizar novos testes (que se tornou uma etapas - em andamento - do Auxílio à Pesquisa Regular, concedido pela FAPESP) e aberto seu laboratório à realizar parte de nossa pesquisa na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

À Ms. Rosemeire de Lordo Franco (Cirurgiã-Dentista da FORP) , Drº Jorge Luiz Jacob Liporaci Junior (Responsável pelo curso de Aperfeiçoamento Em Cirurgia Buco-Maxilo-Facial da Associação Paulista de Cirurgiões-Dentistas de Ribeirão Preto) e Centro

de Especialidades Odontológicas da Unidade Básica de Saúde "Dr João Baptista Quartin"
– Central do Município de Ribeirão Preto.

À Dr^a Myrella Lessio Castro, Fernanda Schimidt de Freitas e Milena Suemi Irie, por ter sido minha dupla, minha companheira, amiga, e a pessoa sem a qual não teria feito essa pesquisa dessa forma.

Aos meus colegas de turma Sérgio Henrique Lago Martins, Gabriel Figueiredo Bastos, Luiz Fernando Ferreira de Oliveira, Jéssica Pires de Carvalho e Camila Alves Costa. Em especial, Milena Suemi Irie (importância já descrita acima) e Felipe Torres Dantas, meu caro amigo e companheiro de jargões, quem me fazia dançar e gargalhar nas horas de tristezas, e que me fazia comer sorvete quando estava desanimada.

Aos doutorandos Umberto Demoner Ramos, Cristine D’Almeida Borges (querida “Nem” que eu muito amo), Paula Gabriela Faciola Pessoa de Oliveira, Mariana Sales de Melo Soares, Gustavo Henrique Apolinário Vieira, Marco de Mendonça Invernici, Nicolly Parente Ribeiro Frota, Carolina de Moraes Rego Mandetta e Carolina Delmondes Freitas Dantas. Agradeço também ao já Dr^o Danilo Maeda Reino, todos esses pelos ensinamentos e experiências transmitidos.

Às meninas da clínica, que estiveram nos suportando com muita paciência, Joana D’Arc Leandro, Sueli Cooke Militello (com seu radinho), em especial, a eficiência em pessoa, Daniela Steter Martins (meu sonho é ter uma auxiliar como você).

Aos técnicos de laboratório Fabíola Singaretti de Oliveira (FORP), Roger Rodrigo Fernandes (FORP), Nilza Letícia Magalhães (FORP), Caroline Fontarari (FCFRP), em especial a Milla Sprone Tavares Ricoldi (FORP), por ter assessorado na maior parte do tempo.

Às secretárias Carla Daniela Lima da Silva, Aparecida Dulce de Oliveira Negreti (os abraços de mãe fizeram muita diferença), Mary Possani Carmessano e Tatiana Angeli Passos Fernandes.

À toda minha família e amigos (José Carlos, Emilia, Geisa, Valtinho, Ana Beatriz, João Victor, Pedro Lucas, Vó Miriam, Vô Manuel, Tia Kátia, Tia Penha, Leandro, Amanda, Dani, Mileninha, Luan, Eric, Ralen, Ju Oliveira, Denise Silveira e os demais agregados) pela compreensão da minha ausência nesse período. Agradeço pelo verdadeiro apoio.

A Marcel Santos de Araújo, por ter sido, informalmente, meu co-orientador, conselheiro, avaliador, criticando severamente, antes que qualquer um pudesse fazer isso.

Mas acima disso, por nesse tempo ter sido meu amigo e companheiro. Para tanto, a frase continua valendo: “The adventure is out there!”.

À Casa 13, para a qual precisaria de 3 páginas para colocar o nome de todos. Sintam-se beijados e abraçados, representarei com o nome de Priscilla Mendes, Prycila Feitoza, Malik Osbourne, Fabio Caixeta, Simone Cavalcante, Mayara Correr, Victória Martinez, Yagoub Ali, Eliana Arantes, Daniel Junta e Fernanda Moraes. Vocês tornaram a minha vida florida, quentinha, alegre, diversa, plural, uma colcha de retalho muito maior. Sei que não tive apenas amigos em Ribeirão Preto, tive uma família (já sinto saudades de comer pipoca e da nossa hora do chá).

Este projeto teve suporte financeiro da FAPESP mediante os processos 2013/25990-3 e 2014/06799-3.

Muito obrigada!

“In a dark place we find ourselves, and a little more knowledge lights our way.”

Yoda.

Resumo

Resumo

SILVA, COP. Avaliação da viabilidade tecidual de ligamento periodontal recém-extraído sob efeito de proteínas da matriz do esmalte e seu potencial angiogênico. Dissertação (Mestrado em Periodontia) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

A periodontite é uma doença inflamatória crônica, multifatorial, altamente prevalente na população que compromete os tecidos de suporte dos dentes gerando sequelas de difícil resolução, mesmo com as mais modernas técnicas regenerativas. A terapia tecidual parece ser uma alternativa promissora e as células indiferenciadas do ligamento periodontal (PDL) tem demonstrado grande potencial terapêutico. No entanto, o PDL necessita de estímulos adequados de biomodificadores para que a diferenciação ocorra de forma coordenada. As proteínas da matriz do esmalte (EMD) são biomodificadores que promovem formação de novo cimento. Apesar de ser utilizada clinicamente, a sua associação com células frescas do PDL ainda não foi explorada. Este é um estudo da expressão gênica e proteica do PDL com finalidade de reaproveitamento do tecido recém-extraído, estimulado por EMD, tendo em vista a regeneração periodontal. Os resultados da expressão gênica apresentam VEGF ($p=0.5194$) com diferença entre medianas de -0.201 e FGF-2 ($p = 0,0059$) com diferença entre medianas de -0.4167. No estudo de citocinas, VEGF-A ($p<0,0001$) com diferença entre medianas de 60,93, enquanto VEGF-D ($p=0.0049$) com diferença entre medianas de 2,45. Por meio dos resultados da expressão gênica baseada em FGF-2 e proteica baseada em VEGF-A, foi possível observar que após 10 min sob ação das EMD, houve modulação da resposta tecidual ex-vivo. Essa combinação poderá servir como uma proposta terapêutica, visando a aplicação clínica futura de tecidos comumente descartados após exodontia, como o PDL.

Palavras-chave: Ligamento periodontal, Regeneração, Terapia tecidual, Expressão gênica

Abstract

Abstract

SILVA, COP. Evaluation of the tissue viability of fresh periodontal ligament under the influence of enamel matrix proteins and their angiogenic potential. Master thesis (Master in Periodontology) – School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, 2016.

Periodontitis is a chronic inflammatory disease, multifactorial and highly prevalent in the world population that affects the teeth of the supporting tissues, generating sequels difficult to solve even with the most modern regenerative techniques. Tissue therapy appears to be a promising alternative and undifferentiated cells of the periodontal ligament (PDL) have shown great therapeutic potential. However, the PDL needs to appropriate stimuli biomodificadores that differentiation occurs in a coordinated fashion. The enamel matrix proteins (EMP) are a type of biomodificator that promotes new cementum formation. Despite being used clinically, its association with PDL fresh cells has not yet been explored. This is a study of gene and protein expression of PDL with reuse purpose of the newly extracted tissue stimulated by EMD, with a view to periodontal regeneration. The results show VEGF gene expression ($p = 0.5194$) difference in median -0.001 and FGF-2 ($p = 0.0059$) difference in medians of -0.4167. In the study of cytokines, VEGF-A ($p < 0.0001$) with the difference between medians of 60.93, whereas VEGF-D ($p = 0.0049$) with from 2.45 medians. Through the results of the FGF-2-based gene expression and protein-based VEGF-A, it was observed that the EMD modulated the tissue response ex vivo in the 10-minute period considering the standard angiogenic. This combination may serve as a therapeutic approach aimed at future clinical application of tissues commonly discarded after extraction, such as the PDL.

Keywords: Periodontal ligament, Regeneration, Tissue therapy, Gene expression.

Lista de Figuras

Lista de Figuras

Figura 1: Método de coleta do ligamento periodontal. O elemento dentário é retido pela coroa e, com a lâmina em 90° com a raiz, foi realizado o movimento longitudinal de raspagem pelo terço médio radicular. Esse movimento deve ser repetido até que a coleta do LP seja concluída. **(A)** Angulação de 90° da lâmina de bisturi com a superfície radicular. **(B)** Após o movimento repetido de raspagem, realizado ao longo eixo da porção média da raiz, ocorre acúmulo do PDL na lâmina de bisturi. **(C)** O PDL acumulado na lâmina então é transferido para o tubo tipo eppendorf, a tampa é fechada, o tempo de 10 minutos é marcado em cronômetro, e após completar esse período seguem para o armazenamento em gelo seco, até o momento da transferência para o Freezer -80°C **(D)** As amostras do grupo teste recebem a adição de Straumann® Emdogain® numa proporção de 1:1. A tampa é fechada, o tempo de 10 minutos é marcado em cronômetro, e após completar esse período seguem para o armazenamento em gelo seco, até o momento da transferência para o Freezer -80°C 36

Figura 2: Gráficos Box-Whisker, baseado no experimento de qPCR-RT, de acordo com os dados gerados pelo programa GraphPad Prism 7.00 e a expressão relativa (VEGF/GAPDH) de Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF) a partir do ligamento periodontal recém-extraído, sendo biomodificado (TEST) ou não (CTRL) por Straumann® Emdogain® dentro do período de 10 minutos. O teste de normalidade Mann-Whitney, valor de $p = 0,5194$ e diferença entre medianas de $-0,201$, com maior expressão para o grupo controle. A linha horizontal ao centro da caixa representa a mediana. As bordas inferiores representam 25%, enquanto as superiores 75%. O limite representado pelas linhas junto a haste vertical representa os valores extremos não atípicos..... 41

Figura 3: Gráficos Box-Whisker, baseado no experimento de qPCR-RT, de acordo com os dados gerados pelo programa GraphPad Prism 7.00 e a expressão relativa (FGF-2/GAPDH) de Fator de Crescimento Fibroblástico-2 (FGF-2) a partir do ligamento periodontal recém-extraído, sendo biomodificado (TEST) ou não (CTRL) por Straumann® Emdogain® dentro do período de 10 minutos. O teste de normalidade Mann-Whitney, valor de $p = 0,0059$ e diferença entre medianas de $-0,4167$, com maior expressão para o grupo controle. A linha horizontal ao centro da caixa representa a mediana. As bordas inferiores representam 25%, enquanto as superiores 75%. O limite representado pelas linhas junto a haste vertical representa os valores extremos não atípicos..... 42

Figura 4: Gráficos Box-Whisker, baseado no experimento de MILLIPLEX® Multiplex Assays Using Luminex® através do Kit HAP1MAG-12K HUMAN ANGIOGENESIS e a expressão relativa (pg/mL) de Fator de Crescimento Vascular Endotelial-A (VEGF-A) a partir do ligamento periodontal recém-extraído, sendo biomodificado (TEST) ou não (CTRL) por Straumann® Emdogain® dentro do período de 10 minutos. O teste de normalidade Mann-Whitney, valor de $p < 0,0001$ e diferença entre medianas de $60,93$, com maior expressão para o grupo teste. A linha horizontal ao centro da caixa representa a mediana. As bordas inferiores representam 25%, enquanto as superiores 75%. O limite representado pelas linhas junto a haste vertical representa os valores extremos não atípicos..... 43

Figura 5: Gráficos Box-Whisker, baseado no experimento de MILLIPLEX® Multiplex Assays Using Luminex® através do Kit HAP1MAG-12K HUMAN ANGIOGENESIS e a expressão relativa (pg/mL) de Fator de Crescimento Vascular Endotelial-D (VEGF-

D) a partir do ligamento periodontal recém-extraído, sendo biomodificado (TEST) ou não(CTRL) por Straumann® Emdogain® dentro do período de 10 minutos. O teste de normalidade Mann-Whitney, valor de $p = 0,0049$ e diferença entre medianas de 2,45, com maior expressão para o grupo teste. A linha horizontal ao centro da caixa representa a mediana. As bordas inferiores representam 25%, enquanto as superiores 75%. O limite representado pelas linhas junto a haste vertical representa os valores extremos não atípicos..... 43

Figura 6: Quantidade de tecido suficiente para compor uma amostra para análise de RNA 82

Figura 7: Tempo de viabilidade tecidual do ligamento periodontal em 5, 10 e 20 minutos. 83

Figura 8: Gráficos Box-Whisker, baseado no experimento de qPCR-RT e a Expressão relativa de Osteopontina(OPN), Osterix (SP7), Fator de Crescimento de Fibroblastos 2(FGF-2), Fator de Crescimento Vascular Endotelial(VEGF), BAX e BCL-2, a partir do ligamento periodontal recém-extraído, sendo biomodificado ou não por Straumann® Emdogain® dentro do período de 10 minutos. Foi considerado o $P < 0,05$. A linha horizontal ao centro da caixa representa média ou mediana. As bordas inferiores representam 25%, enquanto as superiores 75%. O limite representado pelas linhas junto a haste vertical representa os valores extremos não atípicos..... 84

Figura 9 : Gráficos Box-Whisker, baseado no experimento de qPCR-RT e a Expressão relativa de Osteoprotegerina (OPG), Fosfatase Alcalina (ALP), Sialoproteína Óssea (BSP) e Fator de transcrição relacionados ao Runt 2 (RUNX-2), a partir do ligamento periodontal recém-extraído, sendo biomodificado ou não por Straumann® Emdogain® dentro do período de 10 minutos. Foi considerado o $P < 0,05$. A linha horizontal ao centro da caixa representa média ou mediana. As bordas inferiores representam 25%, enquanto as superiores 75%. O limite representado pelas linhas junto a haste vertical representa os valores extremos não atípicos..... 85

Figura 10: Gráficos Box-Whisker, baseado no experimento de qPCR-RT e a Expressão relativa de BAX e BCL-2, a partir do ligamento periodontal recém-extraído, sendo biomodificado ou não por Straumann® Emdogain® dentro do período de 10 minutos. Foi considerado o $P < 0,05$. A linha horizontal ao centro da caixa representa média ou mediana. As bordas inferiores representam 25%, enquanto as superiores 75%. O limite representado pelas linhas junto a haste vertical representa os valores extremos não atípicos..... 86

Figura 11: Gráficos Box-Whisker, baseado no experimento de MILLIPLEX® Multiplex Assays Using Luminex® e a expressão relativa de Fator de Crescimento de Fibroblastos-1, Osteocalcina, Fator de Crescimento de Fibroblastos-2, Osteopontina, Fator de Crescimento Vascular Endotelial-C, DKK-1, Osteoprotegerina, Interleucina-8, Fator de Crescimento Epidérmico, a partir do ligamento periodontal recém-extraído, sendo biomodificado ou não por Straumann® Emdogain® dentro do período de 10 minutos. Foi considerado o $P < 0,05$. A linha horizontal ao centro da caixa representa média ou mediana. As bordas inferiores representam 25%, enquanto as superiores 75%. O limite representado pelas linhas junto a haste vertical representa os valores extremos não atípicos..... 87

Figura 12: Gráficos Box-Whisker, baseado no experimento de MILLIPLEX® Multiplex Assays Using Luminex® e a expressão relativa de Fator de Crescimento Vascular Endotelial-A, Fator de Crescimento Vascular Endotelial-D, Proteína Óssea

Morfofenética-9, Angiopietina-2, a partir do ligamento periodontal recém-extraído, sendo biomodificado ou não por Straumann® Emdogain® dentro do período de 10 minutos. Foi considerado o $P < 0,05$. A linha horizontal ao centro da caixa representa média ou mediana. As bordas inferiores representam 25%, enquanto as superiores 75%. O limite representado pelas linhas junto a haste vertical representa os valores extremos não atípicos..... 88

Lista de Tabelas

Lista de Tabelas

Tabela 1: Distribuição de grupos de estudos.....	35
Tabela 2: Esquema de Placa de PCR demonstrando controle, teste, duplicada técnica, 6 repetições biológicas, GAPDH como gene constitutivo (presente em todas as placas), dois genes alvos e os brancos.	38
Tabela 3: Resultado de expressão gênica a partir de qPCR-RT, de acordo com os dados gerados pelo programa GrapfPad Prism 7.00.....	89
Tabela 4: Tabela de expressão proteica a partir da análise dos analitos presentes nos kits HAGP1MAG-12K HUMAN ANGIOGENESIS/ HUMAN BONE	89

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

- - Menos

% - Percentual

+ - Mais

°C – Graus Celsius

μL - Microlitro

ALP - Fosfatase alcalina

ANGPT-2 - Angiopoietina-2

BAX – proteína x associada a BCL2

BCL-2 - célula-B de linfoma 2

BMP-9 - Proteína morfogenética óssea - 9

BSP - Sialoproteína óssea

Ct - ciclo threshold

Ctrl – Grupo controle

DKK1 - Dickkopf 1

DNA – ácido desoxirribonucléico

DNase - desoxirribonuclease

EGF - Fatores de crescimento epidérmicos

EMD - Proteínas da matriz do esmalte

FGF - Fator de crescimento fibroblástico (FGF-1/ FGF-2)

GAPDH - gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

IL-8 - Interleucina-8

mg - miligrama

mL – Mililitro

ng - nanograma

nm - nanômetro

OC - Osteocalcina

OPG - Osteoprotegerina

OPN - Osteopontina

P – valor de significância

PCR – reações em cadeia da polimerase

PDL - Ligamento periodontal

qPCR-RT - Reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa em tempo real

RANK - Receptor Ativador de Fator Nuclear kappa-B

RIN – Número de integridade do RNA

RNA – ácido ribonucléico

RPM – rotações por minuto

RUNX-2 - Fator de transcrição relacionados ao Runt 2

SP7 - Osterix

Test – Grupo test

TIE2 - TEK receptor tirosina quinase 2

VEGF - Fator de crescimento vascular endotelial (VEGF/ VEGF-A/ VEGF-D)

Sumário

Sumário

1. Introdução	28
2. Proposição	31
3. Material e Métodos	33
3.1 Obtenção das amostras PDL	34
3.1.1 Grupos	34
3.2 Expressão gênica	36
3.2.1 Protocolo de extração de RNA	36
3.2.2 Quantificação e Integridade do RNA	37
3.2.3 Síntese de cDNA	37
3.2.4 Gene constitutivo e alvos	37
3.2.6 Plaqueamento qPCR-RT:	37
3.3 Expressão Proteica	38
3.3.1 Protocolo de extração de proteína	38
3.3.2 Dosagem de citocinas e fatores de crescimento	38
3.4 Análise estatística	39
3.4.1 Expressão gênica:	39
3.4.2 Expressão de proteínas:	39
4. Resultados	40
5. Discussão	45
6. Conclusões	50
7. Referências	52
Apêndice	58
Apêndice A – Artigo submetido ao Journal of Periodontology	59
Anexo	77
Anexo A – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa	78

Anexo B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	80
Anexo C - Padronização da metodologia - Protocolos desenvolvidos	82
- <i>Coleta do Ligamento Periodontal.....</i>	<i>82</i>
- <i>Quantidade de tecido suficiente para análise de RNA .....</i>	<i>82</i>
- <i>Tempo de viabilidade tecidual .....</i>	<i>82</i>
- <i>Método para extração de RNA .....</i>	<i>83</i>
Anexo D - Figuras	84
Anexo E - Tabelas	89

1.Introdução

- Introdução

A complexidade da regeneração periodontal se encontra na reconstrução ordenada dos quatro tecidos que o formam, osso, ligamento periodontal (PDL), cemento e gengiva (1). Esse processo depende de várias etapas, sem as quais, permanece incompleto. A regeneração depende de células específicas. Sendo assim, fibroblastos para formação do PDL, cementoblastos para o cemento, osteoblasto para o tecido ósseo e células endoteliais para promover a angiogênese (2). A participação de células exóticas, como as do epitélio oral, impedem o processo, gerando o chamado epitélio juncional longo (3). E é através do microambiente periodontal, formado pela matriz cementária e junção cemento dentinária, que ocorre a seleção das células que serão recrutadas para a regeneração, das que serão afastadas substâncias como fatores de crescimento, moléculas de adesão e proteínas estruturais presentes nesse ambiente local são capazes de afetar a migração celular, adesão, proliferação e diferenciação (4).

Dessas substâncias, falaremos sucintamente de algumas, iniciando pela ação angiogênica que podem exercer no tecido. FGFs são relacionados à angiogênese, migração e cicatrização. FGF-2 é um fator básico (5). No entanto, possui alto poder de indução à angiogênese (6). Outra família é a dos fatores de crescimento vascular endotelial (VEGF). Estudos tem demonstrado que a expressão de VEGF induz a proliferação das células endoteliais, angiogênese, migração celular e inibe a morte celular programada. In vivo, induz a angiogênese e permeabilização dos vasos sanguíneos (7). VEGF-A é a forma predominante do VEGF. Sua função é induzir a angiogênese. É mediador da permeabilidade vascular e contribui a inflamação (8). Apesar de VEGF-D não apresentar todos os mecanismos esclarecidos, este está envolvido com o crescimento e diferenciação do epitélio linfático (9).

Sabendo que substâncias locais interferem no microambiente, e podem influenciar o periodonto, há 20 anos, as proteínas da matriz do esmalte (EMD) entraram no mercado com a proposta de promover a regeneração periodontal (10). Seu mecanismo ainda não é bem conhecido, mas o crédito disso é devido a ação mimética das amelogeninas, que são removidas da porção do esmalte de dentes suínos (10). A amelogenina é uma proteína que pertence a uma família de proteínas hidrofóbicas, responsável por mais de 95% do conteúdo total das proteínas que compõe a EMD (11). Essas proteínas tem uma influência significativa sobre a adesão e proliferação celulares. Auxiliam na diferenciação celular, mediando a ligação de células, espalhamento, proliferação e sobrevivência, bem como a

expressão de fatores de transcrição, de crescimento, componentes de matriz extracelular e outras moléculas envolvidas na regulação da remodelação óssea (12). A amelogenina é conhecida como molécula de sinalização (13). No entanto, há uma segunda teoria, de que a amelogenina seria compreendida como uma proteína estrutural, servindo como carreadora para outros fatores, como os secretados por células (13). Corroborando com esta teoria, o resultado de um estudo foi que as EMD estimularam a cicatrização por meio do fluxo de nutrientes e oxigênio (14). O mecanismo das EMD que influencia na regeneração clinicamente, é resultado da ação mimética pelo contato com a superfície de dentina, formando cimento, como no estudo em macacos (10) e em humanos (15). Para além de regeneração periodontal, sua adição foi adjuvante na formação de cimento em 80% dos experimentos de apicectomia em cães (16). Os estudos *in vitro* apresentaram que as EMD podem aumentar a proliferação e diferenciação de linhagens celulares osteoblásticas (17),(18), aumentar a atividade de fosfatase alcalina, assim como a expressão de osteocalcina no meio de cultura de células osteoblásticas primárias (19). Em adição, sua aplicação pode influenciar a angiogênese e os eventos inflamatórios associados à cicatrização, favorecendo o reparo do tecido ósseo (20). Logo, este biomodificador é apresentado para promover a regeneração periodontal por induzir a formação de cimento, PDL e do osso alveolar, o que é evidenciado clinicamente por redução de profundidade à sondagem, ganho de inserção, e preenchimento de defeito radiográfico (11, 21).

Desde o início dos anos de 2000, células indiferenciadas tem sido descritas nos tecidos bucais (22, 23, 24). Uma população de células progenitoras promove a regeneração limitada do periodonto, como observado nas fases iniciais da doença periodontal. Tem sido postulado que células mesenquimais são recrutadas e ativadas após danos ao periodonto, onde passam por diferenciação terminal formando células do PDL ou cimento. Ambos atuam para proteger as conexões entre o cimento e o osso alveolar adjacente (25).

Entretanto, para regeneração periodontal, células do tecido ósseo não apresentam essa capacidade, ocasionando anquilose e reabsorções (26). Apenas tecidos conjuntivos bucais apresentam fisiologia para a regeneração periodontal (27, 28). Quando em contato direto com dentes reimplantados, PDL promove a formação de tecido mineralizado, tal qual cimento, maior cobertura de tecido mole, semelhante ao PDL, apresentando menores taxas de anquilose e menores taxas de reabsorção em comparação com o controle. Estudos com dentes avulsionados associaram o uso das EMD e observaram diminuição na taxa de

anquilose (29), e taxas de PDL normal ao redor dos dentes quando reduziram os tempos que cientificamente eram praticados de 60 e 30 minutos para 15 minutos (30).

Outra prova disso foi averiguada mediante esse estudo, em que implantes dentários foram colocados em contato com remanescentes dentários, e houve a formação de cimento e ligamento periodontal. Os autores ainda concluíram que, a população responsável pela formação cementária é originária do ligamento periodontal, que possui uma alta taxa de proliferação e boa aderência à superfícies (31).

Em 2013, o PDL recém-extraído foi testado em associação com esponja de colágeno. Foi verificado um ganho clínico e radiográfico entre o controle que recebeu apenas a esponja de colágeno, e o teste, que a associou ao PDL (32).

A proposta desse estudo foi simplificar, mas não substituir, as etapas laboratoriais do uso de tecidos de enxertia. Os dentes ao serem extraídos são majoritariamente descartados, desperdiçando tecidos como a polpa, ligamento periodontal e os próprios tecidos mineralizados do cimento, dentina e esmalte, que mais recentemente estão sendo testados (33). A potencial riqueza regenerativa desses tecidos dentários sugerem a possibilidade de sua utilização não somente no âmbito da pesquisa acadêmica, mas pode estender-se à realidade da clínica odontológica, onde Centros de Tecnologia Celular não são de fácil acesso e as tecnologias mais inovadoras nem sempre são acessíveis. O objetivo do estudo, portanto, foi avaliar o tecido periodontal recém-extraído, sob o efeito das EMD, observando marcadores do microambiente periodontal que influenciam na angiogênese, visando a regeneração dos tecidos periodontais.

2.Proposição

- Proposição

A proposta desse estudo é avaliar o efeito biomodificador das EMD, avaliando as seguintes hipóteses:

- 1- O estímulo causado ao ligamento periodontal pelo biomodificador altera a expressão de genes e proteínas relacionadas ao processo de regeneração?
- 2- Células do PDL recém-extraído, expressam genes relacionados à osteogênese, angiogênese e apoptose?
- 3- Células do PDL recém-extraído, expressam proteínas relacionadas à osteogênese e angiogênese?
- 4- Que tipo de alterações ocorrem nos tecidos expostos e armazenados junto com ao biomodificador?

3. Material e Métodos

-Material e Métodos

3.1 Obtenção das amostras PDL

Após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (CEP - FORP), sob o número do Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) 27944214.0.0000.5419 (anexo), as amostras foram obtidas de dentes provenientes de 37 pacientes, entre 18 anos a 35 anos, de ambos os gêneros, voluntários em estado saudável (no mínimo 2 dentes de cada paciente), os dentes foram de qualquer grupo dentário, hígidos e em função. Os dentes foram coletados nas clínicas de cirurgia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, no Curso de Aperfeiçoamento Em Cirurgia Buco-Maxilo-Facial da Associação Paulista de Cirurgiões-Dentistas de Ribeirão Preto e Centro de Especialidades Odontológicas da Unidade Básica de Saúde "Drº João Baptista Quartin" – Central do Município de Ribeirão Preto. Após a leitura, compreensão e assinatura, cada elemento dentário foi doado ao Biobanco de Dentes da FORP por meio do TCLE (anexo). Em seguida esses elementos dentários foram doados aos pesquisadores. Desses dentes recém-extraídos, foram coletados o PDL a partir de raspagem do terço médio das raízes por meio da raspagem com lâmina de bisturi.

3.1.1 Grupos

O estudo foi realizado em duas etapas: a análise da expressão gênica e a análise da expressão proteica. Cada etapa conteve dois grupos, teste e controle. Foram seis amostras de PDL+EMD para o grupo teste e seis amostras de PDL para o controle da análise gênica. Dois grupos formaram a análise de proteínas, teste e controle. Foram doze amostras de PDL+EMD para o grupo teste, e doze amostras de PDL para o controle. Cada amostra significa a junção de PDL proveniente de dois elementos dentários (*Tabela 1*).

3.1.1.1 Teste

As amostras do grupo teste foram coletadas imediatamente após exodontia e obtenção do PDL, conforme descrito na **Figura 1**. As amostras foram mantidas por 10 minutos em temperatura ambiente sob o efeito de Straumann® Emdogain® de 30 mg/ml (Straumann®, Suíça), que foi colocado junto ao tecido numa proporção visual 1:1 no tubo

tipo *ependorf* ou criotubo. Após o tempo de espera, foram mantidas por 10 minutos em temperatura ambiente, e posteriormente crio preservadas em gelo seco até que fossem transferidas para o freezer -80°C.

3.1.1.2 Controle

As amostras do grupo controle foram coletadas e transferidas para tubo tipo *ependorf* seco ou criotubo seco imediatamente após exodontia e obtenção do PDL, conforme descrito na **Figura 1**. Pela necessidade de comparação com o grupo teste, as amostras controle foram mantidas por 10 minutos em temperatura ambiente, e posteriormente crio preservadas em gelo seco até que fossem transferidas para o freezer -80°C.

Tabela 1: Distribuição de grupos de estudos

Análise da expressão gênica	Teste	PDL+EMD	6
	Controle	PDL	6
Análise da expressão proteica	Teste	PDL+EMD	12
	Controle	PDL	12

Figura 1: Método de coleta do ligamento periodontal. O elemento dentário é retido pela coroa e, com a lâmina em 90° com a raiz, foi realizado o movimento longitudinal de raspagem pelo terço médio radicular. Esse movimento deve ser repetido até que a coleta do LP seja concluída. (A) Angulação de 90° da lâmina de bisturi com a superfície radicular. (B) Após o movimento repetido de raspagem, realizado ao longo eixo da porção média da raiz, ocorre acúmulo do PDL na lâmina de bisturi. (C) O PDL acumulado na lâmina então é transferido para o tubo tipo eppendorf, a tampa é fechada, o tempo de 10 minutos é marcado em cronômetro, e após completar esse período seguem para o armazenamento em gelo seco, até o momento da transferência para o Freezer -80°C (D) As amostras do grupo teste recebem a adição de Straumann® Emdogain® numa proporção de 1:1. A tampa é fechada, o tempo de 10 minutos é marcado em cronômetro, e após completar esse período seguem para o armazenamento em gelo seco, até o momento da transferência para o Freezer -80°C

3.2 Expressão gênica

3.2.1 Protocolo de extração de RNA

Kit RNA Promega:

A extração do RNA das amostras PDL foi realizada com o reagente Trizol (Trizol® Reagent, Invitrogen, Milan, Italy). Cada fragmento de tecido PDL foi triturado com homogeneizador Tissue Tearor (model 985370, BIOSPEC PRODUCTS, INC, Oklahoma, EUA) em criotubo junto de reagente Trizol (1 ml/ mg de tecido). Foram adicionados 250 µl de clorofórmio (Sigma, St Louis, MO, USA), agitado durante 30 segundos e mantido por 5 minutos à temperatura de 4°C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.500 gRPM, por 15 minutos, a 4°C. Após a centrifugação, foram observadas três fases na solução, em que a fase aquosa incolor contendo o RNA foi

transferida para outro tubo, acrescida de 250 µl de etanol 95% e homogeneizada. A amostra foi adicionada ao filtro do kit (SV Total RNA Isolation System - Promega, Madison, WI, EUA) e centrifugada a 10.500 RPM, por 1 minuto, a 4°C. Após os processos de lavagem do filtro com solução tampão de lavagem para RNA, adição de DNase e, posteriormente, DNase stop solution, foram feitas duas eluições para cada amostra com 25 µl de água RNase/DNase free.

3.2.2 Quantificação e Integridade do RNA

Utilizando o aparelho *NanoVue™ Plus Spectrophotometer*, da GE, colocou-se uma amostra menor que 5 µL no leitor, em seguida o resultado da análise quantitativa é emitido em de extrato impresso. A leitura realizada nos comprimentos de onda de 260 nm, 280 nm e 230 nm, para obtenção da concentração de RNA/µL e contaminação por proteínas e fenol, respectivamente. A concentração mínima considerada viável para posterior análise tem sido de 100 ng/µl. A integridade do RNA ribossômico avaliada por meio do aparelho 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, Califórnia, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Foram consideradas amostras viáveis para realização da Real-time PCR, aquelas que apresentarem valores de RIN (RNA Integrity Number) superior a 5.

3.2.3 Síntese de cDNA

A partir de 1 µg de RNA total foi confeccionado o DNA complementar (cDNA) por uma reação de transcrição reversa, baseado no protocolo proposto pelo fabricante. Ao final desta reação, o cDNA foi estocado a -20°C até o momento do uso.

3.2.4 Gene constitutivo e alvos

Após a amplificação das amostras do PDL, os cálculos para esta análise foram realizados em relação ao gene constitutivo *GAPDH*. A análise da expressão gênica foi realizada mediante qPCR-RT para detecção da expressão de genes *RUNX-2*, *OPG*, *VEGF-A*, *BCL2*, *BAX*, *SP7*, *FGF2*, *ALP*, *BSP* e *OPN*

3.2.6 Plaqueamento qPCR-RT:

O experimento do qPCR-RT foi realizado em quadruplicada técnica com seis repetições biológicas. Cada placa possuía seu constitutivo como controle interno (De A1-A12, **Tabela 2**). Para analisar os 10 genes alvos das amostras PDL, ao todo foram utilizadas 10 placas de 96 poços (MicroAmp® Fast 96-Well Reaction Plate (0.1mL), Applied Biosystems Life Technologies). Em cada poço da placa foram adicionados 5 µl de Mix (TaqMan® Fast Advanced Master Mix, Applied Biosystems) 0,5 µl do primer (TaqMan®, Applied Biosystems) para o gene avaliado, 2,25 µl de reação de síntese de cDNA de cada amostra e 2,25 µl de água deionizada. Em seguida, a reação foi executada em um termociclador em tempo real (StepOne Plus™ Real-Time PCR System, Life Applied Biosystems).

Tabela 2: Esquema de Placa de PCR demonstrando controle, teste, duplicada técnica, 6 repetições biológicas, GAPDH como gene constitutivo (presente em todas as placas), dois genes alvos e os brancos.

PDL#1	CONTROLE						TESTE					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	GAPDH 63	GAPDH 65	GAPDH 66	GAPDH 67	GAPDH 43	GAPDH 53	GAPDH 75+76	GAPDH 77+78	GAPDH 91+92	GAPDH 93+94	GAPDH 124+125	GAPDH 126+127
B	GAPDH 63	GAPDH 65	GAPDH 66	GAPDH 67	GAPDH 43	GAPDH 53	GAPDH 75+76	GAPDH 77+78	GAPDH 91+92	GAPDH 93+94	GAPDH 124+125	GAPDH 126+127
C	RUNX-2 63	RUNX-2 65	RUNX-2 66	RUNX-2 67	RUNX-2 43	RUNX-2 53	RUNX-2 75+76	RUNX-2 77+78	RUNX-2 91+92	RUNX-2 93+94	RUNX-2 124+125	RUNX-2 126+127
D	RUNX-2 63	RUNX-2 65	RUNX-2 66	RUNX-2 67	RUNX-2 43	RUNX-2 53	RUNX-2 75+76	RUNX-2 77+78	RUNX-2 91+92	RUNX-2 93+94	RUNX-2 124+125	RUNX-2 126+127
E	SP7 63	SP7 65	SP7 66	SP7 67	SP7 43	SP7 53	SP7 75+76	SP7 77+78	SP7 91+92	SP7 93+94	SP7 124+125	SP7 126+127
F	SP7 63	SP7 65	SP7 66	SP7 67	SP7 43	SP7 53	SP7 75+76	SP7 77+78	SP7 91+92	SP7 93+94	SP7 124+125	SP7 126+127
G	BRANCO GAPDH	BRANCO RUNX-2	BRANCO SP7									
H	BRANCO GAPDH	BRANCO RUNX-2	BRANCO SP7									

3.3 Expressão Proteica

3.3.1 Protocolo de extração de proteína

As amostras foram descongeladas em gelo, trituradas e homogeneizadas em 300µl de salina tamponada com fosfato (PBS) e 2 µl de inibidor de protease. As amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 1000rpm a 4°C. O sobrenadante foi removido e armazenado até o momento do uso.

3.3.2 Dosagem de citocinas e fatores de crescimento

Para quantificação de citocinas (DKK1, TNF α , OPG, OC, OPN, EGF, ANGPT2, BMP-9, FGF-1, IL-8, VEGF-C, VEGF-D, FGF-2, VEGF-A), utilizou-se kits disponíveis comercialmente (HAGP1MAG-12K HUMAN ANGIOGENESIS/ HUMAN BONE – Milliplex™ map, Merck Millipore Headquarters, Billerica, MA, EUA) em um analisador MAGPIX® (Luminex Corporation, Austin, TX, EUA). O ensaio foi realizado em uma placa de 96 poços seguindo as instruções do fabricante. As placas foram então analisadas pelo MAGPIX®, obtendo-se a intensidade de fluorescência média. Amostras abaixo do limite de detecção foram registradas como zero. Todas as amostras foram analisadas individualmente e os níveis de citocinas foram estimados a partir de uma curva polinomial de quinto grau utilizando-se o software xPONENT® (Luminex Corporation, Austin, TX, EUA). Um total de 48 amostras foi analisado.

3.4 Análise estatística

3.4.1 Expressão gênica:

A normalização e quantificação relativa da expressão gênica foram realizadas pelo método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak; Schmittgen, 2001). Dessa forma, os dados são representados como diferença na expressão gênica (fold regulation) relativa a GAPDH para PDL, que foi normalizada pela média geométrica dos controles. A análise estatística foi realizada com os valores de ciclo threshold (Ct) e foi realizado o teste de normalidade D'Agostino & Pearson, caso aprovado no teste de normalidade, os dados passavam pelo teste T de Student (paramétrico). Caso os dados não passassem pelo teste de normalidade, iriam então para o teste Mann-Whitney (não paramétrico). Para todas as análises, foi adotado nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

3.4.2 Expressão de proteínas:

A análise estatística foi realizada com os valores em pg/mL de cada proteína avaliada. Foi realizado o teste de normalidade D'Agostino & Pearson: caso aprovado no teste de normalidade, os dados passavam pelo teste T de Student (paramétrico). Caso os dados não passassem pelo teste de normalidade, iriam então para o teste Mann-Whitney (não paramétrico). Para todas as análises, foi adotado nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Foi realizado o Power teste Post hoc, entre duas médias independentes de dois grupos, da variável primária VEGF-A no programa G*Power 3192.

4.Resultados

- Resultados

Comparações entre amostras dos grupos teste e controle, apresentam dados dos parâmetros moleculares baseadas na expressão de RNA e das citocinas, sumarizados respectivamente na **Tabela 2** e **Tabela 4** (Anexos). A **Figura 2** apresenta a expressão gênica de VEGF relativa a GAPDH menos expressa no grupo teste, mas sem valores estatisticamente significantes. A **Figura 3** mostra FGF-2 em relação a GAPDH, com valores estatisticamente significantes, e o grupo teste esteve menos expresso. A **Figura 4** apresenta o gráfico box-whisker que apresenta a correlação entre a estimulação com o *Straumann® Emdogain®* no grupo teste e a ausência de estímulos no grupo controle apresentado no elevado aumento da expressão da citocina VEGF-A. Da mesma superfamília, mas com uma expressão menos exacerbada, o gráfico da **Figura 5** mostra que VEGF-D, similarmente, apresentou aumento no grupo teste, com diferença estatisticamente significativa.

Figura 2: Gráficos Box-Whisker, baseado no experimento de qPCR-RT, de acordo com os dados gerados pelo programa GrapfPad Prism 7.00 e a expressão relativa (VEGF/GAPDH) de Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF) a partir do ligamento periodontal recém-extraído, sendo biomodificado (TEST) ou não (CTRL) por *Straumann® Emdogain®* dentro do período de 10 minutos. O teste de normalidade Mann-Whitney, valor de $p = 0,5194$ e diferença entre medianas de $-0,201$, com maior expressão para o grupo controle. A linha horizontal ao centro da caixa representa a mediana. As bordas

inferiores representam 25%, enquanto as superiores 75%. O limite representado pelas linhas junto a haste vertical representa os valores extremos não atípicos.

Figura 3: Gráficos Box-Whisker, baseado no experimento de qPCR-RT, de acordo com os dados gerados pelo programa GrapfPad Prism 7.00 e a expressão relativa (FGF-2/GAPDH) de Fator de Crescimento Fibroblástico-2 (FGF-2) a partir do ligamento periodontal recém-extraído, sendo biomodificado (TEST) ou não (CTRL) por Straumann® Emdogain® dentro do período de 10 minutos. O teste de normalidade Mann-Whitney, valor de $p = 0,0059$ e diferença entre medianas de $-0,4167$, com maior expressão para o grupo controle. A linha horizontal ao centro da caixa representa a mediana. As bordas inferiores representam 25%, enquanto as superiores 75%. O limite representado pelas linhas junto a haste vertical representa os valores extremos não atípicos.

Figura 4: Gráficos Box-Whisker, baseado no experimento de MILLIPLEX® Multiplex Assays Using Luminex® através do Kit HAGP1MAG-12K HUMAN ANGIOGENESIS e a expressão relativa (pg/mL) de Fator de Crescimento Vascular Endotelial-A (VEGF-A) a partir do ligamento periodontal recém-extraído, sendo biomodificado (TEST) ou não (CTRL) por Straumann® Emdogain® dentro do período de 10 minutos. O teste de normalidade Mann-Whitney, valor de $p < 0,0001$ e diferença entre medianas de 60,93, com maior expressão para o grupo teste. A linha horizontal ao centro da caixa representa a mediana. As bordas inferiores representam 25%, enquanto as superiores 75%. O limite representado pelas linhas junto a haste vertical representa os valores extremos não atípicos.

Figura 5: Gráficos Box-Whisker, baseado no experimento de MILLIPLEX® Multiplex Assays Using Luminex® através do Kit HAGP1MAG-12K HUMAN ANGIOGENESIS e a expressão relativa (pg/mL) de Fator de Crescimento Vascular Endotelial-D (VEGF-D) a partir do ligamento periodontal recém-extraído, sendo biomodificado (TEST) ou não (CTRL) por Straumann® Emdogain® dentro do período de 10 minutos. O teste de normalidade Mann-Whitney, valor de $p = 0,0049$ e diferença entre medianas de 2,45, com maior expressão para o grupo teste. A linha horizontal ao centro da caixa representa a mediana. As bordas inferiores representam 25%, enquanto as superiores 75%. O limite representado pelas linhas junto a haste vertical representa os valores extremos não atípicos.

O grupo controle teve 33% de perda das amostras no processamento de extração do RNA. No grupo teste, o percentual de perda subiu para 57%, o número de perda no grupo teste foi, portanto, 1,73 maior que no grupo controle.

No Teste do poder da amostra (Actual Power de VEGF-A = 0,9734024, G*Power3.1.9.2), verificamos que o N amostral pode ter exercido efeito não relevante e ou comparações das amostras que se apresentaram “sem diferença estatisticamente significativa” podem ter sofrido falha do modelo experimental ou falha de processamento.

5. Discussão

- Discussão

Este trabalho foi baseado no princípio de aproveitamento do material dentário que é comumente descartado em exodontias que, a partir desse estudo, poderá ser utilizado ainda recém extraído como um enxerto autógeno. Os benefícios do seu uso incluem a compatibilidade biológica, redução de custos com enxertos e a praticidade de ser um tecido viável e de fácil acesso.

O periodonto é um complexo aparato que possui tecidos moles e duros e que a sua regeneração depende da preexistência de células que possuam esse potencial. O ligamento periodontal, que apesar de ser um tecido conjuntivo frouxo, apresenta o potencial de regeneração dos tecidos moles e duros (3, (4).

Além da população celular, outros fatores, como mediadores celulares, exercem função reguladora na regeneração tecidual. Esses mediadores estão associados com alterações na forma das células e a síntese de macromoléculas da matriz extracelular e em sua maioria são secretados durante o processo de cicatrização. Marcadores como Fator de crescimento derivado de plaquetas, Fator de crescimento de transformação- β , Fator de crescimento de fibroblastos, necrose tumoral- α , interleucina-1 e interferon- γ são alguns exemplos (4). Dois marcadores são essenciais no processo da cementogênese, *Runx-2* e *Osterix*, uma vez que a ativação da via de sinalização canônica WNT só ocorre na presença desses marcadores. Essa via coordenada por uma família de 19 glicoproteínas está associada à diferenciação celular. Após sua ativação, ocorre o aumento na expressão de ALP, BSP e OCN (34). No nosso estudo, *Runx-2* apresentou o grupo controle com uma subexpressão gênica em relação ao grupo teste. Enquanto *Osterix* apresentou uma maior expressão para o grupo controle em relação ao teste. ALP apresentou menor expressão para o grupo controle em relação ao teste e BSP apresentou maior expressão para o grupo controle em relação ao teste. O dado da expressão proteica de osteocalcina apresenta maior expressão para o grupo controle em relação ao teste e DKK-1 apresenta maior expressão para o grupo controle em relação ao teste. Esses dados não são conclusivos para a sinalização WNT, no entanto a caracterização de marcadores como *Runx-2* e ALP, demonstram uma estreita vantagem na ativação da via de sinalização canônica, que pode ter tido interferência pela perda de RNA no processamento das amostras do grupo teste.

Os testes de sua viabilidade permearam pelos pilotos de curva do tempo e quantidade de tecidos necessários para avaliar molecularmente as expressões de RNA e

proteica, comprovando que o tecido do PDL apresenta viabilidade e, aos estudos moleculares, apresenta mudança de expressão frente ao estímulo de 10 minutos sob o efeito do Emdogain. Nesse estudo, portanto, destacamos o efeito angiogênico protagonizado pelos marcadores de expressão gênica VEGF e FGF-2 e as citocinas e fatores de crescimento VEGF-A e VEGF-D.

Dos genes, destacamos o efeito do Straumann® Emdogain® por meio da expressão de VEGF-A, em que o grupo teste apresentou relativa subexpressão em relação ao controle, não significativa estatisticamente, possivelmente por uma perda de RNA. Enquanto o FGF-2, com dados estatisticamente significantes, apresentaram uma maior distância entre grupos, com menor expressão para o grupo teste. Estes achados se conectam à literatura que discute sobre a interferência que as EMD causam ao longo do tempo e da quantidade utilizados (14, 34), podendo exercer até mesmo um papel de agente citostático ou mesmo citotóxico (36).

O presente estudo, ao avaliar a expressão do fator de crescimento VEGF-A frente ao estímulo de Straumann® Emdogain® por 10 minutos, pode observar aumento da expressão no grupo teste. E, em mesmas condições, ao avaliar a expressão da citocina VEGF-D, pode-se observar ligeiro aumento da expressão no grupo teste. Ambos com resultados estatisticamente significantes. Esses resultados estão de acordo com a literatura, é possível que essa ativação esteja associada a ativação de vias como TGF- β 1 e FGF-2 (35).

O uso do Emdogain pode estar associado à estimulação da produção de fatores de crescimento como o Fator de crescimento derivado de plaquetas-AB (PDGF-AB), Fator de transformação do crescimento - β 1 (TGF- β 1) e Interleucina-6 (IL-6), resultando numa aceleração da população de células do PDL e, conseqüentemente, uma cicatrização acelerada, como verificado em estudo *in vitro* (37). Ademais, Emdogain pode fazer a conexão entre células endoteliais e as células do PDL durante a regeneração periodontal (38).

O processo de cicatrização tem início após a incisão, quando ocorre a formação o coágulo por células sanguíneas, plaquetas, neutrófilos e hemácias, tudo interligado por uma malha de fibrina e fatores de adesão. Simultaneamente a fase inflamatória se desencadeia, ativando a migração neutrofílica para a região. Em 24h, além de neutrófilos, monócitos também estão presentes no sítio. Após essas fases, os tecidos presentes serão substituídos por tecidos de granulação, um tecido altamente vascularizado, formado por fibroblastos e matriz extracelular. A formação de um novo tecido depende da participação

das células endoteliais, fibroblastos e epiteliais em fase de anabolismo, dessa forma serão formados novos vasos e queratinócitos, por exemplo. A fase de remodelação de longo prazo ocorre através da apoptose de miofibroblastos, fibroblastos, células endoteliais e macrófagos, gerando um tecido rico em colágeno (39). A aplicação de EMD em defeito periodontal e aumento da expressão de VEGF podem auxiliar na aceleração da nova formação de vasos e melhora da qualidade do tecido marginal (36). Além disso, EMD quando associado em procedimentos cirúrgicos pode ser uma das causas de aceleração da cicatrização (40). Esse benefício pode estar relacionado à melhora da granulação tecidual provocada pelas EMD e aceleração do fechamento de feridas (41).

Diferentes formas de VEGF, como VEGF-A e VEGF-D exercem diferentes funções e muitos ainda não estão desvendados. Tendo em vista que a mudança de expressão ocorreu em um curto espaço temporal, a relação entre VEGF e EMD pode ser vista com certa mutualidade, mesmo porque o estímulo de EMD eleva a expressão de VEGF, que é importante para a penetração de vasos através do aumento da permeabilidade, isso viabiliza a aceleração do processo cicatricial da ferida através do aumento do fluxo de nutrientes e oxigênio (14).

Além desses genes, também foram avaliados OPN, OPG, BCL-2 e BAX com os resultados discriminados na Tabela 3 e nas Figura 8, Figura 9 e Figura 10. E a expressão de citocinas e fatores de crescimento quantificou IL-8, Fator de crescimento endotelial, Angiopoetina-2, BMP-9, OPN, OPG, VEGF-C e FGF-1 que tem os resultados apresentados na Tabela 4 e nas Figura 11 e Figura 12. A presente pesquisa é uma etapa inicial de estudos sobre a viabilidade e utilização do tecido do ligamento periodontal fresco, sendo este um portal para novas investigações de tecidos disponíveis clinicamente como a do próprio ligamento e de outros como a polpa, folículo dentário e papila apical. Esses tecidos, clinicamente, poderão ser utilizados de diversas formas: em associação a osso particulado para preenchimento de “GAP” em região de implante, comumente encontrado em implantes imediatos; defeitos periodontais; alvéolos de extração e talvez uma aplicação de reparo pulpar pós lesão cariosa.

As limitações do material e métodos, como ausência de padronização da quantidade de células indiferenciadas presentes em cada amostra, sendo necessário quantificar no PDL fresco, podendo gerar uma média, visto que existem influências do aparato bucal sobre espessura do PDL e, provavelmente, sobre a quantidade de células presentes nesse tecido. Assim como a idade do indivíduo possivelmente influencie. Sendo assim, diversos fatores são variáveis, inclusive o tamanho/volume da amostra, o curto

tempo de trabalho em que o tecido está viável, o que se torna um complicador para a padronização da quantidade ideal de biomodificador, mas que possivelmente no futuro pode ser feita a adesão de uma balança de precisão e o gotejamento através de uma pipeta, onde uma regra de proporções possa ser estabelecida. Outro fator que influenciou os resultados da pesquisa foi o tempo de exposição ao Emdogain que é diminuto no *ex-vivo* em relação a uma condição orgânica e no modelo *in vitro*, onde é possível transportar alguns mecanismos orgânicos. No ambiente *in vivo*, em vez de ter uma ação de toxicidade, mesmo que essa possa ter ocorrido pelo aumento da osmolaridade, o Emdogain teria ação de proliferação, adesão e expressão de colágeno tipo I (42). Se houvesse um meio de manutenção tecidual, quais os utilizados para dentes avulsionados, possivelmente a viabilidade do PDL seria otimizada, visto a melhoria da nutrição. Todos esses são fatores decisivos no comportamento tecidual. Esses fatores são importantes para futura reprodução científica do modelo e padronização dos requisitos mínimos dentro da possibilidade de regeneração periodontal que o tecido apresenta dentro do modelo de estudos controlados e randomizados.

6. Conclusões

- Conclusões

O Straumann® Emdogain® modulou a resposta tecidual ex-vivo do ligamento periodontal no período de 10 minutos. Mais estudos são necessários, tendo em vista que essa combinação poderá servir como uma proposta terapêutica, visando a aplicação clínica futura de tecidos, comumente descartados após exodontia. A exemplo disso: inclusão do PDL e EMD em área de “GAP” pós implantação ou em defeito periodontal.

7.Referências

- Referências

1. McCulloch C a. Basic considerations in periodontal wound healing to achieve regeneration. *Periodontol 2000*. 1993;1:16–25.
2. Pitaru S, McCulloch CAG, Narayanan SA. Cellular origins and differentiation control mechanisms during periodontal development and wound healing. *J Periodontal Res*. 1994;29:81–94.
3. Melcher a H. On the repair potential of periodontal tissues. *J Periodontol*. 1976;47(5):256–60.
4. Bartold PM, McCulloch CAG, Narayanan AS, Pitaru S. Tissue engineering: a new paradigm for periodontal regeneration based on molecular and cell biology. *Periodontol 2000*. 2000;24:253–69.
5. Dereka XE, Markopoulou CE, Vrotsos IA. Role of growth factors on periodontal repair. *Growth Factors*. 2006;24(4):260–7.
6. Gospodarowicz D, Massoglia S, Cheng J, Fujii DK. Effect of retina-derived basic and acidic fibroblast growth factor and lipoproteins on the proliferation of retina-derived capillary endothelial cells. *Exp Eye Res*. 1986;43(3):459–76.
7. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J [Internet]*. 1999;13(1):9–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9872925>
8. Yanagita M, Kojima Y, Kubota M, Mori K, Yamashita M, Yamada S, et al. Cooperative effects of FGF-2 and VEGF-A in periodontal ligament cells. *J Dent Res [Internet]*. 2014;93(1):89–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24186558>
9. Achen MG, Jeltsch M, Kukk E, Mäkinen T, Vitali a, Wilks a F, et al. Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4). *Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]*. 1998;95(2):548–53. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=18457&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
10. Hammarström L. Enamel matrix, cementum development and regeneration. *J Clin Periodontol*. 1997;24(9 Pt 2):658–68.
11. Lyngstadaas SP, Wohlfahrt JC, Brookes SJ, Paine ML, Snead ML, Reseland JE. Enamel matrix proteins; old molecules for new applications. *Orthodontics and*

- Craniofacial Research. 2009.
12. Bosshardt DD. Biological mediators and periodontal regeneration: A review of enamel matrix proteins at the cellular and molecular levels. *J Clin Periodontol*. 2008;35(SUPPL. 8):87–105.
  13. Viswanathan HL, Berry JE, Foster BL, Gibson CW, Li Y, Kulkarni AB, et al. Amelogenin: a potential regulator of cementum-associated genes. *J Periodontol* [Internet]. 2003;74(10):1423–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14653387>
  14. Schlueter SR, Carnes DL, Cochran DL. In vitro effects of enamel matrix derivative on microvascular cells. *J Periodontol* [Internet]. 2007;78(1):141–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17199551>
  15. Heijl L. Periodontal regeneration with enamel matrix derivative in one human experimental defect. A case report. *J Clin Periodontol*. 1997;
  16. Watanabe K, Kikuchi M, Okumura M, Kadosawa T, Fujinaga T. Efficacy of enamel matrix proteins on apical periodontal regeneration after experimental apicoectomy in dogs. *J Vet Med Sci* [Internet]. 2001;63(8):889–94. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11558545
  17. Galli C, Macaluso GM, Guizzardi S, Vescovini R, Passeri M, Passeri G. Osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand modulation by enamel matrix derivative in human alveolar osteoblasts. *J Periodontol* [Internet]. 2006;77(7):1223–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16805686>
  18. Schwartz Z, Carnes Jr. DL, Pulliam R, Lohmann CH, Sylvia VL, Liu Y, 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. *J Periodontol*. 2000;71(August):1287–96.
  19. Reseland JE, Reppe S, Larsen AL, Berner HS, Reinholt FP, Gautvik KM, et al. The effect of enamel matrix derivative on gene expression in osteoblasts. *Eur J Oral Sci* [Internet]. 2006;114(1):205–11. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1079210401272606>
  20. Venezia TA, Merchant AA, Ramos CA, Whitehouse NL, Young AS, Shaw CA,

- et al. Molecular signatures of proliferation and quiescence in hematopoietic stem cells. *PLoS Biol.* 2004;2(10).
21. Miron RJ, Bosshardt DD, Zhang Y, Buser D, Sculean A. Gene array of primary human osteoblasts exposed to enamel matrix derivative in combination with a natural bone mineral. *Clin Oral Investig.* 2013;
  22. Seo B-M, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahimi J, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* [Internet]. 2004;364(9429):149–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15246727>
  23. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2000;97(25):13625–30. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=17626&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  24. Handa K, Saito M, Tsunoda A, Yamauchi M, Hattori S, Sato S, et al. Progenitor Cells From Dental Follicle Are Able to Form Cementum Matrix In Vivo. *Connect Tissue Res* [Internet]. 2002;43(2-3):406–8. Available from: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1080/03008200290001023>
  25. Egusa DDS H, Sonoyama DDS W, Nishimura DDS M, Atsuta DDS I, Akiyama DDS K. Stem cells in dentistry – Part I: Stem cell sources. *J Prosthodont Res.* 2012;56:151–65.
  26. Karring T, Nyman S, Lindhe J. Healing following implantation of periodontitis affected roots into bone tissue. *J Clin Periodontol.* 1980;7:96–105.
  27. Nyman S, Karring T, Lindhe J, Plantén S. Healing following implantation of periodontitis-affected roots into gingival connective tissue. *J Clin Periodontol.* 1980;7:394–401.
  28. Andreasen JO, Kristerson L. Evaluation of different types of autotransplanted connective tissues as potential periodontal ligament substitutes. An experimental replantation study in monkeys. *Int J Oral Surg* [Internet]. Munksgaard International Publishers Ltd.; 1981;10(3):189–201. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0300-9785\(81\)80053-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0300-9785(81)80053-1)
  29. Schjøtt M, Andreasen JO. Emdogain® does not prevent progressive root resorption after replantation of avulsed teeth: A clinical study. *Dent Traumatol.* 2005;21(1):46–50.

30. Iqbal MK, Bamaas N. Effect of enamel matrix derivative (EMDOGAIN) upon periodontal healing after replantation of permanent incisors in beagle dogs. *Dent Traumatol*. 2001;17(4):36–45.
31. Buser D, Warrer K, Karring T, Stich H. Titanium implants with a true periodontal ligament: an alternative to osseointegrated implants? *Int J Oral Maxillofac Implants* [Internet]. 1990;5(2):113–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2133335>
32. Graziano A, Carinci F, Scolaro S, Aquino RD. Periodontal tissue generation using autologous dental ligament micro-grafts : case report with 6 months follow-up. *Annals Oral Maxillofac Surg*. 2013;1(2):2–5.
33. Pang K-M, Um I-W, Kim Y-K, Woo J-M, Kim S-M, Lee J-H. Autogenous demineralized dentin matrix from extracted tooth for the augmentation of alveolar bone defect: a prospective randomized clinical trial in comparison with anorganic bovine bone. *Clin Oral Implants Res* [Internet]. 2016;1–7. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/clr.12885>
34. Nemoto E, Koshikawa Y, Kanaya S, Tsuchiya M, Tamura M, Somerman MJ, et al. Wnt signaling inhibits cementoblast differentiation and promotes proliferation. *Bone* [Internet]. Elsevier Inc.; 2009;44(5):805–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2008.12.029>
35. Sakoda K, Nakajima Y, Noguchi K. Enamel matrix derivative induces production of vascular endothelial cell growth factor in human gingival fibroblasts. *Eur J Oral Sci*. 2012;120:513–9.
36. Aspriello SD, Zizzi A, Spazzafumo L, Rubini C, Lorenzi T, Marzioni D, et al. Effects of enamel matrix derivative on vascular endothelial growth factor expression and microvessel density in gingival tissues of periodontal pocket: a comparative study. *J Periodontol* [Internet]. 2011;82(4):606–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20843235>
37. Bartold PM, Raben A. Growth factor modulation of fibroblasts in simulated wound healing. 1996. p. 205–2016.
38. Schlueter SR, Jr DLC, Cochran DL. In Vitro Effects of Enamel Matrix Derivative on Microvascular Cells. 2007;(January).
39. Sculean A, Gruber R. Soft tissue wound healing around teeth and dental implants. *J Clin Periodontol*. 2014;41:6–22.
40. Yuan K, Chen C-L, Lin MT. Enamel matrix derivative exhibits angiogenic effect

- in vitro and in a murine model. *J Clin Periodontol* [Internet]. 2003;30(8):732–8. Available from:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11842477
41. Mirastschijski U, Konrad D, Lundberg E, Lyngstadaas SP, Jorgensen LN, Agren MS. Effects of a topical enamel matrix derivative on skin wound healing. *Wound Repair Regen* [Internet]. 1927;12(1):100–8. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14974971>
  42. 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* [Internet]. 2004;75(4):498–504. Available from:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15152811
  43. Saito Y, Watanabe E, Mayahara K, Watanabe N, Morokuma M, Isokawa K, et al. CD146/MCAM Surface Marker for Identifying Human Periodontal Ligament-derived Mesenchymal Stem Cells. *Orig J Hard Tissue Biol*. 2013;22(1):115–28.

Apêndice

Apêndice A – Artigo submetido ao Journal of Periodontology

Evaluation of the fresh periodontal ligament tissue viability under the influence of enamel matrix proteins and their angiogenic potential.

Carla de Oliveira Pires da Silva (M.Sc. in Periodontology)*, Milena Suemi Irie (M.Sc. in Periodontology)*, Myrella Lessio Castro (Ph.D., Post-Doctoral student in Oral Biology)*, Fernanda Schimidt de Freitas (Undergraduate student) †, Marcio Fernando de Moraes Grisi (Ph.D. and Associate Professor)*, Arthur Belem Novaes Junior* (Ph.D. and Titular Professor)*, Sérgio Luís Scombatti de Souza (Ph.D. and Associate Professor)*, Michel Reis Messoria (Ph.D. and Associate Professor)*, Daniela Bazan Palioto (Ph.D. and Associate Professor)*, Mario Taba Jr. (Ph.D. and Associate Professor)*

* Department of Oral and Maxillofacial Surgery and Periodontology, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil.

† School of Dentistry at Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil.

Mario Taba Junior

Department of Oral and Maxillofacial Surgery and Periodontology

Avenida do Café, s/nº - CEP 14040-904 – Ribeirão Preto – SP – Brazil

Phone: +55 16 3315 4128 – Fax: +55 16 3315 4788

email: mtaba@usp.br

3288 words and 2 figures and 37 references in the manuscript;

Fresh PDL and EMD

Enamel matrix proteins modulated the tissue response of the ex-vivo periodontal ligament in the 10-minute period

Abstract

Periodontitis is a chronic multifactorial inflammatory disease, highly prevalent in general population, which affects the supporting tissues of the teeth and causes sequelae that are difficult to treat even with the most modern regenerative techniques. The tissue therapy seems to be a promising alternative and the undifferentiated cells of the periodontal ligament (PDL) have shown great therapeutic potential. However, PDL needs appropriate stimuli from bio modifiers so that the differentiation can occur in a coordinated fashion. The enamel matrix proteins (EMD) are a type of bio modifier that promote new cementum formation. Despite being used clinically, its association with PDL fresh cells has not been explored yet. This is a study of the PDL gene and protein expression for the purpose of reusing the newly extracted tissue stimulated by EMD, with a view to periodontal regeneration. The results of the gene expression show VEGF ($p = 0.5194$) with a difference between medians -0.201 and FGF-2 ($p = 0.0059$) difference between medians of -0.4167. In the study of cytokines, VEGF-A ($p < 0.0001$) with the difference between medians of 60.93, whereas VEGF-D ($p = 0.0049$) with difference of 2.45 between medians. From the results of the FGF-2-based gene expression and protein-based VEGF-A, it was observed that the EMD have modulated the ex-vivo tissue response in the 10-minute period, bearing in mind the standard angiogenic. This combination may serve as a therapeutic approach aimed at future clinical application of tissues commonly discarded after extraction, such as the PDL.

Keywords: Periodontal regeneration, Tissue engineering, Gene expression, Cytokines.

Introduction

The complexity of the periodontal regeneration is in the orderly reconstruction of the four tissues by which it is formed: bone, periodontal ligament (PDL), cementum and gums (1). This process depends on several stages, without which it would remain incomplete. The regeneration depends on specific cells. Thus, fibroblasts for the formation of the PDL, cementoblasts for the cementum, osteoblasts for bone tissue and endothelial cells to promote angiogenesis (2). The participation of exotic cells, such as

those of the oral epithelium, impede the process, generating what is called long junctional epithelium (3). The selection of cells to be recruited for regeneration, that will be removed, happen through the periodontal microenvironment, which is formed by the cementum matrix and the cementum dentine junction. The substances present in this environment are able to affect cell migration, adhesion, proliferation and differentiation, such as growth factors, adhesion molecules and structural proteins. (4).

Some of these substances will be addressed briefly in this study, starting with the angiogenic action that they can cause in the tissue. FGFs are related to angiogenesis, migration, and healing. FGF-2 is a basic factor (5). However, it has a great power of angiogenesis induction (6). The vascular endothelial growth factors (VEGF) are another issue. Studies have revealed that the expression of VEGF induces the proliferation of endothelial cells, angiogenesis, cell migration and inhibit programmed cell death. In vivo, it induces angiogenesis and the permeabilization of blood vessels (7). VEGF-A is the predominant form of VEGF. Its function is to induce angiogenesis. It is a mediator of vascular permeability and it promotes inflammation (8). Not all the mechanisms of VEGF-D have been clarified. VEGF-D is involved with the growth and differentiation of the lymphatic epithelium (10).

The fact that substances interfere in the local microenvironment and can influence the periodontium has been known for 20 years and enamel matrix proteins (EMD) have entered the market with the proposal to promote periodontal regeneration (21). Its mechanism is still not well known, due to the action of mimetic amelogenins, which are removed from the enamel portion of pig teeth (21). The amelogenin is a family of hydrophobic proteins, responsible for over 95% of the total content of the proteins that make up the EMD (22). These proteins have a significant influence on the cell adhesion and proliferation. They help in the cell differentiation, mediating cell adhesion, spread, proliferation and survival, as well as the expression of transcription factors, growth factors, extracellular matrix components and of other molecules involved in the regulation of bone remodeling (23). The amelogenin is known as a signaling molecule (24). However, there is a second theory that regards the amelogenin as a structural protein, which leads to other factors, such as the secreted by cell (24). Corroborating to this theory, there was a study whose result showed that the EMD stimulated healing through the flux of nutrients and oxygen (25). The mechanism of EMD that influences clinical regeneration is the result of mimetic action by contact with the surface of the dentin, forming cementum, as demonstrated by the study in monkeys (21) and in humans (26).

In addition to periodontal regeneration, the application of EMD contributed to cementum formation in 80% of the apicectomy experiments in dogs (27). The studies in vitro showed that the EMD may enhance the proliferation and differentiation of osteoblastic cell lines (28) (29), may increase the Alkaline phosphatase activity, as well as osteocalcin expression in the primary osteoblast cell culture medium (30) (30). Furthermore, its application can influence angiogenesis and associated inflammatory events associated with healing, favoring the bone tissue repair (31). Therefore, this bio modifier is used to promote periodontal regeneration as it induces the formation of cementum, PDL and the alveolar bone, fact evidenced clinically by probing depth reduction, insertion gain and radiographic evidence of bone fill (32) (22).

Since the early 2000s, undifferentiated cells have been reported in oral tissues (33) (34) (35). A population of progenitor cells promotes the limited periodontal regeneration, as observed in the early stages of the periodontal disease. In addition, it has been postulated that mesenchymal cells are recruited and activated after damage to the periodontium where they undergo terminal differentiation to form PDL cells or cementum. Both act to protect the connections between the cement and the adjacent alveolar bone (36).

Nevertheless, for the periodontal regeneration, bone tissue cells do not have this ability, causing ankylosis and resorption (37). Only oral tissues have physiology for periodontal regeneration (38) (39). When in direct contact with reimplanted teeth, PDL promotes mineralized tissue formation, cementum-like, greater coverage of soft tissue, similar to the PDL, showing lower ankylosis rates and reduced resorption rates compared to the control. Studies with avulsed teeth associated the use of EMD and observed a decrease in the ankylosis rate (40), and rates of normal PDL around the teeth when the usual times of 60 and 30 minutes were reduced to 15 minutes (41).

Another proof was ascertained through this study, in which dental implants were placed in contact with dental remains, and there was a formation of cementum and periodontal ligament. The authors concluded that the population responsible for the cementum formation originates from the periodontal ligament, which has a high proliferation rate and good adhesion to surfaces (42).

In 2013, the newly extracted PDL was tested in combination with collagen sponge. In this case, the clinical and radiographic gain between the control that received only the collagen sponge and the test that associated it with the PDL was published (43).

The purpose of this study was to simplify, but not replace, the laboratory stages of the use of grafting tissues. Extracted teeth are usually discarded, and there is a waste of tissues such as the pulp, periodontal ligament, mineralized tissues of the cementum, dentin and enamel, which are currently being tested (44). The richness of such tissues and the possibility of usage can, not only be wide in terms of research, but also extend to dental clinic reality, in which laboratories are not easily accessible and the most innovative technologies are not always affordable. The objective of the study, therefore, was to evaluate the newly extracted periodontal tissue under the effect of EMD, observing markers of the periodontal microenvironment that influence in angiogenesis, aiming at the periodontal tissue regeneration.

-Proposition

The purpose of this study is to evaluate the bio modifier effect of the EMD, evaluating the following assumptions:

1. Does the stimulation caused by the bio modifier on the periodontal ligament alter the expression of genes and proteins related to the regeneration process?
- 2 Which genes related to osteogenesis, angiogenesis and apoptosis do cells of the newly extracted PDL express?
- 3 Which proteins related to osteogenesis and angiogenesis do cells of the newly extracted PDL express?
- 4- What changes occur in the tissues that are exposed and stored along with the bio modifier?

-Materials and methods

The samples were obtained from teeth from 37 patients whose ages range from 18 to 35 years old, of both genders, volunteers in a healthy state (at least two teeth of each patient), the collected teeth were not from a particular dental group, but they were healthy and in function. The teeth were collected in the surgery clinics at the School of Dentistry of Ribeirão Preto, in the Oral and Maxillofacial Surgery Improvement Course of the “Associação Paulista de Cirurgiões-Dentistas de Ribeirão Preto” (Dentists Association of São Paulo in Ribeirão Preto) and the “Centro de Especialidades

Odontológicas da Unidade Básica de Saúde "Drº João Baptista Quartin" – Central do Município de Ribeirão Preto" (Dental Specialties Center of the Basic Health Unit of the Ribeirão Preto municipality.) Each tooth was donated to the Teeth Biobank of the School of Dentistry of Ribeirão Preto through an Informed Consent Form (Table 1), according to prior approval by the Ethics in Research Committee of the School of Dentistry of Ribeirão Preto by means of the Certificate of Presentation for Ethical Consideration (CAAE nº 27944214.0.0000.5419). Subsequently these dental elements were donated to the researchers. From these teeth, freshly extracted, the PDL was collected from the middle third of the root by scraping with a scalpel blade, as previously mentioned.

Groups

There are two analysis groups, one formed by gene analysis (PCR) and one formed by protein analysis, both evaluate the PDL. Each sample that forms each group consists of tissue pool removed from 2 teeth from the same patient. The samples were divided into:

Obtaining PDL samples

Control

Samples of the control group were collected and transferred to cryogenic vials immediately after extraction, they were kept for 10 minutes at room temperature and later cryopreserved in dry ice, until their transfer to the freezer at -80° C (figure 1).

Test

Samples of the test group were collected immediately after extraction, they were maintained for 10 minutes at room temperature under the effect of EMD, which was placed next to the tissue in a 1: 1 visual ratio in the Eppendorf tube or cryovial. After the waiting time, the samples were cryopreserved in dry ice. The dry ice was purchased in accordance with the estimated time of hours required for storage until they were transferred to a -80 ° C freezer (Figure 1).

RNA extraction protocol

RNA Promega Kit:

The extraction of RNA from the PDL samples was performed using the Trizol reagent (Trizol® Reagent, Invitrogen, Milan, Italy). Each PDL tissue fragment was

trituated with Tissue Tearor homogenizer (model 985 370, Biospec PRODUCTS, INC, Oklahoma, USA) in a cryovial with Trizol reagent (1 mL / mg tissue). 250 uL of chloroform were added (Sigma, St. Louis, MO, USA), the solution was stirred for 30 seconds and held for 5 minutes at 4 ° C. Then the samples were centrifuged at 10,500 rpm for 15 minutes at 4 ° C. After centrifugation, three layers were observed in the solution, the colorless aqueous phase containing the RNA was transferred to another tube, together with 250 uL 95% ethanol and homogenized. The sample was added to the kit filter (SV Total RNA Isolation System - Promega, Madison, WI, USA) and centrifuged at 10,500 RPM for 1 minute at 4 ° C. After the filter washing process with washing buffer for RNA, adding DNase and subsequently DNase Stop Solution, two elutions were made for each sample with 25 l of water RNA / DNase free.

Quantification and RNA Integrity

Using the device NanoVue™ Plus Spectrophotometer, GE, a sample smaller than 5 uL is placed in the reader, subsequently the result of the quantitative analysis is issued through printed statement. The reading is carried out in 260 nm, 280 nm and 230 nm wavelength to obtain the RNA concentration / uL and contamination by proteins and phenol, respectively. The minimum concentration considered viable for further analysis is 100 ng / l. The integrity of the ribosomal RNA will be assessed by means of the apparatus 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA) according to the manufacturer's instructions. The samples will be considered viable for the execution of real-time PCR if they exhibit RIN values (RNA Integrity Number) greater than 5.

cDNA Synthesis

From 1g of total RNA, a complementary DNA strand (cDNA) was confectioned by means of a reverse transcription reaction, based on the protocol proposed by the manufacturer. At the end of this reaction, the cDNA was stored at -20 ° C until the moment of its use.

Constitutive genes

After the amplification of PDL samples, calculations for this analysis were carried out in relation to the constitutive gene GAPDH.

Target Genes

The gene expression analysis was performed using the qPCR-RT to detect gene expression, VEGF and FGF2.

RT-qPCR Plating:

The qPCR-RT experiment was performed in quadruplicate technique with six biological replicates. Each plate had its constitutive as an internal control. To analyze the PDL 10 target genes of the samples, a total of 10 96-well plates were used (MicroAmp® Fast 96-Well Reaction Plate (0.1ml), Applied Biosystems Life Technologies). In each well of the plate, the following measures were used: 5 uL of Mix (TaqMan Fast Advanced Master Mix, Applied Biosystems), 0.5 uL primer (TaqMan, Applied Biosystems) for the estimated gene (VEGF and FGF2), 2.25 uL cDNA synthesis reaction for each sample and 2.25 uL of deionized water. Then the reaction was performed in a thermal cycler in real time (StepOne Plus™ Real-Time PCR System, Applied Biosystems Life).

Protein Extraction Protocol

Samples were ground and homogenized in 300µl of phosphate buffered saline (PBS) and 2 uL protease inhibitor. The samples were centrifuged 1000rpm for 15 minutes at 4 ° C. The supernatant was removed and stored until the moment of use.

Protein Expression

For quantification of cytokines (VEGF-D, VEGF-A), commercially available kits were used (HAGP1MAG-12K HUMAN ANGIOGENESIS, Headquarters EMD Millipore, Billerica, MA, USA) in a MAGPIX® analyzer (Luminex Corporation, Austin, TX, USA). The assay was performed in a 96 well plate following the manufacturer's instructions. Plates were then analyzed by MAGPIX®, in order to obtain the mean fluorescence intensity. Samples below the detection limit were recorded as zero. All samples were analyzed individually and cytokine levels were estimated from a quantic polynomial curve using the xPONENT® software (Luminex Corporation, Austin, TX, USA).

Statistical analysis

Gene expression:

Normalization and relative quantification of gene expression were performed by 2-ΔΔCT method (Livak; Schmittgen, 2001). Thus, the data are represented as the

difference in gene expression (fold regulation) on GAPDH for PDL, which was normalized by the geometric mean of the controls. Statistical analysis was performed with the threshold cycle values (Ct) and the D'Agostino & Pearson normality test was carried out, if approved in the normality test, the data would pass by the Student T test (parametric). If the data did not pass the normality test, it would go through the Mann-Whitney test (nonparametric). For all tests, we adopted a significance level of 5% ($p < 0.05$).

Protein Expression:

Data were expressed as pg / ml of each protein assessed. Statistical analysis was performed with the values (pg / mL) and the D'Agostino & Pearson normality test was conducted, if approved in the normality test, the data would pass by the Student T test (parametric). If the data did not pass the normality test, it would go through the Mann-Whitney test (nonparametric). For all tests, we adopted a significance level of 5% ($p < 0.05$). The post hoc power test was performed between two independent averages of two groups, the VEGF-A primary variable in 3192 L * Power program.

Results

Comparisons between samples of the test group and the control group present data from molecular parameters based on RNA expression and cytokines, Figure 2, image D shows the VEGF gene expression relative to GAPDH less significant in the test group, with no statistically significant values. Figure 2, image E shows FGF-2 in relation to GAPDH, with statistically significant values, and the test group was less significant. Figure 2, image F shows the Box-Whisker plot demonstrating the correlation between the stimulation with the Straumann Emdogain® in the test group and the absence of stimuli in the control group, evidenced by the highly increase of the expression of VEGF-A cytokine. From the same superfamily, but with a less exaggerated expression, the graph of Figure 2, image G shows that VEGF-D, similarly, increased in the test group, with a statistically significant difference.

The control group had a 33% loss of the samples on the RNA extraction processing. In the test group, the loss percentage rose to 57%, the loss number in the test group was, therefore, 1.73 higher than the one in the control group.

The power of the sample test (Current Power of VEGF-A = 0.9734024, G * Power3.1.9.2) shows that sample N may have had no material effect and the samples that showed "no significant difference" might have suffered a failure of the experimental model or a processing failure.

-Discussion

This work was based on the principle of use of the dental material commonly discarded in tooth extractions, and according to this study, the material can be used right after the extraction as an autograft. The benefits of its use include biocompatibility, grafts with cost reduction and the convenience of being a viable tissue and easily accessible. The viability tests were permeated by the time curve pilots and the amount of tissue necessary to the molecularly assessment of the expressions of RNA and protein, demonstrating that the tissue of the PDL is viable and, to the molecular studies, it shows a change of expression against the 10 stimulus minutes under the effect of emdogain®. In this study, therefore, we highlight the angiogenic effect started by gene expression markers VEGF and FGF-2 and VEGF-A and VEGF-D cytokines.

Concerning the genes, we highlight the effect of Straumann Emdogain® through VEGF expression in the test group that showed relative depression in the control, which was not statistically significant. While FGF-2 with statistically significant data showed a greater distance between groups, with the lower expression for the test group. These findings connect the literature that discusses the interference the EMD cause over time and the amount used (34) (14), being able to play the part of paper cytotoxic or cytostatic agent (35).

This study was able to demonstrate increased expression in the test group, by evaluating the expression of VEGF-A front cytokine to stimulate Straumann Emdogain® for 10 minutes. In the same conditions, it was able to show a slight increase of expression in the test group by evaluating the expression of VEGF-D cytokine. Both with statistically significant results. These results are in agreement with the literature and this activation could be associated with activation pathways such as TGF-β1 and FGF-2 (34). The application of EMD in periodontal defects and increased VEGF expression may help in the acceleration of the new vessel formation and improve the quality of the marginal tissue (35). Moreover, EMD, when associated with surgical procedures, may be one of

the causes of acceleration of healing (36), this benefit may be related to improved tissue granulation caused by EMD and acceleration of wound closure (37).

Different forms of VEGF such as VEGF-A and VEGF-D performing different functions and the action have not been unraveled yet. Given that the change in expression occurred in a short time period, the ratio between EMD and VEGF can be seen with some mutuality since the EMD stimulation increases VEGF expression, which is important for the penetration of vessels through increased permeability, this enables the acceleration of wound healing process by increasing the flow of nutrients and oxygen (14).

This research is an early stage of the studies on the feasibility and use of fresh periodontal ligament tissue, which is a portal to new clinically available tissue investigations as the ligament itself and others like pulp, dental follicle and apical papilla. The limitations of the materials and methods, such as the lack of standardization of the number of stem cells present in each tissue, amount of tissue (weight - ng), the definition of the amount of ideal biomodificator to amount of tissue, limited time of exposure to Emdogain®, absence of maintenance medium (as environmental interference in ex vivo tissue without maintenance or nutrition, is also one of the determining factors), are decisive factors in tissue behavior. These factors are important for future scientific reproduction of the model and standardization of minimum requirements within the periodontal regeneration possibility that the tissue presents within the controlled and randomized design. Perhaps, to transpose into everyday clinical reality, we return to the initial phase we are in, where standardization and minimum requirements are no longer possible because the used tissue will be the available tissue. For now, the recommendation is that the standardization and the establishment of a protocol should maintain the most stable results and, therefore, optimize the visualization of the results.

-Conclusions

Straumann® Emdogain® modulated tissue ex vivo response in 10 minutes of the periodontal ligament. More studies are needed, given that this combination can serve as a therapeutic approach aimed at future clinical application of tissues, commonly discarded after tooth extraction. As an example: inclusion of the PDL and EMD in the area of "GAP" post implantation or periodontal defect.

-Acknowledgment

The authors thank Mrs. Milla Sprone Tavares Ricoldi (Lab Staff of the Department of Oral Maxillofacial Surgery and Periodontology, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, São Paulo, Brazil) for lab supporting. Ph.D. Jorge Luiz Jacob Liporaci Jr (Coordinator of the Oral and Maxillofacial Surgery Improvement Course of the “Associação Paulista de Cirurgiões-Dentistas”, in Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil) for the partnership in teeth donation. São Paulo Research Foundation (FAPESP), São Paulo, Brazil, supported this study. The authors have no commercial relationships to declare and report no conflicts of interest related to this study.

-References

1. McCulloch C a. Basic considerations in periodontal wound healing to achieve regeneration. *Periodontol* 2000. 1993;1:16–25.
2. Pitaru S, McCulloch CAG, Narayanan SA. Cellular origins and differentiation control mechanisms during periodontal development and wound healing. *J Periodontal Res*. 1994;29:81–94.
3. Melcher a H. On the repair potential of periodontal tissues. *J Periodontol*. 1976;47(5):256–60.
4. Bartold PM, McCulloch CAG, Narayanan AS, Pitaru S. Tissue engineering: a new paradigm for periodontal regeneration based on molecular and cell biology. *Periodontol* 2000. 2000;24:253–69.
5. Dereka XE, Markopoulou CE, Vrotsos IA. Role of growth factors on periodontal repair. *Growth Factors*. 2006;24(4):260–7.
6. Gospodarowicz D, Massoglia S, Cheng J, Fujii DK. Effect of retina-derived basic and acidic fibroblast growth factor and lipoproteins on the proliferation of retina-derived capillary endothelial cells. *Exp Eye Res*. 1986;43(3):459–76.
7. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* [Internet]. 1999;13(1):9–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9872925>
8. Yanagita M, Kojima Y, Kubota M, Mori K, Yamashita M, Yamada S, et al. Cooperative effects of FGF-2 and VEGF-A in periodontal ligament cells. *J Dent Res* [Internet]. 2014;93(1):89–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24186558>

9. Achen MG, Jeltsch M, Kukk E, Mäkinen T, Vitali a, Wilks a F, et al. Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4). *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1998;95(2):548–53. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=18457&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
10. Hammarström L. Enamel matrix, cementum development and regeneration. *J Clin Periodontol*. 1997;24(9 Pt 2):658–68.
11. Lyngstadaas SP, Wohlfahrt JC, Brookes SJ, Paine ML, Snead ML, Reseland JE. Enamel matrix proteins; old molecules for new applications. *Orthodontics and Craniofacial Research*. 2009.
12. Bosshardt DD. Biological mediators and periodontal regeneration: A review of enamel matrix proteins at the cellular and molecular levels. *J Clin Periodontol*. 2008;35(SUPPL. 8):87–105.
13. Viswanathan HL, Berry JE, Foster BL, Gibson CW, Li Y, Kulkarni AB, et al. Amelogenin: a potential regulator of cementum-associated genes. *J Periodontol* [Internet]. 2003;74(10):1423–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14653387>
14. Schlueter SR, Carnes DL, Cochran DL. In vitro effects of enamel matrix derivative on microvascular cells. *J Periodontol* [Internet]. 2007;78(1):141–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17199551>
15. Heijl L. Periodontal regeneration with enamel matrix derivative in one human experimental defect. A case report. *J Clin Periodontol*. 1997;
16. Watanabe K, Kikuchi M, Okumura M, Kadosawa T, Fujinaga T. Efficacy of enamel matrix proteins on apical periodontal regeneration after experimental apicoectomy in dogs. *J Vet Med Sci* [Internet]. 2001;63(8):889–94. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11558545
17. Galli C, Macaluso GM, Guizzardi S, Vescovini R, Passeri M, Passeri G. Osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand modulation by enamel matrix derivative in human alveolar osteoblasts. *J Periodontol* [Internet]. 2006;77(7):1223–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16805686>
18. Schwartz Z, Carnes Jr. DL, Pulliam R, Lohmann CH, Sylvia VL, Liu Y, 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. J Periodontol. 2000;71(August):1287–96.

19. Reseland JE, Reppe S, Larsen AL, Berner HS, Reinholt FP, Gautvik KM, et al. The effect of enamel matrix derivative on gene expression in osteoblasts. Eur J Oral Sci [Internet]. 2006;114(1):205–11. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1079210401272606>

20. Venezia TA, Merchant AA, Ramos CA, Whitehouse NL, Young AS, Shaw CA, et al. Molecular signatures of proliferation and quiescence in hematopoietic stem cells. PLoS Biol. 2004;2(10).

21. Miron RJ, Bosshardt DD, Zhang Y, Buser D, Sculean A. Gene array of primary human osteoblasts exposed to enamel matrix derivative in combination with a natural bone mineral. Clin Oral Investig. 2013;

22. Seo B-M, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahimi J, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. Lancet [Internet]. 2004;364(9429):149–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15246727>

23. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 2000;97(25):13625–30. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=17626&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

24. Handa K, Saito M, Tsunoda A, Yamauchi M, Hattori S, Sato S, et al. Progenitor Cells From Dental Follicle Are Able to Form Cementum Matrix In Vivo. Connect Tissue Res [Internet]. 2002;43(2-3):406–8. Available from: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1080/03008200290001023>

25. Egusa DDS H, Sonoyama DDS W, Nishimura DDS M, Atsuta DDS I, Akiyama DDS K. Stem cells in dentistry – Part I: Stem cell sources. J Prosthodont Res. 2012;56:151–65.

26. Karring T, Nyman S, Lindhe J. Healing following implantation of periodontitis affected roots into bone tissue. J Clin Periodontol. 1980;7:96–105.

27. Nyman S, Karring T, Lindhe J, Plantén S. Healing following implantation of periodontitis-affected roots into gingival connective tissue. J Clin Periodontol. 1980;7:394–401.

28. Andreasen JO, Kristerson L. Evaluation of different types of autotransplanted connective tissues as potential periodontal ligament substitutes. An experimental replantation study in monkeys. *Int J Oral Surg* [Internet]. Munksgaard International Publishers Ltd.; 1981;10(3):189–201. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0300-9785\(81\)80053-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0300-9785(81)80053-1)
29. Schjøtt M, Andreasen JO. Emdogain® does not prevent progressive root resorption after replantation of avulsed teeth: A clinical study. *Dent Traumatol*. 2005;21(1):46–50.
30. Iqbal MK, Bamaas N. Effect of enamel matrix derivative (EMDOGAIN) upon periodontal healing after replantation of permanent incisors in beagle dogs. *Dent Traumatol*. 2001;17(4):36–45.
31. Buser D, Warrer K, Karring T, Stich H. Titanium implants with a true periodontal ligament: an alternative to osseointegrated implants? *Int J Oral Maxillofac Implants* [Internet]. 1990;5(2):113–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2133335>
32. Graziano A, Carinci F, Scolaro S, Aquino RD. Periodontal tissue generation using autologous dental ligament micro-grafts : case report with 6 months follow-up. *Annals Oral Maxillofac Surg*. 2013;1(2):2–5.
33. Pang K-M, Um I-W, Kim Y-K, Woo J-M, Kim S-M, Lee J-H. Autogenous demineralized dentin matrix from extracted tooth for the augmentation of alveolar bone defect: a prospective randomized clinical trial in comparison with anorganic bovine bone. *Clin Oral Implants Res* [Internet]. 2016;1–7. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/clr.12885>
34. Sakoda K, Nakajima Y, Noguchi K. Enamel matrix derivative induces production of vascular endothelial cell growth factor in human gingival fibroblasts. *Eur J Oral Sci*. 2012;120:513–9.
35. Aspriello SD, Zizzi A, Spazzafumo L, Rubini C, Lorenzi T, Marzioni D, et al. Effects of enamel matrix derivative on vascular endothelial growth factor expression and microvessel density in gingival tissues of periodontal pocket: a comparative study. *J Periodontol* [Internet]. 2011;82(4):606–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20843235>
36. Yuan K, Chen C-L, Lin MT. Enamel matrix derivative exhibits angiogenic effect in vitro and in a murine model. *J Clin Periodontol* [Internet]. 2003;30(8):732–8. Available from:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11842477

37. Mirastschijski U, Konrad D, Lundberg E, Lyngstadaas SP, Jorgensen LN, Agren MS. Effects of a topical enamel matrix derivative on skin wound healing. *Wound Repair Regen* [Internet]. 1997;12(1):100–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14974971>

-Figure Legends

Figure 1: Collection method of the periodontal ligament, the dental element is retained by the crown, and with the blade at 90° to the root, a longitudinal movement of scraping by the the middle third root must be performed. This movement must be repeated until the collection of LP is completed. (A) 90° angulation of the scalpel blade to the root surface. (B) After the repeated movement of scraping performed along the axis of the middle portion of the root, accumulation of PDL occurs in the scalpel blade. (C) The accumulated PDL in the blade is then transferred to an Eppendorf tube, the lid is closed and after 10 minutes (using a chronometer), the tube is stored in dry ice until the moment of transferring it to a -80 ° C Freezer. . (D) Samples of the test group receive the addition of Straumann Emdogain® a 1: 1 ratio, the lid is closed, the time of 10 minutes is marked

on timer. When the time is over, the solution is kept in the dry ice storage until the time of being transferred to the freezer at -80°C

Figure 2: (E) and (F) are Box-Whisker plots based on the RT-qPCR experiment, according to the data generated by GraphPad Prism program 7:00, which depict the relative expression (VEGF / GAPDH), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) (E), that is, to the normal Mann-Whitney test, $p = 0.5194$ and difference between medians of -0.201, with higher expression in the control group, (F) the relative expression (FGF-2 / GAPDH) Fibroblast Growth Factor-2; and to the Mann-Whitney normality test, $p = 0.0059$ and difference between medians of -0.4167, with higher expression in the control group. (G) and (H) are Box-Whisker plots based on the experiment MILLIPLEX®

Multiplex Assays Using Luminex by means of the HAGP1MAG-12K HUMAN ANGIOGENESIS Kit. (G) the relative expression (pg / ml) of Vascular Endothelial Growth Factor-A (VEGF-A) and to the Mann-Whitney normality test, $p < 0.0001$ and the difference between median 60.93, with higher expression for the test group. (H) the expression of Vascular Endothelial Growth Factor-D (VEGF-D) to the Mann-Whitney normality test, $p\text{-value} = 0.0049$ and the difference between medians of 2.45, with higher expression to the test group. All experiments were from the newly extracted periodontal ligament, having been bio modified (TEST) or not (CTRL) by Straumann Emdogain® within the 10-minute period. The lower edges represent 25%, while the top edges represent 75%.

Anexo

Anexo A – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO
PRETO/ FORP/ USP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise de células frescas do ligamento periodontal e polpa dentária e o efeito de biomodificadores visando à regeneração dos tecidos periodontais

Pesquisador: Mario Taba Jr

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 6

CAAE: 27944214.0.0000.5419

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.086.227

Data da Relatoria: 27/05/2015

Apresentação do Projeto:

Relatório parcial, com alteração de metodologia e com pedido de prorrogação de prazo.

Objetivo da Pesquisa:

Apresentação de relatório parcial

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não se aplica

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O pesquisador responsável solicita o aumento de 42 participantes na pesquisa. O n inicialmente proposto era de 32 participantes com coleta de 2 dentes de cada participante (64 dentes ao todo). A nova situação compreenderá 74 participantes, com 18 anos a 35 anos, de ambos os gêneros, saudáveis (serão coletados 2 dentes de cada participantes – 148 dentes ao todo). Foi justificado que o aumento no n ocorreu porque foi observado que será necessário pool de 4 dentes para obtenção de RNA suficiente para as análises.

Mediante atraso na aprovação do auxílio à Pesquisa pela agência de fomento, o pesquisador solicita prorrogação de prazo, passando a data prevista para entrega do relatório final para

Endereço: Avenida do Café s/nº

Bairro: Monte Alegre

CEP: 14.040-904

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3315-0493

Fax: (16)3315-4102

E-mail: cep@forp.usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO
PRETO/ FORP/ USP

Continuação do Parecer: 1.086.227

05/2016.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O cronograma foi alterado.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O pesquisador responsável solicita e justifica alteração de metodologia e prorrogação de 3 meses. Não há pendências.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Conforme deliberado na 180ª Reunião Ordinária do CEP, realizada em 27/05/2015.

RIBEIRAO PRETO, 29 de Maio de 2015

Assinado por:

**Simone Cecilio Hallak Regalo
(Coordenador)**

Endereço: Avenida do Café s/nº

Bairro: Monte Alegre

CEP: 14.040-904

UF: SP

Município: RIBEIRAO PRETO

Telefone: (16)3315-0493

Fax: (16)3315-4102

E-mail: cep@forp.usp.br

Anexo B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
BIOBANCO DE DENTES HUMANOS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O Biobanco de Dentes Humanos da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, convida você _____, natural de _____, nascido em ____/____/____, sexo _____ residente à _____, telefone (____) _____ portador(a) do RG _____, a consentir (concordar) que o(s) dente(s) extraído(s) _____, com grau de irrupção _____ por indicação terapêutica
(incluso ou irrompido)

(tratamento) para a melhoria de sua saúde, como documentado em seu prontuário, possa(m) ser coletado(s) e armazenado(s) para ser(em) utilizado(s) pelos alunos desta Faculdade em treinamento(s) pré-clínico(s) e/ou pesquisa(s). O(s) dente(s) será(ão) armazenado(s) individualmente e identificado(s) por códigos, garantindo o seu anonimato. Não sendo de sua vontade concordar com a coleta do(s) dente(s) extraído(s), você não sofrerá nenhum prejuízo ou penalidade. A utilização deste(s) dente(s) em pesquisa(s) deverá ser previamente aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto-USP, sendo sua identidade preservada na divulgação.

Solicito que manifeste o seu desejo quanto às seguintes alternativas:

- ( ) I- Necessidade de novo consentimento a cada pesquisa
- ( ) II- Dispensa de novo consentimento a cada pesquisa

A utilização do(s) dente(s) armazenado(s) será para aprimoramento de técnicas (tipos de tratamentos) e materiais empregados nas diversas áreas da Odontologia. Para conhecimento dos resultados obtidos com a utilização do(s) dente(s) armazenado(s), você poderá entrar em contato com o Biobanco de Dentes Humanos da FORP-USP, localizado à Avenida do Café s/n, bairro Monte Alegre, CEP 14040-904, Ribeirão Preto - SP, telefone (16) 36020274, atendimento de segunda à sexta-feira, das 8h às 12h e das 13h às 17h. Em casos onde houver implicações com os participantes da pesquisa, o Biobanco juntamente com o Comitê de Ética alertarão ao responsável pela pesquisa da necessidade de informar aos participantes da pesquisa a respeito

dos resultados obtidos. Os dados fornecidos, coletados e obtidos a partir de pesquisa(s) poderão ser utilizados em pesquisas futuras. A retirada do consentimento de utilização do(s) dente(s) poderá ser realizada por escrito, a qualquer momento, desde que não tenha ocorrido sua destruição, sem prejuízo(s) ou penalidade(s) em caso de sua desistência. O prazo de armazenamento do(s) dente(s) é indeterminado. Caso ocorra transferência do(s) dente(s) armazenado(s) entre Biobancos, sempre que possível, você será comunicado.

O Comitê de Ética em Pesquisa é um órgão institucional, com o objetivo de avaliar e acompanhar os aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos, a fim de garantir a dignidade, os direitos, a segurança e o bem-estar do(s) participante(s) da(s) pesquisa(s), localizado à Avenida do Café s/n, bairro Monte Alegre, CEP 14040-904, Ribeirão Preto - SP, telefone (16) 36020251, atendimento de segunda à sexta-feira, das 8h às 12h e das 13h30min às 17h30min, endereço eletrônico cep@forp.usp.br

Obrigado por ler e/ou ouvir estas informações. Se quiser consentir (concordar) que o(s) dente(s) extraído(s) possa(m) ser empregado(s) em pesquisa(s), assine este Termo de Consentimento e, no caso de menores, também o Termo de Assentimento e devolva-o(s) ao Biobanco de Dentes Humanos.

Este Termo deverá ser assinado em **duas vias idênticas**, sendo uma retida pelo participante da pesquisa ou por seu representante legal e uma arquivada no Biobanco.

Nome do consentidor ou responsável: _____
Assinatura _____ Data: _____

Nome da criança/adolescente : _____
Assinatura _____ Data: _____

Nome da pessoa que obteve o consentimento: _____
Assinatura _____ Data: _____

Nome do Supervisor do Biobanco: _____
Assinatura _____

Anexo C - Padronização da metodologia - Protocolos desenvolvidos

- Coleta do Ligamento Periodontal

Para a coleta do LP foram testados protocolos anteriormente descritos na literatura. Estes preconizam o uso de curetas periodontais (28) e lâminas de bisturi (43) e a técnica de remoção do LP deve prever a coleta apenas do tecido presente no terço médio radicular. Isto porque, para além desta região incidem fibras e populações celulares mais pertinentes às regiões gengival e apical (43). Avaliando o fluxo da pesquisa, a lâmina de bisturi se apresentou como o instrumental mais adequado à necessidade, principalmente por ser descartável. Na coleta, o elemento dentário é retido pela coroa e, com a lâmina em 90° com a raiz, deve ser realizado o movimento longitudinal de raspagem pelo terço médio radicular. Esse movimento deve ser repetido até que a coleta do LP seja concluída e, assim, o tecido deve ser armazenado em criotubo ou tubo tipo eppendorf (de acordo com a criopreservação).

-Quantidade de tecido suficiente para análise de RNA

Com a finalidade de avaliar qual a concentração de RNA que o tecidos do PDL *in natura* apresentava e, principalmente, quantos dentes seriam necessários para compor uma amostra que tivesse o material necessário para rodar as análises de PCR, realizamos a quantificação e integridade de RNA. Nessa proposta, fizemos o piloto do PDL em um pool de 6 tecidos, 4, e comparamos com o pool proveniente de 2 elementos dentários. Os resultados foram favoráveis para todas as quantidades, apresentando alta concentração de RNA. E, conscientes que uma amostra composta por tecido de dois dentes seria mais conveniente, essa quantidade foi eleita (**Figura 6**).

Figura 6: Quantidade de tecido suficiente para compor uma amostra para análise de RNA

-Tempo de viabilidade tecidual

Neste piloto foi realizada a curva de tempo de espera para testar a viabilidade do tecidos do ligamento periodontal. Para avaliar, após a extração do elemento dentário, removemos o tecido e aguardamos os tempos de 5, 10 e 20 minutos. O experimento foi realizado em triplicata. O tecido continuou viável em função do tempo, mas teve um discreto declínio na curva do tempo (**Figura 7**), sendo 10 minutos o melhor tempo de viabilidade.

Figura 7: Tempo de viabilidade tecidual do ligamento periodontal em 5, 10 e 20 minutos.

- Método para extração de RNA

Avaliamos dois protocolos com a finalidade de identificar qual manteria maiores concentração e integridade do RNA. Assim testamos a técnica de cadim e pistilo. Como nossos tecidos eram pequenos e víamos que estávamos perdendo amostra na porosidade da cerâmica, testamos a técnica alternativa com o homogeneizador Tissue Tearor (model 985370, BIOSPEC PRODUCTS, INC, Oklahoma, EUA). Com a segunda técnica houve melhores resultados sobre concentração e integridade de RNA, sendo essa nossa eleição.

Anexo D - Figuras

Figura 8: Gráficos Box-Whisker, baseado no experimento de qPCR-RT e a Expressão relativa de Osteopontina(OPN), Osterix (SP7), Fator de Crescimento de Fibroblastos 2(FGF-2), Fator de Crescimento Vascular Endotelial(VEGF), BAX e BCL-2, a partir do ligamento periodontal recém-extraído, sendo biomodificado ou não por Straumann® Emdogain® dentro do período de 10 minutos. Foi

considerado o $P < 0,05$. A linha horizontal ao centro da caixa representa média ou mediana. As bordas inferiores representam 25%, enquanto as superiores 75%. O limite representado pelas linhas junto a haste vertical representa os valores extremos não atípicos.

Figura 9 : Gráficos Box-Whisker, baseado no experimento de qPCR-RT e a Expressão relativa de Osteoprotegerina (OPG), Fosfatase Alcalina (ALP), Sialoproteína Óssea (BSP) e Fator de transcrição relacionado ao Runt 2 (RUNX-2), a partir do ligamento periodontal recém-extraído, sendo biomodificado ou não por Straumann® Emdogain® dentro do período de 10 minutos. Foi considerado o $P < 0,05$. A linha horizontal ao centro da caixa representa média ou mediana. As bordas inferiores representam 25%, enquanto as superiores 75%. O limite representado pelas linhas junto a haste vertical representa os valores extremos não atípicos.

Figura 10: Gráficos Box-Whisker, baseado no experimento de qPCR-RT e a Expressão relativa de BAX e BCL-2, a partir do ligamento periodontal recém-extraído, sendo biomodificado ou não por Straumann® Emdogain® dentro do período de 10 minutos. Foi considerado o $P < 0,05$. A linha horizontal ao centro da caixa representa média ou mediana. As bordas inferiores representam 25%, enquanto as superiores 75%. O limite representado pelas linhas junto a haste vertical representa os valores extremos não atípicos.

Figura 11: Gráficos Box-Whisker, baseado no experimento de MILLIPLEX® Multiplex Assays Using Luminex® e a expressão relativa de Fator de Crescimento de Fibroblastos-1, Osteocalcina, Fator de Crescimento de Fibroblastos-2, Osteopontina, Fator de Crescimento Vascular Endotelial-C, DKK-1, Osteoprotegerina, Interleucina-8, Fator de Crescimento Epidérmico, a partir do ligamento periodontal recém-extraído, sendo biomodificado ou não por Straumann® Emdogain® dentro do período de 10 minutos. Foi considerado o $P < 0,05$. A linha horizontal ao centro da caixa representa média ou mediana. As bordas inferiores representam 25%, enquanto as superiores 75%. O limite representado pelas linhas junto a haste vertical representa os valores extremos não atípicos.

Figura 12: Gráficos Box-Whisker, baseado no experimento de MILLIPLEX® Multiplex Assays Using Luminex® e a expressão relativa de Fator de Crescimento Vascular Endotelial-A, Fator de Crescimento Vascular Endotelial-D, Proteína Óssea Morfogenética-9, Angiopoietina-2, a partir do ligamento periodontal recém-extraído, sendo biomodificado ou não por Straumann® Emdogain® dentro do período de 10 minutos. Foi considerado o $P < 0,05$. A linha horizontal ao centro da caixa representa média ou mediana. As bordas inferiores representam 25%, enquanto as superiores 75%. O limite representado pelas linhas junto a haste vertical representa os valores extremos não atípicos.

Anexo E - Tabelas

Tabela 3: Resultado de expressão gênica a partir de qPCR-RT, de acordo com os dados gerados pelo programa GraphPad Prism 7.00

Gene	Teste de Normalidade	Teste Estatístico	Valor de P	Média ± Erro padrão, N (Controle)	Média ± Erro padrão, N (Teste)
RUNX-2	Não/ Sim	Mann-Whitney	0.0507	1.117, n=24	1.805, n=24
SP7	Sim/ Sim	Teste T	0.8117	1.086 ± 0.09929, n=24	1.055 ± 0.08598, n=24
ALP	Sim/ Sim	Teste T	0.053	1.093 ± 0.1001, n=24	1.383 ± 0.1064, n=24
BSP	Sim/ Sim	Teste T	0.9699	1.31 ± 0.174, n=24	1.302 ± 0.1025, n=24
OPN	Sim/ Sim	Teste T	0.0192	1.104 ± 0.1099, n=24	0.7841 ± 0.07269, n=24
OPG	Sim/ Não	Mann-Whitney	0.0017	0.7837, n=24	2.416, n=24
BCL-2	Sim/ Não	Mann-Whitney	0.3204	1.355, n=24	0.9735, n=24
BAX	Não/ Sim	Mann-Whitney	0.0394	0.8792, n=24	0.7082, n=24
VEGF	Não/ Sim	Mann-Whitney	0.5194	1.027, n=24	0.8258, n=24
FGF-2	Não/ Não	Mann-Whitney	0.0059	0.9575, n=24	0.5408, n=24

Tabela 4: Tabela de expressão proteica a partir da análise dos analitos presentes nos kits HAGPIMAG-12K HUMAN ANGIOGENESIS/ HUMAN BONE

Citocina	Teste de Normalidade	Teste Estatístico	Valor de P	Média/Mediana ± Erro Padrão, N (Controle)	Média/Mediana ± Erro padrão, N (Teste)
DKK-1	Não/ Sim	Teste T	0.2871	21.05 ± 8.552, n=18	11.62 ± 1.69, n=18
TNF-α	-	-	-	-	-
IL-8	Não/ Sim	Mann-Whitney	0.6815	4.195, n=12	3.97, n=12
EGF	Não/ Não	Mann-Whitney	>0.999	4.39, n=9	3.84, n=10
ANGPT2	Sim/ Sim	Teste T	0.1711	138.1 ± 43.56, n=12	73.11 ± 14.47, n=12
BMP-9	Sim/ Não	Mann-Whitney	<0.0001	0.71, n=11	1.43, n=11
OC	Sim/ Sim	Teste T	<0.0001	74786 ± 6855, n=18	12665 ± 3070, n=18
OPN	Não/ Não	Mann-Whitney	0.0974	22.05, n=18	20.63, n=17
OPG	Não/ Sim	Mann-Whitney	0.4857	1.055, n=18	0.815, n=18

VEGF-A	Não/ Sim	Mann-Whitney	<0.0001	29.89, n=12	90.82, n=12
VEGF-C	Sim/ Sim	Teste T	0.1813	51.39 ± 11.96, n=12	32.41 ± 6.786, n=12
VEGF-D	Não/ Não	Mann-Whitney	0.0049	4.72, n=10	7.17, n=11
FGF-1	Sim/ Não	Mann-Whitney	0.0304	67.19, n=10	49.43, n=10
FGF-2	Sim/ Sim	Mann-Whitney	0.0606	2499, n=10	1195, n=10