**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Periodontia)**

MILENA SUEMI IRIE

Análise do potencial osteogênico e angiogênico do tecido pulpar fresco em associação às proteínas derivadas da matriz do esmalte através da expressão gênica e proteica

Ribeirão Preto
2016

MILENA SUEMI IRIE

Análise do potencial osteogênico e angiogênico do tecido pulpar fresco em associação às proteínas derivadas da matriz do esmalte através da expressão gênica e proteica

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

Orientador: Prof. Dr. Mario Taba Jr

Ribeirão Preto

2016

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

Catálogo da Publicação

Biblioteca Central do Campus USP – Ribeirão Preto

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Irie, Milena Suemi.

Análise do potencial osteogênico e angiogênico do tecido pulpar fresco em associação às EMD através da expressão gênica e proteica/ Milena Suemi Irie; orientador: Mario Taba Jr – Ribeirão Preto, 2016.

88p.:il.

Dissertação (Mestrado)—Universidade de São Paulo, 2016.

1. Polpa dentária; 2. Fatores de crescimento; 3. Terapia tecidual.

Nome: Irie, Milena Suemi

Título: Análise do potencial osteogênico e angiogênico do tecido pulpar fresco em associação às proteínas derivadas da matriz do esmalte através da expressão gênica e proteica

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

Aprovada(o) em:

Banca Examinadora

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

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho
aos meus pais, Milton e Mary.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela dádiva da vida, por guiar meus passos, me iluminando e abençoando em todos os momentos.

Aos meus pais, Milton e Mary, por se doarem a mim e à minha irmã, sem medir esforços para ver nossa felicidade. Por acreditarem em mim, sempre me apoiando em todas as decisões. A vocês, o meu agradecimento, que jamais poderia ser traduzido somente em palavras.

À minha irmã, Maísa, obrigada simplesmente por existir. Você irradia luz e vida, e tenho orgulho da pessoa que você é.

Ao meu noivo, Tiago, pelo companheirismo, pelo apoio, pelos ensinamentos e por todos os momentos que já vivemos. Você faz de mim alguém melhor, e é um dos maiores presentes que Deus me deu. Obrigada por existir em minha vida e alegrar os meus dias.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Mario Taba Jr. Obrigada pela oportunidade de ser sua orientada. Acredito que pesquisadores visionários como você, são raridades no meio acadêmico. Exemplo de profissional e pessoa. Foram anos de muito aprendizado intelectual, profissional e de crescimento pessoal. Muito obrigada!!

À minha dupla de clínica, de pesquisa, e da vida, Carla. Dizer que você é uma pessoa muito divertida e que é companhia para todas as horas, todos sabem. Você é uma pessoa especial, com um coração enorme, muito inteligente e sonhadora. Obrigada, minha amiga, por todos os momentos que vivemos e por toda ajuda nesta pesquisa!!

Aos professores Arthur Belem Novaes Jr, Daniela Palioto, Marcio Grisi, Michel Reis Messoria e Sergio Scombatti de Souza, por me ensinarem Periodontia do mais alto nível de excelência. A convivência nestes anos com vocês foi muito produtiva e de muito aprendizado.

Aos meus amigos da minha turma de Mestrado, Jéssica, Luiz, Gabriel, Camila, e em especial, Carla, Felipe e Sergio. Obrigada pela troca de

conhecimento, pela apoio em qualquer situação, e pelos momentos que vivemos juntos. Desejo a vocês, muito sucesso nesta jornada!

Ao meu amigo Danilo Maeda Reino, por ter sido o responsável pelo início desta jornada, pelo incentivo, pela amizade e por todo o aprendizado.

Aos alunos da Pós-graduação, Paula, Mari, Kelly, Umberto, Marquinhos, Felipe Anderson, Carol Mandetta e Carol Delmondes, e em especial, Cris e Gustavo, pela convivência e experiência partilhada.

À aluna de pós-doc Myrella e a aluna de iniciação científica Fernanda Schimidt de Freitas, pela colaboração nesta pesquisa.

À Milla Tavares e Rodrigo Abuna, pela experiência, aprendizado e muita diversão no laboratório!

À todos os funcionários da FORP-USP, Dani, Tati, Dulce, Mary, e em especial, Dani Steter e Joaquina, por estarem sempre dispostas diariamente a nos ajudar e facilitar nosso trabalho na clínica.

À Rose, Jorge, Maurício, Alice, funcionários da UBS Central, e pacientes que participaram da pesquisa. Vocês foram fundamentais para a realização deste trabalho.

À todos que de alguma forma contribuíram para que eu chegasse até aqui hoje, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

RESUMO

Irie, M.S. Análise do potencial osteogênico e angiogênico do tecido pulpar fresco em associação às proteínas derivadas da matriz do esmalte através da expressão gênica e proteica. (Dissertação – Mestrado). Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto; 2016. 88p.

A regeneração óssea é um processo complexo que exige a atuação coordenada de vários sinalizadores bioquímicos para promover as diversas fases da angiogênese e osteogênese. Diversas pesquisas têm focado no entendimento da biologia molecular com o objetivo de promover e acelerar a regeneração do tecido ósseo. Este estudo avaliou o potencial osteogênico e angiogênico da polpa dentária (PD) fresca e o efeito das proteínas derivadas da matriz do esmalte (EMD) neste tecido, obtido imediatamente após a exodontia, sem isolamento e cultura destas células. Trinta e seis amostras foram utilizadas, cada uma constituída de um *pool* de tecidos da polpa removidos de 2 dentes de um mesmo paciente. No grupo controle, as amostras foram inseridas em criotubo e mantidas por 20 minutos em temperatura ambiente. No grupo teste, foi realizada aplicação de EMD (Emdogain®) na proporção de 1:1 e também mantidas por 20 minutos em temperatura ambiente. Análise de expressão gênica de Runx2, Osterix, ALP, BSP, OPN, VEGF-A, FGF-2 foi realizada através da Reação da Transcriptase Reversa em Cadeia da Polimerase (qRT-PCR). As análises imunológicas foram realizadas pelo imunoenensaio Multiplex Cytokine Profiling (Luminex) para níveis de OCN, OPN, EGF, Angiopoietina-2, BMP-9, FGF-1, FGF-2, VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente. Os genes BSP e OPN apresentaram níveis significativamente maiores ($p < 0,05$) no Grupo Controle. Em relação à Osterix e FGF-2, houve maior expressão ($p < 0,05$) no Grupo Teste. Nos genes Runx-2, ALP e VEGF-A, não foi possível observar diferenças significativas entre os grupos. Na análise imunológica, OCN e OPN apresentaram níveis significativamente maiores ($p < 0,05$) no Grupo Controle. Já os níveis de Angiopoietin-2, BMP-9, FGF-1, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-A e FGF-2 tiveram maior expressão ($p < 0,05$) no Grupo Teste. Para os níveis de EGF, não foi observada diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos. De acordo com os achados deste estudo, a aplicação de EMD no tecido pulpar em modelo *ex vivo*, aumentou a expressão gênica e proteica relacionada ao processo angiogênico, podendo, portanto, favorecer a regeneração óssea. No entanto, ensaios clínicos são necessários para confirmar os achados deste estudo e para que esta proposta terapêutica seja validada.

Palavras-chave: 1. Polpa dentária; 2. Fatores de crescimento; 3. Terapia tecidual.

ABSTRACT

ABSTRACT

Irie, M.S. **Osteogenic and angiogenic potential of dental pulp tissue in association with enamel matrix derivative.** (Dissertação – Mestrado). Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto; 2016. 88p.

Bone regeneration is a complex process that requires coordinated biochemical signaling to promote the various stages of angiogenesis and osteogenesis. In order to promote and accelerate bone regeneration, many studies have focused on molecular biology knowledge of this process. This *in vitro* study investigated the angiogenic and osteogenic potential of fresh dental pulp tissue with or without enamel matrix derivative (EMD) stimulation through gene and protein expression. Thirty-six samples were obtained, each one composed by a pool of pulp tissue removed from 2 teeth of the same patient. In the control group, immediately after tooth extraction, dental pulp tissue was collected and inserted in cryotube and left 20 minutes at room temperature. In the test group, EMD was applied and left 20 minutes at room temperature. Gene expression of Runx2, Osterix, ALP, BSP, OPN, VEGF-A, FGF-2 was assessed by qRT-PCR. Immunological analysis of OCN, OPN, EGF, Angiopoietin-2, BMP-9, FGF-1, FGF-2, VEGF-A, VEGF-C and VEGF-D levels was performed by Multiplex Cytokine Profiling (Luminex). Test Group presented significantly lower mean levels of BSP and OPN than Control Group ($p<0,05$). Osterix and FGF-2 mean levels were higher ($p<0,05$) in Test Group than Control Group. Immunological analysis showed that OCN and OPN mean levels were significant lower in Test Group ($p<0,05$). However, Test Group presented significantly higher mean levels of ANGIOPOIETINA-2 BMP-9, FGF-1, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-A ($p<0,05$). EMD application in dental pulp tissue in *ex vivo* model increased gene and protein expression related to angiogenesis and can actuate in bone regeneration process. However, randomized clinical trials are required to confirm our findings and to validate this therapy approach.

Palavras-chave: 1. Dental Pulp; 2. Growth Factors; 3. Tissue Therapy

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Fluxograma do estudo.....	36
Figura 2.	(A) Abertura coronária do dente com alicate tipo turquês (B) Coleta do tecido pulpar com lâmina de bisturi número 15 (C) Inserção do tecido no criotubo (D) Transporte ao freezer -80°C no gelo seco (E) Aplicação de EMD no grupo teste.....	37
Figura 3.	Níveis médios e erros-padrão da expressão relativa (ACTB) dos genes relacionados à osteogênese (A) Runx-2, (B) Osterix, (C) ALP, (D) BSP e (E) OPN, nos grupos Controle e Teste. (*) Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos.....	45
Figura 4.	Níveis médios e erros-padrão da expressão relativa (ACTB) dos genes envolvidos na angiogênese (A) VEGF-A e (B) FGF-2, nos grupos Controle e Teste. (*) Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos.....	46
Figura 5.	Níveis médios e erros-padrão dos níveis (pg/ml) das proteínas relacionadas à osteogênese (A) OCN e (B) OPN nos grupos Controle e Teste. (*) Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos.	46
Figura 6.	Níveis médios e erros-padrão dos níveis (pg/ml) das proteínas relacionadas à angiogênese (A) EGF, (B) Angiopoietina-2, (C) BMP-9, (D) FGF-1, (E) VEGF-A, (F) VEGF-C e (G) FGF-2 nos grupos Controle e Teste. (*) Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos.....	47

LISTA DE TABELAS

Lista de Tabelas

Tabela 1. Critérios de inclusão dos pacientes.....	34
Tabela 2. Tempo e temperatura utilizada no termociclador em tempo real.....	40
Tabela 3. Dados demográficos dos pacientes incluídos na pesquisa.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Lista de Abreviaturas e Siglas

ACTB	- Beta Actina
ALP	- Atividade da Fosfatase Alcalina
ASA	- American Society of Anesthesiologist
AutoBT	- Material de enxerto ósseo proveniente de dente autógeno
BMP	- Proteína Óssea Morfogenética
BMP-2	- Proteína Óssea Morfogenética 2
BMP-4	- Proteína Óssea Morfogenética 4
BMP-9	- Proteína Óssea Morfogenética 9
BSP	- Sialoproteína óssea
cDNA	- Ácido desoxirribonucleico
Ct	- Cycle threshold
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
DP	- Desvio Padrão
EGF	- Fator de Crescimento Endotelial
EMD	- Proteínas Derivadas da Matriz do Esmalte
FGF-1	- Fator de Crescimento de Fibroblastos 1
FGF-2	- Fator de Crescimento de Fibroblastos 2
FORP	- Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
ml	- mililitro
Ng	- Nanograma
Nm	- Nanômetro
NS	- Não significativa
OCN	- Osteocalcina
OPG -	- Osteoprotegerina
OPN -	- Osteopontina
PBS	- Solução salina tamponada com fosfato
PD	- Polpa dentária
PDGF	- Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
pg	- Picograma
PRF	- Fibrina Rica em Plaquetas
RANK-L	- Ligante do receptor ativador do fator kappa B nuclear
RAR	- Raspagem e Alisamento Radicular
RIN	- RNA Integrity Number
RNA	- Ácido ribonucleico
RNA _m	- Ácido ribonucleico mensageiro
RPM	- Rotações por minuto
RT-qPCR	- Reação da Transcriptase Reversa em Cadeia da Polimerase
RTG	- Regeneração Tecidual Guiada
Runx-2	- Runt-related transcription factor 2
TCLE	- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF	- Fator de Crescimento Transformador
TGF- β	- Fator de Crescimento Transformador Beta
USP	- Universidade de São Paulo
VEGF-A	- Fator de Crescimento Vascular Endotelial A
VEGF-C	- Fator de Crescimento Vascular Endotelial C
VEGF-D	- Fator de Crescimento Vascular Endotelial D
μ l	- Microlitro

LISTA DE ANEXOS

Lista de Anexos

Anexo A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	65
Anexo B – Certificado de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....	67
Anexo C – Artigo Científico submetido para publicação no periódico <i>Journal of Clinical Periodontology</i>	68

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1 JUSTIFICATIVA.....	24
2 INTRODUÇÃO.....	26
3 PROPOSIÇÃO.....	31
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1 Consentimento para a pesquisa.....	34
4.2 Seleção dos pacientes.....	34
4.3. Delineamento do estudo.....	35
4.4. Coleta do tecido pulpar (grupo controle).....	35
4.5. Coleta do tecido pulpar (grupo teste).....	35
4.6. Expressão gênica.....	38
4.7. Análise imunológica	40
4.8. Análise estatística.....	41
5 RESULTADOS	42
5.1 Expressão gênica.....	43
5.2. Análise imunológica.....	44
6 DISCUSSÃO	48
7 CONCLUSÃO	54
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
9 ANEXOS.....	62

JUSTIFICATIVA

A regeneração óssea é um processo biológico complexo, o qual envolve uma série de alterações moleculares que clinicamente influenciam no planejamento de tratamentos que exigem quantidade e qualidade óssea. As técnicas de preservação alveolar após extração dentária e preenchimento de *gap* em implantes imediatos, são influenciadas pelo tempo de cicatrização e pela qualidade do tecido ósseo formado, fatores cruciais para se obter previsibilidade no tratamento com implantes dentários. Desta forma, a busca por procedimentos que visam à manutenção ou ganho da crista alveolar e à redução no tempo de cicatrização do tecido ósseo, é necessária para se obter resultados mais satisfatórios. Neste contexto, o entendimento da biologia molecular da cicatrização óssea pode oferecer grandes benefícios para otimizar a prática clínica.

A polpa dentária é um tecido que apresenta diversos tipos celulares, inclusive células tronco, com propriedades regenerativas ainda não totalmente exploradas¹. A literatura existente tem focado em pesquisas *in vitro*, através de cultura celular, para identificar células mesenquimais indiferenciadas da polpa dentária, e observar o seu efeito osteogênico^{2; 3; 4}. No entanto, este modelo limita a utilização clínica imediata deste tecido, exigindo semanas de cultivo celular em laboratórios de alto padrão e com elevados custos. Outro fator a se considerar, é o risco de infecção viral pelo soro fetal bovino que comumente é utilizado no meio de cultura⁵. Apesar disso, ainda não há investigações sobre as propriedades regenerativas do tecido pulpar fresco, utilizado imediatamente após a sua obtenção de um dente previamente condenado e extraído, simulando uma aplicação clínica de enxerto autógeno imediato deste tecido.

Recentemente, o uso de biomodificadores celulares, como proteínas derivadas da matriz do esmalte (EMD), fatores de crescimento e proteínas ósseas morfogenéticas (BMP), associados ou não com enxertos ósseos, tem sido estudados para se obter maior previsibilidade nas terapias regenerativas^{6; 7; 8}. A adição das EMD no meio de cultura de células da polpa dentária humana aumentou o potencial osteogênico destas células, avaliado por meio de atividade de fosfatase alcalina e acúmulo de cálcio. Além disso, houve uma maior expressão de fatores de transcrição essenciais para diferenciação osteoblástica⁹.

Até o presente, não há estudos sobre a associação de EMD com tecido da polpa dentária fresco, obtido imediatamente após a exodontia, sem isolamento celular e cultura destas células. Essa combinação poderá servir como uma proposta terapêutica que potencializa a terapia celular visando a regeneração óssea, utilizando o tecido pulpar que é rotineiramente descartado no momento das extrações dentárias.

INTRODUÇÃO

A regeneração de defeitos ósseos tem sido amplamente estudada em diversas áreas da saúde. Na Periodontia e Implantodontia, com a necessidade de desenvolver tratamentos que levem à formação óssea, seja no tratamento de defeitos periodontais, na manutenção ou no aumento da crista óssea alveolar, inúmeras pesquisas vêm sendo realizadas com o intuito de otimizar a prática clínica, com terapias que visam o ganho de quantidade e qualidade óssea frente às doenças ou situações que acarretam a sua perda. A regeneração óssea é um processo complexo que exige a atuação coordenada de vários sinalizadores bioquímicos para promover as diversas fases da angiogênese e osteogênese e se caracteriza por transformações moleculares, celulares e teciduais¹⁰. Estas moléculas sinalizadoras, denominadas citocinas e fatores de crescimento, iniciam uma série de eventos através de transdução de sinais, transcrição de genes, síntese de RNAm de determinadas proteínas, e sua posterior secreção¹¹.

Análises histológicas e histomorfométricas de estudos em animais e humanos^{12; 13; 14} demonstraram 3 fases do processo de cicatrização de alvéolos após extração dentária: fase inflamatória, proliferativa e de modelação/remodelação óssea. A formação do tecido ósseo se inicia com a formação do coágulo sanguíneo, o qual permite a migração de células e proliferação de capilares. O coágulo sanguíneo é uma fonte primária de fatores de crescimento e se forma com o início da resposta inflamatória¹⁵. A combinação entre células inflamatórias, vasos sanguíneos e fibroblastos imaturos, formam o tecido de granulação. Neste estágio, ocorre intensa mobilização celular e crescimento vascular mediado por Angiopietinas, Fatores de Crescimento Endoteliais Vasculares (VEGF) e Fator de Crescimento de Fibroblastos -2 (FGF-2)^{16; 17; 18}. O tecido de granulação é lentamente substituído por uma matriz de tecido conjuntivo provisória rica em fibras colágenas e células. A fase proliferativa é caracterizada pelo aumento de vasos sanguíneos, quimiotaxia de pré-osteoblastos, e presença de projeções de osso reticulado próximos aos vasos sanguíneos, os quais, posteriormente, formarão os osteons. O osso reticulado é formado após 2 semanas da extração dentária e permanece por várias semanas, até ser completamente substituído por tecido ósseo lamelar e medular. Esta última fase do processo de cicatrização em alvéolos pós-extração é de modelação e remodelação óssea. A remodelação óssea é caracterizada pela substituição do osso reticulado pelo osso lamelar e medular, enquanto alterações na crista óssea, como reabsorção das paredes alveolares é considerada modelação do tecido. Fator de Crescimento Transformador Beta (TGF- β), Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF), e Proteína Óssea Morfogenética 2 (BMP-2), mediam este processo pelo

recrutamento de células mesenquimais, diferenciação de osteoblastos e indução de angiogênese¹¹.

A matriz derivada do esmalte (EMD) na forma de extrato ácido purificado de proteínas da matriz do esmalte de suínos (Emdogain; Straumann AG, Basel, Switzerland) tem sido amplamente utilizada na Periodontia, com a finalidade de se obter a regeneração periodontal. As EMD consistem em 2 famílias de proteínas, as amelogeninas (90%) e as não-amelogeninas (10%), incluindo ameloblastinas, enamelinas, tuftelinas e enzimas proteolíticas. Apresenta como veículo o alginato de propilenoglicol, conferindo maior viscosidade ao gel.¹⁹. Hammarstron e colaboradores (1997)²⁰ demonstraram a formação de cemento acelular nas superfícies radiculares de dentes de macacos após aplicação de EMD, o que também foi demonstrado em defeito em humano²¹. Posteriormente, estudos clínicos demonstraram que EMD reduziu a profundidade à sondagem e resultou em ganho de inserção quando comparado à cirurgia de acesso para Raspagem e Alisamento Radicular (RAR) e à Regeneração Tecidual Guiada (RTG)^{22; 23}.

A ação das EMD não se limita somente ao cemento. Essas proteínas tem influência significativa sobre a adesão e proliferação de diversos tipos celulares, bem como a expressão de fatores de crescimento, citocinas, componentes de matriz extracelular e outras moléculas envolvidas na regulação da remodelação óssea²⁴. Estudos *in vitro*^{25; 26}, mostraram que EMD apresenta habilidade de aumentar a proliferação e diferenciação de linhagens celulares osteoblásticas, podendo criar um microambiente osteogênico favorável através da redução na liberação do Ligante do receptor ativador do fator Kappa β nuclear (RANKL) e aumentando a produção de Osteoprotegerina (OPG). Reseland e colaboradores (2006)²⁷ avaliaram o efeito do EMD sobre os fatores de mineralização *in vitro*, e observaram um aumento na atividade de fosfatase alcalina (ALP), assim como na expressão de Osteocalcina (OCN) e colágeno tipo I em células osteoblásticas primárias. Além disso, sua aplicação influenciou a angiogênese²⁸ e os eventos inflamatórios associados à cicatrização, favorecendo o reparo do tecido ósseo²⁹.

Após serem observados resultados favoráveis à regeneração óssea pela estimulação das células osteoblásticas com EMD, diversas pesquisas buscaram avaliar seu efeito sobre outras linhagens celulares. Neste contexto, a polpa dentária de dente permanente possui células multipotentes com alta capacidade de proliferação. As células tronco da polpa dentária, foram as primeiras células troncos mesenquimais isoladas e caracterizadas do tecido dentário. Podem ser estimuladas a se diferenciarem, em condições específicas, em vários tipos celulares, como adipócitos, mioblastos, células neurais, condrócitos, cementoblastos e

osteoblastos². Sua ampla variedade de diferenciação representa uma ferramenta promissora para regeneração de tecidos. Foi demonstrado que células troncos adultas da polpa dentária de dentes permanentes podem se diferenciar em osteoblastos *in vivo* e formar um tecido semelhante ao osso⁴.

A partir destas propriedades observadas nas células da polpa dentária, Wang e colaboradores (2014)⁹ avaliaram o efeito de EMD na proliferação e diferenciação das células da polpa dentária humana em cultura. Observou-se que a adição deste biomodificador ao meio de cultura aumentou o potencial osteogênico destas células, avaliado por meio da atividade da fosfatase alcalina e acúmulo de cálcio. Além disso, houve uma maior expressão de fatores de transcrição essenciais à diferenciação osteoblástica, como ALP, BMP-1, Osteopontina (OPN), Osterix, Runx2. Através de outra metodologia, estudo pré-clínico em ratos demonstrou que a aplicação de EMD sobre a polpa dentária após pulpotomia, aumentou a expressão celular de BMP-2 e BMP-4 após 7 e 14 dias, com maior formação de tecido duro quando comparada à aplicação de hidróxido de cálcio. Os autores sugerem que este aumento na expressão de BMP nas células da polpa após exposição à EMD, demonstra relação com o processo de cicatrização de tecidos duros³⁰.

A capacidade osteogênica da polpa dentária também foi demonstrada em estudos que utilizaram a metodologia de reimplantação dentária. Foram observadas 2 padrões de cicatrização do tecido pulpar: produção de dentina terciária e formação de tecido ósseo na polpa dentária^{31; 32; 33}. Posteriormente, para excluir a possível influência do ligamento periodontal e cimento neste processo de formação de tecido ósseo, Ogawa e colaboradores (2006)³⁴ realizaram o transplante somente da parte coronária do elemento dentário para região sublingual de ratos. Os resultados deste estudo mostraram que a formação de dentina e de tecido ósseo estava presente em todos os animais após o transplante, demonstrando a capacidade *in vivo* da polpa dentária de formar tecidos duros. O padrão da cicatrização após o transplante dentário parece ser determinado pela apoptose das linhagens celulares odontoblásticas, a qual ocorre pela ausência de oxigênio. A realização intencional do transplante em um tempo cirúrgico prolongado induziu a morte celular de linhagens odontoblásticas antes das linhagens osteoblásticas, determinando o padrão de cicatrização que virá a ocorrer³¹.

Desta forma, com o objetivo de promover e acelerar a regeneração óssea, diversas pesquisas têm focado no entendimento da biologia molecular, utilizando o cultivo celular para identificar células mesenquimais indiferenciadas da polpa dentária e observar o seu efeito

osteogênico após estimulação com fatores de crescimento^{2; 3; 4; 8}. No entanto, este modelo limita a utilização clínica imediata deste tecido, exigindo semanas de cultura celular em laboratórios de alto padrão e com elevados custos. Outro fator a se considerar, é o risco de infecção viral pelo soro fetal bovino que comumente é utilizado no meio de cultura⁵. Até o presente momento, a literatura não relatou estudos sobre o potencial osteogênico e angiogênico do tecido pulpar fresco, obtido imediatamente após exodontia, e o efeito de EMD neste tecido, que é rotineiramente descartado após as extrações dentárias.

PROPOSIÇÃO

Objetivo Geral

- Avaliar o potencial angiogênico e osteogênico do tecido pulpar obtido de dentes recém-extraídos com ou sem associação à EMD

Objetivos específicos

- Análise da expressão gênica (Runx2, Osterix, ALP, OPN, VEGF, FGF-2) do tecido pulpar somente ou tecido pulpar associado às EMD
- Análise da expressão proteica (OC, OPN, EGF, Angiopoietina-2, BMP-9, FGF-1, FGF-2, VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D) do tecido pulpar somente ou tecido pulpar associado às EMD

MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Consentimento para a pesquisa

Os pacientes que participaram da pesquisa através da doação de dentes receberam informações detalhadas do Banco de Dentes da FORP – USP (Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo), conforme Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo 1). Os procedimentos realizados nesta pesquisa foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (protocolo no: 27944214.0.0000.5419 – Anexo 2) da FORP – USP.

4.2. Seleção dos pacientes

Para a realização desta pesquisa, foi necessária a participação de 36 pacientes. Os pacientes foram atendidos 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 no Centro de Especialidades Odontológicas da Unidade Básica de Saúde "Dr João Baptista Quartin" – Central do Município de Ribeirão Preto. Os pacientes incluídos na pesquisa foram aqueles que necessitavam de exodontia prévia de no mínimo 2 dentes e se enquadravam nos seguintes critérios de inclusão (Tabela 1):

<i>Crítérios de inclusão para coleta de dentes</i>
Pacientes adultos (18 a 35 anos) de ambos os gêneros
ASA I
Mínimo de 2 elementos dentários hígidos com indicação de extração
Pacientes voluntários à pesquisa através da assinatura do TCLE

Tabela 1. Critérios de inclusão dos pacientes

4.3. Delineamento do estudo

Cada paciente incluído neste estudo (número de pacientes = 36), realizou a doação de 2 elementos dentários que apresentavam a necessidade prévia de exodontia, como abordado anteriormente. Um total de 72 elementos dentários foi utilizado.

Cada amostra consistiu em pool de tecidos da polpa removidos de 2 dentes de um mesmo paciente para que, desta forma, possuísse material suficiente para a realização das análises. Portanto, foram obtidas 36 amostras (n=36), cada uma contendo tecido pulpar de 2 elementos dentários de um mesmo paciente.

As amostras foram divididas de acordo com uma tabela numérica aleatória gerada por um programa computadorizado (Figura 1):

- Análise expressão gênica:
 - Controle (n=6)
 - Teste (n=6)
- Análise expressão proteica:
 - Controle (n=12)
 - Teste (n=12)

4.4. Coleta do tecido pulpar (Grupo Controle)

Imediatamente após a exodontia, a polpa dentária foi coletada através da abertura coronária com alicate tipo turquês [Figura 2 (A)] e posterior curetagem da câmara pulpar com lâmina de bisturi [Figura 2 (B)]. O tecido pulpar foi inserido em criotubo e mantido por 20 minutos em temperatura ambiente [Figura 2 (C)]. Posteriormente as amostras eram mantidas em gelo até serem transportadas e armazenadas em freezer a -80°C [Figura 2 (D)]

4.5. Coleta do tecido pulpar (Grupo Teste)

Imediatamente após a exodontia, a polpa dentária foi coletada através da abertura coronária com alicate tipo turquês [Figura 2 (A)] e posterior curetagem da câmara pulpar com lâmina de bisturi da mesma forma que foi realizada no Grupo Controle [Figura 2 (B)]. O tecido pulpar era inserido em criotubo [Figura 2 (C)] e EMD (Emdogain®) foi aplicado na

proporção de 1:1 e mantido por 20 minutos em temperatura ambiente [Figura 2 (E)]. Posteriormente as amostras eram armazenadas em freezer a -80°C

Figura 1. Fluxograma do estudo

Figura 2. (A) Abertura coronária do dente com alicate tipo turquês (B) Coleta do tecido pulpar com lâmina de bisturi número 15 (C) Inserção do tecido no criotubo (D) Transporte ao freezer -80°C no gelo seco (E) Aplicação de EMD no grupo teste

4.6. Expressão gênica

- **Protocolo extração RNA**

A extração do RNA das amostras PD foi realizada utilizando-se o reagente Trizol (Trizol® Reagent, Invitrogen, Milan, Italy). Brevemente, cada fragmento de tecido da PD foi triturado com homogeneizador Tissue Tearor (model 985370, BIOSPEC PRODUCTS, INC, Oklahoma, EUA) em criotubo junto de reagente Trizol. 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 RPM, por 15 minutos, a 4°C. Após 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 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 2 eluições para cada amostra, com 25 µl de água RNA/DNase free.

- **Quantificação de RNA**

Utilizando o aparelho *NanoVue™ Plus Spectrophotometer*, colocava-se 1 µL da amostra no leitor, em seguida o resultado da análise quantitativa era emitido através de extrato impresso. A leitura foi 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 considerável viável para posterior análise foi de 100 ng/µl.

- **Integridade do RNA**

A integridade do RNA ribossômico foi avaliada utilizando Agilent 6000 RNA Nanochips 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.

- **Síntese de cDNA**

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

- **Genes constitutivos**

Após a amplificação das amostras, os cálculos para esta análise foram realizados em relação ao gene constitutivo: Beta-actina (ACTB) (TaqMan®, Applied Biosystems)

- **Genes alvos**

A análise da expressão gênica foi realizada através do qPCR-RT para detecção da expressão de genes RUNX-2, VEGF, Osterix, FGF-2, ALP, BSP e OPN

- **Plaqueamento qPCR-RT:**

Foram utilizadas 08 placas de 96 poços (MicroAmp® Fast 96-Well Reaction Plate (0.1mL), Applied Biosystems Life Technologies) para amostras controles (n=6) e testes (n=6). As reações foram realizadas em quadruplicata. 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 (RUNX-2, VEGF, Osterix, FGF-2, ALP, BSP e OPN), 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). Os tempos e as temperaturas utilizados na amplificação dos genes estão descritos na Tabela 2.

	ciclos	duração	temperatura
<i>StepOnePlus™ System</i>	1	02:00 minutos	50°C
		00:20 segundos	95°C
	40	01 segundos	95°C
		20 segundos	60°C

StepOnePlus™ System = nome do termociclador utilizado; ciclos = quantidade de ciclos ocorridos; duração = tempo decorrido em cada ciclo; temperatura = temperatura alcançada durante o ciclo.

Tabela 2. Tempo e temperatura utilizada no termociclador em tempo real

4.7. Análise Imunológica

- **Protocolo de extração de proteína**

As amostras foram trituradas e homogeneizadas em 300µl de solução salina tamponada com fosfato (PBS) e 2 µl de inibidor de protease. Posteriormente, foram centrifugadas por 15 minutos 1000rpm a 4°C. O sobrenadante foi removido e armazenado em freezer -80°C até o momento do uso.

- **Expressão de proteínas**

Para quantificação de citocinas (OCN, OPN, EGF, ANGIOPOIETINA-2, BMP-9, FGF-1, VEGF-C, VEGF-D, FGF-2, VEGF-A), utilizou-se 2 kits disponíveis comercialmente (HAGP1MAG-12K HUMAN ANGIOGENESIS e HBNMAG-51K HUMAN BONE – Milliplex™ map, Merck Millipore Headquarters, Billerica, MA, EUA) em um analisador MAGPIX® (Luminex Corporation, Austin, TX, EUA). O ensaio foi realizado em 2 placas de 96 poços seguindo as instruções do fabricante. Um total de 24 amostras, sendo 12 do grupo controle e 12 do grupo teste, foi analisada em duplicata. A placa filtro era umedecida com o *washing buffer* e, em seguida, a solução foi aspirada dos poços. *Beads* magnéticos revestidos com os anticorpos monoclonais para os analitos (OCN, OPN, EGF, ANGIOPOIETIN2, BMP-9, FGF-1, VEGF-C, VEGF-D, FGF-2, VEGF-A) foram adicionadas aos poços. As amostras e padrões foram transferidas para os poços e incubadas *overnight* 4°C. Os poços foram lavados novamente e uma mistura de anticorpos secundários biotinilados foi adicionada. Após a

incubação por uma hora, adicionou-se aos poços a Estreptavidina R- ficoeritrina, sendo este conjunto incubado por mais uma hora. Após lavagem para a remoção de reagentes não-ligados, foi acionado *sheath fluid* (Luminexs, MiraiBio, Alameda, CA, USA) aos poços. 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 em duplicata 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).

4.8. Análise estatística

As análises foram realizadas com o *software* Prism 7 (GraphPad Prism 7 Version 7.0). A amostra, contendo um pool de tecido pulpar de 2 dentes provenientes de um mesmo paciente, foi considerada como a unidade estatística. Foi adotado nível de significância de 5% ($p < 0,05$). A distribuição dos dados foi verificada pelo teste D'Agostino&Pearson. Para os dados que apresentaram distribuição normal, foram selecionados testes paramétricos para análises das diferenças inter-grupos. Testes não paramétricos foram aplicados para os dados com distribuição não normal.

- 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 serão representados como diferença na expressão gênica (fold regulation) relativa a β - actina, que foi normalizada pela média geométrica dos controles. A análise estatística foi realizada com os valores de ciclo threshold (Ct) e foi aplicado o teste T ou teste Mann-Whitney, de acordo com a normalidade dos dados (teste de normalidade D'Agostino&Pearson). Para todas as análises, foi adotado nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

- Expressão de proteínas:

Os dados foram expressos em pg/ml de cada proteína avaliada. A análise estatística foi realizada com os valores (pg/ml) e foi aplicado o teste T ou teste Mann-Whitney, de acordo com a normalidade dos dados (teste de normalidade D'Agostino&Pearson). Para todas as análises, foi adotado nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Trinta e seis pacientes participaram deste estudo através da doação de dentes. Os dados demográficos da população deste estudo estão descritos na Tabela 3.

Variável	Todos	Controle	Teste	Valor de p
Número de pacientes	36	18	18	-
Idade (Média ± DP)	21,77 ± 3,61	22,27 ± 3,96	21,25 ± 3,26	NS
Gênero (F/M)	22F/14M	12F/6M	10F/8M	NS
Dente	3° Molares	3° Molares	3° Molares	-

Tabela 3. Dados demográficos dos pacientes incluídos na pesquisa. NS= não apresentou diferença estatística ($p < 0,05$). DP = Desvio Padrão

5.1. Expressão gênica (qPCR-RT)

- Genes relacionados à osteogênese

Os níveis de expressão gênica relativa de RUNX-2 (Controle $1,18 \pm 0,25$; Teste $1,07 \pm 0,06$), Osterix (Controle: $1,10 \pm 0,14$; Teste: $2,09 \pm 0,35$), ALP (Controle: $1,15 \pm 0,18$; Teste: $0,82 \pm 0,10$), BSP (Controle: $1,27 \pm 0,18$; Teste: $0,36 \pm 0,11$) e OPN (Controle: $1,21 \pm 0,23$; Teste: $0,48 \pm 0,08$) estão apresentados na Figura 2.

Foi observada maior expressão gênica relativa no grupo controle dos genes RUNX-2, ALP, BSP e OPN. Estas diferenças foram estatisticamente significantes ($p < 0,05$) para BSP e OPN. Maior expressão gênica relativa ao gene Osterix foi observada no grupo teste, apresentando diferença estatística ($p < 0,05$).

- Genes relacionados à angiogênese

Os níveis de expressão gênica de VEGF-A (Controle: $0,84 \pm 0,13$; Teste: $0,85 \pm 0,10$) e FGF-2 (Controle: $1,60 \pm 0,35$; Teste: $4,65 \pm 0,95$) estão apresentados na Figura 3.

Foi observada maior expressão gênica relativa no grupo teste de ambos os genes (VEGF e FGF-2) apresentando diferença estatística ($p < 0,05$) para o gene FGF-2.

5.2. Análise imunológica (Multiplex)

- Proteínas relacionadas à osteogênese

Os níveis das proteínas (pg/mL) OCN (Controle: $189,6 \pm 48,51$; Teste: $19,62 \pm 2,84$) e OPN (Controle: $3,71 \pm 1,48$; Teste: $0,55 \pm 0,19$) estão apresentados na Figura 4.

Foi observada maior expressão no grupo controle das proteínas OCN, OPN, sendo estas diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$).

- Proteínas relacionados à angiogênese

Os níveis das proteínas EGF (Controle: $0,8017 \pm 0,11$; Teste: $1,07 \pm 0,25$), ANGIOPOIETINA-2 (Controle: $61,88 \pm 9,36$; Teste: $140 \pm 23,79$), BMP-9 (Controle: $0,87 \pm 0,027$; Teste: $1,50 \pm 0,07$), FGF-1 (Controle: $92,73 \pm 8,58$; Teste: $144 \pm 14,89$), VEGF-C (Controle: $25,91 \pm 6,13$; Teste: $60,77 \pm 9,64$), VEGF-D (Controle: $3184 \pm 366,5$; Teste: $16,45 \pm 1,68$), FGF-2 (Controle: $3184 \pm 366,5$; Teste: $4487 \pm 600,1$), VEGF-A (Controle: $30,49 \pm 1,92$; Teste: $114,1 \pm 24,03$) estão apresentados na Figura 5.

Todas as proteínas relacionadas à angiogênese tiveram maior expressão no grupo teste. Diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) foram observadas para as proteínas ANGIOPOIETINA-2 BMP-9, FGF-1, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-A.

Figura 3. Níveis médios e erros-padrão da expressão relativa (ACTB) dos genes relacionados à osteogênese (A) Runx-2, (B) Osterix, (C) ALP, (D) BSP e (E) OPN, nos grupos Controle e Teste. (*) Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos.

Figura 4. Níveis médios e erros-padrão da expressão relativa (ACTB) dos genes envolvidos na angiogênese (A) VEGF-A e (B) FGF-2, nos grupos Controle e Teste. (*) Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos.

Figura 5. Níveis médios e erros-padrão dos níveis (pg/ml) das proteínas relacionadas à osteogênese (A) OCN e (B) OPN nos grupos Controle e Teste. (*) Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos.

Figura 6. Níveis médios e erros-padrão dos níveis (pg/ml) das proteínas relacionadas à angiogênese (A) EGF, (B) Angiopoietin-2, (C) BMP-9, (D) FGF-1, (E) VEGF-A, (F) VEGF-C e (G) FGF-2 nos grupos Controle e Teste. (*) Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos.

DISCUSSÃO

Este estudo *in vitro* investigou o potencial angiogênico e osteogênico do tecido pulpar fresco com ou sem aplicação de EMD, por meio de análise da expressão gênica e proteica. Diversos estudos mostraram este potencial das EMD em células tronco obtidas da polpa dentária, no entanto, a utilização terapêutica destas células ainda não foi estabelecida na prática clínica. Por exigir semanas de cultura celular em laboratório, o custo para o desenvolvimento deste procedimento é elevado. Além disso, apesar de ser incomum, existe o risco de infecção viral pelo soro fetal bovino que é rotineiramente utilizado no meio de cultura celular⁵. Desta forma, torna-se necessária a investigação de demais aplicações clínicas do tecido pulpar, considerado descarte biológico que é usualmente desprezado após exodontia. A literatura demonstra que a estimulação das células tronco obtidas da polpa dentária com EMD, levou à diferenciação osteoblástica e à produção de matriz mineralizada^{8; 9; 35}. Baseado nestes resultados, buscamos avaliar o efeito osteogênico e angiogênico do EMD no tecido pulpar fresco em modelo *ex vivo*, obtido imediatamente após exodontia. Para tanto, após remoção do tecido pulpar do dente extraído, no grupo teste, EMD foi aplicado na proporção de 1:1 sobre a polpa dentária e deixado a temperatura ambiente por 20 minutos. Este tempo foi estabelecido considerando o tempo necessário de manipulação clínica do tecido pulpar após exodontia, simulando sua enxertia, e também para garantir a integridade do tecido para posterior análise laboratorial.

Os resultados obtidos demonstraram que a aplicação de EMD no tecido pulpar fresco, potencializou a expressão de todos os genes e proteínas avaliadas envolvidas na angiogênese, enquanto que, em relação à osteogênese, não pode ser observado um padrão nos resultados analisados. Devido à ausência de relato na literatura que avalie a ação das EMD sobre a polpa dentária fresca em modelo *ex vivo* objetivando a regeneração óssea, a discussão deste trabalho será realizada através de estudos que avaliaram o efeito osteogênico e angiogênico da aplicação de EMD em cultura de células da polpa dentária.

Wang e colaboradores (2014)⁹, relataram que a adição de EMD no meio de cultura de células provenientes da polpa dentária resultou em maior expressão dos genes ALP, OPN, Osterix e Runx-2 após 14 dias. Os autores inferiram que EMD pode influenciar na função celular da polpa dentária, atuando no processo de mineralização. No entanto, neste presente estudo, a aplicação de EMD reduziu a expressão gênica e proteica de OPN e OCN. OPN é uma glicofosfoproteína encontrada tanto em tecidos mineralizados e não-mineralizados que possui função de regular a produção de cristais de hidroxiapatita no tecido ósseo. OCN é uma

proteína não colagenosa específica da diferenciação osteoblástica tardia. A expressão relativa do gene BSP também apresentou-se menor no grupo teste. A BSP é uma das principais proteínas glicosiladas da matriz extracelular no osso. É uma proteína específica de tecidos mineralizados expressa em osteoblastos diferenciados e apresenta função na fase inicial da mineralização óssea³². Também envolvidos no processo de osteogênese, Osterix e Runx-2 são fatores de transcrição essenciais para a diferenciação osteoblástica e formação óssea. Estudos em ratos mostraram que a deficiência nestes genes^{36; 37; 38} levaram à má formação óssea devido à inibição da maturação dos osteoblastos. Estes 2 fatores de transcrição determinam a regulação crítica da diferenciação osteoblástica e da formação óssea. Neste presente estudo, Osterix teve sua expressão aumentada após aplicação de EMD, assim como foi observado no estudo de Wang e colaboradores (2014)⁹. No entanto, a expressão gênica de Runx-2 e ALP não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos, confrontando os resultados observados em outros estudos^{9 30; 35; 39}.

O mecanismo pelo qual EMD influencia as células da polpa ainda não está completamente esclarecido. Alguns estudos sugerem que o tecido pulpar pode ser diretamente estimulado por EMD a produzir matriz colágena para calcificação³⁹, e que TGF- β 1 (Fator de Crescimento Transformador B1), ou as amelogeninas presentes nas EMD ativam a sinalização celular para estimular a formação de matriz e posterior mineralização^{40; 41}. Mori e colaboradores (2011)³⁵ também constataram que a adição de EMD no meio de cultura de células da polpa aumentou a expressão gênica de ALP, OPN e OCN. Porém, o modelo *ex vivo* utilizado neste presente estudo, com estimulação do tecido pulpar com EMD por 20 minutos, não foi suficiente para aumentar a expressão dos genes osteogênicos (Runx-2, ALP), os quais não apresentaram diferença estatística entre os grupos. Ademais, é provável que devido à ausência de meio de cultura celular e pela análise realizada no período inicial de ação das EMD, tenha ocorrido uma diminuição nos marcadores osteoblásticos demonstrada através da menor expressão de BSP, OPN e OCN após o *timing* de 20 minutos no grupo teste. Nos estudos em que estes marcadores osteoblásticos estiveram aumentados, as análises eram realizadas após longos períodos da adição das EMD ao meio de cultura. Entretanto, o *timing* de 20 minutos preconizado neste estudo, foi suficiente para aumentar a expressão de genes e proteínas relacionadas a angiogênese. Isto posto, acreditamos que a estimulação com EMD pode inicialmente direcionar a função celular da polpa dentária para o processo angiogênico.

A maioria das estratégias de terapias gênicas para promover a regeneração óssea,

avalia somente a expressão de genes osteoindutores. No entanto, algumas pesquisas têm focado na importância dos fatores de crescimento envolvidos na angiogênese, elucidando a sua importância na formação óssea. Mayr-Wohlfart e colaboradores (2002)⁴², demonstraram em estudo *in vitro*, o efeito quimiotático e proliferativo de VEGF-A em osteoblastos humanos. Os autores observaram maior migração e proliferação celular, sugerindo que VEGF-A pode influenciar na formação óssea por 2 vias, favorecendo a angiogênese e também, pela estimulação de osteoblastos. Da mesma forma atua o Fator de Crescimento de Fibroblastos 2 (FGF-2), que além de ter sua ação nas células endoteliais, também parece estimular a proliferação de osteoblastos⁴³. A habilidade de induzir angiogênese e vascularização como estratégia terapêutica fornece um ambiente adequado para migração, proliferação e diferenciação celular, favorecendo a síntese de matriz extracelular durante as fases iniciais da regeneração óssea⁴⁴. Em estudos prévios, a capacidade angiogênica do EMD foi demonstrada *in vivo* em ratos⁴⁵, em camundongos⁴⁴ e em membrana corioalantóica em ovos⁴⁶. A angiogênese é considerada como fator determinante para a regeneração óssea⁴⁷. desta forma, a utilização terapêutica de determinados mediadores biológicos pode estimular e coordenar os processos regenerativos. Neste estudo, todos os genes e proteínas analisados envolvidos no processo angiogênico, apresentaram maior expressão após aplicação de EMD. A aplicação de EMD sobre o tecido pulpar fresco por 20 minutos, foi suficiente para aumentar a expressão dos genes VEGF-A e FGF-2 e proteínas ANGIOPOIETINA-2, BMP-9, FGF-1, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-A.

Através da observação do processo de cicatrização natural, uma ampla variedade de fatores de crescimento estão sendo pesquisados na área da engenharia tecidual⁴⁸. A regeneração dos tecidos pode ser facilitada pela utilização de fatores de crescimento, que estimulam a atividade celular, como recrutamento, adesão, proliferação e diferenciação⁴⁸. O processo de osseointegração é associado com uma diminuição na inflamação e aumento nos genes relacionados a angiogênese nos estágios iniciais da cicatrização⁴⁹. A importância da angiogênese na cicatrização e regeneração óssea é bem estabelecida e representa um mecanismo em potencial para modular a osseointegração de implantes. Essa abordagem pode ser suportada por estudos que mostraram que a adição de fatores de crescimento na superfície do implante pode aumentar o contato osso-implante⁵⁰. Desta forma, uma possível utilização terapêutica da combinação polpa dentária e EMD, é na sua adição aos enxertos ósseos particulados (autógeno ou xenógeno) para preenchimento de *gaps* em implantes imediatos, ou em alvéolos pós-extração, utilizando o tecido pulpar do dente recém extraído. Foi

demonstrado em estudo clínico⁵¹, que a aplicação de Fibrina Rica em Plaquetas (PRF) nos alvéolos criados cirurgicamente após fresagem para posterior implantação, aumentou a estabilidade do implante após uma semana, avaliada através do Osstel. Os autores sugerem que a liberação de fatores de crescimento após aplicação do PRF, favoreceu a regeneração óssea e, portanto, acelerou o processo de osseointegração. Da mesma forma, a utilização de PRF em alvéolos pós-extração para preservação da crista óssea alveolar, também foi clinicamente efetiva⁵². Estes resultados podem ser explicados pela ativação de plaquetas, que leva à liberação de fatores de crescimento localmente, como BMP's, PDGF, FGF(1 e 2) e VEGF (A e C) que aceleram o processo de cicatrização pela quimiotaxia de células indiferenciadas⁵³. Seguindo esta linha de raciocínio, a presença de fatores de crescimento como VEGF (A, C e D), FGF (1 e 2), Angiopoietina 2 e BMP-9, resultante da combinação polpa dentária e EMD demonstrada neste estudo, também pode favorecer o processo de osteogênese, podendo ser utilizada em combinação aos substitutos ósseos particulados de uso rotineiro na Implantodontia. Porém, estes são resultados obtidos de um estudo *in vitro*, sendo necessária a realização de ensaios clínicos para confirmar os achados deste estudo.

Com o enfoque de utilizar clinicamente o dente extraído objetivando a regeneração óssea, recentes estudos buscaram avaliar os resultados clínicos da utilização de descartes biológicos após a exodontia. Pang e colaboradores (2016)⁵⁴ através de estudo clínico randomizado, compararam a eficácia clínica e características histológicas da matriz de dentina desmineralizada, denominada pelos autores de material de enxerto ósseo proveniente de dente autógeno (AutoBT), com enxerto ósseo bovino inorgânico (Bio-Oss® Geistlich Pharma, Wolhumsen, Suíça), com objetivo de ganho ósseo em alvéolos pós-extração. Foi observado que o volume e as características histológicas do novo osso formado e a estabilidade primária dos implantes instalados nas regiões enxertadas, foram semelhantes nos 2 grupos, não apresentando diferença estatística. Portanto, os autores concluíram que a utilização da matriz de dentina desmineralizada em alvéolos pós-extração exibiu resposta tecidual mínima e potencial de regeneração óssea semelhante ao enxerto ósseo bovino inorgânico (Bio-Oss). Outro grupo de pesquisadores⁵⁵, desenvolveram um protocolo (Rigenera Protocol) para utilização imediata do tecido pulpar proveniente de dente recém extraído. Neste relato de caso, a polpa dentária é dissociada em equipamento próprio (Rigenera System HBW srl, Turin, Italy) por 30 segundos e a suspensão celular é coletada e aplicada em esponja de colágeno e utilizada imediatamente para levantamento de seio maxilar. Após 4 meses, os autores observaram através de Tomografia Computadorizada formação de novo osso na área

enxertada do seio maxilar. A partir destas pesquisas e com os resultados observados neste presente estudo, a utilização de descartes biológicos, parece ser uma proposta promissora para promover a regeneração óssea utilizando o tecido dentário, que é usualmente descartado após exodontia. No entanto, são escassos os artigos publicados nesta área e ensaios clínicos controlados randomizados são necessários para validação destas abordagens.

CONCLUSÃO

De acordo com os achados deste estudo, a aplicação de EMD no tecido pulpar em modelo *ex vivo*, aumentou a expressão gênica e proteica relacionadas ao processo angiogênico. Estes foram os resultados de uma análise *in vitro*, obtidos através de uma metodologia que simula uma situação clínica da utilização do tecido pulpar como um microenxerto autógeno associado à aplicação de EMD. Esta proposta pode favorecer a regeneração óssea através da angiogênese, no entanto, é importante ressaltar que estudos clínicos são necessários para confirmar os achados deste estudo e para que esta proposta terapêutica seja validada.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ¹ LEDESMA-MARTÍNEZ, E.; MENDOZA-NÚÑEZ, V. M.; SANTIAGO-OSORIO, E. Mesenchymal Stem Cells Derived from Dental Pulp: A Review. *Stem Cells Int*, v. 2016, p. 4709572, 2016. ISSN 1687-966X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26779263> >.
- ² RANGANATHAN, K.; LAKSHMINARAYANAN, V. Stem cells of the dental pulp. *Indian J Dent Res*, v. 23, n. 4, p. 558, 2012 Jul-Aug 2012. ISSN 1998-3603. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23257502> >.
- ³ RODRÍGUEZ-LOZANO, F. J. et al. Tissue engineering with dental pulp stem cells: isolation, characterization, and osteogenic differentiation. *J Craniofac Surg*, v. 23, n. 6, p. e571-5, Nov 2012. ISSN 1536-3732. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23172482> >.
- ⁴ GRONTHOS, S. et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 97, n. 25, p. 13625-30, Dec 2000. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11087820> >.
- ⁵ YANAGI, M. et al. Contamination of commercially available fetal bovine sera with bovine viral diarrhea virus genomes: implications for the study of hepatitis C virus in cell cultures. *J Infect Dis*, v. 174, n. 6, p. 1324-7, Dec 1996. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8940226> >.
- ⁶ YANG, X. et al. Hard tissue formation of STRO-1-selected rat dental pulp stem cells in vivo. *Tissue Eng Part A*, v. 15, n. 2, p. 367-75, Feb 2009. ISSN 1937-3341. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18652538> >.
- ⁷ AJLAN, S. A. et al. Osteogenic differentiation of dental pulp stem cells under the influence of three different materials. *BMC Oral Health*, v. 15, p. 132, 2015. ISSN 1472-6831. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26510991> >.
- ⁸ RIKSEN, E. A. et al. Enamel matrix derivative promote primary human pulp cell differentiation and mineralization. *Int J Mol Sci*, v. 15, n. 5, p. 7731-49, 2014. ISSN 1422-0067. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24857913> >.
- ⁹ WANG, Y.; ZHAO, Y.; GE, L. Effects of the enamel matrix derivative on the proliferation and odontogenic differentiation of human dental pulp cells. *J Dent*, v. 42, n. 1, p. 53-9, Jan 2014. ISSN 1879-176X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24246686> >.
- ¹⁰ SELA, J. J.; BAB, I. A. Principles of Bone Regeneration. In: SCIENCES, I. O. D.; JERUSALEM, T. H. U. O., et al (Ed.). © Springer Science+Business Media. New York, NY: Springer, 2012. cap. 154, p.1-10.
- ¹¹ ARAÚJO, M. G. et al. Alveolar socket healing: what can we learn? *Periodontol 2000*, v. 68, n. 1, p. 122-34, Jun 2015. ISSN 1600-0757. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25867983> >.

- 12 ARAÚJO, M. G.; LINDHE, J. Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog. *J Clin Periodontol*, v. 32, n. 2, p. 212-8, Feb 2005. ISSN 0303-6979. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15691354> >.
- 13 AMLER, M. H. The time sequence of tissue regeneration in human extraction wounds. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, v. 27, n. 3, p. 309-18, Mar 1969. ISSN 0030-4220. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5251474> >.
- 14 NOVAES, A. B. et al. Histologic evaluation of the buccal and lingual bone plates in anterior dog teeth: possible influence on implant dentistry. *J Periodontol*, v. 82, n. 6, p. 872-7, Jun 2011. ISSN 1943-3670. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21138354> >.
- 15 CRITCHLOW, M. A.; BLAND, Y. S.; ASHHURST, D. E. The effect of exogenous transforming growth factor-beta 2 on healing fractures in the rabbit. *Bone*, v. 16, n. 5, p. 521-7, May 1995. ISSN 8756-3282. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7654467> >.
- 16 SOLHEIM, E. Growth factors in bone. *Int Orthop*, v. 22, n. 6, p. 410-6, 1998. ISSN 0341-2695. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10093814> >.
- 17 BAB, I. A.; EINHORN, T. A. Polypeptide factors regulating osteogenesis and bone marrow repair. *J Cell Biochem*, v. 55, n. 3, p. 358-65, Jul 1994. ISSN 0730-2312. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7962168> >.
- 18 FISHER, J. P. et al. Effect of biomaterial properties on bone healing in a rabbit tooth extraction socket model. *J Biomed Mater Res A*, v. 68, n. 3, p. 428-38, Mar 2004. ISSN 1549-3296. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14762922> >.
- 19 BROOKES, S. J. et al. Biochemistry and molecular biology of amelogenin proteins of developing dental enamel. *Arch Oral Biol*, v. 40, n. 1, p. 1-14, Jan 1995. ISSN 0003-9969. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7748107> >.
- 20 HAMMARSTRÖM, L.; HEIJL, L.; GESTRELIUS, S. Periodontal regeneration in a buccal dehiscence model in monkeys after application of enamel matrix proteins. *J Clin Periodontol*, v. 24, n. 9 Pt 2, p. 669-77, Sep 1997. ISSN 0303-6979. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9310871> >.
- 21 HEIJL, L. Periodontal regeneration with enamel matrix derivative in one human experimental defect. A case report. *J Clin Periodontol*, v. 24, n. 9 Pt 2, p. 693-6, Sep 1997. ISSN 0303-6979. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9310874> >.
- 22 ESPOSITO, M. et al. Enamel matrix derivative (Emdogain(R)) for periodontal tissue regeneration in intrabony defects. *Cochrane Database Syst Rev*, n. 4, p. CD003875, 2009. ISSN 1469-493X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19821315> >.

- 23 SCULEAN, A. et al. The application of an enamel matrix protein derivative (Emdogain) in regenerative periodontal therapy: a review. *Med Princ Pract*, v. 16, n. 3, p. 167-80, 2007. ISSN 1011-7571. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17409750> >.
- 24 BOSSHARDT, D. D. Biological mediators and periodontal regeneration: a review of enamel matrix proteins at the cellular and molecular levels. *J Clin Periodontol*, v. 35, n. 8 Suppl, p. 87-105, Sep 2008. ISSN 1600-051X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18724844> >.
- 25 SCHWARTZ, Z. et al. Porcine fetal enamel matrix derivative stimulates proliferation but not differentiation of pre-osteoblastic 2T9 cells, inhibits proliferation and stimulates differentiation of osteoblast-like MG63 cells, and increases proliferation and differentiation of normal human osteoblast NHOst cells. *J Periodontol*, v. 71, n. 8, p. 1287-96, Aug 2000. ISSN 0022-3492. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10972644> >.
- 26 GALLI, C. et al. Osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand modulation by enamel matrix derivative in human alveolar osteoblasts. *J Periodontol*, v. 77, n. 7, p. 1223-8, Jul 2006. ISSN 0022-3492. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16805686> >.
- 27 RESELAND, J. E. et al. The effect of enamel matrix derivative on gene expression in osteoblasts. *Eur J Oral Sci*, v. 114 Suppl 1, p. 205-11; discussion 254-6, 381-2, May 2006. ISSN 0909-8836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16674687> >.
- 28 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*, v. 120, n. 6, p. 513-9, Dec 2002. ISSN 1600-0722. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23167467> >.
- 29 VENEZIA, T. A. et al. Molecular signatures of proliferation and quiescence in hematopoietic stem cells. *PLoS Biol*, v. 2, n. 10, p. e301, Oct 2004. ISSN 1545-7885. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15459755> >.
- 30 KAIDA, H. et al. Wound healing process of injured pulp tissues with emdogain gel. *J Endod*, v. 34, n. 1, p. 26-30, Jan 2008. ISSN 0099-2399. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18155487> >.
- 31 HASEGAWA, T. et al. Influence of extended operation time and of occlusal force on determination of pulpal healing pattern in replanted mouse molars. *Cell Tissue Res*, v. 329, n. 2, p. 259-72, Aug 2007. ISSN 0302-766X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17497176> >.
- 32 TSUKAMOTO-TANAKA, H. et al. Histochemical and immunocytochemical study of hard tissue formation in dental pulp during the healing process in rat molars after tooth replantation. *Cell Tissue Res*, v. 325, n. 2, p. 219-29, Aug 2006. ISSN 0302-766X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16596394> >.

- 33 SHIMIZU, A. et al. Responses of immunocompetent cells in the dental pulp to replantation during the regeneration process in rat molars. *Cell Tissue Res*, v. 302, n. 2, p. 221-33, Nov 2000. ISSN 0302-766X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11131133> >.
- 34 OGAWA, R. et al. Capacity of dental pulp differentiation after tooth transplantation. *Cell Tissue Res*, v. 326, n. 3, p. 715-24, Dec 2006. ISSN 0302-766X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16865348> >.
- 35 MORI, G. et al. Dental pulp stem cells: osteogenic differentiation and gene expression. *Ann N Y Acad Sci*, v. 1237, p. 47-52, Nov 2011. ISSN 1749-6632. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22082364> >.
- 36 NAKASHIMA, K. et al. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*, v. 108, n. 1, p. 17-29, Jan 2002. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11792318> >.
- 37 KOMORI, T. et al. Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell*, v. 89, n. 5, p. 755-64, May 1997. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9182763> >.
- 38 DUCY, P. et al. A *Cbfa1*-dependent genetic pathway controls bone formation beyond embryonic development. *Genes Dev*, v. 13, n. 8, p. 1025-36, Apr 1999. ISSN 0890-9369. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10215629> >.
- 39 ISHIZAKI, N. T. et al. Histopathological study of dental pulp tissue capped with enamel matrix derivative. *J Endod*, v. 29, n. 3, p. 176-9, Mar 2003. ISSN 0099-2399. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12669875> >.
- 40 KAWASE, T. et al. Enamel matrix derivative (EMDOGAIN) rapidly stimulates phosphorylation of the MAP kinase family and nuclear accumulation of smad2 in both oral epithelial and fibroblastic human cells. *J Periodontal Res*, v. 36, n. 6, p. 367-76, Dec 2001. ISSN 0022-3484. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11762872> >.
- 41 _____. Anti-TGF-beta antibody blocks enamel matrix derivative-induced upregulation of p21WAF1/cip1 and prevents its inhibition of human oral epithelial cell proliferation. *J Periodontal Res*, v. 37, n. 4, p. 255-62, Aug 2002. ISSN 0022-3484. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12200968> >.
- 42 MAYR-WOHLFART, U. et al. Vascular endothelial growth factor stimulates chemotactic migration of primary human osteoblasts. *Bone*, v. 30, n. 3, p. 472-7, Mar 2002. ISSN 8756-3282. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11882460> >.

- 43 YANG, Y. Q. et al. The role of vascular endothelial growth factor in ossification. *Int J Oral Sci*, v. 4, n. 2, p. 64-8, Jun 2012. ISSN 1674-2818. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22722639> >.
- 44 THOMA, D. S. et al. Angiogenic activity of an enamel matrix derivative (EMD) and EMD-derived proteins: an experimental study in mice. *J Clin Periodontol*, v. 38, n. 3, p. 253-60, Mar 2011. ISSN 1600-051X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21198764> >.
- 45 YUAN, K.; CHEN, C. L.; LIN, M. T. Enamel matrix derivative exhibits angiogenic effect in vitro and in a murine model. *J Clin Periodontol*, v. 30, n. 8, p. 732-8, Aug 2003. ISSN 0303-6979. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12887342> >.
- 46 KAUVAR, A. S. et al. In vivo angiogenic activity of enamel matrix derivative. *J Periodontol*, v. 81, n. 8, p. 1196-201, Aug 2010. ISSN 1943-3670. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20370422> >.
- 47 TONNESEN, M. G.; FENG, X.; CLARK, R. A. Angiogenesis in wound healing. *J Investig Dermatol Symp Proc*, v. 5, n. 1, p. 40-6, Dec 2000. ISSN 1087-0024. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11147674> >.
- 48 BAYER, E. A. et al. The scope and sequence of growth factor delivery for vascularized bone tissue regeneration. *J Control Release*, v. 219, p. 129-40, Dec 2015. ISSN 1873-4995. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26264834> >.
- 49 SALVI, G. E. et al. Temporal sequence of hard and soft tissue healing around titanium dental implants. *Periodontol 2000*, v. 68, n. 1, p. 135-52, Jun 2015. ISSN 1600-0757. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25867984> >.
- 50 STANFORD, C. M. Surface modification of biomedical and dental implants and the processes of inflammation, wound healing and bone formation. *Int J Mol Sci*, v. 11, n. 1, p. 354-69, 2010. ISSN 1422-0067. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20162020> >.
- 51 ÖNCÜ, E.; ALAADDINOĞLU, E. E. The effect of platelet-rich fibrin on implant stability. *Int J Oral Maxillofac Implants*, v. 30, n. 3, p. 578-82, 2015 May-Jun 2015. ISSN 1942-4434. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26009908> >.
- 52 ANWANDTER, A. et al. Dimensional changes of the post extraction alveolar ridge, preserved with Leukocyte- and Platelet Rich Fibrin: A clinical pilot study. *J Dent*, Jun 2016. ISSN 1879-176X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27338946> >.
- 53 ANITUA, E. et al. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost*, v. 91, n. 1, p. 4-15, Jan 2004. ISSN 0340-6245. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14691563> >.

- 54 PANG, K. M. et al. 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, Jun 2016. ISSN 1600-0501. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27279547> >.
- 55 BRUNELLI, G. et al. Sinus lift tissue engineering using autologous pulp micro-grafts: A case report of bone density evaluation. J Indian Soc Periodontol, v. 17, n. 5, p. 644-7, Sep 2013. ISSN 0972-124X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24174760> >.

ANEXOS

Anexo A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

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) 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 B – Certificado de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO
PRETO/ FORP/ USP

COMPROVANTE DE ENVIO DO PROJETO

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

Versão: 6

CAAE: 27944214.0.0000.5419

Instituição Proponente: Universidade de Sao Paulo

DADOS DO COMPROVANTE

Número do Comprovante: 039580/2015

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

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 C - Artigo científico submetido para publicação no periódico *Journal of Clinical Periodontology*

Osteogenic and angiogenic potential of dental pulp tissue in association with enamel matrix derivative

Milena S. Irie¹, Carla O. P. Silva¹, Myrella L. Castro¹, Arthur B. Novaes Jr.¹, Márcio F. M. Grisi¹, Michel R. Messoria¹, Sérgio L. S. Souza¹, Daniela B. Palioto¹, Fabiani G. Frantz², Mario Taba Jr.¹

¹Departament of Oral & Maxillofacial Surgery and Periodontology, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of Sao Paulo – USP, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

² Department of Clinical Analysis, Toxicology and Bromatology, School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo – USP, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

Running title: Effect of enamel matrix derivative on dental pulp

Keywords: Dental Pulp; Growth Factors; Tissue Therapy; Bone regeneration; Angiogenesis

Correspondence address

Prof. Dr. Mario Taba Jr

Telephone: +55(16) 3315-3980 / Fax: + 55(16) 3315-4788

Av. Café, s/n 14040-904

Ribeirao Preto / SP, Brazil

e-mail: m.messoria@forp.usp.br

Conflict of Interest and Sources of Funding Statement

The authors declare that there are no conflicts of interest in this study. This study was financially supported by Sao Paulo Research Foundation – FAPESP (protocol number 2014/06799-3).

Abstract

Aim: This *in vitro* study investigated the angiogenic and osteogenic potential of fresh dental pulp tissue with or without enamel matrix derivative (EMD) stimulation by gene and protein expression.

Material and Methods: Thirty-six samples were obtained, each one composed by a pool of pulp tissue removed from 2 teeth of the same patient. In the control group, immediately after tooth extraction, dental pulp tissue was collected and inserted in cryotube and left 20 minutes at room temperature. In the test group, EMD was applied and left 20 minutes at room temperature. Osteogenic and angiogenic potential were assessed through qRT-PCR and immunological analysis.

Results: Test Group presented significantly lower mean levels of BSP and OPN than Control Group ($p < 0,05$). Osterix and FGF-2 mean levels were higher ($p < 0,05$) in Test Group than Control Group. Immunological analysis showed that OCN and OPN mean levels were significant lower in Test Group ($p < 0,05$). However, Test Group presented significantly higher mean levels of ANGIOPOIETINA-2 BMP-9, FGF-1, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-A ($p < 0,05$).

Conclusion: EMD application in dental pulp tissue in ex vivo model increased gene and protein expression related to angiogenesis. Randomized clinical trials are required to confirm our findings and to validate this therapy approach.

Introduction

Many researches have been performed in order to optimize clinical practice with therapies that aim bone tissue formation in the treatment of periodontal defects or to increase alveolar ridge. Bone regeneration is a complex process that requires coordinated biochemical signaling to promote the various stages of angiogenesis and osteogenesis. This process is characterized by molecular, cellular and tissue changes (Sela and Bab, 2012). Signaling molecules called cytokines and growth factors initiate a series of events via signal transduction, gene transcription, mRNA synthesis of certain proteins and their subsequent secretion (Araújo et al., 2015).

Histological and histomorphometric studies (Araújo and Lindhe, 2005, Amler, 1969, Novaes et al., 2011) showed 3 phases of healing process after tooth extraction: inflammatory, proliferative and modeling/remodeling. Bone formation is initiated with blood clot which allows cell migration and proliferation of capillaries. The blood clot formation is concomitant with the onset of inflammatory response and is a primary source of growth factors (Critchlow et al., 1995). The combination of inflammatory cells, immature fibroblasts and vascular sprouts forms the granulation tissue. This stage is characterized by an immanent cellular mobilization and vascular growth with extensive neo-angiogenesis mediated by angiopoietins and different Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2) (Solheim, 1998, Bab and Einhorn, 1994, Fisher et al., 2004). A provisional connective tissue matrix, rich in collagen, fibers and cells, gradually replaces granulation tissue. The proliferative phase is characterized by increased blood vessel, pre-osteoblast chemotaxis, and the finger-like projections of woven bone that are laid down around the blood vessels, which subsequently will give rise to the osteons. Woven bone can be observed 2 weeks after tooth extraction and remains for several weeks until its complete replacement by lamellar and medullary bone. Bone modeling and remodeling is the last phase of the socket-healing process. Remodeling is defined as the replacement of woven bone with lamellar bone or bone marrow, whereas modeling is characterized by bone resorption and changes in the shape and architecture of the alveolar ridge. Transforming Growth Factor Beta (TGF- β) Platelet-Derived Growth Factor (PDGF), and Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP-2), mediate this process by the recruitment of mesenchymal cells, osteoblast differentiation and angiogenesis induction (Araújo et al., 2015).

Enamel matrix derivative (EMD) as a purified acid extract of proteins from pig enamel matrix (Emdogain; Straumann AG, Basel, Switzerland) has been successfully employed in periodontal regeneration. EMD consist of 2 families of proteins, amelogenins (90%) and non-amelogenins (10%), including ameloblastin, enamelin, tuftelin, and proteolytic enzymes. The commercial formulation (Emdogain®) is prepared in propylene glycol alginate vehicle providing viscosity to the gel (Brookes et al., 1995). Hammarström et al. (1997), have shown new acellular cementum on the root surfaces of teeth monkeys after application of EMD, which was also shown in human defect (Heijl, 1997). Subsequently, clinical studies demonstrated that EMD have reduced probing depth and improved clinical attachment level when compared to the access surgery for debridement and Guided Tissue Regeneration (GTR) (Esposito et al., 2009, Sculean et al., 2007).

The effect of EMD is not limited to the cementum. These proteins affect adhesion and proliferation of different cell types as well as expression of growth factors, cytokines, extracellular matrix constituents and expression of others bone turnover involved molecules (Bosshardt, 2008). In vitro studies (Schwartz et al., 2000, Galli et al., 2006) showed that EMD has the ability to increase proliferation and differentiation of osteoblastic cell lines and to provide extracellular matrix that create an osteogenic microenvironment by reducing receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) release and increasing osteoprotegerin (OPG) production. Reseland et al. (2006), evaluated the EMD effect of in vitro mineralization and showed an increase in phosphatase alkaline activity (ALP) as well as an increase in mRNA expression of type I collagen and osteocalcin (OCN) in primary human osteoblasts. Moreover, EMD also stimulated angiogenesis (Sakoda et al., 2012) e inflammatory events related to bone healing (Venezia et al., 2004).

Positive results on bone regeneration have being shown by stimulating osteoblastic cell with EMD (Grandin et al., 2012), thus, many studies have aimed to assess this effect on other cell types. In this context, dental pulp tissue has multipotent cells with high proliferative capacity. Dental pulp stem cells can be stimulated to differentiate under specific conditions into several cell lineages, such as adipocytes, myoblasts, neural cells, chondrocytes, cementoblasts and osteoblasts (Ranganathan and Lakshminarayanan, 2012). It also has been demonstrated that dental pulp stem cells from permanent teeth can differentiate into osteoblasts in vivo and form bone-like tissue (Gronthos et al., 2000). This property represents a promising tool for tissue

regeneration. Wang et al. (2014), demonstrated that EMD increased the osteogenic potential of human dental pulp cells, as measured by ALP and calcium accumulation. The expression levels of osteogenesis-related genes, such as ALP, BMP-1, OPN, Osterix and Runx-2 were also upregulated.

Therefore, in order to promote and accelerate bone regeneration, many studies have focused on molecular biology knowledge using dental pulp stem cell culture and its osteogenic effect through growth factor stimulation (Ranganathan and Lakshminarayanan, 2012, Rodríguez-Lozano et al., 2012, Riksen et al., 2014, Gronthos et al., 2000). However, this model restricts immediate clinical use of this tissue, requiring several weeks of cell culture and substantial laboratorial costs. Besides, there is a risk of viral infection by using fetal bovine serum that is commonly used in culture medium (Yanagi et al., 1996). To date, the literature has not reported studies related to osteogenic and angiogenic potential of fresh dental pulp tissue that is usually discarded after tooth extraction and the effect of EMD on this tissue.

Materials and Methods

Subject population

Thirty-six patients were selected from School of Dentistry of Ribeirão Preto – University of São Paulo (FORP-USP, Ribeirão Preto) and Paulista Association of Dental Surgeons (APCD, Ribeirão Preto). All eligible subjects were thoroughly informed about Tooth Bank of FORP-USP and signed a Term of Informed Consent. The study protocol was reviewed and approved by the Research Ethics Committee at FORP-USP (no: 27944214.0.0000.5419).

Inclusion criteria

All subjects included were those that require prior extraction of at least two healthy teeth. The inclusion criteria were as follows: a) 18 to 35 years of age b) ASA I (healthy patient, no-smoking, no or minimal alcohol use).

Experimental design

Each subject (n=36), made a donation of two dental elements with the prior requirement for extraction. A total of 72 teeth were used. Each sample was composed by a pool of pulp tissue removed from 2 teeth of the same patient. Therefore, 36

samples were obtained. Samples were allocated according to a random number table generated by a computer program (Figure 1):

Sample preparation

Control group: Immediately after tooth extraction, dental pulp tissue was collected through crown opening with pliers pincer type [Figure 2 (A)] and subsequent curettage of the pulp chamber with 15C scalpel blade [Figure 2 (B)]. Dental pulp tissue was inserted in cryotube and left 20 minutes at room temperature [Figure 2 (C)]. After that, samples were stored in a freezer at -80°C [Figura 2 (D)].

Test group: Dental pulp tissue was collected in the same way as the control group. After being inserted in cryotube, EMD (Emdogain®) was applied (ratio 1:1) and left 20 minutes at room temperature [Figura 2 (E)]. After that, samples were stored in a freezer at -80°C.

RNA extraction

Total RNA from dental pulp tissue was extracted using the Trizol (Trizol® Reagent, Invitrogen, Milan, Italy) reagent according to the directions supplied by the manufacturer. Briefly, the tissue was triturated by Tissue Reator equipment (model 985370, BIOSPEC PRODUCTS, INC, Oklahoma, EUA) inside cryotube with Trizol (Trizol® Reagent, Invitrogen, Milan, Italy). 0.25 ml of chloroform (Sigma, St Louis, MO, USA) was added and shaken for 30s and incubated at room temperature for 15 min and then centrifuged at 10,500 rpm by 15 min for 4°C. The aqueous phase was transferred to a new tube, to which 0,25 ml of 95% ethanol was added. The suspension was transferred to the spin basket assembly of the kit (SV Total RNA Isolation System - Promega, Madison, WI, EUA) and centrifuged at 10,500 rpm by 1 min for 4°C. After wash solution process, addition of DNase and, then, DNase stop solution, two elutions were made with 25 µl of RNA/DNase free. The concentration of RNA was determined from optical density at a wavelength of 260 nm (NanoVue™ Plus Spectrophotometer, GE Healthcare) and thus it stored under -80°C.

RNA Integrity

Ribosomal RNA integrity was assessed using Agilent 6000 RNA Nanochips through 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA). RIN (RNA Integrity Number) greater than 5 was considered to perform the assay.

cDNA Synthesis:

From 1 µg of total RNA, a strand of complementary DNA (cDNA) was synthesized through a reverse transcription reaction (RT2 First Strand Kit, SABioscience, Frederick, MD, USA), according to the directions supplied by the manufacturer. At the end of this reaction, cDNA was stored at -20°C for later use.

Real Time Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR):

The reactions were carried out in quadruplicates for each sample. For each PCR reaction in real time, we used: 5 µl of buffer (TaqMan® Fast Advanced Master Mix, Applied Biosystems, Carlsbad, California, USA); 2,25 µl of cDNA synthesis reaction diluted, 2,25 µl of deionized water and 0,5 µl of primers (TaqMan®, Applied Biosystems, Carlsbad, California, USA) of each gene (RUNX-2, VEGF, Osterix, FGF2, ALP, BSP e OPN). Then, the reaction was performed on a real-time thermocycler (StepOne Plus™ Real-Time PCR System, Life Applied Biosystems). Conditions of real time PCR were as follows: 2 minutes at 50°C (incubation), 20 seconds at 95°C (polymerase activation) and 40 cycles for amplification for 1 sec at 95°C (denaturation) and 20 sec at 60°C (annealing/extension). Following sample amplification, calculations were performed for this analysis.

Immunological analysis

Samples were triturated with 300 µl of phosphate-buffered saline and then centrifuged at 1000 rpm by 15 min for 4°C. Supernatant was transferred to a new tube and stored at -80°C. The levels of the proteins (OCN, OPN, EGF, ANGIOPOIETINA-2, BMP-9, FGF-1, VEGF-C, VEGF-D, FGF-2, VEGF-A) in the samples were determined using high sensitivity available kits (HAGP1MAG-12K HUMAN ANGIOGENESIS and HBNMAG-51K HUMAN BONE – Milliplex™ map, Merck Millipore Headquarters, Billerica, MA, EUA) and the multiplexing instrument (MAGPIX® analyzer, Luminex Corporation, Austin, TX, USA) according to the manufacturer's recommendations. The samples were individually evaluated in duplicates and the concentrations of each protein were estimated from the standard curve using a five-parameter polynomial equation with specific software (Xponent® software, Luminex Corporation, Austin, TX, USA). A total of 24 samples (n=12 control group/n=12 test group) were analyzed.

Statistical analysis

Gene expression

The differential expression calculation was done by specific software for data analysis (RT2 Profiler PCR Array Data Analysis, SuperArray, SABiosciences, Frederick, MD, USA). Relative gene expression normalization and quantification was performed by 2- $\Delta\Delta$ CT method. This software also performed pairwise comparisons among groups of experimental replicates and defined fold-change and statistical significant thresholds. Therefore, data were presented as a difference (fold regulation) in gene expression, which would be normalized by the geometric mean value of actin-beta (ACTB). Data are expressed as mean $\pm$ SD. Comparison between the groups were made using Mann-Whitney test or Student's t-test according to the normality test (D'Agostino&Pearson). Significance level was set at $p < 0.05$.

Immunological analysis

Data are expressed as mean $\pm$ SD. Data were analyzed using the Student's t-test or Mann-Whitney test according to normality test (D'Agostino&Pearson). Significance level was set at $p < 0.05$.

Results

Thirty-six subjects participated in this study. Demographic characteristics are presented in Table 3.

Gene expression

Relative gene expression mean levels of RUNX-2 (Control $1,18 \pm 0,25$; Test $1,07 \pm 0,06$), Osterix (Control: $1,10 \pm 0,14$; Test: $2,09 \pm 0,35$), ALP (Control: $1,15 \pm 0,18$; Test: $0,82 \pm 0,10$), BSP (Control: $1,27 \pm 0,18$; Test: $0,36 \pm 0,11$) e OPN (Control: $1,21 \pm 0,23$; Test: $0,48 \pm 0,08$) are shown in Figure 2. Test Group presented significantly lower mean levels of BSP and OPN than Control Group ($p < 0,05$). Osterix mean levels were higher ($p < 0,05$) in Test Group than Control Group. No significant differences were observed between groups to RUNX-2 and ALP.

Relative gene expression mean levels of VEGF-A (Control: $0,84 \pm 0,13$; Test: $0,85 \pm 0,10$) and FGF-2 (Control: $1,60 \pm 0,35$; Test: $4,65 \pm 0,95$) are shown in Figure 3.

FGF-2 mean levels were higher in Test Group ($p < 0,05$). No significant difference between groups was observed to VEGF-A.

Immunological analysis

Mean levels (pg/mL) of OCN (Control: $189,6 \pm 48,51$; Test: $19,62 \pm 2,84$) and OPN (Control: $3,71 \pm 1,48$; Test: $0,55 \pm 0,19$) are shown in Figure 4. OCN and OPN mean levels were significant lower in Test Group ($p < 0,05$).

EGF (Control: $0,8017 \pm 0,11$; Test: $1,07 \pm 0,25$), ANGIOPOIETIN-2 (Control: $61,88 \pm 9,36$; Test: $140 \pm 23,79$), BMP-9 (Control: $0,87 \pm 0,027$; Test: $1,50 \pm 0,07$), FGF-1 (Control: $92,73 \pm 8,58$; Test: $144 \pm 14,89$), VEGF-C (Control: $25,91 \pm 6,13$; Test: $60,77 \pm 9,64$), VEGF-D (Control: $3184 \pm 366,5$; Test: $16,45 \pm 1,68$), FGF-2 (Control: $3184 \pm 366,5$; Test: $4487 \pm 600,1$), VEGF-A (Control: $30,49 \pm 1,92$; Test: $114,1 \pm 24,03$) mean levels are shown in Figure 5. Test Group presented significantly higher mean levels of ANGIOPOIETINA-2 BMP-9, FGF-1, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-A ($p < 0,05$).

Discussion

This in vitro study investigated the angiogenic and osteogenic potential of fresh dental pulp tissue with or without EMD stimulation through gene and protein expression. Several studies have shown this EMD potential on dental pulp stem cells. However, therapeutic use of these cells has not been established in clinical practice. The requirement of cell culture raises the cost of this procedure. Thus, investigation of dental pulp clinical application becomes necessary, considering a tissue that is usually discarded after tooth extraction. Literature has shown evidences that stimulation of dental pulp stem cells with EMD promoted osteoblastic differentiation e mineralized matrix production. Based on these findings, we sought to investigate osteogenic and angiogenic effect of EMD on fresh dental pulp tissue ex vivo model. For this purpose, EMD was applied (ratio 1:1) in the dental pulp immediately after tooth extraction and left 20 minutes at room temperature. Samples were frozen subsequently. This time (20 minutes) was established considering clinical handling to tissue access and to simulating a graft procedure, and also, to ensure sample integrity for subsequent laboratory analysis.

Results showed that EMD enhanced all genes and proteins expression related to angiogenesis. However, variation in the results was found in the osteogenesis

analysis. Due to the absence of study evaluating *ex vivo* model of EMD effect on fresh dental pulp tissue, our results will be discussed with studies using dental pulp cell culture model. Wang et al. (2014), reported increased gene expression of ALP, OPN, Osterix and Runx-2 after EMD addition in dental pulp cell culture after 14 days. The authors concluded that EMD has an effect on dental pulp cell behavior playing a regulatory role in the mineralization process. Nonetheless, in the present study we observed a significant decrease in OPN and OCN gene and protein expression in the test group. OPN is a secreted glycoprophosphoprotein that is found in both mineralized and non-mineralized tissues and play a crucial role in modulating apatite crystal growth in bones. OCN is non-collagenous protein specific of late-stage osteoblast differentiation. In this study, BSP gene expression was also lower in the test group. BSP is also a glycoprotein that represents one of the major non-collagenous extracellular matrix proteins associated with mineralized tissues. Studies on the developmental expression of BSP have shown the BSP mRNA is expressed at high levels by osteoblasts at the onset of bone formation (Tsukamoto-Tanaka et al., 2006). Osterix and Runx-2 are also essential transcriptions factors for osteoblast differentiation and bone formation. Osterix and Runx-2 deficient mice were deficient in bone formation because of maturation arrest of osteoblasts (Nakashima et al., 2002, Komori et al., 1997, Ducy et al., 1999). These two transcription factors govern the critical regulation of osteoblast differentiation and bone formation. Osterix expression was increased after EMD application as noted by Wang et al. (2014). But, Runx-2 and ALP showed no statistically significant difference between the groups, contrasting other studies findings (Wang et al., 2014, Kaida et al., 2008, Mori et al., 2011, Ishizaki et al., 2003).

The mechanism by which EMD influences dental pulp cells is not yet fully understood. Some studies suggest that EMD may directly stimulate dental pulp tissue to produce collagen matrix for calcification (Ishizaki et al., 2003), and TGF- β 1 (Transforming growth factor beta 1) or amelogenins present in EMD activate cell signaling to stimulate matrix formation and subsequent mineralization (Kawase et al., 2001, Kawase et al., 2002). Mori et al. (2011), also found that EMD addition in the medium culture of dental pulp cells increased ALP, OPN e OCN gene expression. However, the *ex vivo* model presented in this study with EMD stimulation of dental pulp tissue for 20 minutes was not enough to increase osteogenic gene expression (Runx-2, ALP), showing no significant difference between groups. Moreover, it is

presumable that the osteoblastic markers decrease (BSP, OPN e OCN) in the test group occurred due the absence of cell culture media and short period of EMD action. Nevertheless, this timing was sufficient to increase genes and proteins expression related to angiogenesis. Thus, we believe that EMD stimulation may initially direct dental pulp cell function to angiogenic process.

Most gene therapy strategies to facilitate bone regeneration, as was discussed above, focus on the delivery and expression of osteoinductive genes. However, some researches have evaluated the importance of angiogenic growth factors to support new bone formation. Mayr-Wohlfart et al. (2002) demonstrated the chemotactic and proliferative effect of VEGF-A in human osteoblast. The authors noted increased migration and cell proliferation, suggesting that VEGF-A may influence bone formation by 2-way: supporting angiogenesis, and also stimulating osteoblast activity. Similarly operate FGF-2, which besides acting in endothelial cells, appears to stimulate osteoblast proliferation (Yang et al., 2012). The ability to induce angiogenesis and vascularization as a therapeutic strategy provides a suitable environment for migration, cell proliferation and differentiation, thus favoring matrix extracellular synthesis during early stages of bone regeneration (Thoma et al., 2011). Previous studies, demonstrated the angiogenic capacity of EMD in rats (Yuan et al., 2003), mices (Thoma et al., 2011), and also chorioallantoic membrane eggs (Kauvar et al., 2010). Angiogenesis is considered as a crucial factor to bone healing (Tonnesen et al., 2000). Therefore, therapeutic use of certain biological mediators can stimulate and coordinate regenerative processes. In this study, all investigated genes and proteins related to angiogenesis showed higher expression after EMD stimulation. EMD application for 20 minutes was sufficient to increase gene expression of VEGF-A and FGF-2, and ANGIOPOIETIN-2, BMP-9, FGF-1, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-A proteins expression.

A wide variety of growth factors are being investigated in the field of tissue engineering to treat bone defects through natural healing observation. Growth factors can facilitate tissue regeneration by stimulating cell activity, such as recruitment, adhesion, proliferation and differentiation (Bayer et al., 2015). Implants osseointegration is associated with inflammation decrease and increased angiogenic expression in the early stages of healing (Salvi et al., 2015). The importance of angiogenesis in wound healing and bone regeneration is well established and represents a potential mechanism to modulate implants osseointegration. This

approach can also be supported by studies that demonstrated an increase in bone-implant contact levels after growth factor addition to implant surface (Stanford, 2010). A possible therapeutic use of dental pulp tissue associated with EMD consists in its addition to particulate bone graft to fill gaps in immediate implants or in post-extraction sockets, using dental pulp tissue of the extracted tooth. A clinical study (Öncü and Alaaddinoğlu, 2015) demonstrated that application of Platelet Rich Fibrin (PRF) in alveolar socket surgically created increased implant stability after one week, evaluated by Osstel. The authors suggest that growth factor release by PRF application favored bone regeneration and accelerated osseointegration process. Likewise, using PRF in post-extraction sockets to ridge maintenance was clinically effective (Anwandter et al., 2016). These results can be explained by the release of growth factors locally, such as BMP's, PDGF, FGF (1 and 2) and VEGF (A and C) through platelets activation leading to chemotaxis of undifferentiated cells (Anitua et al., 2004). Following this reasoning, the presence of growth factors such as VEGF (A, C and D), FGF (1 and 2), Angiopoietin-2 and BMP-9 resulting from the dental pulp tissue and EMD association, may also improve osteogenesis and can be used in combination with particulate bone substitute. However, these are results from an in vitro study and clinical trials are required to confirm our findings.

Focusing on the clinical use of the extracted tooth aiming bone regeneration, recent studies sought to evaluate clinical results of this application. Pang et al. (2016), evaluated clinical efficacy and histological characteristics of demineralized dentin matrix, called by the authors of bone graft material from autogenous tooth (AutoBT) in comparison to inorganic bovine bone graft (Bio-Oss® Geistlich Pharma, Wolhusen, Switzerland), for bone augmentation in post-extraction sockets in a randomized clinical trial. It was observed similar volume and histological characteristics of the newly formed bone between the 2 groups. Primary implant stability in the grafted area were also similar in both groups, with no significant difference. Therefore, the authors concluded that autogenous tooth as a substitute for bone graft showed minimal tissue response and present potential to bone regeneration as well as inorganic bovine bone graft. Another research group (Brunelli et al., 2013) developed a protocol (Rigenera Protocol) for immediate use of dental pulp tissue from extracted tooth. In this case report, dental pulp is dissociated in a proper equipment (Rigenera System HBW srl, Turin, Italy) for 30 seconds and then, the cell suspension is collected and applied to collagen sponge and used immediately for maxillary sinus

lifting. After 4 months, the authors noted new bone formation in the grafted area through computed tomography. From these researches and the results of this present study, the application of biological discards after tooth extraction, appears to be a promising proposal to promote bone regeneration.

It may be concluded that EMD application in dental pulp tissue in ex vivo model increased gene and protein expression related to angiogenesis. Therefore, it seems that this therapeutic approach can influence bone regeneration, but randomized clinical trials are required to confirm our findings and to validate this therapy approach.

References

- AMLER, M. H. 1969. The time sequence of tissue regeneration in human extraction wounds. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 27, 309-18.
- ANITUA, E., ANDIA, I., ARDANZA, B., NURDEN, P. & NURDEN, A. T. 2004. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost*, 91, 4-15.
- ANWANDTER, A., BOHMANN, S., NALLY, M., CASTRO, A. B., QUIRYNEN, M. & PINTO, N. 2016. Dimensional changes of the post extraction alveolar ridge, preserved with Leukocyte- and Platelet Rich Fibrin: A clinical pilot study. *J Dent*.
- ARAÚJO, M. G. & LINDHE, J. 2005. Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog. *J Clin Periodontol*, 32, 212-8.
- ARAÚJO, M. G., SILVA, C. O., MISAWA, M. & SUKEKAVA, F. 2015. Alveolar socket healing: what can we learn? *Periodontol 2000*, 68, 122-34.
- BAB, I. A. & EINHORN, T. A. 1994. Polypeptide factors regulating osteogenesis and bone marrow repair. *J Cell Biochem*, 55, 358-65.
- BAYER, E. A., GOTTARDI, R., FEDORCHAK, M. V. & LITTLE, S. R. 2015. The scope and sequence of growth factor delivery for vascularized bone tissue regeneration. *J Control Release*, 219, 129-40.
- BOSSHARDT, D. D. 2008. Biological mediators and periodontal regeneration: a review of enamel matrix proteins at the cellular and molecular levels. *J Clin Periodontol*, 35, 87-105.
- BROOKES, S. J., ROBINSON, C., KIRKHAM, J. & BONASS, W. A. 1995. Biochemistry and molecular biology of amelogenin proteins of developing dental enamel. *Arch Oral Biol*, 40, 1-14.
- BRUNELLI, G., MOTRONI, A., GRAZIANO, A., D'AQUINO, R., ZOLLINO, I. & CARINCI, F. 2013. Sinus lift tissue engineering using autologous pulp micro-grafts: A case report of bone density evaluation. *J Indian Soc Periodontol*, 17, 644-7.
- CRITCHLOW, M. A., BLAND, Y. S. & ASHHURST, D. E. 1995. The effect of exogenous transforming growth factor-beta 2 on healing fractures in the rabbit. *Bone*, 16, 521-7.
- DUCY, P., STARBUCK, M., PRIEMEL, M., SHEN, J., PINERO, G., GEOFFROY, V., AMLING, M. & KARSENTY, G. 1999. A Cbfa1-dependent genetic pathway controls bone formation beyond embryonic development. *Genes Dev*, 13, 1025-36.
- ESPOSITO, M., GRUSOVIN, M. G., PAPANIKOLAOU, N., COULTHARD, P. & WORTHINGTON, H. V. 2009. Enamel matrix derivative (Emdogain(R)) for

- periodontal tissue regeneration in intrabony defects. *Cochrane Database Syst Rev*, CD003875.
- FISHER, J. P., LALANI, Z., BOSSANO, C. M., BREY, E. M., DEMIAN, N., JOHNSTON, C. M., DEAN, D., JANSEN, J. A., WONG, M. E. & MIKOS, A. G. 2004. Effect of biomaterial properties on bone healing in a rabbit tooth extraction socket model. *J Biomed Mater Res A*, 68, 428-38.
- GALLI, C., MACALUSO, G. M., GUIZZARDI, S., VESCOVINI, R., PASSERI, M. & PASSERI, G. 2006. Osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand modulation by enamel matrix derivative in human alveolar osteoblasts. *J Periodontol*, 77, 1223-8.
- GRANDIN, H. M., GEMPERLI, A. C. & DARD, M. 2012. Enamel matrix derivative: a review of cellular effects in vitro and a model of molecular arrangement and functioning. *Tissue Eng Part B Rev*, 18, 181-202.
- GRONTHOS, S., MANKANI, M., BRAHIM, J., ROBEY, P. G. & SHI, S. 2000. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 13625-30.
- HAMMARSTRÖM, L., HEIJL, L. & GESTRELIUS, S. 1997. Periodontal regeneration in a buccal dehiscence model in monkeys after application of enamel matrix proteins. *J Clin Periodontol*, 24, 669-77.
- HEIJL, L. 1997. Periodontal regeneration with enamel matrix derivative in one human experimental defect. A case report. *J Clin Periodontol*, 24, 693-6.
- ISHIZAKI, N. T., MATSUMOTO, K., KIMURA, Y., WANG, X. & YAMASHITA, A. 2003. Histopathological study of dental pulp tissue capped with enamel matrix derivative. *J Endod*, 29, 176-9.
- KAIDA, H., HAMACHI, T., ANAN, H. & MAEDA, K. 2008. Wound healing process of injured pulp tissues with emdogain gel. *J Endod*, 34, 26-30.
- KAUVAR, A. S., THOMA, D. S., CARNES, D. L. & COCHRAN, D. L. 2010. In vivo angiogenic activity of enamel matrix derivative. *J Periodontol*, 81, 1196-201.
- KAWASE, T., OKUDA, K., MOMOSE, M., KATO, Y., YOSHIE, H. & BURNS, D. M. 2001. Enamel matrix derivative (EMDOGAIN) rapidly stimulates phosphorylation of the MAP kinase family and nuclear accumulation of smad2 in both oral epithelial and fibroblastic human cells. *J Periodontal Res*, 36, 367-76.
- KAWASE, T., OKUDA, K., YOSHIE, H. & BURNS, D. M. 2002. Anti-TGF-beta antibody blocks enamel matrix derivative-induced upregulation of p21WAF1/cip1 and prevents its inhibition of human oral epithelial cell proliferation. *J Periodontal Res*, 37, 255-62.
- KOMORI, T., YAGI, H., NOMURA, S., YAMAGUCHI, A., SASAKI, K., DEGUCHI, K., SHIMIZU, Y., BRONSON, R. T., GAO, Y. H., INADA, M., SATO, M., OKAMOTO, R., KITAMURA, Y., YOSHIKI, S. & KISHIMOTO, T. 1997. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell*, 89, 755-64.
- MAYR-WOHLFART, U., WALTENBERGER, J., HAUSSER, H., KESSLER, S., GÜNTHER, K. P., DEHIO, C., PUHL, W. & BRENNER, R. E. 2002. Vascular endothelial growth factor stimulates chemotactic migration of primary human osteoblasts. *Bone*, 30, 472-7.
- MORI, G., BRUNETTI, G., ORANGER, A., CARBONE, C., BALLINI, A., LO MUZIO, L., COLUCCI, S., MORI, C., GRASSI, F. R. & GRANO, M. 2011. Dental pulp stem cells: osteogenic differentiation and gene expression. *Ann N Y Acad Sci*, 1237, 47-52.

- NAKASHIMA, K., ZHOU, X., KUNKEL, G., ZHANG, Z., DENG, J. M., BEHRINGER, R. R. & DE CROMBRUGGHE, B. 2002. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*, 108, 17-29.
- NOVAES, A. B., MACEDO, G. O., SUAID, F. A., BARROS, R. R., SOUZA, S. L. & SILVEIRA E SOUZA, A. M. 2011. Histologic evaluation of the buccal and lingual bone plates in anterior dog teeth: possible influence on implant dentistry. *J Periodontol*, 82, 872-7.
- PANG, K. M., UM, I. W., KIM, Y. K., WOO, J. M., KIM, S. M. & LEE, J. H. 2016. 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*.
- RANGANATHAN, K. & LAKSHMINARAYANAN, V. 2012. Stem cells of the dental pulp. *Indian J Dent Res*, 23, 558.
- RESELAND, J. E., REPPE, S., LARSEN, A. M., BERNER, H. S., REINHOLT, F. P., GAUTVIK, K. M., SLABY, I. & LYGSTADAAS, S. P. 2006. The effect of enamel matrix derivative on gene expression in osteoblasts. *Eur J Oral Sci*, 114 Suppl 1, 205-11; discussion 254-6, 381-2.
- RIKSEN, E. A., LANDIN, M. A., REPPE, S., NAKAMURA, Y., LYGSTADAAS, S. P. & RESELAND, J. E. 2014. Enamel matrix derivative promote primary human pulp cell differentiation and mineralization. *Int J Mol Sci*, 15, 7731-49.
- RODRÍGUEZ-LOZANO, F. J., INSAUSTI, C. L., MESEGUER, L., RAMÍREZ, M. C., MARTÍNEZ, S. & MORALEDA, J. M. 2012. Tissue engineering with dental pulp stem cells: isolation, characterization, and osteogenic differentiation. *J Craniofac Surg*, 23, e571-5.
- SAKODA, K., NAKAJIMA, Y. & NOGUCHI, K. 2012. Enamel matrix derivative induces production of vascular endothelial cell growth factor in human gingival fibroblasts. *Eur J Oral Sci*, 120, 513-9.
- SALVI, G. E., BOSSHARDT, D. D., LANG, N. P., ABRAHAMSSON, I., BERGLUNDH, T., LINDHE, J., IVANOVSKI, S. & DONOS, N. 2015. Temporal sequence of hard and soft tissue healing around titanium dental implants. *Periodontol* 2000, 68, 135-52.
- SCHWARTZ, Z., CARNES, D. L., PULLIAM, R., LOHMANN, C. H., SYLVIA, V. L., LIU, Y., DEAN, D. D., COCHRAN, D. L. & BOYAN, B. D. 2000. Porcine fetal enamel matrix derivative stimulates proliferation but not differentiation of pre-osteoblastic 2T9 cells, inhibits proliferation and stimulates differentiation of osteoblast-like MG63 cells, and increases proliferation and differentiation of normal human osteoblast NHOst cells. *J Periodontol*, 71, 1287-96.
- SCULEAN, A., SCHWARZ, F., BECKER, J. & BRECX, M. 2007. The application of an enamel matrix protein derivative (Emdogain) in regenerative periodontal therapy: a review. *Med Princ Pract*, 16, 167-80.
- SELA, J. J. & BAB, I. A. 2012. Principles of Bone Regeneration. In: SCIENCES, I. O. D., JERUSALEM, T. H. U. O. & JERUSALEM, I. (eds.) © Springer Science+Business Media. New York, NY: Springer.
- SOLHEIM, E. 1998. Growth factors in bone. *Int Orthop*, 22, 410-6.
- STANFORD, C. M. 2010. Surface modification of biomedical and dental implants and the processes of inflammation, wound healing and bone formation. *Int J Mol Sci*, 11, 354-69.
- THOMA, D. S., VILLAR, C. C., CARNES, D. L., DARD, M., CHUN, Y. H. & COCHRAN, D. L. 2011. Angiogenic activity of an enamel matrix derivative (EMD)

- and EMD-derived proteins: an experimental study in mice. *J Clin Periodontol*, 38, 253-60.
- TONNESEN, M. G., FENG, X. & CLARK, R. A. 2000. Angiogenesis in wound healing. *J Invest Dermatol Symp Proc*, 5, 40-6.
- TSUKAMOTO-TANAKA, H., IKEGAME, M., TAKAGI, R., HARADA, H. & OHSHIMA, H. 2006. Histochemical and immunocytochemical study of hard tissue formation in dental pulp during the healing process in rat molars after tooth replantation. *Cell Tissue Res*, 325, 219-29.
- VENEZIA, T. A., MERCHANT, A. A., RAMOS, C. A., WHITEHOUSE, N. L., YOUNG, A. S., SHAW, C. A. & GOODELL, M. A. 2004. Molecular signatures of proliferation and quiescence in hematopoietic stem cells. *PLoS Biol*, 2, e301.
- WANG, Y., ZHAO, Y. & GE, L. 2014. Effects of the enamel matrix derivative on the proliferation and odontogenic differentiation of human dental pulp cells. *J Dent*, 42, 53-9.
- YANAGI, M., BUKH, J., EMERSON, S. U. & PURCELL, R. H. 1996. Contamination of commercially available fetal bovine sera with bovine viral diarrhea virus genomes: implications for the study of hepatitis C virus in cell cultures. *J Infect Dis*, 174, 1324-7.
- YANG, Y. Q., TAN, Y. Y., WONG, R., WENDEN, A., ZHANG, L. K. & RABIE, A. B. 2012. The role of vascular endothelial growth factor in ossification. *Int J Oral Sci*, 4, 64-8.
- YUAN, K., CHEN, C. L. & LIN, M. T. 2003. Enamel matrix derivative exhibits angiogenic effect in vitro and in a murine model. *J Clin Periodontol*, 30, 732-8.
- ÖNCÜ, E. & ALAADDINOĞLU, E. E. 2015. The effect of platelet-rich fibrin on implant stability. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 30, 578-82.

Figure Legends

Figure 1. Flow chart of the study design

Figure 2. (A) Crown opening with pliers pincer type Immediately after tooth extraction (B) Collect of dental pulp tissue curettage of the pulp chamber with 15C scalpel blade (C) Dental pulp tissue was inserted in cryotube and left 20 minutes at room temperature (D) Samples were stored in a freezer at -80°C

Figure 3. Relative expression mean levels and standard deviations of related osteogenesis genes (A) Runx-2, (B) Osterix, (C) ALP, (D) BSP and (E) OPN in control and test groups. (*) Significant difference between groups ($p < 0,05$)

Figure 4. Relative expression mean levels and standard deviations of related angiogenesis genes (A) VEGF-A and (B) FGF-2 in control and test groups. (*) Significant difference between groups ($p < 0,05$)

Figure 5. Mean levels and standard deviations (pg/ml) of related osteogenesis proteins (A) OCN and (B) OPN in control and test groups. (*) Significant difference between groups ($p < 0,05$)

Figure 6. Mean levels and standard deviations (pg/ml) of related angiogenesis proteins (A) EGF, (B) Angiopoietin-2, (C) BMP-9, (D) FGF-1, (E) VEGF-A, (F) VEGF-C and (G) FGF-2 in control and test groups. (*) Significant difference between groups ($p < 0,05$)

Table 1 – Demographic characteristics of subject population

Variable	All Mean ± SD	Control	Test	p value
Number of subjects	36	18	18	-
Age		22,27 ± 3,96	21,25 ± 3,26	NS
Gender (F/M)	22F/14M	12F/6M	10F/8M	NS
Tooth	Third molars	Third molars	Third molars	-

SD = standard deviation; NS = no significant difference

FIGURE 2

FIGURE 3

FIGURE 4 **FIGURE 5**

FIGURE 6