

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

LETÍCIA FAUSTINO ADOLPHO

**Efeito de células-tronco mesenquimais derivadas do ligamento
periodontal de humanos com alto e baixo potencial osteogênico no
reparo ósseo de defeitos criados em calvárias de ratos**

RIBEIRÃO PRETO

2021

LETÍCIA FAUSTINO ADOLPHO

Efeito de células-tronco mesenquimais derivadas do ligamento periodontal de humanos com alto e baixo potencial osteogênico no reparo ósseo de defeitos criados em calvárias de ratos

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

Programa: Odontologia (Periodontia)
Área de Concentração: Cirurgia Buco-Maxilo-Facial

Orientador: Prof. Dr. Márcio Mateus Beloti

VERSÃO CORRIGIDA

RIBEIRÃO PRETO

2021

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Catálogo na Publicação

Serviço de Documentação Odontológica

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Adolpho, Letícia Faustino

Efeito de células-tronco mesenquimais derivadas do ligamento periodontal de humanos com alto e baixo potencial osteogênico no reparo ósseo de defeitos criados em calvárias de ratos. Ribeirão Preto, 2021.

85p.: il.; 30 cm

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências. Ribeirão Preto, 2021.

Área de Concentração: Cirurgia Buco-Maxilo-Facial

Orientador: Prof. Dr. Márcio Mateus Beloti

1. Célula-tronco. 2. Osso. 3. Reparo ósseo. 4. Terapia celular. 5. Ligamento periodontal. 6. Osteoblasto.

FOLHA DE APROVAÇÃO

ADOLPHO LF. Efeito de células-tronco mesenquimais derivadas do ligamento periodontal de humanos com alto e baixo potencial osteogênico no reparo ósseo de defeitos criados em calvárias de ratos

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

Programa: Odontologia (Periodontia)
Área de Concentração: Cirurgia Buco-Maxilo-Facial

Aprovada em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Trabalho realizado nos Laboratórios de Cultura de Células, de Biologia Molecular, de Histologia, LAB 3D BIO e no Biotério da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) na modalidade Bolsa de Mestrado (Processo nº 2019/10076-0) e Auxílio à Pesquisa - Projeto Temático (Processo nº 2017/12622-7).

DEDICO,

Aos meus amados pais,
Daisy e Artur.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por sempre me guiar e abençoar meus caminhos.

Aos meus pais, **Artur** e **Daisy**, pelo amor incondicional, por serem meu exemplo de força, perseverança, responsabilidade e dedicação; por estarem ao meu lado em todos os momentos e por me apoiarem incondicionalmente em todos os meus sonhos e objetivos; por me incentivarem através do exemplo e das palavras a ser melhor a cada dia. Amo vocês infinitamente.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Márcio Mateus Beloti**, por me aceitar como sua aluna e confiar no meu potencial; pela orientação, por todos os conhecimentos transmitidos e por cada palavra de incentivo; por ser um pesquisador exemplar, um ser humano extremamente gentil e uma inspiração para minha vida acadêmica.

Ao **Prof. Dr. Adalberto Luiz Rosa**, por confiar no meu potencial, por todos os conhecimentos transmitidos, por toda a sua dedicação à ciência e por ser um exemplo e uma inspiração como pesquisador.

À **Prof. Dra. Emanuela Prado Ferraz**, pelos conhecimentos transmitidos na clínica e no laboratório, desde minha graduação.

Aos professores do Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia, **Prof. Dr. Waldemar Mallet da Rocha Barros**, **Prof. Dr. Cássio Edvard Sverzut**, **Prof. Dr. Alexandre Elias Trivellato** e **Prof. Dr. Samuel Porfírio Xavier** pelos conhecimentos transmitidos.

À **Helena e ao Gileade**, por estarem sempre dispostos a ajudar e ensinar; pelos conhecimentos transmitidos e experiências compartilhadas; por todo incentivo, pela confiança e por terem se tornado meus grandes amigos.

Ao **Alann**, que me acolheu desde a iniciação científica, por sempre me incentivar, apoiar, acolher e ensinar; por ser um exemplo de dedicação e um grande amigo.

À **Denise**, minha grande amiga, por estar sempre ao meu lado, pela paciência, compreensão, ajuda, escuta e incentivo; por ser meu exemplo de força e coragem na vida. Amo você, amiga.

Ao **Rodrigo**, por sempre transmitir seus conhecimentos, por todo incentivo e por confiar no meu potencial.

À **Paola, Ana Carolina, Gabriela e Rayana** pela amizade e convivência diária e pelas experiências e conhecimentos compartilhados.

Aos amigos de laboratório **Maria Paula, Jaqueline, Jéssica, José Bernardo, Thaís e Letícia** pela convivência diária e pelas experiências e conhecimentos compartilhados.

Aos amigos da pós-graduação **Gabriel, João, José Henrique, Adriano, Lucas Moura, Lucas Nogueira, Juliana e Felipe** pela convivência e ensinamentos compartilhados na clínica.

Aos **alunos** de iniciação científica do Bone Research Lab pela convivência diária e por me permitirem contribuir em seus trabalhos, auxiliando minha formação.

Aos técnicos, **Roger, Fabíola, Adriana e Milla** por compartilharem seus conhecimentos e me orientarem na execução das diversas etapas desse estudo. Ao Roger, por me acolher no laboratório desde 2014, por transmitir para mim seu conhecimento em cultura de células e por ter se tornado meu amigo. À Fabíola por todos os seus ensinamentos de biologia molecular. À Adriana por todo o seu generoso auxílio nas etapas de processamento histológico desse trabalho.

Às funcionárias **Isabel, Imaculada, Dulce, Daniela, Rosângela** por sempre me auxiliarem quando precisei.

Aos **funcionários** do Biotério da FORP-USP pelo auxílio e orientação na manutenção e manejo dos animais.

À *Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo* e seus funcionários pela estrutura que permitiu a execução desse trabalho.

À **FAPESP** pelo apoio financeiro para a execução desse projeto. Processo nº 2019/10076-0, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2019-2021). Processo nº 2017/12622-7, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2018-2023).

À **CAPES** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e ao **CNPq** (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

Muito obrigada.

RESUMO

ADOLPHO, LF. **Efeito de células-tronco mesenquimais derivadas do ligamento periodontal de humanos com alto e baixo potencial osteogênico no reparo ósseo de defeitos criados em calvárias de ratos.** 2021. 85p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

A terapia com células-tronco mesenquimais (MSCs) é uma das estratégias utilizadas em medicina regenerativa e que pode ser aplicada na regeneração óssea. MSCs podem ser isoladas de diversos sítios do organismo, como medula óssea, tecido adiposo, cordão umbilical, músculo e ligamento periodontal. Nosso grupo de pesquisa tem avaliado estratégias para promover a regeneração óssea em modelo de defeitos criados em calvária de ratos e, em estudos recentes, demonstramos que MSCs injetadas localmente são mais efetivas comparadas ao uso de biomaterial isolado ou em combinação com células. A coleta do ligamento periodontal de dentes extraídos é um procedimento simples e esse tecido é fonte de PDLSCs (do inglês, periodontal ligament stem cells). Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que essas células têm capacidade de diferenciação osteoblástica e de formar matriz mineralizada. Além disso, PDLSCs podem apresentar diferentes potenciais osteogênicos. Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade PDLSCs com alto (AP-PDLSCs) e baixo potencial (BP-PDLSCs) osteogênico, além de ambas as populações de células misturadas (AP-PDLSCs+BP-PDLSCs), para reparar o tecido ósseo, após injeção local em defeitos criados em calvárias de ratos. As células foram obtidas do ligamento periodontal de terceiros molares inclusos extraídos, caracterizadas *in vitro* quanto à capacidade de proliferação e diferenciação osteoblástica e classificadas como AP-PDLSCs ou BP-PDLSCs. Em seguida, defeitos unilaterais, com 5 mm de diâmetro, foram criados em calvárias de ratos da linhagem Sprague-Dawley e 2 semanas após a criação dos defeitos, 5×10^6 AP-PDLSCs, BP-PDLSCs ou AP-PDLSCs+BP-PDLSCs (1:1), foram injetadas diretamente em cada defeito ósseo. Como controle, foram utilizados defeitos tratados com veículo (PBS). Quatro semanas após a injeção, foram avaliadas a formação óssea por microtomografia computadorizada, análise histológica, e expressão gênica de *Runx2*, *Sp7*, *Alp*, *Bglap*, *Ibsp*, *Opg*, *Rankl*, *Rank*, *Cd31*, *Vegfa* e *Vegfr2* por PCR em tempo real. Os resultados demonstram que as PDLSCs apresentaram capacidade de adesão ao plástico e fenótipo típico de MSCs, evidenciado pela expressão de marcadores mesenquimais e ausência de marcadores hematopoiéticos na superfície das células. Ainda, as AP-PDLSCs e BP-PDLSCs apresentaram *in vitro* diferentes potenciais de diferenciação osteoblástica, demonstrado pela maior atividade *in situ* de ALP nas AP-PDLSCs. A formação de matriz mineralizada, no entanto, foi semelhante nas duas culturas. *In vivo*, não houve diferença na capacidade de induzir o reparo de defeitos ósseo entre AP-

PDLSCs, BP-PDLSCs e AP-PDLSCs+BP-PDLSCs e em todos os casos a formação óssea foi maior do que nos defeitos tratados com PBS. O tecido neoformado nos defeitos tratados com células também apresentou características similares. A expressão gênica nos tecidos neoformados indica a ocorrência de remodelação óssea nos defeitos tratados com células, principalmente naqueles tratados com AP-PDLSCs. Tomados em conjunto, os dados demonstraram que, no período avaliado, independentemente do potencial osteogênico *in vitro*, as PDLSCs induziram formação óssea semelhante em defeitos criados em calvária de ratos e, portanto, podem ser consideradas para o desenvolvimento de terapias celulares para o tratamento de defeitos ósseos.

Palavras-chave: Célula-tronco. Osso. Reparo ósseo. Terapia celular. Ligamento periodontal. Osteoblasto.

ABSTRACT

ADOLPHO, LF. **Effect of human periodontal ligament-derived mesenchymal stem cells with high and low osteogenic potential on bone repair of defects created in rat calvaria.** 2021. 85p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Therapy with mesenchymal stem cells (MSCs) is one of the strategies used in regenerative medicine that can be applied to regenerate bone tissue. MSCs can be isolated from several sites of the body, such as bone marrow, adipose tissue, umbilical cord, muscle, and periodontal ligament. Our research group has evaluated strategies to promote bone regeneration in a model of defects created in rat calvaria and, in recent studies, we have shown that locally injected MSCs are more effective compared to the use of biomaterial itself or in combination with cells. The periodontal ligament harvest from extracted teeth is a simple procedure and this tissue is a source of periodontal ligament stem cells (PDLSCs). *In vitro* and *in vivo* studies have shown that these cells are capable of osteoblastic differentiation and to form mineralized matrix. In addition, PDLSCs may have different osteogenic potentials. In this context, the aim of this study was to evaluate the capacity of PDLSCs with high (AP-PDLSCs) and low osteogenic potential (BP-PDLSCs), as well as both mixed cell populations (AP-PDLSCs+BP-PDLSCs), to repair the bone tissue after locally injected in defects created in rat calvaria. The cells were obtained from the periodontal ligament of extracted third molars, *in vitro* characterized in terms of their capacity for osteoblastic proliferation and differentiation, and sorted as AP-PDLSCs or BP-PDLSCs. Then, unilateral defects, 5 mm in diameter, were created in calvaria of Sprague-Dawley rats and 2 weeks after the creation of the defects, 5×10^6 AP-PDLSCs, BP-PDLSCs, or AP-PDLSCs + BP-PDLSCs (1:1) were directly injected into bone defects. Defects treated with vehicle (PBS) were used as control. Four weeks post-injection, bone formation was evaluated by computed microtomography, histological analysis, and gene expression of *Runx2*, *Sp7*, *Alp*, *Bglap*, *Ibsp*, *Opg*, *Rankl*, *Rank*, *Cd31*, *Vegfa*, and *Vegfr2* by real-time PCR. The results demonstrated that PDLSCs can adhere to plastic and a typical MSC phenotype, evidenced by the expression of mesenchymal markers and the absence of hematopoietic markers on cell surface. Furthermore, AP-PDLSCs and BP-PDLSCs exhibited distinct *in vitro* potential to differentiate into osteoblasts, demonstrated by the higher *in situ* ALP activity of the AP-PDLSCs. The formation of a mineralized matrix was, however, similar in both cell populations. *In vivo*, the ability to induce repair of bone defects was similar for AP-PDLSCs, BP-PDLSCs, and AP-PDLSCs + BP-PDLSCs and in all cases the bone formation was greater compared to defects treated with PBS. Neoformed tissue in defects treated with cells also exhibited the same histological features. Gene expression in newly formed tissues indicated the occurrence of bone remodeling in defects treated with cells, especially in that ones treated with AP-

PDLSCs. Taken together, the data demonstrated that, at the evaluated period, regardless of the *in vitro* osteogenic potential, PDLSCs induced the similar bone formation in defects created in rat calvaria and therefore they can be considered to the development of cell therapies to treat bone defects.

Keywords: Stem cell. Bone. Bone repair. Cell therapy. Periodontal ligament. Osteoblast.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** AP-PDLSC (A) e BP-PDLSCs (B) ao final de 24 horas de cultivo em meio de crescimento. Barra de escala: 100 μm **49**
- Figura 2.** Expressão de marcadores de superfície nas AP-PDLSCs e BP-PDLSCs ao final de 10 dias de cultivo em meio de crescimento..... **50**
- Figura 3.** Proliferação celular de AP-PDLSCs e BP-PDLSCs ao final de 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 dias de cultivo em meio de crescimento. Os dados estão representados como média \pm desvio-padrão (n=5). Asterisco (*) indica diferença estatisticamente significativa entre as AP-PDLSCs e BP-PDLSCs quando comparadas no mesmo período (teste t, $p \leq 0,05$)..... **51**
- Figura 4.** Atividade *in situ* de ALP nas culturas de AP-PDLSCs e BP-PDLSCs ao final de 14 dias de cultivo em meio osteogênico. Os dados estão representados como média \pm desvio-padrão (n=3). Asterisco (*) indica diferença estatisticamente significativa entre as AP-PDLSCs e BP-PDLSCs (teste t, $p \leq 0,05$)..... **52**
- Figura 5.** Formação de matriz extracelular mineralizada nas culturas de AP-PDLSCs e BP-PDLSCs ao final de 21 dias de cultivo em meio osteogênico. Os dados estão representados como média \pm desvio-padrão (n=3). Asterisco (*) indica diferença estatisticamente significativa entre as AP-PDLSCs e BP-PDLSCs (teste t, $p \leq 0,05$)..... **53**
- Figura 6.** Reconstruções microtomográfica tridimensionais dos defeitos ósseos criados em calvária de ratos 4 semanas a injeção local de PBS (A), AP-PDLSCs (B), BP-PDLSCs (C) e AP-PDLSCs+BP-PDLSCs (D). Parâmetros morfométricos obtidos após as reconstruções tridimensionais (E – M). Os dados estão representados como média \pm desvio-padrão (n=12). Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos (ANOVA, $p \leq 0,05$)..... **54**
- Figura 7.** Fotomicrografias do tecido neoformado nos defeitos ósseos criados em calvária de ratos 4 semanas após a injeção local de PBS (A, E), AP-PDLSCs (B, F), BP-PDLSCs (C, G) e AP-PDLSCs+BP-PDLSCs (D, H). Coloração: Hematoxilina e eosina (HE). ob: osteoblasto, ot: osteócito, oi: osso imaturo, ol: osso lamelar, tc: tecido conjuntivo. Barra de escala: A – D: 1,25 mm; E – F: 100 μm **55**

- Figura 8.** Integridade do RNA obtido da calvária do grupo CTL e dos tecidos neoformados nos defeitos ósseos criados em calvária de ratos 4 semanas após a injeção local de PBS, AP-PDLSCs, BP-PDLSCs e AP-PDLSCs+BP-PDLSCs..... **56**
- Figura 9.** Expressão gênica relativa de marcadores osteogênicos e osteoclastogênicos no tecido obtido da calvária do grupo CTL e dos tecidos neoformados nos defeitos ósseos criados em calvária de ratos 4 semanas após a injeção local de PBS, AP-PDLSCs, BP-PDLSCs e AP-PDLSCs+BP-PDLSCs. Os dados estão representados como média \pm desvio-padrão (n=4). Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos (ANOVA, $p \leq 0,05$)..... **59**
- Figura 10.** Expressão gênica relativa de marcadores angiogênicos no tecido obtido da calvária do grupo CTL e dos tecidos neoformados nos defeitos ósseos criados em calvária de ratos 4 semanas após a injeção local de PBS, AP-PDLSCs, BP-PDLSCs e AP-PDLSCs+BP-PDLSCs. Os dados estão representados como média \pm desvio-padrão (n=4). Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos (ANOVA, $p \leq 0,05$)..... **60**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Distribuição dos animais em relação aos ensaios.....	42
Tabela 2.	Sequência de primers, temperatura de anelamento (TA) e número de pares de bases nitrogenadas (pb).....	46
Tabela 3.	Expressão de marcadores de superfície nas AP-PDLSCs e BP-PDLSCs.....	51

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	25
2. OBJETIVO GERAL	33
2.1. Objetivos específicos.....	35
3. MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1. Obtenção e cultura de células.....	39
3.2. Caracterização <i>in vitro</i> das AP-PDLSCs e BP-PDLSCs.....	39
3.2.1. Expressão de marcadores celulares de superfície por citometria de fluxo	39
3.2.2. Proliferação celular	40
3.2.3. Diferenciação osteoblástica	40
3.2.3.1. Atividade <i>in situ</i> de ALP	40
3.2.3.2. Formação de matriz extracelular mineralizada.....	41
3.3. Efeito de PDLSCs injetadas localmente no reparo de defeitos ósseos	42
3.3.1. Animais.....	42
3.3.2. Procedimento cirúrgico para a criação do defeito ósseo	42
3.3.4. Análise microtomográfica (μ CT).....	43
3.3.5. Processamento e análise histológica	44
3.3.6. Análise da expressão gênica (mRNA) por PCR em tempo real.....	44
3.4. Análise Estatística	46
4. RESULTADOS	47
4.1. Cultura celular.....	49
4.2. Expressão de marcadores celulares de superfície por citometria de fluxo	49
4.3. Proliferação celular	51
4.4. Atividade <i>in situ</i> de ALP	52
4.5. Formação de matriz extracelular mineralizada.....	52
4.6. Análise microtomográfica.....	53
4.7. Análise histológica	55
4.8. Análise da expressão gênica (mRNA) por PCR em tempo real	55
5. DISCUSSÃO	61
6. CONCLUSÕES	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

ANEXOS.....	79
Anexo 1	81
Anexo 2	82
Anexo 3	83
Anexo 4	84
Anexo 5.....	85

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O tecido ósseo possui grande capacidade de reparo após injúrias. Porém, traumas, patologias ou processos infecciosos podem causar perdas ósseas extensas que superam a capacidade de reparo do tecido (FILLINGHAM e JACOBS, 2016). Defeitos ósseos e não-união de fraturas fazem do tecido ósseo o segundo tecido mais transplantado no mundo (BALDWIN et al., 2019). Atualmente, os recursos mais comumente utilizados para o tratamento dessas lesões são os enxertos autógenos, aloenxertos e xenoenxertos (KUMAR, VINITHA, FATHIMA, 2013; FILLINGHAM e JACOBS, 2016). O enxerto autógeno é considerado o padrão ouro para o tratamento dos defeitos ósseos, pois é capaz de promover osteoindução, osteocondução e osteogênese, uma vez que possui células, fatores de crescimento e um arcabouço no qual pode ocorrer a proliferação celular e a infiltração vascular (BALDWIN et al., 2019). No entanto, esse enxerto requer a remoção de tecido saudável de uma área doadora, tornando a sua disponibilidade limitada e aumentando a morbidade do procedimento, uma vez que há a necessidade de duas áreas cirúrgicas no mesmo paciente (FINKEMEIER, 2002).

As alternativas existentes para o enxerto autógeno são os aloenxertos e os xenoenxertos. Os aloenxertos apresentam como vantagens a maior disponibilidade e a não ocorrência de duas áreas cirúrgicas no paciente, além de boa osteocondução. No entanto, os procedimentos de esterilização e armazenagem reduzem a resistência do tecido e destroem as células, além de existir risco de transmissão de doenças. Os xenoenxertos são produzidos principalmente a partir de osso bovino, mas assim como os enxertos alógenos não possuem boas propriedades osteogênicas e osteoindutoras, além de terem custo elevado (YOUNGER e CHAPMAN., 1989; ZWINGENBERGER et al., 2012; BALDWIN et al., 2019).

Neste cenário, a terapia com células-tronco surge como alternativa para o tratamento de defeitos ósseos e não-união de fraturas. Células-tronco mesenquimais (MSCs, do inglês, mesenchymal stem cells) são células indiferenciadas, de origem não-hematopoiética, localizadas em nichos específicos no tecido, com capacidade de autorrenovação e multipotentes, ou seja, com capacidade de diferenciação nas linhagens osteoblástica, adipocítica e condroblástica (DOMINICI et al., 2006). As MSCs foram inicialmente isoladas da medula óssea (BM-MSCs, do inglês, bone

marrow mesenchymal stem cells) e posteriormente de diversos outros sítios, como tecido adiposo (AT-MSCs, do inglês, adipose tissue mesenchymal stem cells), nervoso e muscular, cordão umbilical, pele e tecidos dentais (FRIEDENSTEIN, CHAILAKHJAN, LALYKINA, 1970; WEI et al., 2013).

Nosso grupo de pesquisa tem avaliado estratégias para promover regeneração óssea utilizando o modelo de defeito criado em calvária de ratos e alguns estudos utilizando a estratégia de engenharia de tecidos demonstraram que a formação óssea foi maior nos animais que receberam tratamento com biomaterial associado a células em comparação àqueles tratados apenas com biomaterial (FREITAS et al., 2017; LOPES et al., 2016; FERRAZ et al., 2015; SANTOS et al., 2015a; SANTOS et al., 2015b; LOPES et al., 2014; BELOTI et al., 2012). Porém, apesar da associação de células apresentar melhores resultados, estudo recente do nosso grupo utilizando a terapia celular, demonstrou que células injetadas localmente nos defeitos ósseos induziram formação óssea superior em relação às outras estratégias de regeneração previamente utilizadas (SOUZA et al., 2018). No entanto, não ocorreu a completa regeneração do defeito.

Apesar dos efeitos benéficos da terapia com BM-MSCs no tratamento de defeitos ósseos, a obtenção das células exige procedimentos invasivos. Em humanos, a obtenção é feita por aspiração da medula óssea, um procedimento que raramente apresenta complicações, mas quando estas ocorrem, têm alto potencial de agravamento (PITTENGER et al., 1999; BAIN, 2006). As complicações reportadas para esse procedimento envolvem hemorragia, infecção, dor crônica e fraturas, esta última, principalmente associada a pacientes com osteoporose ou osteomalácia (IMAM et al., 2017). Além disso, o número de MSCs obtidas é baixo (em torno de 0,001 a 0,02% do total de células) e sua capacidade de proliferação e diferenciação diminui com o envelhecimento (ALVAREZ-VIEJO et al., 2013). Dessa forma, novas fontes de MSCs têm sido buscadas.

Estima-se que 10 milhões de terceiros molares sejam extraídos anualmente nos Estados Unidos (FRIEDMAN, 2007). Dessa forma, os tecidos dentais constituem uma fonte viável para obtenção dessas células. Dentre esses tecidos, o ligamento periodontal tem sido estudado como fonte de MSCs. O ligamento periodontal é um tecido conjuntivo especializado, altamente vascularizado e rico em células, cuja função é a ancoragem do dente ao osso alveolar e a proteção de estruturas do periodonto, tais como vasos e nervos, contribuindo para a irrigação e homeostasia

dental (SEO et al., 2004; TRUBIANI et al., 2019). As PDLSCs (do inglês, periodontal ligament stem cells) constituem uma parcela importante da população celular desse tecido, de onde são facilmente isoladas após a exodontia de terceiros molares (SEO et al., 2004; GAY, CHEN, MCDOUGALL, 2007; SILVÉRIO et al., 2010). Estas são células de fácil cultivo, durante o qual mantêm a morfologia e os marcadores associados à multipotência, além de apresentarem maior taxa de proliferação em comparação às BM-MSCs (ELEUTERIO et al., 2013; DIOMEDE et al., 2017).

As PDLSCs foram isoladas do ligamento periodontal de terceiros molares extraídos e caracterizadas pela primeira vez por Seo e colaboradores (2004). O estudo demonstrou que as PDLSCs, assim como outras MSCs, possuíam capacidade de adesão ao plástico, de formação de colônias e de diferenciação em linhagens osteoblásticas e adipocíticas. Ainda, no mesmo estudo, a implantação subcutânea de células obtidas de colônias celulares distintas levou a diferentes formações teciduais. A maioria das implantações levou à formação de tecido com características de cemento e tecido ósseo em continuidade com tecido semelhante ao ligamento periodontal, porém outras induziram a formação somente de tecido conjuntivo (SEO et al., 2004). Essa diferença nos tecidos formados sugere a ocorrência de uma população heterogênea de PDLSCs, com diferentes potenciais de diferenciação celular.

Os dados encontrados no primeiro estudo foram corroborados por estudos posteriores. Diversos autores demonstraram *in vitro* a capacidade de diferenciação osteoblástica, adipocítica e condroblástica e a capacidade de formação de nódulos mineralizados das PDLSCs (ALVAREZ et al., 2015; SILVÉRIO et al., 2010; ZHOU et al., 2008; GAY, CHEN, MCDOUGALL, 2007). *In vivo*, a implantação subcutânea de molares extraídos de ratos demonstrou que as células do ligamento periodontal presentes nos dentes foram capazes de induzir a formação de osso semelhante ao osso alveolar ao redor das raízes (HOSOYA et al., 2010).

As PDLSCs constituem uma população heterogênea, apresentando células mais comprometidas com a diferenciação fibroblástica, enquanto outras mostram-se mais comprometidas com a diferenciação osteoblástica ou cementoblástica (GAY, CHEN, MCDOUGALL, 2007; NAGAMOTO et al., 2006; SEO et al., 2004). Foi demonstrado que o ligamento periodontal obtido de dentes permanentes apresenta alta porcentagem de células que expressam antígenos de superfície típicos de MSCs, CD105 e CD166, comparado ao ligamento periodontal de dentes decíduos.

Além disso, essa população de células expressa o antígeno de superfície Stro-1 e o fator de transcrição Oct-4, um fator embrionário responsável pela manutenção da condição indiferenciada e pluripotente da célula. Comparando as duas populações de células, foi observado que aquelas obtidas de dentes permanentes apresentam maior capacidade de diferenciação osteoblástica (SILVÉRIO et al., 2010). Porém, a diferença do potencial osteogênico das PDLSCs não se deve somente ao tipo de dentição, permanente ou decídua, a partir da qual as células são obtidas.

PDLSCs obtidas de dentes permanentes constituem uma população de células com variada capacidade de diferenciação osteoblástica, cujo padrão de antígenos de superfície apresentado influencia seu comprometimento com a diferenciação em uma linhagem celular específica (ALVAREZ et al., 2015; SAITO et al., 2014). Ao comparar três padrões diferentes de antígenos (CD51+/CD140α+, CD271+ e Stro-1+/CD146+) em PDLSCs de dentes permanentes, foi demonstrado que as células CD271+ apresentaram maior potencial osteogênico *in vitro* quando comparado ao dos demais grupos (ALVAREZ et al., 2015). Clones celulares obtidos por Silvério et al. (2010) de populações de PDLSCs enriquecidas com células CD105+ apresentaram potencial osteogênico distinto. Entre os clones que se diferenciaram em osteoblastos, foi possível detectar células com alto (AP-PDLSCs) e baixo (BP-PDLSCs) potencial osteogênico. Estas células foram caracterizadas quanto à expressão dos genes *Runx2* (do inglês, runt-related transcription factor-2) e *Alp* (do inglês, alkaline phosphatase) e à habilidade em formar matriz mineralizada, sendo que as células com alto potencial apresentaram expressão mais precoce de *Runx2* e maior formação de matriz mineralizada. Adicionalmente, a expressão do antígeno CD166 aumentou gradualmente durante a diferenciação na população de células com alto potencial osteogênico, enquanto esse marcador já ocorria em grande quantidade nas células com baixo potencial desde o início do processo de diferenciação (SAITO et al., 2014).

No contexto da regeneração óssea, a aplicação de PDLSCs de cães carregadas para defeitos periodontais com biomaterial mostrou-se mais efetiva para a regeneração do defeito do que o uso do biomaterial sem células (KIM et al., 2009). Defeitos em calvária de ratos tratados com associação de PDLSCs de cães com Bio-Oss® apresentaram melhor formação óssea em comparação aos defeitos tratados apenas com Bio-Oss® (YU, ZHOU, WANG et al., 2014).

Considerando a facilidade de obtenção dessas células, sua comprovada capacidade *in vitro* de diferenciação osteoblástica e a possibilidade de isolamento de populações de PDLSCs com alto e baixo potencial osteogênico, as células do ligamento periodontal apresentam-se como candidatas à terapia celular para regeneração de defeitos ósseos. Assim, estabelecemos a hipótese de que PDLSCs com alto e baixo potencial osteogênico *in vitro* apresentam efeitos distintos no reparo de defeitos ósseos criados em calvárias de ratos.

2. OBJETIVO GERAL

2. OBJETIVO GERAL

O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito de AP-PDLSCs e BP-PDLSCs no reparo do tecido ósseo em um modelo de defeito em calvárias de ratos.

2.1. Objetivos específicos

- Caracterizar *in vitro* as AP-PDLSCs e BP-PDLSCs obtidas do ligamento periodontal de terceiros molares inclusos de humanos.
- Avaliar *in vivo* o potencial das AP-PDLSCs e BP-PDLSCs, além de ambas as populações de células misturadas (AP-PDLSCs+BP-PDLSCs), injetadas localmente para reparar o tecido ósseo em defeitos criados em calvárias de ratos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção e cultura de células

AP-PDLSCs e BP-PDLSCs previamente isoladas do ligamento periodontal do terço médio da raiz de terceiros molares inclusos de pacientes com idades entre 20 e 22 anos, foram obtidas do Biobanco B041 – Periocells da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas (FOP-UNICAMP). Com a finalidade de obter quantidade de células suficiente para a execução dos experimentos, as células, conservadas em nitrogênio líquido, foram descongeladas e cultivadas até a sexta passagem em frascos de cultura de poliestireno de 75 cm² (Corning, EUA) contendo meio de crescimento composto por meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) com alta concentração de glicose (Gibco, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco) e 1% de antibiótico penicilina / estreptomicina (Gibco), a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico. Ao atingirem 80% de confluência, as culturas foram lavadas 3 vezes com PBS (Gibco) aquecido a 37°C e destacadas dos frascos com solução de tripsina 0,25% (Gibco) e 5% de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) a 37°C por 5 minutos. A solução enzimática foi neutralizada com meio de crescimento e as células foram centrifugadas por 5 minutos a 2000 rpm (rotações por minuto). O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas na solução de congelamento, composta por soro fetal bovino e 5% de DMSO (dimetilsulfóxido, Sigma-Aldrich, EUA). As células foram mantidas em nitrogênio líquido até a sua utilização nas etapas seguintes do trabalho.

3.2. Caracterização *in vitro* das AP-PDLSCs e BP-PDLSCs

3.2.1. Expressão de marcadores celulares de superfície por citometria de fluxo

Após 10 dias de cultivo em meio de crescimento, as AP-PDLSCs e BP-PDLSCs foram analisadas por citometria de fluxo para avaliação da expressão das moléculas de MHC classes I e II (MHC I e MHC II, do inglês, major histocompatibility complex), bem como dos marcadores mesenquimais CD90 (do inglês, cluster of differentiation), CD29, CD44, CD73, CD13, CD106 e CD54 e dos marcadores hematopoiéticos CD34, CD45, CD14 e CD31. As culturas foram tripsinizadas conforme descrito no item 3.1, e 5x10⁵ células foram utilizadas para a avaliação de cada marcador. As células foram incubadas, separadamente, com 5 µL do anticorpo

de interesse durante 15 minutos, em ausência de luz e, ao final desse período, foram homogeneizadas em 2 mL de PBS (Gibco) e os tubos foram centrifugados a 2000 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e em cada tubo foram adicionados 200 µL de solução de PBS (Gibco) com 2% de paraformaldeído (Merck, Alemanha). Os tubos foram mantidos em refrigerador ao abrigo da luz até o momento da leitura no citômetro de fluxo FACSCanto™ (BD Biosciences, EUA), onde as leituras foram feitas a cada 10 mil eventos. Os dados em porcentagem são relativos à população previamente selecionada.

3.2.2. Proliferação celular

Após descongelamento e expansão, as AP-PDLSCs e BP-PDLSCs foram plaqueadas na densidade de 1×10^4 células por poço ($n=5$), em placa de poliestireno de 24 poços (Corning) e mantidas em meio de crescimento. Após 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 dias de cultura, os poços foram lavados 3 vezes com PBS (Gibco) aquecido a 37°C e, em seguida, foi adicionado 1 mL de solução de tripsina 0,25% (Gibco) e 5% de EDTA em cada poço, e as placas foram mantidas em incubadora a 37°C durante 5 minutos. Após esse período, foram adicionados 500 µL de meio de crescimento para neutralização da tripsina e a suspensão de células foi transferida para tubos eppendorf. Em seguida, 100 µL das células foram homogeneizados com 100 µL de azul de tripan e as células foram contadas manualmente na câmara de Neubauer, sendo os dados expressos em número de células.

3.2.3. Diferenciação osteoblástica

Após descongelamento e expansão, conforme descrito em 3.1, as AP-PDLSCs e BP-PDLSCs foram plaqueadas na densidade de 1×10^4 células por poço, em placas poliestireno de 24 poços (Corning), em meio osteogênico contendo meio de crescimento suplementado com 5 µg/mL de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich), 7 mM de beta-glicerofosfato (Sigma-Aldrich) e 10^{-7} M de dexametasona (Sigma-Aldrich), por até 21 dias.

3.2.3.1. Atividade *in situ* de ALP

A atividade *in situ* da ALP foi avaliada como marcador osteoblástico fenotípico, pelo método Fast red (MAJORS et al., 1997). Após 14 dias de cultivo em meio osteogênico, o meio de cultura foi removido e os poços ($n=3$), lavados com

PBS (Gibco) aquecido a 37°C. Foi adicionado, por poço, 1 mL de solução tampão Tris (Sigma-Aldrich) 120 mM com pH 8,4, contendo 1,8 mM de Fast red TR (Sigma-Aldrich), 0,9 mM de naftol-ASMX-fosfato (Sigma-Aldrich) e 1:9 de dimetilformamida (Merck) e as placas foram mantidas por 30 minutos a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico. Em seguida, a solução foi removida e as placas ficaram à temperatura ambiente para permitir a secagem dos poços. Então, imagens macroscópicas dos poços foram obtidas digitalmente com câmera de alta resolução (Canon EOS Digital Rebel, 6.3 megapixels, com lente macro EF100 f/2.8). A avaliação quantitativa foi realizada no software ImageJ (National Institutes of Health), sendo os dados expressos em porcentagem (%) de área.

3.2.3.2. Formação de matriz extracelular mineralizada

Após 21 dias de cultivo conforme descrito em 3.2.3, os poços (n=3) foram lavados 3 vezes com PBS (Gibco) aquecido a 37° C, preenchidos com 2 mL de formalina 10% e mantidos a 4 °C. Após 24 horas, os poços foram desidratados à temperatura ambiente em série crescente de álcoois (30%, 50%, 70% e 100%), com duração de 1 hora para cada graduação alcoólica. Após secagem, os poços foram corados com vermelho de alizarina (Sigma-Aldrich) e as áreas de mineralização ricas em cálcio, foram evidenciadas pela coloração vermelha. Após a secagem dos poços em temperatura ambiente, imagens macroscópicas dos poços foram obtidas digitalmente com câmera de alta resolução (Canon EOS Digital Rebel, 6.3 megapixels, com lente macro EF100 f/2.8). Para quantificação da coloração segundo método de Gregory et al, (2004), 150 µL de ácido acético a 10% foram acrescentados a cada poço e a placa foi mantida sob agitação por 30 minutos. A camada de células foi então raspada com um raspador de células e a solução transferida para tubos de 1,5 mL e agitadas em vortex por 30 segundos. Em seguida, as amostras foram aquecidas a 85°C por 10 minutos e transferidas para o gelo por 5 minutos. Os tubos foram centrifugados a 20.000 g por 15 minutos, e em seguida foram adicionados 40 µL de hidróxido de amônia a 10% e 100 µL do sobrenadante foram utilizados para leitura em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 405 nm, sendo os dados expressos em absorbância a 405 nm.

3.3. Efeito de PDLSCs injetadas localmente no reparo de defeitos ósseos

3.3.1. Animais

Este estudo foi realizado utilizando 68 ratos machos Sprague-Dawley, pesando entre 150 e 200 g, seguindo as normas estabelecidas pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do campus da USP de Ribeirão Preto (Protocolo 2019.1.419.58.3). Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos com relação ao tratamento utilizado: (1) veículo (PBS); (2) AP-PDLSCs; (3) BP-PDLSCs e (4) AP-PDLSCs +BP-PDLSCs misturadas na proporção de 1:1. Foram utilizados 17 animais para cada grupo, sendo 12 para análise microtomográfica e histológica e 5 para avaliação da expressão gênica por PCR em tempo real. A distribuição dos animais por tratamento e ensaios é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. Distribuição dos animais em relação aos ensaios

Grupos	Histologia e μ CT (6 semanas)	PCR em tempo real (6 semanas)
PBS	12	5
AP-PDLSC	12	5
BP-PDLSC	12	5
AP-PDLSC+BP-PDLSC (1:1)	12	5

3.3.2. Procedimento cirúrgico para a criação do defeito ósseo

Os animais foram submetidos à cirurgia para preparação de defeitos ósseos nas calvárias com diâmetro de 5 mm. Para isso, os animais foram anestesiados com solução anestésica de xilazina (Agibrands do Brasil Ltda, Brasil) - sedativo, analgésico e relaxante muscular - e cetamina (Agibrands) - anestésico geral - na proporção de 6 mg/kg de peso corporal de xilazina e 75 mg/kg de peso corporal de cetamina, injetada por via intraperitoneal. Foi também realizada analgesia pré-operatória com flunixinina meglumina (2,5 mg/kg) (Schering-Plough, Brasil). Após tricotomia e antissepsia com solução de clorexidina 2,5% na região dorsal da cabeça, a pele e o tecido subcutâneo foram incisados ao longo da sutura sagital para expor os ossos parietais. O perióstio dos ossos parietais foi descolado e o defeito, produzido unilateralmente utilizando uma broca trefina com 5 mm de diâmetro sob irrigação abundante com soro fisiológico. A opção pelo defeito unilateral e não bilateral tem como objetivos minimizar o trauma na calvária e evitar a possível interferência de um determinado tratamento no defeito contra-lateral (GOMES e FERNANDES, 2011). A pele foi então suturada com mononylon 4.0 (Ethicon Ltda, Brasil) e os animais foram medicados com dose única de analgésico

anti-inflamatório não esteroide flunixinina meglumina (10 mg/100 g de peso corporal) (Schering) e dose única de uma solução de antibióticos contendo Benzilpenicilina benzatina (156.000 UI/100 g de peso corporal), Benzilpenicilina procaína (78.000 UI/100 g de peso corporal), Benzilpenicilina potássica (78.000 UI/100 g de peso corporal), Diidroestreptomicina base (sulfato) (65 mg/100 g peso corporal) e Estreptomicina base (sulfato) (65 mg/100 g peso corporal) (Pentabiótico, Fort Dodge, Brasil). Os ratos foram mantidos em número de 3 por caixa, recebendo ração e água “*ad libitum*” e ficaram sob observação constante, sendo feita a limpeza das caixas, com troca da maravalha, três vezes por semana.

3.3.3. Injeção de células no defeito ósseo

Após 2 semanas da criação dos defeitos em calvárias, os animais foram submetidos a nova intervenção para a injeção das células, seguindo a distribuição apresentada na Tabela 1. Para isso, os animais foram anestesiados e 5×10^6 células diluídas em 50 μ L de PBS foram injetadas subperiostealmente com a utilização de uma agulha de 21 Gauge (21G). Em seguida, os animais receberam dose única de analgésico anti-inflamatório não esteroide flunixinina meglumina (10 mg/100 g de peso corporal) (Schering). Quatro semanas após a injeção das células, ou seja, 6 semanas após a criação dos defeitos, os animais foram eutanasiados com dose excessiva de cetamina (Agibrands) e xilazina (Agibrands) por via intraperitoneal seguida de exposição ao CO₂, e as calvárias foram removidas para avaliação do tecido ósseo neoformado.

3.3.4. Análise microtomográfica (μ CT)

As calvárias foram fixadas em solução de formalina tamponada a 4% (pH=7) por 48 horas, e transferidas para uma solução de etanol 70% onde permaneceram por 3 dias. Em seguida, as peças foram utilizadas para análise por μ CT no microtomógrafo SkyScan 1172 (SkyScan, Bélgica) operando com fonte de raios-X de 100 kV detectados por uma câmera de 11 megapixels com resolução de até 1 μ m. Os dados foram adquiridos pelo software de aquisição de imagens do próprio equipamento e as reconstruções serão feitas pelo software NRecon Cluster (Micro Photonics, EUA). Após as reconstruções, foram analisados, dentro da área de interesse, ou seja, a região dos defeitos ósseos produzidos, os seguintes parâmetros: volume ósseo (BV, bone volume, mm³), porcentagem de volume ósseo

formado em relação ao defeito ósseo (BV/TV, bone volume/tissue volume, %), superfície óssea (BS, bone surface, mm²), espessura trabecular (Tb.Th, trabecular thickness, mm), número de trabéculas (Tb.N, trabecular number, 1/mm), separação trabecular (Tb.Sp, trabecular separation, mm), volume de poros (Po.V, mm³), porcentagem de poros (Ct.Po, %) e densidade mineral óssea (BMD, bone mineral density). Esses parâmetros, automaticamente gerados pelo software, são preconizados pela *American Society of Bone and Mineral Research* (BOUXSEIN et al., 2010).

3.3.5. Processamento e análise histológica

Após as análises por μ CT, as amostras foram descalcificadas em EDTA a 4%, lavadas em água corrente e desidratadas por meio de uma sequência de álcoois com concentração crescente (50 a 100%). Em seguida, foi realizada a diafanização das peças em xilol até ficarem transparentes e a impregnação em parafina, em estufa a 60°C, em três banhos de 3 horas. Na etapa seguinte, foi realizada a inclusão das peças em formas com parafina e o corte em micrótomo com espaçamento padronizado de 5 μ m de espessura, seguido de coloração com hematoxilina e eosina (HE). As imagens foram obtidas em microscópio de luz (Axioskop 40, Carl Zeiss, Alemanha) acoplado a uma câmera digital (Axiocam ICc3, Carl Zeiss). A análise histológica foi realizada para avaliação qualitativa da neoformação óssea e vascular. Para isso, as imagens foram capturadas por uma câmera digital DC 300F (Leica, Alemanha) acoplada a um microscópio DMLB (Leica) e as análises foram realizadas utilizando o software Leica QWin.

3.3.6. Análise da expressão gênica (mRNA) por PCR em tempo real

O osso neoformado foi coletado para avaliação da expressão dos genes *Runx2*, *Sp7* (osterix, SP7 transcriptional factor), *Alp*, *Bglap* (do inglês, bone gamma-carboxyglutamate protein), *Ibsp* (do inglês, integrin binding sialoprotein), *Opg* (do inglês, osteoprotegerin), *Rankl* (do inglês, receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand), *Rank* (do inglês, receptor activator of nuclear factor kappa-B), *Cd31* (do inglês, cluster of differentiation 31), *Vegfa* (do inglês, vascular endothelial growth factor A) e *Vegfr2* (do inglês, vascular endothelial growth factor receptor 2). Com o objetivo de comparar o tecido neoformado com o tecido ósseo que não sofreu nenhum tipo de intervenção (controle), o RNA total foi isolado de amostras de tecido ósseo da calvária de ratos de 11 semanas de vida, idade na qual a eutanásia dos animais foi realizada.

Para o isolamento do RNA total, o tecido ósseo foi macerado em nitrogênio líquido e a extração do RNA total foi realizada utilizando o kit SV Total RNA Isolation System (Promega, EUA), de acordo com as especificações do fabricante. Em seguida, o RNA total será quantificado a partir de 1 µL de amostra no aparelho NanoVue (GE Healthcare, EUA) e sua integridade avaliada por eletroforese utilizando o kit Agilent RNA 6000 Nano Kit e o aparelho Agilent 2100 (Agilent Technologies, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. A eficiência de cada primer foi avaliada em reações contendo DNA complementar (cDNA) em diferentes concentrações (50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,56 ng/reação) de acordo com o protocolo descrito no User Bulletin #2 (Applied Biosystems, EUA). Os valores de amplificação foram submetidos à análise de regressão linear em função do logaritmo da respectiva diluição, sendo os coeficientes angulares das retas obtidas, utilizados para o cálculo da eficiência de amplificação dos *primers* e determinação das diluições a serem utilizadas. Para realização do PCR em tempo real, foi usado o sistema *SYBR Green*, em um aparelho StepOne Plus (Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA). As reações foram realizadas em quadruplicata (n=4) com volume final de 13 µL, sendo utilizados: 7 µL de FastSYBR Master Mix (Applied Biosystems) que contém o fluoróforo *SYBR Green*, a enzima polimerase *AmpliTaQ Gold*, dNTPs com dUTP e o fluoróforo *ROX*, usado como referência passiva para normalização dos níveis de fluorescência, 2,5 µL da solução de cDNA, 2,5 µL de água Milli-Q tratada com DEPC e 0,5 µL da solução contendo cada *primer* com as concentrações adequadas. A reação de amplificação ocorreu em 2 minutos a 50°C, 20 segundos a 95°C, quarenta ciclos de 3 segundos a 95°C e 30 segundos a 60°C, além de um ciclo final de 20 minutos, com temperatura crescente de 60°C a 95°C, que foi empregado para a obtenção de uma curva de dissociação dos produtos da reação, usada para análise da especificidade de amplificação. Os resultados foram analisados com base no valor de Ct (cycle threshold, ou ciclo limiar), sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos em que a amplificação das amostras atinge um limiar (determinado entre o nível de fluorescência dos controles negativos e a fase de amplificação exponencial das amostras), que permite a análise quantitativa da expressão de mRNA. Como controle endógeno foi avaliada a expressão do gene *Eif2b1* (do inglês, eukaryotic translation initiation factor 2B subunit alpha). O método comparativo de 2-ddCt (LIVAK e SCHIMITTGEN, 2001) foi utilizado para comparar a expressão gênica do tecido formado nos defeitos ósseos

previamente tratados e do osso controle, sendo os dados expressos como expressão gênica relativa. As sequências dos primers são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Sequência de primers, temperatura de anelamento (TA) e número de pares de bases nitrogenadas (pb)

Gene alvo	Sequência sense e anti-sense	TA	Pb
<i>Runx2</i>	CGTATTTTCAGATGATGACACTGCC AAATGCCTGGGAAGTGCCTG	60	127
<i>Sp7</i>	GAGGCCTTTTCGTCTGCAACT CAAGTGGTCGCTTCGGGTAA	60	145
<i>Alp</i>	TACTGCTGATCACTCCCACG ACCGTCCACCACCTTGTAAC	60	154
<i>Bglap</i>	GCATTCTGCCTCTCTGACCTG CCGGAGTCTATTCACCACCTTAC	60	105
<i>Ibsp</i>	AGACTGCTTTAATCTTGCTCTGC GTAGCGTGGCCGGTACTTA	60	125
<i>Opg</i>	TCGCAAGAGCAAACCTTCCAG GCTTTCACAGAGGTCAATGTCTTG	60	102
<i>Rankl</i>	ACATCCCATCGGGTTCCCA AGCAAATGTTGGCGTACAGGT	60	144
<i>Rank</i>	AGCTCAACATCCCTTGCAGC GTCCCTTGGTGTGCTTCCAT	60	147
<i>Cd31</i>	GAAATGGTGCTTCGGTGCTC GGTGCCAAAACACTTGGGTG	60	124
<i>Vegfa</i>	GTTCGAGGAAAGGGAAAGGGT TCTGCGGATCTTGGACAAACA	60	121
<i>Vegfr2</i>	AGTGATTCCAGATGACAGCCAG GCCACAGACTCCCTGCTTTTA	60	135
<i>Eif2b1</i>	TGCTGTTGGCTATATCATGGAGA TGCAACCACATAGAAGGGCT	60	148

3.4. Análise Estatística

Os dados quantitativos foram submetidos à análise estatística no programa SigmaPlot 11.0 (Systat Software, Alemanha). Os dados relativos às comparações entre dois grupos foram analisados pelo teste t e aqueles relativos às comparações entre múltiplos grupos, por ANOVA one-way, seguida de pós-teste de Tukey. Os dados foram expressos como média e desvio padrão e o nível de significância adotado foi de 5%.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Cultura celular

Ao final de 24 horas de cultivo celular, imagens foram obtidas para confirmação da adesão das células ao frasco de cultura e avaliação da morfologia celular (Figura 1). As AP-PDLSCs (Figura 1A) e BP-PDLSCs (Figura 1B) aderiram à superfície de cultura e ambas as células apresentaram morfologia alongada com pequenas projeções citoplasmáticas.

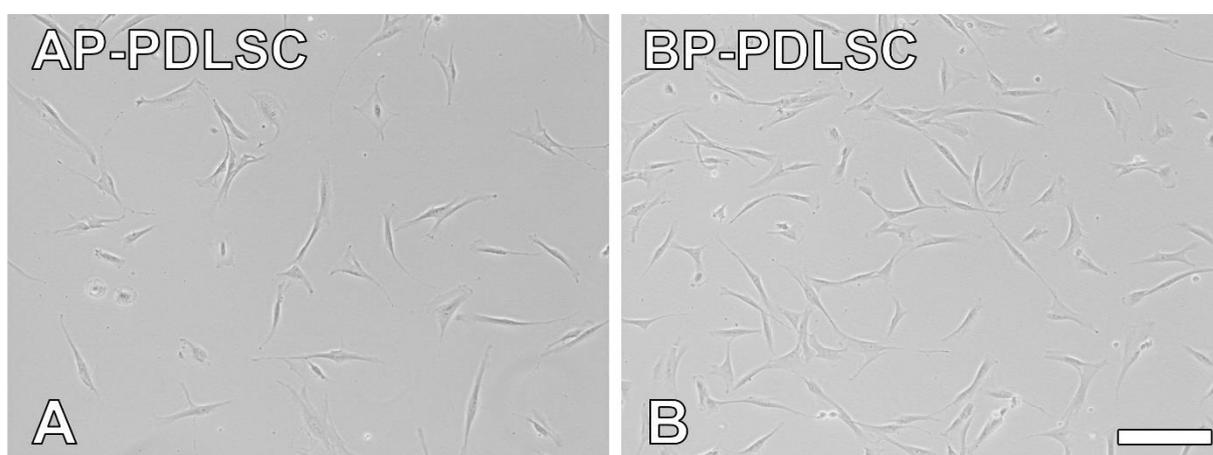


Figura 1. AP-PDLSC (A) e BP-PDLSCs (B) ao final de 24 horas de cultivo em meio de crescimento. Barra de escala: 100 μ m.

4.2. Expressão de marcadores celulares de superfície por citometria de fluxo

A expressão dos marcadores MHC I e MHC II, bem como daqueles característicos de MSCs e células hematopoiéticas, foi avaliada aos 10 dias de cultura (Figura 2; Tabela 3). A expressão de MHC I e MHC II foi semelhante nas AP-PDLSCs e BP-PDLSCs, sendo que a porcentagem de expressão de MHC I foi maior em ambas as populações celulares em comparação ao MHC II. No entanto, a intensidade de fluorescência para ambos os marcadores foi relativamente baixa.

Na avaliação dos marcadores mesenquimais, as AP-PDLSCs e BP-PDLSCs apresentaram alta porcentagem de expressão de CD90, CD29, CD44, CD73 e CD13, sendo semelhante em ambas as células. A intensidade de fluorescência também se apresentou elevada para esses marcadores. Para o CD106, as BP-PDLSCs apresentaram maior porcentagem de expressão em comparação às AP-PDLSCs; no entanto, a intensidade de fluorescência foi semelhante em ambas as

células. A expressão de CD54 foi semelhante em ambas as células, com baixa porcentagem de expressão e baixa intensidade de fluorescência.

Na avaliação dos marcadores hematopoiéticos, CD34, CD45, CD14 e CD31, as AP-PDLSCs e BP-PDLSCs apresentaram baixa porcentagem de expressão e baixa intensidade de fluorescência para todos os marcadores, sendo o perfil de expressão semelhante em ambas as células.

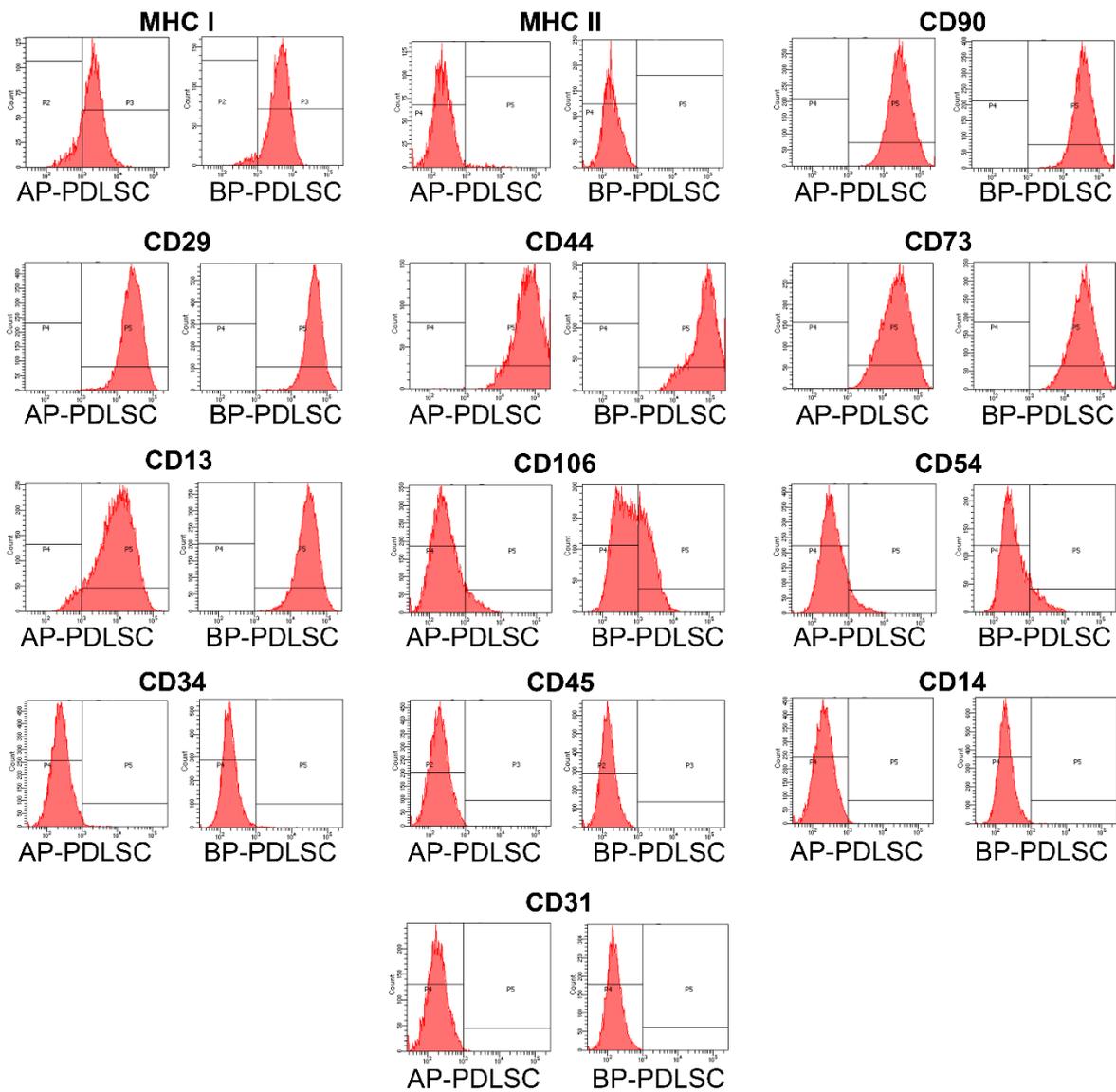


Figura 2. Expressão de marcadores de superfície nas AP-PDLSCs e BP-PDLSCs ao final de 10 dias de cultivo em meio de crescimento.

Tabela 3. Expressão de marcadores de superfície nas AP-PDLSCs e BP-PDLSCs

Marcador de superfície	AP-PDLSC		BP-PDLSC	
	%	Intensidade de fluorescência	%	Intensidade de Fluorescência
MHC I	80,7	2162	94,9	4284
MHC II	2,8	3622	0,4	1429
CD90	99,9	26761	99,8	35182
CD29	99,7	25680	99,9	41420
CD44	99,7	62395	99,8	73070
CD73	99,9	23014	99,8	31667
CD13	93,5	10011	99,8	29102
CD106	9,5	1659	35,3	1806
CD54	10,0	1560	14,1	1766
CD34	1,8	1770	1,8	2597
CD45	0,2	328	0,0	288
CD14	0,8	1380	1,2	2331
CD31	0,5	1377	0,4	1971

4.3. Proliferação celular

A proliferação celular foi avaliada aos 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 dias de cultura (Figura 3). Os dados foram submetidos ao teste t ($p \leq 0,05$) para comparação entre as AP-PDLSCs e BP-PDLSCs dentro do mesmo período. Para ambas as culturas celulares, houve tendência de aumento no número de células até o sétimo dia. Nos períodos de 5, 6 e 7 dias houve maior número de BP-PDLSCs em comparação às AP-PDLSCs ($p=0,023$, $p=0,008$ e $p=0,013$, respectivamente).

Proliferação Celular

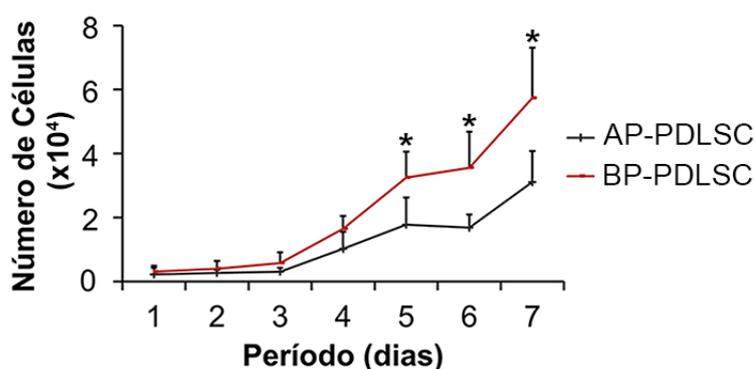


Figura 3. Proliferação celular de AP-PDLSCs e BP-PDLSCs ao final de 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 dias de cultivo em meio de crescimento. Os dados estão representados como média \pm desvio-padrão ($n=5$). Asterisco (*) indica diferença estatisticamente significativa entre AP-PDLSCs e BP-PDLSCs quando comparadas no mesmo período (teste t, $p \leq 0,05$).

4.4. Atividade *in situ* de ALP

A atividade *in situ* de ALP foi avaliada por Fast red aos 14 dias de cultura (Figura 4). Os dados foram submetidos ao teste t ($p \leq 0,05$). A análise qualitativa mostrou uma maior área corada nas culturas de AP-PDLSCs em comparação às culturas de BP-PDLSCs. Quantitativamente, esta informação foi confirmada, uma vez que a atividade de ALP *in situ* foi maior nas AP-PDLSCs em comparação às BP-PDLSCs, com diferença estatisticamente significativa ($p=0,001$).

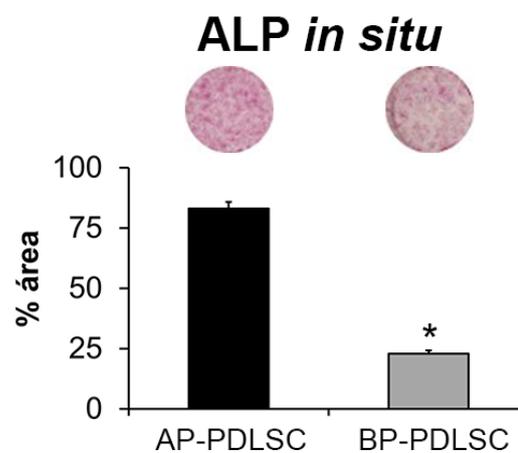


Figura 4. Atividade *in situ* de ALP nas culturas de AP-PDLSCs e BP-PDLSCs ao final de 14 dias de cultivo em meio osteogênico. Os dados estão representados como média \pm desvio-padrão ($n=3$). Asterisco (*) indica diferença estatisticamente significativa entre AP-PDLSCs e BP-PDLSCs (teste t, $p \leq 0,05$).

4.5. Formação de matriz extracelular mineralizada

A formação de matriz extracelular mineralizada foi avaliada por vermelho de alizarina após 21 dias de cultura (Figura 5). Os dados foram submetidos ao teste t ($p \leq 0,05$). As AP-PDLSCs apresentaram tendência para maior formação de matriz extracelular mineralizada, porém não houve diferença estatisticamente significativa entre as AP-PDLSCs e BP-PDLSCs ($p=0,157$).

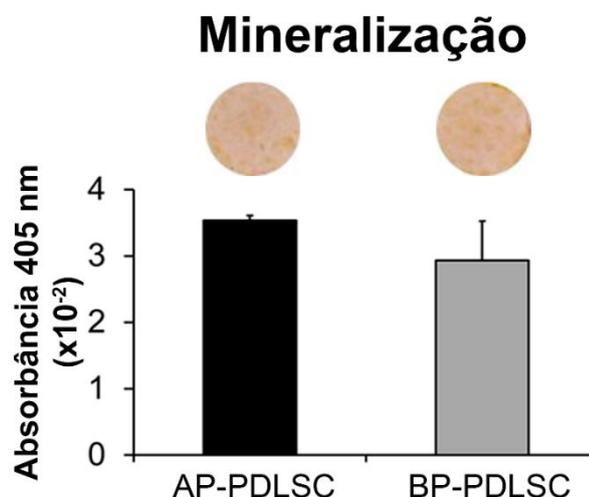


Figura 5. Formação de matriz extracelular mineralizada nas culturas de AP-PDLSCs e BP-PDLSCs ao final de 21 dias de cultivo em meio osteogênico. Os dados estão representados como média \pm desvio-padrão (n=3). Asterisco (*) indica diferença estatisticamente significativa entre AP-PDLSCs e BP-PDLSCs (teste t, $p \leq 0,05$).

4.6. Análise microtomográfica

A formação óssea nos defeitos criados em calvária de ratos foi avaliada por μ CT 4 semanas após a injeção de PBS, AP-PDLSCs, BP-PDLSCs ou da mistura de células na proporção de 1:1 (AP-PDLSCs+BP-PDLSCs) (Figura 6). Os dados quantitativos foram submetidos à análise estatística por ANOVA one way e pós-teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

As reconstruções microtomográficas tridimensionais (Figura 6A – D) demonstram que ocorreu formação óssea, da borda para o centro do defeito em todos os grupos avaliados, sendo que essa formação foi maior nos defeitos tratados com células em comparação aos tratados com PBS, porém sem diferença entre as AP-PDLSCs, BP-PDLSCs e AP-PDLSCs+BP-PDLSCs.

A análise morfométrica confirmou os dados qualitativos, com diferença estatisticamente significativa entre os defeitos tratados com células e aqueles tratados com PBS nos seguintes parâmetros: volume ósseo (PBS < AP-PDLSCs, BP-PDLSCs e AP-PDLSCs+BP-PDLSCs, $p=0,001$), porcentagem de volume ósseo (PBS < AP-PDLSCs, BP-PDLSCs e AP-PDLSCs+BP-PDLSCs, $p=0,001$), superfície óssea (PBS < AP-PDLSCs e BP-PDLSCs, $p=0,002$; PBS < AP-PDLSCs+BP-PDLSCs, $p=0,001$), número de trabéculas (PBS < AP-PDLSCs, $p=0,005$; PBS < BP-PDLSCs e AP-PDLSCs+BP-PDLSCs, $p=0,001$), densidade mineral óssea (PBS < AP-PDLSCs, BP-PDLSCs e AP-PDLSCs+BP-PDLSCs, $p=0,001$), porcentagem de porosidade (PBS > AP-PDLSCs, BP-PDLSCs e AP-PDLSCs+BP-PDLSCs, $p=0,001$) e volume de poros (PBS > AP-PDLSCs, BP-PDLSCs e AP-PDLSCs+BP-PDLSCs,

$p=0,001$). A análise estatística confirmou que não houve diferença entre os tratamentos com células. No parâmetro de espessura trabecular, somente os defeitos tratados com AP-PDLSCs+BP-PDLSCs apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação aos defeitos tratados com PBS ($p=0,006$). No parâmetro de separação trabecular não houve diferença estatística entre os tratamentos ($p=0,179$).

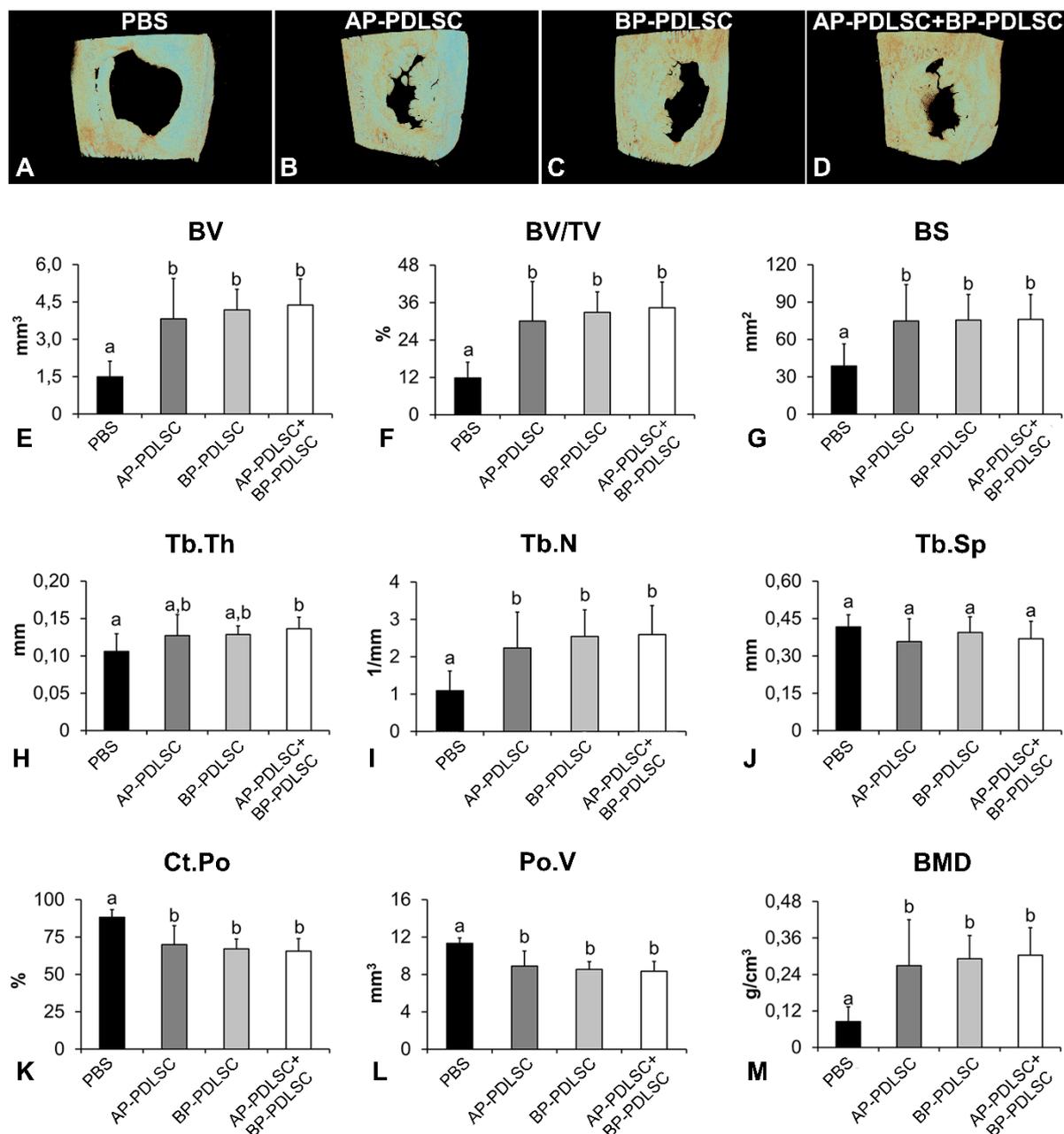


Figura 6. Reconstruções microtomográfica tridimensional dos defeitos ósseos criados em calvária de ratos 4 semanas após a injeção local de PBS (A), AP-PDLSCs (B), BP-PDLSCs (C) e AP-PDLSCs+BP-PDLSCs (D). Parâmetros morfométricos obtidos após as reconstruções tridimensionais (E – M). Os dados estão representados como média \pm desvio-padrão ($n=12$). Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos (ANOVA, $p \leq 0,05$).

4.7. Análise histológica

O tecido formado nos defeitos criados em calvária de ratos foi avaliado 4 semanas após a injeção local de PBS ou células (Figura 7). Em todos os grupos avaliados, houve formação de tecido ósseo e tecido conjuntivo no defeito ósseo. Nos defeitos tratados com PBS, houve predominância de tecido conjuntivo, com pequena formação óssea em continuidade com as bordas do defeito (Figuras 7A e 7E). Nos defeitos tratados com células, (Figura 7B e 7F, AP-PDLSCs; Figura 7C e 7G, BP-PDLSCs e Figura 7D e 7H, AP-PDLSCs+BP-PDLSCs), ocorreu formação óssea em continuidade com as bordas do defeito ósseo, em maior quantidade em comparação aos defeitos tratados com PBS, com ocorrência de áreas de tecido ósseo lamelar e tecido ósseo imaturo.

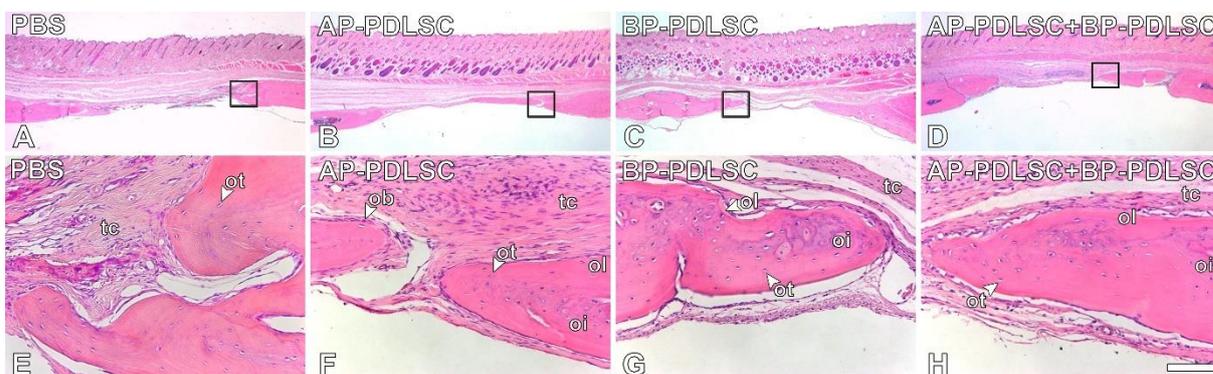


Figura 7. Fotomicrografias do tecido neoformado nos defeitos ósseos criados em calvária de ratos 4 semanas após a injeção local de PBS (A, E), AP-PDLSCs (B, F), BP-PDLSCs (C, G) e AP-PDLSCs+BP-PDLSCs (D, H). Coloração: Hematoxilina e eosina (HE). ob: osteoblasto, ot: osteócito, oi: osso imaturo, ol: osso lamelar, tc: tecido conjuntivo. Barra de escala: A – D: 1,25 mm; E – F: 100 µm.

4.8. Análise da expressão gênica (mRNA) por PCR em tempo real

A avaliação da expressão gênica foi realizada no tecido ósseo intacto da calvária de ratos de 11 semanas de vida (CTL, controle) e no tecido ósseo formado nos defeitos 4 semanas após a injeção de PBS ou células. Os dados foram submetidos à análise estatística por ANOVA one way e pós-teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Com a finalidade de avaliar a qualidade do material genético coletado das amostras de tecido ósseo, foi realizado o teste de integridade do RNA nas amostras (Figura 8). No teste, que avalia a integridade do RNA ribossômico através da detecção das subunidades 18S e 28S, todas as amostras apresentaram RIN (do inglês, RNA integrity number) superior a 8, demonstrando que o material genético se encontrava íntegro e, portanto, adequado para utilização.

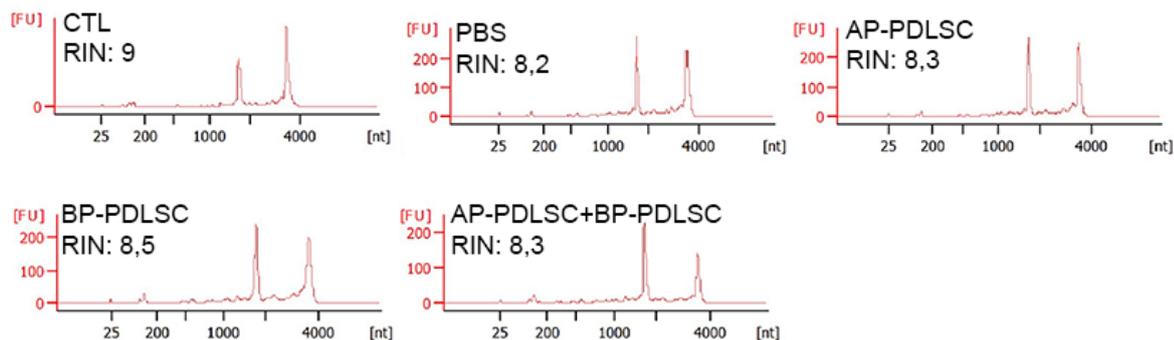


Figura 8. Integridade do RNA obtido da calvária do grupo CTL e dos tecidos neoformados nos defeitos ósseos criados em calvária de ratos 4 semanas após a injeção local de PBS, AP-PDLSCs, BP-PDLSCs e AP-PDLSCs+BP-PDLSCs.

A avaliação da expressão gênica relativa demonstrou, de forma geral, maior expressão dos genes osteogênicos nos defeitos tratados com AP-PDLSCs em comparação aos demais grupos avaliados.

A expressão gênica de *Runx2* foi maior nos tecidos derivados dos defeitos tratados com AP-PDLSCs ($p=0,001$). Não houve diferença estatisticamente significativa na expressão gênica de *Runx2* entre os tecidos dos defeitos tratados com PBS, BP-PDLSCs, AP-PDLSCs+BP-PDLSCs e o grupo CTL (CTL=PBS, $p=0,956$; CTL=BP-PDLSCs, $p=0,116$; CTL=AP-PDLSCs+BP-PDLSCs, $p=1,000$; PBS=BP-PDLSCs, $p=0,340$; PBS=AP-PDLSCs+BP-PDLSCs, $p=0,938$; BP-PDLSCs=AP-PDLSCs+BP-PDLSCs, $p=0,101$) (Figura 9A).

A expressão gênica de *Sp7* foi maior nos tecidos derivados dos defeitos tratados com AP-PDLSCs ($p=0,001$). A expressão gênica de *Sp7* nos tecidos obtidos dos defeitos tratados com BP-PDLSCs foi menor em comparação àqueles obtidos dos defeitos tratados com PBS ($p=0,001$). Não houve diferença estatisticamente significativa na expressão gênica de *Sp7* nos tecidos obtidos dos defeitos tratados com PBS, AP-PDLSCs+BP-PDLSCs e do grupo CTL (CTL=PBS, $p=0,167$; CTL=BP-PDLSCs, $p=0,088$; CTL=AP-PDLSCs+BP-PDLSCs, $p=0,998$; PBS=AP-PDLSCs+BP-PDLSCs, $p=0,101$; BP-PDLSCs=AP-PDLSCs+BP-PDLSCs, $p=0,148$) (Figura 9B).

A expressão gênica de *Alp* foi maior nos tecidos derivados dos defeitos tratados com AP-PDLSCs ($p=0,001$). A expressão gênica de *Alp* foi maior nos tecidos obtidos dos defeitos tratados com PBS em comparação àqueles obtidos dos defeitos tratados com BP-PDLSCs ($p=0,001$), AP-PDLSCs+BP-PDLSCs ($p=0,044$) e do grupo CTL ($p=0,001$). Não houve diferença estatisticamente significativa na

expressão gênica de *Alp* nos tecidos obtidos dos defeitos tratados com BP-PDLSCs e AP-PDLSCs+BP-PDLSCs ($p=0,242$) (Figura 9C).

A expressão gênica de *Bglap* foi maior nos tecidos derivados dos defeitos tratados com AP-PDLSCs ($p=0,001$) e menor naqueles obtidos de defeitos tratados com BP-PDLSCs ($p=0,001$). Não houve diferença estatisticamente significativa na expressão gênica de *Bglap* nos tecidos obtidos dos defeitos tratados com PBS e AP-PDLSCs+BP-PDLSCs e do grupo CTL (CTL=PBS, $p=0,903$; CTL=AP-PDLSCs+BP-PDLSCs, $p=0,820$; PBS=AP-PDLSCs+BP-PDLSCs, $p=1,000$) (Figura 9D).

A expressão gênica de *Ibsp* foi maior nos tecidos derivados dos defeitos tratados com AP-PDLSCs ($p=0,001$). A expressão gênica de *Ibsp* nos tecidos obtidos dos defeitos tratados com BP-PDLSCs foi menor em comparação àqueles obtidos do grupo CTL ($p=0,001$) e dos defeitos tratados com PBS ($p=0,001$) e AP-PDLSCs +BP-PDLSCs ($p=0,001$). Os tecidos derivados dos defeitos tratados com AP-PDLSCs+BP-PDLSCs apresentaram menor expressão gênica de *Ibsp* em comparação àqueles derivados do grupo CTL ($p=0,003$) e maior em relação aos tecidos dos defeitos tratados com PBS ($p=0,004$) (Figura 9E).

A expressão gênica de *Opg* foi maior nos tecidos derivados dos defeitos tratados com PBS ($p=0,001$). Os tecidos obtidos do grupo CTL apresentaram maior expressão gênica de *Opg* em comparação àqueles obtidos dos defeitos tratados com AP-PDLSCs ($p=0,001$), BP-PDLSCs ($p=0,001$) e AP-PDLSCs+BP-PDLSCs ($p=0,001$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os tecidos obtidos dos defeitos tratados com AP-PDLSCs, BP-PDLSCs e AP-PDLSCs+BP-PDLSCs (AP-PDLSCs=BP-PDLSCs, $p=0,506$; AP-PDLSCs=AP-PDLSCs+BP-PDLSCs, $p=0,709$; BP-PDLSCs=AP-PDLSCs+BP-PDLSCs, $p=0,997$) (Figura 9F).

A expressão gênica relativa de genes envolvidos na osteoclastogênese também foi avaliada. A expressão gênica de *Rankl* foi maior nos tecidos derivados de defeitos tratados com AP-PDLSCs ($p=0,001$). Nos tecidos obtidos dos defeitos tratados com BP-PDLSCs, a expressão gênica de *Rankl* foi menor em comparação àqueles obtidos dos grupos CTL e dos defeitos tratados com PBS ($p=0,007$ e $p=0,001$, respectivamente) e semelhante aos tecidos dos defeitos tratados com AP-PDLSCs+BP-PDLSCs ($p=0,410$). Nos tecidos derivados dos defeitos tratados com AP-PDLSCs+BP-PDLSCs, a expressão gênica foi menor em comparação àqueles derivados dos defeitos tratados com PBS ($p=0,005$). Não houve diferença estatisticamente significativa na expressão gênica de *Rankl* nos tecidos obtidos do

grupo CTL e dos defeitos tratados com PBS e AP-PDLSCs+BP-PDLSCs ($p=0,321$ e $p=0,186$, respectivamente) (Figura 9G).

A expressão gênica de *Rank* foi maior nos tecidos derivados de defeitos tratados com AP-PDLSCs ($p=0,001$). Nos tecidos obtidos de defeitos tratados com BP-PDLSCs, a expressão gênica de *Rank* foi menor em comparação àqueles obtidos dos defeitos tratados com PBS ($p=0,017$) e semelhante àqueles obtidos de defeitos tratados com AP-PDLSCs+BP-PDLSCs ($p=0,146$) e do grupo CTL ($p=0,551$). Não houve diferença estatisticamente significativa na expressão gênica de *Rank* entre os tecidos obtidos do grupo CTL e aqueles derivados de defeitos tratados com PBS e AP-PDLSCs+BP-PDLSCs (CTL=PBS, $p=0,268$; CTL=AP-PDLSCs+BP-PDLSCs, $p=0,877$; PBS=AP-PDLSCs+BP-PDLSCs, $p=0,770$) (Figura 9H).

A razão da expressão gênica de *Rankl/Opg*, calculada a partir da média de expressão relativa de cada gene, foi maior que 1 para os tecidos obtidos de defeitos tratados com AP-PDLSCs, demonstrando que a expressão de *Rankl* foi maior que a de *Opg* nesses tecidos. No grupo CTL a razão foi 0,99, o que significa que a expressão dos dois genes foi semelhante para esse grupo. Nos tecidos derivados de defeitos tratados com BP-PDLSCs e AP-PDLSCs+BP-PDLSCs, a razão foi menor que 1, indicando que a expressão de *Opg* foi maior em relação à expressão de *Rankl* (Figura 9I).

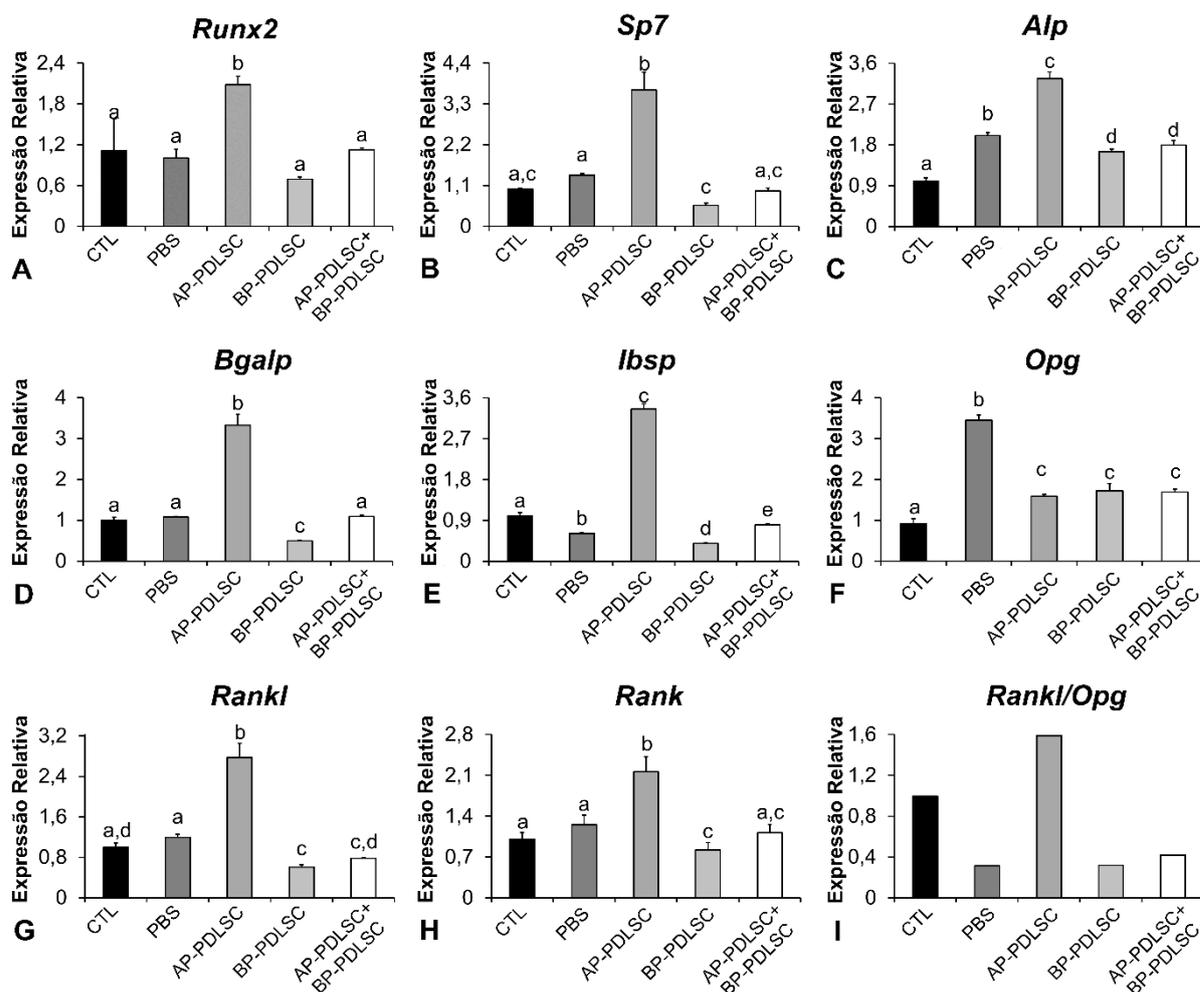


Figura 9. Expressão gênica relativa de marcadores osteogênicos e osteoclastogênicos no tecido obtido da calvária do grupo CTL e dos tecidos neoformados nos defeitos ósseos criados em calvária de ratos 4 semanas após a injeção local de PBS, AP-PDLSCs, BP-PDLSCs e AP-PDLSCs+BP-PDLSCs. Os dados estão representados como média \pm desvio-padrão (n=4). Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos (ANOVA, $p \leq 0,05$).

Considerando que a angiogênese é um processo importante para a formação óssea, a expressão relativa de genes angiogênicos também foi avaliada.

A expressão gênica de *Cd31* foi maior nos tecidos derivados de defeitos tratados com AP-PDLSCs ($p=0,001$). Nos tecidos obtidos dos defeitos tratados com BP-PDLSCs, a expressão gênica de *Cd31* foi maior em comparação àqueles obtidos do grupo CTL ($p=0,004$) e dos defeitos tratados com AP-PDLSCs+BP-PDLSCs ($p=0,002$), e menor em comparação aos tecidos derivados de defeitos tratados com PBS ($p=0,001$). Não houve diferença estatisticamente significativa na expressão gênica de *Cd31* entre tecidos derivados de defeitos do grupo CTL e daqueles tratados com AP-PDLSCs+BP-PDLSCs ($p=0,990$) (Figura 10A).

A expressão gênica de *Vegfa* foi maior nos tecidos obtidos de defeitos tratados com PBS (PBS > AP-PDLSCs, $p=0,007$; PBS > CTL, BP-PDLSCs e AP-PDLSCs+BP-PDLSCs, $p=0,001$). Os tecidos derivados de defeitos tratados com AP-PDLSCs apresentaram maior expressão gênica de *Vegfa* em comparação àqueles obtidos do grupo CTL ($p=0,042$) e dos defeitos tratados com BP-PDLSCs ($p=0,001$) e AP-PDLSCs+BP-PDLSCs ($p=0,001$). Em comparação ao grupo CTL, houve menor expressão gênica de *Vegfa* nos tecidos derivados de defeitos tratados com BP-PDLSCs ($p=0,001$) e AP-PDLSCs+BP-PDLSCs ($p=0,001$). Não houve diferença estatisticamente significativa na expressão gênica de *Vegfa* entre os tecidos derivados de defeitos tratados com BP-PDLSCs e AP-PDLSCs+BP-PDLSCs ($p=0,985$) (Figura 10B).

A expressão gênica de *Vegfr2* foi menor no grupo CTL (CTL < PBS e AP-PDLSCs, BP-PDLSCs, $p=0,001$; CTL < AP-PDLSCs+BP-PDLSCs, $p=0,028$). A expressão gênica de *Vegfr2* nos tecidos derivados de defeitos tratados com AP-PDLSCs+BP-PDLSCs foi menor em comparação àqueles obtidos de defeitos tratados com PBS ($p=0,009$) e AP-PDLSCs ($p=0,012$), e semelhante aos de defeitos tratados com BP-PDLSCs ($p=0,329$). Não houve diferença estatisticamente significativa na expressão gênica de *Vegfr2* entre os tecidos derivados de defeitos tratados com PBS, AP-PDLSCs e BP-PDLSCs (PBS=AP-PDLSCs, $p=1,000$; PBS=BP-PDLSCs, $p=0,308$; AP-PDLSCs=BP-PDLSCs, $p=0,370$) (Figura 10C).

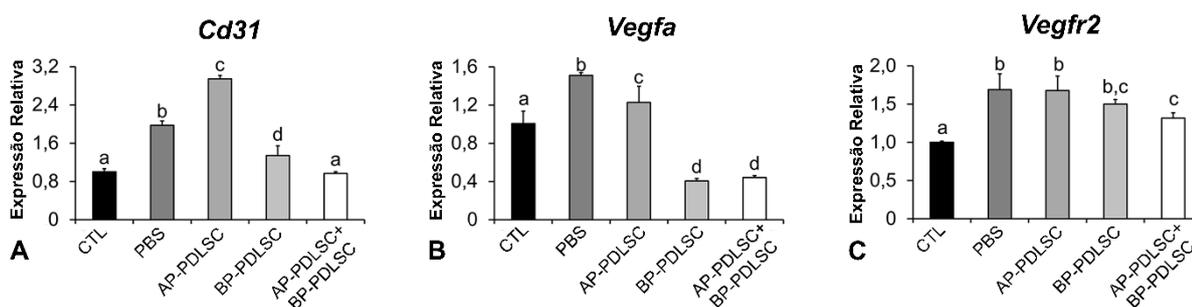


Figura 10. Expressão gênica relativa de marcadores angiogênicos no tecido obtido da calvária do grupo CTL e dos tecidos neoformados nos defeitos ósseos criados em calvária de ratos 4 semanas após a injeção local de PBS, AP-PDLSCs, BP-PDLSCs e AP-PDLSCs+BP-PDLSCs. Os dados estão representados como média \pm desvio-padrão ($n=4$). Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos (ANOVA, $p \leq 0,05$).

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O objetivo desse estudo foi caracterizar PDLSCs com diferentes potenciais osteogênicos e avaliar sua capacidade para regenerar defeitos ósseos criados em calvárias de ratos. As células apresentaram taxas de proliferação diferentes e, de forma geral, expressão de marcadores de superfície semelhantes. Quanto à diferenciação osteoblástica, conforme esperado, o potencial osteogênico das AP-PDLSCs foi maior em comparação às BP-PDLSCs. Essa diferença, no entanto, não se refletiu no potencial para reparar o tecido ósseo, pois todos os grupos tratados com células apresentaram formação óssea semelhante, sem atingir a regeneração do defeito. Nos tecidos neoformados nos defeitos tratados com AP-PDLSCs houve maior expressão de genes marcadores osteogênicos, osteoclastogênicos e angiogênicos quando comparados aos tecidos dos defeitos tratados com BP-PDLSCs e AP-PDLSCs+BP-PDLSCs.

A expressão dos marcadores avaliados por citometria de fluxo, CD90, CD73, CD34, CD45 e CD14, para ambas as populações celulares, e a expressão de MHC II nas BP-PDLSCs, foram compatíveis com os parâmetros mínimos estabelecidos pela International Society for Cellular Therapy (ISCT) para MSCs humanas (DOMINICI et al., 2006). Nas AP-PDLSCs, a expressão de MHC II foi 2,8%, portanto, maior que o limite estabelecido pela ISCT. A expressão de MHC I foi alta em ambas as populações celulares, sendo maior nas BP-PDLSCs. A expressão de MHC I associada à expressão de MHC II baixa ou ausente é esperada para MSCs humanas, tais como as PDLSCs e as BM-MSCs (TRUBIANI et al., 2019; LE BLANC et al., 2003). Aumentos na expressão das moléculas de MHC I e II são associados à estimulação das MSCs por fatores pró-inflamatórios, como IFN- γ (do inglês, interferon-gamma) (KRAMPERA et al., 2013). No entanto, do ponto de vista imunológico, a expressão das moléculas de MHC na superfície das MSCs não parece ocasionar a rejeição das células transplantadas pelo organismo receptor. O transplante de MSCs humanas em animais de outras espécies, tais como ratos e coelhos, é um procedimento seguro e as células são incorporadas pelo organismo no qual são injetadas (FAHMY et al., 2017; VELANDIA et al., 2018; ŘEHOŘOVÁ et al., 2019). Ainda, a expressão de CD13 e CD29 corrobora dados de estudos anteriores (TRUBIANI et al., 2019). O marcador CD54 (ou ICAM-1) é constitutivamente expresso em diversos tipos celulares, mas a estimulação celular

por fatores pró-inflamatórios pode aumentar sua expressão (ROEBUCK e FINNEGAN, 1999). Estímulos inflamatórios também aumentam a capacidade proliferativa nas PDLSCs, além de reduzir a diferenciação osteoblástica dessas células (TANG ET AL., 2016).

Para determinar o potencial de diferenciação osteoblástica das AP-PDLSCs e BP-PDLSCs, foram avaliadas a atividade *in situ* de ALP e a formação de matriz extracelular mineralizada. A ALP é um marcador fenotípico importante para a diferenciação osteoblástica e possui papel fundamental na formação de matriz mineralizada (MAJORS et al., 1997; OWEN et al., 1990). Ambas as populações celulares avaliadas apresentaram capacidade de diferenciação osteoblástica, evidenciada pela atividade *in situ* de ALP, que foi maior nas AP-PDLSCs em comparação com as BP-PDLSCs. Embora não tenha sido encontrada diferença estatística na formação de nódulos mineralizados, as AP-PDLSCs apresentam tendência à maior mineralização em comparação às BP-PDLSCs. Nossos dados estão em acordo com um estudo recente que demonstrou que uma população de PDLSCs com alto potencial osteogênico apresenta maior expressão de *Runx2* e *Sp7*, além de maior formação de matriz extracelular mineralizada, quando comparada a uma população com baixo potencial osteogênico (ASSIS et al., 2021). O mesmo estudo demonstrou que a diferença de potencial osteogênico entre as células pode ser explicada, pelo menos em parte, por diferenças nos perfis de expressão de genes associados à pluripotência, tais como *Nanog* e *Oct-4* e que, em última análise, mecanismos epigenéticos são responsáveis por essas diferenças (ASSIS ET AL., 2021). No presente estudo, tais mecanismos não foram avaliados, mas investigações futuras podem ser relevantes para elucidar os mecanismos envolvidos na diferenciação osteoblástica das AP-PDLSCs e BP-PDLSCs. É importante notar que a diferença na formação da matriz extracelular mineralizada entre os dois grupos celulares foi muito mais acentuada no trabalho de Assis e colaboradores (2021) do que a demonstrada no presente estudo, variação que pode estar associada aos diferentes meios de cultivo utilizados nos dois trabalhos.

Considerando a diferença de potencial osteogênico entre as AP-PDLSCs e BP-PDLSCs *in vitro*, a investigação da capacidade de induzir a regeneração óssea *in vivo* foi realizada utilizando o modelo de defeito em calvária de rato. Quatro semanas após a injeção local de AP-PDLSCs, BP-PDLSCs ou AP-PDLSCs+BP-PDLSCs, o tecido ósseo neoformado foi avaliado por μ CT, análise histológica e PCR

em tempo real. Apesar de apresentar diferentes potenciais osteogênicos *in vitro*, a μ CT revelou que as AP-PDLSCs, BP-PDLSCs e AP-PDLSCs+BP-PDLSCs induziram formação óssea *in vivo* semelhante, sendo todas superiores em comparação aos defeitos tratados com PBS. Essa tendência foi observada em trabalhos anteriores com células de outros sítios. BM-MSCs que apresentaram maior potencial de diferenciação osteogênica *in vitro* em comparação com AT-MSCs, não demonstraram maior capacidade de induzir a formação óssea *in vivo* (FREITAS et al., 2019a). Da mesma maneira, osteoblastos derivados do mesoderma apresentaram grande potencial osteogênico *in vitro* em comparação àqueles obtidos da crista neural, mas promoveram formação óssea *in vivo* muito similares (SOUZA et al., 2020). Dessa forma, o potencial osteogênico *in vitro* parece não prever com fidelidade o potencial osteogênico *in vivo* das células.

Ainda, ao comparar os dados aqui apresentados com aqueles obtidos anteriormente por nosso grupo pesquisa, observamos que independentemente da fonte a partir da qual as MSCs são obtidas, a formação óssea nos defeitos de calvária é equivalente. A porcentagem de volume ósseo obtida após o tratamento de defeitos ósseos com BM-MSCs e AT-MSCs derivadas de ratos foi em torno de 45% e 35%, respectivamente (FREITAS et al., 2019a). Osteoblastos derivados do mesoderma e da crista neural de ratos apresentaram porcentagem de volume ósseo de aproximadamente 20% a 30%, respectivamente (SOUZA et al., 2020). Os dados de ambos os trabalhos são muito próximos dos valores médios encontrados nesse estudo para AP-PDLSCs (~ 30%), BP-PDLSCs (~33%) e AP-PDLSCs+BP-PDLSCs (~34%). Corroborando nossos resultados, ao comparar defeitos tratados com Bio-Oss® associado à PDLSCs ou BM-MSCs, foi demonstrado que não houve diferença na formação óssea nesses defeitos (YU, ZHOU, WANG, 2014). No mesmo trabalho, a porcentagem de volume ósseo nos defeitos tratados com biomaterial associado à PDLSCs foi de 48,6%, portanto maior que o encontrado no presente estudo. No entanto, o maior volume ósseo pode estar associado ao maior tempo de avaliação utilizado no estudo, que foi de 8 semanas após o tratamento do defeito.

Os aspectos histológicos dos tecidos neoformados nos defeitos tratados com PDLSCs injetadas localmente não diferem daqueles encontrados em estudos anteriores, ou seja, todos apresentam maior formação de tecido conjuntivo nos defeitos tratados com veículo (PBS) e, nos defeitos tratados com células, tecido ósseo neoformado em diferentes estágios de maturação (SOUZA et al., 2020;

FREITAS et al., 2019a; FREITAS et al., 2019b). Os dados indicam que MSCs injetadas localmente, independentemente do tecido ou da espécie de origem e do grau de diferenciação, promovem formação óssea no modelo de defeito ósseo aqui apresentado, sem promover, no entanto, a completa regeneração do tecido ósseo. A presença de tecido ósseo imaturo e lamelar nos defeitos tratados com AP-PDLSCs, BP-PDLSCs e AP-PDLSCs+BP-PDLSCs indica a ocorrência de processo de remodelação no tecido ósseo.

A avaliação da expressão gênica nos tecidos neoformados corrobora a ocorrência de processo de remodelação no tecido ósseo 4 semanas após a injeção das células. De forma geral, os tecidos derivados de defeitos tratados com AP-PDLSCs apresentam maior expressão dos genes relacionados à formação e reabsorção óssea, como evidenciado pela maior expressão de *Runx2*, *Sp7*, *Alp*, *Bglap*, *Ibsp* e *Rank* e *Rankl*, respectivamente. A expressão de genes com funções contrastantes nos tecidos obtidos de defeitos tratados com AP-PDLSCs sugere fortemente a ocorrência de um processo de remodelação óssea no tecido no período avaliado. Nossos resultados contrastam com estudos anteriores, no qual os tratamentos que induziram maior expressão de genes osteogênicos também promoveram maior formação óssea. BM-MSCs injetadas localmente promoveram maior formação óssea em defeitos de calvária e induziram a maior expressão de genes osteogênicos no tecido, acompanhado de uma razão *Rankl/Opg* baixa e menor expressão de *Trap* (do inglês, Tartrate-resistant acid phosphatase), em comparação aos defeitos tratados com AT-MSCs, células que apresentaram a menor formação óssea no estudo (FREITAS et al., 2019a). A expressão de genes angiogênicos *Cd31*, *Vegfa* e *Vegfr2* também foi maior nos tecidos derivados de defeitos tratados com AP-PDLSCs em comparação aos demais defeitos tratados com células. No entanto, a diferença no genótipo encontrado nos tecidos neoformados após a injeção das células não resultou em maior formação óssea em nenhum dos grupos tratados com PDLSCs. Em conjunto, nossos dados indicam que populações de PDLSCs, independentemente do potencial osteogênico *in vitro*, podem ser consideradas para o desenvolvimento de terapias celulares para o tratamento de defeitos ósseos.

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

- As PDLSCs apresentaram características de MSCs humanas, como adesão ao plástico, expressão de marcadores mesenquimais na superfície celular e ausência de marcadores hematopoiéticos.
- As AP-PDLSCs apresentaram maior potencial osteogênico *in vitro* do que as BP-PDLSCs.
- As AP-PDLSCs, BP-PDLSCs ou a mistura de ambas, injetadas localmente, promoveram formação óssea semelhante nos defeitos criados em calvária de ratos e maior do que nos defeitos tratados com PBS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALVAREZ R, LEE HL, WANG CY, HONG C. Characterization of the osteogenic potencial of mesenchymal ligament based on cell surface markers. *Int J Oral Sci* 2015;7:213-219.
2. ALVAREZ-VIEJO M, MENENDEZ-MENENDEZ Y, BLANCO-GELAZ MA, FERRERO-GUTIERREZ A, FERNANDEZ-RODRIGUEZ MA, GALA J, OTERO-HERNANDEZ J. Quantifying mesenchymal stem cells in the mononuclear cell fraction of bone marrow samples obtained for cell therapy. *Tranplant Proc* 2013;45(1):434-439.
3. ASSIS RIF, SCHMIDT AG, RACCA F, DA SILVA RA, ZAMBUZZI WF, SILVÉRIO KG, NOCITI FH, PECORARI VG, WIENCH M, ANDIA DC. DNMT1 Inhibitor Restores RUNX2 Expression and Mineralization in Periodontal Ligament Cells. *DNA and Cell Biology* 2021;40:662–674.
4. ASSIS RIF, WIENCH M, SILVÉRIO KG, DA SILVA RA, FELTRAN GDS, SALLUM EA, CASATI MZ, NOCITI FH JR, ANDIA DC. RG108 increases NANOG and OCT4 in bone marrow-derived mesenchymal cells through global changes in DNA modifications and epigenetic activation. *PLoS One* 2016;13(12):e0207873.
5. BAIN JB. Morbidity associated with bone marrow aspiration and trephine biopsy – a review of UK data for 2004. *Haematologica* 2006;91:1293-1294.
6. BALDWIN P, LI DJ, AUSTON DA, MIR HS, YOON RS, KOVAL KJ. Autograft, allograft, and bone graft substitutes: clinical evidence and indications for use in the setting of orthopaedic trauma surgery. *Journal of Orthopaedic Trauma* 2019;33: 203–213.
7. BELOTI MM, SICCHIERI LG, OLIVEIRA PT, ROSA AL. The influence of osteoblast differentiation stage on bone formation in autogenously implanted cell-based poly(lactide-co-glycolide) and calcium phosphate constructs. *Tissue Eng* 2012;9-10:999-1005.
8. BOUXSEIN ML, BOYD SK, CHRISTIANSEN BA, GULDBERG RE, JEPSEN KJ, MÜLLER R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res* 2010;25:1468–1486.
9. DIOMEDE F, RAJAN TS, GATTA V, D'AURORA M, MERCIARO I, MARCHISIO M, MUTTINI A, CAPUTI S, BRAMANTI P, MAZZON E, TRUBIANI O. Stemness Maintenance Properties in Human Oral Stem Cells after Long-Term Passage. *Stem Cells International* 2017; 1–14.
10. DOMINICI M, LE BLANC K, MUELLER I, SLAPER-CORTENBACH I, MARINI FC, KRAUSE DS, DEANS RJ, KEATING A, PROCKOP DJ, HORWITZ EM. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8(4):315-317.

11. ELEUTERIO E, TRUBIANI O, SULPIZIO M, DI GIUSEPPE F, PIERDOMENICO L, MARCHISIO M, GIANCOLA R, GIAMMARRIA G, MISCIA S, CAPUTI S, DI ILIO C, ANGELUCCI S. Proteome of Human Stem Cells from Periodontal Ligament and Dental Pulp. *PLoS ONE* 2013;8:e71101.
12. FAHMY SR, SOLIMAN AM, ANSARY ME, ELHAMKID AS. Therapeutic efficacy of human umbilical cord mesenchymal stem cells transplantation against renal ischemia/ reperfusion injury in rats. *Tissue Cell* 2017;49:369-375.
13. FERRAZ EP, ALMEIDA ALG, FEITAS GP, CROVACE MC, PEITL O, OLIVEIRA PT, BELOTI MM, ROSA AL. *In vitro* and *in vivo* evaluations of a bioactive glass scaffold (Bio-Sca) for bone regeneration. In: IV International Conference on Tissue Engineering, 2015, Lisboa. Book of Abstracts. Lisboa: ICTE, 2015 p. 56.
14. FILLINGHAM Y, JACOBS J. Bone grafts and their substitutes. *Bone Joint J* 2017;98-B:1-A:6-9.
15. FINKEMEIER CG. Bone-grafting and bone-graft substitutes. *J Bone Joint Surg Am.* 2002;84(3):454-64.
16. FREITAS GP, LOPES HB, ALMEIDA ALG, ABUNA RPF, GIMENES R, SOUZA LEB, COVAS DT, BELOTI MM, ROSA AL. Potencial of osteoblastic cells derived from bone marrow and adipose tissue associated with a polymer/ceramic composite to repair bone tissue. *Calcif Tissue Int* 2017;101:312-320.
17. FREITAS GP, LOPES HB, SOUZA ATP, OLIVEIRA PGFP, ALMEIDA ALG, SOUZA LEB, COELHO PG, BELOTI MM, ROSA AL. Cell Therapy: Effect of locally injected mesenchymal stromal cells derived from bone marrow or adipose tissue on bone regeneration of rat calvarial defects. *Sci Rep* 2019(a);9:13476.
18. FREITAS GP, LOPES HB, SOUZA, ATP, OLIVEIRA PGFP, ALMEIDA ALG, COELHO PG, FERREIRA FU, COVAS DT, BELOTI MM, ROSA AL. Effect of cell therapy with osteoblasts differentiated from bone marrow or adipose tissue stromal cells on bone repair. *Regenerative Medicine* 2019(b);14:1107–1119.
19. FRIEDENSTEIN AJ, CHAILAKHJAN RK, LALYKINA KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet* 1970;3:393-403.
20. FRIEDMAN JW. The prophylactic extraction of third molars: a public health hazard. *Am J Public Health* 2007;97:1554-1559.
21. GAY IC, CHEN S, MACDOUGALL M. Isolation and characterization of multipotent human periodontal ligament stem cells. *Orthod Craniofacial Res* 2007;10:149–160.
22. GOMES PS, FERNANDES MH. Rodent models in bone-related research: the relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies. *Lab Anim* 2011;45:14-24.

23. GREGORY CA, GUNN WG, PEISTER A, PROCKOP DJ. AN Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal Biochem* 2004;329:77-84.
24. HOSOYA A, NINOMIYA T, HIRAGA T, YOSHIBA K, YOSHIBA N, KASAHARA E, OZAWA H, NAKAMURA H. Potential of periodontal ligament cells to regenerate alveolar bone. *J Oral Biosci* 2010;52:78-80.
25. IMAM MA, HOLTON J, ERNSTBRUNNER L, PEPKE W, GRUBHOFER F, NARVANI A, SNOW M. A systematic review of the clinical applications and complications of bone marrow aspirate concentrate in management of bone defects and nonunions. *International Orthopaedics (SICOT)* 2017;41, 2213–2220.
26. KIM SH, KIM KH, SEO BM, KOO KT, KIM TI, SEOL YJ, KU Y, RHYU, CHUNG CP, LEE YM. Alveolar bone regeneration by transplantation of periodontal ligament stem cells and bone stem cells in a canine peri-implant defect model: a pilot study. *J Periodontol* 2009;80:1815-1823.
27. KRAMPERA M, GALIPEAU J, SHI Y, TARTE K, SENSEBE L. Immunological characterization of multipotent mesenchymal stromal cells—The International Society for Cellular Therapy (ISCT) working proposal. *Cytotherapy* 2013;15:1054–1061.
28. KUMAR P, VINITHA B, FATHIMA G. Bone grafts in dentistry. *J Pharm Bioallied Sci* 2013;5:125-127.
29. LE BLANC K, TAMMIK C, ROSENDAHL K, ZETTERBERG E, RINGDÉN O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol* 2003;31:890-896.
30. LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25:402-408.
31. LOPES HB, FERRAZ EP, ALMEIDA ALG, FLORIO P, GIMENES R, ROSA AL, BELOTI MM. Participation of microRNA-34a and RANKL on bone repair induced by poly(vinylidene-trifluoroethylene)/barium titanate membrane. *J Biomater Sci Polym Ed* 2016;27:1369-1379.
32. LOPES HB, SANTOS TS, OLIVEIRA FS, FREITAS GP, ALMEIDA ALG, GIMENES R, ROSA AL, BELOTI MM. Poly(vinylidene-trifluoroethylene)/barium titanate composite for *in vivo* support bone formation. *J Biomater Appl* 2014;29:104-112.
33. MAJORS AK, BOEHM CA, NITTO H, MIDURA RJ, MUSCHLER GF. Characterization of human bone marrow stromal cells with respect to osteoblastic differentiation. *J Orthop Res* 1997;15:546-557.
34. NAGAMOTO K, KOMALI M, SEKIYA I, SAKAGUCHI Y, NOGUCHI K, ODA S, MUNETA T, ISHIKAWA I. Stem cell properties of human periodontal ligament cells. *J Periodont* 2006;41:303-310.

35. OWEN TA, ARONOW M, SHALHOUB V, BARONE LM, WILMING L, TASSINARI MS, KENNEDY MB, POCKWINSE S, LIAN JB, STEIN GS. Progressive development of the rat osteoblast phenotype *in vitro*: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J Cell Physiol* 1990;143:420-430.
36. PITTENGER MF, MACKAY AM, BECK SC, JAISWAL RK, DOUGLAS R, MOSCA JD, MOORMAN MA, SIMONETTI DW, CRAIG S, MARSHAK DR. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science* 1999;284:143-147.
37. ŘEHOŘOVÁ M, VARGOVÁ I, FOROSTYAK S, VACKOVÁ I, TURNOVCOVÁ K, SKALNÍKOVÁ HK, VODIČKA P, KUBINOVÁ S, SYKOVÁ E, JENDELOVÁ P. A combination of intrathecal and intramuscular application of human mesenchymal stem cells partly reduces the activation of necroptosis in the spinal cord of SOD1g93a rats. *Stem Cells Transl Med* 2019;00:1-13.
38. ROEBUCK KA, FINNEGAN A. Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) gene expression. *J Leukoc Biol* 1999;66:876-888.
39. SAITO MT, SALMON CR, AMORIM BR, AMBROSANO GMB, CASATI MZ, SALLUM ES, NOCITI JR. FH, SILVÉRIO KG. Characterization of highly osteoblast/cementoblast cells from a CD105-enriched periodontal ligament progenitor cell population. *J Periodont* 2014;85:205-211.
40. SANTOS TS, ABUNA RPF, ALMEIDA ALG, BELOTI MM, ROSA AL. Effect of collagen sponge and fibrin glue on bone repair. *J Appl Oral Sci* 2015;23:623-628.
41. SANTOS TS, ABUNA RPF, LOPES HB, ALMEIDA ALG, BELOTI MM, ROSA AL. Association of mesenchymal stem cell and osteoblasts for bone repair. *Regen Med* 2015;10:127-133.
42. SEO BM, MIURA M, GRONTHOS S, BARTOLD PM, BATOULI S, BRAHIM J, YOUNG M, ROBEY PG, WANG CY, SHI S. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 2004;364:149-155.
43. SILVÉRIO KG, RODRIGUES TL, COLLETA RD, BENEVIDES L, SILVA JSD, CASATI MZ, SALLUM EA, NOCITI JR. FH. Mesenchymal stem cell properties of periodontal ligament cells from deciduous and permanent teeth. *J Periodont* 2010;81:1207-1215.
44. SOUZA ATP, FREITAS GP, LOPES HB, FERRAZ EP, OLIVEIRA FS, BELOTI MM, ROSA AL. Effect of cell therapy with allogenic osteoblasts on bone repair of rat calvaria defects. *Cytotherapy* 2018;20:1267-1277.
45. SOUZA ATP, LOPES HB, FREITAS GP, FERRAZ EP, OLIVEIRA FS, ALMEIDA ALG, WEFFORT D, BELOTI MM, ROSA AL. Role of embryonic origin on osteogenic potential and bone repair capacity of rat calvarial osteoblasts. *J Bone Miner Metab* 2020;38:481-490.

46. SOUZA NJ, JUSTO GZ, OLIVEIRA CR, HAUN M, BINCOLETTO C. Cytotoxicity of materials used in perforation repair tested using the V710 fibroblast cell line and the granulocyte-macrophage progenitor cell. *Int Endod J* 2006;310:40-47.
47. TANG H.-N, XIA Y, YU Y, WU R.-X, GAO L.-N, CHEN F.-M. Stem cells derived from “inflamed” and healthy periodontal ligament tissues and their sheet functionalities: a patient-matched comparison. *J Clin Periodontol* 2016;43,72–84.
48. TRUBIANI O, PIZZICANNELLA J, CAPUTI S, MARCHISIO M, MAZZON E, PAGANELLI R, PAGANELLI A, DIOMEDE F. Periodontal Ligament Stem Cells: Current Knowledge and Future Perspectives. *Stem Cells and Development* 2019;28:995–1003.
49. VELANDIA SL, DI LAURO S, ALONSO-ALONSO ML, BARTOLOMÉ ST, SRIVASTAVA GK, PASTOR JC, FERNANDEZ-BUENO I. Biocompatibility of intravitreal injection of human mesenchymal stem cells in immunocompetent rabbits. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2018;256:125-134.
50. WEI X, YANG X, HAN Z, QU F, SHAO L, SHI Y. Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. *Acta Pharmacologica Sinica* 2013;34:747–754.
51. YOUNGER EM, CHAPMAN MW. Morbidity at bone graft donor sites. *J Orthop Trauma* 1989;3:192-195.
52. YU BH, ZHOU Q, WANG ZL. Periodontal ligament versus bone marrow mesenchymal stem cells in combination with Bio-Oss scaffolds for ectopic and *in situ* bone formation: a comparative study in the rat. *J Biomater Appl* 2014;29:243-253.
53. ZHOU Y, HUTMACHER DW, SAE-LIM V, ZHOU Z, WOODRUFF M, LIM TM. Osteogenic and adipogenic induction potential of human periodontal cells. *J Periodontol* 2008;79:525-534.
54. ZWINGENBERGER S, NICH C, VALLADARES RD, YAO Z, STIEHLER M, GOODMAN SB. Recommendations and considerations for the use of biologics in orthopedic surgery. *BioDrugs* 2012;26:245-256.

ANEXOS

ANEXOS

ANEXO 1



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

Departamento de Prótese e Periodontia
ÁREA DE PERIODONTIA



Piracicaba, 20 de março de 2019.

DECLARAÇÃO

Venho por meio desta informar, que as populações celulares estudadas no Projeto de Pesquisa intitulado “**Efeito de células-tronco mesenquimais do ligamento periodontal com alto e baixo potencial osteogênico na regeneração do tecido ósseo**”, sob a responsabilidade da Prof. Dr. Marcio Mateus Beloti, são provenientes do **Biobanco B041- Periocells**, alocado no Laboratório de Biologia Celular e Molecular da Área de Periodontia, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Karina Gonzales Silvério Ruiz
Vice-Coordenadora do Biobanco Periocells

ANEXO 2

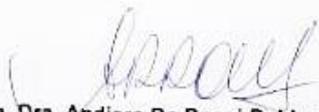
JUSTIFICATIVA DE NÃO APLICAÇÃO DO TCLE

Para o estudo serão utilizadas células cultivadas a partir do ligamento periodontal derivado de terceiros molares indicados para exodontia. Essas células foram coletadas em projeto prévio, na qual foi aplicado o TCLE aos pacientes e as células fazem parte do banco de células denominado Biobanco B041 - Periocytes, FOP-UNICAMP. Para o presente estudo, intitulado "**Efeito de células-tronco mesenquimais do ligamento periodontal com alto e baixo potencial osteogênico na regeneração do tecido ósseo**", o TCLE não será aos participantes, pois os dados dos dois indivíduos estão desatualizados, não sendo possível localizá-los.

ANEXO 3

<small>UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO</small> <small>FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO</small> CEUA <small>COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</small>	UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
CERTIFICADO CEUA – FORP/USP	
<p>Certificamos que o projeto intitulado “Efeito de células-tronco mesenquimais do ligamento periodontal com alto e baixo potencial osteogênico no reparo ósseo”, Protocolo nº 2019.1.419.58.3, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Marcio Mateus Beloti – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADO pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (CEUA/FORP) em 25/09/2019.</p>	
Vigência do Projeto	01/10/2019 a 01/08/2021
Espécie/Linhagem	Rato heterogênico / Wistar Hannover
Nº de animais	75
Peso/Idade	~150 g / 4 semanas
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central – PUOSP-RP
<p>Ribeirão Preto, 25 de setembro de 2019.</p>  Prof. Dra. Andriara De Rossi Daldegan Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais	
CEUA - FORP/USP	

ANEXO 4

 UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
CERTIFICATE CEUA – FORP/USP	
<p>We hereby certify that the project entitled “Effect of mesenchymal stem cells from periodontal ligament with high and low osteogenic potential on bone repair” Protocol n° 2019.1.419.58.3 under the responsibility of do Prof. Dr. Márcio Mateus Beloti – involving the production, maintenance and/or use of animals from the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for purposes of scientific research (or teaching) – is in accordance with the provisions of Law No. 11.794, of October 8th, 2008, Decree No 6899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Board of Animal Experimentation Control (CONCEA), with the Ethical principles in animal research adopted by the Animal Research Ethics Committee of the School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil, and was approved in 25/09/2019.</p>	
Duration of the Project	01/10/2019 a 01/08/2021
Species/Lineage	Heterogenic Rats / Wistar Hannover
N° of animals	75
Weight / age	~150g / 4 weeks-old
Gender	male
Origin	Central Animal Research Facilities of Campus Ribeirão Preto – University of São Paulo
<p>Ribeirão Preto, September 25th, 2019.</p>  Prof. Dra. Andriara De Rossi Daldegan Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais	
CEUA - FORP/USP	

ANEXO 5



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
Comissão de Ética no Uso de Animais

Of. CEUA 123/2019

Ribeirão Preto, 20 de novembro de 2019.

Ref. processo nº 2019.1.419.58.3

Senhor Pesquisador,

Informamos que a Comissão de Ética no Uso de Animais da FORP, em sua 73ª Sessão, realizada em 20/11/2019, REFERENDOU a aprovação da solicitação de alteração de espécie/linhagem animal para desenvolvimento do projeto de pesquisa intitulado "Efeito de células-tronco mesenquimais do ligamento periodontal com alto e baixo potencial osteogênico no reparo ósseo".

Lembramos que deverá ser entregue na Secretaria da CEUA, **até 24/09/2021**, o **Relatório Final** contendo os resultados e/ou resumo do trabalho publicado.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Andíara De Rossi Daldegan
Coordenadora Comissão de Ética no Uso de Animais

Ilmo(a). Sr(a).

Prof. Dr. Márcio Mateus BelotiDepartamento de Biologia Básica e Oral
desta Faculdade

AAFN/vgpr