

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

UGO GUILHERME ROQUE RINCO

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA CAPACIDADE DE DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA
DE CÉLULAS-TRONCO DE DENTES DECÍDUOS ESFOLIADOS HUMANOS
CULTIVADAS EM GRÂNULOS DE HIDROXIAPATITA E BETA-TRICÁLCIO
FOSFATO**

ALFENAS/MG

2021

UGO GUILHERME ROQUE RINCO

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA CAPACIDADE DE DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA
DE CÉLULAS-TRONCO DE DENTES DECÍDUOS ESFOLIADOS HUMANOS
CULTIVADAS EM GRÂNULOS DE HIDROXIAPATITA E BETA-TRICÁLCIO
FOSFATO**

Dissertação de mestrado apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas pela Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Alfenas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Vivien Thiemy Sakai

Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo Garcia Mureb Jacob

ALFENAS/MG

2021

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas

R579a Rinco, Ugo Guilherme Roque.
Avaliação *in vitro* da capacidade de diferenciação osteogênica de células-tronco de dentes decíduos esfoliados humanos cultivadas em grânulos de hidroxiapatita e beta-tricálcio fosfato. / Ugo Guilherme Roque Rinco. - Alfenas/MG, 2021.
61f. : il. –
Orientadora: Vivien Thiemy Sakai.
Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas) - Universidade Federal de Alfenas, 2021.
Bibliografia.

1. Regeneração Óssea. 2. Engenharia Tecidual. 3. Células-Tronco.
I. Sakai, Vivien Thiemy. II. Título.

CDD-617.605

Ugo Guilherme Roque Rinco

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA CAPACIDADE DE DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA DE CÉLULAS-TRONCO DE DENTES DECÍDUOS ESFOLIADOS HUMANOS CULTIVADAS EM GRÂNULOS DE HIDROXIAPATITA E BETA-TRICÁLCIO FOSFATO

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação/Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Odontologia.

Aprovada em: 11 de junho de 2021

Profa. Dra. Vivien Thiemy Sakai
Instituição: Universidade Federal de Alfenas- MG

Profa. Dra. Nádia Carolina Teixeira Marques
Instituição: Unifenas- MG

Profa. Dra. Marina Lara de Carli Dias
Instituição: Universidade Federal de Alfenas- MG



Documento assinado eletronicamente por **Vivien Thiemy Sakai Jacob, Professor do Magistério Superior**, em 13/06/2021, às 09:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Nádia Carolina Teixeira Marques, Usuário Externo**, em 13/06/2021, às 13:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marina Lara de Carli Dias, Professor do Magistério Superior**, em 13/06/2021, às 22:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0526247** e o código CRC **CECC8317**.

Dedico o fruto dessa caminhada, brevemente resumida a este trabalho, à minha mãe, Luiza, e à minha irmã, Gabriela, que diante das inúmeras tribulações, jamais descalçaram as sandálias do incentivo e do amor, tão basilares à concretização da obra a mim confiada.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, **a Deus**, pelo fôlego da vida e constante sopro para que essa se cumpra, de acordo com seus propósitos. Porque sou dEle e a Ele confio, com tranquilidade, o meu caminhar.

À minha amada mãe, **Luiza**. Exemplo de mulher, que faz jus à palavra mãe. Em nenhum instante soltou minha mão e, por vezes, me reconduziu à continuidade dessa obra, com suas palavras de força e incentivo. A ela sou grato por tudo. Meus olhos são cegos para enxergar a possibilidade de outras vidas além dessa, mas caso exista, em todas as outras expressarei a Deus o desejo de vir, novamente, filho dela.

À minha querida irmã, **Gabriela**. Meu refúgio nos momentos difíceis e a quem, imediatamente, recorro para compartilhar os momentos felizes. Não há espaço suficiente nessas páginas para descrever sua importância para a realização desse sonho. A Deus, novamente, sou grato por proporcionar esse fraterno laço que nos une.

Ao meu irmão, **Michel**, pelo apoio incondicional e votos de sucesso que a mim são direcionados.

Aos meus avós, **Eva e Luiz**, pela luz que emana de seus constantes ensinamentos. Uma xícara de café e uma boa conversa se traduzem na recarga de energia que eu preciso para continuar superando os desafios da vida.

A **Paulo César da Silva (in memoriam)**, por sua dedicação e confiança em mim, ainda que eu mesmo não acreditasse. Sua breve passagem nesse mundo cativou muitas pessoas e as saudades serão eternas.

Aos meus **tios e demais familiares**, pela confiança em mim depositada.

À minha querida orientadora, **Prof^a. Dr^a. Vivien Thiemy Sakai**, com quem tive o privilégio de conviver e aprender ciência desde a graduação. Sua competência, profissionalismo, imensurável conhecimento e genialidade, aliados ao seu carisma e humildade, fizeram de mim um acadêmico e uma pessoa melhor. Seu

passar pela vida das pessoas sempre deixa uma semente que gera um lindo fruto. A academia, certamente, seria um ambiente muito melhor se todas as pessoas, que dela participam, pudessem aprender e ao mesmo tempo compartilhar sorrisos com você. Minha eterna gratidão!

Ao meu co-orientador, **Ricardo Garcia Mureb Jacob**, pela formidável parceria e como fonte precursora das geniais ideias colocadas nesse trabalho.

A todos os colaboradores desse trabalho, em especial ao **Prof. Dr. Denismar Alves Nogueira**, **Prof. Dr. Fábio Antônio Colombo** e à **doutoranda Juliana Barbosa Nunes**, cujas respectivas contribuições foram imprescindíveis para a construção, desenvolvimento e conclusão dessa pesquisa. Obrigado pela paciência e pronta disponibilidade.

Aos **técnicos e demais funcionários do laboratório de Bioquímica da UNIFAL**, por me receber e auxiliar, dentro do possível, na condução dos experimentos desse trabalho.

À **Prof^a. Dr^a. Nádia Carolina Teixeira Marques**, que muito contribuiu para o meu conhecimento sobre cultura de células e que, com leveza e harmonia, sempre esteve disposta a ajudar.

Aos **docentes do programa de pós-graduação em Ciências Odontológicas dessa universidade**, cujos ensinamentos foram essenciais para minha formação pessoal e profissional. Aprender com professores tão competentes sempre é um privilégio e certo do meu, expresso aqui minha imensurável gratidão.

À minha amiga e fiel companheira de jornada acadêmica, **Samara Catarino Sampaio**. Pessoa ímpar que nunca mediu esforços para me ajudar e estar presente em todos os momentos. Sua amizade, regada a carisma e espontaneidade, tornou minha vida em Alfenas mais leve. Seu futuro será brilhante. Conte sempre comigo!

Aos membros da banca do exame geral de qualificação, **Prof^a Dr^a Suzane Cristina Pigossi** e **Prof. Dr. João Adolfo Costa Hanemann**, que, com seus minuciosos apontamentos, proporcionaram um valioso aprimoramento desse trabalho.

Também aos **membros da banca examinadora de defesa dessa dissertação, Profª Drª Marina Lara de Carli Dias e Profª Drª Nádia Carolina Teixeira Marques** pelo aceite do convite e comprometimento com essa importante etapa do trabalho, que certamente proporcionará o refinamento necessário à colheita de bons frutos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES), pela viabilização financeira dessa obra – Código de Financiamento 001.

E a todos aqueles, cuja menção nesse espaço não foi possível, mas que, diretamente ou indiretamente, acrescentaram à minha formação pessoal e profissional e, portanto, fazem parte dessa conquista. Muito obrigado!

“A utopia está lá no horizonte. Aproximo-me dois passos, ela se afasta dois passos. Caminho dez passos e o horizonte corre dez passos. Por mais que eu caminhe, jamais alcançarei. Para que serve a utopia? Serve para isso: para que eu não deixe de caminhar.”

(Eduardo Galeano)

RESUMO

Limitações substanciais presentes no emprego do enxerto ósseo autólogo apontam para a necessidade do estabelecimento de alternativas concretas no contexto das cirurgias reconstrutivas ósseas. A biocerâmica de fosfato de cálcio bifásico (BCP), em suas diversas proporções de hidroxiapatita (HA) e β -tricálcio fosfato (β -TCP), vem sendo lançada como uma possibilidade peremptória para esta demanda. Nesse âmbito, o presente estudo teve como propósito investigar a resposta osteogênica *in vitro* de células-tronco de dentes decíduos esfoliados humanos (SHED) em associação a grânulos de BCP com diferentes proporções de HA e β -TCP. Para isso, as SHED foram cultivadas por 1, 7, 14 e 21 dias em oito agrupamentos distintos, de acordo com as proporções de HA/ β -TCP dos grânulos de BCP e com os meios de cultura empregados: MC80-20 (SHED + HA/ β -TCP 80/20 em meio convencional - MC); MC60-40 (SHED + HA/ β -TCP 60/40 em MC); MC20-80 (SHED + HA/ β -TCP 20/80 em MC); MO80-20 (SHED + HA/ β -TCP 80/20 em meio osteogênico - MO); MO60-40 (SHED + HA/ β -TCP 60/40 em MO); MO20-80 (SHED + HA/ β -TCP 20/80 em MO); C- (SHED em MC) e C+ (SHED em MO). A viabilidade e proliferação das SHED foram avaliadas por meio do ensaio MTT. A análise quantitativa e qualitativa da deposição de íons cálcio na matriz mineralizada das SHED foi conduzida empregando o ensaio colorimétrico com vermelho de alizarina. Já a expressão gênica para os marcadores de diferenciação osteogênica, OCN e RUNX2, foi avaliada pela RT-PCR em tempo real. A viabilidade e proliferação das SHED não foram afetadas pela presença dos grânulos, exceto no dia 1, cujos resultados foram menores em relação aos demais períodos. Nenhuma das proporções de HA/ β -TCP dos grânulos exerceu influência superior no processo de deposição mineral, em relação às demais empregadas. Além disso, o meio osteogênico, por si só, demonstrou induzir mineralização semelhante àquela gerada em associação aos grânulos, a partir do 14º dia. Já para os marcadores de diferenciação osteogênica, foi possível perceber que alguns grupos contendo grânulos expressaram OCN, tardiamente, no 21ª dia, sem diferença estatística entre aqueles que o fizeram ($p > 0,05$). Em contrapartida, a expressão para RUNX2 se iniciou precocemente no 1º dia, em todos os grupos, sem diferença estatística entre eles ($p > 0,05$), seguida de decaimento nos dias 7 e 14 e posterior aumento no 21º

dia, em alguns grupos. Além disso, no 21^o dia, o grupo C+ demonstrou maior expressão de RUNX2 que os demais grupos. Diante desses dados e considerando as limitações do estudo, concluímos que as BCPs foram capazes de estimular a diferenciação osteogênica nas SHED, sem diferença entre as três proporções empregadas.

Palavras-chave: Regeneração óssea; engenharia tecidual; células-tronco.

ABSTRACT

Substantial limitations present in the use of autologous bone graft point to the need to establish concrete alternatives in the context of bone reconstructive surgery. The bioceramic of biphasic calcium phosphate (BCP), in its various proportions of hydroxyapatite (HA) and β -tricalcium phosphate (β -TCP), has been launched as a peremptory possibility for this demand. In this context, the present study aimed to investigate the in vitro osteogenic response of stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) in association with BCP granules with different proportions of HA and β -TCP. SHED were cultured for 1, 7, 14 and 21 days and divided into eight groups according to the HA/ β -TCP proportions of the BCP granules and the culture media employed: MC80-20 (SHED + HA/ β -TCP 80/20 in conventional medium - CM); MC60-40 (SHED + HA/ β -TCP 60/40 in CM); MC20-80 (SHED + HA/ β -TCP 20/80 in CM); MO80-20 (SHED + HA/ β -TCP 80/20 in osteogenic medium - OM); MO60-40 (SHED + HA/ β -TCP 60/40 in OM); MO20-80 (SHED + HA/ β -TCP 20/80 in OM); C- (SHED in CM) and C+ (SHED in OM). The viability and proliferation of SHED were assessed using MTT assay. The quantitative and qualitative analysis of the deposition of calcium ions in the mineralized matrix of SHED was carried out using the colorimetric assay with alizarin red. Gene expression for osteogenic differentiation markers, OCN and RUNX2, was evaluated by real time RT-PCR. The viability and proliferation of SHED were not affected by the presence of the granules, except on day 1, whose results were lower than in the other periods. None of the proportions of HA/ β -TCP of the granules had a greater influence on the mineral deposition process, when compared to the other employed ones. In addition, the osteogenic medium, by itself, induced mineralization similar to that generated in association with granules after the 14th day. As for the osteogenic differentiation markers, some groups containing granules expressed OCN lately, on the 21st day, with no statistical difference between those who did ($p > 0.05$). In contrast, the expression for RUNX2 started early on the first day, in all groups, with no statistical difference between them ($p > 0.05$), followed by a decrease on days 7 and 14 and a subsequent increase on the 21st day, in some groups. In addition, on the 21st day, the C+ group showed greater expression of RUNX2 than the other groups. Taken together and considering the limitations of the study, we concluded that BCPs were able to stimulate

osteogenic differentiation in SHED, with no difference between the three proportions used.

Keywords: Bone reconstruction; tissue engineering; stem cell.

LISTA DE ABREVIATURAS

BCP	Cerâmicas de fosfato de cálcio bifásico
BMP	Proteína óssea morfogenética
Ca	Cálcio
$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	Hidroxiapatita
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Tricálcio Fosfato
CaCO_3	Carbonato de Cálcio
CaP	Fosfato de Cálcio
CaSO_4	Sulfato de Cálcio
cDNA	DNA complementar
CO_2	Dióxido de carbono
COL	Colágeno
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo fosfatado
DTT	Ditiotreitol
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
HA	Hidroxiapatita
HCl	Ácido Clorídrico
HDPSC	Células-tronco da polpa de dentes permanentes humanos
KCl	Cloreto de Potássio
M-MLV RT	<i>Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase</i>
MC	Meio Convencional
MEM α	Meio essencial mínimo modificado alfa
MgCl_2	Cloreto de Magnésio
MO	Meio Osteogênico
mRNA	RNA mensageiro
MTT	Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)]-2,5-difenil tetrazolium
OCN	Osteocalcina
P	Fosfato
PBS	Solução Salina Tamponada com Fosfato
pH	Potencial hidrogeniônico

RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	<i>Reverse transcription-polymerase chain reaction</i>
RUNX2	Fator de transcrição 2 relacionado ao <i>runt</i>
SDS	Sulfato de Sódio Dodecil
SFB	Soro fetal bovino
SHED	Células-tronco de dentes decíduos esfoliados humanos
β -TCP	Beta-tricálcio fosfato

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Fotomicrografia das SHED em associação com grânulos em diferentes proporções de HA/ β -TCP, em meio convencional, após 1 dia de cultivo, posterior à coloração com vermelho de alizarina (aumento 10x).....39
- Figura 2 - Fotomicrografia das SHED em associação com grânulos em diferentes proporções de HA/ β -TCP, em meio osteogênico, após 1 dia de cultivo, posterior à coloração com vermelho de alizarina (aumento 10x).....39
- Figura 3 - Fotomicrografia das SHED em associação com grânulos em diferentes proporções de HA/ β -TCP, em meio convencional, após 7 dias de cultivo, posterior à coloração com vermelho de alizarina (aumento 10x).....40
- Figura 4 - Fotomicrografia das SHED em associação com grânulos em diferentes proporções de HA/ β -TCP, em meio osteogênico, após 7 dias de cultivo, posterior à coloração com vermelho de alizarina (aumento 10x).....40
- Figura 5 - Fotomicrografia das SHED em associação com grânulos em diferentes proporções de HA/ β -TCP, em meio convencional, após 14 dias de cultivo, posterior à coloração com vermelho de alizarina (aumento 10x).....41
- Figura 6 - Fotomicrografia das SHED em associação com grânulos em diferentes proporções de HA/ β -TCP, em meio osteogênico, após 14 dias de cultivo, posterior à coloração com vermelho de alizarina (aumento 10x).....41
- Figura 7 - Fotomicrografia das SHED em associação com grânulos em diferentes proporções de HA/ β -TCP, em meio convencional, após 21 dias de cultivo, posterior à coloração com vermelho de alizarina (aumento 10x).....42
- Figura 8 - Fotomicrografia das SHED em associação com grânulos em diferentes proporções de HA/ β -TCP, em meio osteogênico, após 21 dias de

	cultivo, posterior à coloração com vermelho de alizarina (aumento 10x).....	42
Gráfico 1	- Análise da viabilidade e proliferação celular dos grupos cultivados em meio convencional após 1, 7, 14 e 21 dias.....	34
Gráfico 2	- Análise da viabilidade e proliferação celular dos grupos cultivados em meio osteogênico após 1, 7, 14 e 21 dias.....	35
Gráfico 3	- Análise da taxa de viabilidade e proliferação celular comparativa entre os grupos homólogos com a mesma proporção de HA/ β -TCP, cultivados em meio convencional e osteogênico, respectivamente.....	36
Gráfico 4	- Análise da viabilidade e proliferação celular, por grupo em função do tempo de cultivo.....	38
Gráfico 5	- Análise do potencial de calcificação exercido pelos diferentes grânulos no meio convencional MEM α , após 1, 7, 14 e 21 dias de cultivo.....	43
Gráfico 6	- Análise do potencial de calcificação exercido pelos diferentes grânulos no meio osteogênico, após 1, 7, 14 e 21 dias de cultivo.....	44
Gráfico 7	- Análise do potencial de calcificação exercido pelos dois meios de cultivo numa mesma proporção de HA/ β -TCP, dentro de um mesmo período.....	45
Gráfico 8	- Análise da calcificação dos diferentes grupos em função do tempo de cultivo.....	46
Gráfico 9	- Expressão relativa de mRNA para OCN nos diferentes grupos.....	47
Gráfico 10	- Expressão relativa de mRNA para RUNX2 nos diferentes grupos.....	49

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	20
3	OBJETIVOS	27
4	MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1	CULTIVO CELULAR	28
4.2	DETERMINAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS	28
4.3	PLAQUEAMENTO DE SHED EM GRÂNULOS DE HA E β -TCP	29
4.4	ENSAIO DE VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO CELULAR – MTT	29
4.5	ENSAIO DA CAPACIDADE DE MINERALIZAÇÃO CELULAR – VERMELHO DE ALIZARINA	30
4.6	EXPRESSÃO GÊNICA - RT-PCR	31
4.6.1	Extração de RNA e síntese de cDNA	31
4.6.2	Avaliação da expressão relativa por RT-PCR	32
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
5	RESULTADOS	33
5.1	VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO CELULAR	33
5.1.1	Ensaio de viabilidade e proliferação celular – MTT	33
5.2	ENSAIO DA CAPACIDADE DE MINERALIZAÇÃO CELULAR – VERMELHO DE ALIZARINA	38
5.2.1	Vermelho de Alizarina – Avaliação Qualitativa	38
5.2.2	Vermelho de Alizarina – Avaliação Quantitativa	43
5.3	EXPRESSÃO GÊNICA - RT-PCR	46
5.3.1	Expressão relativa de mRNA para OCN	46
5.3.2	Expressão relativa de mRNA para RUNX2	47
6	DISCUSSÃO	50
7	CONCLUSÃO	55
	REFERÊNCIAS	56

1 INTRODUÇÃO

Em diversas áreas da Odontologia, com destaque para a cirurgia oral e maxilofacial, é comum a ocorrência de defeitos ósseos provenientes de acidentes traumáticos, neoplasias, doenças patológicas, bem como de quadros congênitos. Proporcionar o reparo de forma eficiente para essas situações torna-se cada vez mais um desafio para o profissional (KOUHESTANI *et al.*, 2018). A busca incessante por materiais que tragam resultados efetivos de reparo ósseo com tempos menores de recuperação e com menor morbidade para o paciente vem estimulando cada vez mais a pesquisa no campo dos biomateriais.

Atualmente, o enxerto autógeno e o aloenxerto são as escolhas preferenciais no tratamento de reparação óssea (EBRAHIMI *et al.*, 2017; KOUHESTANI *et al.*, 2018). No entanto, o uso dessas formas de terapia tem algumas limitações substanciais, como trauma secundário com a criação de um novo sítio cirúrgico no caso do enxerto autógeno, quantidade limitada de material a ser enxertado, bem como possibilidade de rejeição para o aloenxerto, além de altas taxas de reabsorção antes da neoformação óssea (BOULER *et al.*, 2017). Visando suprir as deficiências encontradas no uso de terapias convencionais de substituição óssea e como alternativas viáveis, as cerâmicas de fosfato de cálcio vêm sendo amplamente utilizadas devido a sua alta similaridade com os componentes minerais da matriz óssea, relativa facilidade de processamento e boa ligação celular (LOBO; ARINZEH, 2010).

As cerâmicas de fosfato de cálcio bifásico (BCP) são definidas como duas fases individuais de fosfato de cálcio, geralmente sendo uma fase mais estável (hidroxiapatita) e outra mais solúvel (beta-tricálcio fosfato), diferenciando-se primariamente pela diferença em suas proporções (EBRAHIMI *et al.*, 2017). A combinação de hidroxiapatita (HA) e beta-tricálcio fosfato (β -TCP) proporciona funções e propriedades marcantes às cerâmicas, pois unem suas diferentes propriedades físico-químicas e biológicas, conferindo vantagens sobre os demais biomateriais. O β -TCP apresenta a fase mais solúvel das BCP sendo, portanto, reabsorvido mais rapidamente que a HA. Contudo, tem como características significativas seu poder osteoindutivo, boa biocompatibilidade e alta porosidade (LOBO *et al.*, 2015). Já a HA apresenta osteoindutividade semelhante ao β -TCP,

mas tem capacidade de osteocondução superior (LOBO *et al.*, 2015; EBRAHIMI *et al.*, 2017).

As estruturas das BCP com proporções variáveis de HA e β -TCP podem apresentar diferentes topografias superficiais, tamanhos de poros e porosidades e, além disso, podem estar em diversas formas, tais como grânulos ou partículas, blocos, cimentos e implantes. Também podem estar na forma de compósitos com ou sem polímeros, com a finalidade de atender às demandas clínicas (LOBO *et al.*, 2015).

Como constituinte relevante das BCP, a HA exerce notável função à medida que se mostra como principal componente do osso natural, e sua formulação sintética é muito semelhante à fase mineral óssea, apresentando boa resistência à compressão, porém lenta degradação (de 1 a 2% ao ano) (EBRAHIMI *et al.*, 2017; MOORE *et al.*, 1987). Contrariamente à HA, o β -TCP apresenta uma taxa de degradação mais rápida e isso implica diretamente na formação de novo osso, que nem sempre é proporcional a esta precoce degradação (ELLINGER *et al.*, 1986; EBRAHIMI *et al.*, 2017).

As BCPs estão cada vez mais sendo estudadas com o intuito de estabelecer parâmetros ideais de dissolução dos íons cálcio e fosfato no processo de regeneração óssea (DACULSI *et al.*, 1990). Sabe-se que a dissolução de superfície das biocerâmicas gera uma supersaturação dos íons cálcio e fosfato, causando sua reprecipitação e formação de uma camada biológica de apatita. Desse modo, a biocerâmica pode ligar-se à matriz óssea, influenciando diretamente o seu potencial de osteoindução (LOBO; ARINZEH, 2010).

Embora a BCP seja um biomaterial com excelentes propriedades e, conseqüentemente uma alternativa viável para a reconstrução óssea, seu uso isolado ainda apresenta limitações, como as demonstradas por Garrido *et al.* (2011), cujo estudo clínico acusou a necessidade de mais de um procedimento cirúrgico e tempo de cicatrização prolongado quando biocerâmicas foram empregadas para a enxertia de defeitos ósseos segmentares maiores que 3 cm em ossos longos (GARRIDO *et al.*, 2011). Dessa forma, buscam-se estratégias terapêuticas substitutivas com o intuito de superar os desafios em que o emprego das biocerâmicas, de forma isolada, mostra-se limitado. Nesse contexto, a medicina regenerativa surge como uma aliada. Sabe-se que as células-tronco são requisitos

essenciais para a prática da medicina regenerativa e sua aplicação representa um instrumento de grande potencial para a solução de problemáticas encontradas no cotidiano clínico.

As células-tronco podem ser derivadas de vários órgãos e tecidos e esse estudo preconizou a adoção das células-tronco da polpa de dentes decíduos esfoliados humanos (SHED) para investigar o seu potencial osteogênico frente às BCPs. Nakajima e colaboradores (2018) investigaram a capacidade de regeneração óssea de defeitos em calvária de camundongos quando em contato com SHED e comparou a resposta dessas células com outras linhagens celulares (células-tronco da polpa dental humana e células-tronco mesenquimais da medula óssea). Foi concluído nesse estudo que o grau de osteogênese contemplado pelas SHED, em relação às demais linhagens celulares, não apresentou diferença significativa, demonstrando que elas representam excelentes candidatas como fonte celular para a reconstrução óssea, em função da sua fácil obtenção com pouca ou nenhuma invasão cirúrgica (NAKAJIMA *et al.*, 2018). Pesquisas como a do estudo citado, apontam para uma boa resposta osteogênica das SHED, e em virtude dessa possibilidade aliada à escassez de trabalhos associando as BCP com células-tronco, mais especificamente com SHED, o presente estudo mostra-se pertinente à medida que busca investigar alternativas viáveis para o processo de reconstrução óssea.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Todos os anos, milhares de pacientes são submetidos à exodontia. A perda de um dente natural traz como consequência a diminuição tridimensional (altura x largura x espessura) do osso alveolar. Tal processo ocorre de forma pronunciada nos primeiros seis meses pós-extração, o que gera um impacto relevante quando se trata do planejamento protético posterior ou até mesmo em virtude da estética envolvida (MACEDO *et al.*, 2018). Vale lembrar que as exodontias não são as únicas responsáveis pelas perdas ósseas intraorais. Outros fatores como as ressecções ósseas extensas (neoplasias e traumas), anomalias congênitas e perdas ósseas associadas à periodontite também demandam procedimentos de regeneração (MOTAMEDIAN *et al.*, 2016; KOUHESTANI *et al.*, 2018; LEE *et al.*, 2019).

Numa tentativa de corrigir a deficiência, bem como acelerar o processo de neoformação óssea, vários substitutos ósseos vêm sendo estudados ao longo dos anos e muitas são as propostas para tornar essa dinâmica óssea mais efetiva. Sabe-se que o osso autólogo é o “padrão ouro” de enxertia utilizado em processos reconstrutivos ósseos devido à sua osteogenicidade, osteocondutividade e propriedades osteoindutoras. Nesse caso, têm-se a crista ilíaca, as costelas, a calota craniana e o processo coronoide como áreas doadoras extraorais mais comumente utilizadas pelos cirurgiões (REICHERT *et al.*, 2012; ROOHANI-ESFAHANI *et al.*, 2016). Contudo, esta modalidade de tratamento apresenta limitações substanciais que, muitas vezes, inviabilizam a sua escolha, tais como a disponibilidade de osso na área doadora, a morbidade do procedimento em si, principalmente da área doadora, o risco de infecção, a incompatibilidade geométrica entre o osso obtido e o leito receptor onde se encontra o defeito, bem como a necessidade de hospitalização (fator psicológico e custos) (DIMITRIOU *et al.*, 2011; REICHERT *et al.*, 2012). Nesse sentido, ao longo da história, foram lançadas alternativas como substituição ao osso autógeno e entre elas destacam-se os enxertos homogêneos (homólogo, aloenxerto), xenógenos (heterógeno) e sintéticos (aloplásticos), os quais também não estão isentos de limitações.

Para que um substituto ósseo se torne ideal, o profissional envolvido na sua escolha deve ter o conhecimento das propriedades específicas de cada biomaterial, bem como da situação clínica associada. Os enxertos ósseos diferem em relação às

suas propriedades de osteocondução, osteoindução, osteogênese e suporte estrutural (FILLINGHAM; JACOBS, 2016). A osteocondução refere-se à capacidade do material enxertado de propiciar um arcabouço, cujo suporte irá hospedar de maneira passiva as células necessárias ao processo de neoformação óssea, não sendo capaz de induzir a formação óssea. Todos os materiais de enxerto ósseo exercem, em algum grau, a função de osteocondução (KHAN *et al.*, 2005; FILLINGHAM; JACOBS, 2016). A osteoindução é a propriedade relacionada ao processo de recrutamento, proliferação e diferenciação de células-tronco mesenquimais em condroblastos e osteoblastos (FILLINGHAM; JACOBS, 2016). Por fim, a osteogênese refere-se à capacidade de neoformação óssea a partir de células osteoprogenitoras presentes no material a ser enxertado. Logo, para um material ser considerado osteogênico ele deve apresentar células-tronco mesenquimais viáveis, osteoblastos e osteócitos, contendo assim, além de todos os elementos celulares, fatores de crescimento e arcabouço necessários à construção de novo osso (KHAN *et al.*, 2005; FILLINGHAM; JACOBS, 2016).

Com o advento da Implantodontia, surge uma urgência em prover alternativas ao processo de neoformação óssea de forma eficiente. Pesquisas recentes foram responsáveis por desenvolver biomateriais sintéticos para o tratamento dos diversos defeitos ósseos existentes (ROOHANI-ESFAHANI *et al.*, 2016; EBRAHIMI *et al.*, 2017). Atualmente o estudo no campo das biocerâmicas tem progredido muito e busca-se, cada vez mais, aprimorar as propriedades físico-químicas, mecânicas e biológicas desses biomateriais (ROOHANI-ESFAHANI *et al.*, 2016).

As biocerâmicas presentes hoje no mercado podem ser à base de carbonato de cálcio (CaCO_3), sulfato de cálcio (CaSO_4), fosfatos de cálcio (CaP) ou vidros bioativos (GARRIDO *et al.*, 2011), diferindo entre si pelas suas propriedades físico-químicas, bem como pelas suas composições (GARCIA-GARETA *et al.*, 2015; YUNUS BASHA *et al.*, 2015). Sabe-se que a porção mineral do osso é constituída, basicamente por apatita CaP não estequiométrica e polissubstituída e, em virtude disso, os materiais à base de CaP tornaram-se os preferidos para o processo de enxertia óssea, uma vez que exercem papel fundamental na remodelação do osso (BOULER *et al.*, 2017). As cerâmicas de fosfato de cálcio podem ser divididas em três grupos de acordo com a sua composição: beta tricálcio fosfato (β -TCP, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), hidroxiapatita (HA, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) e fosfato de cálcio bifásico (BCP),

consistindo, essa última, em uma mistura de proporções variadas entre β -TCP e HA (GARRIDO *et al.*, 2011).

A primeira aplicação de BCP foi realizada em 1975 por Nery e colaboradores, os quais relataram ter usado um fosfato tricálcico, mas que, posteriormente, foi confirmado, por difração de raios-X, se tratar de uma mistura de 80% β -TCP e 20% de HA (NERY *et al.*, 1975; LEGEROS, 1988). Posteriormente, essa mistura foi denominada de BCP (NERY *et al.*, 1992; GARRIDO *et al.*, 2011). As proporções ideais de β -TCP e HA nas BCP para gerar uma neoformação óssea efetiva vêm sendo cada vez mais estudadas. Daculsi *et al.* foram os pioneiros na investigação das propriedades da BCP, concentrando seus estudos no desenvolvimento e aplicações desses biomateriais (DACULSI *et al.*, 1990; DACULSI *et al.*, 2003).

O interesse nas biocerâmicas de BCP e sua aplicação tão efetiva no campo da regeneração óssea justificam-se, não só pela sua similaridade com a porção mineral do tecido ósseo, mas também pelas características complementares em relação à sua ação e biodegradação. Sabe-se que, embora os materiais de enxerto sejam utilizados para favorecer a formação de novo tecido ósseo, sua presença na loja cirúrgica após o procedimento pode interferir no curso normal da sequência de reparação (DE COSTER *et al.*, 2011; MACEDO *et al.*, 2014). Sendo assim a HA, que apresenta alta similaridade com a porção mineral do osso e melhores propriedades mecânicas, demonstra uma pobre taxa de biodegradação (menos solúvel) e isso poderia comprometer, em certo grau, o processo cicatricial. No entanto, a menor solubilidade da HA é contornada com a sua combinação com o β -TCP, uma vez que esse é mais biodegradável, sendo reabsorvido mais rapidamente e deixando, portanto, lacunas viáveis à invasão de osteoblastos e consequente formação óssea (FRIEDMANN *et al.*, 2009; MACEDO *et al.*, 2014; EBRAHIMI *et al.*, 2017). Dessa forma, por meio da combinação de uma proporção balanceada entre uma fase mais estável (HA) e uma mais solúvel (β -TCP), busca-se aperfeiçoar as BCP de modo a obter um material com uma taxa de dissolução controlada e propriedades mecânicas favoráveis (GARRIDO *et al.*, 2011).

Outra característica interessante das cerâmicas de BCP é que algumas foram classificadas como osteoindutoras, uma vez que podem ser capazes de modificar a expressão gênica de células osteogênicas sem a adição de moléculas bioativas, como a proteína óssea morfogenética (BMP). Alguns estudos recentes elucidaram

os possíveis mecanismos moleculares para descrever essa propriedade intrínseca de osteoindução das BCP, atribuindo tal capacidade à composição química e características físicas do material, tais como topografia da superfície, tamanho e forma dos poros (RIPAMONTI, 1996; LEGEROS, 2008; CHENG ;GENEVER, 2010; YUAN *et al.*, 2010). Essas características físico-químicas da BCP, dependendo de como são manipuladas, podem se relacionar diretamente com as atividades biológicas de interesse. Entre as propriedades mencionadas, destacam-se a solubilidade, estrutura (macro/microestrutura e interconectividade) e granulometria.

A solubilidade, como descrita anteriormente, está diretamente relacionada à razão β -TCP/HA, sendo que quanto maior a proporção de β -TCP na biocerâmica, maior será a extensão de dissolução. É importante ter controle sobre a taxa de biodegradação (dissolução e reabsorção) da BCP, pois à medida que ocorre este processo, íons Ca e P são precipitados no local estimulando as células progenitoras ósseas a formarem novo osso. Neste sentido conhecer a proporção ideal entre β -TCP e HA na constituição das BCP é de suma importância para determinar, não somente a taxa de reabsorção das biocerâmicas, mas também para ter controle sobre a proporção de íons Ca e P liberados, a fim de modular a atividade osteoblástica (BOULER *et al.*, 2017).

A estrutura é responsável pelo contato direto com os fluidos biológicos e, à medida que esta interação ocorre, o comportamento das células osteoblásticas vai sendo influenciado. Macroporos (diâmetro > 100 μm) e microporos (diâmetro <10 μm) podem ser criados por tratamento térmico das BCP ou por meio de formadores de poros (LOBO; ARINZEH, 2010). A microporosidade exerce influência na fixação de proteínas e inibição da atividade osteoblástica. Ao passo que a macroporosidade e a interconectividade fornecem um ambiente para a invasão celular, propiciando meios favoráveis para diferenciação e crescimento de células progenitoras ósseas que culminará na formação de novo osso (BOULER *et al.*, 2017; RH OWEN *et al.*, 2018). Além disso, a porosidade do material exerce influência significativa no processo de neovascularização e diferentes níveis dessa porosidade são requeridos para que o arcabouço oferecido possa mimetizar a configuração hierárquica de poros presente no tecido ósseo natural (KARAGEORGIU; KAPLAN, 2005).

Por fim, a granulometria consiste em espaços intergranulares no biomaterial que favorecem o processo de angiogênese, dão suporte para a colonização de

osteoblastos e propiciam a reabsorção do biomaterial, evidenciando assim, sua propriedade osteocondutora (GAUTHIER *et al.*, 1999; ANNAZ *et al.*, 2004; BOULER *et al.*, 2017).

As biocerâmicas de fosfato de cálcio têm se mostrado muito efetivas nos processos de enxertia óssea, em virtude de suas propriedades osteocondutora e osteoindutora. Contudo, ainda não foi possível detectar qualquer tipo de atividade osteogênica nesses biomateriais. Para aperfeiçoar a resposta cicatricial, têm-se utilizado esses biomateriais em pesquisas na área de engenharia de tecidos.

Nas últimas décadas, a engenharia de tecidos vem se tornando uma importante ferramenta no processo de regeneração e cicatrização de tecidos e órgãos. A engenharia tecidual é uma área ampla e especializada da ciência e da bioengenharia que reúne em seu escopo os princípios de biologia celular, biologia molecular, fisiologia e desenvolvimento de tecidos usando biomateriais, com intuito de confeccionar, reparar e substituir tecidos e órgãos danificados. O sucesso da engenharia de tecidos está relacionado, em parte, à presença de uma matriz extracelular tridimensional apropriada (arcabouço) que contém sinais regulatórios para instruir as células progenitoras na diferenciação adequada do tecido, as quais serão implantadas no tecido alvo defeituoso (MILLAN *et al.*, 2018).

Estudos recentes buscaram avaliar a resposta de diferentes linhagens de células-tronco frente a substitutos ósseos (LOBO *et al.*, 2015; MOTAMEDIAN *et al.*, 2016). Entretanto, a resposta do comportamento de BCP em diferentes proporções de HA/ β -TCP associadas às células-tronco ainda é pouco esclarecida na literatura. As células-tronco utilizadas na engenharia tecidual podem ser derivadas de diferentes tecidos. Estas células são definidas como unidades celulares não diferenciadas com uma alta capacidade de autorrenovação e grande potencial de diferenciação em diversos tipos de células. Dependendo de sua fonte de origem, as células-tronco podem ser classificadas em embrionárias ou adultas, sendo que, quando obtida em adultos são denominadas células-tronco mesenquimais, devido à sua capacidade de se diferenciarem em linhagens mesenquimais, como osteogênica, condrogênica, adipogênica e miogênica (BRUDER *et al.*, 1994; PITTENGER *et al.*, 1999; MILLAN *et al.*, 2018). Contudo, essas mesmas células-tronco mesenquimais podem também dar origem, *in vivo*, às células de linhagem não mesenquimal como às do tecido nervoso (DEVINE, 2002).

A fonte mais comum de obtenção das células-tronco mesenquimais é a medula óssea. No entanto, diversos estudos têm demonstrado sucesso no isolamento dessas células a partir de diferentes tecidos (ZUK *et al.*, 2002). Aquelas originadas da medula óssea, tecido adiposo, pele e cordão umbilical, foram muito estudadas em termos de proliferação celular e potencial para regeneração tecidual. Além disso, outra fonte importante de células-tronco são as derivadas da polpa dentária, que têm mostrado grande aplicação na medicina regenerativa devido às suas características biológicas e maior acessibilidade (WONGSUPA *et al.*, 2017). *In vitro*, essas células podem ser expandidas, mantendo viáveis suas propriedades por até várias passagens (LANGE *et al.*, 2007; MILLAN *et al.*, 2018).

As células-tronco da polpa dental humana foram isoladas pela primeira vez em 2000 (GRONTHOS *et al.*, 2000). Três anos mais tarde, as células-tronco da polpa de dentes decíduos esfoliados humanos (SHED) foram estudadas (MIURA *et al.*, 2003). As SHED são uma fonte celular acessível e promissora para a regeneração de tecidos, uma vez que elas têm um alto potencial para proliferação e diferenciação osteogênica (LEE *et al.*, 2019). Quando comparadas com as células-tronco da polpa dentária de dentes permanentes, as SHED mostram maior taxa de proliferação (NAKAMURA *et al.*, 2009) e maior número de divisões celulares, o que gera maior facilidade de expansão *in vitro*, assim como maior formação de colônias, capacidade osteoindutiva *in vivo* e formação de diferentes tecidos do complexo dentino-pulpar (MIURA *et al.*, 2003; GINANI *et al.*, 2018). Outra característica que elege as SHED como excelentes candidatas ao processo de regeneração tecidual é o fato de seu isolamento se dar de forma simples e conveniente, causando pouco ou nenhum trauma, uma vez que toda criança perde dentes decíduos, sendo uma oportunidade perfeita de recuperar e armazenar células-tronco para aplicações futuras (ARORA *et al.*, 2009; GINANI *et al.*, 2018).

Lobo *et al.* (2015) investigaram a resposta de células-tronco de diferentes linhagens à biocerâmica de fosfato de cálcio bifásico na forma de grânulos e blocos. Os grânulos utilizados neste estudo apresentavam diferentes porosidades e os blocos possuíam diâmetros de 2 mm e 5 mm. Além disso, as formas de BCPs empregadas continham 65% de HA e 35% de β -TCP. A partir de suas análises, os autores concluíram que o comportamento das células foi influenciado de forma distinta, de acordo com a sua origem, pela presença de BCP, sendo que a composição química e características físicas exerceram papel fundamental no tipo

de resposta verificado – grânulos menores propiciaram a maior proliferação celular, enquanto grânulos maiores favoreceram diferenciação. Verificaram também que aqueles materiais que apresentavam superfícies mais rugosas e com maior número de micro e macroporosidades permitiram maior viabilidade celular, proliferação e diferenciação, em contraste com os de superfícies mais lisas e com menor porosidade (LOBO *et al.*, 2015). Outro estudo, nesse segmento, foi desenvolvido por AbdulQader *et al.* (2015), que investigaram a interação das BCP em três proporções diferentes de HA/ β -TCP com as células-tronco da polpa de dentes permanentes e concluíram que o material que continha 20% de HA e 80% de β -TCP interferiu negativamente na viabilidade celular devido ao pH mais alcalino. Todavia, essa mesma proporção de HA/ β -TCP também foi responsável pela maior expressão gênica de marcadores osteogênicos, apontando para uma melhor diferenciação osteoblástica (ABDULQADER *et al.*, 2015).

Diante do exposto ao longo desse manuscrito e considerando a pouquidade de estudos na literatura abordando esse tema, torna-se imprescindível realizar pesquisas como esta, a fim de determinar proporções e características adequadas das BCPs em suas diversas apresentações físicas, com o intuito de promover uma regeneração óssea de forma eficaz e com qualidade de osso compatível com a necessidade de suporte e funcionalidade orgânica.

3 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo geral avaliar a resposta osteogênica de células-tronco de dentes decíduos humanos esfoliados (SHED) quando em contato, por diferentes períodos, com grânulos de cerâmica de fosfato de cálcio bifásico em diferentes proporções de β -TCP e HA e em dois meios de cultura distintos (Meio Essencial Mínimo Modificado Alfa - MEM α e Meio Osteogênico).

Os objetivos específicos deste projeto foram:

- a) avaliar a viabilidade e proliferação celular das SHED em meio de cultura convencional MEM α e meio osteogênico contendo os grânulos de BCP, por meio do método MTT;*
- b) determinar quantitativamente e qualitativamente a deposição de íons cálcio na formação de matriz mineralizada nas SHED, em diferentes proporções de β -TCP e HA, por meio do ensaio colorimétrico com vermelho de alizarina;*
- c) analisar a diferenciação celular das SHED em osteoblastos nas condições estabelecidas, por meio da técnica de RT-PCR.*

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CULTIVO CELULAR

Células-tronco de dentes decíduos esfoliados humanos (SHED), fornecidas pela Prof^a Dr^a Thais Marchini Oliveira Valarelli (Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, SP, Brasil) após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da instituição (protocolo número CAAE: 88330218.6.0000.5417) e após a devida caracterização, foram mantidas em meio de cultura MEM α (Gibco, Invitrogen, Grand Island, NY, EUA), suplementado com soro fetal bovino 10% (SFB) (Fetal Bovine Serum, Certified, Heat-Inactivated, Gibco, Invitrogen) e solução de penicilina e estreptomicina 1% (Penicillin-Streptomycin, Gibco, Invitrogen). As células foram mantidas em incubadora a 37°C e 5% de CO₂, sendo o meio de cultura trocado a cada dois dias. Para todos os experimentos, as SHED foram utilizadas entre a 8^a e 10^a passagem.

4.2 DETERMINAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram empregados grânulos de fosfato de cálcio bifásico poroso de 10 a 20 mesh compostos por diferentes proporções de HA e β -TCP - Osteosynt® (EINCO Biomaterial Ltda, Belo Horizonte, MG, Brasil). Os grupos foram determinados de acordo com as diferentes proporções de HA e β -TCP e os diferentes meios de cultura, MEM α ou meio osteogênico (Osteogenic Differentiation Medium, Lonza Group Ltd., Basel, SWZ), conforme se segue:

- a) MC80-20: SHED cultivadas em grânulos compostos por 80% de HA e 20% de β -TCP em meio convencional (MEM α);
- b) MC60-40: SHED cultivadas em grânulos compostos por 60% de HA e 40% de β -TCP em meio convencional (MEM α);
- c) MC20-80: SHED cultivadas em grânulos compostos por 20% de HA e 80% de β -TCP em meio convencional (MEM α);

- d) *MO80-20: SHED cultivadas em grânulos compostos por 80% de HA e 20% de β -TCP em meio osteogênico;*
- e) *MO60-40: SHED cultivadas em grânulos compostos por 60% de HA e 40% de β -TCP em meio osteogênico;*
- f) *MO20-80: SHED cultivadas em grânulos compostos por 20% de HA e 80% de β -TCP em meio osteogênico;*
- g) *C-: SHED cultivadas somente em meio convencional (MEM α);*
- h) *C+: SHED cultivadas somente em meio osteogênico.*

4.3 PLAQUEAMENTO DE SHED EM GRÂNULOS DE HA E B-TCP

Para o plaqueamento, foram distribuídos 10 mg de grânulos do biomaterial por poço de uma placa de 24 poços e 500 μ L de uma suspensão de MEM α contendo $2,5 \times 10^4$ SHED. Após o plaqueamento, as células foram incubadas a 37°C e 5% de CO₂ durante a noite para se aderirem aos grânulos e/ou ao fundo dos poços. Depois deste período, as células foram cultivadas em meio de cultura convencional ou em meio de cultura osteogênico durante 1, 7, 14 e 21 dias, sendo trocados a cada dois dias. Os grupos foram plaqueados em triplicata.

4.4 ENSAIO DE VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO CELULAR – MTT

A viabilidade e proliferação das células foram avaliadas pelo ensaio colorimétrico MTT, que se baseia na capacidade de enzimas desidrogenases, presentes em células viáveis, em converter o sal de brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio, que é solúvel em água, em cristais de formazan, produto insolúvel em água. O número de células viáveis é diretamente proporcional à quantidade de cristais de formazan produzido.

Ao término de cada período de incubação, o meio de cultura foi removido e substituído por 210 μ L/poço de novo meio. Em seguida, foram acrescentados 170 μ L/poço de solução de MTT (5 mg/mL) e a placa incubada a 37°C e 5% de CO₂ durante 4 horas. Os cristais de formazan foram solubilizados por meio da adição de

210 µL/poço de uma solução de sulfato de sódio dodecil (SDS) 10% em água – 10% HCl, seguido de incubação a 37°C e 5% de CO₂ durante 18 horas. Um total de 100 µL do conteúdo dos poços foi transferido para uma placa de 96 poços, e a absorbância foi medida em espectrofotômetro (*Anthos Zenyth 200 RT, Biochrom LTD, Cambridge, Reino Unido*) com comprimento de onda de 595 nm.

4.5 ENSAIO DA CAPACIDADE DE MINERALIZAÇÃO CELULAR – VERMELHO DE ALIZARINA

A avaliação qualitativa e quantitativa da deposição de cálcio na formação de matriz mineralizada foi detectada pelo ensaio colorimétrico com vermelho de alizarina. Neste ensaio, os poços foram lavados com solução salina tamponada com fosfato (PBS) e as células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 15 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, as células foram lavadas com água destilada duas vezes, incubadas com solução de alizarina 1% (peso/volume) (pH 4,1 a 4,5) em água destilada por 20 minutos em temperatura ambiente e novamente lavadas três vezes com água destilada. As células coradas foram então avaliadas com microscópio invertido e fotografadas.

Após o registro fotográfico, procedeu-se a análise quantitativa, adicionando-se 280 µL de ácido acético a 10% por poço, sob agitação por 30 minutos. Alíquotas de 100 µL do conteúdo dos poços foram transferidas para uma placa de 96 poços, e a absorbância foi avaliada, por meio do espectrofotômetro (*Anthos Zenyth 200 RT, Biochrom LTD, Cambridge, Reino Unido*) adotando o comprimento de onda de 405 nm.

4.6 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA - RT-PCR

Para avaliar o potencial de diferenciação das SHED em osteoblastos nos diferentes grupos, foi realizada a RT-PCR, conforme as etapas descritas a seguir.

4.6.1 Extração de RNA e síntese de cDNA

As amostras de SHED cultivados com os diferentes grânulos do biomaterial foram processadas conforme protocolo básico de extração de RNA com colunas de afinidade. O material foi processado e submetido à lise com tampão específico do kit PureLink® RNA Mini Kit (Life Technologies, EUA). Após a lise, o RNA contido no sobrenadante foi extraído por colunas de afinidade e congelado imediatamente. A seguir, essas amostras foram reversamente transcritas para cDNA. A uma quantidade de 11,0 µL do RNA, foi adicionado 1,0 µL de uma mistura contendo os quatro dNTP's, 1,0 µL de random primers de acordo com o protocolo do fabricante do kit. Em seguida as reações foram levadas ao termociclador por aproximadamente 5 minutos a 65°C. Após este tempo foram retiradas e colocadas no banho de gelo por 20 segundos, seguido da adição das misturas, 2µL de DTT e o 4µl tampão (Tris-HCl, 250mM, pH 8,3; KCl, 375mM; MgCl₂, 15mM) e colocado novamente no termociclador por 20 segundos a 37°C. Após os 20 segundos, foi adicionado 1,0 µl da enzima M-MLV RT (Moloney Murine Leukemia Vírus Reverse Transcriptase), que é a responsável para a complementação do RNA para cDNA, seguido de um ciclo de 37°C durante 50 minutos. Ao final da reação as amostras foram congeladas até o momento da realização dos ensaios de PCR.

O grau de pureza das amostras foi analisado no Nanodrop ND2000 pela razão da medida da absorbância 260/280. Após a verificação da integridade, as amostras foram congeladas a -20°C para o posterior uso em PCR quantitativo em tempo real.

4.6.2 Avaliação da expressão relativa por RT-PCR

Para a RT-PCR foram utilizadas sondas de hidrólise do tipo *TaqMan*, duplamente marcadas utilizando os iniciadores.

As reações foram realizadas em um *Step One Real Time PCR System* (*Applied Biosystems*), em um volume final de 10µL por reação. Foi adicionado 1µL de uma mistura que inclui os marcadores *forward*, *reverse*, e a sonda *TaqMan*, marcada com FAM para o fator de transcrição 2 relacionado ao *runt* (RUNX2, Hs00231692_m1), para a osteocalcina (OCN, Hs01587814_g1) e para o gene constitutivo - gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH, Hs99999905_m1),

utilizando NFQ como *quencher* na placa. Em seguida foi preparada uma mistura contendo 5 μL de *2X TaqMan Universal PCR Master Mix* e 3 μL de água livre de DNase e RNase e 1 μL de cDNA das amostras, que foram homogeneizados ao mesmo tempo para todos os marcadores, para que todos estivessem com a mesma concentração final de cDNA, e então adicionados à placa. Foi utilizado um controle negativo e um positivo para cada marcador. As amplificações ocorreram em um ciclo inicial de 50°C por 2 minutos. A segunda etapa foi um ciclo a 95°C por 10 minutos. Na próxima etapa foram realizados 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e a 60°C por 1 minuto.

Os resultados foram expressos pelo método ΔCt (*Cycle Threshold*) que consiste de uma quantificação relativa, em que é realizada a normalização de expressão de cada alvo pela subtração do valor de Ct encontrado para cada gene alvo, pelo valor do Ct do gene constitutivo.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores obtidos em triplicata foram submetidos à análise estatística, por meio do *software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS)*, versão 20.0. Foi constatado, após aplicação do teste de Shapiro-Wilk, que a distribuição dos dados seguiu normalidade. Dessa forma, as médias dos valores apresentados foram submetidas à análise de variância pelo método ANOVA, três fatores e o teste T protegido por Bonferroni foi aplicado, na sequência, para os dados referentes ao ensaio de viabilidade/proliferação celular e de calcificação. Para a análise de expressão gênica, também se verificou normalidade na distribuição dos dados e, dessa forma, os métodos ANOVA e teste de Tukey foram aplicados, de acordo com a pertinência da análise. Para que as diferenças fossem consideradas significativas, foi adotado um nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO CELULAR

A partir da análise estatística da média das absorbâncias obtidas no ensaio de viabilidade e proliferação celular, verificou-se que os três fatores aplicados neste estudo (proporção HA/ β -TCP x tipo de meio de cultura x tempo de cultivo) apresentaram interação entre si. Em virtude disso, a análise foi voltada para essa relação entre os grupos, os quais foram avaliados em três conjuntos, da seguinte forma: a) comparação do efeito das diferentes proporções dos grânulos em um mesmo meio de cultivo, dentro de um mesmo período; b) comparação do efeito dos meios de cultura, para uma mesma proporção de HA/ β -TCP dentro de um mesmo período e c) comparação do efeito em um mesmo grupo (proporção de HA/ β -TCP + meio de cultivo) em razão dos diferentes períodos.

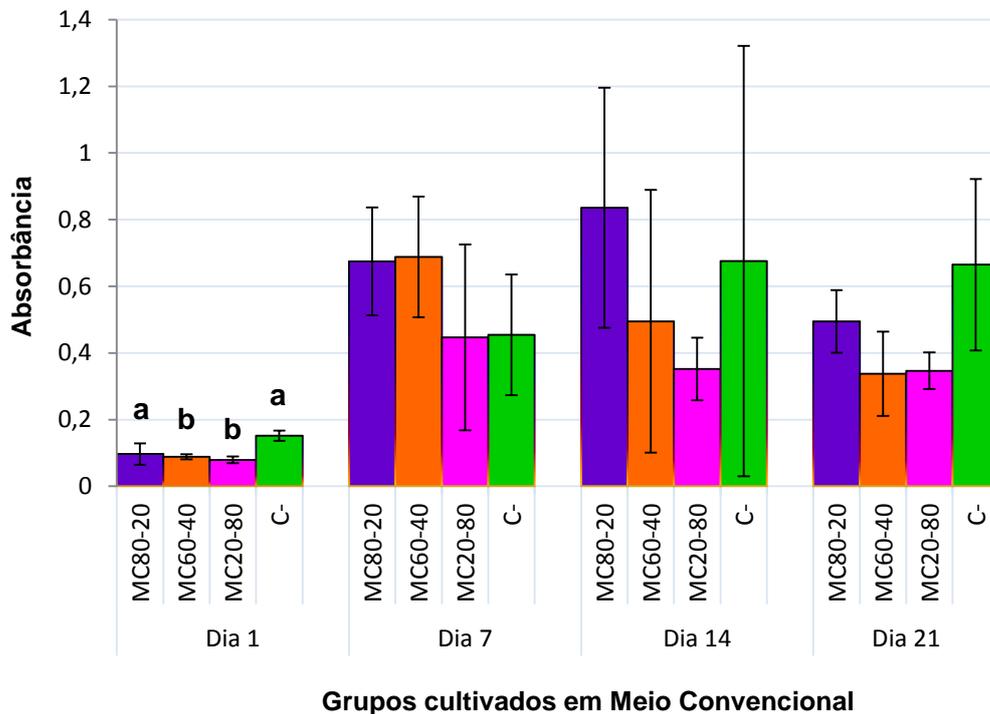
5.1.1 Ensaio de viabilidade e proliferação celular – MTT

Iniciando a análise sobre o efeito dos diferentes grânulos no meio convencional, verificamos que no dia 1 a viabilidade e proliferação celular do grupo controle negativo (C-) foram significativamente maiores que MC60-40 e MC20-80, porém não houve diferença estatística em relação a MC80-20. Já nos dias 7, 14 e 21, nenhum grupo se sobressaiu em relação a outro, ou seja, nenhuma proporção de HA/ β -TCP demonstrou interferência na viabilidade e proliferação celular das SHED quando cultivadas em meio convencional (GRÁFICO 1).

Para o cultivo em meio osteogênico, no dia 1, o grupo controle positivo (C+) apresentou viabilidade e proliferação celular superiores a MO80-20, MO60-40 e MO20-80, sendo que entre esses últimos, apenas MO60-40 demonstrou diferença estatística em relação a MO20-80, tendo o primeiro resultado superior ao segundo. No dia 7, os grupos C+ e MO60-40, apresentaram viabilidade e proliferação celular semelhante, porém superior a MO80-20 e MO20-80, os quais entre si demonstraram

diferença estatística, com MO80-20 tendo resultado superior a MO20-80. Já no dia 14, não houve diferença estatística entre os grupos, exceto entre MO80-20 e MO20-80, sendo que MO80-20 apresentou maior taxa de viabilidade e proliferação celular. Contudo, MO80-20 e MO20-80 não apresentaram resultados estatisticamente diferentes de C+. No dia 21, todos os grupos apresentaram viabilidade e proliferação celular semelhante entre si (GRÁFICO 2).

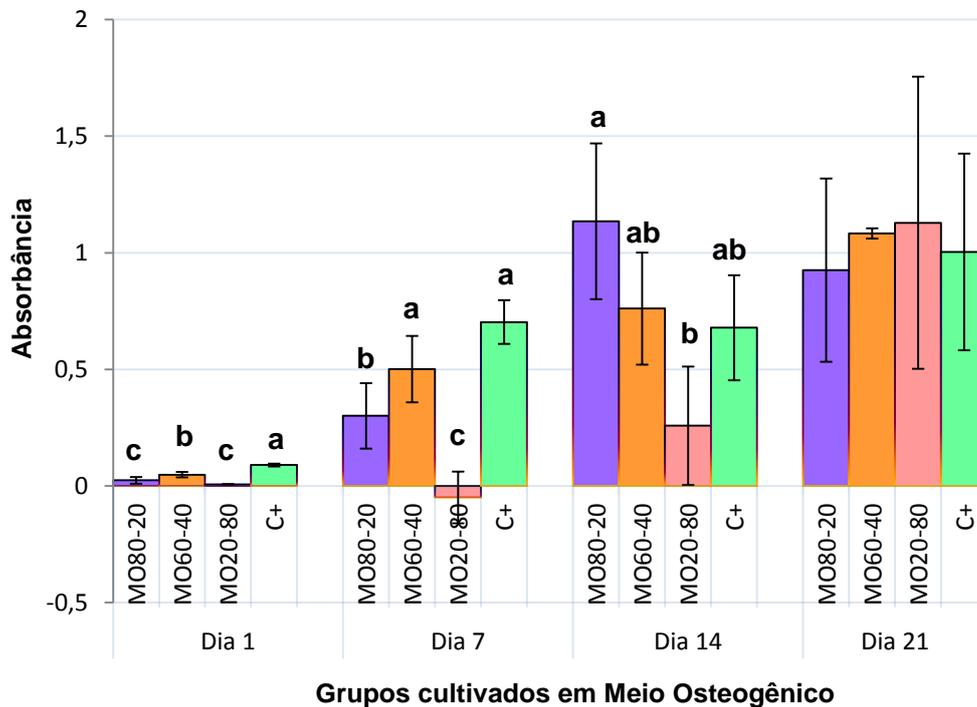
Gráfico 1 - Análise da viabilidade e proliferação celular dos grupos cultivados em meio convencional após 1, 7, 14 e 21 dias.



Fonte: do autor (2021).

Nota: Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre os grupos avaliados dentro de um mesmo período ($p < 0,05$).

Gráfico 2 - Análise da viabilidade e proliferação celular dos grupos cultivados em meio osteogênico após 1, 7, 14 e 21 dias.



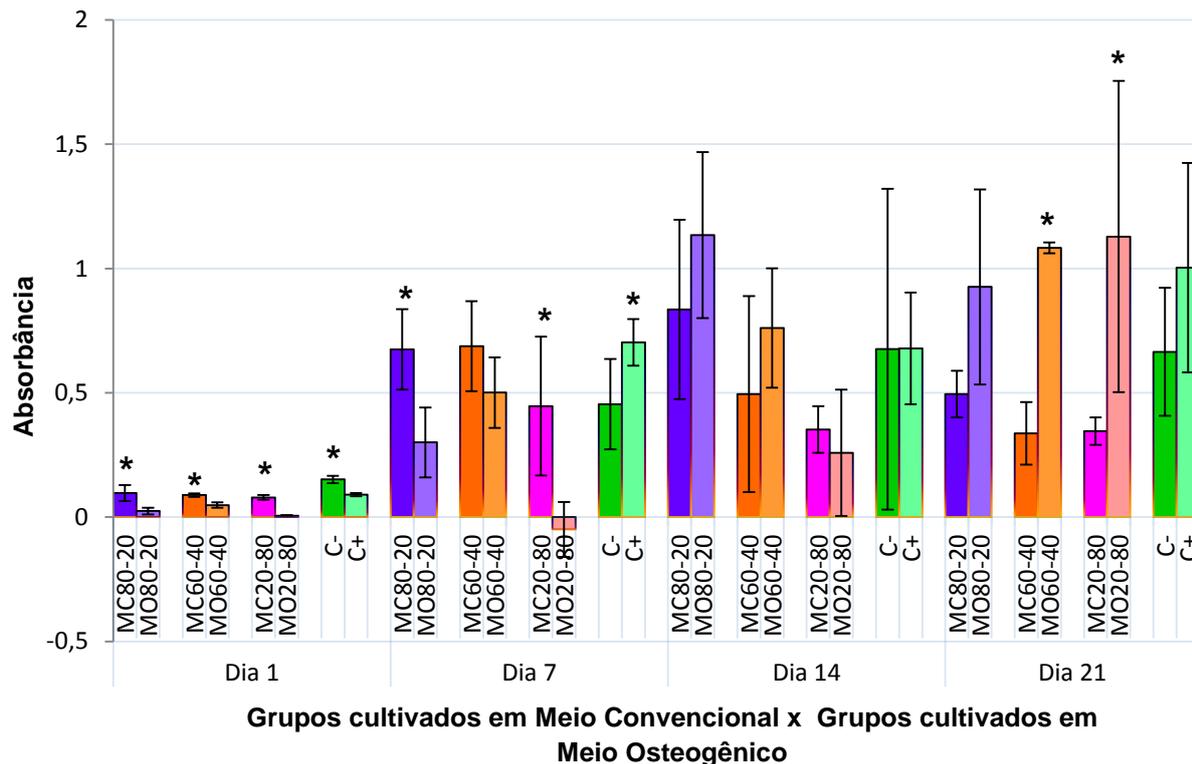
Fonte: do autor (2021).

Nota: Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre os grupos avaliados dentro de um mesmo período ($p < 0,05$).

Partindo para a análise entre os dois tipos de meio de cultivo numa mesma proporção de HA/ β -TCP, observamos que no dia 1 todos os grupos cultivados em meio convencional (MC80-20, MC60-40, MC20-80 e C-), apresentaram maior taxa de viabilidade e proliferação celular, em relação a seus homólogos cultivados em meio osteogênico (MO80-20, MO60-40, MO20-80 e C+). No dia 7, percebemos que entre MC80-20 e MO80-20, bem como entre MC20-80 e MO20-80, os grupos cultivados em meio convencional apresentaram maior viabilidade e proliferação celular, em relação ao seu homólogo em meio osteogênico (MC80-20 > MO80-20, MC20-80 > MO20-80). Contudo, na comparação entre C- e C+, o grupo C+, cultivado em meio osteogênico, apresentou maior resultado neste período. Já entre MC60-40 e MO60-40 não houve diferença. Em contrapartida, no dia 14 não houve diferença na viabilidade e proliferação das células entre nenhum dos grupos homólogos avaliados. Curiosamente, no dia 21, os grupos que apresentaram diferença entre si foram MC60-40 e MO60-40 e MC20-80 e MO20-80, sendo que dessa vez, aqueles

cultivados em meio osteogênico apresentaram superioridade na viabilidade e proliferação (MO60-40>MC60-40 e MO20-80>MC20-80). O gráfico 3 elucida esses resultados.

Gráfico 3 - Análise da taxa de viabilidade e proliferação celular comparativa entre os grupos homólogos com a mesma proporção de HA/ β -TCP, cultivados em meio convencional e osteogênico, respectivamente.



Fonte: do autor (2021).

Nota: O símbolo * indica diferença estatística entre os grupos homólogos avaliados no período correspondente ($p < 0,05$).

Por fim, quando avaliamos a viabilidade e a proliferação celular de um mesmo grupo em função do tempo, verificamos que para o grupo MC80-20 a viabilidade e proliferação foram menores no primeiro dia, em relação aos demais períodos. Entre o 7º e o 14º dia não houve diferença. Já no 21º dia, a taxa de viabilidade e proliferação foi superior aos demais grupos, com exceção do 14º dia, o qual foi estatisticamente igual ao 21º.

Para o grupo MC60-40, a viabilidade e proliferação celular no primeiro dia também foram inferiores aos demais. Não houve diferença entre o dia 7 e o dia 14, mas no 21º dia, a taxa de viabilidade e proliferação foi maior em relação ao dia 7. Contudo, entre o 14º e 21º dia, não houve diferença.

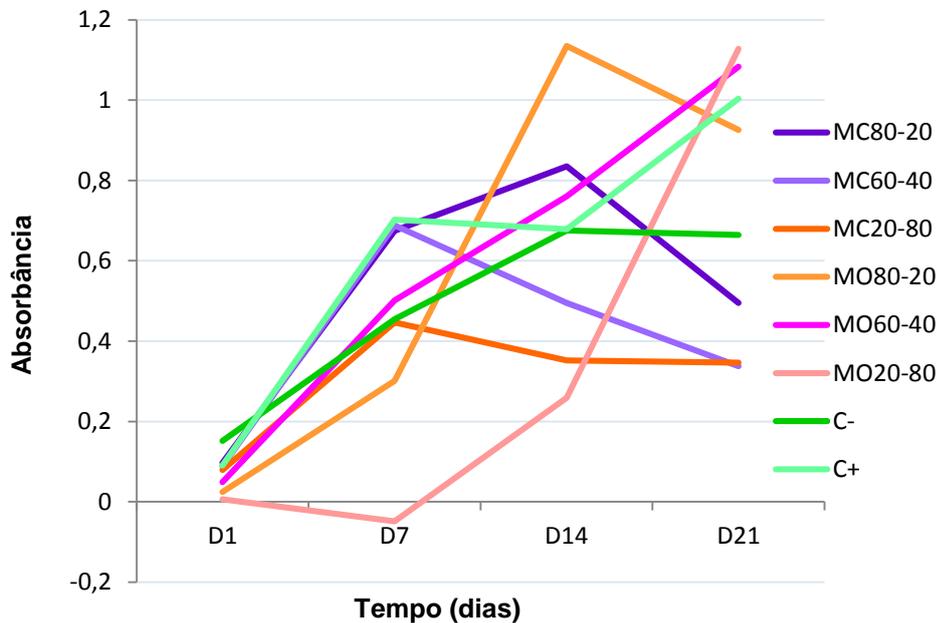
No grupo MC20-80, verificamos que os dias 7, 14 e 21 mostraram viabilidade e proliferação celular superior ao primeiro dia, mas sem diferença entre eles. Esse fato também foi observado para MO80-20, diferenciando-se apenas pela presença de diferença estatística entre o 7º e 14º dia, com maior viabilidade e proliferação do segundo, em relação ao primeiro. No grupo MO60-40, os resultados mostraram aumento gradativo, com menor taxa de viabilidade e proliferação no dia 1, seguido pelo dia 7, culminando no 14º e 21º dia, sem diferença estatística entre esses dois últimos.

Para o grupo MO20-80, apenas houve diferença na taxa de células viáveis e proliferação entre o 1º e 21º dia, sendo o dia 21 superior ao dia 1. Contudo, não houve diferença estatística entre os dias 1, 7 e 14, assim como também não houve diferença entre os dias 7, 14 e 21.

No grupo C-, a taxa de viabilidade e proliferação celular do dia 1 foi inferior aos demais períodos, não havendo diferença entre os dias 7, 14 e 21, assim como também ocorreu para o grupo C+.

A descrição supracitada pode ser visualizada no gráfico 4.

Gráfico 4 - Análise da viabilidade e proliferação celular, por grupo, em função do tempo de cultivo.



Fonte: do autor (2021).

5.2 ENSAIO DA CAPACIDADE DE MINERALIZAÇÃO CELULAR – VERMELHO DE ALIZARINA

Para análise do potencial de calcificação celular das SHED, foram preconizados dois processos diferentes, por meio dos quais foi possível avaliar quantitativamente e qualitativamente a deposição de cálcio. As absorbâncias obtidas foram analisadas por meio de testes estatísticos, com avaliação conduzida da mesma forma que para o teste de viabilidade e proliferação celular. Já para a análise qualitativa, após o processo descrito na metodologia, foram obtidas fotos capturadas com microscópio óptico invertido.

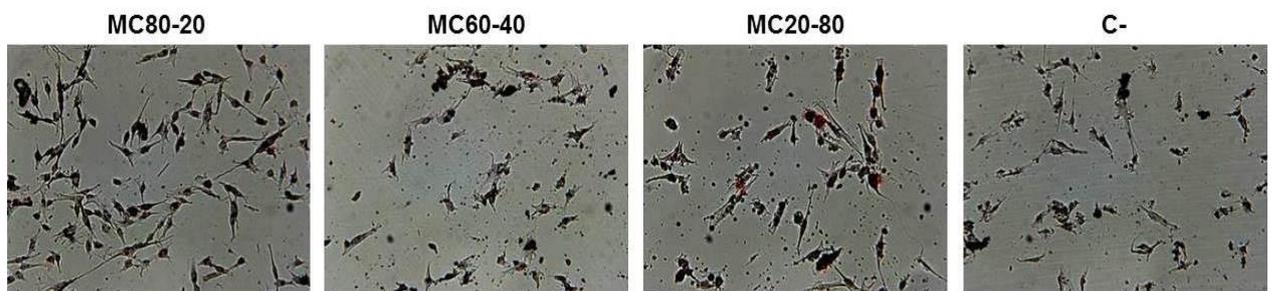
5.2.1 Vermelho de Alizarina – Avaliação Qualitativa

A avaliação qualitativa da deposição de cálcio na formação de matriz mineralizada das SHED foi realizada por meio de fotomicrografia com microscópio

óptico invertido, após a coloração com vermelho de alizarina. A análise foi subjetiva, a partir das evidências de focos de mineralização, constatados nas fotos obtidas.

No dia 1, quando as SHED foram cultivadas em meio convencional, observamos que os escassos focos de mineralização encontravam-se semelhantes em todos os grupos, com exceção do grupo C- (FIGURA 1).

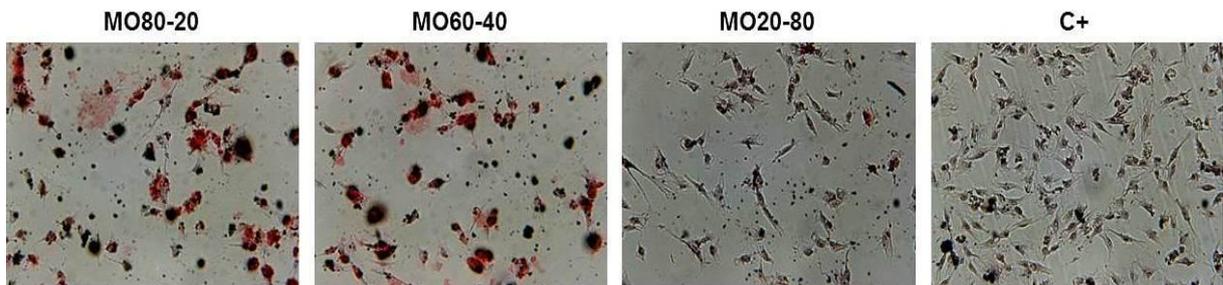
Figura 1 - Fotomicrografia das SHED em associação com grânulos em diferentes proporções de HA/ β -TCP, em meio convencional, após 1 dia de cultivo, posterior à coloração com vermelho de alizarina (aumento 10x).



Fonte: do autor (2021).

Nesse mesmo dia, com as células sendo cultivadas em meio osteogênico, verificamos que houve um número maior de focos de mineralização, quando comparado ao meio convencional. Todavia, essa diferença ainda se mostrava bem pequena, conforme demonstrado pela figura 2.

Figura 2 - Fotomicrografia das SHED em associação com grânulos em diferentes proporções de HA/ β -TCP, em meio osteogênico, após 1 dia de cultivo, posterior à coloração com vermelho de alizarina (aumento 10x).

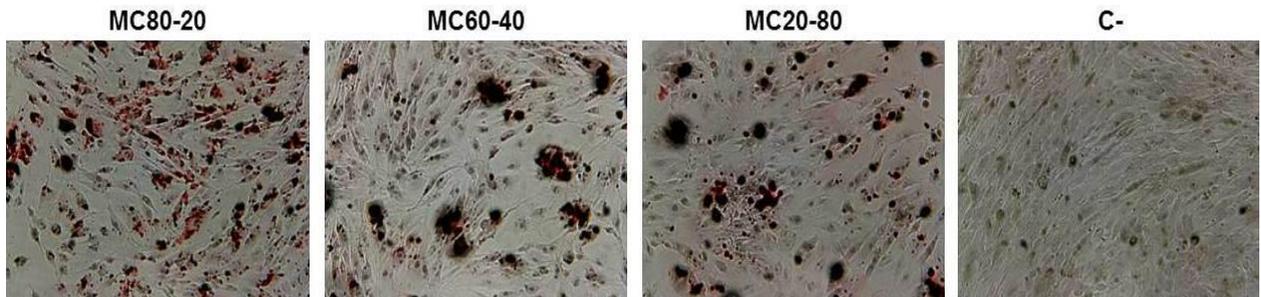


Fonte: do autor (2021).

No dia 7, analisando as células cultivadas em meio convencional, foi possível enxergar o início dos focos de mineralização nos grupos em que havia grânulos.

Contudo, no grupo controle, C-, não foi possível notar áreas coradas em vermelho intenso, como nos demais grupos (FIGURA 3).

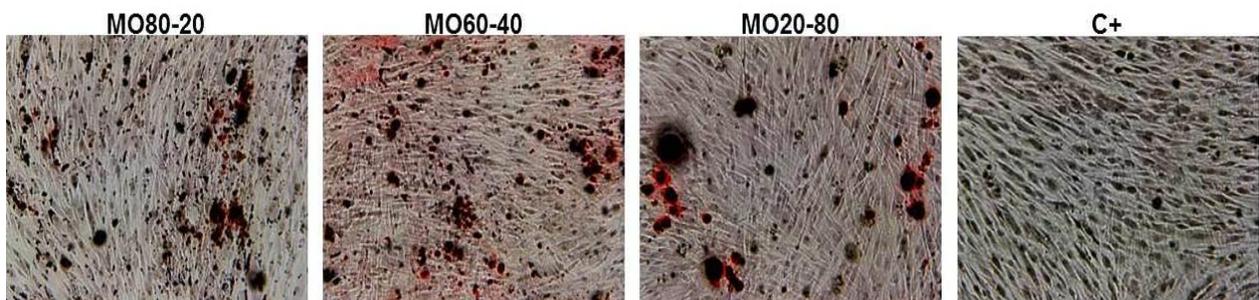
Figura 3 - Fotomicrografia das SHED em associação com grânulos em diferentes proporções de HA/ β -TCP, em meio convencional, após 7 dias de cultivo, posterior à coloração com vermelho de alizarina (aumento 10x).



Fonte: do autor (2021).

Para as células cultivadas em meio osteogênico, também no dia 7, foi possível localizar áreas coradas em vermelho intenso nos grupos contemplados com grânulos, da mesma forma que para o meio convencional, sem diferença marcante entre eles. Todavia, no grupo C+, ainda não tinha sido possível detectar indícios de mineralização perceptível (FIGURA 4).

Figura 4 - Fotomicrografia das SHED em associação com grânulos em diferentes proporções de HA/ β -TCP, em meio osteogênico, após 7 dias de cultivo, posterior à coloração com vermelho de alizarina (aumento 10x).

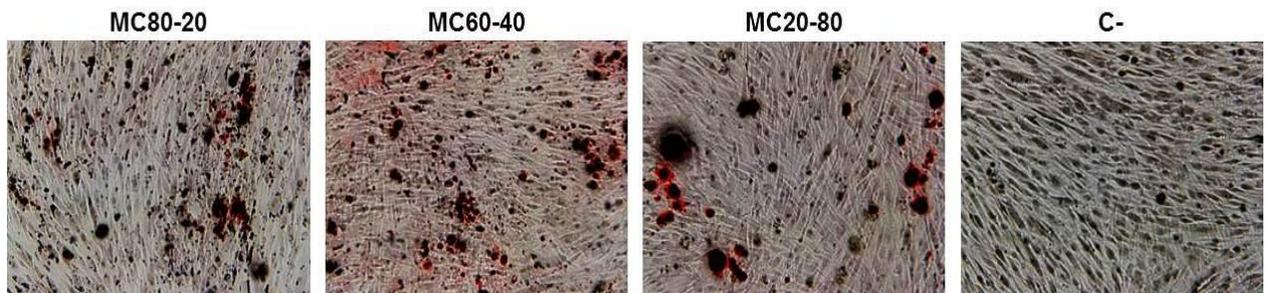


Fonte: do autor (2021).

Na análise das células cultivadas em meio convencional, no dia 14, notamos que os focos de mineralização, nos grupos em que havia a presença de grânulos,

estavam mais perceptíveis e em maior número. No entanto, no grupo C-, não foi possível identificar áreas nítidas coradas em vermelho (FIGURA 5).

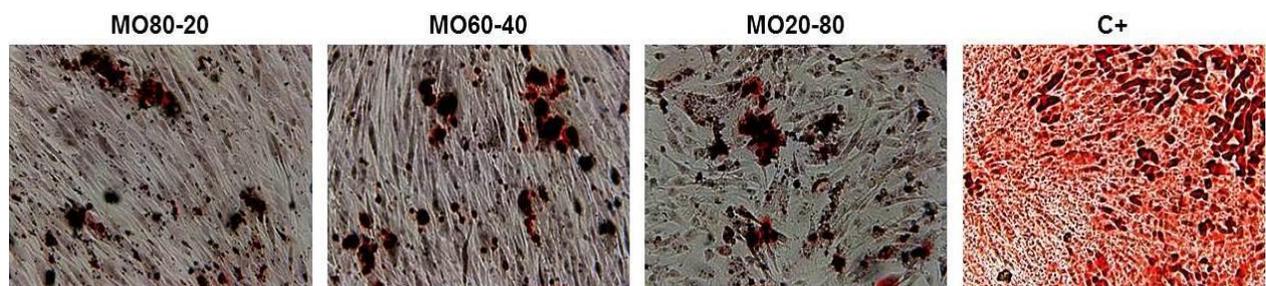
Figura 5 - Fotomicrografia das SHED em associação com grânulos em diferentes proporções de HA/ β -TCP, em meio convencional, após 14 dias de cultivo, posterior à coloração com vermelho de alizarina (aumento 10x).



Fonte: do autor (2021).

Ainda no dia 14, com as células cultivadas em meio osteogênico, percebemos que todos os grupos mostraram um número maior de focos de mineralização. Em especial, o grupo C+ mostrou-se intensamente corado de vermelho, indicando a atividade indutora de mineralização do meio osteogênico, após esse período, conforme ilustra a figura 6.

Figura 6 - Fotomicrografia das SHED em associação com grânulos em diferentes proporções de HA/ β -TCP, em meio osteogênico, após 14 dias de cultivo, posterior à coloração com vermelho de alizarina (aumento 10x).

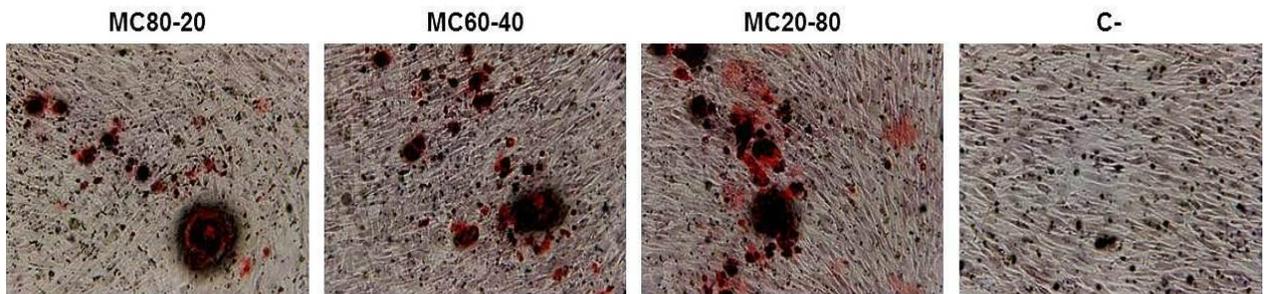


Fonte: do autor (2021).

No dia 21, quando as células foram cultivadas em meio convencional, os focos de mineralização estavam nitidamente em maior número nos grupos contemplados com os grânulos. Em contrapartida, o grupo C- se manteve com nenhuma ou quase nenhuma área de calcificação. Não foi possível perceber um

aumento do número de focos de mineralização do 14^o para o 21^o dia, embora a proliferação das células estivesse bem avançada (FIGURA 7).

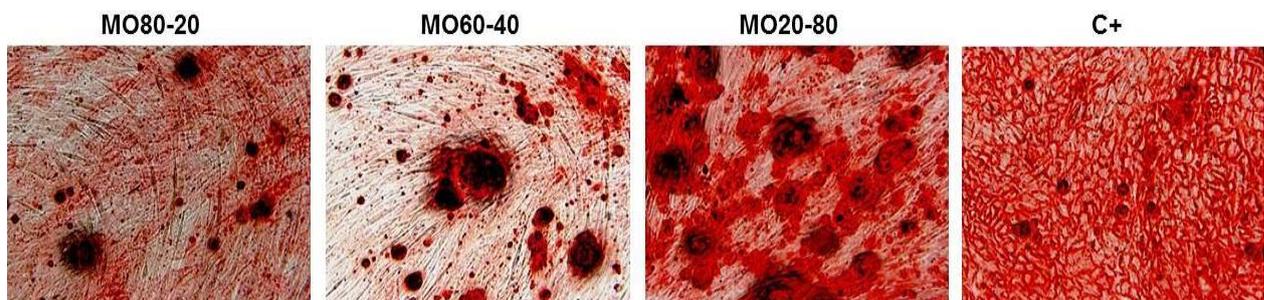
Figura 7 - Fotomicrografia das SHED em associação com grânulos em diferentes proporções de HA/ β -TCP, em meio convencional, após 21 dias de cultivo, posterior à coloração com vermelho de alizarina (aumento 10x).



Fonte: do autor (2021).

Por fim, a análise das células cultivadas em meio osteogênico, no dia 21 também revelou focos de calcificação extremamente nítidos, tanto para os grupos com grânulos, quanto para o grupo C+ cuja coloração em vermelho intenso se estendeu por toda a superfície dos poços avaliados. Essa constatação pode ser verificada na figura 8.

Figura 8 - Fotomicrografia das SHED em associação com grânulos em diferentes proporções de HA/ β -TCP, em meio osteogênico, após 21 dias de cultivo, posterior à coloração com vermelho de alizarina (aumento 10x).

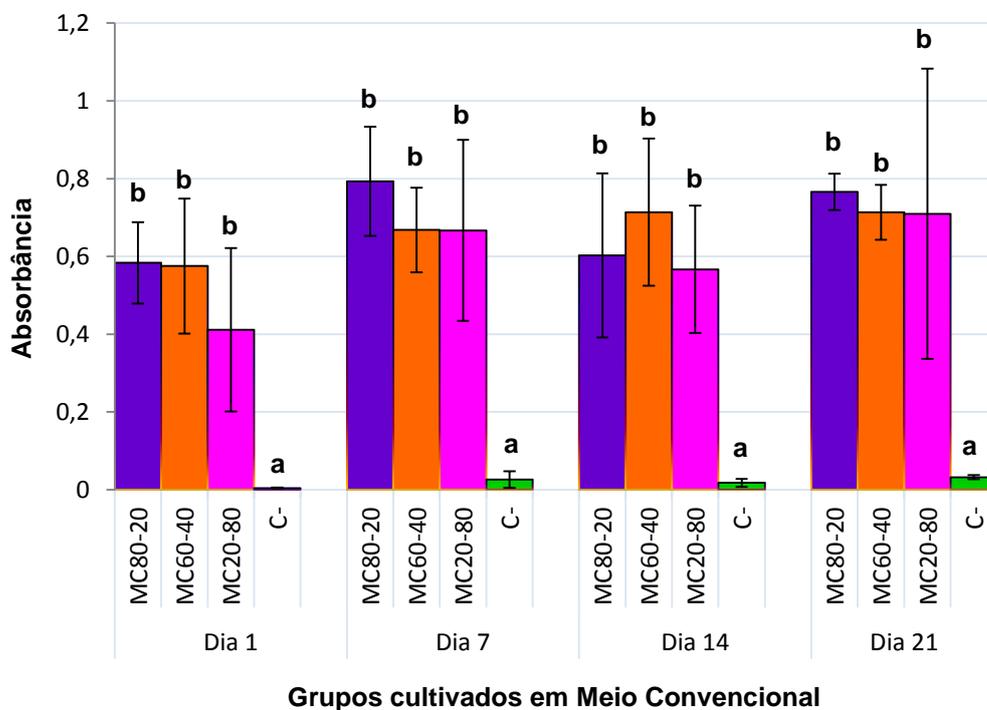


Fonte: do autor (2021).

5.2.2 Vermelho de Alizarina – Avaliação Quantitativa

Analisando os diferentes grânulos em um mesmo meio de cultivo, observamos que para o meio convencional, em todos os períodos avaliados, o grupo C- apresentou menor teor de calcificação que os demais grupos (C- < MC80-20, MC60-40 e MC20-80). Contudo, não houve diferença entre os grupos MC80-20, MC60-40 e MC20-80 (GRÁFICO 5). Já para o meio osteogênico, nos dias 1 e 7, o grupo C+ apresentou menor teor de mineralização que os demais grupos (C+ < MO80-20, MO60-40 e MO20-80), também não havendo diferença entre os grupos MO80-20, MO60-40 e MO20-80. Todavia, nos dias 14 e 21, não houve diferença estatística na taxa de mineralização entre os grupos MO80-20, MO60-40 e MO20-80 e C+ (GRÁFICO 6).

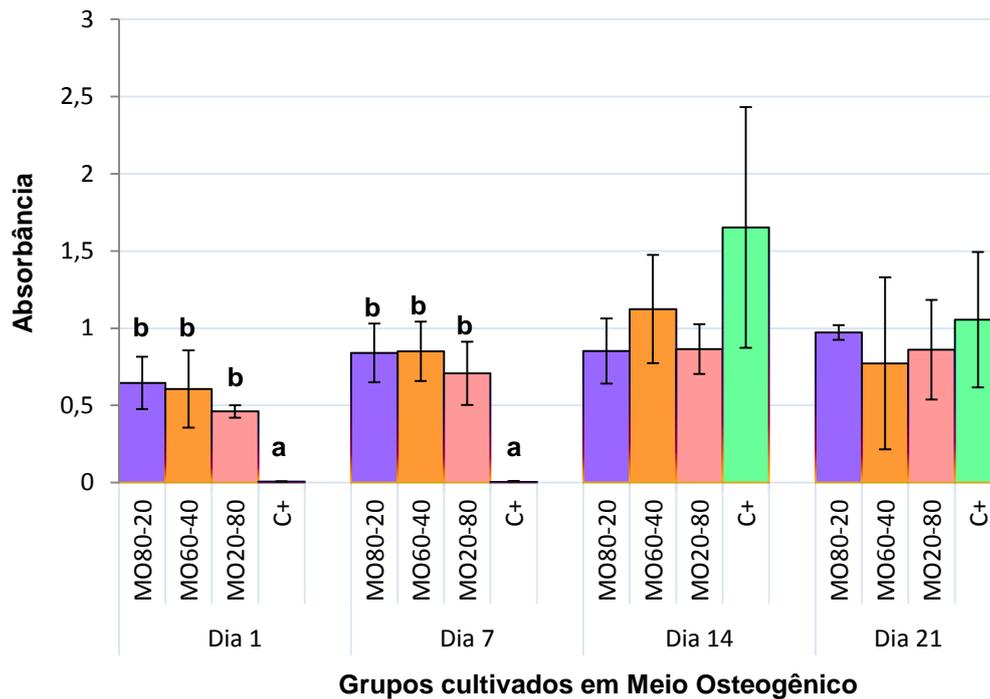
Gráfico 5 - Análise do potencial de calcificação exercido pelos diferentes grânulos no meio convencional MEM α , após 1, 7, 14 e 21 dias de cultivo.



Fonte: do autor (2021).

Nota: Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre os grupos avaliados dentro de um mesmo período ($p < 0,05$).

Gráfico 6 - Análise do potencial de calcificação exercido pelos diferentes grânulos no meio osteogênico, após 1, 7, 14 e 21 dias de cultivo.

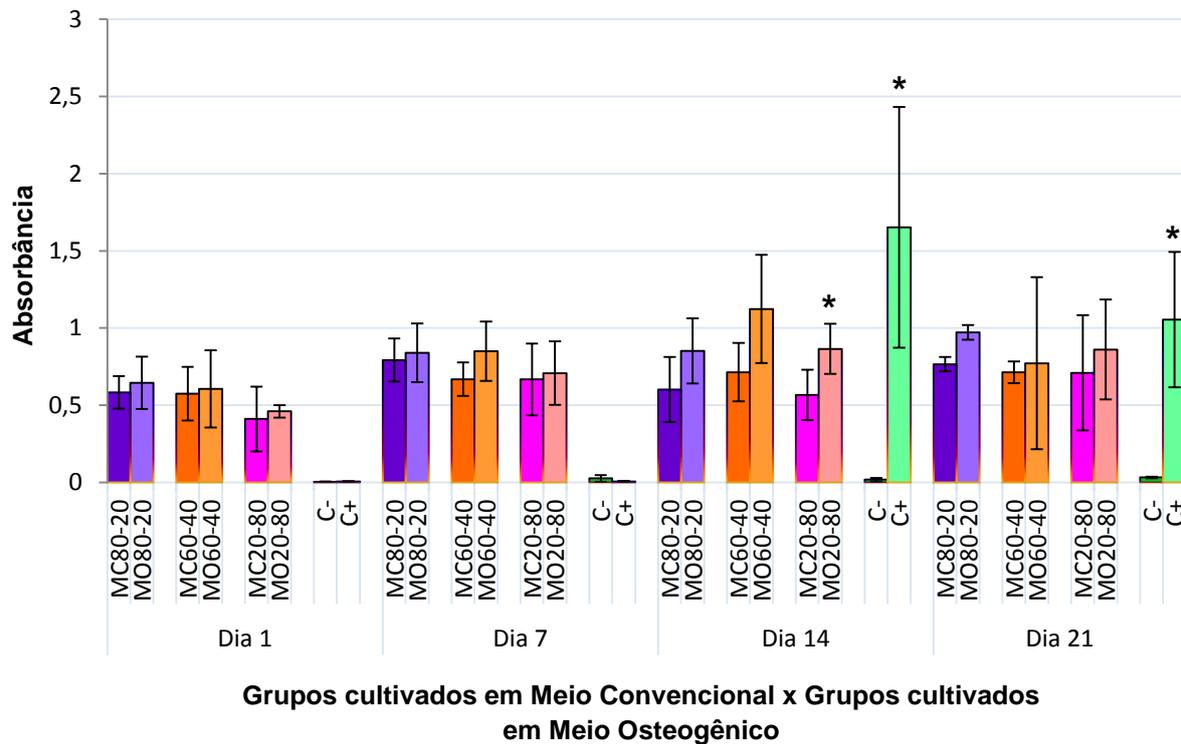


Fonte: do autor (2021).

Nota: Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre os grupos avaliados dentro de um mesmo período ($p < 0,05$).

Comparando o efeito entre os dois meios de cultivo em uma mesma proporção de HA/ β -TCP, notamos que, tanto no dia 1 quanto no dia 7, não houve diferença estatística na taxa de mineralização entre os grupos cultivados em meio convencional com os grupos homólogos cultivados em meio osteogênico (MC80-20 = MO80-20; MC60-40 = MO60-40; MC20-80 = MO20-80 e C- = C+). Já no dia 14, percebemos que para os grupos em que havia grânulos de 80 de HA e 20 de β -TCP (MC80-20 e MO80-20), bem como para os grupos em que havia grânulos de 60 de HA e 40 de β -TCP (MC60-40 e MO60-40), não houve diferença estatística. Todavia, nesse mesmo período, o grupo MO20-80 apresentou maior teor de calcificação que MC20-80, da mesma forma que C+ também foi superior a C-. Para o dia 21, houve diferença apenas entre os grupos C- e C+, sendo que a taxa de calcificação de C+ foi superior a C-, fato esse que não ocorreu entre os demais grupos homólogos nesse período. Esses achados podem ser visualizados no gráfico 7.

Gráfico 7 - Análise do potencial de calcificação exercido pelos dois meios de cultivo numa mesma proporção de HA/ β -TCP, dentro de um mesmo período.

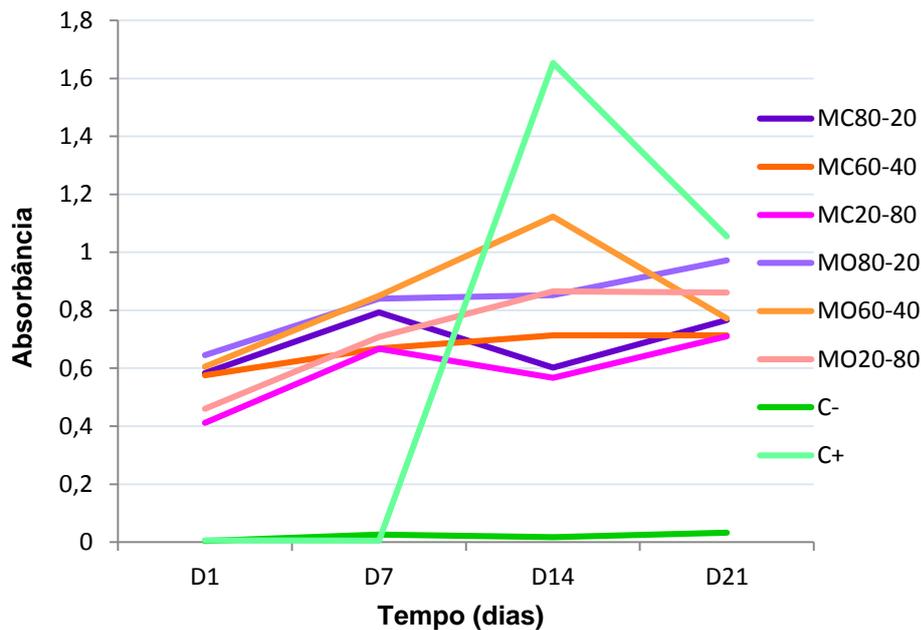


Fonte: do autor (2021).

Nota: O símbolo * indica diferença estatística entre os grupos homólogos avaliados no período correspondente ($p < 0,05$).

Por fim, quando avaliamos esses efeitos em um mesmo grupo, em razão do tempo, verificamos que para os grupos MC80-20, MC60-40, MC20-80, MO80-20 e MO60-40, nenhuma diferença estatística no teor de mineralização das células foi detectada com o passar do tempo. Já para o grupo MO20-80, o dia 1 apresentou menor taxa de mineralização que o dia 14, porém não houve diferença entre os demais períodos. No grupo C-, houve diferença estatística somente entre o 1º e o 21º dia, com maior taxa de mineralização no 21º dia. No grupo C+, a maior taxa de mineralização ocorreu no 14º e 21º dia, sem diferença entre esses dois períodos. Essas informações podem ser constatadas no gráfico 8.

Gráfico 8 - Análise da calcificação dos diferentes grupos em função do tempo de cultivo.



Fonte: do autor (2021).

5.3 EXPRESSÃO GÊNICA - RT-PCR

A expressão osteogênica das SHED foi avaliada por meio da técnica de RT-PCR em tempo real, empregando-se os marcadores OCN e RUNX2, para os quais a expressão do respectivo mRNA foi investigada. De posse dos resultados, a análise estatística foi conduzida e assim foi possível verificar, após o teste de Shapiro-Wilk, que a distribuição dos dados seguia normalidade. Logo, em seguida, o teste T ou ANOVA, seguido pelo teste Tukey foram aplicados, de acordo com a análise pertinente à distribuição dos dados.

5.3.1 Expressão relativa de mRNA para OCN

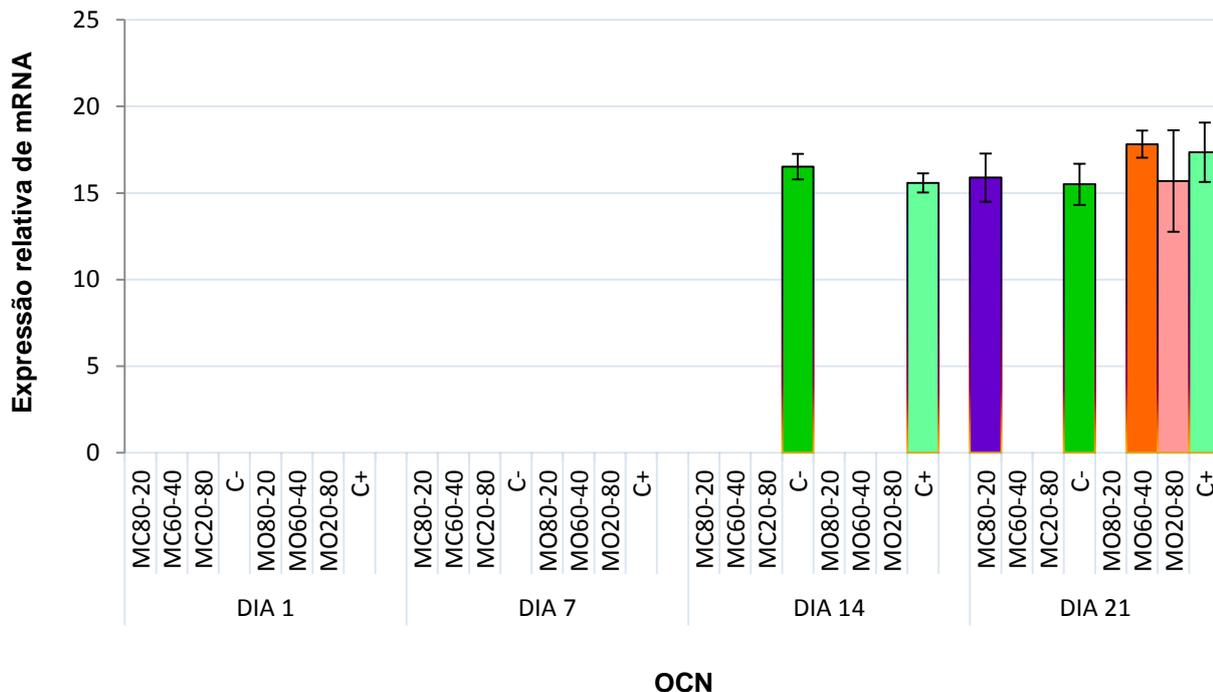
As SHED expressaram OCN apenas a partir do 14º dia, sendo que nesse período apenas os grupos controles C- e C+ apresentaram expressão relativa para esse marcador, não havendo diferença estatística entre eles ($p > 0,05$). Já no 21º dia, houve expressão de mRNA para a maioria dos grupos, exceto em MC60-40, MC20-

80 e MO80-20. Além disso, não houve diferença estatística entre os grupos que expressaram o marcador.

Quanto à resposta em relação ao tempo, foi possível comparar apenas a expressão relativa de mRNA nos grupos C- e C+ entre o 14º e 21º dia e, dentro dessa análise, verificou-se que não houve diferença quantitativa na expressão do marcador entre os dois períodos.

Tais achados podem ser constatados, por meio do gráfico apresentado logo abaixo (GRÁFICO 9).

Gráfico 9 - Expressão relativa de mRNA para OCN nos diferentes grupos.



Fonte: do autor (2021).

Nota: Não houve diferença estatística entre os grupos que expressaram mRNA ($p > 0,05$).

5.3.2 Expressão relativa de mRNA para RUNX2

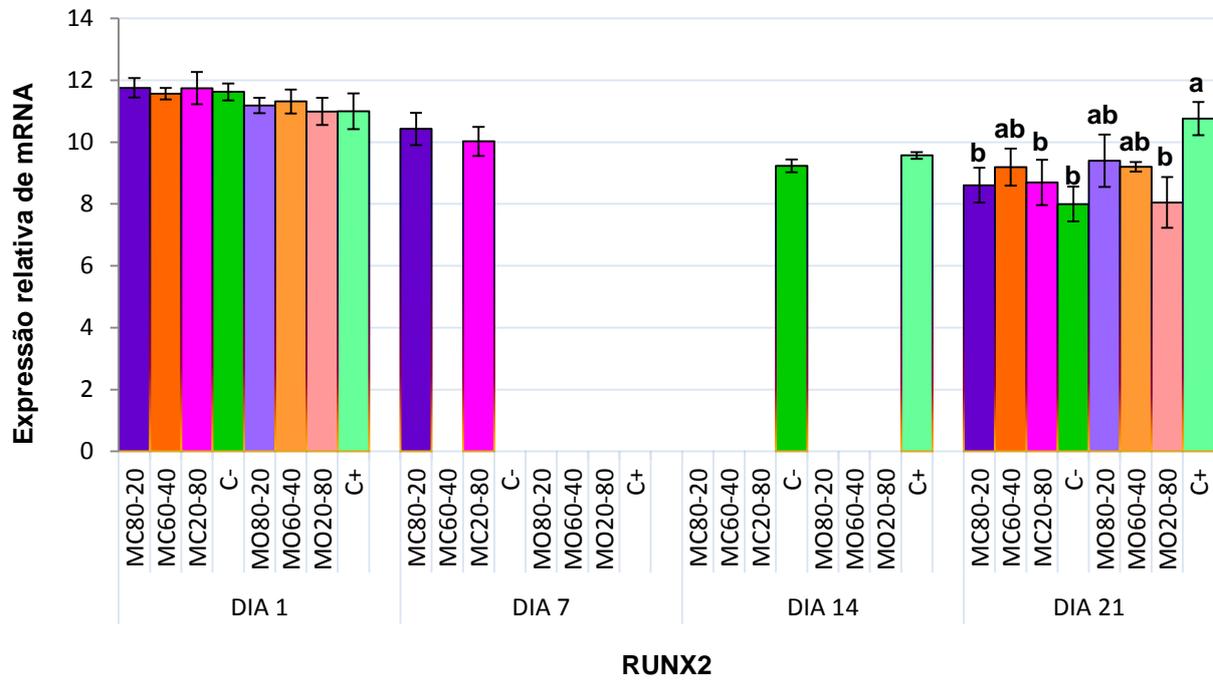
Para o RUNX2, houve expressão de mRNA em todos os períodos. No entanto, nem todos os grupos expressaram o marcador em um mesmo período. No

dia 1, todos os grupos expressaram RUNX2 e não houve diferença quantitativa na expressão desse marcador entre os grupos. No dia 7, houve detecção de mRNA para RUNX2 apenas nos grupos MC80-20 e MC20-80, sendo que, estatisticamente, não houve diferença quantitativa para os resultados coletados. No dia 14, apenas os grupos controle C- e C+ expressaram RUNX2, também não havendo diferença estatística entre tais grupos. Em contrapartida, no dia 21 foi possível verificar que todos os grupos avaliados expressaram o marcador e que o grupo C+ foi responsável pelo maior teor de expressão do mRNA. Contudo, embora C+ tenha demonstrado clara regulação positiva para RUNX2 nesse período, a média obtida apenas guardou diferença estatística com os grupos MC80-20, MC20-80, MO20-80 e C-. Com exceção do grupo C+, todos os demais grupos não demonstraram diferença estatística entre si.

Em relação ao comportamento dos dados de um mesmo grupo ao longo do tempo, foi possível verificar que para os grupos MC80-20, MC60-40, MC20-80, MO20-80, MO60-40 e C- a maior expressão de RUNX2 se deu no dia 1. Já para os grupos MO80-20 e C+, o maior teor foi constatado nos dias 1 e 21, sem diferença estatística entre esses dois períodos.

O gráfico 10 elucida o comportamento dos dados supracitados.

Gráfico 10 - Expressão relativa de mRNA para RUNX2 nos diferentes grupos.



Fonte: do autor (2021).

Nota: Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre os grupos avaliados dentro de um mesmo período ($p < 0,05$).

6 DISCUSSÃO

A odontologia regenerativa vem, cada vez mais, ganhando espaço como alternativa às terapias convencionais de restauração da função dentária e constitui uma modalidade promissora para a recuperação do órgão dental em um futuro próximo. Contudo, a regeneração óssea usando ferramentas da medicina regenerativa já é uma realidade. A polpa dentária constitui uma importante fonte de células-tronco e de fácil acessibilidade para ser empregada na terapia regenerativa óssea, pois essas células são capazes de se diferenciarem em linhagens osteogênicas se corretamente estimuladas.

Esse estudo buscou investigar se as diferentes proporções de HA e β -TCP, na forma de grânulos, cultivados em dois diferentes meios de cultivo celular, tiveram impacto na viabilidade e na diferenciação osteogênica de SHED. Neste trabalho, os grânulos de BCP utilizados foram da marca OSTEOSYNT®, fornecidos pela empresa EINCOBIO.

As biocerâmicas de BCP presentes no mercado podem diferir em sua forma física (grânulos de vários tamanhos, blocos, pasta, etc.), bem como em sua composição química. Estudos mostram que variações em ambos os parâmetros (químicos e físicos) podem refletir na produção de microambientes distintos, capazes de influenciar diretamente as respostas celulares frente a fatores intrínsecos e extrínsecos (LOBO *et al.*, 2015). Com relação à composição química, o presente estudo preconizou o emprego de diferentes proporções de HA/ β -TCP, porque é descrito na literatura que as diferentes razões nessa composição podem modular diretamente a bioatividade do material de acordo com as características de cada componente. Os produtos iônicos liberados no processo de dissolução desses materiais inorgânicos exercem efeito direto no microambiente onde estão situadas as células, bem como influenciam o processo de neoformação óssea (LEGEROS *et al.*, 2003). AbdulQader *et al.* (2014) investigaram a influência de três diferentes proporções de HA/ β -TCP na viabilidade de células-tronco da polpa de dentes permanentes (HDPSC). Ao quantificar a liberação de íons cálcio e fosfato, constataram que houve um aumento desses íons com a diminuição da razão HA/ β -TCP, o que refletiu na viabilidade das células, aumentando de forma proporcional ao aumento da razão HA/ β -TCP. Esse fato pode ser explicado pela maior quantidade

de β -TCP, que por ser mais solúvel, forneceu um ambiente mais alcalino, restringindo a viabilidade celular (ABDULQADER *et al.*, 2015).

Buscando investigar o efeito das diferentes proporções de HA/ β -TCP na viabilidade e proliferação das SHED, essa pesquisa verificou, por meio do ensaio MTT, que a relação destacada pelo estudo supracitado não foi observada. O ensaio MTT é um teste colorimétrico muito difundido que avalia a viabilidade/proliferação de células e a citotoxicidade de materiais terapêuticos. Nesse trabalho, os resultados demonstraram que a viabilidade e proliferação das SHED não foram prejudicadas pela presença dos grânulos, e que não houve diferença marcante quando comparadas as diferentes proporções de HA/ β -TCP. Foi verificado que apenas no dia 1, os resultados foram inferiores aos do grupo controle, em ambos os meios, e isso pode estar relacionado ao menor número de células presentes nesse período, bem como ao contato inicial das células com o material. Kouhestani *et al.* (2018) avaliaram a viabilidade de HDPSCs em contato com grânulos de BCP, por meio do teste MTT, e também concluíram que, entre os períodos analisados, apenas o primeiro dia retornou uma viabilidade inferior aos demais (KOUHESTANI *et al.*, 2018). Quanto aos meios de cultivo, percebemos que, nos dias 1 e 7, a taxa de viabilidade e proliferação das SHED em meio convencional se mostrou superior ao meio osteogênico, mas a partir do dia 14, não foi possível detectar uma diferença marcante nos resultados atribuídos aos meios. Esse fato aponta para uma boa receptividade de ambos os meios de cultura como fonte nutricional para as SHED em contato com a BCP.

Para avaliar o potencial de deposição de cálcio na formação de uma matriz mineralizada das SHED, elegemos o teste colorimétrico com vermelho de alizarina. Esse teste se baseia na coloração de nódulos minerais presentes na matriz óssea extracelular (LI-YU *et al.*, 2002). Nesse estudo, verificamos que os grânulos de BCP foram capazes de induzir a mineralização nas SHED e que não houve um padrão de diferença marcante na quantidade de deposição mineral entre as diferentes proporções de HA/ β -TCP cultivadas no mesmo tipo de meio. Além disso, quando analisamos o efeito dos dois meios de cultivo para uma mesma proporção de HA/ β -TCP (grupos homólogos), notamos também que não há diferença na capacidade de mineralização das células atribuída aos meios. Isso nos aponta para a hipótese de que as SHED cultivadas com grânulos de BCP em meio convencional podem ser tão estimuladas à diferenciação osteogênica, quanto àquelas cultivadas com BCP em

meio osteogênico, sendo uma vantagem nessa técnica, devido ao alto custo deste último. Em adição, percebemos que nos dias 1 e 7, os focos de mineralização se mostravam bem discretos nos grupos com grânulos e levantamos a hipótese de que aqueles presentes no primeiro dia se tratavam, na verdade, de produtos da fragmentação dos grânulos dissolvidos inicialmente nos meios de cultura. Ademais, constatamos que, a partir do dia 14, o meio osteogênico foi capaz de induzir mineralização, de forma semelhante aos grupos contemplados com grânulos, o que indica uma ausência de somação dos efeitos de estímulo de mineralização atribuídos ao meio osteogênico em conjunto aos grânulos de BCP.

Li *et al.* (2017) investigaram a indução de diferenciação osteogênica em células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea, utilizando três formas de cerâmicas de fosfato de cálcio, sendo a BCP na proporção de 60% de HA e 40% de β -TCP e, por meio do ensaio com vermelho de alizarina, também concluíram que a BCP foi capaz de estimular a deposição de matriz mineralizada, em contraste com o grupo controle, o qual apresentou discretos focos de mineralização do início ao fim dos períodos avaliados (LI *et al.*, 2017).

Com a finalidade de investigar a capacidade de osteogênese das SHED sob estímulo, investigamos a expressão de dois genes relacionados à diferenciação osteoblástica (OCN e RUNX2). A osteocalcina é uma proteína não colágena, dependente da vitamina K, que é secretada durante o estágio tardio da diferenciação osteoblástica (CARVALHO *et al.*, 2019). Os níveis de OCN no decorrer do desenvolvimento ósseo são muito baixos, sendo que o teor máximo só é alcançado no estágio final de mineralização da matriz óssea (GUNDBERG, 2000; CARVALHO *et al.*, 2019). Esse achado guarda relação com o fato de que essa proteína possui em sua estrutura três resíduos de ácido glutâmico, os quais se ligam fortemente ao íon cálcio e, por consequência, à hidroxiapatita, conferindo assim uma alta afinidade com os componentes minerais do osso maduro (POSER; PRICE, 1979; POSER *et al.*, 1980). Dessa forma, a OCN acelera o processo de nucleação da hidroxiapatita, o que confere um papel ativo nos estágios iniciais da maturação óssea (RAMMELT *et al.*, 2005).

Já o RUNX2 é um dos principais fatores de transcrição na diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais (KOMORI, 2006). Durante o processo de diferenciação dessas células, ocorre uma regulação positiva na via do RUNX2, a

qual estimula a diferenciação de osteoblastos imaturos, enquanto, concomitantemente, inibe a de outras linhagens celulares, como por exemplo, de adipócitos (CHEN *et al.*, 2016). Além disso, o RUNX2 também é necessário para estimular a expressão da maioria dos genes envolvidos na matriz óssea de osteoblastos imaturos. Contudo, sua participação é desnecessária para manter esses mesmos genes em osteoblastos já maduros, fazendo com que durante o processo de maturação óssea, ocorra uma diminuição da sua expressão (KOMORI, 2010; CHEN *et al.*, 2016).

Nesse estudo, verificamos que as SHED demonstraram os primeiros indícios de expressão para OCN tardiamente, após o 14^o dia, tendo seu pico de expressão no 21^o dia. Além disso, constatamos que houve uma expressão significativa de RUNX2 já no 1^o dia da análise, seguida por um decaimento e posterior expressão no 21^o dia. Esses achados, que mostram a tendência de expressão dos marcadores em relação ao tempo, guardam certa semelhança com os resultados demonstrados no trabalho realizado por Li *et al.* (2017), cuja pesquisa teve por objetivo investigar a resposta osteogênica de células-tronco mesenquimais da medula óssea, após serem cultivadas em HA, β -TCP e BCP na proporção de 60% de HA e 40% de β -TCP, durante 7, 14 e 21 dias. Em seus resultados, os pesquisadores verificaram que para a maioria dos marcadores de osteogênese utilizados, inclusive OCN, houve um aumento tempo-dependente na expressão gênica e que a expressão máxima foi detectada no 21^o dia. Contudo, para o RUNX2, eles constataram que houve um aumento gradual inicial, seguido de um decaimento (LI *et al.*, 2017). Tal qual em nosso estudo, uma similaridade no comportamento dos marcadores em função do tempo pôde ser notada, embora estivesse presente uma diferença de resposta quantitativa nos resultados, bem como no desenho dos grupos aplicados.

Aqui cabe ressaltar, que em nosso estudo o grupo C-, desenhado para ser o controle negativo, demonstrou expressão dos dois marcadores osteogênicos, por vezes sem diferença estatística com os demais grupos. Esse fato chama a atenção para a inclusão desse achado nas considerações a respeito da comparação entre os grupos para avaliação da indução de diferenciação osteogênica, sendo mais prudente a condução de novos experimentos empregando os mesmos parâmetros aplicados nesse estudo. Contudo, ao olhar para a tendência dos dados obtidos, não é possível designar uma proporção de grânulos da BCP que tenham exercido estímulo maior de diferenciação osteogênica, comparada às demais.

Outro estudo importante de se referenciar, em virtude do contraste dos resultados, é o de Sun *et al.* (2018), que investigou a capacidade osteogênica de células-tronco da medula óssea de ratos, quando expostas a quatro materiais diferentes, durante 1, 4, 7, 14, 21 e 28 dias. Os biomateriais empregados por eles foram colágeno (COL), colágeno com hidroxiapatita (COL/HA), somente hidroxiapatita (HA) e a biocerâmica de fosfato de cálcio bifásico contendo 60% de HA e 40% de β -TCP (BCP). Após análise dos resultados de expressão gênica, por meio da técnica de RT-PCR, para OCN e RUNX2, os autores perceberam que para a BCP, a expressão de OCN, curiosamente, teve seu pico no 4º dia e que após esse período houve um decaimento nessa taxa. Fato parecido ocorreu na expressão do RUNX2, cujo pico se deu entre o 4º e o 7º dia, com posterior diminuição (SUN *et al.*, 2018).

Diante dos resultados apresentados aqui e do contraste com os estudos referenciados e existentes na literatura, torna-se importante salientar que pesquisas envolvendo linhagens celulares diferentes, podem demonstrar resultados distintos e particulares das células-tronco empregadas, de acordo com sua origem. Em virtude disso, tornar-se-á imprescindível a condução de novos estudos empregando diferentes linhagens celulares associadas às BCPs. Além disso, não há na literatura trabalhos de indução de diferenciação osteogênica associando BCPs com SHED, o que torna o presente estudo pioneiro nesse seguimento e preliminar para a investigação dos efeitos dessas biocerâmicas no potencial de osteogênese das SHED.

7 CONCLUSÃO

Em face dos resultados apresentados e levando em consideração as limitações inerentes à metodologia aplicada nesse estudo, foi possível concluir que as BCPs foram capazes de estimular a diferenciação osteogênica nas SHED a partir do 14º dia de cultivo, sem diferença entre as diferentes proporções de HA/ β -TCP e meios nutricionais empregados. Esse fato destaca as SHED como excelente fonte de células-tronco a serem consideradas no processo de osteogênese em associação às BCPs, embora haja uma necessidade imperativa de mais estudos *in vitro* e *in vivo* para determinar, parâmetros ideais de cultivo, bem como para avaliar a qualidade de osso recém-formado.

REFERÊNCIAS

- ABDULQADER, S. T. *et al.* Effect of different calcium phosphate scaffold ratios on odontogenic differentiation of human dental pulp cells. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, v. 49, p. 225-233, Apr. 2015.
- ANNAZ, B. *et al.* Porosity variation in hydroxyapatite and osteoblast morphology: a scanning electron microscopy study. **J Microsc**, v. 215, n. Pt 1, p. 100-10, July 2004.
- ARORA, V.; ARORA, P.; MUNSHI, A. K. Banking stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED): saving for the future. **J Clin Pediatr Dent**, v. 33, n. 4, p. 289-94, Summer 2009.
- BOULER, J. M. *et al.* Biphasic calcium phosphate ceramics for bone reconstruction: A review of biological response. **Acta Biomater**, v. 53, p. 1-12, Apr. 15 2017.
- BRUDER, S. P.; FINK, D. J.; CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. **J Cell Biochem**, v. 56, n. 3, p. 283-94, Nov. 1994.
- CARVALHO, M. S. *et al.* Synergistic effect of extracellularly supplemented osteopontin and osteocalcin on stem cell proliferation, osteogenic differentiation, and angiogenic properties. **J Cell Biochem**, v. 120, n. 4, p. 6555-6569, Apr. 2019.
- CHEN, Q. *et al.* Fate decision of mesenchymal stem cells: adipocytes or osteoblasts? **Cell Death Differ**, v. 23, n. 7, p. 1128-39, July 2016.
- CHENG, A.; GENEVER, P. G. SOX9 determines RUNX2 transactivity by directing intracellular degradation. **J Bone Miner Res**, v. 25, n. 12, p. 2680-9, Dec. 2010.
- DACULSI, G. *et al.* Current state of the art of biphasic calcium phosphate bioceramics. **J Mater Sci Mater Med**, v. 14, n. 3, p. 195-200, Mar. 2003.
- DACULSI, G. *et al.* Macroporous calcium phosphate ceramic for long bone surgery in humans and dogs. Clinical and histological study. **J Biomed Mater Res**, v. 24, n. 3, p. 379-96, Mar. 1990.
- DE COSTER, P.; BROWAEYS, H.; DE BRUYN, H. Healing of extraction sockets filled with BoneCeramic(R) prior to implant placement: preliminary histological findings. **Clin Implant Dent Relat Res**, v. 13, n. 1, p. 34-45, Mar. 2011.
- DEVINE, S. M. Mesenchymal stem cells: will they have a role in the clinic? **J Cell Biochem Suppl**, v. 38, p. 73-9, 2002.

DIMITRIOU, R. *et al.* Bone regeneration: current concepts and future directions. **BMC Med**, v. 9, p. 66, May 31 2011.

EBRAHIMI, M.; BOTELHO, M. G.; DOROZHKIN, S. V. Biphasic calcium phosphates bioceramics (HA/TCP): Concept, physicochemical properties and the impact of standardization of study protocols in biomaterials research. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, v. 71, p. 1293-1312, Feb. 1 2017.

ELLINGER, R. F.; NERY, E. B.; LYNCH, K. L. Histological assessment of periodontal osseous defects following implantation of hydroxyapatite and biphasic calcium phosphate ceramics: a case report. **Int J Periodontics Restorative Dent**, v. 6, n. 3, p. 22-33, 1986.

FILLINGHAM, Y.; JACOBS, J. Bone grafts and their substitutes. **Bone Joint J**, v. 98-B, n. 1 Suppl A, p. 6-9, Jan. 2016.

FRIEDMANN, A. *et al.* Ridge augmentation and maxillary sinus grafting with a biphasic calcium phosphate: histologic and histomorphometric observations. **Clin Oral Implants Res**, v. 20, n. 7, p. 708-14, July 2009.

GARCIA-GARETA, E.; COATHUP, M. J.; BLUNN, G. W. Osteoinduction of bone grafting materials for bone repair and regeneration. **Bone**, v. 81, p. 112-121, Dec. 2015.

GARRIDO, C. A. *et al.* Biphasic calcium phosphate bioceramics for orthopaedic reconstructions: clinical outcomes. **Int J Biomater**, v. 2011, p. 129727, 2011.

GAUTHIER, O. *et al.* Elaboration conditions influence physicochemical properties and in vivo bioactivity of macroporous biphasic calcium phosphate ceramics. **J Mater Sci Mater Med**, v. 10, n. 4, p. 199-204, Apr. 1999.

GINANI, F. *et al.* Low-level laser irradiation induces in vitro proliferation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **Lasers Med Sci**, v. 33, n. 1, p. 95-102, Jan. 2018.

GRONTHOS, S. *et al.* Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 25, p. 13625-30, Dec. 5 2000.

GUNDBERG, C. M. Biochemical markers of bone formation. **Clin Lab Med**, v. 20, n. 3, p. 489-501, Sep 2000.

KARAGEORGIU, V.; KAPLAN, D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. **Biomaterials**, v. 26, n. 27, p. 5474-91, Sept. 2005.

KHAN, S. N. *et al.* The biology of bone grafting. **J Am Acad Orthop Surg**, v. 13, n. 1, p. 77-86, Jan-Feb. 2005.

KOLERMAN, R. *et al.* Histomorphometric analysis of newly formed bone after bilateral maxillary sinus augmentation using two different osteoconductive materials and internal collagen membrane. **Int J Periodontics Restorative Dent**, v. 32, n. 1, p. e21-8, Feb. 2012.

KOMORI, T. Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2. **Cell Tissue Res**, v. 339, n. 1, p. 189-95, Jan. 2010.

_____. Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. **J Cell Biochem**, v. 99, n. 5, p. 1233-9, Dec. 1 2006.

KOUHESTANI, F. *et al.* Allogenic vs. synthetic granules for bone tissue engineering: an in vitro study. **Prog Biomater**, v. 7, n. 2, p. 133-141, June 2018.

LANGE, C. *et al.* Accelerated and safe expansion of human mesenchymal stromal cells in animal serum-free medium for transplantation and regenerative medicine. **J Cell Physiol**, v. 213, n. 1, p. 18-26, Oct. 2007.

LEE, J. M. *et al.* Developing palatal bone using human mesenchymal stem cell and stem cells from exfoliated deciduous teeth cell sheets. **J Tissue Eng Regen Med**, v. 13, n. 2, p. 319-327, Feb. 2019.

LEGEROS, R. Z. Calcium phosphate materials in restorative dentistry: a review. **Adv Dent Res**, v. 2, n. 1, p. 164-80, Aug. 1988.

_____. Calcium phosphate-based osteoinductive materials. **Chem Rev**, v. 108, n. 11, p. 4742-53, Nov. 2008.

_____. Calcium phosphate materials in restorative dentistry: a review. **Adv Dent Res**, v. 2, n. 1, p. 164-80, Aug. 1988.

LEGEROS, R. Z. *et al.* Biphasic calcium phosphate bioceramics: preparation, properties and applications. **J Mater Sci Mater Med**, v. 14, n. 3, p. 201-9, Mar. 2003.

LI-YU, J. *et al.* Calcium apatite crystals in synovial fluid rice bodies. **Ann Rheum Dis**, v. 61, n. 5, p. 387-90, May 2002.

LI, Y. *et al.* Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) induced by three calcium phosphate ceramic (CaP) powders: A comparative study. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, v. 80, p. 296-300, Nov. 1 2017.

LOBO, S. E.; ARINZEH, T. L. Biphasic Calcium Phosphate Ceramics for Bone Regeneration and Tissue Engineering Applications. **Materials** v. 3, p. 815-826, Jan. 2010.

LOBO, S. E. *et al.* Response of stem cells from different origins to biphasic calcium phosphate bioceramics. **Cell Tissue Res**, v. 361, n. 2, p. 477-95, Aug. 2015.

MACEDO, R. M. *et al.* Vital Bone Formation After Grafting of Autogenous Bone and Biphasic Calcium Phosphate Bioceramic in Extraction Sockets of Rats: Histological, Histometric, and Immunohistochemical Evaluation. **Implant Dent**, v. 27, n. 6, p. 615-622, Dec. 2018.

MACEDO, R. M. *et al.* Bone integration behavior of hydroxyapatite/beta-tricalcium phosphate graft implanted in dental alveoli: a histomorphometric and scanning electron microscopy study. **Implant Dent**, v. 23, n. 6, p. 710-5, Dec. 2014.

MILLAN, C. *et al.* Mesenchymal Stem Cells and Calcium Phosphate Bioceramics: Implications in Periodontal Bone Regeneration. **Adv Exp Med Biol**, v. 1107, p. 91-112, 2018.

MIURA, M. *et al.* SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 10, p. 5807-12, May 13 2003.

MOORE, D. C.; CHAPMAN, M. W.; MANSKE, D. The evaluation of a biphasic calcium phosphate ceramic for use in grafting long-bone diaphyseal defects. **J Orthop Res**, v. 5, n. 3, p. 356-65, 1987.

MOTAMEDIAN, S. R.; KHOJASTE, M.; KHOJASTE, A. Success rate of implants placed in autogenous bone blocks versus allogenic bone blocks: A systematic literature review. **Ann Maxillofac Surg**, v. 6, n. 1, p. 78-90, Jan-June 2016.

NAKAJIMA, K. *et al.* Comparison of the bone regeneration ability between stem cells from human exfoliated deciduous teeth, human dental pulp stem cells and human bone marrow mesenchymal stem cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 497, n. 3, p. 876-882, Mar. 11 2018.

NAKAMURA, S. *et al.* Stem cell proliferation pathways comparison between human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells by gene expression profile from promising dental pulp. **J Endod**, v. 35, n. 11, p. 1536-42, Nov. 2009..

NERY, E. B. *et al.* Bioceramic implants in surgically produced infrabony defects. **J Periodontol**, v. 46, n. 6, p. 328-47, June 1975.

NERY, E. B. *et al.* Tissue response to biphasic calcium phosphate ceramic with different ratios of HA/beta TCP in periodontal osseous defects. **J Periodontol**, v. 63, n. 9, p. 729-35, Sept. 1992.

PITTENGER, M. F. *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v. 284, n. 5411, p. 143-7, Apr. 2 1999.

POSER, J. W. *et al.* Isolation and sequence of the vitamin K-dependent protein from human bone. Undercarboxylation of the first glutamic acid residue. **J Biol Chem**, v. 255, n. 18, p. 8685-91, Sept. 25 1980.

POSER, J. W.; PRICE, P. A. A method for decarboxylation of gamma-carboxyglutamic acid in proteins. Properties of the decarboxylated gamma-carboxyglutamic acid protein from calf bone. **J Biol Chem**, v. 254, n. 2, p. 431-6, Jan. 25 1979.

RAMMELT, S. *et al.* Osteocalcin enhances bone remodeling around hydroxyapatite/collagen composites. **J Biomed Mater Res A**, v. 73, n. 3, p. 284-94, Jun 1 2005.

REICHERT, J. C. *et al.* A tissue engineering solution for segmental defect regeneration in load-bearing long bones. **Sci Transl Med**, v. 4, n. 141, p. 141ra93, July 4 2012.

RH OWEN, G.; DARD, M.; LARJAVA, H. Hydroxyapatite/beta-tricalcium phosphate biphasic ceramics as regenerative material for the repair of complex bone defects. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 106, n. 6, p. 2493-2512, Aug. 2018.

RIPAMONTI, U. Osteoinduction in porous hydroxyapatite implanted in heterotopic sites of different animal models. **Biomaterials**, v. 17, n. 1, p. 31-5, Jan. 1996.

ROOHANI-ESFAHANI, S. I. *et al.* A bioceramic with enhanced osteogenic properties to regulate the function of osteoblastic and osteoclastic cells for bone tissue regeneration. **Biomed Mater**, v. 11, n. 3, p. 035018, Jun. 15 2016.

SUN, X. *et al.* Comparison of the osteogenic capability of rat bone mesenchymal stem cells on collagen, collagen/hydroxyapatite, hydroxyapatite and biphasic calcium phosphate. **Regen Biomater**, v. 5, n. 2, p. 93-103, Mar. 2018.

WONGSUPA, N. *et al.* Assessment of bone regeneration of a tissue-engineered bone complex using human dental pulp stem cells/poly(epsilon-caprolactone)-biphasic calcium phosphate scaffold constructs in rabbit calvarial defects. **J Mater Sci Mater Med**, v. 28, n. 5, p. 77, May 2017.

YUAN, H. *et al.* Osteoinductive ceramics as a synthetic alternative to autologous bone grafting. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 31, p. 13614-9, Aug. 3 2010.

YUNUS BASHA, R.; SAMPATH KUMAR, T. S.; DOBLE, M. Design of biocomposite materials for bone tissue regeneration. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, v. 57, p. 452-63, Dec. 1 2015.

ZUK, P. A. *et al.* Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. **Mol Biol Cell**, v. 13, n. 12, p. 4279-95, Dec. 2002.