

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

SAMARA CATARINO SAMPAIO

**CAPACIDADE DE MINERALIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO DA POLPA
DE DENTES DECÍDUOS ESFOLIADOS HUMANOS CULTIVADAS COM
FRAGMENTOS DE DENTES BOVINOS**

ALFENAS/MG

2021

SAMARA CATARINO SAMPAIO

**CAPACIDADE DE MINERALIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO DA POLPA
DE DENTES DECÍDUOS ESFOLIADOS HUMANOS CULTIVADAS COM
FRAGMENTOS DE DENTES BOVINOS**

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

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Sampaio, Samara Catarino.

Capacidade de mineralização de células-tronco da polpa de dentes decíduos esfoliados humanos cultivadas com fragmentos de dentes bovinos / Samara Catarino Sampaio. - Alfenas, MG, 2021.

53 f. : il. -

Orientador(a): Vivien Thiemy Sakai.

Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2021.

Bibliografia.

1. Dente. 2. Regeneração Óssea. 3. Engenharia Tecidual. 4. Células-tronco. I. Sakai, Vivien Thiemy, orient. II. Título.

Samara Catarino Samapio

**"CAPACIDADE DE MINERALIZAÇÃO DE CÉLULAS-
TRONCO DA POLPA DE DENTES DECÍDUOS ESFOLIADOS HUMANOS
CULTIVADAS COM FRAGMENTOS DE DENTES BOVINOS"**

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

Aprovada em: 17 de setembro de 2021.

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

Prof. Dr. Natalino Lourenço Neto
Instituição: Universidade de São Paulo - USP - Bauru

Prof. Dr. Leandro Araújo Fernandes
Instituição: Universidade Federal de Alfenas -MG



Documento assinado eletronicamente por **Vivien Thiemy Sakai Jacob, Professor do Magistério Superior**, em 20/09/2021, às 07:25, 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 **Leandro Araújo Fernandes, Professor do Magistério Superior**, em 20/09/2021, às 10:18, 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 **NATALINO LOURENÇO NETO, Usuário Externo**, em 21/09/2021, às 13:25, 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 **0588584** e o código CRC **005CDE3A**.

Dedico este trabalho primeiramente a Deus e em seguida a todos àqueles que acreditaram em mim e no meu potencial, mesmo quando eu mesma não tinha essa capacidade. Em especial, não posso deixar de reforçar que minhas maiores conquistas são fruto do amor e incentivo de minha mãe, Magna, e de meu companheiro de jornada, Victor Hugo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, pela oportunidade de estar aqui, nesta encarnação, vivenciando e aprendendo. Sei que até aqui minha fé me tornou forte para suportar desafios que antes não me via capaz de vencer. Sei também que, apesar disso, Deus torna a minha jornada mais leve e junto Dele e da espiritualidade, tomo um passo adiante para contribuir e me tornar um ser-humano melhor para minha comunidade.

Agradeço minha mãe, Magna, que nunca podou minhas asas. A pessoa responsável por me fazer acreditar que tudo que eu sonho, eu sou capaz de realizar. O colo necessário, o choro compartilhado, as infinitas risadas até a barriga doer, a personificação de uma melhor amiga. Minha mãe é para mim minha alma-gêmea. Eu não poderia ser mais feliz do que ter ela como mãe, a primeira pessoa a acreditar e a última a desistir. Com a minha mãe eu aprendi que tudo se conserta, recicla, e evita jogar fora. Tudo tem um potencial incrível de ser renovado, seja um espelho quebrado, uma dissertação que foi parada pela pandemia ou um coração partido. Honrada por poder compartilhar mais essa experiência e os frutos dela com a mulher mais forte e confiante que eu conheço e tenho a honra de chamar de “mamãe”.

Agradeço meu companheiro, Victor Hugo, que nunca, em hipótese alguma, mede esforços para que eu realize os meus sonhos. Divide comigo as responsabilidades, me dá a paz e acalento necessário. São praticamente 10 anos compondo uma bela e verdadeira história de amor. daquelas de filme. Mas o felizes para sempre a gente constrói diariamente, com as dificuldades e alegrias de viver. Hoje, se sou capaz de entregar um trabalho como esse, foi pelo suporte inquestionável psicológico, emocional e financeiro que ele me deu. Por vezes o caminho foi árduo, por vezes ele estava lá com um café. O Victor Hugo me dá vontade de vencer, me estimula a buscar meu melhor, não me deixa desacreditar de mim e me relembra minhas prioridades. Agradeço o privilégio de ter comigo alguém que não se intimida com meu sucesso, mas compartilha dos meus caminhos.

Agradeço ao meu pai, Rogério, que sempre me desafia a ser melhor, mas também fornece um espaço seguro, um refúgio, caso eu sinta necessidade de dar uma pausa e refazer meus planos. Meu pai é o exemplo do trabalho duro e competência. É um privilégio poder caminhar pelas batalhas árduas e em cada passo sentir que meus pés são guiados pela admiração que tenho pelo caminho do meu pai, que é um orgulho para quem conhece.

Agradeço às minhas irmãs, Suélen e Sabrina, que me criaram como minhas irmãs, fizeram lindos caminhos de sucesso profissional e hoje, me servem de inspiração. Me ensinaram tanto, desde o dever de casa à fazer escolhas e não me sentir culpada por isso. Sempre foram minhas amigas. Espero poder ser para meus afilhados e sobrinhos metade das inspirações que elas foram na minha vida.

Aos meus amados afilhados e sobrinhos, Pietro, Mariah e Benjamin, agradeço por me manterem no caminho de foco e dedicação, pois se hoje quero que minha carreira dê certo, não posso negar que é para deixar um legado para eles. Para que eles saibam com suas respectivas imaginação, honestidade e alegria que eles podem conquistar o mundo através da dedicação aos estudos.

Aos meus sogros, Luciano e Silvina, bem como meus cunhados, que são como irmãos, Maria Inês e Daniel Victor, agradeço por acreditarem em mim com tanto afincamento. Não me deixando nem por um segundo esquecer que eu sou capaz. São a extensão da minha família e fico feliz por poder agregar à família deles. São fundamentais para que eu pudesse estar me dedicando ao mestrado. Agradeço pelo voto de confiança com leveza que sempre me deram.

Agradeço à minha orientadora, Prof^a Dr^a Vivien Thiemy Sakai. Apesar de ter dito muito até aqui, me faltam palavras para expressar fidedignamente a gratidão que tenho por ela. É uma mistura de gratidão, carinho, incondicional respeito, admiração e amor. Quando eu ouvia frases para me inspirar em mulheres fortes, hoje, próximo da minha orientadora, consigo entender. Ela é uma mulher forte como eu serei um dia. Agradeço por ter confiado esta obra a mim. Por ter não só aberto as portas da sua sala, mas da sua vida para mim. Hoje saio não com uma orientadora, mas com uma amiga para o resto de minha vida. Obrigada por se sensibilizar com as minhas dificuldades de uma forma tão humana e admirável. Se eu tivesse um desejo para fazer hoje, sem dúvidas seria que mais pessoas se

encantassem pelo mundo acadêmico como me encantei convivendo com a Vivien. Determinada, perspicaz, dedicada, versátil e com compaixão.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Ricardo Gracia Mureb Jacob, agradeço a confiança no meu trabalho. Confiou a mim suas idéias e de forma leve e divertida, me guiou não só para concluir este trabalho, mas a construir meu futuro. Sempre preocupado e dedicado, junto com a Vivien faz do meio acadêmico um lugar excepcional.

Agradeço a todos aqueles que contribuíram diretamente para este trabalho, em especial ao Prof. Dr. Fábio Antônio Colombo e à doutoranda Juliana Barbosa Nunes que abriram as portas do laboratório para mim e se dedicaram à me conduzir e acompanhar enquanto corríamos os testes laboratoriais. O aprendizado que me forneceram vai ser profundo em minha mente, mas a mão que me estenderam vai ser eterna em meu coração.

Aos funcionários do laboratório de bioquímica que me foram tão receptivos e solícitos, meu muito obrigada.

Agradeço à UNIFAL-MG, onde encerro uma jornada que se iniciou com uma jovem saindo do ensino médio do interior do Rio de Janeiro em 2012 em busca da graduação em Odontologia e hoje sai com a oportunidade de se tornar Mestre em Ciências Odontológicas.

Agradeço aos meus professores de graduação e mestrado que me enriqueceram e conduziram com seus conhecimentos. É pela paixão deles que me inspiro em difundir e enriquecer a Odontologia.

Agradeço aos meus colegas de turma de Mestrado Alexandre, Caio, Laura, Nívea, Thaísa e Ugo. Minha turma foi de suma importância para construir meu senso crítico como futura professora e contribuíram demais na minha evolução acadêmica.

Agradeço ao meu grande amigo Ugo, que não é o desenho de melhor amigo para mim, assim como não sou para ele. Não somos o amigo que idealizamos, somos um para o outro o amigo que precisamos. Hoje eu o chamo de melhor amigo não só pelas vezes que passamos mal de rir, ou pelas conversas tão profundas, mas pelos conselhos pontuais, por não me deixar desistir, por trilhar essa jornada que foi o mestrado lado a lado. Bem ou mal, na alegria e na

tristeza, no laboratório ou na clínica, nem sempre de bom humor, mas juntos. Minha amizade com o Ugo é classificada em ser feliz com o vôo do outro. Mas por vezes, escolhemos e escolheremos voar juntos.

Aos que dividi a composição do colegiado da PPGCO, Prof. Dr. Ronaldo Célio Mariano, Prof. Dr. André Gustavo Paleari, Prof. Dr. João Adolfo Costa Hanemann, Prof^a Dr^a Vivien Thiemy Sakai, Prof^a Dr^a Suzane Pigossi, Prof^a Dr^a Daniela Coêlho de Lima e a secretária Rosana Aparecida de Oliveira. Meu agradecimento por se reafirmarem e aprofundarem como meus grandes exemplos. Pude conviver e os ver trabalhando muito para fazer o programa acontecer. Contribuindo com idéias, com trabalho extra, com dedicação todos os dias, durante todo esse tempo, para solucionar as dificuldades de fazer um programa deste porte viver.

Às Prof^a. Dr^a. Nádia Carolina Teixeira Marques e Ana Beatriz da Silveira Moretti. Bancas de minha qualificação, que enriqueceram este trabalho com conhecimento, dedicação, carinho e com percepções tão únicas. Agradeço por fazerem desta trabalho, para mim, uma obra-prima.

Às minhas amigas Bárbara, Jéssica e Olívia, agradeço por serem suporte, abrigo, amor, carinho, descontração e desabafo. Além de meus grandes orgulhos na jornada acadêmica. Trilham caminhos incríveis que só me fazem ter vontade de continuar. Amizades que estão sempre junto, mesmo estando separadas. São mais de 15 anos de amizade que perdurarão para o resto da vida. Deus é muito generoso de me permitir ter essas mulheres ao meu lado e poder tanto me inspirar quanto contribuir na vida delas.

Por fim, agradeço à mim, por não ter desistido, por ter me superado, por ter estudado tanto, pelas abdições, por ter feito o que precisava fazer para que desse certo. Agradeço a mim pela minha dedicação comigo mesma e com meus sonhos, por ter colocado minhas metas e sonhos como prioridade e não ter esquecido onde eu quero chegar e assim o caminho que preciso percorrer. Agradeço a mim por ter cultivado as melhores pessoas para estarem comigo construindo a minha história. Por vezes fui muito dura comigo e não tenho coragem de tratar jamais alguém como me tratei. E por isso mesmo quero agradecer a mim por não ter desistido de mim.

Agradeço aos órgãos de fomento que possibilitaram este trabalho.

Contei com o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) como bolsista pelo identificador 11819.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“A disciplina precede a espontaneidade.”

(EMMANUEL, 2021, p. 32)

RESUMO

Embora o enxerto ósseo autólogo seja considerado o padrão-ouro nas cirurgias de reconstruções ósseas, seu uso apresenta restrições como a baixa disponibilidade e a necessidade de um segundo sítio cirúrgico para coleta do material. Os dentes são biomateriais com propriedades físicas e químicas muito semelhantes às do osso, sendo que a disponibilidade de dentes bovinos é maior do que a de dentes humanos. Este trabalho teve como objetivo investigar a resposta osteogênica *in vitro* de células-tronco de dentes decíduos esfoliados humanos (SHED) em associação a partículas de dentes bovinos. Para isso, as SHED foram cultivadas por 1, 7, 14 e 21 dias e divididas nos seguintes grupos: Grupo 1: Dente bovino triturado + meio de cultura convencional (MEM α) + SHED; Grupo 2: MEM α + SHED; Grupo 3: Dente bovino triturado + meio de cultura osteogênico (MO) + SHED; Grupo 4: MO + SHED. 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. A detecção da proteína TGF β 1 foi realizada por meio do ensaio imunoenzimático Elisa. Os valores obtidos em triplicata foram submetidos à análise estatística, sendo adotado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Os resultados encontrados nos ensaios de vermelho de alizarina e Elisa seguiram exatamente o mesmo padrão, com maiores valores de absorvância aos 14 dias para o grupo G4 (SHED + meio osteogênico) e aos 21 dias para o grupo G3 (SHED + meio osteogênico + partículas de dente bovino). As SHED, portanto, demonstraram capacidade de deposição de íons cálcio na formação de matriz mineralizada e de expressão de TGF β 1 tanto quando cultivadas exclusivamente em meio osteogênico (G3) quanto em meio osteogênico concomitante à presença de partículas de dente bovino (G4), sendo que nesse último os resultados foram mais expressivos.

Palavras-chave: Dente; Regeneração Óssea; Engenharia Tecidual; Células-tronco.

ABSTRACT

Although autologous bone graft is considered the gold standard in bone reconstruction surgeries, its use has restrictions such as low availability and the need for a second surgical site to collect the material. Teeth are biomaterials with physical and chemical properties very similar to bone, and the availability of bovine teeth is greater than that of human teeth. This work aimed to investigate the in vitro osteogenic response of stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) in association with particles from bovine teeth. For this purpose, SHED were cultivated for 1, 7, 14 and 21 days and divided into the following groups: Group 1: particulate bovine tooth + conventional culture medium (MEM α) + SHED; Group 2: MEM α + SHED; Group 3: particulate bovine tooth + osteogenic culture medium (OM) + SHED; Group 4: MO + SHED. Quantitative and qualitative analysis of calcium ion deposition in the mineralized matrix of SHED was carried out using the alizarin red colorimetric assay. The detection of the TGF β 1 protein was performed using the Elisa immunoenzymatic assay. The values obtained in triplicate were submitted to statistical analysis, adopting a significance level of 5% ($p < 0.05$). The results found in the alizarin red and Elisa assays followed exactly the same pattern, with higher absorbance values at 14 days for the G4 group (SHED + osteogenic medium) and at 21 days for the G3 group (SHED + osteogenic medium + particles of bovine tooth). Therefore, SHED demonstrated the capacity of deposition of calcium ions in the formation of mineralized matrix and expression of TGF β 1 both when cultivated exclusively in osteogenic medium (G3) and in osteogenic medium concomitant with the presence of bovine tooth particles (G4), with more expressive results in the G4.

Keywords: Tooth; Bone Regeneration; Tissue Engineering; Stem Cell.

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Valores de absorvância referentes à capacidade de mineralização das SHED quando cultivadas em meio convencional ou osteogênico, na presença de dentes bovinos particulados ou na ausência de dentes, ao longo do tempo..... 38
- Gráfico 2 - Curva padrão com o TGFβ1 diluído em série fornecido no kit43
- Gráfico 3 - Expressão de TGFβ1 por SHED cultivadas em meio convencional ou osteogênico, na presença de dentes bovinos particulados ou na ausência de dentes, ao longo do tempo..... 44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Plaqueamento de células-tronco e cultivo com partículas de dente bovino	34
Figura 2 -	Procedimento de coloração com vermelho de alizarina.....	35
Figura 3 -	Plaqueamento do Teste Elisa	36
Figura 4 -	Fotomicrografia das SHED, respectivamente, da esquerda para direita, em associação com dente bovino e ausência de dentes, em meio convencional ou osteogênico, após 1 dia de cultivo, posterior à coloração com vermelho de alizarina (aumento 10x)	38
Figura 5 -	Fotomicrografia das SHED, respectivamente, da esquerda para direita, em associação com dente bovino e ausência de dentes, em meio convencional ou osteogênico, após 7 dias de cultivo, posterior à coloração com vermelho de alizarina (aumento 10x)	40
Figura 6 -	Fotomicrografia das SHED, respectivamente, da esquerda para direita, em associação com dente bovino e ausência de dentes, em meio convencional ou osteogênico, após 14 dias de cultivo, posterior à coloração com vermelho de alizarina (aumento 10x)	41
Figura 7 -	Fotomicrografia das SHED, respectivamente, da esquerda para direita, em associação com dente bovino e ausência de dentes, em meio convencional ou osteogênico, após 21 dias de cultivo, posterior à coloração com vermelho de alizarina (aumento 10x)	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentração estimada de TGFb1 (pg/mL) expresso por SHED cultivadas em meio convencional ou osteogênico, na presença de dentes bovinos particulados ou na ausência de dentes, nos períodos de 1, 7, 14 e 21 dias, sendo “CM= concentração mínima ou zero”	43
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ALP	Fosfatase alcalina
BMP	Proteína morfogenética óssea
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta
CBFA1	Fator de transcrição pertencente à família de genes Runt
cDNA	DNA complementar
CO ₂	Gás carbônico
COL1	Colágeno do tipo I
C2C12	Células precursoras mesenquimais pluripotentes
DEPC	Dietil pirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAse	Desoxirribonuclease
DMP1	Fosfoproteína ácida da matriz de dentina 1
DPSCs	Células-tronco da polpa de dentes permanentes
DSPP	Sialofosfoproteína dentinária
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
HDPSC	Células-tronco da polpa de dentes permanentes humanos
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina
MEM α	Meio essencial mínimo modificado alfa
MEPE	Fosfoglicoproteína extracelular da matriz
NaOCl	Hipoclorito de sódio
OCN	Osteocalcina
OPN	Osteopontina

PBS	Tampão fosfato salino
PCNA	Antígeno nuclear celular proliferante
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PDLSCs	Células mesenquimais indiferenciadas derivadas do ligamento periodontal
pH	Potencial hidrogeniônico
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	RNA mensageiro
RT-PCR	Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase
Runx2	Fator de transcrição 2 relacionado à runt
SFB	Soro fetal bovino
SHED	Células-tronco de dentes decíduos esfoliados humanos
TGF-β1	Fatores de crescimento beta 1
TGFβr2	Receptor do fator de crescimento beta tipo 2

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1	CORRELAÇÃO ENTRE A NEOFORMAÇÃO ÓSSEA E OS DEFEITOS ÓSSEOS	23
2.2	TECIDOS DENTÁRIOS COMO POSSÍVEOS BIOMATERIAIS PARA ENXERTIA	24
2.3	ENGENHARIA TECIDUAL	26
2.4	BIOMARCADORES	27
3	OBJETIVOS	30
3.1	OBJETIVO GERAL	30
3.2	OJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
4	MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1	CULTIVO CELULAR	31
4.2	PREPARO DO DENTE BOVINO PARTICULADO E DETERMINAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS	31
4.3	PLAQUEAMENTO DE SHED COM PARTÍCULAS DE DENTE TRITURADO	33
4.4	CAPACIDADE DE MINERALIZAÇÃO DAS SHED PELO ENSAIO VERMELHO DE ALIZARINA.....	34
4.5	EXPRESSÃO DE TGFB1 PELO ENSAIO ELISA.....	35
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
5	RESULTADOS	37
5.1	CAPACIDADE DE MINERALIZAÇÃO DAS SHED PELO ENSAIO VERMELHO DE ALIZARINA.....	37
5.2	EXPRESSÃO DE TGFB1 PELO ENSAIO ELISA.....	42
6	DISCUSSÃO	45

7 CONCLUSÃO	49
REFERÊNCIAS.....	50

1 INTRODUÇÃO

Um dos desafios da Odontologia é proporcionar condições ideais para que ocorra uma eficiente regeneração óssea dos maxilares acometidos por traumatismos, neoplasias, patologias e até mesmo deformidades ósseas congênitas (KOUHESTANI *et al.*, 2018). O enxerto autógeno é considerado o padrão ouro, uma vez que é o único que possui ao mesmo tempo as três propriedades necessárias para a neoformação óssea (osteogênese, osteoindução e osteocondução) (EBRAHIMI *et al.*, 2017; KOUHESTANI *et al.*, 2018). Entretanto, essa forma de terapia apresenta algumas limitações, como quantidade limitada de material a ser enxertado e trauma secundário decorrente da necessidade de um sítio cirúrgico doador. Outra possibilidade de terapia é a utilização de enxerto de banco de ossos (aloenxerto), a qual tem sido questionada devido às altas taxas de reabsorção antes da neoformação óssea e a possibilidade de rejeição e de transmissão de doenças (BOULER *et al.*, 2017).

Visando suprir as deficiências encontradas no uso dessas terapias, diversos biomateriais têm sido desenvolvidos e estudados. Um substituto ósseo considerado ideal precisa atender requisitos como ser de fácil manuseio, de baixo custo, bioabsorvível e biocompatível, possuir semelhança estrutural com o osso, bem como ter uma matriz osteocondutora e fatores osteoindutores, que estimulem a diferenciação de células ósseas para o completo reparo a parti de sua capacidade osteogênica. Contudo, ainda não se tem um material com todas essas características (JORDANA; VISAGE; WEISS, 2017).

Diante da semelhança da histogênese com o osso, o dente se torna um biomaterial a ser cogitado. A dentina tem 20% de matéria orgânica em sua composição, sendo 90% constituídas por colágeno do tipo I e 10% por fatores de crescimento. Dentre estes fatores de crescimento, estão as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), que fazem parte dos fatores de crescimento transformador beta (TGF- β), possuindo propriedades de indução e neoformação óssea (KIM *et al.*, 2013; MURATA *et al.*, 2011).

A presença de biomarcadores fosfoproteína ácida da matriz de dentina 1 (DMP1), fosfoglicoproteína extracelular da matriz (MEPE) e sialofosfoproteína dentinária (DSPP), fosfatase alcalina (ALP), colágeno tipo 1 (COL1), osteocalcina (OCN), osteopontina (OPN) e Runx2 garantem aos dentes características osteogênicas, osteoindutoras e osteocondutoras, como o osso autógeno. Os dentes contêm componentes orgânicos que estimulam a mineralização da matriz extracelular e desencadeiam a osteogênese. Além disso, apresentam propriedade osteoindutoras devido à diversos fatores de crescimento encontrados na dentina e cimento (ARABADZHIEV; MAURER; STEVAO, 2020; CHING *et al.*, 2017; KUNIMATSU *et al.*, 2018).

Apesar de ser um substrato relevante nas pesquisas, o dente humano possui algumas limitações, como a dificuldade de obtenção de dentes livres de cárie e em quantidade suficiente. Como opção, os dentes bovinos apresentam maior disponibilidade e facilidade de obtenção, além de terem superfícies maiores e não serem acometidos por lesões de cárie, fornecendo maior quantidade de material (YASSEN; PLATT; HARA, 2011).

Com o intuito de aperfeiçoar o uso dos biomateriais nos procedimentos de enxertia, pesquisadores têm voltado sua atenção para a engenharia tecidual. Com a integração de células-tronco, biomaterial e sinais morfogenéticos bioindutivos, buscam estimular a adesão, proliferação e diferenciação celular e ainda promover a produção de moléculas específicas do tecido-alvo. 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 terapia clínica. Estudos recentes buscaram avaliar a resposta de diferentes linhagens de células-tronco frente a substitutos ósseos (LOBO *et al.*, 2015; MOTAMEDIAN; KHOJASTE; KHOJASTEH, 2016).

Contudo, não há estudos que avaliam o potencial osteogênico das células-tronco de dentes decíduos esfoliados humanos (SHED) associadas a dentes bovinos particulados. Desta forma, o presente estudo mostra-se pertinente à medida que busca investigar alternativas viáveis em engenharia de tecido ósseo.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CORRELAÇÃO ENTRE A NEOFORMAÇÃO ÓSSEA E OS DEFEITOS ÓSSEOS

Por vezes o cirurgião-dentista precisa intervir em situações para prover ao paciente volume ósseo e melhorar a integração e/ou neoformação óssea. Uma constante intercorrência são os defeitos ósseos por exemplo. Estes possuem necessidade de reparação por questões como tempo natural de cicatrização lento e conseqüente deficiência na modelação óssea, e são recorrentes na Odontologia por apresentarem causas diversas, como extração dentária, doença periodontal, traumas, patologias e outros (SCULEAN; STAVROPOULOS; BOSSHARDT, 2019).

A extração dentária, por exemplo, que é comum na rotina do cirurgião-dentista, gera um defeito ósseo e pode necessitar de reparos. Estudos mostram que a cicatrização da cortical óssea em 6 meses é de aproximadamente 60%, alcançando 80% de cicatrização após 12 meses, sendo que após 15 meses de extração, alguns alvéolos ainda não alcançaram uma cicatrização completa (AHN; SHIN, 2008; FERRAROTTI *et al.*, 2018).

Dentre as opções de tratamentos voltados para a neoformação, tem-se a enxertia óssea autógena, opção muito utilizada pela implantodontia e cirurgia bucomaxilofacial, a qual utiliza blocos de osso removidos da sínfise mandibular e do ramo da mandíbula. Estas áreas conseguem fornecer uma quantidade de osso satisfatória para atender a maior parte dos casos (SCULEAN; STAVROPOULOS; BOSSHARDT, 2019). Entretanto, quanto à cicatrização pós-operatória das áreas doadoras, WEIBULL *et al.* (2009) mostraram em seu estudo que estas áreas, em 46 pacientes que tiveram remoção de blocos de 1,7 mm², tiveram uma mineralização maior que 75% em 4-6 meses. Contudo, 93% dos locais apresentaram defeitos ósseos, as quais tinham uma clara concavidade por observação direta em 62% dos casos.

Outra intercorrência recorrente ao cirurgião dentista que necessita de reparo ósseo são as lesões císticas, que apesar do seu alto potencial

regenerativo em maxila, na mandíbula se mostra menos eficiente diante da provisão de espaço, em especial para cistos maiores que 2 cm e/ou quando afeta corticais vestibulares e linguais, e a capacidade de estabilidade da ferida (SCULEAN; STAVROPOULOS; BOSSHARDT, 2019). Estudos de Hren e Miljavec (2008) mostram a remoção de 33 cistos mandibulares que, quando possuíam de 2 a 3 cm de diâmetro, tiveram uma remodelação de 97% em 1 ano de acompanhamento. Contudo, quando estas lesões possuíam diâmetro de 3 a 5 cm, a remodelação foi de 84% no mesmo período pós-operatório.

Um tratamento adequado e eficiente para correção de defeitos ósseos se torna pré-requisito na busca de estratégias regenerativas intra-orais (SCULEAN; STAVROPOULOS; BOSSHARDT, 2019). Busca-se encontrar um substituto ósseo que apresente características consideradas ideais como as citadas anteriormente (JORDANA; VISAGE; WEISS, 2017).

2.2 TECIDOS DENTÁRIOS COMO POSSÍVEOS BIOMATERIAIS PARA ENXERTIA

O tratamento considerado padrão ouro para a correção de defeitos ósseos é o enxerto ósseo autógeno, mas a quantidade disponível de osso, trauma local, aumento do tempo cirúrgico e reabsorção pós enxertia demonstram a necessidade de um biomaterial mais adequado. Desta forma, com base no potencial de osteocondução e osteoindução mediada pelos fatores de crescimento presentes em um dente, além da histogênese semelhante ao osso, o dente se torna um biomaterial a ser cogitado (EBRAHIMI *et al.*, 2017; KOUHESTANI *et al.*, 2018).

O dente passa por intensa atividade de diferenciação que, por vezes, é semelhante ao desenvolvimento ósseo e, se estimulado, poderá gerar os mesmos benefícios. O órgão dental é composto por tecidos duros (esmalte, dentina e cemento) e tecido mole (polpa) e envolto em um estrato fibrocelular que forma o ligamento periodontal. Estes tecidos vêm da diferenciação celular dos ameloblastos, em epitélio interno do esmalte e em odontoblastos, da diferenciação da polpa por células-tronco mesenquimais, enquanto as células do

folículo dental diferenciam-se em cementoblastos, cementócitos, fibroblastos, osteoblastos e osteócitos (MORSCZECK; REICHERT, 2018). Os tecidos dentários são ricos em matéria orgânica, além de possuírem diversos biomarcadores. Estes biomarcadores, tais como OCN, DMP1, DSPP, COL1, desencadeiam a osteogênese, enfatizados pela OPN, estimulam a mineralização da matriz extracelular. Os dentes ainda possuem boa característica osteocondutora pela presença da proteína morfogenética óssea (BMP) e pelos fatores de crescimento encontrados em dentina e cimento. Destacam-se o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), o fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e o fator de crescimento transformador beta (TGF- β) (ARABADZHIEV; MAURER; STEVAO, 2020).

Arabadzhiev, Maures e Stevao (2020) utilizaram dente humano particulado para auxiliar no reparo ósseo de cavidades císticas nas regiões dos dentes 22 e 23, 12 e 13. Inicialmente, os dentes 18 e 28 foram removidos e, com ajuda de martelo cirúrgico e triturador de osso, foram quebrados e particulados. No mesmo momento cirúrgico, os dentes particulados foram inseridos na cavidade onde estavam os cistos, sendo que os dentes envolvidos nas lesões císticas (12, 13, 22 e 23) foram previamente tratados endodonticamente e, durante o processo cirúrgico, sofreram apicectomia. Os autores observaram clínica e radiograficamente sucesso na regeneração óssea, com cicatrização adequada e sem defeito ósseo no período de 6 meses.

Apesar de ser um substrato relevante nas pesquisas, o dente humano possui algumas limitações, como a dificuldade de obtenção e, em especial, dentes sadios que forneçam uma adequada quantidade de material, uma vez que as extrações diversas vezes estão associadas com extensas lesões de cáries. A dificuldade de se conseguir dentes que estejam em condições de coleta, preservação e tempo de vida adequados e dentro das condições ideais de uso como biomaterial são fatores que podem implicar numa variação de resultados não desejada. Como opção, os dentes bovinos e suínos apresentam uma maior disponibilidade e facilidade de obtenção. Eles são dentes de superfícies maiores e não são acometidos por lesões cariosas, fornecendo maior quantidade de material (YASSEN; PLATT; HARA, 2011).

O dente bovino possui uma semelhança estrutural com o dente humano. De acordo com a revisão sistemática de Yassen, Platt e Hara (2011), análises bioquímicas não demonstraram diferenças na composição química e em suas reações, como a desmineralização e remineralização, captação de flúor ou resposta à índices de pH. Contudo, diferenças nos componentes estruturais são apontados, como a diferença do peso molecular entre dentes humanos e bovinos, onde as partículas de dente bovino são mais pesadas e apresentam maior quantidade de túbulos dentinários, apesar de não demonstrarem diferença em diâmetro, demonstrando ser um dente mais inervado e mais nutrido.

2.3 ENGENHARIA TECIDUAL

Células-tronco são espécies celulares com capacidade clonogênica e de autorrenovação e sua descoberta permitiu um importante progresso na medicina regenerativa pela sua capacidade de diferenciação celular ampla. As células-tronco classificam-se em três diferentes tipos, conforme sua capacidade de diferenciação: totipotentes (capazes de se diferenciar em todos os tecidos que formam o corpo humano, incluindo a placenta e anexos embrionários), pluripotentes (ou embrionárias, capazes de transformar-se em qualquer tipo celular de um indivíduo adulto) e multipotentes (adultas ou pós-natais, são menos versáteis que as embrionárias e, em geral, diferenciam-se em células do tecido que as originou) (SAEZ *et al.*, 2019; WAGERS; WEISSMAN, 2004).

As células-tronco embrionárias têm o maior potencial de diferenciação. Contudo, as questões éticas associadas a pesquisas com estas células fazem com que as células-tronco pós-natais sejam as mais viáveis. Essas células, que têm duas características importantes de autorrenovação e grande capacidade de diferenciação, já foram identificadas em diversos tecidos do corpo humano, tais como medula óssea, tecido adiposo, tecido neural e até o tecido dental (SAEZ *et al.*, 2019).

Apesar da grande atividade mitótica das células-tronco do epitélio do esmalte durante sua formação, após a erupção dentária estas não ficarão mais disponíveis (MORSCZECK; REICHERT, 2018). Já a polpa dentária possui

células-tronco derivadas da crista neural. As células-tronco da polpa de dentes permanentes, também conhecidas como DPSCs (Dental Pulp Stem Cells), possuem características multipotentes de diferenciação e grande capacidade de se diferenciarem em odontoblastos, tornando-se uma valiosa alternativa para o futuro da odontologia regenerativa. Contudo, o potencial regenerador dos tecidos dentais depende da capacidade de autorrenovação e de diferenciação destas células-tronco, cuja viabilidade diminui ao longo da vida durante o processo de envelhecimento. Além disso, a câmara pulpar se torna diminuída pela deposição de material mineralizado e conseqüentemente há diminuição do suprimento sanguíneo, celular e nervoso (GOSAU *et al.*, 2013; MEGUID *et al.*, 2018; MORSCZECK; REICHERT, 2017).

Existem também as células-tronco oriundas de dentes decíduos esfoliados, também conhecidas como SHED (Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth). As SHED possuem uma maior capacidade proliferativa e de diferenciação, possibilitando a formação de odontoblastos funcionais, além de terem capacidade de se transformar em adipócitos e células neurais. Quando transplantadas *in vitro*, estimulam a osteogênese pela diferenciação em osteoblastos (GOSAU *et al.*, 2013; SOARES *et al.*, 2007).

Cultivar células tronco da polpa de dentes decíduos humanos esfoliados junto a dentes bovinos demonstrará o potencial de indução osteogênico deste possível biomaterial. Esta diferenciação odontogênica e osteogênica das células-tronco originárias dos dentes, tanto decíduos quanto permanentes, tem sido avaliada pela presença de biomarcadores, que são variáveis bioquímicas, inflamatórias e genéticas que se relacionam com a atividade ou remissão de um determinado processo pelo organismo (CHING *et al.*, 2017; SCHRIEFER; CARVALHO, 2008).

2.4 BIOMARCADORES

A capacidade odontogênica das células-tronco de dentes, em especial as SHED, está relacionada aos biomarcadores fosfoproteína ácida da matriz de dentina 1 (DMP1), fosfoglicoproteína extracelular da matriz (MEPE) e

sialofosfoproteína dentinária (DSPP), enquanto a capacidade osteogênica tem maior relação com os biomarcadores fosfatase alcalina (ALP), colágeno tipo 1 (COI1), osteocalcina (OCN), osteopontina (OPN) e Runx2 (CHING *et al.*, 2017; KUNIMATSU *et al.*, 2018).

Quanto aos biomarcadores osteogênicos, ALP é uma proteína com expressão na mineralização da matriz extracelular e tem significativa importância na formação óssea como marcador onipresente de diferentes linhagens osteogênicas, expressas com intensa ativação junto com a expressão de RNAm, o que resulta em progressiva diferenciação osteoblástica. Além disso, ALP é também uma ectoenzima que aparece como biomarcador para renovação óssea, pela degradação de pirofosfato inorgânico e sucessiva liberação de fosfato na fase de citodiferenciação para mineralização (CHING *et al.*, 2017).

O Col1, por sua vez, é um elemento que está presente no processo ósseo pelo seu papel na adesão celular e proliferação e diferenciação do fenótipo osteoblástico pela conexão com outras proteínas da matriz extracelular do osso. A OCN é um biomarcador encontrado em ossos e dentina e sua produção é restrita a células com capacidade de mineralização, como osteoblastos, odontoblastos e osteócitos. Ela está presente no processo de maturação osteogênica, regulando a formação de nódulos minerais e a mineralização do tecido duro. O OPN, por fim, é uma glicoproteína adesiva encontrada amplamente no organismo pelas suas diversas funções. Ela induz eventos como divisão celular, adesão celular, quimiotaxia e citodiferenciação (CHING *et al.*, 2017).

Já a Runx2 é o fator de transcrição mais avançado e regulador essencial para a transcrição de osteoblastos (KAWANE *et al.* 2018). Também tem sua associação com o desenvolvimento adequado das funções do sistema estomatognático. Estudos relacionam a falha na transcrição de Runx2 intimamente associada com mal desenvolvimento dentário como sua associação a dentes supranumerários ou com displasia cleidocraniana (MA *et al.* 2018; XIN *et al.* 2020; JÄRVINEN *et al.* 2018).

A Runx2 é o fator de transcrição intimamente ligado com a ativação do fator de crescimento TGF β 1. Este fator de crescimento aparece relacionado a

diferenciação de células-tronco mesenquimais em células ósseas. Doses de TGF β 1 aparecem correlacionadas também com o aumento da matriz mineralizada durante a diferenciação óssea (ELSAVADI *et al.* 2018). O TGF β 1 aparece ainda presente da histogênese dentária, responsável pela mineralização de e maturação do esmalte através da modulação do Runx2 (LIU *et al.* 2019).

A engenharia tecidual está em evidência e é uma promissora alternativa para a regeneração óssea. Baseada nos estudos com células-tronco para regeneração de tecidos e órgãos, a regeneração de tecidos dentais, de suporte dental ou mesmo a possibilidade de se produzir um novo órgão inteiro *in vitro*, constituem uma alternativa para o tratamento endodôntico e periodontal, inclusive com a regeneração de defeitos ósseos (MEGUID *et al.*, 2018).

Assim sendo, o intuito deste trabalho foi propor a utilização de partículas de dentes bovinos triturados, utilizados como biomaterial estimulador de SHED, uma vez que as qualidades osteoindutoras e osteocondutoras de dentes já foram relatadas na literatura, mas sua eficácia como estímulo para a formação e reparação óssea a partir de células-tronco ainda precisa ser comprovada.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho é avaliar o potencial osteogênico de SHED quando cultivadas em diferentes meios de cultura (convencional e osteogênico) na presença de partículas de dentes bovinos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos foram:

- a) Determinar quantitativa e qualitativamente a deposição de íons cálcio na formação de matriz mineralizada pelas SHED, por meio do ensaio colorimétrico com vermelho de alizarina;
- b) Analisar a expressão de TGF β 1 por SHED, por meio da técnica de ELISA.

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), CAAE: 88330218.6.0000.5417 (2018), imediatamente após aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da instituição, mantidas em meio de cultura Meio Essencial Mínimo Modificado Alfa (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 trocado a cada dois dias. Para todos os experimentos, as SHED foram utilizadas entre a 8^a e 10^a passagem.

4.2 PREPARO DO DENTE BOVINO PARTICULADO E DETERMINAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram utilizadas partículas de dentes bovinos triturados, obtidos pela doação de matadouros no município de Alfenas - MG. Os dentes tiveram quaisquer remanescentes de tecido mole removidos com lâmina de bisturi nº 15 e após isso, foi feita sua trituração com triturador de dentina. As porções de dentes triturados foram peneiradas em agitador eletromagnético para peneiras (Tamis) (Bertel Indústrias Metalúrgicas toda Ltda. Caieiras-SP, Brasil) na medida de vibração correspondente a 5 durante 15 minutos com peneiras (Tamis) redondas para análises granulométricas (Bertel Indústrias Metalúrgicas Ltda. Caieiras-SP, Brasil) na granulação de 1,7 mm.

Para esterilização das partículas dentais foi utilizado o protocolo de ácido peracético, uma composição de ácido acético e peróxido de hidrogênio utilizado

comumente para esterilização química nas áreas médicas e odontológicas por caracterizar um subproduto biocompatível (RAIMUNDO *et al.* 2015), com neutralização do ácido em PBS, uma solução tampão salina que é composta por cloreto de sódio, sódio fosfato e fosfato de potássio, que equilibra a acidez e concentração do sal em torno das células (MARTIN *et al.*, 2006). As partículas dentais foram esterilizadas, então, primeiramente em ácido peracético 0,2% e colocadas sob o agitador durante 25 minutos em velocidade alta. Após, foram lavados em PBS abundantemente, novamente foram lavados em ácido peracético 0,2% também de forma abundante e foram imersos em PBS, sob agitação, por 5 minutos. Depois destas etapas, foram transferidos para imersão em concentração decrescente de álcool (100%, 90%, 80% e 70%) sob agitação por 20 minutos. As porções foram mantidas em PBS por 24 horas e, então, colocadas em cultivo com as células-tronco nos diferentes grupos.

Os grupos foram determinados de acordo com a presença ou ausência das partículas de dentes triturados e os diferentes meios de cultura, MEM α ou meio osteogênico (Osteogenic Differentiation Medium, Lonza Group Ltda., Basel, SWZ), conforme se segue:

- Grupo 1: Dente bovino triturado + meio de cultura convencional (MEM α) + SHED;
- Grupo 2: Meio de cultura convencional (MEM α) + SHED;
- Grupo 3: Dente bovino triturado + meio de cultura osteogênico + SHED;
- Grupo 4: Meio de cultura osteogênico + SHED;

Para o ensaio vermelho de alizarina, dois grupos foram criados para garantir a ausência de falso-positivo por dissociação de material dentinário quando imerso e cultivado nos períodos selecionados:

- Grupo x: Dente bovino triturado + meio de cultura convencional (MEM α);
- Grupo y: Dente bovino triturado + meio de cultura osteogênico;

Para facilitar a identificação, os grupos foram legendados no decorrer do trabalho com abreviatura e ilustração como exposto a seguir:

- Grupo 1: G1 - 
- Grupo 2: G2 - 
- Grupo 3: G3 - 
- Grupo 4: G4 - 

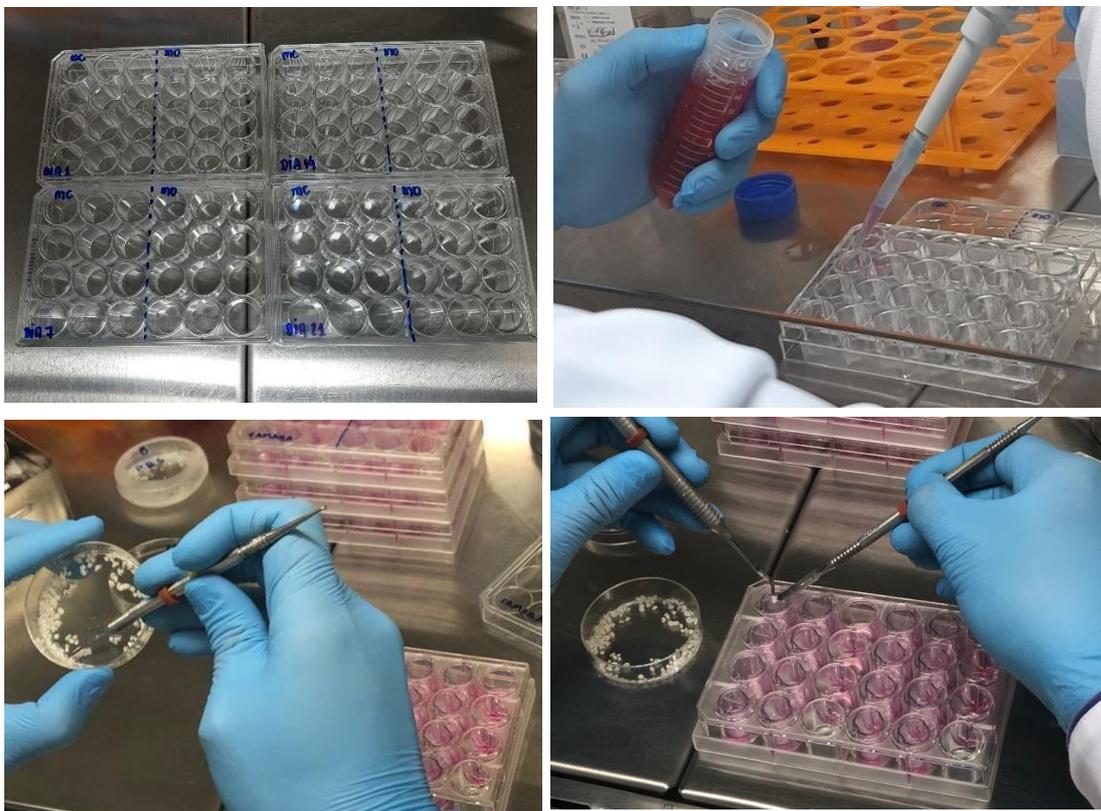
Onde:

- Dente bovino: 
- Meio de cultura convencional: 
- Meio de cultura osteogênico: 
- SHED: 

4.3 PLAQUEAMENTO DE SHED COM PARTÍCULAS DE DENTE TRITURADO

Foram utilizadas 8 placas de 24 poços para plaqueamento. Através de duas contagens em microscópio invertido de 10 μL da suspensão celular com o corante Azul de Trypan, garantiu-se que em 500 μL de meio de cultura MEM α tivesse $2,5 \times 10^4$ SHED para serem levados aos poços necessários. As células foram incubadas a 37°C e 5% de CO₂ durante a noite para se aderirem ao fundo dos poços. No dia seguinte, após conferir no microscópio a adesão celular ao fundo do poço da placa, o meio foi trocado de acordo com os grupos experimentais. Assim, os grupos G1, G2 e Gx receberam meio convencional enquanto os grupos G3, G4 e Gy receberam meio osteogênico. Neste mesmo dia, partículas de dente triturado no volume de 2,5 mgmm³ foram colocadas em insertos individuais e estes posicionados em cada poço, ficando assim as partículas banhadas pelo meio de cultura, mas sem tocar nas células localizadas no fundo do poço. Para garantir que os insertos estariam sendo banhados em meio e as partículas dentais seriam cobertas por meio de cultura, foi colocado sempre 400 μL de meio no poço e 100 μL diretamente no inserto. As células foram cultivadas durante 1, 7, 14 e 21 dias, sendo os meios trocados a cada dois dias. Os grupos foram plaqueados em triplicata. O Processo de plaqueamento e cultivo de células com partículas de dente bovino está exemplificado na figura 1.

Figura 1 – Plaqueamento de células-tronco e cultivo com partículas de dente bovino.



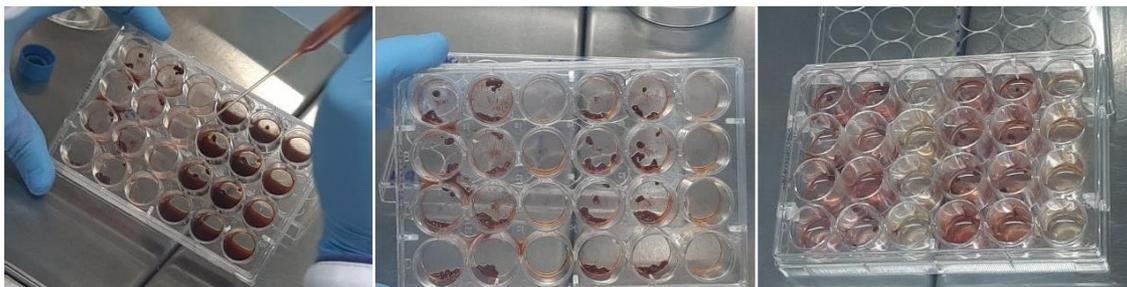
Fonte: Autora

4.4 CAPACIDADE DE MINERALIZAÇÃO DAS SHED PELO ENSAIO 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 PBS e as células 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.

Para a análise quantitativa, foram adicionados 280 μL de ácido acético a 10% por poço sob agitação por 30 minutos. Cem μL do conteúdo dos poços foram transferidos para uma placa de 96 poços, e a absorbância foi medida em espectrofotômetro com comprimento de onda de 405 nm. O processo pode ser visualizado na Figura 2.

Figura 2 – Procedimento de coloração com vermelho de alizarina



Fonte: Autora

4.5) Expressão de TGF β 1 pelo ensaio ELISA

Para quantificar o TGF β 1, foi utilizado um kit de ELISA (Quantikine; R&D Systems, Minneapolis, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Uma exemplificação pode ser vista na Figura 3.

Uma curva padrão foi criada com o TGF β 1 diluído em série fornecido no kit. A densidade óptica foi determinada imediatamente usando um espectrofotômetro de 450 nm e mais uma leitura de 570 nm para determinação de gráfico de ELISA. Os dados foram linearizados plotando o log das concentrações de TGF β 1 versus o log da densidade óptica (450-570nm). As concentrações de TGF β 1 foram determinadas por regressão linear. Cada amostra foi analisada em triplicata.

Figura 3 – Plaqueamento do Teste Elisa



Fonte: Autora

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após a coleta dos dados, os resultados foram analisados através do programa “R Statistical Software”. Os valores obtidos em triplicata foram analisados pelo método ANOVA a 2 critérios, seguido pelo teste de Tukey. Foi adotado nível de significância de 5%.

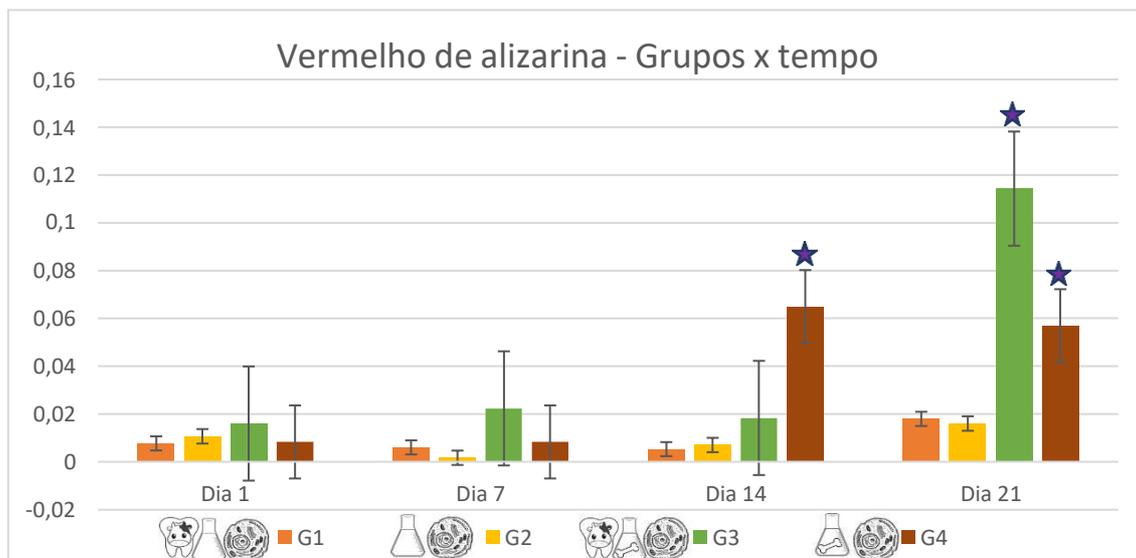
5 RESULTADOS

5.1 CAPACIDADE DE MINERALIZAÇÃO DAS SHED PELO ENSAIO VERMELHO DE ALIZARINA

Em cada um dos períodos experimentais, as médias dos valores de absorvância de dos grupos foram comparadas. Observou-se que, nos dias 1 e 7, não houve diferença estatística entre as médias dos valores de absorvância dos grupos G1, G2, G3 e G4. No dia 14, a média dos valores de absorvância de G4 foi estatisticamente maior do aquelas de G1, G2 e G3, não havendo diferenças entre estas. No dia 21, a média dos valores de absorvância de G3 foi estatisticamente superior àquelas de G4, G2 e G1. Além disso, a média dos valores de absorvância de G4 foi estatisticamente superior àquela de G1 e G2. Nesse período, não foi observada diferença estatística entre as médias dos valores de absorvância de G1 e G2.

Na análise de cada grupo ao longo do tempo, observou-se que tanto para G1 como para G2 não houve diferença estatística na média dos valores de absorvância entre os dias 1, 7, 14 e 21. Para G3, a média dos valores de absorvância do dia 21 foi estatisticamente superior àquelas observadas nos dias 1, 7 e 14 dias, sem diferenças estatísticas entre estas. Por fim, para o G4, a média dos valores de absorvância dos dias 14 e 21 foram estatisticamente superiores àquelas observadas para os dias 1 e 7, não havendo diferenças entre as médias dos dias 1 e 7 e nem entre as médias dos dias 14 e 21.

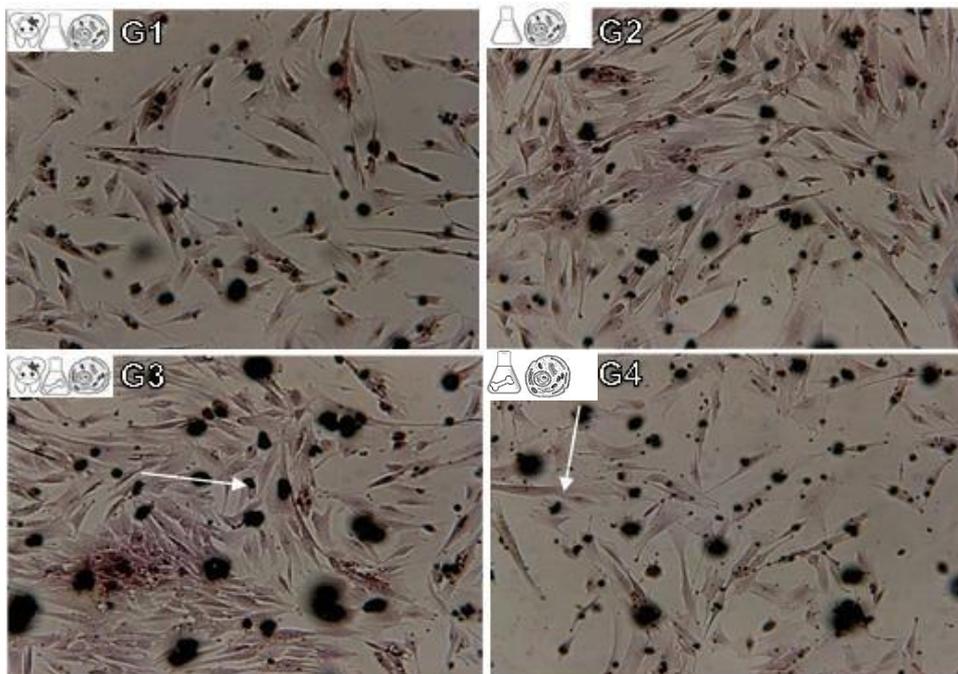
Gráfico 1 – Valores de absorvância referentes à capacidade de mineralização das SHED quando cultivadas em meio convencional ou osteogênico, na presença de dentes bovinos particulados ou na ausência de dentes, ao longo do tempo



Fonte: Autora.

A análise qualitativa da deposição de cálcio na formação de matriz mineralizada das SHED mostrou que no dia 1, G1, G2 e G4 não apresentaram focos de mineralização aparentes, enquanto observou-se uma coloração mais avermelhada em pequenas áreas de G3 (Figura 4).

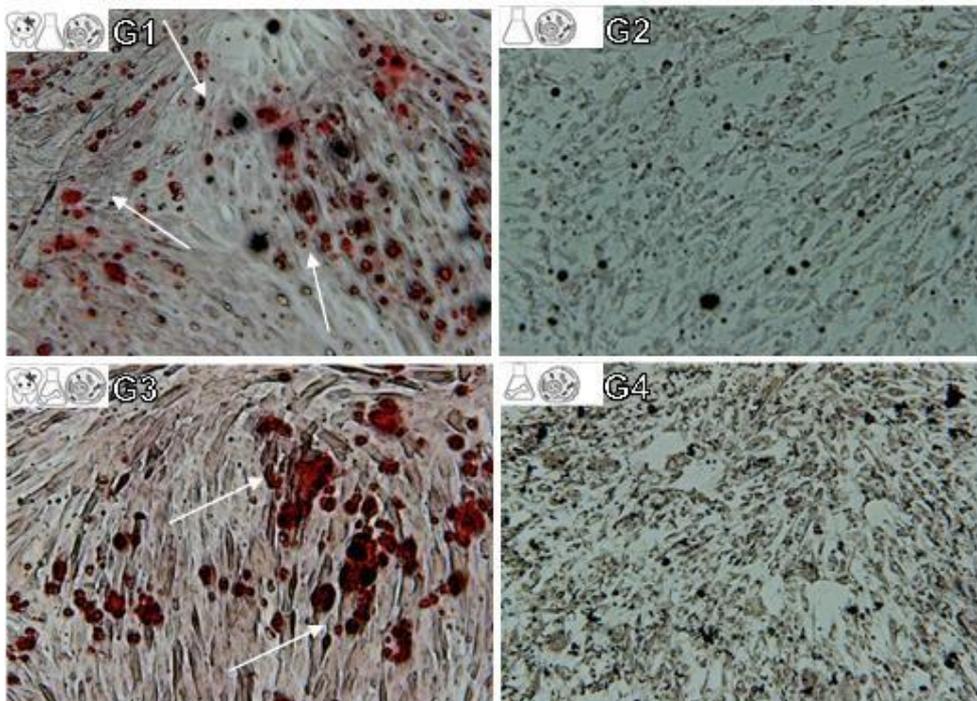
Figura 4 – Fotomicrografia das SHED, respectivamente, da esquerda para direita, em associação com dente bovino e ausência de dentes, em meio convencional ou osteogênico, após 1 dia de cultivo, posterior à coloração com vermelho de alizarina (aumento 10x)



Fonte: Autora.

No dia 7, observou-se o início dos focos de mineralização em G1 e G3, mas não em G2 e G4 (Figura 5).

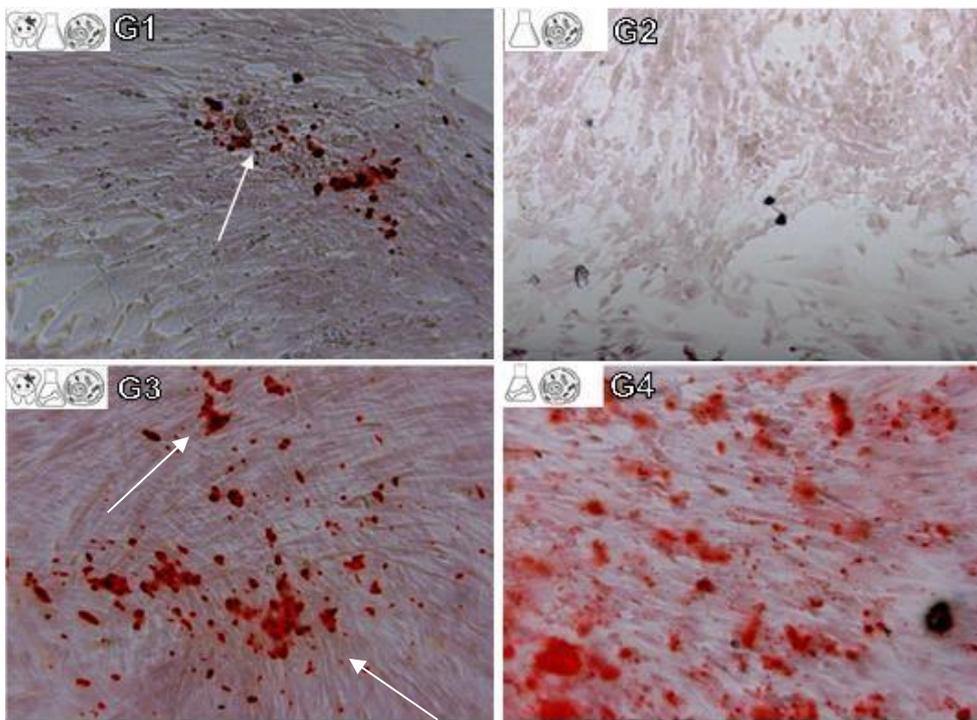
Figura 5 – Fotomicrografia das SHED, respectivamente, da esquerda para direita, em associação com dente bovino e ausência de dentes, em meio convencional ou osteogênico, após 7 dias de cultivo, posterior à coloração com vermelho de alizarina (aumento 10x)



Fonte: Autora.

Aos 14 dias, focos de mineralização foram observados em ordem crescente em G1, G3 e G4, mas não em G2 (Figura 6).

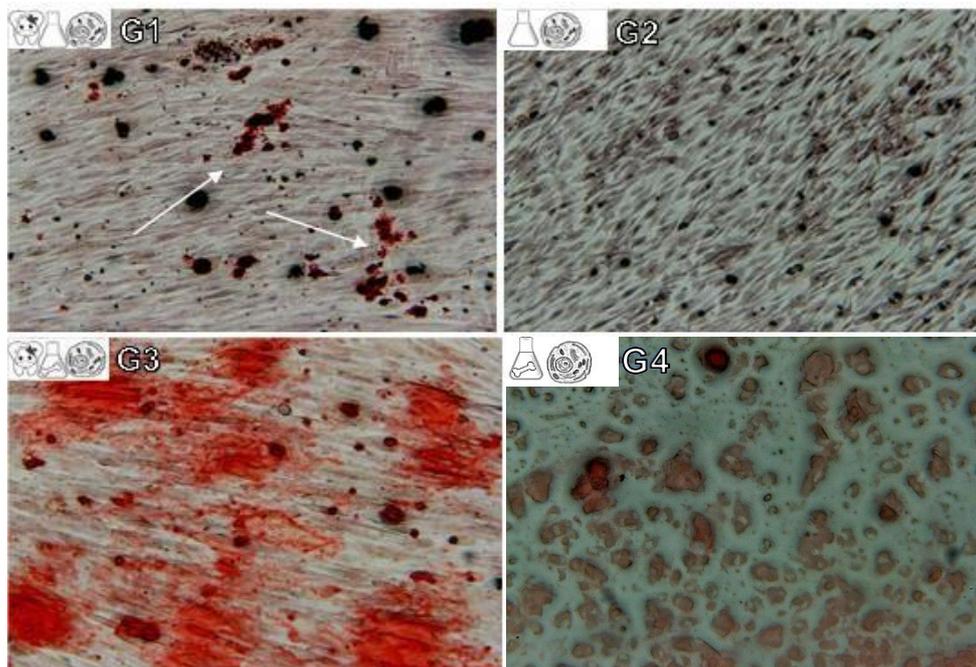
Figura 6 – Fotomicrografia das SHED, respectivamente, da esquerda para direita, em associação com dente bovino e ausência de dentes, em meio convencional ou osteogênico, após 14 dias de cultivo, posterior à coloração com vermelho de alizarina (aumento 10x)



Fonte: Autora.

Aos 21 dias, foram observados focos de mineralização em ordem crescente em G1, G4 e G3, mas não em G2, sendo que em G3 houve uma intensa produção de mineral (Figura 7).

Figura 7 – Fotomicrografia das SHED, respectivamente, da esquerda para direita, em associação com dente bovino e ausência de dentes, em meio convencional ou osteogênico, após 21 dias de cultivo, posterior à coloração com vermelho de alizarina (aumento 10x) (

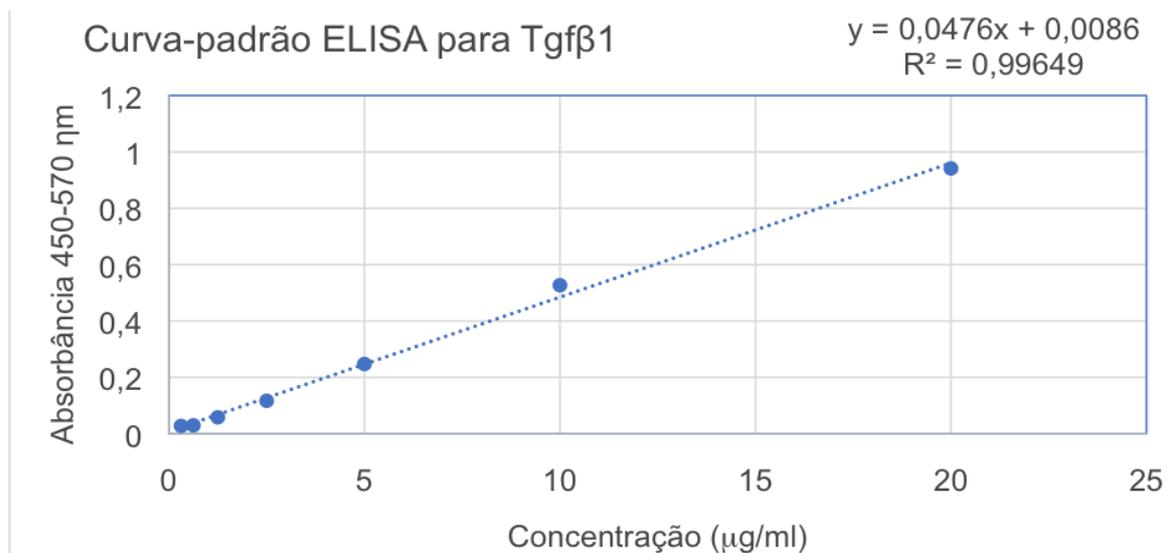


Fonte: Autora.

5.2 EXPRESSÃO DE TGFB1 PELO ENSAIO ELISA

O gráfico 2 demonstra uma curva padrão com o TGF β 1 diluído em série fornecido no kit.

Gráfico 2 – Curva padrão com o TGFβ1 diluído em série fornecido no kit.



Fonte: Autora.

A tabela 1 apresenta as concentrações estimadas de TGFb1 em cada grupo, calculadas por regressão linear ($y = ax + b$), onde x é a concentração estimada de TGFb1, y é a densidade ótica, $a = 0,0476$ e $b = 0,0086$. A curva padrão apresentou ótima linearidade e reprodutibilidade, com $R^2 = 0,99649$, indicando ótima correlação entre as variáveis analisadas.

Tabela 1 – Concentração estimada de TGFb1 (pg/mL) expresso por SHED cultivadas em meio convencional ou osteogênico, na presença de dentes bovinos particulados ou na ausência de dentes, nos períodos de 1, 7, 14 e 21 dias, sendo “CM = concentração mínima ou zero”.

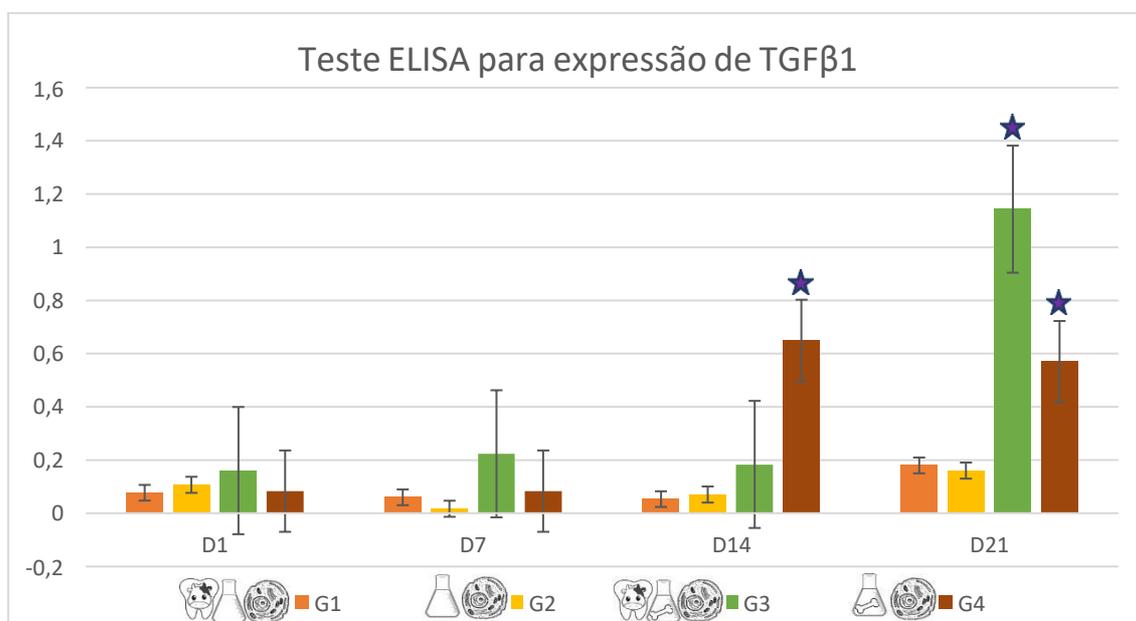
	D1	D7	D14	D21
G1	CM	CM	CM	0,197479
G2	0,043417	CM	CM	0,155462
G3	0,155462	0,288515	0,204482	2,221288
G4	CM	CM	1,184874	1,016807

Fonte: Autora

Nos dias 1 e 7, não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores médios de absorvância (expressão de TGF β 1) dos grupos G1, G2, G3 e G4. No dia 14, a expressão de TGF β 1 foi significativamente maior em G4 do que em G3, G2 e G1, sem diferença significativa entre estes. Aos 21 dias, a expressão de TGF β 1 foi significativamente maior em G3 do que em G4, G1 e G2. Além disso, a expressão de TGF β 1 foi significativamente maior em G4 do que em G1 e G2. Não houve diferença estatisticamente significativa entre a expressão de TGF β 1 em G1 e G2 (Gráfico 3).

Em relação aos grupos, não foi constatada diferença estatisticamente significativa entre os valores de absorvância ao longo do tempo (1, 7, 14 e 21 dias) em G1 e G2. Para G3, a média dos valores de absorvância foi significativamente maior aos 21 dias do que a 1, 7 e 14 dias, sem diferença significativa entre estas. Por fim, para G4, a média dos valores de absorvância foi significativamente maior nos dias 14 e 21 do que nos dias 1 e 7. Não houve diferença significativa entre os valores médios de absorvância aos 14 e 21 dias, assim como ao 1º e 7º dias (Gráfico 3).

Gráfico 3 – Expressão de TGF β 1 por SHED cultivadas em meio convencional ou osteogênico, na presença de dentes bovinos particulados ou na ausência de dentes, ao longo do tempo.



Fonte: Autora.

6 DISCUSSÃO

A ocorrência de defeitos ósseos pós-extração cirúrgica é uma realidade desafiadora na Odontologia e reflete em dificuldades para áreas como Implantodontia, Ortodontia ou quaisquer que sejam as necessidades reabilitadoras. Com o desenvolvimento da engenharia de tecidos, tem surgido a possibilidade da utilização dessa ferramenta como alternativa para o aprimoramento das terapias de enxertia óssea. O uso de células-tronco de origem dentária, como as SHED, as quais são capazes de se diferenciarem em osteoblastos, surgem como uma possibilidade de acrescentar a propriedade osteogênica a biomateriais comprovadamente osteoindutores e osteocondutores como os dentes. (ZHAI *et al.*, 2019).

A proposta do uso de dentes como um biomaterial para a enxertia autógena tem sido relevante, ainda mais quando se analisam as composições estruturais semelhantes entre dente e osso, uma vez que ambos são constituídos, em peso, por 30% de colágeno, 60% de hidroxiapatita e 10% de fluido corporal, além de apresentarem capacidade osteoindutora, osteocondutora e remodeladora (CALVO-GUIRADO *et al.*, 2018; KIM; KIM; LIM, 2001; KIM; KIM; YUN, 2014; ZHAI *et al.*, 2019;).

Os resultados desta pesquisa sugerem a capacidade de diferenciação das SHED em células produtoras de tecido mineralizado quando corretamente estimuladas, demonstrando que o uso de SHED associado a partículas de dente bovino e meio osteogênico pode ser uma terapia promissora para a enxertia. Os dentes particulados, isoladamente ou associados ao meio osteogênico, demonstraram ser indutores do potencial osteogênico das SHED principalmente a partir do 14º dia. Esses dados corroboram aqueles encontrados por Viale-Bouroncle e colaboradores, em 2012, quando testaram a mineralização de células-tronco pós-natais oriundas de tecidos dentais, inclusive SHED, cultivadas por 7 dias em meio convencional e osteogênico, fixadas e analisadas em 24h e 72h. Estes autores demonstraram que as células-tronco pós-natais têm maior predisposição para se diferenciar em células específicas, sendo as SHED altamente propensas a diferenciarem-se em células osteoblásticas,

principalmente após um período mais longo de cultivo e em meio osteogênico, onde a produção mineral foi bem mais evidenciada pelo vermelho de alizarina.

Por meio da análise quantitativa do ensaio vermelho de alizarina e melhor evidenciado na análise qualitativa das fotomicrografias, observou-se no presente estudo aumento da mineralização nos grupos contendo partículas de dente bovino e meio osteogênico ao longo do período, principalmente a partir de 14 dias. Não foi observada a produção de mineral pelas SHED cultivadas em meio de cultura MEM α sem qualquer estímulo ao longo de todo o período. Xu *et al.* (2018) também encontraram resultados semelhantes, com aumento de mineralização intensificada a partir de 14 dias, em um estudo *in vivo* em que foram realizadas enxertias em seios maxilares de coelhos com osso bovino liofilizado (Bio-oss) e dente humano particulado. No grupo com Bio-Oss, não foi demonstrada regeneração óssea significativa maior em 8 semanas em comparação com 2 semanas. Já para o grupo em que foi utilizado o dente humano particulado, a regeneração óssea foi significativamente maior em 8 semanas do que em 2 semanas.

Em relação à expressão de TGF β 1, as SHED, quando em contato com partículas de dentes e/ou cultivadas em meio osteogênico, concomitante ou não, tiveram um aumento progressivo de sua expressão a partir de 7 dias, com pico da concentração de TGF β 1 aos 21 dias para o grupo contendo SHED estimuladas por dente bovino e meio osteogênico e aos 14 dias, em menor proporção, para o grupo contendo SHED estimuladas apenas por meio osteogênico, sem diferença estaticamente significativa para a concentração de TGF β 1 encontrada aos 21 dias. Para as células cultivadas apenas em meio MEM α , a expressão de TGF β 1 foi praticamente inexpressiva em todos os períodos. Takata e colaboradores, em 1998, já haviam demonstrado a influência causada por subprodutos de dentina oriunda de dentes bovinos a partir do cultivo, em meio MEM α , de células osteoprogenitoras de camundongos em dentina durante 7 dias. Neste período, foi demonstrado que as células apenas em contato com os subprodutos dentinários suprimiram sua proliferação e alteraram sua morfologia de células cuboidais para fibroblásticas fusiformes, além de alterar os marcadores presentes, diminuindo a expressão de RNAm para osteocalcina e sialoproteína óssea e aumentando a de RNAm para

osteopontina, além de também demonstrar aumento na presença de TGF- β . Com estes resultados, os pesquisadores sugeriram que as proteínas presentes na dentina bovina têm grande influência na regeneração, desenvolvimento e remodelação óssea e de tecidos mineralizados.

Os resultados encontrados nos ensaios colorimétrico vermelho de alizarina e imunoenzimático Elisa seguiram exatamente o mesmo padrão, com maiores valores de absorvância aos 14 dias para o grupo G4 (SHED + meio osteogênico) e aos 21 dias para o grupo G3 (SHED + meio osteogênico + partículas de dente bovino), sugerindo uma correlação entre a expressão de TGF β 1 e a produção de tecido mineralizado. RINCO (2021) cultivou SHED em diferentes proporções de hidroxiapatita e beta tricálcio fosfato (HA/ β -TCP), também em meio osteogênico e em MEM α , pelo período de 1, 7, 14 e 21 dias. As análises qualitativa e quantitativa do ensaio vermelho de alizarina demonstraram que, aos 14 dias, as SHED têm uma intensa atividade no grupo em que foram cultivadas sem o biomaterial, mas em meio osteogênico. Esta atividade foi superior à de quaisquer dos outros grupos no mesmo período e nos dias anteriores (RINCO *et al.* 2021).

Os fatores de crescimento oriundos da regulação de Runx2 são importantes na proliferação e maturação de células ósseas. Os fatores de crescimento da família β , como TGF β 1 e a BMP-2 tem uma importante associação com o gene Runx2 e os estudos de Lee *et al.*, 2000, demonstram que a ação coordenada de sinalizadores de transcrição para ativação de transcritores do tipo beta por Runx2 e BMP leva à indução da expressão genética específica do osteoblasto em células progenitoras, que neste caso foram células precursoras mesenquimais pluripotentes (C2C12) (LEE *et al.* 2000).

Peters, Wang e Serra (2017) demonstram a importância de fatores de crescimento como TGF β r2, com transcrição regulada por Runx2, para células ósseas. Após impedirem a transcrição de TGF β r2 em células progenitoras ósseas *in vitro*, levaram estas células para lojas cirúrgicas em calvária de ratos jovens. Além das alterações fenotípicas e deficientes da maturação do tecido ósseo, os pesquisadores relatam os resultados de RT-PCR quantitativo uma significativa redução para Antígeno Nuclear Celular Proliferante (PCNA) e Bglap (marcador de osteoblastos maduros – osteocalcina), o que é sugestivo da

redução dos osteoblastos maduros para deeeção em TGF β r2 . Estes resultados são importantes para associação do fator de crescimento da família β , no caso o TGF β r2, na proliferação e maturação de osteoblastos imaturos (PETERS; WANG; SERRA, 2017).

Apesar de não ter sido observada diferenças estatisticamente significativas entre os grupos G3 e G4 aos 21 dias, tanto na análise quantitativa do ensaio vermelho de alizarina como no ensaio ELISA, a presença de um arcabouço como a dentina bovina tem um significado clínico relevante, uma vez que será fundamental para garantir a distribuição e manutenção das células com potencial osteogênico por todo o defeito ósseo para um reparo completo e homogêneo.

7 CONCLUSÃO

As SHED demonstraram capacidade de deposição de íons cálcio na formação de matriz mineralizada e de expressão de TGF β 1 tanto quando cultivadas exclusivamente em meio osteogênico (G3) quanto em meio osteogênico concomitante à presença de partículas de dente bovino (G4), sendo que nesse último os resultados foram mais expressivos.

REFERÊNCIAS

AHN, J. J.; SHIN, H. I. Bone tissue formation in extraction sockets from sites with advanced periodontal disease: a histomorphometric study in humans. **Int J Oral Maxillofac Implants**, Daego, v. 23, n. 6, p.1133-1138, 2008.

ARABADZHIEV, I.; MAURER, P.; STEVAO, E. Particulated wisdom teeth as an autologous bone substitute for grafting/filling material in bone defects: Case Report. **J Clin Exp Dent**, Wendalinustr, v. 12, n. 4, p. 424-428, 2020.

BOULER, J. M. *et al.* Biphasic calcium phosphate ceramics for bone reconstruction: A review of biological response. **Acta Biomater**, Nantes, v. 53, p. 1-12, 2017.

CALVO-GUIRADO, J. L. *et al.* The Use of Tooth Particles as a Biomaterial in Post-Extraction Sockets. Experimental Study in Dogs. **Dent J**, Guadalupe, v. 6, n. 2, 2018.

CHING H. S. *et al.* Expression of odontogenic and osteogenic markers in DPSCs and SHED: A Review. **Current Stem Cell Research & Therapy**, Kelantan, v. 12, p. 71-79, 2017.

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**, Hong Kong, v. 71, p. 1293-1312, 2017.

ELSAVADI, M. *et al.* TGF β 1-Induced Differentiation of Human Bone Marrow-Derived MSCs Is Mediated by Changes to the Actin Cytoskeleton. **Stem Cells International**, Riyhad, v. 2018, p. 6913594, 2018.

EMANNUEL (espírito). **Coragem**. Psicografado por Francisco Cândido Xavier. Uberaba, MG: CEC, 2021.

FERRAROTTI, F. *et al.* Human intrabony defect regeneration with micrografts containing dental pulp stem cells: A randomized controlled clinical trial. **J Clin Periodontol**, Turin, v. 45, n. 1, p. 841-850, 2018.

GOSAU, M. *et al.* Comparison of the differentiation potential of neural crest derived progenitor cells from apical papilla (dNC-PCs) and stem cells from exfoliated deciduous teeth (SHED) into mineralising cells. **Arch Oral Biol**, Regenseburg, v. 58, n. 6, p. 699-706, 2013.

HREN, N. I., MILJAVEC, M. Spontaneous bone healing of the large bone defects in the mandible. **Inter J of Oral and Maxillofacial Surgery**, Ljubljana, v. 37, n. 12, p.1111-1116, 2008.

JÄRVINEN, E. *et al.* Mesenchymal Wnt/ β -catenin signaling limits tooth number. **Development**, Helsinki, v. 145, n. 4,

JORDANA, F.; VISAGE, C.; WEISS, P. Substituts osseux. **M/s**, Nantes, v. 33, n.1, p. 60-65, 2017.

KAWANE, T. *et al.* Runx2 is required for the proliferation of osteoblast progenitors and induces proliferation by regulating Fgfr2 and Fgfr3. **Sci Rep**, Nagasaki, v. 8, n. 13551, p.1-17, 2018.

KIM, S. G., KIM H. K., LIM, S.C. Combined implantation of particulate dentin, plaster of Paris, and a bone xenograft (Bio-Oss) for bone regeneration in rats. **J. Craniomaxillofac. Surg**, Kwang-Ju, v. 29, n. 1, p. 282–288, 2001.

KIM, Y, K. *et al.* Healing Mechanism and Clinical Application of Autogenous Tooth Bone Graft Material. **Advances in Biomaterials Science and Biomedical Applications**, Rosario Pignatello, IntechOpen, 2013. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/advances-inbiomaterials-science-and-biomedical-applications/healing-mechanism-and-clinicalapplication-of-autogenous-tooth-bone-graft-material>. Acesso em: 24 de Janeiro de 2021.

KIM, Y. K., KIM, S. G., YUN P.Y. Autogenous teeth used for bone grafting: A comparison with traditional grafting materials. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol**, Xi'an, v. 117, n. 1, p. 39-45, 2014.

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

KUNIMATSU, R *et al.* Comparative characterization of stem cells from human exfoliated deciduous teeth, dental pulp, and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Hiroshima, v. 501, n. 1, p. 193-198, 2018.

LEE, K. S. *et al.* Runx2 is a common target of transforming growth factor beta1 and bone morphogenetic protein 2, and cooperation between Runx2 and Smad5 induces osteoblast-specific gene expression in the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12. **Mol Cell Biol**, Cheongju, v. 20, n.1, p. 8783-8792, 2000.

LIU, X. *et al.* RUNX2 contributes to TGF- β 1-induced expression of Wdr72 in ameloblasts during enamel mineralization. **Biomed Pharmacother**. Shandong, v. 118, p. 109235, 2019

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

MA, D. *et al.* Identification of a novel mutation of RUNX2 in a family with supernumerary teeth and craniofacial dysplasia by whole-exome sequencing: A case report and literature review. **Medicine**, China, v. 97, n. 32, p. e11328, 2018.

MARTIN, N.C. *et al.* The use of phosphate buffered saline for the recovery of cells and spermatozoa from swabs, **Science & Justice**, Howdenhall Road, v. 46, n. 3, p. 179-184, 2006.

MEGUID, A. *et al.* Stem cells applications in bone and tooth repair and regeneration: New insights, tools, and hopes. **J Cell Physiol**, Ireland, v. 233, n. 3, p. 1825-1835, 2018.

MORSCZECK, C.; REICHERT, T. E. Dental stem cells in tooth regeneration and repair in the future. **Expert Opin Biol Ther**, Regensburg, v. 18, n. 2, p. 187-196, 2018.

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

MURATA, M. *et al.* Human Dentin as Novel Biomaterial for Bone Regeneration.

Physics and Chemistry, Rosario Pignatello, IntechOpen, 2011. Croácia, Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/biomaterials-physics-and-chemistry/human-dentinas-novel-biomaterial-for-bone-regeneration>. Acesso em: 24 Janeiro 2021

PETERS, S. B.; WANG, Y.; SERRA, R. Tgfr2 is required in osterix expressing cells for postnatal skeletal development, **Bone**, Birmingham, v. 97, n.1, p. 54-56, 2017.

RAIMUNDO, L. B. *et al.* Effects of Peracetic Acid on the Corrosion Resistance of Commercially Pure Titanium (grade 4). **Braz. Dent. J**, Brasil, v. 26, n. 6, p. 660-666, 2015.

RINCO, U. G. R. **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 (Mestrado em Ciências Odontológicas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, UNIFAL-MG, Alfenas, 2021.

SAEZ, D. M. *et al.* Rat facial nerve regeneration with human immature dental pulp stem cells. **Cell Transplantation**, São Paulo, v. 28, n. 12, p. 1573-1584, 2019.

SCHRIEFER, A.; CARVALHO, E. M. Biomarcadores em Medicina. **Gaz. méd. Bahia**, Bahia, v. 78, n. 1, p. 47-51, 2008.

SCULEAN, A.; STAVROPOULOS, A.; BOSSHARDT, D. D. Self-regenerative capacity of intra-oral bone defects. **J Clin Periodontol**, Bern, v. 46, n. 21, p. 70-81, 2019.

SOARES, A. P. *et al.* Células-tronco em Odontologia. **R Dental Press Ortodon Ortop Facial**, Maringá, v. 12, n. 1, p. 33-40, 2007.

VIALE-BOURONCLE, S. *et al.* Rigid matrix supports osteogenic differentiation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED). **Differentiation**, Regensburg, v. 84, n. 5, p. 366-370, 2012.

TAKATA, T. *et al.* Protein extracts of dentin affect proliferation and differentiation of osteoprogenitor cells in vitro. **J Periodontol**, Hiroshima, v. 69, n. 11, p. 1247-1255, 1998.

WAGERS, A. J.; WEISSMAN, I. L. Plasticity of adult stem cells. **Cell**, California, v. 116, n. 5, p. 639-648, 2004.

WEIBULL, L. *et al.* Morbidity after chin bone harvesting – a retrospective long-term follow-up study. **Clin Implant Dent Relat Res**, v. 11, n. 1, p. 149-157, 2009.

XIN, Y. *et al.* New Function of RUNX2 in Regulating Osteoclast Differentiation via the AKT/NFATc1/CTSK Axis. **Calcif tissue int.**, Göteborg, v. 106 n. 5, p. 553-566, 2020.

XU, X. *et al.* Comparative Histomorphometric Analysis of Maxillary Sinus Augmentation With Deproteinized Bovine Bone and Demineralized Particulate Human Tooth Graft: An Experimental Study in Rabbits. **Implant Dent**. Daegu, v. 27, n. 3, p. 324-331, 2018.

YASSEN, G. H.; PLATT, J. A.; HARA, A. T. Bovine teeth as substitute for human teeth in dental research: a review of literature. **J Ora Sci**, Indianapolis, v. 53, n. 3, p. 273-282, 2011.

ZHAI, Q. *et al.* Dental stem cell and dental tissue regeneration. **Front Med**, Xi'an, v. 13, n. 2, p. 152-159, 2019.