



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



### CONCORDÂNCIA DO ORIENTADOR

Declaro que a aluna Priscila Alves Giovani R.A.: 103811 esteve sob minha orientação para a realização do Trabalho de Conclusão de Curso intitulado "AVALIAÇÃO *IN VIVO* DA CAPACIDADE REGENERATIVA DAS CÉLULAS MESENQUIMAIS INDIFERENCIADAS PROVENIENTES DO LIGAMENTO PERIODONTAL DE HUMANOS." no ano de 2013.

Concordo com a submissão do trabalho apresentado à Comissão de Graduação pelo aluno, como requisito para aprovação na disciplina DS833 - Trabalho de Conclusão de Curso.

Piracicaba, 01 de Outubro de 2013.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Karina Gonzales Silvério Ruiz", written over a horizontal line.

Profa. Dra. Karina Gonzales Silvério Ruiz



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**



**PRISCILA ALVES GIOVANI**

**AVALIAÇÃO *IN VIVO* DA CAPACIDADE REGENERATIVA DAS CÉLULAS  
MESENQUIMAIS INDIFERENCIADAS PROVENIENTES DO LIGAMENTO  
PERIODONTAL DE HUMANOS.**

**Piracicaba  
2013**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**



**PRISCILA ALVES GIOVANI**

**AVALIAÇÃO *IN VIVO* DA CAPACIDADE REGENERATIVA DAS CÉLULAS  
MESENQUIMAIS INDIFERENCIADAS PROVENIENTES DO LIGAMENTO  
PERIODONTAL DE HUMANOS.**

*Monografia apresentada à Faculdade de  
Odontologia de Piracicabada  
Universidade Estadual de Campinas  
como Trabalho de Conclusão de Curso de  
Graduação em Odontologia.*

*Orientadora: Profa. Dra. Karina Gonzales  
Silvério Ruiz*

**Piracicaba  
2013**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
MARILENE GIRELLO – CRB8/6159 - BIBLIOTECA DA  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP

G439a      Giovani, Priscila Alves, 1990-  
Avaliação *in vivo* da capacidade regenerativa das  
células mesenquimais indiferenciadas  
provenientes do ligamento periodontal de  
humanos / Priscila Alves Giovani. -- Piracicaba,  
SP: [s.n.], 2013.

Orientador: Karina Gonzales Silvério Ruiz.  
Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) –  
Universidade Estadual de Campinas, Faculdade  
de Odontologia de Piracicaba.

1. Células-tronco.   2. Periodonto.   3.  
Regeneração. I. Ruiz, Karina Gonzales Silvério. II.  
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade  
de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

## **DEDICATÓRIA**

A Deus, por me permitir essa alegria.

À minha família, sem a qual eu jamais teria imaginado essa conquista, que não mediu esforços para me ajudar e acreditou no meu sonho.

Aos meus amigos de longa data e aos novos que a Faculdade me possibilitou conhecer.

## **AGRADECIMENTOS**

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba por me proporcionar não só o conhecimento intelectual como a sabedoria e entendimento.

À Profa. Dra. Karina Gonzales Silvério Ruiz pelo exemplo de profissionalismo, pela atenção e paciência para me orientar.

Aos pesquisadores do Laboratório de Periodontia da FOP.

A todos que de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente para execução desse trabalho.

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.”

*Albert Einstein*

## RESUMO

A regeneração dos tecidos periodontais de suporte perdidos em decorrência da doença periodontal inflamatória depende da migração e proliferação das células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal remanescente, acompanhada pela subsequente diferenciação em osteoblastos, cementoblastos e fibroblastos, e síntese de componentes da matriz extracelular. O objetivo do estudo foi avaliar histomorfometricamente a regeneração dos tecidos periodontais em defeitos do tipo fenestração tratados com o transplante de células mesenquimais indiferenciadas provenientes do ligamento periodontal de humanos. Para tal, células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal de dentes permanentes (células com fenótipo CD105<sup>+</sup> CD34<sup>-</sup> CD45<sup>-</sup>) foram carregadas em esponjas de colágeno e avaliadas quanto a sua capacidade de adesão e proliferação, utilizando a microscopia eletrônica de varredura e ensaio de MTS, respectivamente. A análise de microscopia eletrônica de varredura mostrou que as células foram capazes de aderir nas paredes da esponja sem sofrer alteração morfológica, mantendo-se viáveis e proliferativas como revelado pelo ensaio de MTS, tendo uma maior atividade proliferativa aos 6 dias ( $p < 0,05$ ). *In vivo*, esponjas de colágeno carregadas (grupo teste) ou não (grupo controle) com células mesenquimais indiferenciadas foram transplantadas em defeitos periodontais do tipo fenestração criados em camundongos NOD/SCID, para avaliar o seu potencial em relação à regeneração dos tecidos periodontais de sustentação por meio de análises histomorfométrica.

Tanto no grupo controle como no grupo teste houve a formação de osso mineralizado preenchendo os defeitos de fenestração. No entanto, a porcentagem de preenchimento dos defeitos com osso neoformado foi significativamente maior ( $p = 0,009$ ) no grupo que recebeu as células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal ( $84,2 \pm 1,45$ ) comparado ao grupo de defeitos tratados somente com a esponja de colágeno ( $74,6 \pm 6,35$ ). Em relação ao cimento radicular, na maior parte dos defeitos de ambos os grupos, não foi possível observar a formação de novo cimento sobre as superfícies radiculares, não havendo diferença significativa entre os grupos controle e teste ( $p = 0,53$ ).

**PALAVRAS-CHAVE:** Células Tronco, Regeneração, Periodonto.

## ABSTRACT

The regeneration of periodontal tissues lost due to the support of periodontal disease depends on the migration and proliferation of undifferentiated mesenchymal cells from the remaining periodontal ligament, followed by subsequent differentiation into osteoblasts, cementoblasts and fibroblasts, and synthesis of extracellular matrix components. The aim of the study was to evaluate histomorphometric regeneration of periodontal tissues in fenestration-type defects treated with transplantation of undifferentiated mesenchymal cells derived from human periodontal ligament. To this end, undifferentiated mesenchymal cells of the periodontal ligament permanent teeth (cells with phenotype CD105 + CD34-CD45-) were transported in collagen sponges and evaluated for their ability to adhesion and proliferation, using scanning electron microscopy and assay MTS, respectively. The analysis of scanning electron microscopy showed that the cells were able to adhere the walls of the sponge without undergoing morphological change, remaining viable and proliferative as revealed by MTS assay, with a higher proliferative activity at 6 days ( $p < 0, 05$ ). In vivo, collagen sponges carried (test group) or not (control group) with undifferentiated mesenchymal cells were transplanted into periodontal defects of type fenestration created in NOD / SCID mice to evaluate their potential in relation to the regeneration of periodontal tissue support by histomorphometric analysis. In both the control and the test group was the formation of mineralized bone filling defects fenestration. However, the percentage of filling of defects with newly formed bone was significantly higher ( $p = 0.009$ ) in the group that received undifferentiated mesenchymal cells of the periodontal ligament ( $84.2 \pm 1.45$ ) compared to the group treated only with defects of the sponge collagen ( $74.6 \pm 6.35$ ). In the case of the root cementum, most of the defects of both groups was not possible to observe the formation of new cementum on the root surface, with no significant difference between the test and control groups ( $p = 0.53$ ).

**KEY-WORDS:** Stem cells, Regeneration, Periodontium.

## SUMÁRIO

Resumo .....	8
Abstract.....	9
1.Introdução.....	11
2.Revisão de Literatura.....	13
3.Proposição.....	16
4.Materiais e Métodos.....	17
4.1. Avaliação <i>in vitro</i> da capacidade carreadora das esponjas de colágeno.	
4.2. Avaliação <i>in vitro</i> da capacidade proliferativa das células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontalcarreadas nas esponjas de colágeno.	
4.3. Avaliação do potencial regenerativo das células mesenquimais indiferenciadas provenientes do ligamento periodontal transplantadas em defeitos tipo fenestração.	
5.Resultados.....	22
5.1. Carreamento das células na esponja de colágeno e ensaio de proliferação celular	
5.2. Avaliação <i>in vivo</i> do potencial regenerativo das células mesenquimais indiferenciadasdo ligamento periodontal	
Ilustrações dos resultados.....	24
6.Discussão .....	27
7.Conclusão.....	30
8.Referências.....	31

## 1 INTRODUÇÃO

A doença periodontal inflamatória caracteriza-se pela destruição dos tecidos que suportam os dentes, os quais incluem ligamento periodontal, cemento dental e osso alveolar, e está entre as mais prevalentes doenças infecciosas, constituindo-se na principal causa da perda dental com implicações significativas ao nível de saúde pública (Desvarieux *et al.*, 2003; Elter *et al.*, 2003). A raspagem e alisamento da superfície radicular (terapia mecânica) tem como objetivo é remover cálculo e depósitos bacterianos sobre a superfície radicular, assim como o cemento dental contaminado pelas bactérias e seus produtos (Aleo *et al.*, 1975; Bartold *et al.*, 2000). Os efeitos clínicos da terapia mecânica estão, de forma geral bem documentados e, em combinação com uma boa higiene oral, resultam na diminuição da profundidade de sondagem das bolsas periodontais e na estabilização das medidas do nível clínico de inserção, particularmente em bolsas periodontais profundas (Kaldhal *et al.*, 1993).

Histologicamente, independente do tipo de abordagem utilizada para a descontaminação mecânica da superfície radicular (cirúrgica ou não), o tecido epitelial prolifera de forma mais rápida do que os tecidos mesenquimais envolvidos (ligamento periodontal, cemento dental e osso alveolar) o que resulta em um padrão de cura do tipo reparação (epitélio juncional longo), não ocorrendo à regeneração dos tecidos periodontais perdidos em função da doença (Polimeni *et al.*, 2006). Desta forma, o maior desafio da terapia periodontal contemporânea tem sido o restabelecimento do ligamento periodontal, cemento dental e osso alveolar perdidos durante o processo da doença periodontal inflamatória.

Atualmente, sabe-se que o sucesso da regeneração dos tecidos periodontais depende da migração e proliferação das células do ligamento periodontal remanescente, acompanhada pela subsequente diferenciação em osteoblastos, cementoblastos e fibroblastos, e síntese de componentes das matrizes teciduais. Recentemente, estudos mostraram que o ligamento periodontal de dentes permanentes (Seo *et al.*, 2004; Nagamoto *et al.*, 2006; Gay *et al.*, 2007; Silvério *et al.*, 2010) e de decíduos (Silvério *et al.*, 2010) abrigam populações celulares com características de células mesenquimais indiferenciadas (células tronco adultas). Essas células tem sido caracterizadas através da expressão de marcadores de superfície específicos para células de origem mesenquimal indiferenciada (CD105,

CD166, CD73 e STRO1) (Seo *et al.*, 2004; Nagamoto *et al.*, 2006; Gay *et al.*, 2007; Silvério *et al.*, 2010), além de expressarem o gene para o Oct-4 (Oct-3, POU5f1), um fator de transcrição importante para a manutenção da pluripotencialidade e do estado celular indiferenciado (Kawanabe *et al.*, 2006; Silvério *et al.*, 2010). Em condições apropriadas de cultura, essas células mesenquimais indiferenciadas provenientes do ligamento periodontal têm mostrado-se capazes de diferenciarem em um fenótipo osteoblástico/cementoblástico, adipogênico e condrogênico (Seo *et al.*, 2004; Nagamoto *et al.*, 2006; Gay *et al.*, 2007; Silvério *et al.*, 2010), além de apresentarem *in vivo* formação ectópica de uma estrutura tecidual semelhante ao cimento dental e ligamento periodontal (Seo *et al.*, 2004).

Clinicamente, diferentes modalidades terapêuticas têm sido utilizadas visando à regeneração dos tecidos periodontais de suporte perdidos. Entre estas se destacam técnicas de enxertos ósseos de diferentes origens, moléculas bioativas e a regeneração tecidual guiada (GTR). Entretanto, os resultados clínicos obtidos são pouco previsíveis, e histologicamente, o potencial regenerativo destas técnicas tem se revelado limitado (Egelberg, 1987; Trombelli *et al.*, 2002; Villar & Cochran, 2010).

Diante da possibilidade de se empregar populações de células mesenquimais indiferenciadas obtidas a partir do ligamento periodontal no tratamento de lesões periodontais, o objetivo do presente estudo será avaliar histomorfometricamente a regeneração dos tecidos periodontais em defeitos do tipo fenestração tratados com o transplante de células mesenquimais indiferenciadas provenientes do ligamento periodontal de dentes permanentes.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

Odorico, Kaufman e Thomson(2001) definem células-tronco como células indiferenciadas com grande capacidade de auto-renovação e de produzir pelo menos um tipo celular altamente especializado. Classificam-se em células-tronco embrionárias pluripotentes ou células-tronco adultas. A maior vantagem do uso de células-tronco embrionárias é a sua capacidade de proliferação e de diferenciação em diversos tipos celulares. Mas existem desvantagens, como a sua instabilidade genética, a obrigatoriedade de sua transplantação para hospedeiros imunocomprometidos, o risco de formação de teratocarcinomas e de contaminação através do seu cultivo em fibroblastos de ratos segundo os autores, além da questão ética.

A viabilidade do uso de células-tronco adultas na regeneração e reconstrução de tecidos tem suscitado grande interesse na comunidade científica, dado o aumento de leis em diversos países que proíbem o uso de células-tronco embrionárias em pesquisas. Se por um lado as células-tronco adultas apresentam a vantagem de serem autogênicas, não incorrendo em limitações morais, e responsivas aos fatores de crescimento inerentes ao hospedeiro, por outro também apresentam desvantagens, como o fato de não serem pluripotentes, a dificuldade de obtê-las, purificá-las e cultivá-las *in vitro*, além de sua presença em menor quantidade nos tecidos, segundo Risbud e Shapiro(2005).

Slack JM. (2000) elucidou que existem várias fontes de células-tronco adultas, tais como: a medula óssea, o sangue, a córnea e a retina, o cordão umbilical, o fígado, a pele, o trato gastrointestinal e o pâncreas. Enquanto, Harada H. et al.(2002) defende que a principal fonte de células-tronco adultas é a medula óssea. Estas células têm a capacidade de se diferenciarem em células dos tecidos ósseo, adiposo, cartilaginoso e muscular, o que demonstra sua alta plasticidade.

Gronthos S. et al. realizaram em 2000 estudos isolando células-tronco da polpa de dentes permanentes. Desde então inúmeros estudos têm isolado células mesenquimais indiferenciadas, derivadas dos tecidos orais. Estudos de Miura, Gronthos e Zhao(2003) identificaram células-tronco derivadas da polpa de decíduos esfoliados.

Seo et al.(2004) levantaram a hipótese de que o ligamento periodontal pode conter células indiferenciadas multipotentes, que podem ser usadas para regenerar o cemento e o ligamento periodontal *in vivo*. Os autores isolaram células do ligamento periodontal de terceiros molares extraídos de humanos e analisaram-nas através da técnica de imunohistoquímica, para identificar marcadores de células-tronco. Quando transplantadas em ratos imunocomprometidos, as referidas células mostraram a capacidade de formar estruturas, como cemento e ligamento, e assim contribuir para o reparo tecidual periodontal. Os resultados desta pesquisa mostraram que as células do ligamento periodontal expressaram os marcadores de células-tronco mesenquimais: STRO-1 e CD146/MUC18 e, em condições de cultura, diferenciaram-se em cementoblastos, adipócitos e fibroblastos.

Nuñez J *et al.* (2012) utilizou esponjas de colágeno para transportar células obtidas a partir de pré-molares extraídos quatro cães beagle a defeitos periodontais intra-ósseos criados cirurgicamente em seus segundo e quarto pré-molares, depois de três meses de cura, as amostras foram obtidas e os resultados regenerativos periodontais foram avaliados histologicamente. No estudo a terapia celular, em combinação com uma esponja de colagénio, promoveu a regeneração periodontal em defeitos intra-ósseos.

Trubiani *et al.* (2008) utilizaram arcabouços tridimensionais biocompatíveis (esponja de fibrina, substitutos de derivados ósseos) e examinadas usando microscopia de luz e eletrônica de varredura e transmissão. Observações morfológicas mostraram um crescimento extensivo da biomassa celular, cobrindo parcialmente os arcabouços após quatro semanas de incubação, no meio de mineralização. Esses resultados indicaram que o ligamento periodontal pode ser fácil e eficientemente uma fonte autóloga de células mesenquimais indiferenciadas com uma grande capacidade de expansão e habilidade de se diferenciarem em células osteogênicas que podem colonizar e crescer conectadas ao arcabouço biocompatível.

d' Aquino R *et al.* (2009) realizaram um estudo utilizando um biocomplexo construído a partir de células-tronco progenitoras da polpa dentária e uma esponja de colágeno na reparação do tecido ósseo em pacientes que necessitavam de extração de seus terceiros molares . Os pacientes apresentavam um defeito de reabsorção óssea bilateral do rebordo distal do segundo molar e impacção do terceiro molar na lâmina alveolar cortical. Esta condição clínica não permite a

reparação óssea espontânea após a extração do terceiro molar , e, eventualmente, também conduz à perda do segundo molar adjacente. Terceiros molares superiores foram extraídos e suas células foram então semeadas em uma esponja de colágeno para preencher o local da lesão pós-extração dos terceiros molares mandibulares . Três meses após o enxerto, o osso alveolar dos pacientes tiveram reparação vertical, ideal e restauração completa do tecido periodontal de volta para os segundos molares , avaliados clinicamente por sondagem e raios-X. Observações histológicas mostraram claramente a regeneração completa do osso no local da lesão. Este estudo demonstra como esta população de células dentárias pode ser usada para a reparação e / ou regeneração de tecidos e órgãos.

Silvério *et al.*(2008) realizaram um estudo de revisão de literatura com ênfase na caracterização *in vitro* e *in vivo* das células mesenquimais derivadas de tecidos dentais e no seu potencial para promover regeneração dos tecidos periodontais. Os primeiros resultados destacaram a necessidade de investigações adicionais para determinar a eficácia da expansão ex-vivo de células mesenquimais no reparo das estruturas dentais e tecidos periodontais, visto que, mesmo com as limitações de cada experimento, as células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal mostraram uma habilidade de originar estruturas semelhantes ao cimento radicular e ao ligamento periodontal. Contudo, como as referidas células são heterogêneas, devido a sua capacidade de proliferarem e se diferenciarem em células formadoras do tecido periodontal, um número maior de pesquisas é necessário para investigar a função destas no processo de regeneração. Além disso, células precursoras do folículo dental humano de terceiros molares podem ser, no futuro, geneticamente modificadas *in vitro*, estando portanto, hábeis para se diferenciarem em células do tecido periodontal antes de serem transplantadas *in vivo*. Apesar de novos estudos serem necessários para colocar em prática essas terapias alternativas, neste momento o melhor entendimento das células-tronco e dos seus possíveis papéis na regeneração tecidual podem ajudar a desenvolver novas abordagens para um tratamento mais previsível dos defeitos periodontais.

Em estudo subsequente dos mesmo autores, Silvério *et al.*, publicado em 2010 as propriedades biológicas *in vitro* de células progenitoras mesenquimais altamente purificadas colhidas do ligamento periodontal de dentes decíduos e permanentes foram avaliadas comparativamente. Neste estudo os pesquisadores demonstram que subconjuntos de células progenitoras mesenquimais altamente purificados

podem ser obtidos de ligamento periodontal de dentes decíduos e permanentes, e indicam diferenças fenotípicas sobre as suas aplicações clínicas. Foi observada uma maior expressão de genes relacionados com uma resposta adipogênica em células de ligamento periodontal de decíduos, enquanto um subconjunto de células de ligamento periodontal de permanentes marcadas por CD105 + apresentaram uma resposta mais homogênea para osteoblastos / cementoblastos.

De acordo com a literatura consultada, percebe-se que o ligamento periodontal pode ser uma fonte autógena fácil e eficiente de células mesenquimais indiferenciadas, com capacidade de expansão e habilidade de diferenciação em células fibroblásticas, cementoblásticas e osteoblásticas. Talvez, em um futuro não muito distante, o uso de células tronco mesenquimais na regeneração do periodonto represente um procedimento corriqueiro, significando, assim, um grande avanço na terapia periodontal regenerativa.

### **3 PROPOSIÇÃO**

Avaliar em animais a capacidade de regeneração periodontal de células mesenquimais indiferenciadas provenientes do ligamento periodontal de humanos.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Avaliação *in vitro* da capacidade carreadora das esponjas de colágeno.**

As três populações de células primárias mesenquimais indiferenciadas provenientes do ligamento periodontal de humanos, as quais fazem parte de um banco de células da Disciplina de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP (aprovação do Comitê de Ética em pesquisa sob o protocolo nº 031/2006) foram descongeladas e expandidas em DMEM suplementado com FBS a 10%, 100µg/ml de estreptomicina e 100U/ml de penicilina (meio de cultura padrão), a 37°C em atmosfera saturada em 5% de CO<sub>2</sub> e 98% de umidade até alcançar confluência. Para avaliar a capacidade carreadora da esponja de colágeno marca comercial Koken (Japão, Tóquio), 10ul de  $1 \times 10^4$  células foram transferidas para as esponjas, e estas foram colocadas em uma placa de cultura celular de 96 poços, sendo uma esponja/poço, em triplicata. Após 1 hora de incubação, foram acrescentados 100 ul de DMEM 10% FBS em cada esponja/poço. Após 2 dias em cultura as esponjas foram fixadas em solução de Karnovsky durante 24 horas. Uma esponja sem célula contendo apenas DMEM 10% FBS foi utilizada como controle. Então, as amostras foram desidratadas por série crescente de acetona (Qeel, São Paulo, SP, Brasil) (50%, 75%, 85%, 90%, 95% e 100%), e ao final desidratadas ao ponto crítico (DentonVacuum DCP-1 – Critical Point) seguido de metalização em ouro (DentonVacuum Desk II) e análise em microscópio eletrônico de varredura. As amostras foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura com aumento variando entre 100 e 500 vezes e aceleração entre 5 e 20 Kv. A análise das superfícies foi descritiva, considerando a presença ou ausência de células.

### **4.2. Avaliação *in vitro* da capacidade proliferativa das células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal carreadas nas esponjas de colágeno.**

Para avaliar a capacidade proliferativa das células carreadas na esponja de colágeno, 10 ul de  $1 \times 10^4$  células foram semeadas nas esponjas, e estas foram colocadas em uma placa de cultura celular de 96 poços, sendo uma esponja/poço,

em triplicata. Após 1 hora de incubação, foram acrescentados 100  $\mu$ l de DMEM 10% FBS em cada esponja/poço e as células foram incubadas por 24 horas. Após esse período, o meio de cultura foi substituído por DMEM suplementado com 2% de FBS, e as células foram cultivadas por 2, 6 e 9 dias. Ao final de cada período, 20  $\mu$ l de CellTiter96<sup>®</sup>AQ<sub>ueous</sub>OneSolutionReagent (Promega) foi adicionado em cada poço e as células incubadas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Após 2 horas de incubação, foi realizada a leitura da absorbância a 490nm, sendo a absorbância correspondente ao reagente MTS tetrazolium que foi bio-reduzido em formazan pelas células em proliferação. Desta maneira, em geral, quanto maior a absorbância, maior o número de células viáveis em proliferação por poço. Para se determinar o número absoluto de células em relação à absorbância, 1 x 10<sup>4</sup> células foram semeadas diretamente nos orifícios das placas de 96 e cultivadas sob as mesmas condições e pelos mesmos períodos descritos acima. Ao final de cada período, foi determinada a proliferação celular utilizando-se o kit CellTiter96<sup>®</sup>AQ<sub>ueous</sub>OneSolutionReagent (Promega), e em paralelo, foi realizada a contagem do número de células em cada orifício com o uso de um hemocítmetro. Desta maneira, foi possível estabelecer uma correlação entre absorbância e número de células, determinando assim, uma curva padrão de proliferação celular (Figura 3A).

### **4.3. Avaliar o potencial regenerativo das células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal transplantadas em defeitos tipo fenestração.**

#### *4.3.1. Carreamento das esponjas de colágeno*

Para avaliar *in vivo* o potencial que as células mesenquimais indiferenciadas apresentam na regeneração dos tecidos periodontais, estas células foram transplantadas em defeitos periodontais do tipo fenestração criados em camundongos imunossuprimidos do tipo NOD/SCID.

Para a realização deste ensaio, cada população das células mesenquimais indiferenciadas (n=3) foram semeadas em 6 esponjas de colágeno (marca Koken, Tokyo, Japão) e cultivadas em meio de cultura padrão (DMEM 10%FBS), conforme descrito no item 4.1. Brevemente, as esponjas de colágeno foram semeadas com 10  $\mu$ l de 1 x 10<sup>6</sup>, e estas foram colocadas em uma placa de cultura celular de 96 poços,

sendo uma esponja/poço. Após 1 hora de incubação, foram acrescentados 100 ul de DMEM 10% FBS em cada esponja/poço e as células foram incubadas por 3 dias. Esponjas de colágeno sem células submetidas às mesmas condições das esponjas do grupo com células foram utilizadas como controle negativo.

#### 4.3.2. Cirurgias para transplante celular

Para a realização do transplante das células mesenquimais indiferenciadas, nove camundongos adultos NOD/SCID, pesando 250 a 300g, foram utilizados, segundo aprovação na Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA-IB-UNICAMP), sob o protocolo nº 937-1. Antes do transplante celular, os defeitos periodontais foram criados de acordo com a metodologia proposta por King *et al.* (1997). Brevemente, os animais receberam de acordo com seu peso corpóreo uma solução de ketamina (1ml/Kg/IM) (Francotar<sup>®</sup>; Virbac do Brasil Industria e Comércio LTDA, Roseira, S.P., Brasil) e cloridrato de xylasina (0,3 ml/kg/IM) (Virbaxil<sup>®</sup>; Virbac do Brasil Industria e Comércio LTDA, Roseira, S.P., Brasil). Após tricotomia na região mandibular e anti-sepsia, foi feita uma incisão superficial de aproximadamente 2cm na altura da comissura labial, no sentido ântero-posterior. A fáscia superficial foi separada, expondo o músculo masseter. As inserções musculares foram incisadas, e tanto o músculo quanto o periósteo foram elevados para exposição do tecido ósseo mandibular. Com o auxílio de um microscópio cirúrgico, o tecido ósseo que reveste a região vestibular da raiz distal dos primeiros molares foi removido com o auxílio de uma broca esférica número 4, até que um defeito de cerca de 2mm<sup>2</sup> ( $\cong$  2 mm de largura, 1 mm de altura e 0,5 mm de profundidade) fosse criado (Figuras 1A e 1B). As margens superiores dos defeitos encontravam-se localizadas logo abaixo da linha mucogengival, e acima da região apical das raízes assegurando a vitalidade dentária. Em seguida, com o auxílio de curetas, a superfície radicular foi cuidadosamente raspada e alisada com o objetivo de remover cimento, ligamento periodontal e dentina superficial.

Foram criados defeitos bilaterais, sendo que cada defeito recebeu uma esponja de colágeno contendo as células ou esponja sem células. As células carregadas nas esponjas de colágeno foram mantidas em estufa umidificada a 37°C em atmosfera saturada em 5% de CO<sub>2</sub> no laboratório de cultura celular da Disciplina

de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP. No momento do transplante, essas foram colocadas em tubos eppendorf, contendo o meio de cultura padrão, e então, foram transferidas para o Biotério da Faculdade. Nesta fase, as esponjas foram inseridas e acomodadas nos defeitos periodontais, e os tecidos suturados em camadas com fio 00. As esponjas a serem transplantadas em cada defeito bilateral foram determinadas por sorteio, sendo o operador responsável pelas cirurgias cego para o grupo em questão.

#### *4.3.3. Preparo histológico para análise histomorfométrica*

Ao final do período de oito semanas após as cirurgias, os animais foram sacrificados com dose excessiva de anestésico. As mandíbulas foram dissecadas e divididas pela sínfise mandibular em hemimandíbulas e, imediatamente, fixadas em formol a 10% (Protocol – Fisher Scientific Company, Kalamazoo, MI, EUA) por 2 horas a uma temperatura de 4°C. Após a fixação, as amostras foram lavadas com 3 trocas de 30 minutos de PBS 1X (pH 7.4) a 4°C e imersas em EDTA 20% (Merck, pH = 7.4) em tampão fosfato para a descalcificação a 4°C. Seguindo o procedimento laboratorial de rotina, o descalcificador foi renovado 2 vezes ao dia durante 3 semanas. Ao final deste período, as amostras já descalcificadas foram desidratadas em concentrações crescentes de álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina (Paraplast), sendo orientadas de forma a permitir cortes no sentido transversal. Cortes seriados de aproximadamente 5,0µm foram obtidos e corados com hematoxilina e eosina para a análise histomorfométrica. Com o auxílio de um programa para análise de imagens (Image Pro<sup>®</sup>, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA) 10 secções representativas da região média do defeito foram avaliadas em relação a três parâmetros: extensão do defeito remanescente, área de preenchimento do defeito (novo osso) e extensão de novo cimento. Para a obtenção da medida de área, um retículo (quadrados) foi posicionado de maneira que sempre incluía a região delimitada pela superfície do dente e a superfície externa do tecido ósseo.

### **Análise estatística**

Os dados correspondentes à proliferação celular e os três parâmetros histométricos foram representados como média e desvio-padrão de cada grupo. Os dados referentes aos três períodos de proliferação celular foram submetidos ao teste “one-way” ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni quando diferenças foram detectadas. A análise comparativa entre os dois tipos de tratamento dos defeitos de fenestração (com ou sem célula) foi realizada, utilizando o teste t-Student. Para todas as análises, o nível de significância utilizado foi de 5%.

## 5 RESULTADOS

### *5.1. Carreamento das células na esponja de colágeno e ensaio de proliferação celular*

A análise por meio da microscopia eletrônica de varredura mostrou que após 2 dias em cultura, um grande número de células encontravam-se aderidas nas paredes das esponjas de colágeno, e estas apresentavam características morfológicas compatíveis com células fibroblásticas sem nenhuma alteração morfológica (Figura 2B). Em paralelo, o ensaio de proliferação celular mostrou que as células mesenquimais indiferenciadas foram capazes de manterem-se proliferativas e viáveis no interior das esponjas de colágeno ( $p < 0,05$ ) (Figura 3B). Os dados mostraram um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) do número de células após 6 dias em cultura, ocorrendo uma estabilização da proliferação celular após esse período em cultura (Figura 3B).

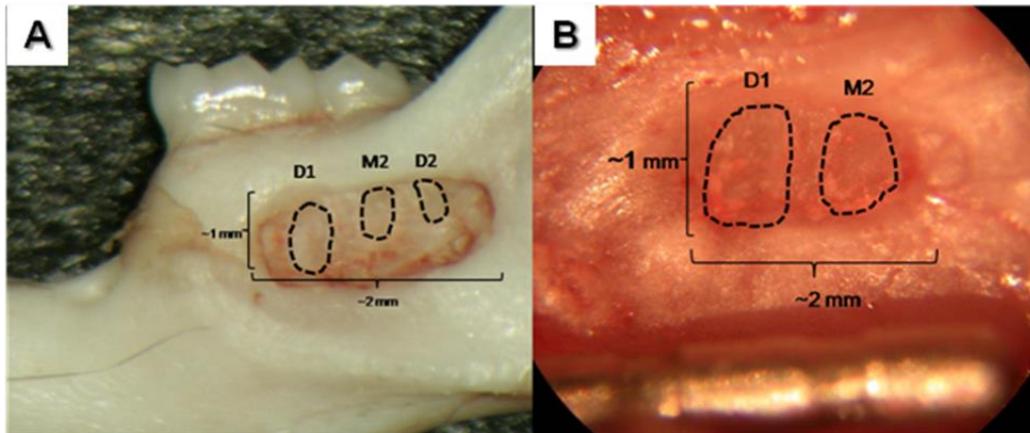
### *5.2. Avaliação in vivo do potencial regenerativo das células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal*

Após o procedimento cirúrgico, os camundongos NOD/SCID apresentaram um padrão de cicatrização normal, e nenhuma reação adversa foi observada durante o período de acompanhamento. Ao final do período de oito semanas, por meio da análise histológica, foi possível verificar a ausência de reação inflamatória local, e a presença das esponjas de colágeno no interior dos defeitos, indicando que estas ainda estavam atuando como um arcabouço para a formação de tecido mineralizado (Figuras 4A e 5A).

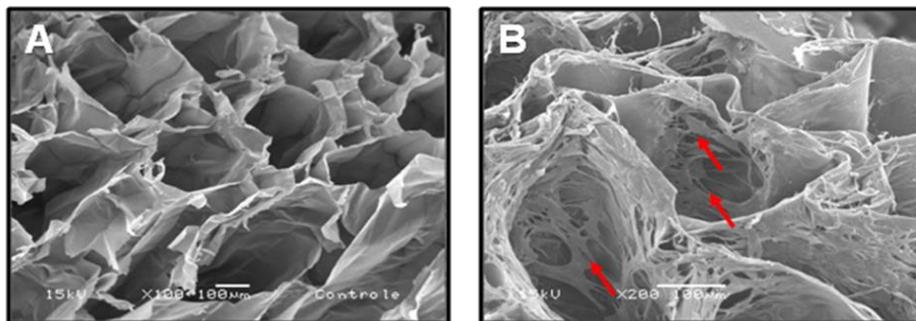
Tanto no grupo controle (esponja sem célula) (Figura 4A e 4B) como no grupo teste (esponja com célula) (Figuras 5A e 5B) houve a formação de osso mineralizado preenchendo os defeitos de fenestração. No entanto, a porcentagem de preenchimento dos defeitos com osso neoformado foi significativamente maior ( $p = 0,009$ ) no grupo que recebeu as células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal ( $84,2 \pm 1,45$ ) comparado ao grupo de defeitos tratados somente com a esponja de colágeno ( $74,6 \pm 6,35$ ) (Tabela 1).

Esse menor preenchimento ósseo no grupo controle (sem célula) refletiu em uma maior porcentagem de defeito remanescente ( $6,68 \pm 2,9$ ) comparado ao grupo teste ( $1,2 \pm 1,1$ ), sugerindo então, que a presença das células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal favoreceu a neoformação óssea e o fechamento dos defeitos do tipo fenestração (Tabela 1). Em relação ao cimento radicular, na maior parte dos defeitos de ambos os grupos, não foi possível observar a formação de novo cimento sobre as superfícies radiculares, não havendo diferença significativa entre os grupos controle e teste ( $p=0,53$ ) (Tabela 1).

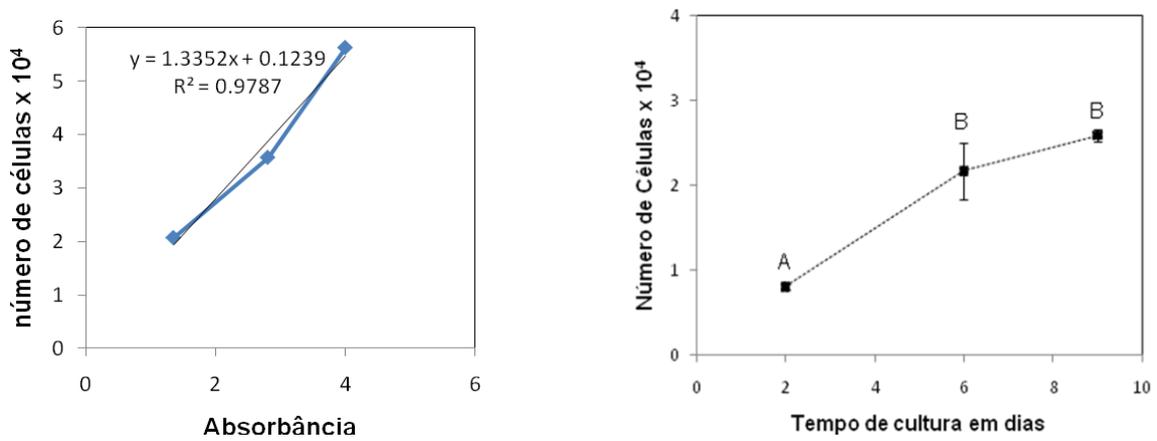
## Ilustrações dos resultados



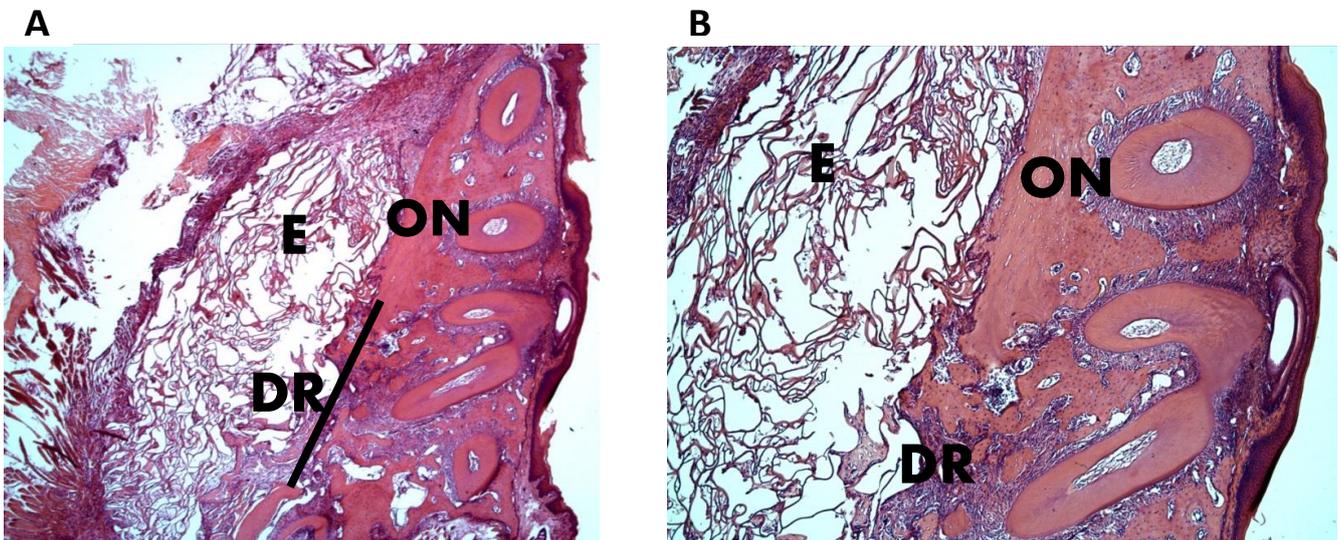
**Figura 1.** Defeitos de fenestração periodontal na vestibular de molares inferiores expondo a raiz distal do primeiro molar (D1) e mesial do segundo molar inferior (M2), com aproximadamente 2 mm de largura, 1 mm de altura e 0,5 mm de profundidade (aumento de 40X). Mandíbula dissecada (A), Cirurgia em camundongos NOD/SCID (B).



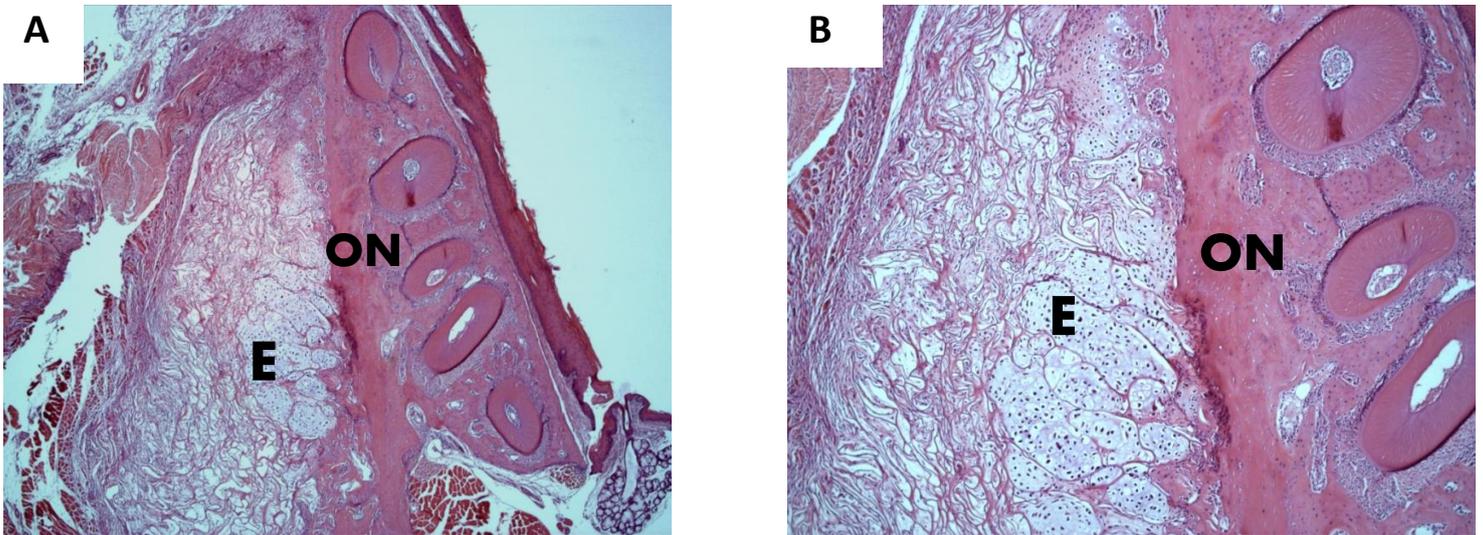
**Figura 2.** Ensaio de microscopia eletrônica de varredura. (A) Grupo controle (sem célula), mostrando a morfologia da esponja de colágeno do tipo “Honeycomb” (100X). (B) Células mesenquimais indiferenciadas aderidas nas paredes da esponja de colágeno, conservando a sua morfologia semelhante a fibroblasto (200X).



**Figura 3. Ensaio de proliferação das células carregadas na esponja de colágeno. (A)** Curva padrão de proliferação celular e equação da reta e **(B)** Capacidade de proliferação das células mesenquimais indiferenciadas carregadas na esponja de colágeno e avaliada nos dias 2, 6, e 9. Os dados são apresentados como média  $\pm$ sd das seis populações. Diferenças estatisticamente significativas são representadas pelas diferentes letras, empregando o teste ANOVA ( $p < 0,05$ ).



**Figura 4. Características histológicas dos defeitos de fenestração tratados com esponja de colágeno (grupo controle).**(A, B) Presença da esponja de colágeno (E) acompanhada pelo preenchimento parcial do defeito com tecido ósseo formado (ON) após o período de 8 semanas. Presença de defeito remanescente (DR) sem preenchimento ósseo. Coloração com H-E, aumento de 2,5X e 5X, respectivamente.



**Figura 5.** Características histológicas dos defeitos de fenestração tratados com células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal carregadas na esponja de colágeno (grupo teste). (A, B) Presença da esponja de colágeno (E) acompanhada pelo preenchimento do defeito com tecido ósseo formado (ON) após o período de 8 semanas. Coloração com H-E, aumento de 2,5X e 5X, respectivamente.

**Tabela 1.** Porcentagem (média  $\pm$ sd) de preenchimento dos defeitos de acordo com os parâmetros avaliados após tratamento com ou sem células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal. \*Diferença estatisticamente significativa determinada pela análise intergrupo, empregando o teste *t* Student ( $p < 0,05$ ).

Parâmetros histométricos em %	Grupo teste (carreador com célula)	Grupo Controle (carreador sem célula)
Novo Osso	84,2 $\pm$ 1,45	74,6 $\pm$ 6,35
Novo Cimento	0,16 $\pm$ 0,22	0,13 $\pm$ 0,18
Defeito Remanescente	1,2 $\pm$ 1,1	6,68 $\pm$ 2,9

## 6 DISCUSSÃO

As células mesenquimais indiferenciadas, ou células-tronco como são conhecidas, têm sido objeto de várias pesquisas recentes, sendo tratadas por pesquisadores e diversos profissionais da área da saúde como um importante artifício para combater múltiplas doenças, principalmente aquelas que desafiam a ciência há muito tempo.

Segundo relatos de Polimeni, Xiropaidis e Wikesjo(2006) desde a década de 70, inúmeras técnicas têm sido utilizadas a fim de interromper a progressão da doença periodontal e obter a reconstituição da arquitetura e da função das estruturas de suporte perdidas. A terapia periodontal inclui raspagem e alisamento radicular; cirurgias para descontaminação e biomodificação da superfície radicular; enxertos, utilizando substitutos ósseos, biomateriais e fatores de crescimento e a técnica da regeneração tecidual guiada (RTG). Entretanto, essas terapias são limitadas pela severidade da doença periodontal bem como pelo tipo de defeito resultante e por fatores locais e sistêmicos, dentre outros. Os resultados clínicos obtidos até então são pouco previsíveis, e histologicamente, o potencial regenerativo destas técnicas tem se revelado limitado segundo Egelberg, 1987; Trombelli *et al.*, 2002; Villar &Cochran, 2010.

Atualmente inúmeros estudos têm isolado células mesenquimais indiferenciadas, derivadas dos tecidos orais, incluindo a polpa dentária dentes permanentes e de decíduos esfoliados, folículo dental e ligamento periodontal. No presente estudo, células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal foram transplantadas em defeitos do tipo fenestração para avaliar a capacidade regenerativa destas células. Seguindo o princípio da engenharia tecidual, as células mesenquimais indiferenciadas foram carregadas em um biomaterial no caso, as esponjas de colágeno.

Batouli *et al.*(2003) e Gronthos S *et al.* (2000) realizaram pesquisas defendendo que células-tronco da polpa requerem um meio indutor apropriado e um arcabouço composto por hidroxiapatita/tricálciofosfato para induzir a formação de osso, cimento e dentina in vivo. Para bioengenharia de tecidos, uma matriz é essencial, pois fornece o arcabouço necessário para o transporte de nutrientes, oxigênio e resíduos metabólicos. Esse arcabouço deve ser biocompatível, não

irritante e resistente. A matriz é composta por materiais sintéticos ou naturais. Os componentes da matriz funcionam ativando morfogenese das células implantadas enquanto esta é gradualmente degradada e substituída pelo tecido regenerado.

O emprego de esponjas de colágeno como substância carreadora de células-tronco tem sido preconizado por vários estudos (Nakashima M e Reddi H 2003; Nakashima M. 2005; Nakashima M e Akamine A 2005). No presente estudo a análise por meio da microscopia eletrônica de varredura mostrou que após 2 dias em cultura, um grande número de células encontravam-se aderidas nas paredes das esponjas de colágeno, e estas apresentavam características morfológicas compatíveis com células fibroblásticas sem nenhuma alteração morfológica. Em paralelo, o ensaio de proliferação celular mostrou que as células mesenquimais indiferenciadas foram capazes de manterem-se proliferativas e viáveis no interior das esponjas de colágeno. Os dados mostraram um aumento significativo do número de células após 6 dias em cultura, ocorrendo uma estabilização da proliferação celular após esse período em cultura.

Trubianiet al. (2008) utilizaram células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal de humanos que foram induzidas à osteogênese e semeadas em arcabouços tridimensionais biocompatíveis (esponja de fibrina, substitutos de derivados ósseos) semelhantes. Ao serem examinadas usando microscopia de luz e eletrônica de varredura e transmissão observou-se um crescimento extensivo da biomassacelular, cobrindo parcialmente os arcabouços após quatro semanas de incubação, no meio de mineralização.

Esses resultados indicaram que o ligamento periodontal pode ser fácil e eficientemente uma fonte autóloga de células mesenquimais indiferenciadas com uma grande capacidade de expansão e habilidade de se diferenciarem em células osteogênicas que podem colonizar e crescer conectadas ao arcabouço biocompatível. Após o procedimento cirúrgico, os camundongos NOD/SCID apresentaram um padrão de cicatrização normal, e nenhuma reação adversa foi observada durante o período de acompanhamento. Ao final do período de oito semanas, por meio da análise histológica, foi possível verificar a ausência de reação inflamatória local, e a presença das esponjas de colágeno no interior dos defeitos, indicando que estas ainda estavam atuando como um arcabouço para a formação de tecido mineralizado. Tanto no grupo controle como no grupo teste houve a formação de osso mineralizado preenchendo os defeitos de fenestração.

No entanto, a porcentagem de preenchimento dos defeitos com osso neoformado foi significativamente maior no grupo que recebeu as células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal comparado ao grupo de defeitos tratados somente com a esponja de colágeno. Esse menor preenchimento ósseo no grupo controle sugere que a presença das células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal favoreceu a neoformação óssea e o fechamento dos defeitos do tipo fenestração. Em relação ao cimento radicular, na maior parte dos defeitos de ambos os grupos, não foi possível observar a formação de novo cimento sobre as superfícies radiculares, não havendo diferença significativa entre os grupos controle e teste.

Akizukiet al. (2005) em um estudo piloto, isolaram e cultivaram células do ligamento periodontal de pré-molares extraídos de cães e, posteriormente, aplicaram essas células juntamente com um condutor de ácido hialurônico em cinco defeitos ósseos produzidos cirurgicamente nas superfícies mesiais das raízes dos primeiros molares mandibulares de uma hemi-arcada de cada cão. A outra hemi-arcada foi usada como grupo controle, em que foram criados os mesmos defeitos e neles aplicados, apenas, o condutor de ácido hialurônico. Após oito semanas, os animais foram sacrificados, e os espécimes, preparados a fim de avaliar histologicamente e histometricamente a cicatrização dos defeitos periodontais. Os resultados mostraram ausência de inflamação clínica ou recessão gengival em ambos os lados. No grupo experimental, foi observada a cicatrização periodontal com formação de osso, ligamento periodontal e cimento em três dos cinco defeitos, e, no grupo controle, não foi constatada a formação de tecido periodontal, exceto em, apenas, um defeito. A análise histométrica revelou que a formação de novo cimento no grupo experimental foi altamente significativa quando comparada à do grupo controle. Os autores concluíram que as células do ligamento periodontal têm o potencial de promover regeneração tecidual, sendo assim de grande importância para a terapia regenerativa.

O estudo de Suaid FF et al.(2011) teve por objetivo investigar histologicamente o uso de células do ligamento periodontal obtidas a partir do dente mandibular para regenerar defeitos de furca classe II em cães. Defeitos de furca grau II bilaterais foram criados nos pré-molares superiores e foram aleatoriamente designados para o grupo de teste recebendo as células mesenquimais ou controle. Após três meses, os animais foram sacrificados para avaliar os parâmetros

histométricas. In vitro, as células provenientes do ligamento periodontal foram capazes de promover a formação de nódulos minerais e expressar sialoproteína óssea, colágeno tipo I e fosfatase alcalina. histometricamente, a análise dos dados mostrou que o grupo tratado com células apresentou um comprimento superior de novo cemento, a maior extensão de periodontal regeneração, uma maior área de osso novo e uma menor área de tecido conjuntivo e epitelial quando comparado com o grupo controle. Concluíram então que células do ligamento periodontal em associação com regeneração tecidual guiada pode promover de forma significativa regeneração periodontal em defeitos de furca grau II em cães.

Diante de algumas divergências nos resultados das pesquisas convém ressaltar que foram preconizados modelos científicos diferentes. Enquanto no presente estudo foi realizado defeito do tipo fenestração em mandíbula de camundongos, o piloto apresentado por Akisikiet al. e o estudo de Suaid FF et al. trata de defeitos nas raízes dentárias e de furca grau II em cães.

Existe um grande avanço nos experimentos com células-tronco adultas provenientes de tecidos bucais. O seu fácil acesso e o fato de não serem órgãos vitais constituem um atrativo para testes de praticidade e viabilidade de técnicas da bioengenharia. É possível que, num futuro próximo, se utilize da bioengenharia na terapia endodôntica e periodontal, apesar de, atualmente, ainda ser complexo para ciência desenvolver órgãos dentários completos a partir de células-tronco, devido aos mecanismos elaborados da formação dentária.

## **7 CONCLUSÃO**

Diante dos resultados apresentados, pôde-se concluir que:

- 1) a metodologia empregada para avaliar o efeito da presença das células mesenquimais indiferenciadas na regeneração dos defeitos periodontais do tipo fenestração parece viável e promissora;
- 2) O transplante de células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal favoreceu a formação de novo osso, porém não esteve relacionada com a neoformação de cemento radicular.

## 8 REFERÊNCIAS

1. Akizuki T, Oda S, Komaki M, Tsuchioka H, Kawakatsu N, Kikuchi A et al. Application of periodontal ligament cell sheet for periodontal regeneration: a pilot study in beagle dogs. *J Periodontal Res.* 2005;40:245-51.
2. Aleo JJ, De Renzis FA, Farber PA. In vitro attachment of human gingival fibroblasts to root surfaces. *J Periodontol* 1975; 46:639-645.
3. Alves BL, Lins RD AU, Barboza CAG. Identificação de células-tronco mesenquimais no ligamento periodontal e perspectivas na regeneração periodontal *Odontol. Clín.-Cient., Recife*, 9 (1) 7-12, jan./mar., 2010.
4. Bartold PM, McCulloch CA, Narayanan AS, Pitaru S. Tissue engineering: a new paradigm for periodontal regeneration based on molecular and cell biology. *Periodontol* 2000 2000; 24:253-269.
5. Bartold PM, Shi S, Gronthos S. Stem cells and periodontal regeneration. *Periodontol.* 2000. 2006;40:164-72.
6. Batouli S, Miura M, Brahim J, Tsutsui TW, Fisher LW, Gronthos S, Robey PG. SHI, S. Comparison of stem-cell-mediated osteogenesis and dentinogenesis. *J Dent Res, Alexandria*, v. 82, no. 12, p. 976-981, 2003.
7. d'Aquino R, De Rosa A, Lanza V, Tirino V, Laino L, Graziano A, Desiderio V, Laino G, Papaccio G. Human mandible bone defect repair by the grafting of dental pulp stem/progenitor cells and collagen sponge biocomplexes. *Eur Cell Mater.* 2009 Nov 12;18:75-83.
8. Desvarieux M, Demmer RT, Rundek T, Boden-Albala B, Jacobs DR Jr, Papapanou PN, Sacco RL. Relationship between periodontal disease, tooth loss, and carotid artery plaque: the Oral Infections and Vascular Disease Epidemiology Study (INVEST). *Stroke* 2003; 34:2120-2125.
9. Egelberg J. Regeneration and repair of periodontal tissues. *J Periodontol Res* 1987; 22:233-242.
10. Elter JR, Offenbacher S, Toole JF, Beck JD. Relationship of periodontal disease and edentulism to stroke/TIA. *J Dent Res* 2003; 82:998-1001.
11. Gay IC, Chen S, MacDougall M. Isolation and characterization of multipotent human periodontal ligament stem cells. *Orthod Craniofac Res* 2007;10: 149-160.
12. Gebhardt M, Murray P.E., Namerow KN, Kuttler S and Garcia-Godoy F. (J Endod 2009;35:63– 66) Cell Survival within Pulp and Periodontal Constructs.
13. Gronthos S, Mankaji M, Brahim J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97:13625-30.

14. Harada H, Mitsuyasu, T, Toyono T, Toyoshima K. Epithelial stem cells in teeth. *Odontology*, Tokyo, 2002 v. 90, no. 1, p. 1–6.
15. Kaldahl WB, Kalkwarf KL, Patil KD. A review of longitudinal studies that compared periodontal therapies. *J Periodontol* 1993; 64:243-253.
16. Kawanabe N, Murakami K, Yamamoto-Takano T. The presence of ABCG2-dependent side population cells in human periodontal ligaments. *BBRC* 2006;344: 1278-1283.
17. King GN, King N, Cruchley AT, Wozney JM, Hughes FJ. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 promotes wound healing in rat periodontal fenestration defects. *J Dent Res* 1997; 76: 1460-1470.
18. Miura M, Gronthos S, Zhao M, et al. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:5807-5812.
19. Nagatomo K, Komaki M, Sekiya I, Sakaguchi Y, Noguchi K, Oda S, et al. Stem cell properties of human periodontal ligament cells. *J Periodont Res* 2006;41: 303-310.
20. Nakashima M, Reddi, H. The application of bone morphogenetic proteins to dental tissue engineering. *Nat Biotechnol*, New York, v. 21, no. 9, p. 1025-1032, 2003.
21. Nakashima M. Bone morphogenetic proteins in dentin regeneration for potential use in endodontic therapy. *Cytokine Growth Factor Rev*, Oxford, v. 16, no. 3, p. 369–376, 2005.
22. Nakashima M, Akamine A. The application of tissue engineering to regeneration of pulp and dentin in Endodontics. *J Endod*, Baltimore, v. 31, no. 10, p. 711-718, 2005.
23. Nuñez J, Sanz-Blasco S, Vignoletti F, Muñoz F, Arzate H, Villalobos C, Nuñez L, Caffesse RG, Sanz M. Periodontal regeneration following implantation of cementum and periodontal ligament-derived cells. *J Periodontal Res*. 2012 Feb;47(1):33-44.
24. Odorico J S, Kaufman D S, Thomson J A. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells*, Basel, v. 19, no. 3, p. 193-204, 2001.
25. Polimeni G, Xiropaidis AV, Wiskejo UM. Biology and principles of periodontal wound healing/regeneration. *Periodontol* 2000 2006; 41:30-47.

26. Risbud MV, Shapiro IM. Stem cells in craniofacial and dental tissue engineering. *Orthod Craniofacial Res*, Oxford, v. 8, no. 2, p. 54–59, 2005..
27. Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 2004;364: 149-155.
28. Silvério KG, Benatti BB, Casati MZ, Sallum EA, Nociti FH Jr. Stem cells: potential therapeutics for periodontal regeneration. *Stem Cell Rev*. 2008;4:13-19.
29. Silvério KG, Rodrigues TL, Coletta RD, Benevides L, Da Silva JS, Casati MZ, Sallum EA, Nociti FH Jr. Mesenchymal stem cell properties of periodontal ligament cells from deciduous and permanent teeth. *J Periodontol*. 2010;81:1207-15.
30. Slack JM. Stem cell in epithelial tissue. *Science*. 2000; 287:1431-33.
31. Soares AP, Knop LAH, Jesus AA, Araújo TM. Células-tronco em Odontologia. *R Dental Press OrtodonOrtop FacialMaringá*, v. 12, n. 1, p. 33-40, jan./fev. 2007.
32. Suaid FF, Ribeiro FV, Rodrigues TL, Silvério KG, Carvalho MD, Nociti Jr. FH, Casati MZ, Sallum EA: Autologous periodontal ligament cells in the treatment of classII furcation defects: a study in dogs. *J ClinPeriodontol* 2011; 38: 491–498.
33. Trombelli L, Heitz-Mayfield LJ, Needleman I, Moles D, Scabbia A. A systematic review of graft materials and biological agents for periodontal intraosseous defects. *J ClinPeriodontol* 2002; 29 Suppl 3:117-35.
34. Trubiani O, Orsini G, Zini N, Di Iorio D, Piccirilli M, Piattelli A et al. Regenerative potential of human periodontal ligament derived stem cells on three-dimensional biomaterials: A morphological report. *Biomed Mater Res A*. 2008;87:986-93.
35. Villar CC, Cochran DL. Regeneration of periodontal tissue: bone replacement grafts. *DentClin North Am* 2010; 54:73-92.

Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP-FOP):



**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**  
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**  
**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**



## CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "Isolamento e caracterização de células progenitoras adultas provenientes do ligamento periodontal de humanos", protocolo nº **031/2006**, dos pesquisadores **FRANCISCO HUMBERTO NOCITI JUNIOR** e **KARINA GONZALES SILVERIO RUIZ**, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 15/05/2006.

The Research Ethics Committee of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that project "Isolation e characterization of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament", register number **031/2006**, of **FRANCISCO HUMBERTO NOCITI JUNIOR** and **KARINA GONZALES SILVERIO RUIZ**, comply with the recommendations of the National Health Council - Ministry of Health of Brazil for researching in human subjects and was approved by this committee at 15/05/2006.



**Prof. Cecilia Gatti Guirado**  
Secretária  
CEP/FOP/UNICAMP



**Prof. Jacks Jorge Júnior**  
Coordenador  
CEP/FOP/UNICAMP

Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição.  
 Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.

Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA-IB):

	<p><b>Universidade Estadual de Campinas</b> <b>Instituto de Biologia</b></p>	
UNICAMP		CEEA-IB-UNICAMP

---

**Comissão de Ética na Experimentação Animal  
CEEA-IB-UNICAMP**

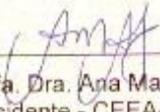
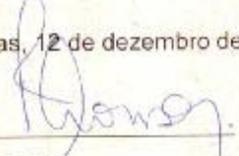
**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº 937-1, sobre **"ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS PROGENITORAS ADULTAS PROVENIENTES DO LIGAMENTO PERIODONTAL DE HUMANOS"** sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Francisco Humberto Nociti Júnior / Karina Gonzales Silvérios Ruiz** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 12 de dezembro de 2005.

**CERTIFICATE**

We certify that the protocol nº 937-1, entitled **"ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF MULTIPOTENT POSTNATAL STEM CELLS FROM HUMAN PERIODONTAL LIGAMENT"**, is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on December 12, 2005.

Campinas, 12 de dezembro de 2005.

 <hr style="width: 100%; border: 0.5px solid black;"/> <p>Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo Presidente - CEEA/IB/UNICAMP</p>	 <hr style="width: 100%; border: 0.5px solid black;"/> <p>Fátima Alonso Secretária - CEEA/IB/UNICAMP</p>
--	--

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS INSTITUTO DE BIOLOGIA CIDADE UNIVERSITÁRIA ZEFERINO VAZ CEP - 13.081-970 - CAMPINAS - SP - BRASIL	TELEFONE 55 19 3286-0359 FAX 55 19 32893124
--	--

Cópia do parecer de aprovação do relatório final de Iniciação da CNPq:

**PROGRAMA DE BOLSAS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA – QUOTA INSTITUCIONAL  
UNICAMP**

(quota de agosto de 2011 a julho de 2012)

**PARECER SOBRE RELATÓRIO FINAL DE ATIVIDADES**

**Bolsista:** PRISCILA ALVES GIOVANI – RA 103811

**Orientador(a):** Prof.(a) Dr.(a) KARINA GONZALES SILVERIO RUIZ

**Projeto:** Avaliação in vivo da capacidade regenerativa das células mesenquimais indiferenciadas provenientes do ligamento periodontal de humanos.

**PARECER**

Relatório final adequado e aprovado.

**Conclusão do Parecer:**

**APROVAR (SIM)  
REFORMULAR (NÃO)  
REJEITAR (NÃO)**

**Pró-Reitoria de Pesquisa, 1 de outubro de 2013.**

  
**Mirian Cristina Marcançola**  
PRP / PIBIC - Unicamp  
Matr. 299062