

**JENNIFER ADRIANE DOS SANTOS**

MARCADORES FLUORESCENTES: LENTIVÍRUS E  
NANOPARTÍCULAS NO RASTREAMENTO DE CÉLULAS-TRONCO  
DE POLPA DENTAL HUMANA EM MODELO DE *Gallus gallus*  
*domesticus*

Dissertação apresentada à Universidade  
Federal de São Paulo para obtenção do  
título de Mestre em Ciências.

SÃO PAULO

2014

**JENNIFER ADRIANE DOS SANTOS**

MARCADORES FLUORESCENTES: LENTIVÍRUS E  
NANOPARTÍCULAS NO RASTREAMENTO DE CÉLULAS-TRONCO  
DE POLPA DENTAL HUMANA EM MODELO DE *Gallus gallus*  
*domesticus*

Dissertação apresentada à Universidade  
Federal de São Paulo para obtenção do  
título de Mestre em Ciências.

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Silvio Eduardo Duailibi**

**COORIENTADORAS: Profa. Dra. Monica Talarico Duailibi**

**Profa. Dra. Ligia Ferreira Gomes**

SÃO PAULO

2014

Santos, Jennifer Adriane.

**Marcadores fluorescentes: Lentivírus e Nanopartículas no rastreamento de células-tronco de polpa dental humana em modelo de *Gallus gallus domesticus*** – Jennifer Adriane dos Santos. — São Paulo, 2014. xxii, 94f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Translacional.

Título em inglês: Fluorescent Dyes: Lentiviral and Nanoparticles in the tracking of human dental pulp stem cells from in *Gallus gallus domesticus* model

1. Engenharia Tecidual.
2. Medicina Regenerativa.
3. Corantes Fluorescentes.
4. Células tronco adultas.
5. Embrião de Galinha.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA TRANSLACIONAL

**Coordenador: Prof. Dr. Miguel Sabino Neto**

*A minha mãe Maria Célia dos Santos, uma mulher forte e guerreira, minha fonte de admiração, cujo incentivo e apoio constantes me motivam em todas as minhas conquistas e pela qual sou eternamente grata pela educação e amor incondicional.*

Ao meu orientador, Professor **SILVIO EDUARDO DUAILIBI**, que desde o início dessa jornada me “escolheu a dedo”, abrindo a porta de seu laboratório e me mostrando o que era ser um pesquisador, acreditando na minha causa e fazendo com que eu reconhecesse o meu potencial. Sempre motivando a ampliação de meu conhecimento intelectual e científico. Tornou-se um grande amigo acima de tudo. Agradeço a oportunidade de fazer parte da sua equipe.

A Professora **MONICA TALARICO DUAILIBI**, minha coorientadora e amiga, uma grande mulher, que me ensinou o que era o dia a dia de um laboratório de pesquisa, incentivou-me a ampliar meu conhecimento científico e intelectual.

A Professora **LIGIA FERREIRA GOMES**, minha coorientadora e amiga, que sempre me apoiou e me ajudou a desenvolver este projeto, abrindo as portas de seu laboratório para realização de análises importantes, sempre acompanhando todos os procedimentos e contribuindo no meu desenvolvimento científico.

***Meus mais sinceros agradecimentos.***

À minha **FAMÍLIA e AMIGOS**, que acreditaram e me incentivaram desde o início, acompanhando minhas vitórias, derrotas e aprendizado. Agradeço a todos que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando em todos os momentos. Este trabalho representa muito mais que um título, é a realização de um sonho.

À Professora **LYDIA MASA KO FERREIRA**, Titular da Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP, pela oportunidade de fazer parte desse grande grupo de excelentes profissionais que admiro e respeito.

Ao Professor **MIGUEL SABINO NETO**, coordenador do Programa de Pós-graduação em Cirurgia Translacional, pelo apoio e incentivo.

Aos Professores **NEIL FERREIRA NOVO** e **IARA JULIANO**, professores de Estatística da UNIFESP por todo auxílio em bioestatística.

Às queridas amigas **ANDREZZA CAMARGO**, **NATASHA MENDONÇA MACHADO** e **VANESSA PENNA**, que prestaram grande apoio e sempre estiveram ao meu lado em todos os momentos.

À toda equipe do **LABORATÓRIO DE ENGENHARIA TECIDUAL E BIOFABRICAÇÃO**, a *Luciana Iwamoto, Paulo Oliveira Martins e Rani Moretti*, pela contribuição pessoal, profissional, intelectual e humana acima de tudo. Agradeço ainda pela amizade, apoio, cumplicidade e harmonia de nossa equipe.

À todos os alunos do **CENTRO DE TERAPIA CELULAR E MOLECULAR**, *Adriano Sartori, Bianca Zanetti, Fernando Virgílio, Graciele Oliveira, Heloísa Rosa, Rafael Ferreira*, pela divisão de experiências e pela companhia durante a caminhada no processo de transformação intelectual e científica.

Aos **COLABORADORES DO CENTRO DE TERAPIA CELULAR E MOLECULAR**, *Márcia, Sandra, Ivonete, Magali, Danilo* e os demais pela competência na manutenção de nosso local de pesquisa e por toda paciência e gentileza. E ao *Paulo Simões*, biólogo, por toda ajuda no preparo das lâminas histológicas e pelos ensinamentos técnicos.

Ao Professor **DURVANEI AUGUSTO MARIA** e a **SONIA ELISABETE ALVES DE LIMA WILL** do Instituto Butantã, Divisão de Ciências Fisiológicas E Químicas, Serviço de Bioquímica por toda ajuda durante o desenvolvimento desse projeto.

A todos os alunos do **LABORATÓRIO DE FARMÁCIA E BIOQUÍMICA DA USP**, *Augusto e Camila* pela companhia e ajuda durante o desenvolvimento desse projeto.

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação, **MARTA REJANE DOS REIS SILVA, SANDRA DA SILVA** e **SILVANA APARECIDA COSTA DE ASSIS**, pela seriedade e compromisso no atendimento e apoio a mim dispensado.



Ao *Programa de Pós-graduação em Cirurgia Translacional*, pelas grandes contribuições em minha formação, pelos ensinamentos que promoveram e estimularam o desenvolvimento de minha capacidade científica e intelectual.

Ao *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)* pela bolsa de estudos concedida durante a realização deste projeto.

À *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)* e a *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)* pelo financiamento concedido ao laboratório.

À *Fundação Nacional do Meio Ambiente “Doutor Ernesto Pereira Lopes”*, obrigada pelo fornecimento do material e do protocolo de manuseio de ovos.

*Preservando pequenas partes da vida através da educação,  
resguardar o fragmento de um tempo para que um dia  
alguém conte a minha, a sua ou a nossa história.*

*Oscar Niemeyer*

***Meus sinceros agradecimentos.***

"Quem caminha sozinho pode até chegar mais rápido, mas aquele que vai acompanhado, com certeza vai mais longe."

Clarice Lispector

<b>DEDICATÓRIA.....</b>	<b>iv</b>
<b>AGRADECIMENTOS ESPECIAIS.....</b>	<b>v</b>
<b>AGRADECIMENTOS.....</b>	<b>vi</b>
<b>EPÍGRAFE.....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>xii</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>xvii</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>xviii</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>xx</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVO.....</b>	<b>5</b>
<b>3. LITERATURA.....</b>	<b>7</b>
3.1. O USO DE CÉLULAS-TRONCO DENTAIS NA ET.....	8
3.2. MARCADORES CELULARES FLUORESCENTES.....	11
3.2.1 Transdução com lentivírus LeGo – C2 <i>mCherry</i> .....	11
3.2.2 Nanopartículas <i>Quantum Trackers</i> – <i>Qtracker</i> .....	13
3.3. <i>Gallus gallus domesticus</i> COMO MODELO DE ESTUDO <i>in vivo</i> .....	15
<b>4. MÉTODOS.....</b>	<b>21</b>
4.1. CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO.....	22
4.2. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	22
4.3. CRITÉRIOS DE NÃO INCLUSÃO.....	22
4.4. AMOSTRA.....	23
4.5. OBTENÇÃO CELULAR.....	23
4.6. MANUTENÇÃO DAS CÉLULAS EM CULTURA.....	24
4.7. AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR.....	25
4.8. OBTENÇÃO DE IMAGENS.....	25
4.9. PRODUÇÃO VIRAL.....	25
4.10. MARCAÇÃO CELULAR COM NANOPARTÍCULAS – <i>Qtracker</i> .....	27
4.11. MODELO DO EMBRIÃO DE <i>Gallus gallus domesticus</i> .....	27
4.11.1. EUTANÁSIA DOS EMBRIÕES.....	31
4.12. ANÁLISES HISTOLÓGICAS.....	33

4.12.1. Hematoxilina e Eosina .....	33
4.12.2. Tricrômio de Masson.....	34
4.12.3. Picro Sirius .....	35
4.13. IMUNOHISTOQUÍMICA .....	36
4.14. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>38</b>
5.1. ANÁLISE CELULAR.....	39
5.2. ANÁLISE DA FLUORESCÊNCIA, RAIOS X E LUMINESCÊNCIA POR MEIO DO SISTEMA KODAK <i>in vivo</i> MSFXPRO (CARESTREAM).....	40
5.2.1. FLUORESCÊNCIA E RAIOS X.....	40
5.2.2. LUMINESCÊNCIA.....	42
5.3. ANÁLISE HISTOLÓGICA .....	43
5.4. ANÁLISE EM MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA .....	47
5.5. ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA .....	49
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>52</b>
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>59</b>
<b>8. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>61</b>
<b>NORMAS ADOTADAS .....</b>	<b>68</b>
<b>ABSTRACT. ....</b>	<b>70</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>72</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>76</b>
<b>FINANCIAMENTO .....</b>	<b>84</b>
<b>FONTES CONSULTADAS .....</b>	<b>86</b>
<b>ANAIS DE CONGRESSO .....</b>	<b>88</b>

**LISTA DE FIGURAS**

**Figura 1:** Injeção venosa de *QTracker* no saco vitelino de embrião de galinha, capturado por imagem digital em diferentes amplitudes de profundidade. Gentilmente cedida por Greg Fisher, Byron Ballou and Alan Waggoner, Carnegie Mellon University para INVITROGEN, 2007..... 15

**Figura 2:** Esquema adaptado, segundo GILBERT, 2006, demonstrando as cavidades e estruturas nas quais se armazenam nutrientes e produtos de excreção..... 17

**Figura 3:** Modelo CAM *in situ*, onde foi realizado a abertura janela no ovo expondo o embrião e a membrana corioalantóica e selado com fita adesiva para acompanhar o desenvolvimento do embrião dentro do ovo segundo PEREIRA LOPES *et al.*, 2009..... 18

**Figura 4:** Modelo da CAM fora da casca, o embrião e seus anexos extra-embriônicos foram transferidos no 4º dia desenvolvimento para uma placa de Petri facilitando a visualização e a fotografia em diferentes estágios segundo DOHLE *et al.*, 2009..... 19

**Figura 5: Higienização e identificação dos ovos** – Ovos previamente higienizados e secando ao ar (A), identificados à lápis com a data e o horário de incubação (B), incubados até o terceiro dia de desenvolvimento embrionário (C) e o preparo do ovo para a inoculação das células em fluxo laminar (D)..... 28

<b>Figura 6: Seleção da área de inoculação das células <i>hDPSC</i> no ovo embrionado –</b> Imagem radiológica, definiu a área na qual os ovos incubados até o terceiro dia de desenvolvimento embrionário seriam inoculados na albumina com células <i>hDPSC</i> na região contrária a câmara de ar.....	29
<b>Figura 7: Etapas Experimentais:</b> Formação do orifício na casca do ovo com o auxílio de uma agulha 23G (A), inoculação das células <i>hDPSC</i> $1 \times 10^6$ , com uma seringa agulhada, na albumina do ovo (B), selagem do orifício com álcool 70% (C) e manutenção dos ovos na chocadeira até o 11 <sup>o</sup> dia (D).....	30
<b>Figura 8: Análise da viabilidade do embrião –</b> Ovoscopia realizada três dias após inoculação das células, observamos presença de vasos, motilidade e viabilidade do embrião (A,B).....	31
<b>Figura 9: Etapas experimentais da eutanásia –</b> Recorte da casca do ovo na região da câmara de ar (A), retirada da membrana interna (B), exposição do embrião em placa de petri estéril (C,D) retirada da gema e separação do saco vitelino da CAM e do embrião (E,F).....	32
<b>Figura 10: Confluência das células <i>hDPSC</i> –</b> Células cultivadas até a 2 <sup>a</sup> passagem para a marcação das células com lentivírus LeGO-C2 <i>mCherry</i> e com <i>QTracker</i> 605nm. Análise da proliferação celular em microscopia óptica com aumento de 5x (A) e 10 (x) e explante com desprendimento das células 5x (C) e 10x (D). .....	39

**Figura 11: Análise de fluorescência por meio do sistema Kodak *in vivo* grupo *mCherry*** – Registro de sinal de fluorescência em regiões anatômica distintas em embrião de *Gallus gallus domesticus* com 11 dias (pós postura), a fluorescência com código de cores foi colocada sobre uma imagem de raio-X, para melhor localizar o sinal de fluorescência das células *hDPSC* marcadas com *mCherry*. (A) – Controle, (B,C) região com maior intensidade de fluorescência, (D) embrião diafanizado, demonstra que na região em azul apresenta membranas e cartilagem, região em vermelho osso (Adaptado de BELLAIRS & OSMOND,2005), (E,F,G) região espectralmente distintas de fluorescência, vermelho maior intensidade de fluorescência, (H) Corte sagital do plano 1. dente do bico, 2. maxila, 3.osso dentário, 5. cerebelo, 6. atlas (Adaptado de BELLAIRS & OSMOND, 2005) ..... 41

**Figura 12: Análise de fluorescência por meio do sistema Kodak *in vivo* grupo *QTracker*** – Imagem radiográfica (A), imagem fluorescente com as células marcadas com *QTracker* (B) região espectralmente distintas de fluorescência, *overlay* da imagem radiográfica com a fluorescente com escalas de cinza (C) e com filtro de rodamina faloidina (D)..... 42

**Figura 13: Análise da luminescência** – Exposição do embrião de *Gallus gallus domesticus* e seus anexos embrionários em luminescência, Grupo Controle (A, B) com menor transmissão de luminescência e Grupo Experimental *hDPSC* marcadas com *mCherry* (C, D) com aumento da absorção da luz transmitida assim como o Grupo Experimental *hDPSC* marcadas com *QTracker* (E, F)..... 43

<b>Figura 14: Coloração de H&amp;E</b> – Grupo controle (A e B), aumento da proliferação na junção óssea, condrócitos maduro nos grupos que receberam a inoculação das células <i>hDPSC</i> marcadas com <i>mCherry</i> (C e D) e também nos grupos que receberam a inoculação das células <i>hDPSC</i> marcadas com <i>QTracker</i> (E e F).....	44
<b>Figura 15: Coloração Tricrômio de Masson</b> – Grupo controle (A, B e C), grupo experimental <i>hDPSC</i> marcadas com <i>mCherry</i> apresentam condrócitos maduros e aumento da proliferação óssea (D, E e F). <i>hDPSC</i> marcadas com <i>QTracker</i> também apresentaram condrócitos maduros e aumento da proliferação óssea (G, H e I).....	45
<b>Figura 16: Coloração Tricrômio de Masson grupo <i>QTracker</i></b> – Embrião inoculado com células <i>hDPSC</i> marcadas com <i>QTracker</i> apresentaram condrócitos maduro na região do bico (A, B, C, D).....	46
<b>Figura 17: Coloração de PicroSirius</b> – Grupo controle analisados em microscopia óptica (A) e na luz polarizada com polarizador cruzado (B) mostrando uma linha tênue de colágeno, grupo experimental <i>hDPSC</i> marcadas com <i>mCherry</i> analisados em microscopia óptica (C) e na luz polarizada com polarizador cruzado (D) e grupo experimental <i>hDPSC</i> marcadas com <i>QTracker</i> analisados em microscopia óptica (E) e na luz polarizada com polarizador cruzado (B), analisados em microscopia de luz polarizada (F).....	47
<b>Figura 18: Análise de fluorescência grupo <i>QTracker</i></b> – Embrião inoculado com células <i>hDPSC</i> marcadas com <i>QTracker</i> , apresentam condrócitos maduro na região do bico, região de tecido mineralizado.....	48



**Figura 19: Análise imunohistoquímica** – Grupo controle, sem inoculação de células *hDPSC* com baixa imunexpressão para Ki67 (A e B) e PCNA (F, G), grupo experimental com inoculação de células *hDPSC* com aumento da imunexpressão de Ki67 (C, D) e aumento da imunexpressão de PCNA (H, I)..... 50

**Figura 20: Análise imunohistoquímica** – Quantificação da imunexpressão de Ki67 (A) e PCNA (B) nas células *hDPSC* inoculadas nos embriões de *Gallus gallus domesticus*..... 51

## **LISTA DE TABELAS**

**Tabela 1:** Descrição da migração, diferenciação celular quanto a presença ou não de fluorescência das células *hDPSC* inoculadas no modelo de *Gallus gallus domesticus*..... 49

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

ANOVA – Análise de variância (*analise of variance*)

CAM– Membrana Corioalantóica de Embrião de Galinha (*chick embryo chorioallantoic membrane*)

CEP – Comitê de Ética e Pesquisa

CEUAs – Comissões de Ética no Uso de Animais

CO<sub>2</sub> – Dióxido de Carbono

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

Countess – Contador de células automático

CTCMol – Centro de Terapia Celular e Molecular

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DNA – *Desoxyribonucleic acid*

EDTA – *Ethylenediamine Tetraacetic Acid*

ET – Engenharia Tecidual

FBS – *Fetal Bovino Serum*

FITC - *Fluorescein IsoThioCyanate* (isotiocianato de fluoresceína)

HAM'S-F12 – *Ham's F-12 nutrient mixture*

HBSS – *Hanks Balanced Salt Solution*

HCl – Ácido Clorídrico

*hDPSC – Human Dental Pulp Stem Cells*

*HRP – Horseradish peroxidase*

H<sub>2</sub>O – Água

Ki67 – Proteína nuclear necessária para proliferação celular

LeGO-C2 – *Lentiviral Gene Ontology Vector*

μL – Microlitro

mM- Milimolar

NIH3T3 – Fibroblasto murinho

nm – nanômetros

PBS – *Phosphate Buffered Saline*

PCNA – *proliferating cell nuclear antigen*

*Qdots – Quantum dots*

*QTracker – Quantum Trackers*

RNA – *Ribonucleic acid*

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

3 Rs – *Replacement, Reduction and Refinement*



## RESUMO

A Engenharia Tecidual é caracterizada como ciência multidisciplinar e destina-se a produzir substitutos biológicos por meio da fabricação de órgãos e tecidos em laboratório, substituindo desta maneira doadores de órgãos. O embrião de *Gallus gallus domesticus* constitui um modelo experimental interessante para experiências pré-clínicas, devido à ausência de rejeição de xenoinxertos. As células-tronco de polpa dental humana (*hDPSC*) tem um grande potencial para utilização em terapias regenerativas e apresentam uma grande capacidade de diferenciação *in vitro* em vários tecidos como dentina, nervos e endotélio vascular, além de outros tecidos. **Objetivo:** Identificar por meio de marcadores fluorescentes, na forma de lentivírus e nanopartículas, a migração de células tronco de polpa dental humanas aplicadas em modelo de *Gallus gallus domesticus*. **Métodos:** As células foram obtidas a partir da explantação de *hDPSC* de germes de terceiros molares. O estudo foi subdividido em três grupos: Grupo 1 - Experimental *QTracker*, Grupo 2 - Experimental *mCherry* e Grupo 3 - Controle. Os ovos foram mantidos na incubadora a 37,6 ° C e umidade 86 % e os animais foram sacrificados 11 dias após a postura. **Resultados:** Ambos os grupos mostraram eficiência em relação à emissão de fluorescência. As células proliferaram e apresentaram afinidade por tecidos mineralizados. **Conclusão:** O modelo animal mostrou-se eficiente para o rastreamento de células *hDPSC*, demonstrado por ambos os marcadores estudados. Devido à estabilidade da fluorescência o *Qtracker* por meio de várias gerações e ausência de vetor viral, a utilização deste marcador tornou o método mais seguro para um futuro ensaio de modelo *in vivo*.

**Palavras chave:** Engenharia Tecidual, Medicina Regenerativa, Embrião de Galinha, Células tronco adultas, Corantes Fluorescentes.



## 1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a utilização de animais na pesquisa básica e em novas terapias medicamentosas experimentais, tem levantado acalorados debates entre: cientistas que utilizam animais em experimentos, organizações de pacientes que buscam novos tratamentos de um lado e grupos de proteção a animais do outro (MATTHIESSEN *et al.*, 2003).

No Brasil, a Lei nº 11794 de 8 de outubro de 2008 e o Decreto nº 6.899 de 15 de Julho de 2009 objetivaram amenizar a carência por regulamentação específica para uso científico/experimental de animais, estabelecendo então, a criação do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA e suas competências que visaram: I – formular e zelar pelo cumprimento das normas relativas à utilização humanitária de animais com finalidade de ensino e pesquisa científica; II – credenciar instituições para criação ou utilização de animais em ensino e pesquisa científica; III – monitorar e avaliar a introdução de técnicas alternativas que substituam a utilização de animais em ensino e pesquisa.

A questão ética no manuseio dos animais, sempre foi uma preocupação mundial e existe uma tendência à implementação do princípio dos 3Rs – *Replacement, Reduction and Refinement* – o qual especifica que experimentos com animais não deveriam ser conduzidos se outro método científico satisfatório, que leve aos resultados esperados independente de uso de animais, estivesse disponível; a escolha das espécies também deve ser considerada cuidadosamente, assim como a escolha dos procedimentos experimentais que devem privilegiar aqueles que: usam o menor número de animais; envolvem animais com menor grau de desenvolvimento



neurológico, causem menos dor, sofrimento e estresse aos animais (MATTHIESSEN *et al.*, 2003).

Neste contexto existe uma busca por alternativas ao uso de mamíferos e outros animais classificados com maior grau de desenvolvimento, por um modelo que apresente menor desenvolvimento neurológico e que proporcione a mesma efetividade nos resultados. O embrião de *Gallus gallus domesticus* tem uma história longa e distinta como um modelo *in vivo* importante na biologia do desenvolvimento dos vertebrados pois, apresenta uma facilidade de manipulação, curto tempo de incubação e o completo desenvolvimento em 21 dias. Também contribuiu principais conceitos de imunologia, genética, virologia, câncer e biologia celular (STERN, 2005; YALCIN *et al.*, 2010).

No campo da Engenharia Tecidual (ET), métodos para a obtenção de populações celulares de células-tronco dentais incluem modelos *in vitro* de diferenciação de odontoblastos, e *in vivo* com análises de células-tronco dentais progenitoras em modelos de camundongos transgênicos (KIKUCHI *et al.*, 1994; BRAUT *et al.*, 2003). Estudos demonstraram que dentes completos de porcos e ratos (YOUNG *et al.*, 2002) foram construídos por ET a partir de células-tronco dentárias, epiteliais e mesenquimais, de germes pós natais de dentes, inferindo que esta abordagem poderá ter uma aplicabilidade de relevância clínica em humanos no futuro (DUAILIBI *et al.*, 2004; DUAILIBI *et al.*, 2008).

Nos últimos anos, o potencial da ET na regeneração de estruturas dentais tomou grandes proporções. O potencial múltiplo e a capacidade regenerativa de células provenientes de dentes terceiros molares tem sido amplamente reconhecida para aplicação na Medicina Regenerativa (BATOULI *et al.*, 2003), principalmente devido a capacidade de diferenciação em células odontoblásticas funcionais,

adipócitos e células neurais, além de apresentar melhor desempenho proliferativo em relação a células tronco de medula óssea (MIURA *et al.*, 2003).

Para investigar as células-tronco e os processos celulares é muito importante visualizar as estruturas e compartimentos moleculares que estão envolvidas na sua bioquímica (MICHALET *et al.*, 2005). Desta forma, a utilização de compostos fluorescentes como marcadores biológicos para a detecção de estruturas celulares e biomoleculares, como DNA, RNA e proteínas é uma área promissora que tem recebido muita atenção nos últimos anos, com diversos trabalhos abordando o tema.

O desenvolvimento de alternativas terapêuticas em ET e o crescente número de pesquisas *in vivo* com células-tronco estimulam o desenvolvimento de novas estratégias e abordagens na condução de experimentos. Em estudos pré-clínicos há necessidade de um bom marcador, com a principal característica de ser inócuo tanto para as células quanto para o modelo animal, a fim de rastrear as células, acompanhando a sua migração e diferenciação e assim, permitir maior eficiência e segurança neste procedimento.

Apesar dos achados descritos com o uso deste modelo animal, não foram encontrados registros literários acerca do uso de marcadores celulares virais ou nanopartículas de *quantum dots* em células de polpa dental de terceiros molares inoculadas no modelo de *Gallus gallus domesticus*, fato que motivou o desenvolvimento do presente estudo.

***OBJETIVO***

---

## 2. OBJETIVO

Identificar por meio de marcadores fluorescentes, na forma de lentivírus e nanopartículas, a migração de células-tronco de polpa dental humana aplicadas em modelo de *Gallus gallus domesticus*.



### 3. LITERATURA

Este capítulo será dividido em três tópicos, a saber: 3.1 O uso de células-tronco dentais na ET, 3.2 Marcadores celulares fluorescentes: marcação com lentivírus LeGo – C2 *mCherry* e nanopartículas *quantum trackers* – *Qtracker*, 3.3 *Gallus gallus domesticus* como modelo de estudo *in vivo*.

#### 3.1. O USO DE CÉLULAS-TRONCO DE POLPA DE DENTE NA ET

LANGER & VACANTI (1993) conceituaram a ET com uma publicação na qual definiram como a ciência que integra os princípios da Biologia com as técnicas da Engenharia para o desenvolvimento de substitutos biológicos a fim de regenerar funcional e morfologicamente tecidos e órgãos lesados ou danificados.

GRONTHOS *et al.*,(2000) analisaram duas culturas de polpas dentárias humanas extraídas a partir de dentes terceiros molares inclusos. Quando as culturas de polpa foram transplantadas em camundongos imunocomprometidos, ocorria a formação de estruturas semelhantes à dentina, odontoblastos e tecido pulpar. Os autores, concluíram que as células obtidas a partir de polpa dentária humana apresentaram características de células-tronco por apresentarem capacidade de auto-replicação, alta taxa proliferativa e capacidade de regenerar tecidos.

DUAILIBI *et al.*, (2004) estudando ET, destacaram a necessidade de procedimentos terapêuticos alternativos nas perdas teciduais e relataram que os recentes avanços científicos no desenvolvimento de materiais sintéticos e da ET têm criado oportunidades para se desenvolver métodos para a bioengenharia tecidual e a substituição de órgãos perdidos ou lesados. Um método foi desenvolvido no qual foi implantado por 12 semanas, um substituto biológico contendo, um *scaffold* biodegradável semeado com células de germes dentários de ratos. Os resultados mostraram que durante esse período ocorreu a formação de uma estrutura com tecidos dentários organizados, tanto em omentum quanto na mandíbula de roedores segundo DUAILIBI *et al.*, (2008). Embasados em estudos anteriores, os autores sugeriram que ET poderia ser empregada na regeneração tecidual de uma variedade de tecidos dentais além de resultar na formação de um dente completo.

ESTRELA *et al.*, (2011) relataram o crescimento exponencial da pesquisa com células-tronco mesenquimais e suas perspectivas para a regeneração nos últimos anos. Este estudo indica que os tecidos dentais são considerados uma fonte rica em células-tronco mesenquimais e enfatiza suas aplicações na Medicina Regenerativa para resolver perdas ósseas ou de elementos dentários, utilizando vários tipos de células progenitoras. O potencial de diferenciação destas células é reconhecido, podendo variar de células progenitoras neurais, odontoblastos, osteoblastos, condrócitos e adipócitos.

SUJESH *et al.*, (2012) afirmaram que a criação de um elemento dentário parcial ou completo em laboratório depende da manipulação de células-tronco. Segundo os autores, este processo necessita da sinergia de todos os eventos celulares e moleculares que levam a formação de tecidos específicos do dente. Diferentes fontes de células-tronco foram consideradas para a construção de dentes *in vitro*. Dentre as mais utilizadas, os autores destacaram as células-tronco embrionárias, pós-natal e adultas, que demonstraram um potencial regenerativo considerável. Apesar destas vantagens, ainda foram relatadas grandes limitações como risco de rejeição e comportamento celular inadequado.

LA NOCE *et al.*, (2014) em uma revisão literária salientaram a aplicação das células-tronco mesenquimais nos avanços da ET, apresentando diversos artigos científicos indicando a capacidade de diferenciação destas células em diversos tipos celulares e tecidos, seu potencial proliferativo, sua propensão para reparação e regeneração óssea, dentre outras vantagens. Os autores ainda salientam a expansão nas pesquisas com células-tronco, porém com poucos avanços nas aplicações terapêuticas, devido a rejeição imunológica que é um grande risco para o transplante de células, de modo que a biossegurança é um ponto crucial para a terapia celular. O desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas, com a identificação e compreensão dos mecanismos de diferenciação celular, ainda são obstáculos a serem vencidos para uma utilização da terapia celular em tratamentos clínicos.



## 3.2. MARCADORES CELULARES FLUORESCENTES

A utilização de compostos fluorescentes como marcadores biológicos para a detecção de estruturas celulares e biomoleculares, como DNA, RNA e proteínas é uma área muito promissora e que tem recebido muita atenção nos últimos anos, com diversos trabalhos abordando o tema. Estudos com diferentes sistemas marcadores têm sido realizados, uma vez que podem fornecer uma visão fundamental sobre a estrutura celular e de diversos tecidos, sendo os experimentos de imagem celular *in vivo*.

### 3.2.1. Marcação com lentivírus LeGo – C2 *mCherry*

Segundo WEBER *et al.*, (2008) os lentivírus são adequados para marcação celular uma vez que asseguram a uma expressão estável, podendo ser eficazes para a transdução de um espectro de amplos alvos celulares, quando embalado dentro das proteínas de revestimento de outros vírus. LeGo, *lentiviral gene ontology*, são vetores projetados de acordo com o princípio de blocos de construção, usando um amplo espectro de diferentes marcadores fluorescentes.

SHANER *et al.*, (2008) descreveram a *mCherry* como uma proteína derivada de *Discosomasp* de nome original *DsRed*. Um conjunto extenso de otimizações promoveu que esta proteína, inicialmente um tetrâmero que se mantivesse fluorescente na forma monomérica (mRFP1). A partir deste monômero foram

realizadas substituições específicas de aminoácidos que levaram à criação dos diferentes e melhorados fluorocromos denominados *mFruits*, onde se inclui a *mCherry*.

WEBER *et al.*, (2010) recentemente desenvolveu vetores lentivirais LeGo para análise múltiplos genes em diferentes células-alvo. Neste estudo, eles descrevem que novas construções LeGo foram produzidos, demonstrando eficiência na marcação e seleção de várias células. Vetores lentivirais são ferramentas úteis para a análise de funções de genes em diferentes tecidos ou sua expressão em um gene de interesse. Esta nova ferramenta compreende um conjunto de vetores lentivirais contendo diferentes cassetes de expressão (para transgenes de interesse) em conjunto com genes marcados fluorescentes individuais.

ZHANG *et al.*, (2014) relataram que os vetores lentivirais podem ser utilizados para transduzir as células, tanto em divisão quanto as que não estão em divisão, fornecendo eficientemente os genes exógenos em células hospedeiras, integrando no genoma, o que resulta na sua expressão estável ao longo de muitas gerações. A eficiência da infecção por lentivírus em células vivas pode ser controlada através da expressão de um gene repórter fluorescente.

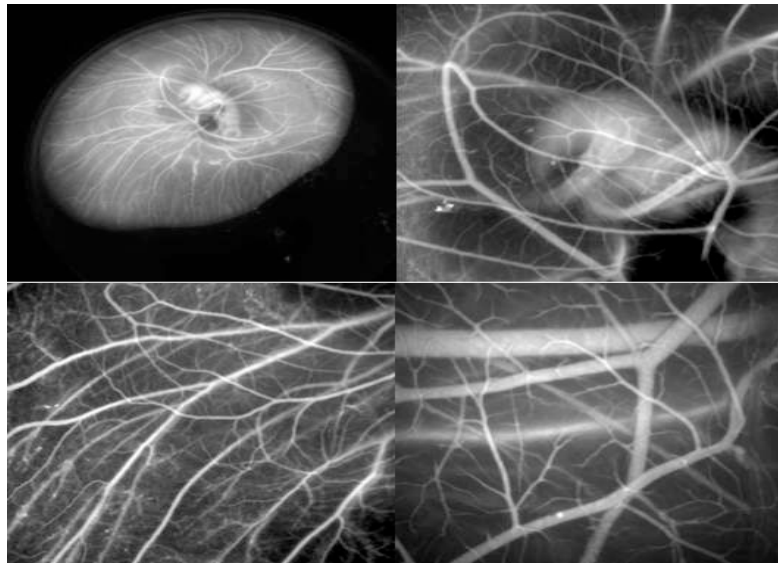
### 3.2.2. Nanopartículas *Quantum Trackers* – *Qtracker*

MICHALET *et al.*, (2005) relatam que a fisiologia da superfície dos *Quantum dots* permitem a formação de nanocristais-bioconjugados que podem se ligar especificamente a moléculas alvo e formar complexos estáveis. Desse modo, os *qdots* têm sido utilizados com sucesso na visibilidade de células, ensaios imunológicos e hibridação de DNA. O estudo aponta que eles ainda não vão substituir os fluoróforos já estabelecidos ou as tecnologias de fusão com proteínas fluorescentes, mas sua fotoestabilidade e baixa citotoxicidade são grandes vantagens para torná-lo uma ferramenta amplamente utilizada para aplicabilidade clínica.

BRUCHEZ (2005) define que os *Quantum dots* (*Qdots*) são nanocristais fluorescentes e fotoestáveis que vêm sendo utilizados com sucesso para a marcação de células *in vitro* e posterior identificação destas *in vivo*. Seu estudo aponta a utilização dos *Qdots* em ensaios celulares e oferecem um complemento poderoso aos pesquisadores, com sua capacidade de estudar especificidades e respostas funcionais em sistemas celulares, numa forma altamente multiplexada, tanto em nível molecular quanto celular. A crescente utilização de *Qdots* para a investigação de produtos químicos e comportamento celular em sistemas biológico, abre o caminho para a utilização desses ensaios para a análise de alto rendimento de respostas funcionais moleculares e celulares em modelos animais.

Segundo o manual publicado pela INVITROGEN (2007), eles descreveram que este novo marcador celular é constituído de um núcleo, uma camada intermediária e cobertura, em que o primeiro possui poucas centenas de átomos de materiais semicondutores, geralmente cádmio associado ao selênio ou telúrio. A camada intermediária semicondutora, estabiliza o núcleo melhorando suas propriedades ópticas e físicas. A camada mais externa, polimérica, recobre as duas outras camadas, promovendo uma superfície hidrossolúvel, A marcação celular ocorre pela internalização destas nanopartículas através de reações mediadas por receptor ou endocitose não específica e, após a entrada na célula, os *Qdots* localizam-se em vesículas no citoplasma, mais precisamente na região perinuclear e são passados às células-filhas por até seis gerações e não são transferidas à células adjacentes da população tecidual.

Segundo INVITROGEN (2007) os *Qdots* são projetados para imagens de pequenos animais *in vivo*, especialmente, para estudar a estrutura vascular após microinjeção (Figura 1). Estes nanocristais exibem fluorescência extremamente intensa, emissão vermelha para uma maior penetração no tecido, e um revestimento de superfície de polietileno glicol (PEG), especialmente desenvolvidos para minimizar interações não específicas e reduzir qualquer resposta imunológica por parte do tecido. Porque o revestimento de superfície de PEG não contém grupos funcionais reativos.



**Figura 1:** Injeção venosa de *QTracker* no saco vitelino de embrião de galinha, capturado por imagem digital em diferentes amplitudes de profundidade. Gentilmente cedida por Greg Fisher, Byron Ballou and Alan Waggoner, Carnegie Mellon University para INVITROGEN, 2007.

#### 3.4. *Gallus gallus domesticus* COMO MODELO DE ESTUDO *in vivo*

O embrião de *Gallus gallus domesticus* tem uma história longa e distinta como um modelo *in vivo* importante na biologia do desenvolvimento e também contribuiu principais conceitos de imunologia, genética, virologia, câncer e biologia celular.

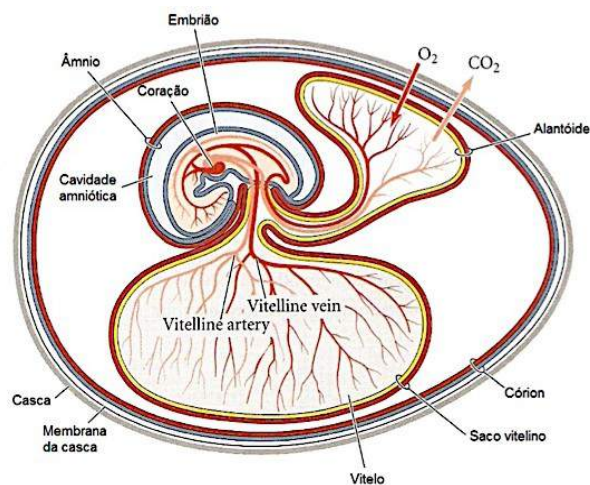
A facilidade de manipulação dos embriões, o curto espaço de tempo de incubação e o seu completo desenvolvimento com vinte e um dias, faz do modelo de *Gallus gallus domesticus*, um sistema ideal para o estudo do desenvolvimento dos vertebrados.

HAMBURGER & HAMILTON (1951) definiram os estágios de desenvolvimento do embrião de galinha. No final do terceiro dia de desenvolvimento, a nível morfológico este modelo animal apresenta: os botões dos membros, a pigmentação acinzentada do olho, a completa rotação do corpo, assim como a flexura cervical acentuada e o dobramento para frente do botão caudal. No quarto dia, os botões dos membros alongam-se, as cinco vesículas e os hemisférios cerebrais são evidentes, as flexuras pronunciam-se dando ao corpo o formato de um C, aparecendo a vesícula óptica mais pigmentada. No quinto dia embrionário são evidentes as juntas do cotovelo e do joelho, e uma pequena projeção do bico do embrião. No sexto dia o membro anterior dobra na junta do cotovelo e no sétimo dia ocorre o dobramento da perna no joelho, apresentando-se bem evidente os três segmentos de braços e pernas. Já no oitavo dia de desenvolvimento a mandíbula alcança a ponta do bico e o pescoço bem alongado separando a cabeça do tórax. Durante o nono e décimo dia embrionário é evidente um aumento pronunciado dos segmentos distais dos membros.

RIBATTI *et al.*, (1996) descreveram que o método da Membrana Corioalantóica de Embrião de Galinha, *chick embryo chorioallantoic membrane* – CAM o que vem sendo amplamente utilizado para protocolos que avaliam processos de angiogênese *in vivo*. RIBATTI *et al.*, (2001) demonstraram que por sua relativa simplicidade, facilidade de manuseio e baixo custo em comparação com os demais métodos, o método da CAM deve ser bastante utilizado para estudos de angiogênese e antiangiogênese. Eles ressaltam ainda que outro motivo da membrana corioalantóica ser considerada bastante privilegiada em estudos de angiogênese em tumor e metástases é devido a fase do desenvolvimento do embrião onde o sistema

imunocompetente não está totalmente desenvolvido e as condições de rejeição ainda não estão estabelecidas. Na verdade, a imunocompetência se desenvolve completamente em aves somente após a eclosão.

Segundo GILBERT (2006) durante o desenvolvimento do ovo se formam quatro cavidades: o saco vitelino, que armazena nutriente; o âmnio, que contém líquido para proteger o embrião; o alantóide, que armazena produtos de excreção metabólica e o coriön, que interage com o ambiente externo selecionando materiais para o embrião. Estas estruturas estão envoltas por uma casca que permite a difusão gasosa além de proteger o embrião (Figura 2).

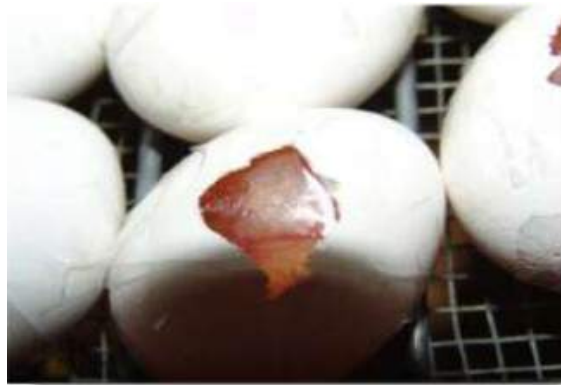


**Figura 2:** Esquema adaptado, segundo GILBERT, 2006, demonstrando as cavidades e estruturas nas quais se armazenam nutrientes e produtos de excreção.

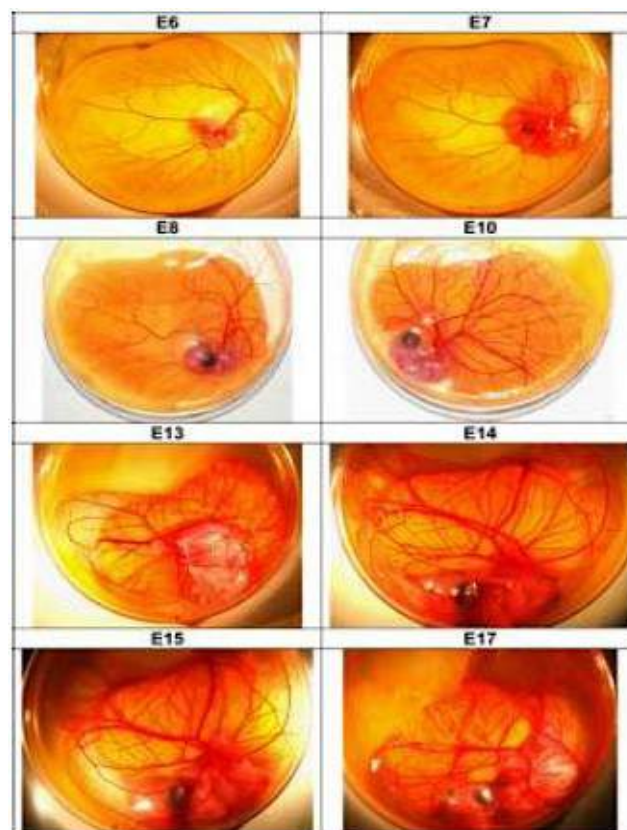
BOILLAND *et al.*, (2010) descreveram que o embrião de galinha é um modelo animal clássico para estudar o desenvolvimento embrionário e fetal, além de estudos experimentais com xenotransplantes celular, a fim de analisar o comportamento dessas células em um ambiente *in vivo*. Segundo os autores, os xenotransplantes em embriões de galinha podem fornecer informações valiosas sobre a proliferação celular, diferenciação e o comportamento, respostas da sinalização celular em determinados tecidos embrionário e o potencial carcinogênico. Neste estudo foram utilizados transplante de células em embriões de galinha também pode ser um passo para transplante experimentos de em outros modelos animais.

WEST *et al.*, (2011) relatam a adaptação de dois métodos complementares, o mais simples e mais amplamente utilizado é o ensaio realizado com a CAM *in situ* (ou *in ovo* ou *in vivo*) (Figura 3). A amostra, até duas por ovo, é aplicada por meio de uma janela feita na casca expondo a membrana de interesse voltada para a abertura. O outro método de ensaio, da CAM fora da casca, envolvendo a transferência do embrião e suas membranas extra embrionárias no 3º - 4º dia de incubação, a uma placa de Petri para posterior desenvolvimento (Figura 4). Isto aumenta a superfície da membrana a ser estudada evidenciando a membrana de interesse totalmente, permitindo a aplicação de amostras múltiplas sobre o mesmo ovo além de facilitar a visualização e fotografia, porém tem como dificuldade, a baixa viabilidade do embrião. Conseqüentemente, várias modificações foram introduzidas em um esforço para aumentar o intervalo de tempo de viabilidade do embrião.





**Figura 3:** Modelo CAM *in situ*, onde foi realizado a abertura janela no ovo expondo o embrião e a membrana corioalantóica e selado com fita adesiva para acompanhar o desenvolvimento do embrião dentro do ovo segundo PEREIRA LOPES *et al.*, 2009.



**Figura 4:** Modelo da CAM fora da casca, o embrião e seus anexos extra-embrionários foram transferidos no 4º dia desenvolvimento para uma placa de Petri facilitando a visualização e a fotografia em diferentes estágios segundo DOHLE *et al.*, 2009.

SMITH *et al.*, (2013) relataram o uso do embrião de galinha como um modelo útil e com potenciais aplicações em inúmeros campos científicos. Esta abordagem para a cultura e manipulação de populações de células dentro de sua matriz extracelular natural pode fornecer informações cruciais em processos de desenvolvimento e de reparação. A combinação com outras técnicas, tais como sistemas de CAM, a criação de defeitos ósseos, micromanipulação, micro injeção e tecnologias biorreativas, aumentam ainda mais a capacidade do modelo de recapitular e manipular os processos *in vivo*. Assim, o modelo oferece um potencial significativo como um banco de ensaio para *scaffolds*, terapias com células e fatores de crescimento, além de atender aos 3Rs. Estas entre outras vantagens, sugerem que o modelo embrião de galinha continuará oferecendo contribuições importantes para o crescimento no campo da Medicina Regenerativa dos tecidos ao longo dos próximos anos.



## 4. MÉTODOS

### 4.1. CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO

O presente estudo é primário, intervencional, experimental, longitudinal, prospectivo, descritivo, comparativo e realizado em centro único.

### 4.2. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram incluídos neste estudo, doadores de tecidos para obtenção de células, pacientes saudáveis e de ambos os gêneros com terceiros molares inclusos e intra-ósseo, com indicação clínica de remoção, nos estágios 2-3 segundo a classificação de DUAILIBI *et al.*, (2011) . A concordância na participação voluntária foi manifestada através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo I).

Em relação ao modelo foram incluídos ovos embrionados de *Gallus gallus domesticus* e com até três dias após a fecundação.

### 4.3. CRITÉRIOS DE NÃO-INCLUSÃO

Não foram incluídos os pacientes com utilização crônica ou pré operatória de medicação contendo drogas corticosteróides, cirurgias com indicação de odontosseção ou desgaste coronário, portadores de doenças infecto-contagiosas ou

anomalias dentárias de qualquer natureza, terceiros molares com exposição coronária, contaminados ou próximos a regiões contaminadas.

Em relação ao modelo não foram incluídos ovos não embrionados de *Gallus gallus domesticus*, com rachaduras ou deformidades na casca.

#### 4.4. AMOSTRA

No presente estudo foram utilizados nove ovos embrionados de *Gallus gallus domesticus*, da raça Lohmann, provenientes da granja *Yamaguishi*, postura recente de 24 a 48 horas, em experimentos independentes.

#### 4.5. OBTENÇÃO CELULAR

Contemplando os aspectos éticos da pesquisa científica com seres humanos, o presente projeto foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo – CEP/UNIFESP, com parecer registrado no protocolo nº1879/11, obedecendo a Resolução 196/96 (ANEXO II).

As células *human Dental Pulp Stem Cells (hDPSC)* foram obtidas a partir da explantação de polpa dentária de germes de terceiros molares humanos de doador voluntário atendido em consultório particular, sendo considerados como tecido de descarte cirúrgico. Os dentes inclusos com indicação clínica de extração foram cirurgicamente removidos, sob anestesia local, de acordo com protocolo descrito por TORRES *et al.*, (2010).

Os dentes foram transportados em meio de preservação Hank's Balanced Salt Solution (HBSS - LGC Biotecnologia, Brasil), sob a temperatura de 37°C até o Laboratório de Engenharia Tecidual e Biofabricação do Centro de Terapia Celular e Molecular (CTCMol) da UNIFESP, local onde foi realizado as etapas experimentais.

A separação do tecido não mineralizado foi realizada, por meio de explantação, em placa de Petri, com auxílio de lâmina número quinze e o cabo de bisturi número três, o material foi fragmentado em dimensões de 1mm<sup>2</sup>. Em seguida, realizou-se a transferência dos explantes para *well-plates* previamente submetidos ao tratamento de superfície adequado com soro fetal bovino (FBS - LGC Biotecnologia, Brasil). Este procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar.

#### 4.6. MANUTENÇÃO DAS CÉLULAS EM CULTURA

A troca dos meios foi realizada duas vezes por semana com meio convencional na proporção de 1:1 de *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM - LGC Biotecnologia, Brasil) e *Ham's F-12 nutrient mixture* (HAM'S F-12- LGC Biotecnologia, Brasil) suplementado com 5% de FBS e 0,5% dos antibióticos penicilina (LGC Biotecnologia, Brasil) e streptomicina (LGC Biotecnologia, Brasil). As células *hDPSC* foram mantidas em incubadora com atmosfera de 95% de umidade relativa, com 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) na temperatura de 37°C onde foram cultivadas até a segunda passagem, atingindo a confluência necessária com um total de células de 6x10<sup>6</sup> (Apêndice I).

#### 4.7. AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

As células *hDPSC* em cultura foram tripsinizadas conforme o protocolo do Laboratório de Engenharia Tecidual e Biofabricação (Apêndice III). Em seguida realizou-se a homogeneização do *pellet* formado em meio de cultura, por meio de aspirações e ejeções sucessivas, com auxílio de uma pipeta e pipetador automático. O volume de 10 microlitros foi retirado deste concentrado celular, misturado com o mesmo volume do corante *trypan blue* a 0,4% e novamente homogeneizado. Dez microlitros da solução corada foram transferidos para o espaço destinado na *chamber slide*<sup>®</sup>. A amostra foi introduzida no contador de células automático (Countess<sup>®</sup> – Invitrogen), que calculou a quantidade de células totais, vivas e mortas. Este procedimento foi realizado após a expansão celular e as tripsinizações.

#### 4.8. OBTENÇÃO DE IMAGENS

As células foram fotografadas em seu local de incubação sob microscopia óptica invertida modelo AXIOVERT 40C (Carl Zeiss<sup>®</sup>) por meio do Software AxioVison<sup>®</sup> 4.1 - Germany.

#### 4.9. PRODUÇÃO VIRAL

A produção viral e a transdução celular foram realizadas na Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas e no Instituto Butantã, Divisão de Ciências Fisiológicas e Químicas, Serviço de Bioquímica.

Para produção de vírus em sobrenadante, o vetor *lentiviral gene ontology* (LeGO-C2) foi transfectado nas células 293T, células de rim embrionário humanas. Após vinte e quatro horas de incubação, o sobrenadante viral foi coletado, centrifugado cinco min, 1000rpm e estocado a  $-80^{\circ}\text{C}$ . As células 293T produtoras foram analisadas para verificar a expressão do gene *reporter*.

Células NIH3T3, fibroblasto murino, foram plaqueadas com  $1,5 \times 10^5$  células em placa 35mm. No dia seguinte, foram infectadas com o sobrenadante viral, recolhido anteriormente em meio DMEM e adicionado de polibreno com uma concentração final de  $8 \mu\text{g ml}^{-1}$  e incubadas por 48 horas. Posteriormente, estas foram tripsinizadas, lavadas em Phosphate buffered saline (PBS) 1x e ressuspensas na concentração de  $1 \times 10^6$  células/mL em meio DMEM.

Após a produção do vírus LeGO-C2, as células *hDPSC* foram plaqueadas em placas de 35mm com  $2 \times 10^5$  células/placa e após de vinte e quatro horas transduzidas.

Foram utilizados os LeGo-C2 ultracentrifugados e concentrados em alíquotas de 10 $\mu\text{l}$  de meio HAM'S F-12, congelados. Os vírus foram descongelados, ressuspensos em meio DMEM/HAM'S F-12 com polibreno (900ng/ml) e adicionados às células plaqueadas anteriormente. Após a adição do LeGO-C2, as placas foram mantidas com um baixo volume de meio por quatro horas em estufa e, posteriormente, foi adicionado mais 2 ml de meio DMEM/HAM'S F-12 por placa e mantidas em cultura por mais quarenta e oito horas, para uma melhor eficiência de transdução. Após este período, alíquotas das suspensões celulares foram analisadas por citometria de fluxo para detecção da fluorescência do gene *reporter*.

As células *hDPSC* transduzidas com o vetor LeGO-C2 foram tripsinizadas, ressuspensas em meio e inoculadas numa concentração de  $1 \times 10^6$  células em 100 $\mu\text{l}$ .



#### 4.10. MARCAÇÃO CELULAR COM NANOPARTÍCULAS - *QTracker*

As células *hDPSC* foram marcadas com *Quantum Trackers* - *QTracker*<sup>®</sup>605nm (Invitrogen) que são microcápsulas que liberam nanocristais fluorescentes chamados *quantum dots* (*Qdots*) no citoplasma de células vivas usando um peptídeo ligante específico.

O primeiro passo consistiu no preparo da solução de marcação a 10 nM, realizando uma pré-mistura 1  $\mu$ L de cada *Qtracker* Componente A e Componente B em um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL. Em seguida foi incubado por cinco minutos em temperatura ambiente e prosseguiu imediatamente para a próxima etapa.

Após isso adicionou-se 0,2 mL de meio DMEM/HAM'S F-12 no tubo e foi colocado no vortex por 30 segundos. Em seguida foi adicionado  $1 \times 10^6$  células em meio DMEM/HAM'S F-12 para o tubo contendo a solução de marcação e incubado a 37°C por sessenta minutos. Por fim, as células foram lavadas por duas vezes com DMEM/HAM'S F-12 e inoculadas no embrião numa concentração de  $1 \times 10^6$  células.

#### 4.11. MODELO DO EMBRIÃO DE *Gallus gallus domesticus*

Os ovos foram recebidos em embalagens apropriadas de papelão, apoiados em posição vertical com a câmara de ar para cima. Foram inicialmente limpos, com algodão embebido em água morna, depois com álcool 70% e secos ao ar (Figura 5A). Após término da desinfecção, todos os ovos foram identificados com uma legenda escrita a lápis na casca, contendo as informações referentes à data de início de incubação e presença ou ausência de células (Figura 5B). A incubação foi realizada em uma incubadora Zagas modelo 401, para quarenta e dois ovos, na temperatura de

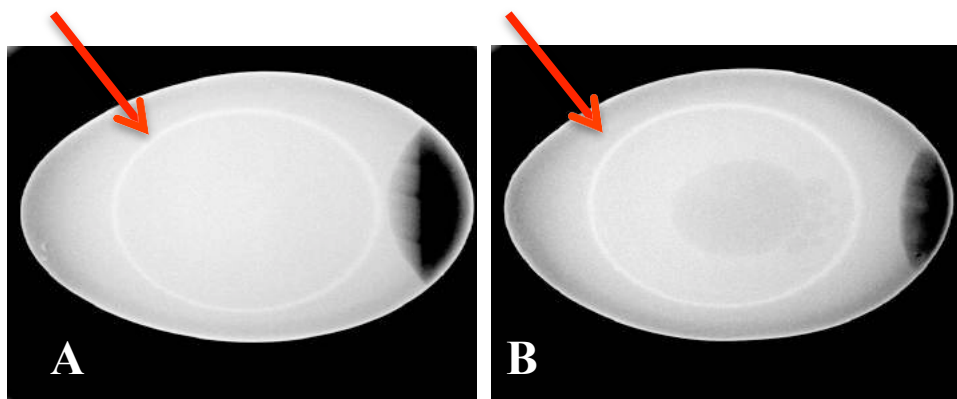
36,7°C, umidade relativa de 55%, na qual os ovos foram mantidos intactos até o terceiro dia (Figura 5C) para posterior inoculação das células em fluxo laminar para manter o ambiente estéril (Figura 5D).



**Figura 5: Higienização e identificação dos ovos** – Ovos previamente higienizados e secando ao ar (A), identificados à lápis com a data e o horário de incubação (B), incubados até o terceiro dia de desenvolvimento embrionário (C) e o preparo do ovo para a inoculação das células em fluxo laminar (D).

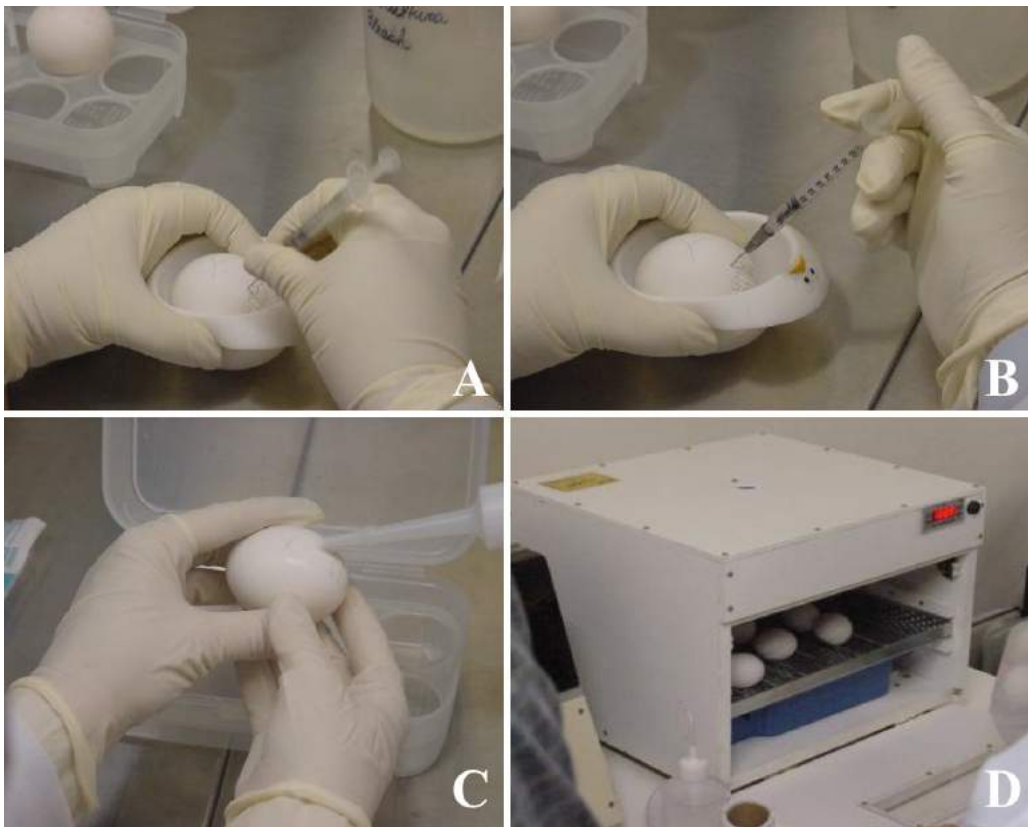
Os ovos foram classificados em três grupos –Grupo 1 Experimental *mCherry*, inoculação das células marcadas com *mCherry* – Grupo 2 Experimental *QTracker*, inoculação das células marcadas com *QTracker* –Grupo 3 Controle, sem inoculação de células (Apêndice I).

O orifício de inoculação foi previamente definido na região contrária a câmara de ar (Figura 6), para que as células fossem inoculadas diretamente na albumina para não influenciar o local de afinidade celular.



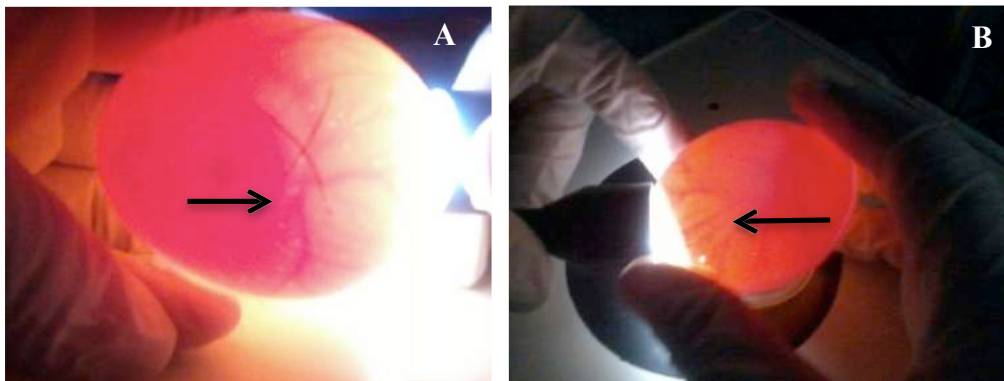
**Figura 6: Seleção da área de inoculação das células *hDPSC* no ovo embrionado –** Imagem radiológica, definiu a área na qual os ovos incubados até o terceiro dia de desenvolvimento embrionário seriam inoculados na albumina com células *hDPSC* na região contrária a câmara de ar.

As células *hDPSC* foram inoculadas através de um orifício na casca (Figura 7A), num volume de 100  $\mu\text{L}$  contendo  $1 \times 10^6$  células/ovo, que foi realizado no terceiro dia de incubação, em fluxo laminar (Figura 7B). Após a inoculação celular foi realizada a selagem do orifício pingando algumas gotas de álcool 70% para evitar contaminação (Figura 7C) e os ovos foram mantidos em incubadora de ovos até o 11º dia (Figura 7D).



**Figura 7: Etapas Experimentais** – Formação do orifício na casca do ovo com o auxílio de uma agulha 23G (A), inoculação das células *hDPSC*  $1 \times 10^6$ , com uma seringa agulhada, na albumina do ovo (B), selagem do orifício com álcool 70% (C) e manutenção dos ovos na chocadeira até o 11º dia (D).

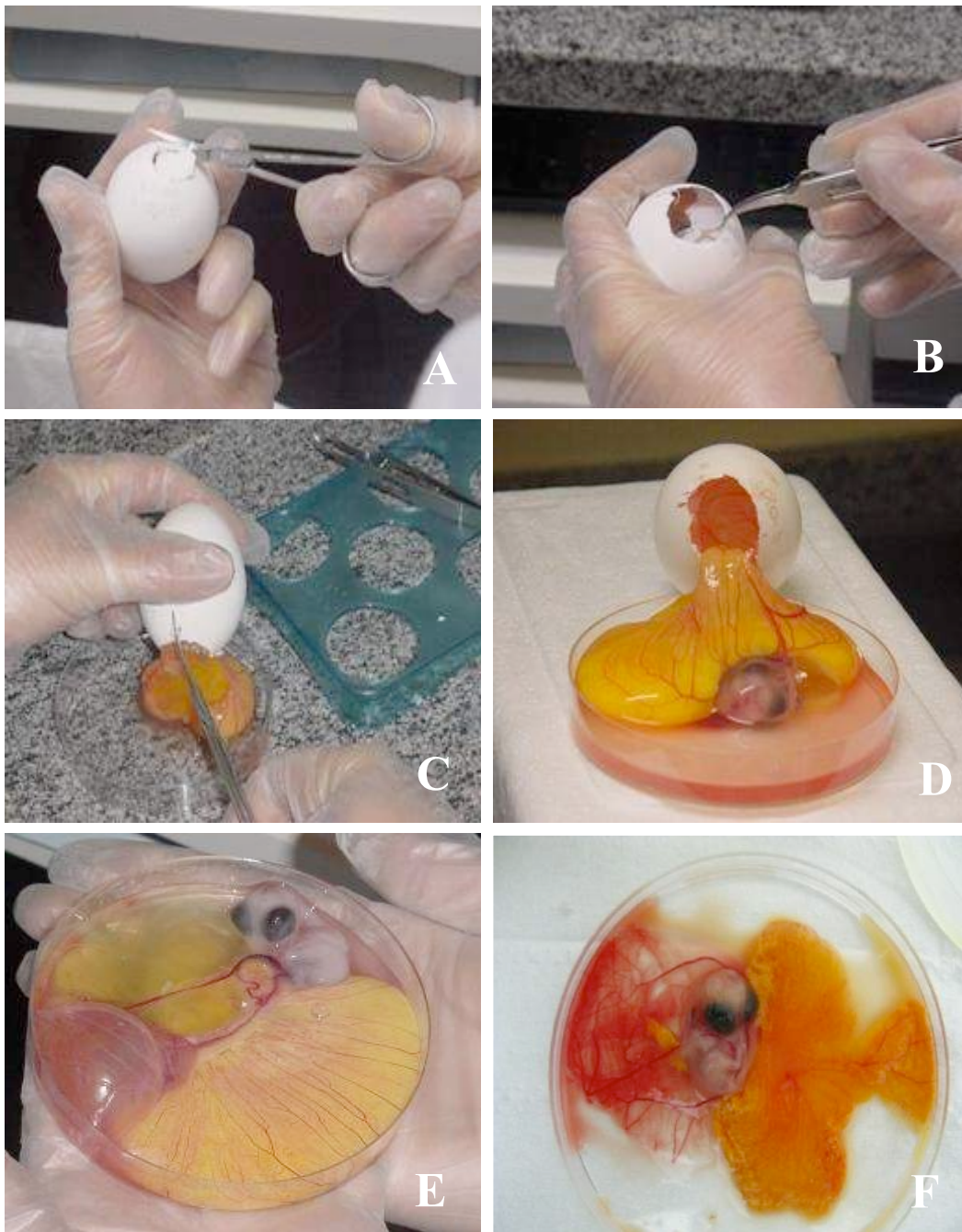
Os ovos foram observados a cada três dias, por meio de ovoscopia, para a constatação da viabilidade (Figura 8A e B). A coleta das CAMs, sacos vitelinos e dos embriões foram realizadas durante o décimo primeiro dia de incubação.



**Figura 8: Análise da viabilidade do embrião** – Ovoscopia realizada três dias após inoculação das células, observamos presença de vasos, motilidade e viabilidade do embrião (A,B).

#### 4.11.1. EUTANÁSIA DOS EMBRIÕES

No décimo primeiro dia, os ovos foram colocados na geladeira por uma hora para a diminuição da frequência cardíaca dos animais com um sacrifício por hipotermia antes da abertura da casca. A casca foi aberta com material cirúrgico delicado, como previamente descrito por PEREIRA-LOPES *et al.*, (2010) WILL *et al.*, (2011) (Figura 9A). Com o auxílio de uma pinça cirúrgica, expor o embrião (Figura 9 B,C) e cuidadosamente virar o ovo em uma placa de petri descartável e estéril (Figura 9 D, E, F).



**Figura 9: Etapas experimentais da eutanásia** – Recorte da casca do ovo na região da câmara de ar (A), retirada da membrana interna (B), exposição do embrião em placa de petri estéril (C,D) retirada da gema e separação do saco vitelino da CAM e do embrião (E,F).

## 4.12. ANÁLISES HISTOLÓGICAS

As análises histológicas foram realizadas no setor de histologia do Centro de Terapia Celular e Molecular e avaliadas a partir de colorações de Hematoxilina e Eosina, Tricrômio de Masson e PicroSirius para analisar as características morfológicas e diferenciação do tecido ósseo e cartilaginoso.

### 4.12.1. HEMATOXILINA E EOSINA – H&E

A coloração pela H&E é o principal método utilizado para a observação de preparados histológicos ao microscópio óptico. Por meio desta técnica, podemos diferenciar componentes basófilos e acidófilos do tecido estudado. A hematoxilina é um corante básico, ou seja, tem afinidade por substâncias ácidas (basófilas). Sendo assim, cora o núcleo e áreas do citoplasma que contenham elevada concentração de determinadas organelas, tais como o Retículo Endoplasmático Rugoso, locais, portanto, onde há grande quantidade de ácidos ribonucléico e desoxirribonucléico. A eosina é um corante ácido, tendo afinidade por substâncias básicas. Sendo assim, a eosina cora estruturas ricas em proteínas, por terem caráter básico em decorrência do grupo amino, corando o citoplasma, fibras colágenas e outras substâncias básicas das células.

#### Hematoxilina Harris

Inicialmente a hematoxilina foi dissolvida no álcool. Em seguida, o alúmen foi dissolvido na água aquecida, retirado do aquecimento e as duas soluções foram misturadas. A solução foi levada a ebulição rapidamente (agitando sempre) e

adicionado lentamente o óxido de mercúrio e foi deixado por um minuto depois foi retirado do fogo e colocado em água fria. Finalmente foi adicionado de 30 ml de ácido acético glacial e ficou em repouso por vinte e quatro horas em vidro âmbar.

#### Eosina Alcoólica

Primeiramente a eosina foi dissolvida em H<sub>2</sub>O destilada fria e deixada em repouso por cinco dias e a solução foi agitada diariamente. No quinto dia adicionou-se 500 ml de álcool absoluto.

Os cortes foram desparafinizados, hidratados e corados inicialmente com hematoxilina de Mayer durante quinze minutos depois foi corado com hematoxilina de Harris por dez minutos e por fim foi corado com a hematoxilina de Ehrlich durante dez minutos. Os cortes foram lavados água corrente por dez minutos. Foi realizada a diferenciação em álcool-ácido com uma solução alcoólica de HCl a 1% (1 ml de HCl em 99 ml de álcool 70%). Os corte foram rapidamente lavados em água corrente, depois corados pela eosina durante dois minutos e novamente lavados em água. Por fim passaram pela bateria de desidratação: álcool 70%, álcool 95%, álcool 100%, Xilol e as lâminas foram montadas.

#### 4.12.2. TRICRÔMIO DE MASSON

A coloração tricrômio de Masson é uma combinação de corantes usados em um protocolo de coloração de três cores em histologia. As formulações desta coloração envolvem a formulação original de Masson para diferentes aplicações, mas todas tem como finalidade distinguir células do tecido conjuntivo circundante. Produz coloração verde: na região de queratina e fibras musculares, azul ou verde em



colágeno e tecido ósseo, vermelho brilhante ou rosa no citoplasma e castanho escuro a preto nos núcleos das células.

Primeiramente as lâminas foram desparafinizadas em Xilol por cinco minutos. Em seguida, foram hidratadas em álcool 99%, 95%, 70% e lavadas em água corrente. As lâminas foram lavadas novamente com água destilada e secas. Em um béquer pequeno foi colocado vinte gotas de hematoxilina férrica de Weigert sobre o tecido onde ficou agindo por um minuto, depois foram diferenciadas, lavadas com água corrente e secas.

Em seguida as lâminas foram colocadas na solução mistura de ponceau contendo: ponceau de xilidina, fucsina , biebrich scarlat, ácido acético glacial e água destilada, por cinco minutos, em seguida as lâminas foram lavadas em água destilada rapidamente e secas. A seguir adicionou-se solução de ácido fosfomolibdico durante cinco minutos e as lâminas foram secas.

Finalmente as lâminas foram mergulhadas na solução de azul de anilina por cinco minutos, e após lavadas em água acética 1% durante cinco minutos, depois foram desidratadas, diafanizadas e finalizadas.

#### 4.12.3. PICROSIRIUS

O método de PicroSirius é a coloração da proteína colágena. As fibras colágenas mais espessas, fortemente birrefringentes apresentam-se coradas em tons de laranja, amarelo e vermelho e representam o colágeno tipo I, enquanto que as fibras mais finas e dispersas, fracamente birrefringente, apresentam-se coradas em verde, representando o colágeno tipo III.

As lâminas foram desparafinizados em xilol durante cinco minutos, hidratadas com álcool 99%, 95%, 70%, lavadas em água corrente e coradas com uma solução 0,1% de Sirius Red F3BA em solução aquosa saturada de ácido pícrico, durante 60 minutos. Depois passou pela solução 0,01 normal HCL por dois minutos e lavadas em água destilada.

Por fim, as lâminas foram coradas com hematoxilina de Harris por dois minutos, lavadas em água corrente por dez minutos e desidratadas, diafanizadas.

#### 4.13. IMUNOHISTOQUÍMICA

As amostras foram fragmentadas e colocadas em solução formol 10% em PBS (Dulbecco's phosphate buffer saline-DPBS, GibcoCo., USA), permanecendo por 48 horas para fixação. Em seguida o material foi desidratado em série de etanóis em concentrações crescentes (de 70 a 100%) e diafanizado em xilol, com posterior inclusão em Paraplast (Paraplast Embedding Media – Paraplast Plus, Oxford Lab., USA).

Os cortes de tecidos incluídos em parafina foram desparafinados em Xilol e hidratados em concentrações decrescentes de álcool etílico. Os cortes foram lavados com água deionizada. A recuperação de antígeno foi feita usando forno de micro ondas, potência máxima, em tampão citrato de sódio 10mM (pH6.0) por aproximadamente 3 minutos destampado e depois por mais três minutos tampado. Seguido de lavagem com água deionizada e aspiração do excesso de líquido das lâminas. O bloqueio das reações inespecíficas foi realizado com soro bloqueador por 20 minutos. As amostras foram, então, incubadas com os anticorpos primários

*proliferating cell nuclear* – PCNA antigen SC-56 – Santa Cruz Biotechnology e Ki67 Abcam<sup>®</sup> ab.15580 uma proteína nuclear necessária para proliferação celular, diluído em soro bloqueador a 0.5 – 5.0 mg/ml, em atmosfera úmida, *overnight*, em geladeira. As lâminas foram lavadas em PBS. As amostras foram incubadas por mais 30 minutos com o complexo *LSAB + SYSTEM Horseradish peroxidase* – HRP (mixture<sup>®</sup> - DAKO, North America U.S.A) *biotinylated link universal* e lavadas novamente em PBS. Em seguida foi adicionado *streptavidin* – HRP deixando agir por 30 minutos. Foram enxaguadas com água deionizada. A revelação foi feita com o *Imunocruz Staining System* SC-2050 – Santa Cruz Biotechnology, contra corada com hematoxilina de Harrys.

O material resultante desta reação imunohistoquímica foi analisado pelo software Image J. A análise foi realizada pela porcentagem da área ocupada pelos núcleos marcados positivamente para PCNA e o Ki67, para avaliar o potencial proliferativo na interação das células com o tecido embrionário.

#### 4.14. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores médios obtidos foram analisados pelo programa estatístico Prisma5<sup>®</sup> por meio da análise de variância (ANOVA), foi aplicado nos resultados com intervalo de confiança fixado em 95%.

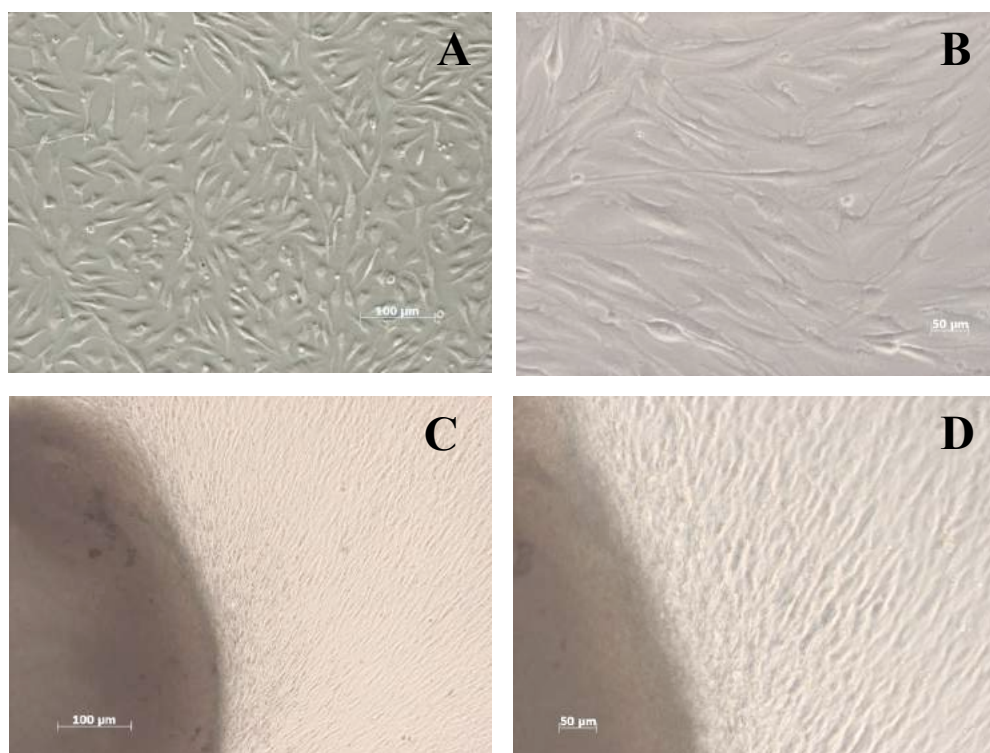
***RESULTADOS***

---

## 5. RESULTADOS

### 5.1. ANÁLISE CELULAR

As células *hDPSC* foram cultivadas até a segunda passagem, atingindo a confluência esperada (Figura 10 A, B, C e D). Após o cultivo as células foram divididas em dois grupo, no primeiro foi realizado a transdução viral com Lentivírus LeGO-C2 *mCherry* e o segundo marcado com *QTracker* 605nm, ambos com uma marcação no espectro vermelho.

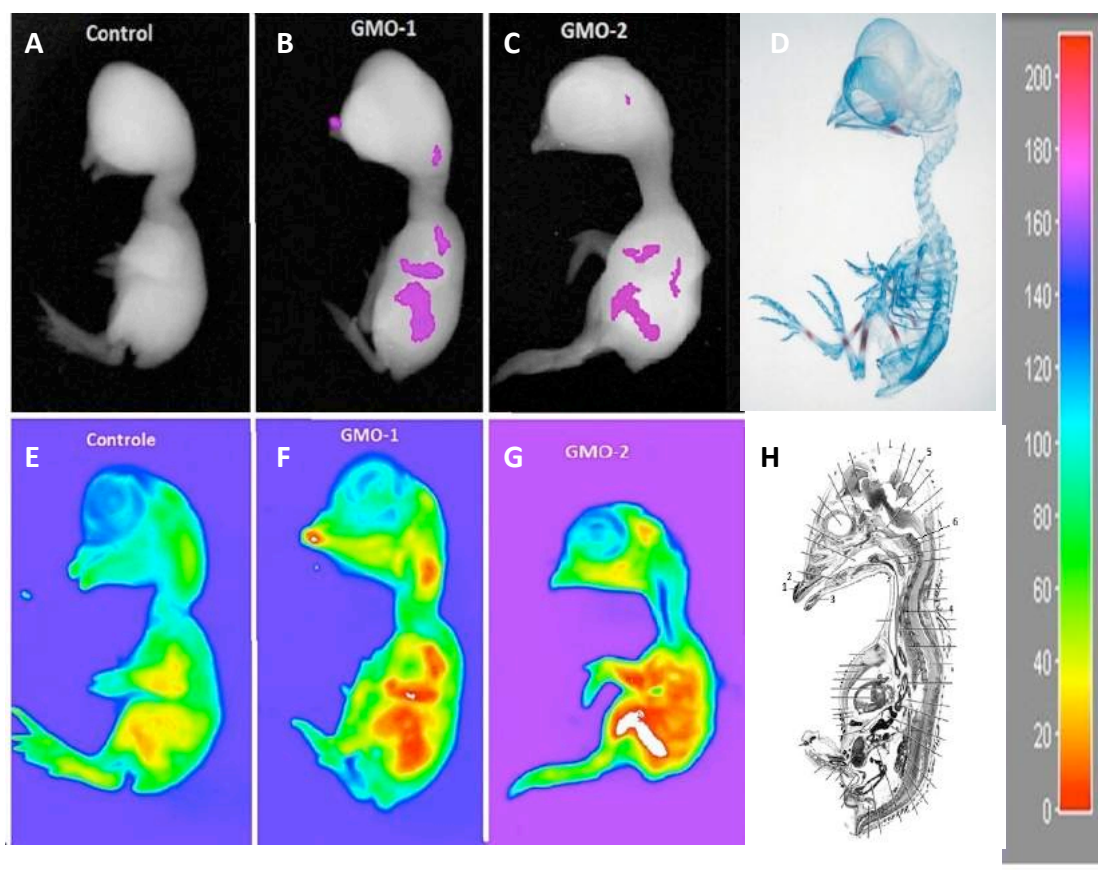


**Figura 10: Confluência das células *hDPSC*** – Células cultivadas até a 2<sup>a</sup> passagem para a marcação das células com lentivírus LeGO-C2 *mCherry* e com *QTracker* 605nm. Análise da proliferação celular em microscopia óptica com aumento de 5x (A) e 10 (x) e explante com desprendimento das células 5x (C) e 10x (D).

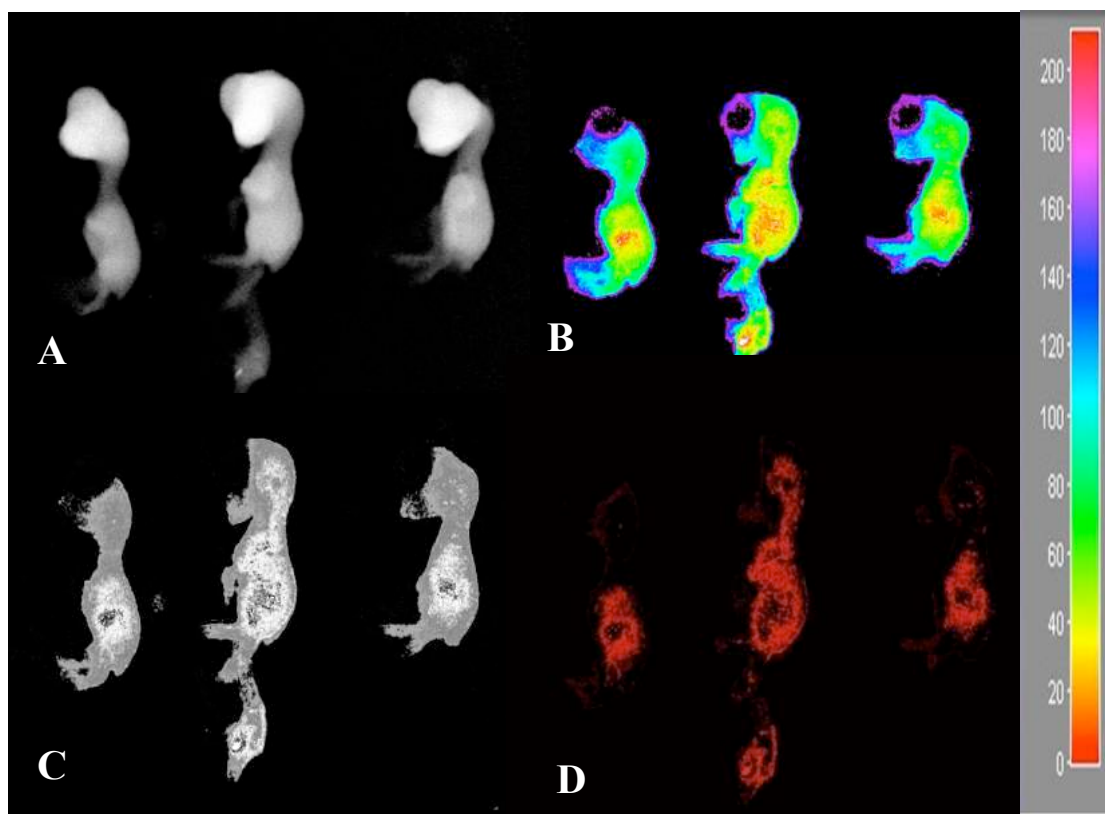
## 5.2. ANÁLISE DA FLUORESCÊNCIA, RAIOS X E LUMINESCÊNCIA POR MEIO DO SISTEMA KODAK *in vivo* MSFXPRO (CARESTREAM)

### 5.2.1. FLUORESCÊNCIA E RAIOS X

As imagens mostraram uma interação célula-tecido que determinaram o *homing* e as células transduzidas migraram para as regiões de mineralização do embrião (Figura 11). Alta intensidade de fluorescência foi observada, no dente do bico e ossos dentário, maxila, pernas e asas. Nas células marcadas com *QTracker*, observamos que elas também migraram para regiões mineralizadas porém, se concentraram na região dorsal do embrião e na região de membros inferiores (Figura 12). Estes dados adicionam à literatura precedente sobre a potencialidade das células-tronco de polpa dentária humana como fonte de células-tronco para terapia celular, especialmente para engenharia de tecidos dentários.



**Figura 11: Análise de fluorescência por meio do sistema Kodak *in vivo* grupo *mCherry*** – Registro de sinal de fluorescência em regiões anatômica distintas em embrião de *Gallus gallus domesticus* com 11 dias (pós postura), a fluorescência com código de cores foi colocada sobre uma imagem de raio-X, para melhor localizar o sinal de fluorescência das células *hDPSC* marcadas com *mCherry*. (A) – Controle, (B,C) região com maior intensidade de fluorescência, (D) embrião diafanizado, demonstra que na região em azul apresenta membranas e cartilagem, região em vermelho tecido ósseo (Adaptado de BELLAIRS & OSMOND, 2005), (E,F,G) região espectralmente distintas de fluorescência, vermelho maior intensidade de fluorescência, (H) Corte sagital do plano 1. dente do bico, 2. maxila, 3. osso dentário, 5. cerebelo, 6. atlas (Adaptado de BELLAIRS & OSMOND, 2005).

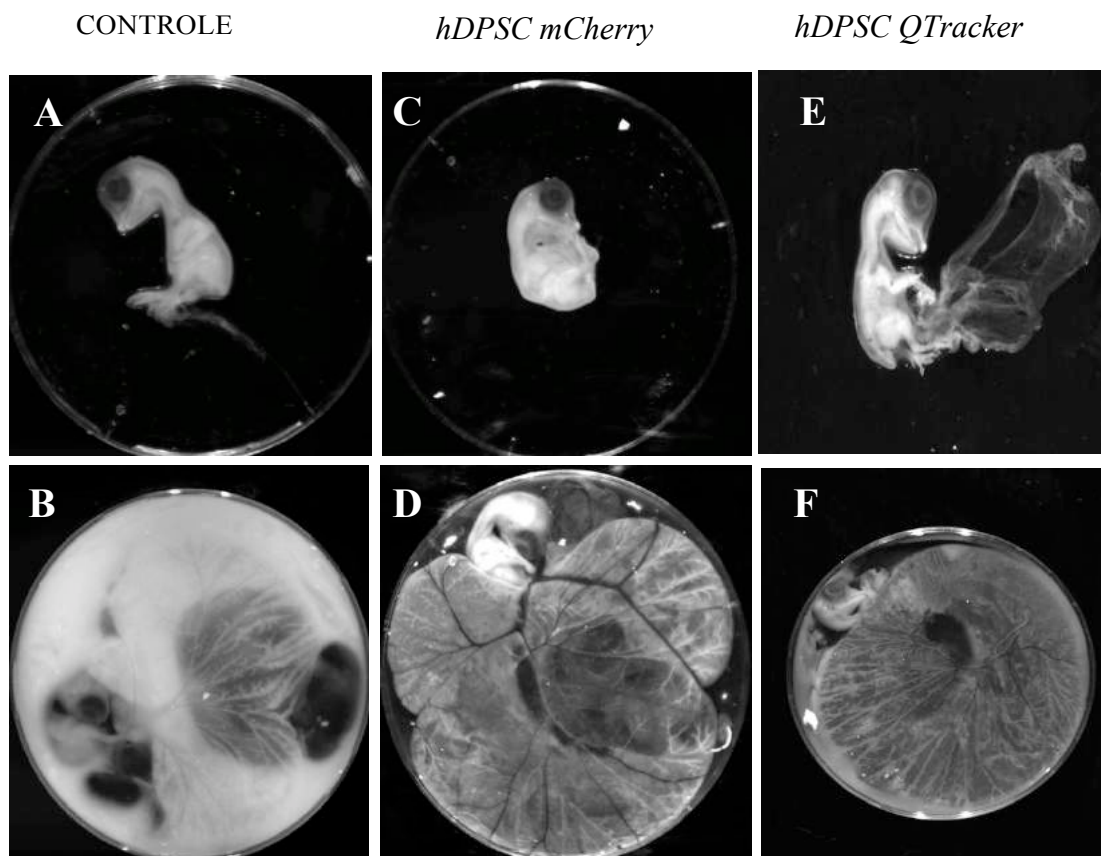


**Figura 12:** Análise de fluorescência por meio do sistema Kodak *in vivo* grupo *QTracker* – Imagem radiográfica (A), imagem fluorescente com as células marcadas com *QTracker* (B) região espectralmente distintas de fluorescência, *overlay* da imagem radiográfica com a fluorescente com escalas de cinza (C) e com filtro de rodamina faloidina (D).

### 5.2.2. LUMINESCÊNCIA

O grupo controle (Figura 13 A e B) apresenta menor intensidade de luz absorvida em relação aos grupos experimentais, tanto com a transdução viral com *mCherry* (Figura 13 C e D) quanto com a marcação com *QTracker* (Figura 13 E e F), que apresentam uma maior transmissão da luminescência.



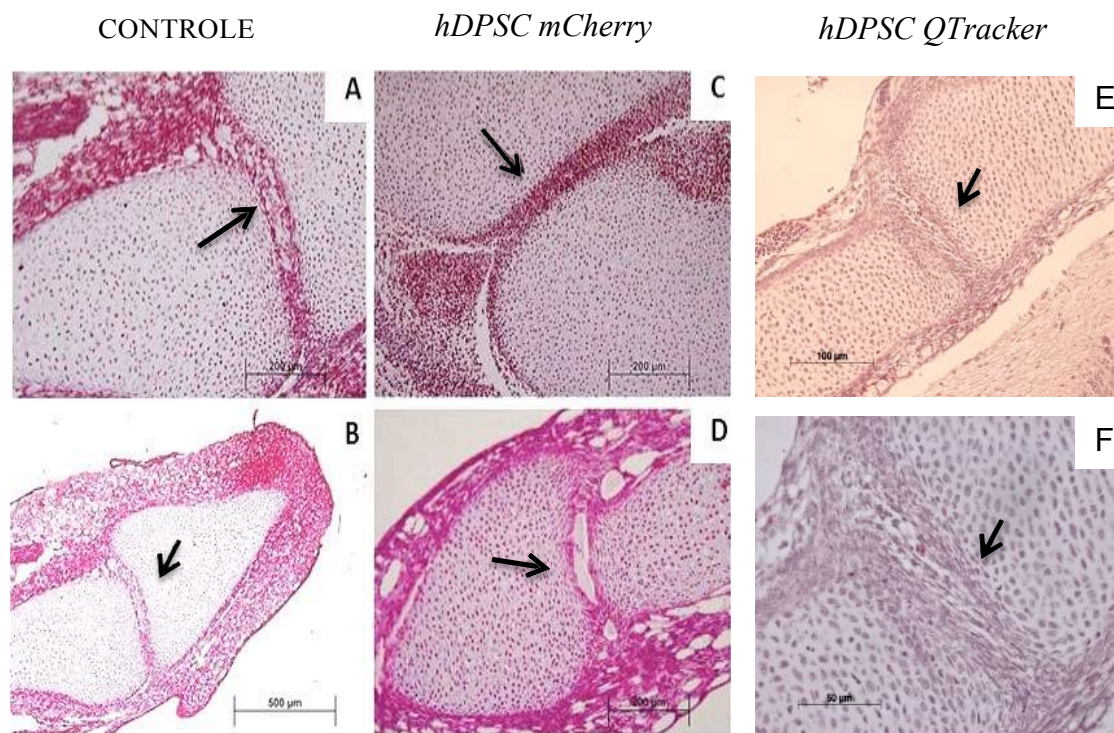


**Figura 13: Análise da luminescência** – Exposição do embrião de *Gallus gallus domesticus* e seus anexos embrionários em luminescência, Grupo Controle (A, B) com menor transmissão de luminescência e Grupo Experimental *hDPSC* marcadas com *mCherry* (C, D) com aumento da absorção da luz transmitida assim como o Grupo Experimental *hDPSC* marcadas com *QTracker* (E, F).

### 5.3. ANÁLISE HISTOLÓGICA

Com coloração de H&E as características morfológicas do grupo controle mantiveram-se inalteradas (Figura 14 A e B), já os grupos que receberam a inoculação das células *hDPSC* marcadas com *mCherry* demonstraram um aumento da proliferação celular nas junções ósseas (Figura 14 C e D) e os grupos que receberam

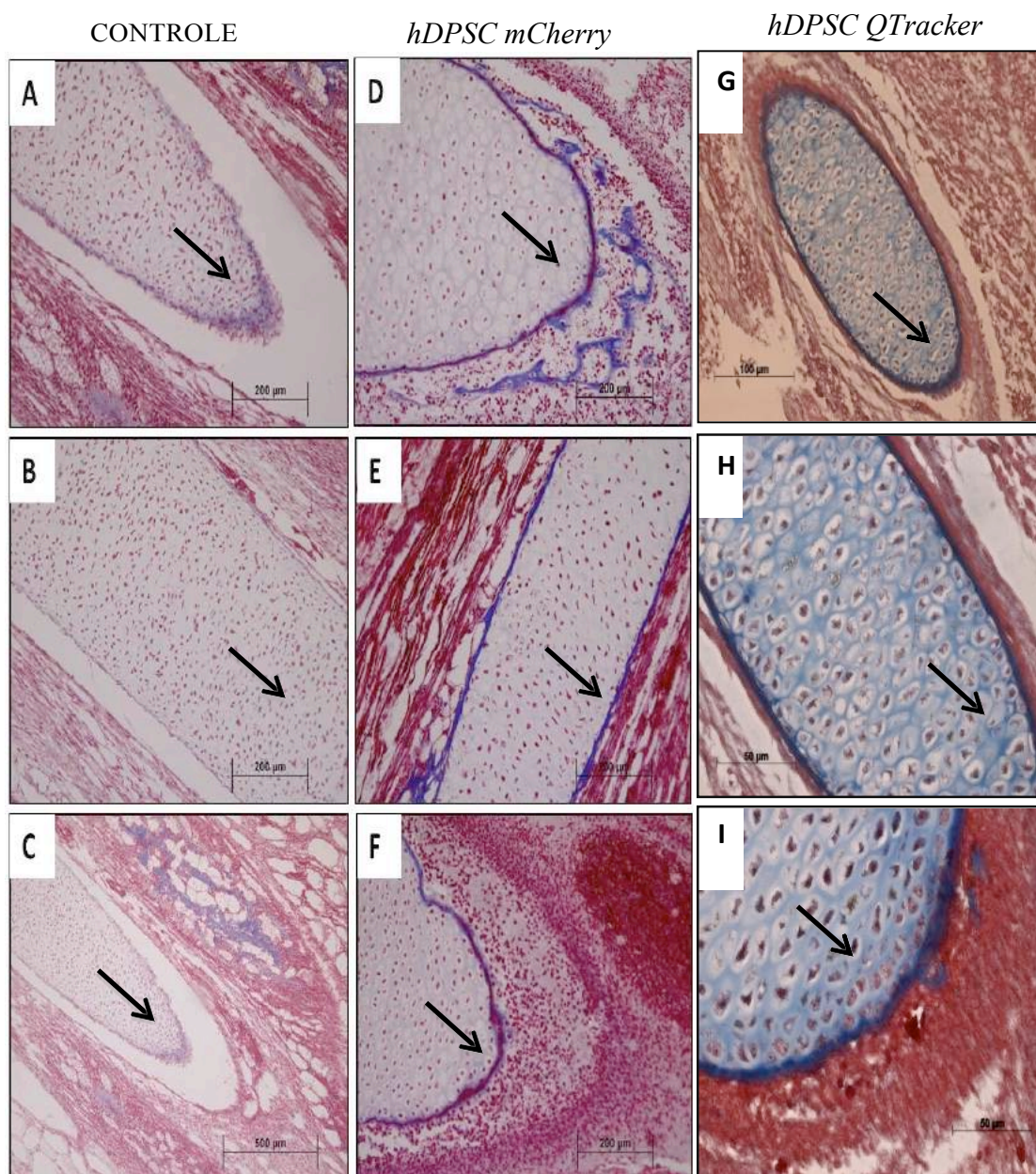
a inoculação das células *hDPSC* marcadas com *QTracker* demonstraram também um aumento da proliferação celular nas junções ósseas (Figura 14 E e F).



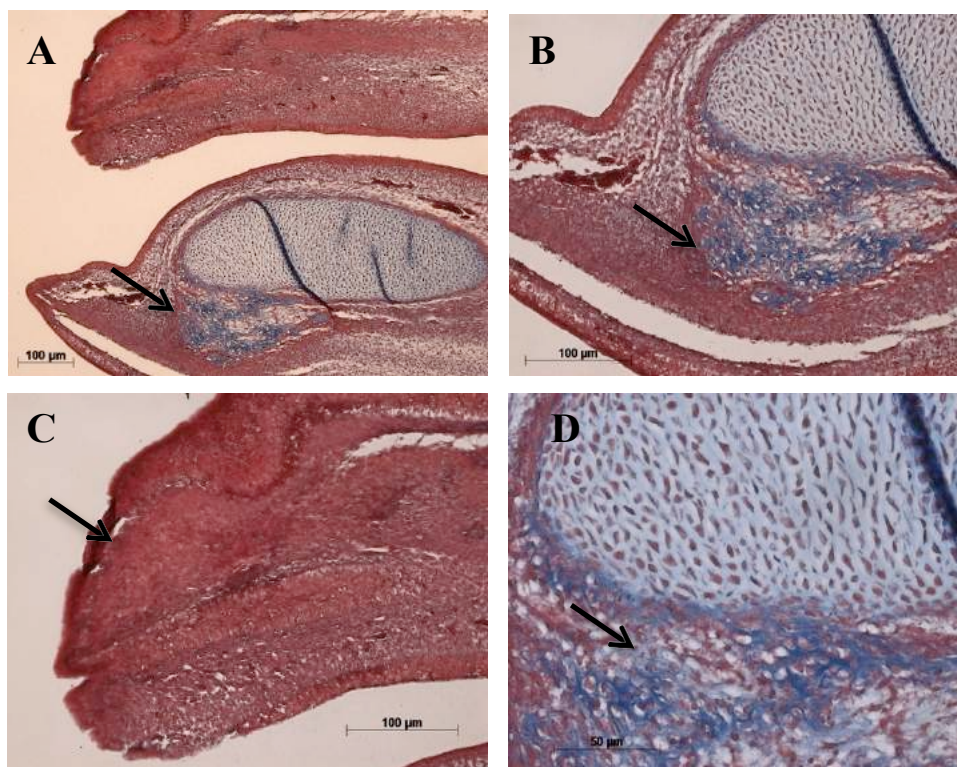
**Figura 14: Coloração de H&E** – Grupo controle (A e B), aumento da proliferação na junção óssea, condrócitos maduro nos grupos que receberam a inoculação das células *hDPSC* marcadas com *mCherry* (C e D) e também nos grupos que receberam a inoculação das células *hDPSC* marcadas com *QTracker* (E e F).

A coloração de Tricrômio de Masson confirmou o que foi mostrado com as análises de H&E, que no grupo controle as características morfológicas mantiveram-se inalteradas (Figura 15 A, B e C), já os grupos que receberam a inoculação das células *hDPSC* marcadas com *mCherry* demonstraram um aumento na proliferação de tecido ósseo e um aumento relativo de colágeno (Figura 15 D, E e F) e os grupos que receberam a inoculação das células *hDPSC* marcadas com *QTracker* demonstraram também um aumento na proliferação de tecido ósseo e um aumento relativo de

colágeno (Figura 15 G, H, e I). A região do bico do embrião mostrou um aumento de condrócitos maduros e imaturos, aumentado a região óssea em torno da maxila (Figura 16 A, B e D) e um aumento celular na região do dente do bico (Figura 16 C).



**Figura 15: Coloração Tricrômio de Masson** – Grupo controle (A, B e C), grupo experimental *hDPSC* marcadas com *mCherry* apresentam condrócitos maduros e aumento da proliferação óssea (D, E e F). *hDPSC* marcadas com *QTracker* também apresentaram condrócitos maduros e aumento da proliferação óssea (G, H e I).

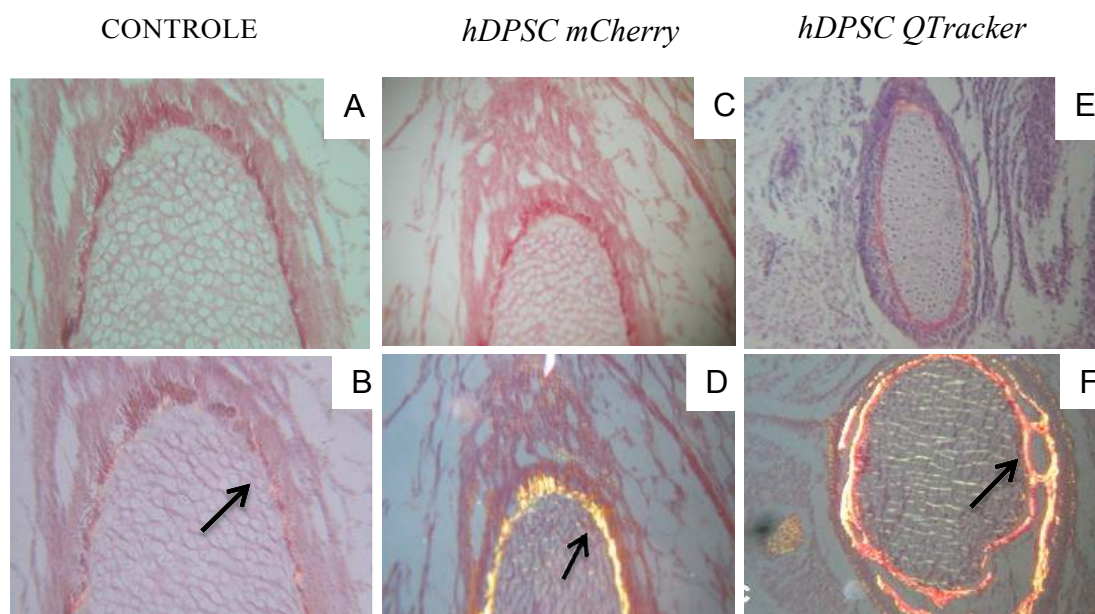


**Figura 16: Coloração Tricrômio de Massongrupo QTracker** – Embrião inoculado com células *hDPSC* marcadas com *QTracker* apresentaram condrócitos maduro na região do bico e dente do bico (A, B, C, D).

As lâminas coradas com PicroSirius foram analisadas em microscópio de luz polarizada, as imagens mostraram que o grupo controle apresenta pouca birrefringência para colágeno tipo I (Figura 17 A e B), os grupos que receberam a inoculação das células *hDPSC* marcadas com *mCherry* (Figura 17 C e D) e os grupos que receberam a inoculação das células *hDPSC* marcadas com *Qtracker* (Figura 17 E e F) apresentaram as fibras colágenas mais espessas, fortemente birrefringentes apresentaram-se coradas em tons de amarelo confirmando a presença de colágeno tipo I.

Essa coloração permite uma análise das fibras colágenas do tecido conjuntivo, através da diferente interferência de cores, intensidade e birrefringência dos tecidos

corados, diferenciando principalmente as fibras tipo I e tipo III. As fibras tipo I se apresentam como fibras grossas, altamente birrefringentes e na cor vermelha, enquanto que as fibras tipo III se apresentam em feixes finos, com fraca birrefringência e na cor amarelo-esverdeado.

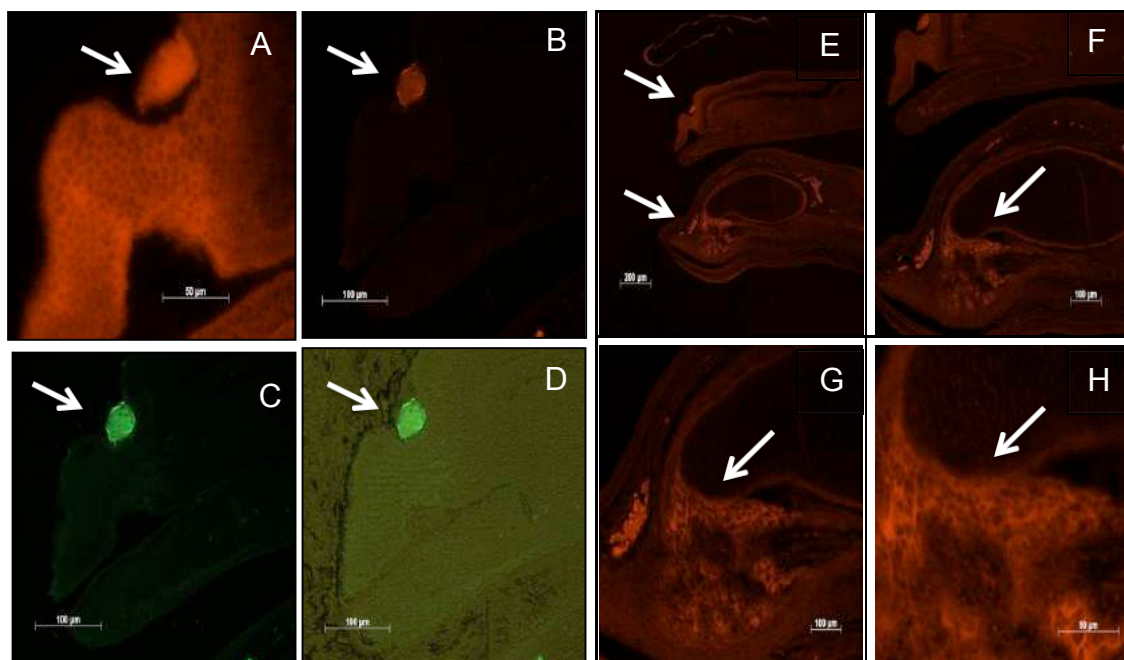


**Figura 17: Coloração de PicroSirius** – Grupo controle analisados em microscopia óptica (A) e na luz polarizada com polarizador cruzado (B) mostrando uma linha tênue de colágeno, grupo experimental *hDPSC* marcadas com *mCherry* analisados em microscopia óptica (C) e na luz polarizada com polarizador cruzado (D) e grupo experimental *hDPSC* marcadas com *QTracker* analisados em microscopia óptica (E) e na luz polarizada com polarizador cruzado (B), analisados em microscopia de luz polarizada(F).

#### 5.4. ANÁLISE EM MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

Foram realizadas análises em microscopia de fluorescência no grupo que recebeu a inoculação das células *hDPSC* marcadas com *QTracker*, na região do dente

do bico observou-se que à presença de uma estrutura calcificada e altamente fluorescente, com o filtro de rodamina faloidina (Figura 18 A e B) e no filtro FITC (Figura 18 C e D). A região da maxila do embrião mostrou uma fluorescência nas áreas de maturação óssea demonstrando que à presença de células fluorescentes nesta região (Figura 18 E, F, G e H). O grupo que recebeu a inoculação das células *hDPSC* marcadas com *mCherry* não demonstrou fluorescência devido ao fato de que após a fixação do embrião na lâmina não tem como rastrear as células *hDPSC*, pois a fluorescência não pode ser captada.



**Figura 18: Análise de fluorescência grupo *QTracker*** – Embrião inoculado com células *hDPSC* marcadas com *QTracker*, apresentam condrócitos maduro na região do bico, região de tecido mineralizado.

Com base nos dados analisados em microscopia óptica, microscopia de luz polarizada e análises análise da fluorescência, raio x e luminescência por meio do sistema Kodak *in vivo*, de forma descritiva, a migração e proliferação das células *hDPSC* no modelo de *Gallus gallus domesticus* e presença de fluorescência nos

grupos experimentais marcados com a transdução viral com Lentivírus LeGO-C2 *mCherry* com *QTracker* 605nm (Tabela 1).

**Tabela 1:** Descrição da migração, diferenciação celular quanto a presença ou não de fluorescência das células inoculadas no modelo de *Gallus gallus domesticus*.

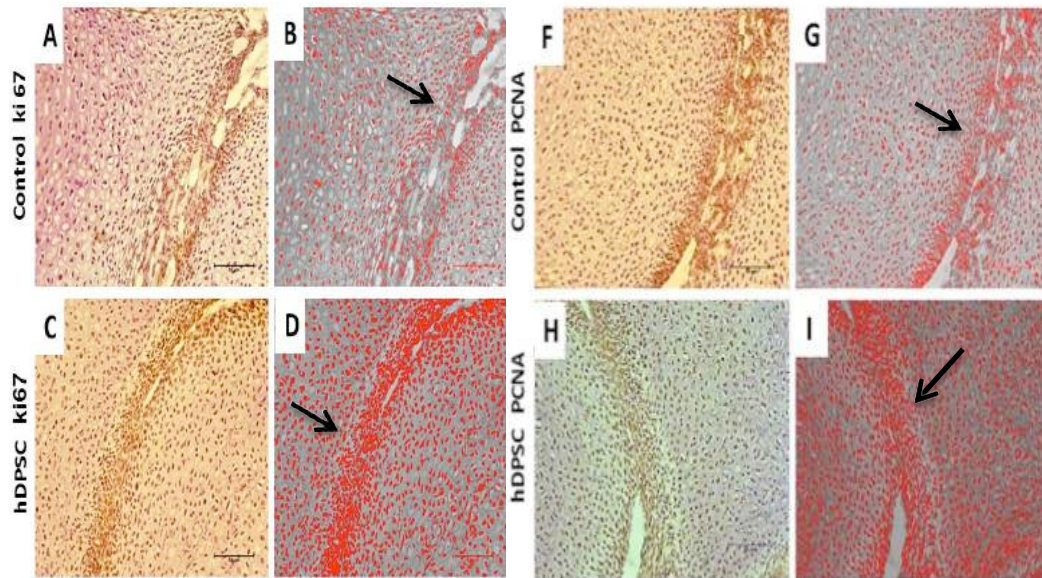
	MIGRAÇÃO CELULAR	DIFERENCIAÇÃO CELULAR	FLUORESCÊNCIA
<b>CONTROLE</b>	NÃO	NÃO	NÃO
<i>mCherry</i>	SIM	SIM	SIM
<i>QTracker</i>	SIM	SIM	SIM

## 5.5. ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA

A imunoexpressão de Ki67 foi observada nas regiões nucleares dos condrócitos nas regiões de cartilagens do embrião e tecidos mineralizados (Figura 19 A-D) com intensidade forte nos grupo dos animais que receberam a inoculação das células de *hDPSC* (Figura 19 C e D). Foi também observado que estes animais expressaram uma quantidade significativas maior de células que expressaram a proteína Ki67 (  $p < 0,01$ ) (Figura 20 A).

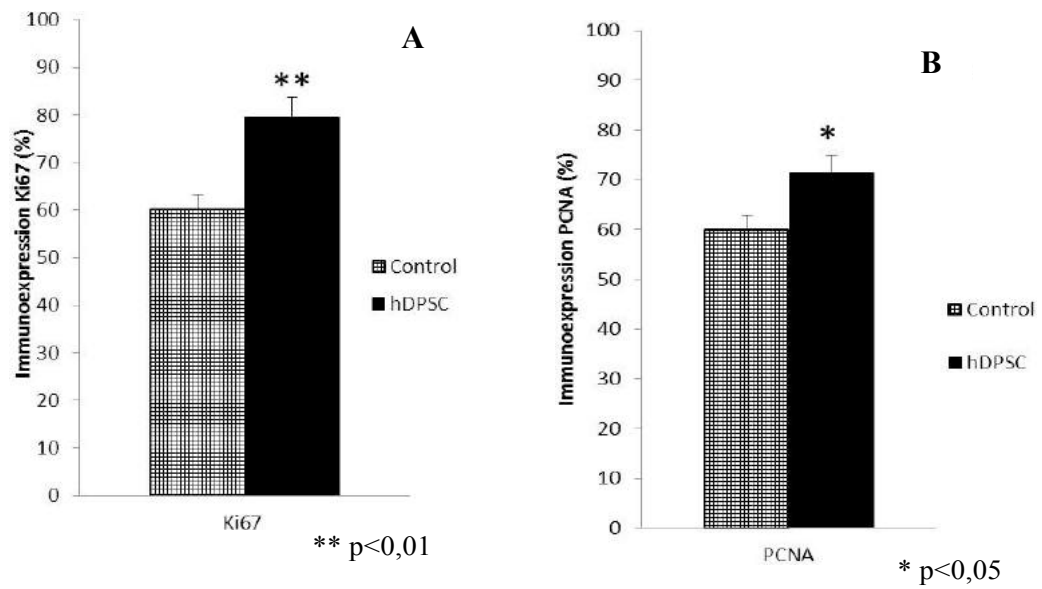
A imunoexpressão de PCNA foi observada nas regiões nucleares dos condrócitos nas regiões de cartilagens do feto e tecidos mineralizados (Figura 19 F-I)

com intensidade forte nos grupo dos animais que receberam a incubação de células de *hDPSC* (Figura 19 H e I). Foi também observado que estes animais expressaram uma quantidade significativas maior de células que expressaram a proteína PCNA com ( $p < 0,05$ ) (Figura 20 B).



**Figura 19: Análise imunohistoquímica** – Grupo controle, sem inoculação de células *hDPSC* com baixa imunoexpressão para Ki67 (A e B) e PCNA(F, G), grupo experimental com inoculação de células *hDPSC* com aumento da imunoexpressão de Ki67 (C, D) e aumento da imunoexpressão de PCNA (H, I).





**Figura 20: Análise imunohistoquímica –** Quantificação da imunoexpressão de Ki67 (A) e PCNA (B) nas células *hDPSC* inoculadas nos embriões de *Gallus gallus domesticus*.



## 6. DISCUSSÃO

Com os avanços na ET, os métodos utilizados para obtenção de populações celulares de células tronco dentais, incluem tanto modelos *in vitro* quanto modelos *in vivo* como descreveram LANGER & VACANTI ,1993; KIKUCHI *et al.*, 1994; BRAUT *et al.*, 2003 em busca da construção de um substituto biológico ideal que tenha uma aplicabilidade de relevância clínica em humanos no futuro de acordo com GRONTHOS *et al.*, 2000; YOUNG *et al.*, 2002; DUAILIBI *et al.*, 2004; DUAILIBI *et al.*, 2008; DUAILIBI *et al.*, 2011.

O potencial proliferativo e a capacidade regenerativa de células provenientes de dentes terceiros molares tem sido amplamente reconhecido para aplicação em Medicina Regenerativa, por sua capacidade de diferenciação em diversos tipos celulares amplamente descrita por BATOULI *et al.*, 2003; MIURA *et al.*, 2003; ESTRELA *et al.*, 2011; SUJESH *et al.*, 2012; LA NOCE *et al.*, 2014 resultados que contribuíram de forma positiva uma vez que corroboram com os achados no presente estudo, a cultura celular demonstrou ter um bom potencial proliferativo e essas células, uma vez inoculadas no modelo de *Gallus gallus domesticus* apresentaram sua capacidade de diferenciação e proliferação.

Dentre os diversos modelos *in vivo* utilizados na ET, o modelo de *Gallus gallus domesticus* foi escolhido baseado no princípio dos 3Rs conforme salientou MATTHIESSEN *et al.*, 2003, além de ser um modelo que apresenta facilidade de manipulação dos embriões, o curto espaço de tempo de incubação, capaz de sustentar os tecidos enxertados e células sem restrições espécie-específicos de acordo com os relatos de STERN, 2005; YALCIN *et al.*, 2010.

Uma vez escolhido o modelo experimental, a necessidade de um marcador fluorescente para rastrear e avaliar as células como descrito por MICHALET *et al.*, 2005. Baseado no conceito acima definiu-se dois marcadores amplamente descritos na literatura: a marcação através da transdução celular com um vetor viral conjugado a uma proteína fluorescente monomérica descrito por WEBER *et al.*, 2008; SHANER *et al.*, 2008; WEBER *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2014; e um marcador celular com nanopartículas fluorescentes de acordo com os relatos de MICHALET *et al.*, 2005; BRUCHEZ, 2005; INVITROGEN, 2007.

Durante o decorrer do presente estudo o embrião de *Gallus gallus domesticus* desenvolveu-se sem alterações morfológicas, as células *hDPSC* migraram e se diferenciaram no embrião que não as rejeitou devido à sua fase do desenvolvimento, quando o sistema imunocompetente não está totalmente desenvolvido e as condições de rejeição ainda não estão estabelecidas conforme descreveram RIBATTI *et al.*, 1996; RIBATTI *et al.*, 2001; GILBERT, 2006; BOILLAND *et al.*, 2010; WEST *et al.*, 2011; SMITH *et al.*, 2013.

O método utilizado para avaliar o embrião de *Gallus gallus domesticus* não foi o mesmo descrito por WEST *et al.*, 2011 pois o primeiro método foi o da janela aberta, que é possível acompanhar o crescimento do embrião sem ovoscopia, e tem como dificuldade a alta taxa de contaminação, pois os ovos ficam mantidos em incubadora devidamente higienizados porém não estéril, e o método *shell-less* no qual o embrião é mantido em placa de Petri, deixa o embrião muito exposto, apresenta alta taxa de contaminação o que inviabilizaria o presente estudo. Com isso fez-se uma inoculação por meio da formação de um orifício na casca que diminui o risco de contaminação e aumenta a viabilidade do embrião.

No momento em que as células foram inoculadas no embrião de *Gallus gallus domesticus*, este se encontrava no terceiro dia de desenvolvimento onde apresentou: os botões dos membros a pigmentação acinzentada dos olhos, completa rotação do corpo, assim como a flexura cervical acentuada e o dobramento para frente do botão caudal de acordo com a classificação de HAMBURGER & HAMILTON, 1951.

A ovoscopia dos embriões de *Gallus gallus domesticus* foi realizada no sétimo dia de incubação quando ocorreu o dobramento da perna no joelho, apresentou uma boa demarcação dos três segmentos de membros inferiores e superiores de acordo com a classificação de HAMBURGER & HAMILTON, 1951.

No momento da eutanásia dos embriões de *Gallus gallus domesticus*, foram adotados critérios de classificação de acordo com a semelhança anátomo morfológico tecidual descrita por HAMBURGER & HAMILTON, 1951; nos achados o grupo controle manteve a estrutura dorsal, tamanho, membros inferiores e superiores, desenvolvimento de órgãos e tecidos similar ao embrião de onze dias, os grupos que receberam a inoculação de células *hDPSC* apresentaram menor tamanho, estrutura dorsal, membros inferiores e superiores em relação ao grupo controle e o desenvolvimento de alguns órgãos e tecidos se apresentaram um pouco alterados como: o dente do bico que apresentou-se mais calcificado do que o grupo controle.

Em relação aos tecidos extra embrionários, do presente estudo como: CAM e saco vitelino que no grupo controle mantiveram-se inalterados, já nos grupos que receberam a inoculação das células *hDPSC* as CAMs apresentaram um aumento nos grandes vasos e diminuição da microcirculação e os sacos vitelinos apresentaram diminuição dos grandes vasos e aumento da microcirculação, o que difere do

apresentado por GILBERTS, 2006 como um desenvolvimento trivial do embrião de *Gallus gallus domesticus*.

O aspecto histológico da coloração de H&E do presente estudo, o grupo controle apresentou as mesmas características histomorfológicas descrita por BELLAIRS & OSMOND, 2005; nos resultados encontrados em ambos os grupos que receberam a inoculação das células *hDPSC* demonstraram uma aumento na junção óssea e presença de condrócitos maduros, achados que foram encontrados pela primeira vez em modelo de *Gallus gallus domesticus* com células *hDPSC*.

Os resultados referentes à coloração de Tricrômio de Masson mostraram que, o grupo controle manteve suas características histomorfológicas preservadas. Ambos os grupos que receberam a inoculação das células *hDPSC* revelaram que ocorreu um aumento da proliferação do tecido ósseo e um aumento relativo de colágeno nas regiões de tecidos mineralizados. As fibras colágenas do tecido conjuntivo, conferindo a coloração azul a todas estas fibras, porém não permitindo a diferenciação entre os tipos I e III.

O grupo que recebeu as células *hDPSC* marcadas com *QTracker* apresentou um aumento celular na região do bico com um aumento de condrócitos maduros e imaturos, com aumento da região óssea em torno da maxila. Esses achados foram analisados em microscópio de fluorescência, as células *hDPSC* ali presentes apresentaram um grande espectro fluorescente no filtro de rodamina faloidina e FITC demonstrando um aumento de condrócitos maduros no tecido mineralizado. Uma vez que não foi possível comparar com o grupo que recebeu as células *hDPSC* marcadas com *mCherry* devido ao fato de que este fluorescente não pode ser rastreado em estruturas fixadas. Com isso o marcador *QTracker* obtém uma vantagem em relação

ao lentivírus, uma vez que este apresenta relatos controversos e limitações quanto a utilização, devido o surto de gripe aviária, restringindo conseqüentemente o uso de partículas virais.

Em relação aos achados com a coloração de Picro Sirius, analisada com microscopia óptica de luz polarizada, o grupo controle apresentou pouca birrefringência para colágeno tipo I e no grupo experimental que recebeu a inoculação das células *hDPSC* as fibras colágenas estavam mais espessas, fortemente birrefringentes apresentando-se corada em tons de amarelo confirmando a presença de colágeno tipo I no qual demonstrou que o colágeno pode ser sintetizado por vários tipos celulares, além dos fibroblastos, como osteoblastos, odontoblastos, condrócitos e células musculares lisas.

O teste ANOVA demonstrou que o grupo controle não apresentou resultados relativos em relação à imunexpressão das proteínas Ki67 e PCNA, os embriões dos grupos que receberam a inoculação das células *hDPSC* expressaram uma quantidade significativa de células que expressaram a proteína Ki67 ( $p < 0,01$ ) e uma quantidade significativa de células que expressaram a proteína PCNA ( $p < 0,05$ ).

Baseado nos resultados do presente estudo, acredita-se que o uso de um marcador que não apresente nenhum risco, tanto para a célula quanto para o modelo, e que sua fluorescência possa ser rastreada, quantificada e difundida totalmente da auto fluorescência que o embrião produz, seja desejável e viável para avaliar todas as interações células-tecido hospedeiro.

Devido à estabilidade da fluorescência *Qtracker* através de várias gerações e ausência de vetor viral, a utilização deste marcador mostrou-se mais segura para um

futuro ensaio de modelo *in vivo*. No entanto serão necessários maiores estudos em nível molecular para avaliar possíveis danos genéticos a longo prazo.

Neste contexto, o desenvolvimento de técnicas mais específicas e o aprimoramento da metodologia serão importantes para determinar como as células se comportam em um organismo *in vivo*.



***CONCLUSÕES***

---

## 7. CONCLUSÕES

Acreditamos ser lícito concluir com que este estudo que o modelo do embrião de *Gallus gallus domesticus* mostrou-se eficiente para o rastreamento de células tronco de polpa dental humana. Ambos os marcadores demonstraram-se satisfatórios para a análise de migração e diferenciação celular. Os dois grupos apresentaram a mesma intensidade de fluorescência.

***REFERÊNCIAS***

---

## 8. REFERÊNCIAS

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 Den Res.* 2003; 82:976-81.

BOULLAND J, HALASI G, KASUMACIC N, GLOVER JC. Xenotransplantation of Human Stem Cells into the Chicken Embryo. *J. Vis. Exp.* 2010;41:e2071.

BRAUT A, KOLLAR EJ, MINA M. Analysis of the odontogenic and osteogenic potentials of dental pulp in vivo using a colla1-2.3-GFP transgene. *Int J Dev Biol* 2003;47:281–292.

BRUCHEZ MP. Turning all the lights on: quantum dots in cellular assays. *Curr Opin Chem Biol.* 2005;9(5):533-537.

DOHLE DS, PASA SD, GUSTMANN S, LAUB M, WISSELER JH, JENNISSEN HP, DÜNKER N. Chick ex ovo Culture and ex ovo CAM Assay: How it Really Works. *J. Vis. Exp.* 2009;33:e1620.

DUAILIBI MT, DUAILIBI SE, YOUNG C, BARTETT JD, VACANTI JP, YELICK PC. Bioengineered teeth from cultured rat tooth bud cells. *J Dental Research, Estados Unidos.* 2004;83(7):523-38.

DUAILIBI SE, DUAILIBI MT, ZHANG W, ARISCAN R, VACANTI JP, YELICK PC. Bioengineered dental tissues grown in the rat jaw. *Journal of Dental Research*. 2008;87:745-50.

DUAILIBI MT, DUAILIBI SE, DUAILIBI NETO EF, NEGREIROS RM, JORGE WA, FERREIRA LM, VACANTI JP, YELICK PC. Tooth Tissue Engineering: Optimal Dental Stem Cell Harvest Based on Tooth Development. *Artif Organs*. 2011;2(2):1-7.

ESTRELA C, de ALENCAR AHG, KITTEN GT, VENCIO EF, GAVA E. Mesenchymal Stem Cells in the Dental Tissues: Perspectives for Tissue Regeneration. *Braz Dent J*. 2011; 22(2): 91-98.

GRONTHOS S, MANKANI M, BRAHIM J, ROBEY PG, SHI S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci*. 2000;97(25):13625-13630.

HAMBURGER AND H.L. HAMILTON. A series of normal stages in the developments of the chick embryo. *Journal of Morphology*. 1951;88:232-272.

KIKUCHI H, SAWADA T, YANAGISAWA T. Isolation of dental papilla from young rat lower incisor by three step digestion. *Bull Tokyo Dent Coll* 1994;35:183–187.

LANGER R, VACANTI JP. Tissue engineering. *Science*. 1993;260:920-926.

LA NOCE M, PAINO F, SPINA A, NADDEO P, MONTELLA R, DESIDERIO V, DE ROSA A, PAPACCIO G, TIRINO V, LAINO L. Dental pulp stem cells: State of the art and suggestions for a true translation of research into therapy. *Journal of Dentistry*. 2014

MATTHIESSEN L, LUCARONI B, SACHEZ E. Towards responsible animal research. *EMBO Rep*. 2003;4 (2):104-107.

MICHALET X, PINAUD FF, BENTOLILA LA, TSAY JM, DOOSE S, LI JJ, SUNDARESAN G, WU AM, GAMBHIR SS, WEISS S. Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. *Science*. 2005;307:538–544.

MIURA M, GRONTHOS S, ZHAO M, LU B, FISHER LW, ROBEY PG, SHI S. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(10): 5807-12.

PEREIRA-LOPES JEF, BARBOSA MR, STELLA CN, SANTOS WA, PEREIRA EM, NOGUEIRA-NETO J, AUGUSTO EM, SILVA LV, SMAILI SS, GOMES, LF. In vivo anti-angiogenic effects further support the promise of the antineoplastic activity of methyl jasmonate. *Braz J Biol*. 2010; 70(2):443-449.

RIBATTI D, VACCA A, RONCALI L, DAMMACCO F. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for in vivo research on angiogenesis. *Int J Dev Biol*. 1996;40(6):1189-1197.

RIBATTI D, NICO B, VACCA A, RONCALI L, BURRI PH, DJONOV V.

Chorioallantoic Membrane Capillary Bed: A Useful Target for Studying Angiogenesis and Anti-Angiogenesis In Vivo. *The Anatomical Record*. 2001; 264:317-324.

SHANER NC, CAMPBELL RE, STEINBACH PA, GIEPMANS BNG, PALMER

AE, TSIEN RY. "Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. Red fluorescent protein". *Nature Biotechnology* 2004;22(12):1567–1572.

SMITH EL, KANCZLER JM, OREFFO ROC. A New Take On An Old Story: Chick Limb Organ Culture For Skeletal Niche Development And Regenerative Medicine Evaluation *Eur Cell Mater*. 2013;26:91-106.

STERN CD. The chick: A great model system becomes even greater. *Develop Cell*. 2005; 8:9–17.

SUJESH M, RANGARAJAN V, RAVI KUMAR C, SUNIL KUMAR G. Stem Cell Mediated Tooth Regeneration: New Vistas in Dentistry, *J Indian Prosthodont Soc*. 2012;12(1):1-7.

TORRES JB, FREITAS MD, MÉNDEZ LL, SAMPEDRO FG, REY JMG, GARCÍA AG. Evaluation of the surgical difficulty in lower third molar extraction. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2010;15(6):e869-74.

YALCIN HC, SHEKHAR A, RANE AA, BUTCHER JT. An ex-ovo Chicken Embryo Culture System Suitable for Imaging and Microsurgery Applications. *J Vis Exp.* 2010;44: e2154.

YOUNG CS, TERADA S, VACANTI JP, HONDA M, BARTLETT JD, YELICK PC. Tissue engineering of complex tooth structures on biodegradable polymer scaffolds. *J Dent Res.* 2002;81(10):695-700.

WEBER K, BARTSCH U, STOCKING C, FEHSE B. A multi-color panel of novel lentiviral ‘gene ontology’ (LeGO) vectors for functional gene analysis. *Mol Ther* 2008;16:698–706.

WEBER K, MOCK U, PETROWITZ B, BARTSCH U, FEHSE B. Lentiviral gene ontology (LeGO) vectors equipped with novel drug-selectable fluorescent proteins: new building blocks for cell marking and multi-gene analysis *Gene Therapy.*2010;17:511–520.

WEST DC, THOMPSON WD, SELLS PG, BURBRIDGE MF. Angiogenesis Assays Using Chick Chorioallantoic Membrane. In: MURRAY, J.C. Angiogenesis protocols. New Jersey: Humana Press. 2001; cap.9:107-129.

WILL SEA, FAVARON PO, PAVEZ MA, FLORENCIO LC, SOARES D, OLIVEIRA FC, RICI REG, MIGLINO MA, ALCANTARA D, MAMIZUKA EM, SILVA RS, CUCCOVIA IM, MARIA DA, GOMES LF. Bactericidal silver



nanoparticles present an antiangiogenic effect in the Chorioallantoic Membrane Model (CAM). *Formatex* (in press). 2011; (3);219-227.

ZHANG Y, LIU N, TANG Y, YANG E, DONG S, HUANG M, PAN C, ZHANG Y, ZHANG P, CHEN H, TANG Z. Efficient Generation of Neural Stem Cell-Like Cells from Rat Adipose Derived Stem Cells After Lentiviral Transduction with Green Fluorescent Protein. *Mol Neurobiol* 2014.



## NORMAS ADOTADAS

- Ministério da Saúde – Conselho Nacional de Saúde – Resolução 196/96 sobre pesquisa envolvendo seres humanos. Brasília-DF;1996. 24p.
- Consulta DeCS – Descritores em Ciências da Saúde. <http://decs.bvs.br/> - terminologia em saúde.
- Ferreira L M, Goldenberg S, Nahas F X, Barbosa M V J, Ely P B, Blanes L, Bretos J L G. Orientação Normativa para a Elaboração e Apresentação de Teses. São Paulo: Editora LMP, 2008. 84p.

***ABSTRACT***

---

## ABSTRACT

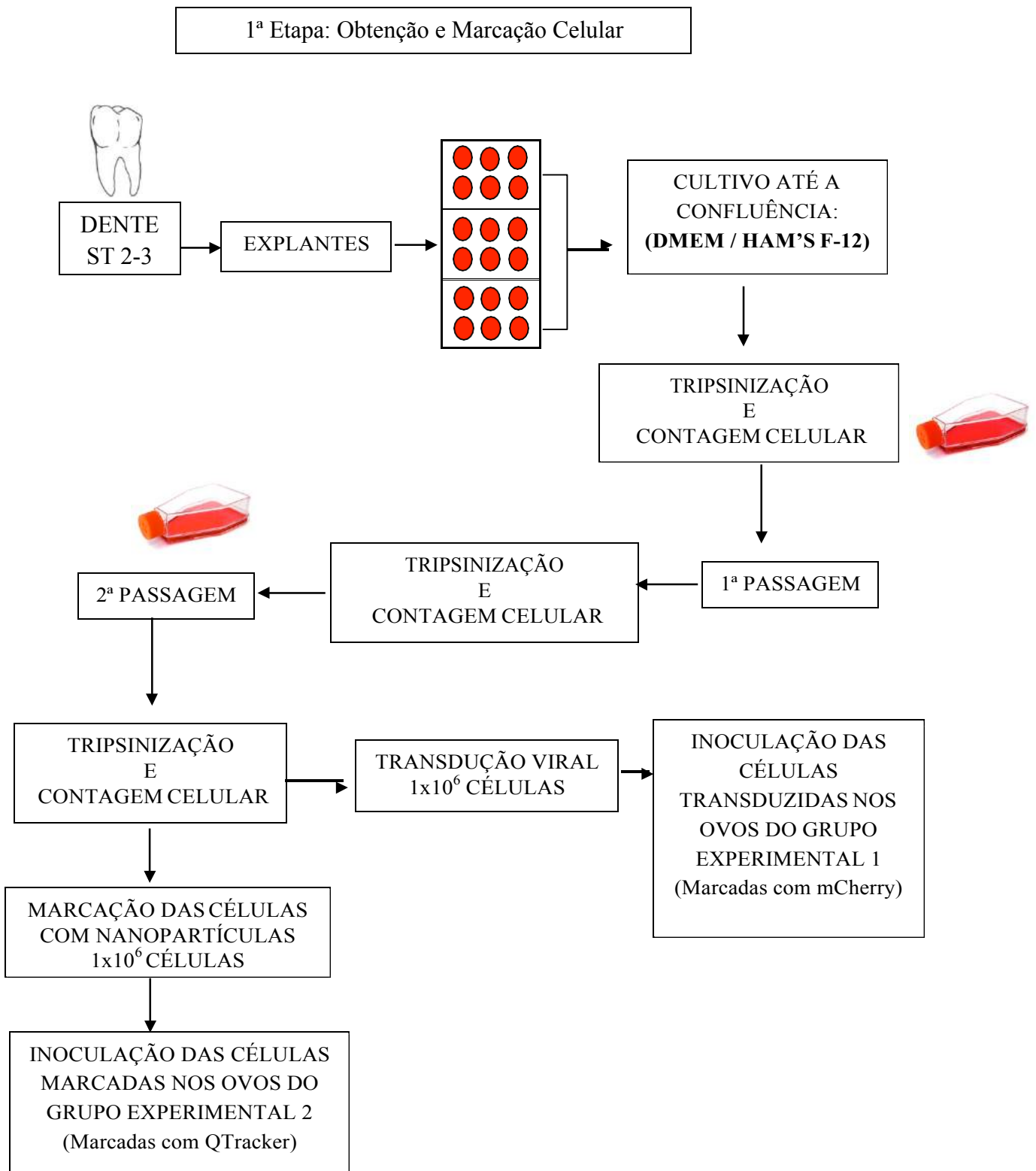
The Tissue Engineering is characterized by a multidisciplinary science and aims to produce biological substitutes, which by the manufacture of organs and tissues in laboratory in this way substituting donor organs. *Gallus gallus domesticus* are an interesting experimental model for pre-clinical experiments due to the absence of xenografts rejection. This model has been used to evaluate from vascularization, cell differentiation, until the effects of certain drugs on embryonic development. Mesenchymal cells extracted from human dental pulp have potential for regenerative therapies to present a great ability of in vitro differentiation into many tissues such dentin, nerve and vascular endothelium and other tissues. **Objective:** Identify by fluorescent dyes in the form of nanoparticles and lentiviral, the human tooth migration of stem cells applied in *Gallus gallus domesticus* model. **Methods:** The cells were obtained from the explantation of *hDPSC* third molars. The study was classified into three groups: Group 1 – Experimental *QTracker*, Group 2 - Experimental *mCherry* and Group 3 - Control. The eggs were kept in incubator 37.6°C and umidity 86% and the animals were euthanized 11 days of posture. **Results:** Both groups showed efficiency relative to fluorescence emission. The proliferated cells presented affinity and morphology similar to mineralized tissue. **Conclusion:** The animal model demonstrated its effectiveness for tracking hDPSC, demonstrated by both studied markers. Due to fluorescence stability of *QTracker* through several generations and absence of viral vector, the use of this labeling became safer for a future assay *in vivo* model.

**Key words:** Tissue Engineering, Regenerative Medicine, Chick Embryo, Adult Stem Cells, Fluorescent Dyes.

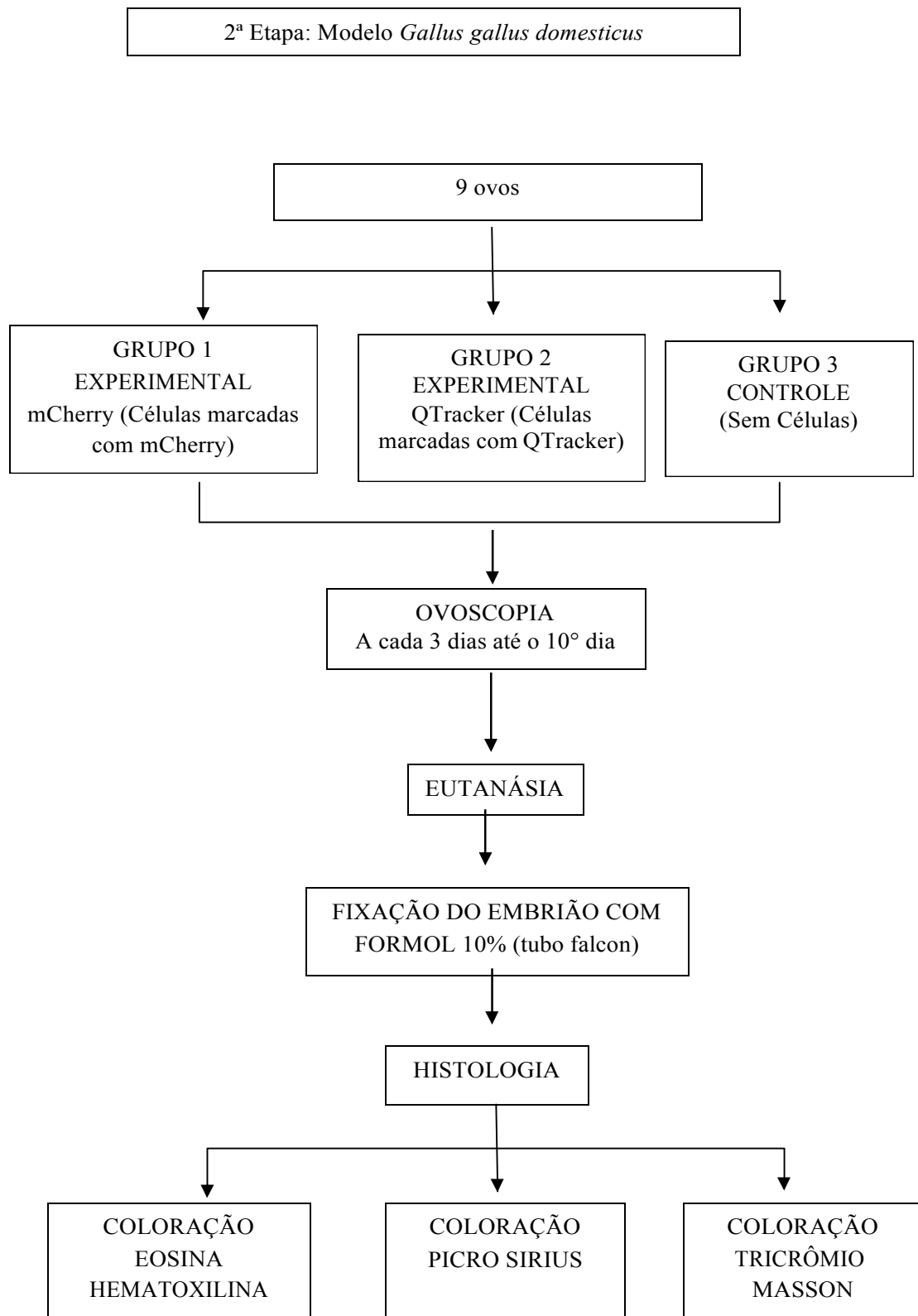


## APÊNDICE

## APÊNDICE I – FLUXOGRAMA DA METODOLOGIA CELULAR



**APÊNDICE II – FLUXOGRAMA DA METODOLOGIA EXPERIMENTAL  
EM MODELO DE EMBRIÃO DE *Gallus gallus domesticus***





## APÊNDICE III - PROTOCOLO TRIPSINIZAÇÃO DE CÉLULAS

### **Etapas do procedimento**

Desprezar o meio de cultura com pipeta de 10ml e dispensar.

Lavar com 5ml de PBS aquecido por 2 vezes por alguns minutos.

Remover o PBS com a pipeta e dispensar.

Adicionar a cada garrafa 1ml de tripsina.

Incubar por 15 minutos.

Bater as garrafas na bancada para soltar as células.

Adicionar 10ml de meio de cultura.

Transferir a solução de cada garrafa com uma pipeta de 10ml para um tubo falcon de 50ml para centrifugar.

Centrifugar: 1500 RPM por 10 minutos.

Desprezar de uma única vez, invertendo o tubo, o sobrenadante.

Adicionar 10ml meio de cultura, resuspender e homogeneizar o pellet com uma pipeta de 10ml para lavar as células.

Centrifugar: 1500 RPM por 10 minutos.

Desprezar de uma única vez, invertendo o tubo, o sobrenadante.

Adicionar 10ml meio de cultura, resuspender e homogeneizar o pellet com uma pipeta de 5ml e preparar para contar as células.

Com o auxílio de uma pipeta automática de 2-20 $\mu$ l, ajustar a pipeta até 10 $\mu$ l e fazer uma proporção de 10 $\mu$ l de trypan blue e 10 $\mu$ l de células em um eppendorf de 1,5ml.

Remover 10 $\mu$ l do pool, adicionar na chamber slide<sup>®</sup>, colocar no Countess<sup>®</sup> para realizar a contagem de células automatizada.



## **ANEXO I – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)**

### **1– TÍTULO DA PESQUISA - “MARCADORES FLUORESCENTES: LENTIVIRUS E NANOPARTÍCULAS NA MARCAÇÃO DE CÉLULAS HUMANAS RASTREADAS EM MODELO DE *Gallus gallus domesticus*”**

#### **2 – PROPOSTAS DE ESTUDO**

Você está sendo convidado a participar de um Estudo de Pesquisa. Antes de decidir se quer participar ou não, é importante que entenda porque o Estudo está sendo realizado e o que ele vai envolver. Por favor, leia com atenção as informações ou peça que as mesmas sejam lidas a você pelo profissional que está apresentando. Sinta-se à vontade para fazer quaisquer questionamentos visando responder as suas dúvidas.

O objetivo desta pesquisa é acompanhar o desenvolvimento de células dentárias em laboratório utilizando modelo animal (ovo de galinha). Para este estudo serão utilizados dentes com indicação de extração, avaliados por meio de exame clínico e radiográfico, os quais em condições normais seriam desprezados após a cirurgia. A sua participação será somente como doador do órgão dentários. No laboratório, serão extraídas as células dentárias.

#### **3 – DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS**

Os pacientes incluídos neste estudo deverão concordar com o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido** assinando o protocolo clínico anexado.

Após os exames clínico e radiográfico e constatada a indicação de extração dental como único tratamento, você será submetido ao procedimento cirúrgico. Este procedimento é exatamente igual ao praticado na rotina odontológica e também seria realizado independente deste estudo.

#### **4 – RELAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS ROTINEIROS**

O procedimento cirúrgico consistirá na extração dentária e você poderá ser medicado com anestésicos, anti-inflamatórios, antibióticos e analgésicos de acordo com as rotinas e necessidades clínicas pré e pós-operatórias de cirurgias de dentes inclusos.

#### **5 - RISCOS E DESCONFORTO**

Os riscos e desconfortos diretos ou indiretos nos procedimentos de extração dentária ocorrerão independentemente da sua participação nesta pesquisa. Os riscos e desconfortos poderão ser:

Anestesia local durante a cirurgia: dor da punção na anestesia; sensação de amortecimento na região; pressão, vibração.

No pós operatório: inchaço; dor; limitação de movimento; dor na articulação da boca; mal gosto e febre.

Todos os itens descritos são os mesmos observados em procedimentos semelhantes à extração dental de dentes inclusos. Você não deverá deixar de informar ao profissional a respeito de quaisquer dúvida ou sintomas que observar telefonando imediatamente ao profissional responsável pelo estudo, o qual estará disponível para ouvi-lo e esclarecer suas dúvidas e perguntas.

## **6 - BENEFÍCIOS**

Esta é uma pesquisa experimental com a finalidade de verificar o comportamento *in vitro* (em laboratório) das células dentais em modelo animal. Este protocolo de estudo não lhe trará benefícios diretos mas, ajudará a reunir informações importantes e valiosas que poderão nortear novas pesquisas e no futuro ajudar outras pessoas. Somente no final deste estudo poderemos concluir a presença de benefícios e o quanto úteis eles poderão ser.

## **7 - ALTERNATIVAS DE PROCEDIMENTO**

Caso você opte por não participar deste Protocolo de Pesquisa não doando o dente, o profissional responsável dispensará o mesmo jogando-o no lixo contaminado.

## **8 - GARANTIA DE ACESSO**

Você terá acesso a todo e qualquer destino dado às células utilizadas e/ou estocadas, além dos resultados obtidos com este estudo, garantimos que em qualquer etapa, você poderá esclarecer suas eventuais dúvidas com os profissionais responsáveis pela pesquisa. Os principais investigadores são Profs. Drs. Silvio Eduardo Duailibi e Monica TalaricoDuailibi que podem ser encontrados no seguinte endereço: Av. Chibarás, 452 e no telefone 011- 5051 1898. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em

Pesquisa (CEP) – Rua Botucatu, 572 – 1º andar – cj 14, 5571-1062, FAX: 5539-7162  
– E-mail: cepunifesp@unifesp.br

## **9 – PARTICIPAÇÃO**

É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição. Sua participação no estudo é voluntária. Se preferir não participar, não há necessidade de nenhuma justificativa.

## **10 - CONFIDENCIALIDADE**

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com as de outros voluntários. Tanto o profissional responsável quanto a equipe envolvida, manterão em sigilo absoluto sua identidade e as informações que você vier a apresentar. Você não será identificado em nenhuma publicação onde o conteúdo do trabalho seja apresentado, garantindo o segredo profissional.

## **11 – ATUALIZAÇÃO DOS RESULTADOS**

É garantido o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

## **12 – DESPESAS E COMPENSAÇÕES**

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, após a sua extração. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional no estudo, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

## **13 – COMPROMISSO**

Os pesquisadores assumem o compromisso de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “**MARCADORES FLUORESCENTES: LENTIVIRUS E NANOPARTÍCULAS NA MARCAÇÃO DE CÉLULAS HUMANAS RASTREADAS EM MODELO DE GALLUS gallus domesticus**”. Eu discuti com o Dr. Silvio Eduardo Duailibi sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do Paciente

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Assinatura da Testemunha

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo Estudo

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## **TERMO DE ASSENTIMENTO PARA MENORES DE DEZOITO ANOS**

Meu nome é Jennifer A. Santos e o meu trabalho é coletar células de dente e avaliar o seu desenvolvimento em laboratório. Queremos melhorar o tratamento de doenças causadas por acidentes e achamos que esta pesquisa pode ajudar nisso. Eu vou informar você e convidá-lo a participar desta pesquisa. Você pode escolher se quer participar ou não, é você quem decide. Discutimos esta pesquisa com seus pais ou responsáveis e eles sabem que também estamos pedindo seu acordo. Se você vai participar na pesquisa, seus pais ou responsáveis também terão que concordar. Mas se você não desejar fazer parte na pesquisa, não é obrigado, até mesmo se seus pais concordarem. Você pode discutir qualquer coisa deste formulário com seus pais, amigos ou qualquer um com quem você se sentir a vontade de conversar. Pode haver algumas palavras que não entenda ou coisas que você quer que eu explique mais detalhadamente porque você ficou mais interessado ou preocupado. Por favor, peça que pare a qualquer momento e eu explicarei.

Estamos testando células de crianças/adolescentes que são da sua idade porque as suas células estão mais novas e mais adequadas para esta pesquisa.

Você não precisa participar desta pesquisa se não quiser. Se decidir não participar da pesquisa, nada mudará no seu tratamento de saúde. Mesmo assim, este serviço de saúde estará disponível para você. Até mesmo se disser "sim" agora, poderá mudar de idéia depois, sem nenhum problema.

A sua saúde é muito importante e você veio ao dentista para tratá-la. O seu dente precisa ser arrancado mesmo que você decida não participar desta pesquisa. Para participar desta pesquisa você deve doar o seu dente que seria jogado no lixo para utilizarmos em laboratório.

O uso do dente em laboratório é seguro e já foi testado em outras crianças e adolescentes. Não houve nada que nos preocupasse. Porém, se qualquer coisa incomum acontecer a você, você deverá se sentir à vontade de nos chamar a qualquer momento para falar sobre suas preocupações ou perguntas. Há algumas outras coisas que eu gostaria que você soubesse. Talvez você sinta dor depois que o seu dente for arrancado, mas isso é passageiro e não tem nada a ver com este estudo.

A sua participação nesta pesquisa é muito importante para melhorar o tratamento de doenças causadas por acidentes. Isto irá ajudar muitas pessoas agora ou

mais tarde. Não falaremos para outras pessoas que você está nesta pesquisa e também não comunicaremos informação sobre você para qualquer um que não trabalha na pesquisa.

Eu entendi que a pesquisa é sobre a avaliação do desenvolvimento de células em laboratório. Eu entendi que o meu dente precisa ser arrancado mesmo que eu não queira participar desta pesquisa.

Assinatura do Paciente

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Assinatura dos Pais ou Responsável

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.


Assinatura do responsável pelo Estudo

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_



## ANEXO II – APROVAÇÃO CEP/UNIFESP


 Universidade Federal de São Paulo  
 Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa  
 Hospital São Paulo

São Paulo, 9 de novembro de 2011  
 CEP Nº: 1879/11

Imo(a) Sr(a)  
 Pesquisador(a): Jennifer Adriane dos Santos  
 Disciplina/Departamento: Cirurgia Plástica  
 Pesquisadores associados: Silvio Eduardo Duailibi (orientador), Monica Talarico Duailibi, Ligia Ferreira Gomes

**Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da  
 Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo**

**TÍTULO DO ESTUDO: MODELO DA MEMBRANA CORIOALANTÓICA DE EMBRIÃO DE Gallus domesticus  
 APLICADO AO ESTUDO DE DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO DE POLPA DENTAL HUMANA :**

**CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO:** Experimental, categoria B e material humano de descarte

**RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE:** Sem risco, sem contato com voluntário de pesquisa.

**OBJETIVO DO ESTUDO:** Rastrear por meio da membrana corioalantóica de embrião de galinha, as células-tronco de polpa dental humana para avaliar a migração celular e sua diferenciação.

**RESUMO:** Serão incluídos no presente estudo pacientes saudáveis, de ambos os gêneros, com idade entre 14 e 20 anos, com indicação clínica de remoção do terceiro molar e que o presente material seja de descarte cirúrgico. As células serão obtidas a partir da explantação de Polpa Dentária de germes de terceiros molares humanos extraídos por indicação e de descarte, de pacientes saudáveis. As células serão cultivadas até a segunda passagem para realizar a marcação celular fluorescente com QTracker (Invitrogen®). O estudo será classificado em três grupos: Grupo 1 - Experimental (inoculação das células marcadas), Grupo 2 - Controle positivo (inoculação de células não marcadas) e Grupo 3 - Controle negativo (sem inoculação de células). Após a análise da migração e diferenciação celular através de microscopia confocal, será padronizado o modelo de rastreamento in vivo para o presente estudo permitindo maior eficiência e segurança neste e em outros tipos de procedimentos. Serão utilizados 12 ovos embrionados de Gallus domesticus gentilmente cedidos pela Profª. Irene Yan, postura recente (de 24 a 48h), proveniente da granja da região de Mogi das Cruzes - SP. Um ensaio completo dura aproximadamente 10 dias e estão previstos três ensaios independentes no total.

**MATERIAL E MÉTODO:** Estão descritos os procedimentos do estudo

**TCLE:** Adequado, apresentando TCLE e Termo de Assentimento para menores de idade

**DETALHAMENTO FINANCEIRO:** Sem financiamento externo - R\$ 5732,78


**CRONOGRAMA DO ESTUDO:** 18 meses

**PRIMEIROS RELATÓRIOS PARCIAIS PREVISTOS PARA :** 3/11/2012 e 29/10/2013

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo ANALISOU e APROVOU o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e termo de consentimento livre e esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

  
 Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana  
 Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da  
 Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Página 1 de 1  
 Rua Botucatu, 572 - 1o andar - CEP 04023-062 - São Paulo/Brasil  
 CEP N. 1879/11



## **FINANCIAMENTO**

*Configuram como parceiros do Laboratório de Engenharia Tecidual e Biofabricação - UNIFESP a Faculdade de Engenharia de Materiais, Química e Mecânica da UNICAMP, a FAPESP vinculada ao Projeto JP 07/51227-4, o CNPq vinculado ao projeto nº 573661/2008-1 do INCT Biofabris (Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia em Biofabricação) e FAPESP 08/57860-3, além do apoio da Rede Ibero-Americana de Biofabricação – Cytel.*

***FONTES CONSULTADAS***

---

**FONTES CONSULTADAS**

GILBERT SF. DEVELOPMENTAL BIOLOGY. 8<sup>a</sup>ed. Sinauer Associates, Inc.  
Sunderland, Massachusetts. U.S.A. 2006.

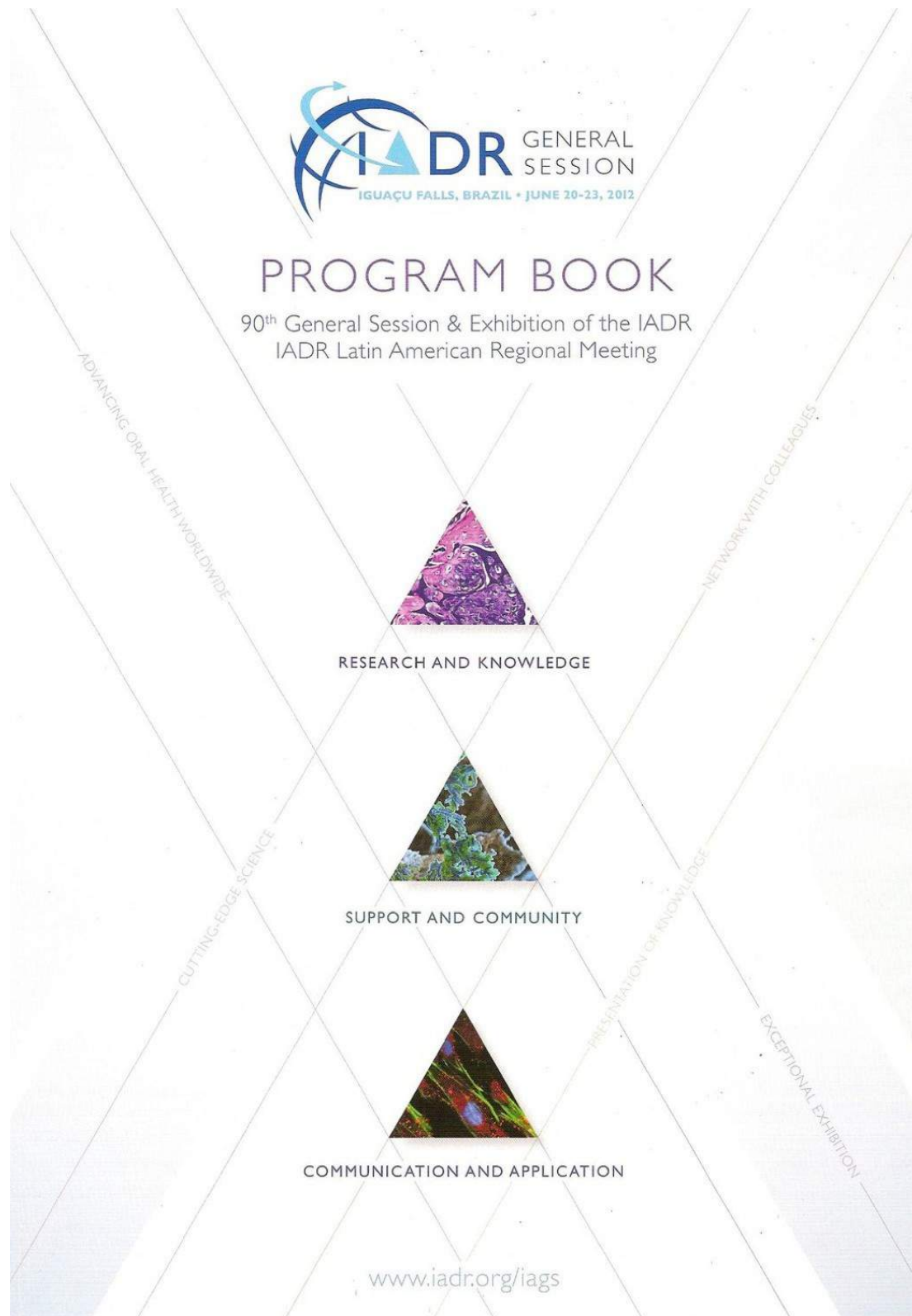
INVITROGEN. Cellular analysis. Biology in context. California, 634p, 2007.

RUTH BELLAIRS AND MARK OSMOND. The Atlas of Chick Development. 2005  
PLATE 127-148 Day 11 (stage 37); p. 368,406.



**IADR- INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR DENTAL RESEARCH**

**90<sup>TH</sup> GENERAL SESSION (JUNE 20-23, 2012) IGUAÇU FALLS, BRAZIL.**



- S1943** Difficulties regarding care of patient with oral cancer in Paraíba-Brazil. F. NUNES\*, A. DAL PIVA, I.K. CARVALHO, N. SIQUEIRA, W. PADILHA, and C. LIRA (Universidade Federal Da Paraíba, João Pessoa, Brazil)
- S1944** Survey of Necessities Orals in Children with Malignant Neoplasms. M. FARIAS\*, L. ALMEIDA, and E. TORQUATO (Universidade Federal Do Ceara, Sobral, Brazil)

Seq#: 197 Friday, 22 June 2012, 9 a.m. – 10:15 a.m.  
Poster Session, Poster Hall (Convention Center)

**Craniofacial Biology – Craniofacial Tissue Biology, Regeneration, and Wound Healing**

- 1945** Regulatory Effects of Rosiglitazone on Osteoclastic Differentiation and Osteoblastogenesis. J.G. KIM\*, M.K. KIM, K.S. LEE, J.C. LEE, and Y.M. JEON (Chonbuk National University, Jeonju, South Korea)
- 1946** Effects of Laser Therapy on Periodontal Ligament Stem Cell Proliferation. C.A.G. BARBOZA\*, F. GINANI, D.M. SOARES, J.S.P. SILVA, Á.C.G. HENRIQUES, and R.A. FREITAS (Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Brazil)
- 1947** Isolation and Characterization of Progenitor/Stem Cells from Alveolar Bone Curettage. L.M. LUIZ, C.P. DOS SANTOS\*, F.P. DALTOE, M.C. DEBONI, and A. MANTESSO POBOCIC (University of São Paulo – Dental School, Sao Paulo, Brazil)
- S1948** Periodontal ligament mesenchymal stem cells can differentiate into endothelial-like cells. B. AMORIM\*, K.G.S. RUIZ, M.Z. CASATI, E.A. SALLUM, and F.H. NOCITI JR (Piracicaba Dental School-UNICAMP, Piracicaba, SP, Brazil)
- S1949** Tooth tissue engineering: *Gallus domesticus*, HDSC tracing *in vivo* model. M. DUAİLÍBI\*, S.E. DUAİLÍBI, L.M. FERREIRA, J.A. SANTOS, S. WILL, L. GOMES, and D. MARIA (Universidade Federal de Sao Paulo, São Paulo, Brazil)
- 1950** Distribution of Podoplanin-Expressing Cells in the Oral Tissue. C. KAJI\*, M. TOMOOKA, Y. HATAKEYAMA, E. TSURUGA, H. KOJIMA, and Y. SAWA (Fukuoka Dental College, Japan)
- 1951** Anti-inflammatory effects of LPLI in hADSCs through cAMP/NF- B pathway. J.-Y. WU, M.-L. Y. YEH, C.-H. CHEN, J.-H. LEE, and Y.-H. WANG\* (Kaohsiung Medical University, Taiwan)

Seq#: 198 Friday, 22 June 2012, 10:45 a.m. – 11:30 a.m.  
Plenary, Auditorium (Convention Center)

**Distinguished Lecture Series/Plenary Sessions – Distinguished Lecture Series: Karen E. Nelson – The Study of the Human Microbiome**

- 1952** 10:45 a.m. The Study of the Human Microbiome. K. NELSON\* (J. Craig Venter Institute, Rockville, USA)

Seq#: 199 Friday, 22 June 2012, 11:45 a.m. – 1 p.m.  
Poster Session, Poster Hall (Convention Center)

**Pulp Biology & Regeneration Research – Endodontics: Lasers, Phototherapy, Electromagnetic Fields**

- S1953** Transdental biostimulation of odontoblast-like cells by different LED irradiation parameters. A.P. TURRIONI\*, F. BASSO, C. OLIVEIRA, J. ALONSO, J. HEBLING, and C.A. DE SOUZA COSTA (State University of São Paulo, Itajubá, Brazil)
- S1954** Response of Odontoblast-Like Cells to LED Irradiation. L. MONTORO\*, A.P. TURRIONI, F. BASSO, J. HEBLING, and C.A. DE SOUZA COSTA (Universidade Est. Paulista Julio Mesquita, Araraquara, Brazil)

- S1955** Biostimulation of odontoblast-like cells by 455 nm LED irradiation. J. ALONSO\*, A.P. TURRIONI, F. BASSO, J. HEBLING, and C.A. DE SOUZA COSTA (Universidade Est. Paulista Julio Mesquita, Araraquara, Brazil)
- S1956** VEGF Secretion by Undifferentiated Pulp Cells: Effect of Low-Level Laser. D. CHIMELLO-SOUSA\*, K.F. BOMBONATO-PRADO, A.L. ROSA, F.S. OLIVEIRA, S. SIÉSSERE, M. SEMPRINI, and S.C.H. REGALO (University of São Paulo, Ribeirão Preto School of Dentistry, Brazil)
- S1957** Photodynamic Therapy Associated with Endovac® for Elimination of *Enterococcus faecalis*. R. MIRANDA\*, E.B. SANTOS, H. GUSMAN, and A.P. COLOMBO (Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil)
- S1958** Effects of Laser Irradiation on Zoledronic Acid-Treated Fibroblasts. T. PANSANI\*, F. BASSO, V. BAGNATO, J. HEBLING, and C.A. DE SOUZA COSTA (Universidade Est. Paulista Julio Mesquita, Araraquara, Brazil)
- 1959** Signaling Pathways and Gene Expression Activated by Electro-Magnetic-Wave in Osteoblastic-Cells. H. YUMOTO\*, T. TOMINAGA, K. HIRAO, N. BANDO, T. SUMITOMO, K. TAKAHASHI, and T. MATSUO (The University of Tokushima, Japan)
- 1960** The effect of SMF on hDPCs and hPDLCS. E.M. RHIM, S.A. CHAE, S. HUH, and S.H. PARK\* (Kyung Hee University, Seoul, South Korea)
- 1961** Effects of Diode lasers on replanted rat teeth. Part I. D. RALDI\*, R.H. ROSA, E.S. CARVALHO, F.M. PEREIRA, S.M. HABITANTE, and M.S. CAMPOS (University of Taubaté, Brazil)

Seq#: 200 Friday, 22 June 2012, 11:45 a.m. – 1 p.m.  
Poster Session, Poster Hall (Convention Center)

**Prosthodontics Research – Prosthodontic Materials Laboratory Research**

- S1962** Accuracy of Transfer Impressions with Two Different Types of Trays. G. GALVÃO\*, E. MORAIS, A. TREML, and C.C. GONZAGA (Positivo University, Curitiba, Brazil)
- 1963** Corrosion Behavior of Cobalt-Chrome and Nickel-Chrome Alloys with *Streptococcus Mutans*. Y. ZHENG\*, J. LI, and C. XU (Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, China)
- 1964** Effect of relining procedure on bond strength of fiber posts. D. PEDROSA, A.B. CORRER, L.R.M. MARTINS, M.A.C. SINHORETI, L. CORRER SOBRINHO, M. SOUSA-NETO, E. COSTA, Jr., C. PEDROSA FILHO, and J. CARVALHO, Jr.\* (University of Brasilia, Brazil)
- 1965** Paper withdrawn.
- 1966** Effect of Handpieces' Spray Patterns and Rates on Cutting Efficiency. J. SUN\* and W.-J. YANG (Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine; Shanghai Key Laboratory of Stomatology, Shanghai, Chi, China)
- S1967** Analysis of facial silicones through hardness, tear resistance and SEM. J. PINHEIRO\*, A. REIS, Sr., V.M. LEITE, A.C. SHIMANO, Sr., P. FRIGHETTO, H. PARANHOS, and C.H. SILVA-LOVATO (School of Dentistry of Ribeirão Preto/ University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil, Brazil)
- S1968** Effects of pigmentation, thermocycling and disinfection on the maxillofacial silicones. M. VOMERO\*, J. PINHEIRO, H. PARANHOS, R.F.D. SOUZA, and C.H. SILVA-LOVATO (School of Dentistry of Ribeirão Preto / University of São Paulo, Brazil)
- S1969** The Development of an Innovative Analysis Device for Occlusal Contacts. S. KASAMA, T. KIHARA, T. IKAWA, R. HIRABAYASHI, Y. SHIGETA, E. ANDO, S. HIRAI, T. MORIYAMA, T. KITAMURA, S. SUZUKI, T. OGAWA\*, and T. HAYAKAWA (Tsurumi University School of Dentistry, Yokohama, Japan)



***Tooth tissue engineering: Gallus domesticus, hDSC tracing in vivo model***

**Authors** - M.T.Duailibi (1), S.E.Duailibi (1), L.M.Ferreira (1), J.A.Santos (1), S.E.A.Will (2), D.A.Maria (3), L.F.Gomes (2). 1.Universidade Federal de São Paulo, São Paulo,Brazil; 2. Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil; 3.Butantã Institute, São Paulo, Brazil.

*Human adult stem cells offer the potential of renewable cell source for diverse regenerative medicine applications. Helping to reduce the number of mammals in the scientific research, minimizing pain, suffering and stress, obtaining reliable and consistent data, this model allows the use of heterologous cells. **Objective:** To evaluate the potential of the egg Gallus domesticus as a model for homing and proliferation of stem cells from human dental pulp to study heterologous cell transplantation. **Methods:** Cells were obtained from pulp tissue of third molars in adult patients. After two weeks, the cells reached confluence and were harvested by trypsinization, collected and analyzed by flow cytometer (FACSCalibur) and marked with CD34 for stem cells, CD166 and CD29 for epithelial cells and CD73, CD90, CD105 for mesenchymal cells. The cells were transduced with 10 $\mu$ l aliquots of Lentiviral Vector Lego-C2 (mCherry), and 1 X 10<sup>5</sup> cells were inoculated into albumin n=3 after 72hs of posture, weight of 60.1g. The eggs were kept in incubator 37.6°C and umidity 86%, the animals being euthanized 10 days of posture. The X-Rays image obtained by MSFXPRO In-Vivo (Carestream). **Results:** Cell-tissue interactions determinants of homing was observed, and cells transduced migrated to regions of embryo's mineralization. High intensity of fluorescence was observed, in egg tooth and bones from maxilla, dentary, legs and wings. While tumoral cells from distinct origin presented different pattern of migration. These data add to previous literature on the potentiality of human dental pulp stem cells as a source of stem cells for cell therapy, particularly for tooth tissue engineering. **Conclusion:** Gallus domesticus showed an excellent model in vivo for heterologous cell transplantation studies. Isolated human dental pulp cells (4th passage) migrate in the Gallus domesticus egg model from albumin to mineralized tissue regions and preserve proliferative potentiality and the vector expression for one week.*

*These studies were supported by the University Federal São Paulo, São Paulo Brazil, CAPES, CNPq FAPESP 07/58856-7; 07/51227-4; 07/59488-1 INCT- Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia – Instituto de Biofabricação - Biofabris, CNPq, 573661/2008-1, FAPESP 08/57860-3.*

**COLAOB 2012 – 7<sup>th</sup> CONGRESSO LATINO AMERICANO DE ÓRGÃOS ARTIFICIAIS E BIOMATERIAIS**



**IADR/AADR/CADR – 91<sup>ST</sup> GENERAL SESSION (MARCH 20-23, 2013)  
SEATTLE, WASHINGTON USA.**

Found 10 matches

Displaying 1 to 10

[ 1 ]

1. [Implant Dentistry: Histological Evaluation of Bone Grafts in Atrophic Maxilla](#)  
... Center) Presentation Type: Poster Session F.Á. KFOURI, Plastic Surgery Department, Universidade Federal de São Paulo, Osasco, Brazil, M.T. **DUAILIBI**, Fundacao de apoio a Universidade de Sao Paulo, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil, L. FRIGO, Centro de Ciências Biológicas e Saúde, Universidade ...
2. [Radiographic Approach according Tooth Development based on Stem Cell Harvesting](#)  
... Harvesting Friday, March 22, 2013 : 2 p.m. - 3:15 p.m. Location: Hall 4 (Washington State Convention Center) Presentation Type: Poster Session E.F. **DUAILIBI** NETO 1, S.E. **DUAILIBI** 2, M.T. **DUAILIBI** 3, J.V.L. SILVA 4, and I. CHILVARQUER 1, 1Stomatology and Oral Radiology Department, Universidade de São ...
3. [Nutrient interference in biological properties of hDSCs in culture](#)  
... culture Friday, March 22, 2013 : 3:30 p.m. - 4:45 p.m. Location: Hall 4 (Washington State Convention Center) Presentation Type: Poster Session S.E. **DUAILIBI** 1, N.M. MACHADO 2, J.A. SANTOS 2, L.M. FERREIRA 2, and M.T. **DUAILIBI** 3, 1CTCMol-Cellular and Molecular Therapy Center, Universidade Federal de ...
4. [Non-targeted quantum dots hDPSC tracking in vivo Gallus domesticus model](#)  
... model Friday, March 22, 2013 : 3:30 p.m. - 4:45 p.m. Location: Hall 4 (Washington State Convention Center) Presentation Type: Poster Session M.T. **DUAILIBI** 1, J.A. SANTOS 2, L.F. GOMES 3, L.M. FERREIRA 2, and S.E. **DUAILIBI** 4, 1Fundacao de apoio a Universidade de Sao Paulo, Universidade Federal de São ...
5. [Morphological and Dynamic Features of Temporomandibular Joint in Moebius Syndrome](#)  
... , March 23, 2013 : 2 p.m. - 3:15 p.m. Location: Hall 4 (Washington State Convention Center) Presentation Type: Poster Session A.O.L. ORTEGA 1, E.F. **DUAILIBI** NETO 2, V. FELIX 1, I. CHILVARQUER 2, and M. GALLOTTINI 1, 1Patologia Bucal, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, 2Oral Radiology, Universidade ...
6. [Bone Substitutes and Regeneration](#)  
... Evaluation of Bone Grafts in Atrophic Maxilla F.Á. KFOURI, Plastic Surgery Department, Universidade Federal de São Paulo, Osasco, Brazil, M.T. **DUAILIBI**, Fundacao de apoio a Universidade de Sao Paulo, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil, L. FRIGO, Centro de Ciências Biológicas e Saúde ...
7. [Clinical and Translational Research](#)  
... - UMD, Newark, NJ, 2New Jersey Dental School - UMDNJ, Newark, NJ Radiographic Approach according Tooth Development based on Stem Cell Harvesting E.F. **DUAILIBI** NETO 1, S.E. **DUAILIBI** 2, M.T. **DUAILIBI** 3, J.V.L. SILVA 4, and I. CHILVARQUER 1, 1Stomatology and Oral Radiology Department, Universidade de S ...
8. [TMJ, Bone and Inflammation](#)  
... of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil Morphological and Dynamic Features of Temporomandibular Joint in Moebius Syndrome A.O.L. ORTEGA 1, E.F. **DUAILIBI** NETO 2, V. FELIX 1, I. CHILVARQUER 2, and M. GALLOTTINI 1, 1Patologia Bucal, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, 2Oral Radiology, Universidade ...
9. [Cell Biology and Differentiation](#)  
... A&M Health Science Center, Baylor College of Dentistry, Dallas, TX Non-targeted quantum dots hDPSC tracking in vivo Gallus domesticus model M.T. **DUAILIBI** 1, J.A. SANTOS 2, L.F. GOMES 3, L.M. FERREIRA 2, and S.E. **DUAILIBI** 4, 1Fundacao de apoio a Universidade de Sao Paulo, Universidade Federal de ...
10. [Stem Cells and Pulp Repair](#)  
... Engineering and Reparative Dentistry, Cardiff University, Cardiff, Wales Nutrient interference in biological properties of hDSCs in culture S.E. **DUAILIBI** 1, N.M. MACHADO 2, J.A. SANTOS 2, L.M. FERREIRA 2, and M.T. **DUAILIBI** 3, 1CTCMol-Cellular and Molecular Therapy Center, Universidade Federal de S ...

[ 1 ]

*Abstract Submitted For Review*

*You have submitted the following abstract to the IADR/AADR/CADR General Session and Exhibition (March 20-23, 2013). Receipt of this notice does not guarantee that the submission was necessarily complete or correct; imply that any errors have been detected; or indicate that it has been accepted for presentation.*

***Non-targeted quantum dots hDPSC tracking in vivo Gallus domesticus model***

*M.T. DUAILIBI<sup>1</sup>, J.A. SANTOS<sup>2</sup>, L.F. GOMES<sup>3</sup>, L.M. FERREIRA<sup>2</sup>, and S.E. DUAILIBI<sup>4</sup>,*

*<sup>1</sup>Fundação de apoio a Universidade de Sao Paulo, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil, <sup>2</sup>Plastic Surgery Department, Universidade Federal de São Paulo, Sao Paulo, Brazil, <sup>3</sup>Clinical and Toxicological Analysis Department, Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil, <sup>4</sup>CTCMol- Cellular and Molecular Therapy Center, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil*

*Abstract*

*The Tissue Engineering, is also known as a field of Regenerative Medicine, characterized by a multidisciplinary science and approach to produce biological substitutes that are intended to prevent the use of donor organs with the manufacture of organs and tissues in the laboratory. Gallus domesticus are an interesting experimental model for pre-clinical experiments due to the absence of xenografts rejection. Objective: Evaluate cell migration and differentiation of the human dental pulp stem cells (hDPSC) in an egg of Gallus domesticus model. Method: Cells were obtained and characterized from pulp tissue of third molars in adult patients. After two weeks, the cells reached confluence and were harvested by trypsinization, collected and analyzed by flow cytometry (FACSCalibur) with CD34 for stem cells, CD166 and CD29 for epithelial cells and CD73, CD90, CD105 for mesenchymal cells. Cells were grown until the second passage to perform the cell labeling with fluorescent non-targeted quantum dots - QTracker (Invitrogen®). The labeled cells ( $1 \times 10^6$ ) were inoculated into albumin after 72hs of incubation. The eggs were kept in incubator 37.6 °C and umidity 86% (Zagas), the animals being euthanized after 10 days of incubation. The X-Rays images were obtained by MSFXPRO In-Vivo (Carestream) and histological analyzes were evaluated through fluorescence microscopy. Result: Cell- tissue interactions determinants of homing were observed, and labeled cells migrated to regions of embryo's mineralization. Conclusion: The Gallus domesticus was confirmed as a promising in vivo model for heterologous cell transplantation. Isolated hDPSC migrated in the Gallus domesticus egg model from albumin to mineralized tissue. The Qtracker probe showed intense and stable fluorescence allowing the tracking during heterologous cells differentiation without transference to adjacent cells populations.*