

# **Trabalho de Conclusão de Curso**

**Utilização de Células-Tronco de Polpa de Dentes  
Permanentes Humanos (DPSCs) na regeneração de  
defeitos ósseos mandibulares**

**Rúbia Teodoro Stuepp**



**Universidade Federal de Santa Catarina  
Curso de Graduação em Odontologia**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA**

Rúbia Teodoro Stuepp

**UTILIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO DE POLPA DE DENTES  
PERMANENTES HUMANOS (DPSCs) NA REGENERAÇÃO DE  
DEFEITOS ÓSSEOS MANDIBULARES**

Trabalho apresentado à Universidade Federal  
de Santa Catarina, como requisito para a  
conclusão do Curso de Graduação em  
Odontologia

Orientador: Profa. Dra. Michelle Tillmann Biz

Co-orientador: Prof. Dr. Filipe Modolo  
Siqueira

Florianópolis

2014

Rúbia Teodoro Stuepp

**UTILIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO DE POLPA DE DENTES  
PERMANENTES HUMANOS (DPSCs) NA REGENERAÇÃO DE  
DEFEITOS ÓSSEOS MANDIBULARES**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado, adequado para obtenção do título de cirurgião-dentista e aprovado em sua forma final pelo Departamento de Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 12 de Novembro de 2014.

**Banca Examinadora:**

---

Prof.<sup>a</sup>, Dr.<sup>a</sup>, Michelle Tillmann Biz  
Orientadora  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof.<sup>a</sup>, Dr.<sup>a</sup>, Mabel M. R. Cordeiro  
Universidade de Santa Catarina

---

Prof., Dr., Ricardo Castilho Garcez,  
Universidade de Santa Catarina



Aos meus pais Waldemar e Rita, pelo amor incondicional e por todo o esforço para que eu realizasse este sonho.



## AGRADECIMENTOS

Este trabalho é, até este momento da minha vida, o mais importante que já realizei. Este projeto representa um objetivo alcançado que tracei já no início da faculdade: a realização de uma pesquisa científica. Mas representa, principalmente, o final de uma importante jornada.

Agradeço ao **universo** as oportunidades que tive, os momentos maravilhosos que vivi, as pessoas que conheci, os amigos que fiz, por ter tido força pra seguir em frente e sempre com saúde.

À minha orientadora **Michelle T. Biz**, por confiar este trabalho a mim, pela ajuda, paciência, conhecimento e pelo exemplo de uma grande professora, pesquisadora, orientadora e ser humano.

Ao meu co-orientador, **Filipe M. Siqueira**, por sua disposição, conhecimento e ajuda.

À minha colega **Priscilla**, por sua ajuda imprescindível à realização desta pesquisa e pelo seu bom humor.

Aos colaboradores **Andreia Trentin** e **Ricardo C. Garcez**, que contribuíram para a realização deste projeto.

Ao técnico do laboratório de histologia, **Gilberto**, pela ajuda nos cortes histológicos e coloração das lâminas.

Ao professor **Alex Rafacho**, por ceder espaço no biotério setorial.

Aos meus pais **Waldemar** e **Rita** e à minha irmã **Júlia**, pelo amor, carinho e apoio, por compreenderem a minha ausência, por estarem presentes em minha vida apesar da distância.

Aos meus **avós**, pelo exemplo de vida e de seres humanos. Especialmente meus avós **Julita** e **Jerobal**, que sempre fizeram tudo que puderam para me ver feliz e pela infância maravilhosa que me proporcionaram.

Ao meu namorado **Rubens**, por estar sempre ao meu lado, me apoiar, me escutar, me dar força e carinho, e por toda a sua ajuda.

Aos meus **amigos**, pelos ótimos momentos que me proporcionaram, por fazerem desta a melhor fase da minha vida, pelo apoio e carinho. Especialmente meus amigos **Paulo** e **Rafael**, que são como irmãos para mim.

À minha grande amiga **Claudia**, companheira desde a primeira fase, minha dupla em todas as clínicas. Obrigada pela paciência, pela ajuda, pelos resumos, pelo ombro amigo e pela companhia para ir ao RU e saborear um “docinho” após o almoço.

Aos meus **colegas** de turma, pelo bom astral e companheirismo que fizeram esta jornada, muitas vezes árdua, mais gostosa de viver.





O próprio viver é morrer, porque não temos um dia a mais na nossa vida que não tenhamos, nisso, um dia a menos nela.

(Fernando Pessoa, 1984)



## RESUMO

Desde que se descobriu o potencial das células-tronco (CT) adultas em formar diferentes tecidos, estas têm sido exploradas em busca de alternativas terapêuticas para diversas desordens clínicas, dentre elas a recuperação de tecido ósseo. No âmbito da Odontologia, uma fonte promissora destas células é a polpa de dentes permanentes humano, que são facilmente coletadas, possuem capacidade de diferenciação celular para osteoblastos e produção de tecido mineralizado. Sendo assim, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o potencial de células-tronco da polpa de dentes permanentes humanos na regeneração de defeitos ósseos mandibulares em ratos. Para isso, a polpa de terceiros molares hígidos extraídos foi coletada e cultivada para CT, confirmada por citometria de fluxo para marcadores CD105, CD90 e CD73; diferenciação para fenótipos mesenquimais, adipocíticos, condrocíticos e osteocíticos; aderência ao plástico e morfologia fibroblastóide. Foram utilizados 20 ratos Wistar, machos, de aproximadamente 250 gramas que, sob anestesia geral, foram submetidos à confecção de um defeito ósseo no lado direito e esquerdo da mandíbula, à altura da raiz disto-vestibular do primeiro molar inferior. Nos animais submetidos à análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV), o defeito foi de aproximadamente 1mm de diâmetro/profundidade, enquanto que nos animais submetidos à análise histológica descritiva e medição de área óssea neoformada o defeito realizado teve 1mm de altura/ profundidade e 3mm de comprimento. Para isso, utilizou-se uma broca esférica número 1 em baixa rotação, sob irrigação de soro fisiológico. No lado direito aplicou-se células-tronco da polpa de dente permanente humano (Tto), enquanto que no lado esquerdo nenhum material foi aplicado (ST). Foi realizada a sutura com fio catgut 4-0. Os tempos (T) de observação foram de 7, 14 e 28 dias pós-operatórios. Dois animais foram eutanasiados logo após a cirurgia, sem haver tratamento, sendo considerados o tempo zero (T0) da análise. Três animais de cada grupo foram destinados para a análise histológica descritiva e de medição; e três animais de cada grupo foram utilizados para a análise descritiva de MEV. Tanto nas imagens de MEV como as histológicas de rotina foram realizadas a análise descritiva. Já para as medições de área foi utilizada uma grade de contagem e os dados obtidos foram submetidos à análise de porcentagem e teste T. Em MEV pode-se verificar em T0 ausência de reparo; T7 com início do reparo ósseo em Tto

e ST, sendo a regeneração predominante no fundo da cavidade, as bordas externas do defeito permaneceram nítidas; T14 com regeneração em curso em Tto e ST, havendo diminuição da profundidade da cavidade; T28 em regeneração avançada em Tto e ST, não havendo mais profundidade na cavidade e ocorrendo fusão dos seus bordos com o tecido ósseo neoformado, de aspecto esponjoso; em algumas regiões houve presença de reabsorções características do processo de regeneração óssea. Na análise histológica descritiva verificou-se ausência de reparo em T0; T7 com início de reparo ósseo, mais avançado em ST; T14 com regeneração óssea em curso em Tto e ST; T28 com avançada regeneração óssea, aparentando não haver diferença entre Tto e ST. A medição da área de neoformação óssea revelou em 7 dias amostras do ST com formação óssea mais acentuada comparada ao Tto, porém sem diferença estatística significativa ( $p=0,13$ ), o mesmo ocorrendo para 14 dias ( $p=0,91$ ). Em 28 dias, a neoformação óssea apresentou-se intensa tanto ST quanto no Tto, sem haver também diferença estatística significativa ( $p=0,48$ ). Nos grupos houve diferença estatística significativa apenas para o Tto entre 7 e 28 dias. ( $p=0,01$ ). Desta forma, pode-se concluir que, apesar de não haver diferença estatística significativa entre Tto e ST nos tempos experimentais analisados, a utilização de DPSCs demonstrou avançada neoformação óssea a longo prazo (de 7 para 28 dias). Contudo, tal resultado merece ser melhor investigado, bem como a qualidade do tecido ósseo neoformado e as células presentes neste processo nos grupos analisados.

**Palavras-chave:** regeneração óssea, polpa dentária, células-tronco.



## ABSTRACT

Since the potential of adult stem cells (SC) to form different tissues was discovered, these cells have been explored in search of alternative therapies for many medical disorders, such as the bone tissue regeneration. A promising source of these cells is dental pulp of human permanent teeth (DPSCs), which are easily collected, capable of cell differentiation to osteoblasts and the production of mineralized tissue. Therefore, this study aims to evaluate the potential of stem cells from the dental pulp of human permanent teeth to be used in the regeneration of human mandibular bone defects in rats. The dental pulp of extracted third molars were collected and the cells were grown for CT, confirmed by flow cytometry for markers CD105, CD90 and CD73; for mesenchymal differentiation (osteocyte cells, adipocyte cells and chondrocyte cells); plastic adherence and fibroblastoid morphology. 20 male Wistar rats, approximately 250 gr, were used. Under general anesthesia the bone defect was prepared in the right and left mandible, in the disto-buccal root of the first molar. For Scanning Electron Microscopy analysis (SEM), the defect had approximately 1mm diameter/depth; for histological and area measurement analysis the defect had 1mm of height/depth and 3mm long. For this, it was used a round bur n° 1 at low rpm under saline irrigation. On the right side (Tto) the stem cells was applied, while on the left side (ST) no material was applied. Stitches was done with 4-0 catgut thread. The observation time was 7, 14 and 28 days post-surgery. Two animals were euthanized shortly after surgery, without any treatment, and considered the analysis in zero time. Three animals from each group were used for histological and area measurement analysis; and three animals from each group were used for descriptive analysis of SEM. Both histological and SEM were descriptive analysis. The SEM analysis evaluated the bone defect, the quality of newly formed bone and the pattern of bone deposition. The area measurement analysis assessed the bone area and it was performed using a counting grid; the data obtained were subjected to analysis of percentage and T test analysis. SEM images at T0 showed absence of repair; T7 showed early bone repair in Tto and ST, with the predominant regeneration in the bottom of the cavity, and the outer edges of the defect remained sharp; T14 with regeneration in course in Tto and ST, with decrease of the depth of the cavity; T28 on advanced regeneration in Tto and ST, with no more depth in the cavity and occurring fusion of its edges with the newly trabecular formed bone; in some regions there was presence of resorption areas, which is characteristics of the bone regeneration process. The histological analysis

showed absence of repair in T0; T7 with early bone repair, advanced in ST in comparison to Tto; T14 with bone regeneration in progress, advanced in ST; T28 with advanced bone regeneration, with no difference between Tto and ST. The area measurement revealed bone formation in 7 days ST samples with more pronounced bone formation compared to Tto, but without statistical significant difference ( $p = 0.13$ ), and for 14 days ( $p = 0.91$ ). 28 days presented in both ST and in Tto intense bone formation, but also with no statistical significant difference ( $p = 0.48$ ). Inside the groups there was only statistical difference in the Tto group between 7 and 28 days ( $p=0.01$ ). Therefore, it was concluded that despite the absence of statistical difference between Tto and ST, the use of DPSCs demonstrated a great recovery of bone formation at long term (from 7 to 28 days). However, it is necessary to investigate the quality of newly formed bone tissue and cells present during this process in the analyzed groups.

**Keywords:** bone regeneration, dental pulp, stem cells.





## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Coleta da polpa dental	40
Figura 2	Desenho demonstrativo do defeito ósseo confeccionado	45
Figura 3	Confecção do defeito ósseo	46
Figura 4	Aplicação das DPSCs e sutura	46
Figura 5	Amostras para MEV	48
Figura 6	Grade de contagem da área de osso neoformado	49
Figura 7	Análise morfológica das células derivadas da polpa dentária humana	50
Figura 8	Representação em histogramas do perfil imunofenotípico de uma população celular	50
Figura 9	Diferenciação das células derivadas da polpa dentária humana cultivadas em meios indutivos adipogênico, osteogênico e condrogênico e fixadas com paraformaldeído 4%	51
Figura 10	Atividade mitocondrial de células-tronco da polpa dentária humana de células mantidas em estufa e sobreviventes ao processo de aplicação in vivo	52
Figura 11	Diferenciação das células derivadas da polpa dentária humana sobreviventes do processo de aplicação in vivo seguido de tratamento com meio osteogênico e fixadas com paraformaldeído 4%	52
Figura 12	Fotomicrografia de MEV das amostras analisadas	54
Figura 13	Fotomicrografia de amostras de tempo zero	55
Figura 14	Fotomicrografia de amostras de 7 dias de pós-operatório	56
Figura 15	Fotomicrografia de amostras de 14 dias de pós-operatório	57
Figura 16	Fotomicrografia de amostras de 28 dias de pós-operatório	58



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Anticorpos primários e secundários utilizados nas reações imunocitoquímicas	43
Tabela 2	Caracterização Imunofenotípica de Células-Tronco Mesenquimais da Polpa Dentária Humana em passagens 4 a 6	51
Tabela 3	Dados da contagem da área óssea neoformada	59



## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Área de neoformação óssea para os grupos tratados e sem tratamento em função do tempo de observação	60
-----------	---	----



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PRP	Plasma Rico em Plaquetas
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
ABB	Osso Bovino Inorgânico (do inglês: anorganic bovine bone)
Bio-Oss	Osso Bovino Inorgânico (do inglês: inorganic bovine bone)
HÁ	Hidroxiapatita
$\beta$ -TCP	Beta Fosfato Tricálcico (do inglês: beta-Tricalcium phosphate)
SBC	Osso Cerâmico Straumann (do inglês: Straumann Bone Ceramic)
CAP	Hidroxiapatita Carbonatada (do inglês: carbonated hydroxyapatite)
S-SBC	Pequeno tamanho de Osso Cerâmico Straumann (do inglês: small-Straumann Bone Ceramic)
L-SBC	Grande tamanho de Osso Cerâmico Straumann (do inglês: large-Straumann Bone Ceramic)
BMPs	Proteínas Morfogenéticas Ósseas (do inglês: bone morphogenetic protein)
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (do inglês: platelet-derived growth factor)
TGF- $\beta$	Fator de Crescimento de Transformação Beta (Do inglês: transforming growth factor beta)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
LACERT	Laboratório de Células-Tronco e Regeneração Tecidual
LABITED	Laboratório de Bioengenharia de Tecidos Dentários
RT-PCR	Reação de Polimerase em Cadeia após Transcriptase Reversa (do inglês: Polymerase Chain Reaction Reverse Transcriptase)
DPSC	Células-Tronco da Polpa de Dentes Permanentes (do inglês: dental pulp stem cells)
CEPSH	Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
$\alpha$ -MEM	Meio Essencial Mínimo $\alpha$ (do inglês: $\alpha$ -Minimum Essential Medium)
SFB	Soro Fetal Bovino
PBS	Água Salina Tamponada Fosfatada (do inglês: phosphate-buffered saline)
CO <sub>2</sub>	Gás Carbônico
RPM	Rotações por minuto
DMSO	Sulfóxido Dimetil (do inglês: DimethylSulfoxide)
DAPI	4',6 diamidino-2-fenilindol (do inglês: 4',6-diamidino-2-phenylindole)

MTT	(3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) (do inglês: (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético (do inglês: Ethylenediamine tetraacetic acid)
Tto	Tratado
ST	Sem tratamento
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
CT	Célula-tronco



## LISTA DE SÍMBOLOS

°	Grau
B	Beta
®	Marca registrada comercial
µm	Micrometro
A	Alfa
X	VeZ/vezes
%	Porcentagem
ml	Mililitro
I	Número um romano
C°	Grau Celsius
µl	Microlitro
cm <sup>2</sup>	Centímetro quadrado
CO <sub>2</sub>	Gás carbônico
G	Gramma
=	Igual
Cm	Centímetro



## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	27
2.	REVISÃO DA LITERATURA .....	29
3.	OBJETIVOS.....	38
3.1	Objetivo Geral.....	38
3.2	Objetivos Específicos .....	38
4.	METODOLOGIA .....	39
5.	RESULTADOS .....	50
6.	DISCUSSÃO.....	61
7.	CONCLUSÃO.....	67
	REFERÊNCIAS.....	68
	APÊNDICE A .....	74
	ANEXO 1.....	78
	ANEXO 2.....	79



## 1 INTRODUÇÃO

Atualmente, no âmbito da Odontologia, inúmeros pacientes necessitam a recuperação de tecido ósseo para viabilizar a reabilitação do sistema estomatognático. As causas mais comuns que levam à perda deste tecido são trauma, patologia, defeitos congênitos, atrofia e reabsorção (Guskuma *et al.*, 2013).

Novas terapêuticas surgem na tentativa de sanar esta necessidade. Reconstrução com enxerto é a opção mais comumente utilizada. Neste sentido, há a possibilidade de se utilizar um material enxertivo sintético, autólogo, homólogo ou xenográfico (Rokn *et al.*, 2012). O material autógeno é o único que possui os três requisitos considerados essenciais para um material enxertivo: osteoindução, osteocondução e osteoproliferação. Isto fez com que o enxerto autógeno se tornasse o padrão ouro no tratamento de regeneração óssea (Nampo *et al.*, 2010). Entretanto, há de se considerar as desvantagens que esta técnica apresenta como a possível necessidade de uma segunda cirurgia para a colheita do material enxertivo, difícil acesso ao sítio doador, possibilidade de infecções, complicações e outras morbidades (Yoshioka *et al.*, 2012).

O uso de materiais sintéticos, como a hidroxiapatita, é amplamente conhecido e utilizado, mostrando resultados positivos, embora não tão bons quanto aqueles do enxerto autógeno. Uma das vantagens deste material é não implicar em morbidades no leito doador, em risco de infecção e cirurgia adicional, além de não apresentar risco de transmissão de doenças. Ademais, é um material de fácil acesso e de quantidade ilimitada (Rokn *et al.*, 2011).

O uso de Plasma Rico em Plaquetas (PRP) também é relatado como uma modalidade terapêutica. Por ser um material autógeno, também não implica em rejeição e possibilidade de transmissão de doenças, além disso, é fácil de ser obtido e manipulado. Entretanto seus resultados positivos não superam os resultados apresentados pelo enxerto autógeno (Marx, 2004).

Considerando estes impasses, juntamente com o crescimento do campo da engenharia tecidual, outras formas de tratamento têm sido pesquisadas. Desde que se descobriu o potencial das células-tronco adultas em formar diferentes tecidos, estas têm sido exploradas visando o tratamento de diversas desordens clínicas, dentre elas a recuperação de tecido ósseo (Shilpa *et al.*, 2013).

Por estarem presentes no adulto, o uso destas células torna-se viável e alternativo ao uso das células-tronco embrionárias, banindo os impasses éticos. Além disso, podem ser obtidas do próprio paciente, eliminando o risco de rejeição e transmissão de doenças. São várias as fontes destas células, entre elas: medula óssea, tecido adiposo, músculo, entre outros (Costa, 2009; Duarte, 2013).

No que diz respeito à Odontologia, alguns dos sítios doadores de células-tronco do adulto são: polpa de dentes permanentes e decíduos e ligamento periodontal. Esta descoberta traz a possibilidade de utilizar estas células para a engenharia de tecidos dentais e ósseo, considerando algumas patologias, como doença periodontal, cárie dental, perda óssea, entre outras (Cordeiro *et al.*, 2008; Shilpa *et al.*, 2013).

Atualmente, sabe-se que estas células têm potencial para formação de dentina, complexo pulpar e tecido ósseo (Shilpa *et al.*, 2013).

Na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), há trabalhos explorando as células-tronco da polpa dentária. Polli (2011) realizou uma pesquisa que confirmou o caráter mesenquimal e de origem da crista neural das DPSCs. Duarte (2013) confirmou o potencial multipotente das DPSCs durante o desenvolvimento de ratos (*in vivo*) e em cultivo de DPSCs humanas (*in vitro*). Coura (2007) provou que o ligamento periodontal é um nicho de células-tronco com capacidade de diferenciação em derivados mesodermiais e neurais.

Seguindo estas premissas, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial das células-tronco da polpa de dentes permanentes humanos em regenerar defeitos ósseos induzidos em mandíbula de ratos.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

A regeneração de tecidos ósseos é uma demanda cada vez maior. Perda óssea devido a trauma, patologia, defeito congênito, atrofia e reabsorção fisiológica requer a recuperação deste tecido e a reabilitação do sistema estomatognático em busca do reestabelecimento estético, funcional e psicossocial (Guskuma *et al.*, 2013).

Segundo Costa (2009) “a reparação óssea é o restabelecimento da continuidade de tecidos defeituosos por outros tecidos que não têm capacidade de substituir funcionalmente e estruturalmente o tecido lesado, enquanto a regeneração óssea pode ser definida como um processo biológico complexo de renovação da arquitetura e função do tecido ósseo perdido” (Costa, 2009).

Muitos estudos estão à procura do material ideal para a regeneração óssea. Dentre os materiais estudados, incluem-se autoenxertos, aloenxertos, xenoenxertos e aloplásticos (Rokn *et al.*, 2012). O primeiro, diz respeito ao material recolhido do próprio receptor; no segundo, o material enxertivo pertence a um indivíduo da mesma espécie do receptor; o terceiro refere-se a materiais recolhidos de um doador de espécie diferente do receptor; e o último é um material sintético. O uso de Plasma Rico em Plaquetas (PRP) também tem sido estudado e mostra evidências positivas na regeneração óssea.

De acordo com Rokn *et al* (2012), as propriedades ideais de um enxerto são: biocompatibilidade, previsibilidade, viabilidade clínica, mínima operação e complicações pós-operatórias e aceitação pelo paciente (Rokn *et al.*, 2012). Além disso, Nampo *et al.* (2010) diz que três propriedades são ideais para um material de enxerto ósseo: osteocondução, que fornece um arcabouço; osteoindução, que promove o recrutamento de células formadoras de osso, como células indiferenciadas e pré-osteoblastos, e a formação de osso por estas células; osteoproliferação, que é a indução de células contidas no material enxertivo para promover a regeneração óssea (Nampo *et al.*, 2010).

O osso autógeno tem sido considerado o padrão ouro na regeneração óssea, uma vez que contém as três propriedades (Nampo *et al.*, 2010). Além disso, é biocompatível e não há transmissão de doenças. Estas características diferenciais têm favorecido seu uso como substituto ósseo (Guskuma *et al.*, 2013).

Um estudo realizado por Guskuma *et al.* (2013) avaliou o uso de osso autógeno como material de enxerto em defeitos ósseos criados em calvária de ratos. Para análise dos resultados, foi avaliada a porcentagem da área total do defeito ósseo colorida pelo fluorocromo Calceína e Alizarina, injetados respectivamente no 7º e 30º dia de pós-operatório, que demonstra o padrão de precipitação de cálcio correspondente à mineralização da matriz osteóide durante a regeneração óssea. Os resultados mostraram maior precipitação de cálcio no defeito ósseo preenchido com osso autógeno quando comparado ao defeito ósseo preenchido com coágulo sanguíneo no período de 7-30 dias de pós-operatório (Guskuma *et al.*, 2013).

Entretanto é necessário considerar as desvantagens deste tratamento. Segundo Yoshioka *et al.* (2012), uma segunda cirurgia é necessária para a coleta do material enxertivo e em alguns casos pode ser invasiva e causar estresse no paciente (Yoshioka *et al.*, 2012). Rokn *et al.* (2011) ainda diz que o acesso ao sítio doador pode ser limitado (Rokn *et al.*, 2011). Segundo Rokn *et al.* (2012), em muitos casos não é possível recolher a quantidade de osso autógeno necessária ao sítio receptor (Rokn *et al.*, 2012). Costa (2009) aponta algumas das desvantagens, como: complicações do sítio doador; enxertia em sítios heterotópicos; alta absorção durante a cicatrização e incorporação (Costa, 2009).

Tais limitações instigam a necessidade de encontrar opções que substituam o uso do osso autógeno. Com isso, diversos estudos foram conduzidos utilizando xenoenxertos e materiais aloplásticos. Dentre os xenoenxertos, o Osso Bovino Inorgânico (ABB, do inglês: anorganic bovine bone) tem se mostrado como uma opção devido à sua propriedade osteocondutiva e biocompatibilidade (Rokn *et al.*, 2012). Devido à forma com que se dá o seu processamento, a matriz mineral utilizada assemelha-se a osso humano em termos de composição química, morfologia e ultraestrutura (Maiorana *et al.*, 2011). O Bio-Oss, uma marca comercial de ABB, promove neoformação, não interfere na cura óssea e possui propriedades osteocondutivas (Rokn *et al.*, 2011; Rokn *et al.*, 2012).

Já os materiais sintéticos têm sua demanda aumentada por serem materiais ilimitados, estéreis e de fácil armazenamento. Estes substitutos ósseos são fabricados como hidroxapatita, fosfato tricálcico, sulfato de cálcio e combinações destes minerais, com diferentes técnicas de fabricação, configurações de cristal, dimensões dos poros, propriedades técnicas e taxas de reabsorção variáveis (Rokn *et al.*,



2011). Porém, diferentes índices de sucesso foram observados e até o momento nenhum destes materiais foi comprovado como o ideal (Costa, 2009).

Dentre os materiais citados, estão os Fosfatos de Cálcio Aloplásticos, como a Hidroxiapatita (HA) e o Fosfato Tricálcico (TCP, do inglês tricalcium phosphate). A HA foi muito utilizada na década de 1980, contudo hoje sabe-se que este material não induz adequada remodelação óssea devido à inflamação crônica associada à baixa reabsorção dos grânulos de HA. O TCP tem mostrado características superiores de reabsorção, contudo sua reabsorção precoce, antes da ligação celular e infiltração linfocítica, tem sido associada a resultados insatisfatórios. Apesar disso, encontrou-se uma maneira de tornar estes materiais úteis na cirurgia oral e ortopédica: a proporção de HA / TCP é controlada e desta forma a taxa de substituição e bioatividade dos materiais é alterada, tornando seu uso vantajoso. A proporção de 60% de HA para 40% de  $\beta$ -TCP é chamada de Straumann Bone Ceramic (SBC), e mostrou-se como um material bioativo, biorreabsorvível e biocompatível, além de possuir alto potencial osteoindutivo (Rokn *et al.*, 2011).

Outro material sintético é a Hidroxiapatita Carbonatada (CAP, do inglês, carbonated hydroxyapatite), onde 3-5% do CAP é constituído por íons de carbonato, sendo este o principal mineral que compõe as estruturas dentais e ósseas, em substituição à HA. O uso deste material como um arcabouço possui alta biocompatibilidade, o que sugere ser de uso vantajoso quando aplicado desta forma (Yoshioka *et al.*, 2012).

Um estudo realizado por Rokn *et al.* (2012) comparou o uso de ABB (® Bio-Oss) e  $\beta$ -tricálcio fosfato ( $\beta$ -TCP) como materiais de preenchimento em defeitos ósseos criados em calvária de ratos. Foram realizados três defeitos, sendo que um recebeu ABB, o outro recebeu  $\beta$ -TCP e o último não recebeu material de preenchimento. A coleta das amostras se deu um mês após da cirurgia. Cortes histológicos foram realizados e analisados em microscopia de luz. Dentre as avaliações realizadas, o  $\beta$ -TCP mostrou maior quantidade de formação óssea, seguido pelo Bio-Oss, e por último o grupo controle (não tratado). Além disso, o Bio-Oss mostrou maior quantidade de resíduos de biomaterial do que o  $\beta$ -TCP (Rokn *et al.*, 2012).

O estudo de Rokn *et al.* (2011) comparou as propriedades osteogênicas do SBC com o Bio-Oss. Para isso, foram realizadas em calvária de ratos quatro cavidades de igual diâmetro. Uma recebeu pequenas partículas de SBC (S-SBC, do inglês small- SBC, com 400-

700 $\mu$ m), outra recebeu grandes partículas de SBC (L-SBC, do inglês large-SBC, com 500-1000 $\mu$ m), outra cavidade recebeu partículas de Bio-Oss de 250-1000 $\mu$ m e uma cavidade não recebeu qualquer tratamento. Cortes histológicos foram preparados na 4<sup>a</sup> e 8<sup>a</sup> semana de pós-operatório e analisados em microscopia de luz. Das amostras obtidas: infiltrado inflamatório foi observado em maior quantidade no grupo controle, seguido pelo Bio-Oss, S-SBC e L-SBC. Foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e o Bio-Oss, controle e S-SBC, controle e L-SBC, e Bio-Oss e L-SBC. No grupo Bio-Oss maior quantidade de osso formado foi visto, mas não foi estatisticamente significativo. Houve diferença estatística significativa na regeneração óssea do grupo Bio-Oss entre a 8<sup>a</sup> e a 4<sup>a</sup> semana. Não houve diferença significativa na quantidade de regeneração óssea e de remanescente de material enxertivo entre os grupos de materiais (Rokn *et al.*, 2011).

Os homoenxertos, outra modalidade de tratamento, consistem em materiais obtidos de cadáveres humanos na forma de matriz desmineralizada. Acredita-se no sucesso desse enxerto pela indução de atividade óssea a partir de proteínas morfogenéticas (BMPs) presentes no material enxertivo. Embora haja estudos que apontam o sucesso clínico no reparo de defeitos ósseos, autores reportam uma atividade de indução óssea inconsistente. Os aloenxertos são materiais congelados e frescos que após implantados sofrem grande absorção e produzem forte resposta antigênica, além da possibilidade de transmissão de doenças infecciosas não detectadas. Com isso torna-se limitado o uso deste material (Costa, 2009).

O PRP é uma concentração autóloga de plaquetas humanas em um pequeno volume de plasma (Marx, 2004). Há estudos que documentam que as plaquetas contêm ao menos 7 fatores de crescimento envolvidos no reparo da ferida: 3 isômeros de PDGF (fator de crescimento derivado da plaqueta), 2 fatores de crescimento beta (TGF- $\beta$ ), um fator de crescimento endotelial e um fator de crescimento epitelial. Além disso, o PRP contém 3 proteínas que agem como moléculas de adesão celular para a osteocondução e como uma matriz para o osso, tecido conjuntivo e migração epitelial. São essas proteínas a fibrina, fibronectina e vitronectina. Devido a estas propriedades o PRP encontra indicação em enxertos ósseos, também como uso associado a substitutos ósseos, aplicações em tecidos moles, como em áreas doadoras de pele e áreas receptoras, entre outras (Marx, 2004).

O processamento deste material, apesar de necessitar de alguns cuidados, é simples: centrifugação do sangue coletado. Um dos cuidados é a concentração de plaquetas no PRP (Marx, 2004). Acredita-se que é necessário 4 ou 5 vezes a concentração de plaquetas autógenas para liberar quantidades significativas de fatores de crescimento para auxiliar na cicatrização óssea (Mooren *et al.*, 2007). Por ser um material autólogo, o PRP é livre de preocupações sobre doenças transmissíveis e por isso é bem aceito pelos pacientes. Além do mais, não induz reação antigênica (Marx, 2004).

Marx e colaboradores (1998) realizaram um estudo em 88 pacientes que iriam fazer enxerto de osso medular em defeitos mandibulares contínuos de 5cm ou mais devido à extirpação por tumor maligno ou benigno, sem tratamento prévio com radioterapia. Foram criados dois grupos, onde um recebeu o enxerto e aplicação de 6 mL de PRP com 1mL de cloreto de metileno/mistura de trombina de cálcio e o outro recebeu apenas o enxerto. Radiografias panorâmicas foram realizadas 2, 4 e 6 meses após a cirurgia. Aos 2 e 4 meses, os enxertos sem adição de PRP foram avaliados como abaixo da sua maturidade real e aos 6 meses em/ou apenas à frente da maturidade real do enxerto. Já os enxertos com adições de PRP foram avaliados em/ou ligeiramente superior a duas vezes a sua maturidade real (Marx *et al.*, 1998).

Além disso, realizou-se análise com anticorpo monoclonal em uma amostra das plaquetas que seriam aplicadas. A análise revelou presença intensa de PDGF e TGF- $\beta$  no material, o que confirma a presença destes fatores de crescimento na preparação do PRP. A mesma análise foi realizada em uma amostra do enxerto que seria utilizado e revelou presença de receptores celulares nos vasos sanguíneos e em menor número na superfície trabecular endosteal do osso esponjoso para os fatores de crescimento citados (Marx *et al.*, 1998).

Após 6 meses da cirurgia, uma avaliação histomorfométrica indicou que os enxertos ósseos com adição de PRP demonstraram maior densidade óssea trabecular do que enxertos ósseos sem PRP, sugerindo que a adição de PRP acelera a taxa e o grau de formação óssea em um enxerto ósseo, pelo menos nos primeiros 6 meses (Marx *et al.*, 1998).

Apesar das evidências científicas positivas sobre os substitutos ósseos, as limitações existentes impulsionam a busca pelo material ideal. Atualmente, com o advento da bioengenharia tecidual sob a perspectiva da utilização de células-tronco, novas expectativas surgem no que tange a regeneração óssea (Costa, 2009).

Pesquisas com células-tronco têm recebido considerável atenção desde que se descobriu que as células-tronco adultas têm capacidade de formar diferentes tipos de tecidos (Shilpa *et al.*, 2013). Isto porque se acredita num importante papel a ser desempenhado futuramente por estas células no tratamento de desordens médicas e odontológicas.

A célula-tronco é definida como uma célula que tem a habilidade de se dividir e se replicar continuamente, ou produzir células que podem se diferenciar em outros tipos de células, e podem ser classificadas em dois grandes grupos: célula-tronco embrionária e célula-tronco adulta. A primeira é derivada da massa celular interna do blastocisto e pode se desenvolver em quase todos os tecidos, contudo apresenta questões técnicas e éticas. A segunda encontra-se presente nos tecidos adultos e tem habilidade limitada em se proliferar, e são divididas em Células-Tronco Hematopoiéticas e Células-Tronco Mesenquimais, de acordo com a sua origem (Shilpa *et al.*, 2013). Há ainda outra classificação segundo o potencial de diferenciação em outros tipos celulares: totipotente (capazes de dar origem a todas as células do organismo, além dos anexos embrionários), pluripotente (origina todos os tipos celulares que constituem o indivíduo, mas não origina os anexos embrionários), ambas de origem embrionária e, multipotente, oligopotente ou unipotente, de origem de tecidos adultos, podendo formar apenas determinadas linhagens celulares (Wagers; Weissman, 2004).

A utilização de células-tronco adultas pode ser uma via alternativa promissora à utilização das células-tronco embrionárias, uma vez que são consideradas uma importante fonte de células-tronco e podem ser obtidas do paciente eliminando o risco de rejeição. Além disso, eliminam-se os entraves éticos da utilização de células-tronco embrionárias, como o paradigma do início da vida ou da falta de conhecimento sobre seu comportamento dentro de um organismo já formado (Duarte, 2013).

Quando induzidas *in vitro* ou *in vivo*, essas células possuem a capacidade de se auto-renovar e de se diferenciar em determinadas células. Estas células podem ser obtidas de diversos tecidos, como medula óssea, tecido adiposo, polpa de dente, músculo, entre outros. Devido à sua fácil obtenção e possibilidade de cultivo, surgem diversas possibilidades para o seu uso na medicina regenerativa, especialmente por apresentar a vantagem de imunocompatibilidade das células autólogas (Costa, 2009).

No campo da Odontologia, a descoberta de células-tronco na polpa de dentes permanentes e decíduos levantou a possibilidade de utiliza-las para a engenharia de tecidos e tratamento de doenças como periodontite, cárie dental, perdas ósseas, entre outras (Cordeiro *et al.*, 2008). Estas células podem ser isoladas de diferentes partes do dente. Atualmente, é realizado o seu isolamento a partir de células mesenquimais da polpa de dente decíduo e permanente, células encontradas na papila apical, no folículo dentário e no ligamento periodontal (Shilpa *et al.*, 2013).

As células de origem dentária possuem características de células-tronco mesenquimais e seus grupos apresentam capacidade distinta para a diferenciação celular. Sabe-se que as células da polpa de dentes decíduos têm maiores taxas de proliferação celular quando comparada às células da polpa de dente permanente (Shilpa *et al.*, 2013).

Estas células têm potencial osteogênico (Yamada *et al.*, 2010a), portanto podem formar osso *in vivo*, têm capacidade de regeneração pulpar (Cordeiro *et al.*, 2007), podem diferenciar-se em odontoblasto e produzir dentina, além de ter a capacidade de gerar neurônios e secretar fatores neurotróficos, e com isso surgem possibilidades de tratamento de doenças neurodegenerativas e reparo de neurônios motores. (Shilpa *et al.*, 2013).

Cordeiro *et al* (2008) realizou um trabalho onde foi implantado em tecido subcutâneo de camundongos imunodeficientes fatias de dentes extraídos em que a porção correspondente à câmara pulpar foi preenchida com um arcabouço biodegradável e células-tronco da polpa de dentes decíduos. O estudo avaliou as características morfológicas do tecido formado após a implantação do dente com o arcabouço e células. Os resultados apontam que após um período de 14-28 dias o tecido formado lembra uma polpa normal, com características morfológicas similares (Cordeiro *et al.*, 2008).

Costa (2009) realizou um trabalho em que comparou a regeneração de defeitos ósseos produzidos em calvária de ratos. Dois defeitos foram realizados na calota craniana de cada animal. Em um deles aplicou-se membrana colágena juntamente com células-tronco da polpa de dente decíduo (grupo experimental) e no outro apenas membrana colágena foi aplicada (grupo controle). Os animais foram divididos em grupos e eutanasiados após 7, 21, 30 e 60 dias de pós-operatório para análise histológica. Aos 7 dias observou-se no grupo controle que o defeito estava preenchido por tecido conjuntivo denso, restos da membrana colágena e processo inflamatório difuso, já no

grupo experimental o mesmo cenário foi observado porém sem remanescentes da membrana colágena. Aos 21 dias ambos os grupos apresentaram tecido ósseo cortical imaturo e tecido de granulação, porém o grupo experimental apresentou-se ligeiramente mais maduro e com menor quantidade de tecido de granulação. No grupo de 30 dias, a regeneração estava avançada com preenchimento total dos defeitos por tecido ósseo. No defeito que recebeu apenas a membrana colágena observou-se tecido de granulação, enquanto que no defeito que recebeu membrana colágena e células-tronco o tecido ósseo se mostrou mais denso e maduro. No grupo de 60 dias o defeito craniano estava aparentemente regenerado em ambos os grupos, porém no grupo experimental observou-se tecido ósseo mais organizado e maduro (Costa, 2009).

Este estudo ainda realizou no grupo de 60 dias de pós-operatório a extração do DNA humano para verificar a presença de células humanas no osso formado. A amplificação do DNA utilizando primers que amplificam especificamente genes humanos foi obtida com sucesso apenas com o material derivado do defeito ósseo que recebeu membrana colágena associada às células-tronco. No defeito ósseo que recebeu apenas a membrana colágena, a amplificação do DNA obteve somente primers específicos para ratos (Costa, 2009).

Atualmente, no âmbito da engenharia e regeneração tecidual, o Laboratório de Células-Tronco e Regeneração Tecidual (LACERT), juntamente com o Laboratório de Bioengenharia de Tecidos Dentários (LABITED), têm realizado pesquisas no campo da engenharia de tecidos. O trabalho realizado por Coura (2007) avaliou o ligamento periodontal humano como um nicho de células-tronco com características da crista neural. Segundo seus resultados, o ligamento periodontal humano possui células que apresentaram marcadores de células-tronco da crista neural, e células com capacidade de diferenciação em derivados mesodermiais e neurais (Coura, 2007).

Polli (2011) realizou uma pesquisa cujo objetivo foi a avaliação *in vitro* da polpa dentária como um nicho de células-tronco derivadas da crista neural e a característica mesenquimal destas células. Os resultados sugerem que as células utilizadas neste trabalho são células-tronco mesenquimais devido à observação da caracterização das células da polpa dentária através da diferenciação para o fenótipo mesodermal (osteócito, adipócito e célula de músculo liso). Além disso, obteve resultado positivo para alguns marcadores de células-tronco embrionárias (OCT4) e de células-tronco da crista neural (Snail,

Nestina), e negativas para outros (Nanog; p75 e SOX 10) avaliados por RT-PCR e imunocitoquímica (Polli, 2011).

Duarte (2013) se propôs a estudar as características das células-tronco da polpa dentária analisando o seu potencial multipotente durante as fases de desenvolvimento de ratos (*in vivo*) e em cultivo de células-tronco da polpa dentária humana (*in vitro*) (Duarte, 2013).

Entre as análises realizadas, destacou-se a procura pela presença de marcadores característicos de células da crista neural *in vivo* e *in vitro*. Os resultados obtidos no estudo *in vivo* sugerem que as células da polpa dentária de ratos expressam as proteínas características de células-tronco pluripotentes e achados de marcadores de células da crista neural sugerem que a polpa dentária de ratos podem se manter em estado multipotente por todo o seu desenvolvimento até a idade adulta. O resultado da pesquisa *in vitro* observou expressão gênica positiva para marcadores de células pluripotentes e da crista neural nas células-tronco da polpa dentária humana sugerindo que as mesmas contêm células-tronco ou células progenitoras multipotentes (Duarte, 2013).

Foi realizado também análises imunofenotípicas em unidades formadoras de colônias nas células-tronco da polpa dental humana. Observou-se células positivas para marcadores que caracterizam derivados ectodermiais e células positivas para marcadores de derivados mesodermiais em uma mesma colônia. Esse resultado demonstra que as células da polpa dentária apresentam potencial ectomesenquimal na fase adulta, o que está de acordo com a origem das células da polpa dentária pela crista neural. Além disso, demonstra que essas células mantêm o potencial ectomesenquimal ao longo do desenvolvimento dentário (Duarte, 2013).

Diante destas premissas e dos resultados encontrados pelo LACERT em colaboração com o LABITED, o presente estudo se propôs a verificar o potencial das células-tronco da polpa de dentes permanentes humanos em regenerar defeitos ósseos induzidos em mandíbulas de ratos *in vivo*.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Verificar a capacidade das células-tronco da polpa de dentes permanentes humanos em regenerar defeitos ósseos induzidos em mandíbulas de ratos, *in vivo*.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Estabelecer a cultura primária de células da polpa de dentes permanentes humanos;
- Padronizar o protocolo de indução de defeito ósseo na mandíbula de ratos para estudos de regeneração óssea;
- Descrever, têmporo-especialmente, o processo de regeneração óssea alcançada pelas DPSCs;
- Quantificar e comparar a neoformação óssea no processo de regeneração com e sem o uso das DPSCs;



## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Questões éticas

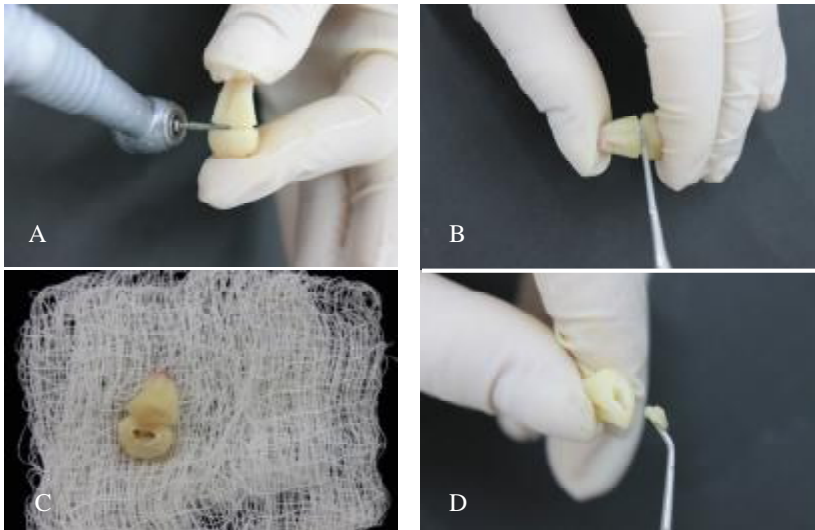
Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) da Universidade Federal de Santa Catarina (projeto 16932913.8.0000.0121) (Anexo 1) e pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), sob o protocolo PP0848 (Ofício nº 114/CEUA/PROPESQ/2013) (Anexo 2).

### 4.2 Coleta e Cultura das DPSCs

A obtenção dos dentes permanentes ocorreu através da doação de terceiros molares hígidos extraídos na clínica do Centro de Especialidades Odontológicas, na Universidade Federal de Santa Catarina, após ler e esclarecer o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice A) e se obter a assinatura do mesmo.

No total, oito dentes foram obtidos, cada um de um paciente. Contudo, foram utilizadas as DPSCs provenientes da cultura de apenas um dente, de forma a evitar possíveis discrepâncias na neoformação óssea.

Para a coleta da polpa dental, após extração o dente foi armazenado em um tubo Falcon contendo meio  $\alpha$ -MEM suplementado com 20% de SFB. Com o auxílio de uma pinça clínica, despejou-se sobre o dente PBS 1x. O elemento dental foi apreendido com os dedos e com uma broca cilíndrica em alta rotação, sob refrigeração com água destilada, realizou-se um sulco no sentido transversal sobre o limite amelocementário, aprofundando todo o diâmetro da broca. Uma espátula lecron foi pressionada contra o sulco realizado para seccionar o dente. Com uma cureta periodontal, a polpa dental foi coletada e permaneceu armazenada em um tubo Falcon contendo meio nutritivo  $\alpha$ -MEM com 20% de SFB (Figura 1).



**Figura 1: Coleta da polpa dental.** (A): corte do dente com broca na região amelo-cementária; (B): clivagem do dente com espátula lecron; (C): polpa exposta após clivagem; (D): remoção da polpa para cultura.

Para o isolamento e expansão das DPSCs todos os procedimentos foram realizados em um fluxo laminar. Descartou-se o meio nutritivo no qual a polpa se encontrava e adicionou-se 1mL da enzima collagenase I e 1mL de dispase para promover a dissociação celular. Durante este processo, o tubo permaneceu armazenado em estufa úmida à 37°C e 5% CO<sup>2</sup> por uma hora, e recebeu leve agitação manual a cada 20 minutos. A solução enzimática foi neutralizada com 4mL de PBS 1x com 5% SFB. O tubo foi submetido à centrifugação por 5min a 1200 rpm.

O sobrenadante foi descartado e ao remanescente foi adicionado 1 ml de meio  $\alpha$ -MEM suplementado com 20% de SFB para resuspender o precipitado. Com uma peneira Cell Strainer de 40  $\mu$ m de diâmetro, sobre um tubo Falcon, foi realizada a filtragem, adicionado ao filtrado 8mL de  $\alpha$ -MEM suplementado com 20% SFB, e o conteúdo transferido com o auxílio de uma pipeta de 10.000  $\mu$ L em duas garrafas de cultura de 25 cm<sup>2</sup>. Nas garrafas de cultura se anotou: tipo de célula, número da amostra, passagem, data e nome do pesquisador. As garrafas permaneceram em estufa úmida a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

O meio  $\alpha$ -MEM com 20% de SFB foi trocado a cada 3 dias, onde o novo meio foi previamente aquecido em banho Maria para ficar em

temperatura ambiente e não provocar choque térmico. Para a troca do meio, 2 mL da solução contida na garrafa de cultura foram removidos e se acrescentou 2mL do meio.

Quando a garrafa de cultura atingiu aproximadamente 90% de confluência, realizou-se o repique. Para isso, os 4mL do meio contidos na garrafa foram descartados, as células lavadas com 2mL de PBS 1x por 3 vezes e 1 mL da enzima tripsina 0,25% foi adicionado e a cultura armazenada na estufa úmida por 1 minuto. Com o auxílio de um microscópio com luz invertida, avaliou-se a dissociação das células da garrafa de cultura. Foi adicionado 1mL de  $\alpha$ -MEM com 15% SFB e toda a solução foi transferida para um tubo Falcon 15mL que foi centrifugado por 5min a 1200 rpm. Descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi ressuspenso com 1mL de  $\alpha$ -MEM com 15% SFB.

Em seguida, realizou-se a contagem celular. Para isso, foi coletado 10  $\mu$ L do conteúdo do tubo Falcon e despejado sobre a câmara de Neubauer. A fórmula utilizada na contagem celular foi: soma de 4 áreas de igual tamanho dividido por 4 e o resultado multiplicado por 10.000.

Após a contagem, as células foram plaqueadas. Com uma pipeta coletou-se uma quantidade da cultura que continha cerca de 100-150 mil células e o conteúdo foi colocado em uma nova garrafa de cultura de 25cm<sup>2</sup> com 4mL de SFB. A garrafa permaneceu armazenada em estufa úmida a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, e a troca do meio realizada a cada três dias.

### **4.3 Armazenamento das DPSCs**

Para o armazenamento em longo prazo das células, utilizou-se o nitrogênio líquido. Para isto, preparou-se antecipadamente solução SBF com 5% de DMSO e se armazenou em geladeira. O meio de nutrição contido na garrafa de cultura foi descartado e as células lavadas 3 vezes com PBS 1x. Em seguida, foi adicionado 1mL de tripsina 0,25% que agiu por 1 minuto em estufa úmida a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, e 1mL de meio  $\alpha$ -MEM suplementado com 15% de SBF foi adicionado e a solução transferida para um tubo Falcon. Este foi centrifugado por 5min a 1200 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado resuspendido com 1 ml de SFB 5% e DMSO. 1mL desta solução, que contém cerca de 1 milhão de células, foi colocada em um tubo de criocongelamento e permaneceu armazenado no freezer à -80°C por 12 horas. Em seguida os tubos foram transferidos para o nitrogênio líquido (-196°C).

Quando foi necessária a utilização das células, estas foram descongeladas dois dias antes do uso para que não houvesse estresse.

Previamente ao descongelamento, foi preparado meio  $\alpha$ -MEM suplementado com 15% de SBF e aquecido em banho Maria para alcançar a temperatura ambiente (em torno de 37°C). Retirou-se o tubo de criocongelamento do nitrogênio líquido e rapidamente foi levado para a sala de cultura. Foi adicionado 1mL do meio  $\alpha$ -MEM suplementado com 15% de SBF para descongelar as células. Em seguida, o conteúdo do tubo de criocongelamento foi transferido com uma pipeta para um tubo Falcon de 15mL que recebeu 9mL do meio  $\alpha$ -MEM suplementado com 15% de SBF.

O tubo foi centrifugado a 1200 rpm por 5 minutos, o sobrenadante descartado e o precipitado recebeu 1 ml de  $\alpha$ -MEM suplementado com 15% de SBF. O conteúdo deste tubo Falcon foi plaqueado em seis garrafas de 25cm<sup>2</sup>, que permaneceram armazenadas em estufa úmida a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 4.4 Avaliação das DPSCs

Para confirmar o fenótipo de célula-tronco mesenquimal das células utilizadas neste trabalho realizou-se: análise morfológica em microscopia de contraste; teste de citometria de fluxo para os marcadores de células-tronco mesenquimais CD105, CD90 e CD73; ensaio de imunocitoquímica para os marcadores de células indiferenciadas Nanog e Sox2; e uso de meios indutivos de diferenciação para os fenótipos adipocíticos, osteocítico e condrocítico seguido de coloração celular.

A análise do fenótipo mesenquimal *in vitro* foi realizada com as células das passagens de 1-5. Foram feitas alíquotas em tubos de citometria de fluxo com 100.000 células cada e acrescidas com os anticorpos conjugados a fluorocromos: anti-CD105, anti-CD73 e anti-CD90 para a leitura de citometria de fluxo. Os dados foram analisados pelo programa Flow Jo para a geração de histogramas e gráficos.

Através do ensaio de imunocitoquímica foram analisados os marcadores de células indiferenciadas: Nanog e Sox 2. Para a realização do ensaio de imunocitoquímica as culturas foram fixadas com paraformaldeído 4% e incubadas com anticorpos primários específicos, descritos na tabela abaixo. Em seguida foram realizadas incubações com os anticorpos secundários Alexa 488 ou 594. Para a observação dos núcleos foi utilizado o corante fluorescente DAPI em

microscópio epifluorescente (Olympus IX71) e fotografadas em câmera Olympus DP71.

Fenótipo	Anticorpo primário	Anticorpo secundário
Nanog	IgG Coelho Nanog	Anti IgG camundongo – conjugado a Alexa 594
Sox-2	IgG Camundongo	Anti IgG coelho – conjugado a Alexa 488

**Tabela 2: Anticorpos primários e secundários utilizados nas reações imunocitoquímicas.**

Todo o procedimento de cultura, armazenamento e análise das células foi realizado no Laboratório de Células-Tronco e Regeneração Tecidual LACERT, sob responsabilidade da Professora Dra. Andréa Gonçalves Trentin, sendo os experimentos realizados pela aluna de iniciação científica Priscilla Barros Delben, colaboradores deste projeto de pesquisa.

#### 4.5 Aplicação das células no defeito ósseo

Para cada defeito ósseo que recebeu aplicação de DPSCs foi necessário a utilização de uma garrafa de cultura celular de 25 cm<sup>2</sup> com 90% de confluência contendo aproximadamente  $1,8 \times 10^5$  células. Para o defeito ósseo foram utilizadas  $1,5 \times 10^5$  células e as células remanescentes (aproximadamente  $3 \times 10^5$ ) foram utilizadas para verificar sua viabilidade após o uso na cirurgia.

No momento do uso das células, o meio contido na garrafa foi descartado, as células lavadas 3 vezes com PBS 1X e 1mL de tripsina foi adicionado por 1 minuto à 37°C e em seguida neutralizada pela incorporação de 4mL de meio  $\alpha$ -Mem com 15% SFB. O conteúdo da garrafa foi transferido em tubo Falcon 15mL e centrifugado a 1200 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas com 1mL de PBS 1x. O tubo foi novamente centrifugado a 1200 rpm por 5 minutos, o sobrenadante descartado e o *pellet* aplicado no defeito ósseo com o auxílio de uma pipeta de 100  $\mu$ l.

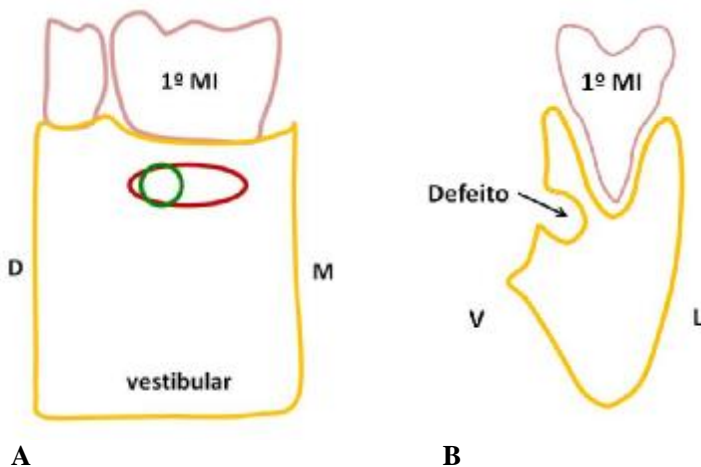
As células remanescentes foram submetidas a testes de viabilidade celular. Para isso, estas células foram semeadas em placas de 96 poços para tratamento com MTT, um sal reduzido nas mitocôndrias ativas e assim, alterando sua coloração para análise de absorbância em espectrofotômetro. Além disso, uma parte das células

remanescentes foi cultivada em meio de diferenciação osteogênica e mantida nesta condição por 22 dias.

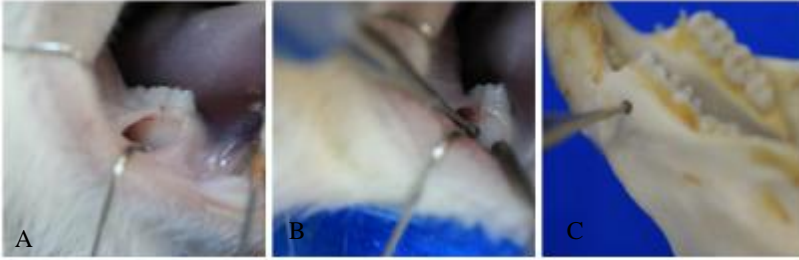
#### **4.6 Protocolo cirúrgico**

Foram utilizados 20 ratos Wistar, machos, com 2 meses de idade, de aproximadamente 250 gramas. Os animais foram submetidos à anestesia geral, na qual se utilizou cloridrato de ketamina 5% e xilazina 2% injetados na cavidade peritoneal (0,3ml/100g). O animal foi colocado em decúbito dorsal e estabilizado na mesa cirúrgica com o auxílio de elásticos que fixaram os membros superiores e inferiores à mesa. Realizou-se a antisepsia extra e intrabucal com uma gaze embebida em álcool iodado. Para a confecção do defeito ósseo, uma incisão foi realizada com uma lâmina de bisturi número 15 em mucosa alveolar abaixo do primeiro molar inferior. A divulsão dos tecidos moles e do periósteo foi realizada com uma espátula de inserção de resina composta. Afastadores de metais adaptados à cavidade bucal dos animais foram utilizados para a exposição do tecido ósseo.

Nos animais que seriam submetidos à análise de microscopia eletrônica de varredura utilizou-se uma broca esférica de 1mm de diâmetro, em baixa rotação, sob irrigação de soro fisiológico, para realizar o defeito ósseo na altura da raiz disto vestibular do primeiro molar inferior, aprofundando toda a ponta ativa da broca (1mm). Já nos animais que seriam submetidos à análise histológica e de medição da área de osso neoformado, utilizou-se a mesma broca, contudo o defeito produzido foi alongado para mesial atingindo dimensões finais de: 1mm de altura e profundidade e 3mm de comprimento (Figura 2 e 3). Foram utilizados protocolos diferentes para facilitar a obtenção dos cortes em parafina. No lado direito (experimental, Tto), o fio de sutura Catgut 4-0 foi transpassado pela gengiva nos bordos da incisão, e antes de completar a sutura, as margens da incisão foram afastadas para expor o defeito ósseo.

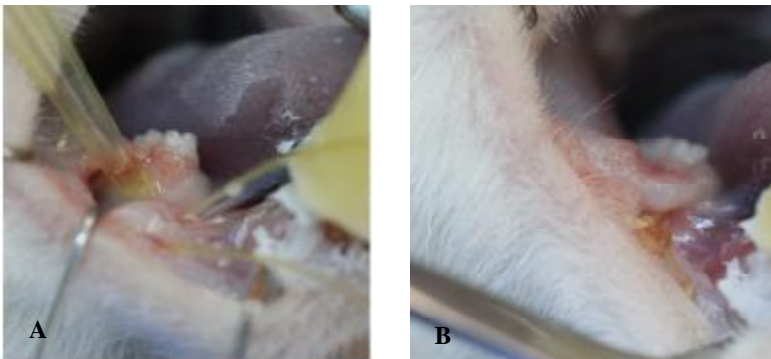


**Figura 2: Desenho demonstrativo do defeito ósseo confeccionado.** (A): Vista vestibular da mandíbula; traçado verde demonstra a posição e tamanho do defeito para análise em MEV; traçado vermelho para análise histológica e medição de área de osso neoformado. (B) Vista mesial da mandíbula. D: distal; M: mesial; 1º MI: 1º molar inferior; V:vestibular; L: lingual.



**Figura 3: Confeção do defeito ósseo.** (A): Exposição do tecido ósseo na região do primeiro molar inferior; (B): Broca esférica em baixa rotação em posição para realização do defeito ósseo; (C): mandíbula dissecada mostrando posição do defeito e seu tamanho compatível com o diâmetro da broca no caso de MEV. Quando para análise histológico o defeito foi alongado para a distal.

Cones de papel estéreis foram utilizados para secar o defeito ósseo e em seguida aplicar as células (aproximadamente 1.000.000 de células) com uma pipeta de 100  $\mu$ l. Após a aplicação das células, a sutura foi finalizada. No lado esquerdo não houve a aplicação das células, sendo realizada a sutura após a realização do defeito ósseo (Figura 4).



**Figura 4: Aplicação das DPSCs e sutura.** (A) DPSCs sendo aplicadas com auxílio da pipeta de 100ul; (B) sutura finalizada.



#### **4.7 Coleta, processamento e análise das amostras para MEV**

Foram utilizados 10 animais para a análise em MEV. Para a coleta do material, os animais foram separados em três grupos de observação: 7, 14 e 28 dias de pós-operatório contendo 3 animais cada grupo; 1 animal sobressalente foi utilizado como tempo zero. Para a eutanásia, os animais receberam sobre-dosagem anestésica. As hemimandíbula direita e esquerda foram coletadas e o excesso de tecido mole aderido ao osso foi removido com uma lâmina de bisturi número 15. A peça cirúrgica permaneceu submersa em hipoclorito de sódio 1% por 6 horas, e em seguida foi hidratada em soro fisiológico por 1 hora. A desidratação da peça ocorreu com sua imersão em uma sequência crescente de etanol, iniciando com 30% e finalizando com dois banhos de 100% por 30 minutos cada. A amostra manteve-se em temperatura ambiente para secar.

A amostra foi reduzida à região méso-distal do primeiro molar inferior e um pincel artístico número 12 da marca Tigre e jato de ar sobre a superfície da amostra foram aplicados para remover resíduos provenientes da redução. Em seguida realizou-se o processamento para análise em MEV JEOL JSM-6390LV (Jeol Ltd, Tokyo, Japan). As amostras foram fixadas no suporte com a superfície vestibular do processo alveolar voltada para o campo de captura, de forma a analisar todo o diâmetro do defeito ósseo. Capturou-se uma imagem com visão total do defeito ósseo em cada amostra (Figura 5).

As amostras tiveram sua identificação mascarada de forma que a captura e análise fossem realizadas por um examinador cegado quanto ao grupo a que cada uma pertence. Na avaliação foi realizada análise descritiva do processo de regeneração óssea em cada grupo, levando em consideração o defeito ósseo, a qualidade do osso neoformado e o padrão de deposição óssea.



**Figura 5: Amostras para MEV.** Amostras de mandíbulas após o processamento para MEV, fixadas no suporte e metalizadas.

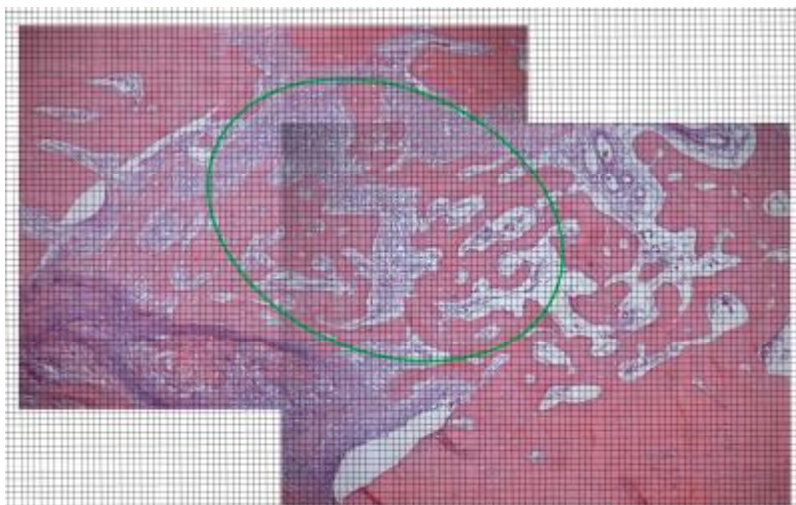
#### **4.8 Coleta, processamento e análise histológicas das amostras incluídas em parafina**

Seguindo os parâmetros da avaliação em MEV, 10 animais foram utilizados e separados em três grupos de observação: 7, 14 e 28 dias de pós-operatório, com 3 animais cada grupo, e um animal sobressalente foi o tempo zero. O protocolo cirúrgico e de coleta foi o mesmo descrito anteriormente.

Após a coleta das hemimandíbulas direita e esquerda, o tecido mole adjacente foi preservado e a peça cirúrgica foi fixada em formol 10% por 24 horas. As amostras foram desmineralizadas em EDTA 4,13% por 3 meses e 20 dias, sob agitação e com trocas de EDTA a cada 3 dias. Em seguida, as amostras foram processadas para inclusão em parafina, cortes semi-seriados de  $3\mu\text{m}$  foram obtidos e as lâminas coradas com Hematoxilina e Eosina. As lâminas tiveram sua identificação mascarada e foram capturadas fotomicrografias da área do defeito ósseo. Os defeitos ósseos foram analisados e descritos.

A análise da área de osso neoformado foi realizado às cegas, por um examinador previamente calibrado, através de uma grade de contagem quadricular, criada no programa Power Point. Cada quadrado (evento) possuía uma área mínima de  $0,5 \times 0,5\text{cm}$ , permitindo uma contagem minuciosa da área de interesse. O perímetro da área de interesse foi padronizado para todas as amostras estando delimitado por uma elipse, tendo uma contagem de 1540 eventos na área total. Os

eventos que continham mais de 50% de sua área preenchida por tecido ósseo foram contados, os eventos que continham o traçado da elipse sobre sua área foram desprezados. Análise de porcentagem foi realizada para quantificar a neoformação óssea. Para a análise estatística dos resultados foi aplicado o teste T, com significância de 0,05. (Figura 6)

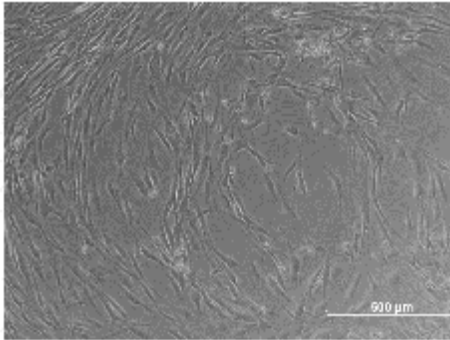


**Figura 6: Grade de contagem da área de osso neoformado.** Elipse verde corresponde à área total considerada na contagem.

## 5. RESULTADOS

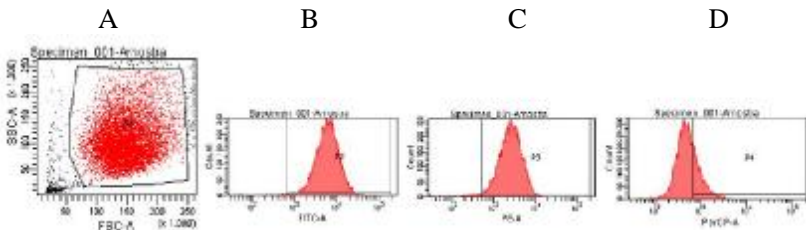
### 5.1 Padronização da Cultura das DPSCs

Após a coleta das polpas dentárias, procedeu-se à cultura, padronização e testes experimentais das células no laboratório de Células-Tronco e Regeneração Tecidual (LACERT). As células apresentaram aderência ao plástico e morfologia fibroblástóide típicas de células-tronco mesenquimais (Figura 7).



**Figura 7: Análise morfológica das células derivadas da polpa dentária humana.** Células fibroblástóide aderidas ao substrato plástico da garrafa de cultura. Fotografia de microscopia de contraste de fase.

Os resultados obtidos pelos testes de imunofluorescência por citometria de fluxo mostraram que as células expressaram em conjunto os marcadores de células estromais mesenquimais CD73, CD90 e CD105 (Figura 8 e Tabela 2).



**Figura 8: Representação em histogramas do perfil imunofenotípico de uma população celular.** Gate da população celular analisada (A) de cultura representativa para os marcadores de superfície CD73-PE (B) e

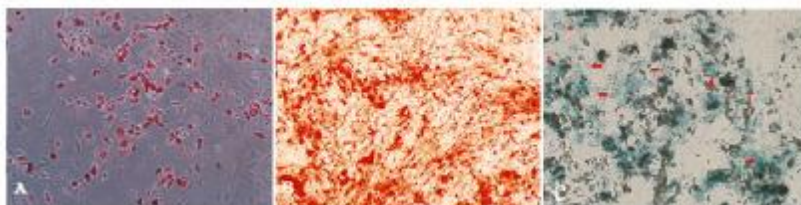
CD90-FITC (C) e CD105 PercP (D)

**Tabela 2: Caracterização Imunofenotípica de Células-Tronco Mesenquimais da Polpa Dentária Humana em passagens 4 a 6.** Valores obtidos para cada passagem transformados em valor médio, visto que não houve diferença significativa entres as passagens analisadas.

Marcador	Passagem			Média	Resultado
	4	5	6		
CD73	996	998	997	997	+
CD90	996	997	998	997	+
CD105	668,5	990	890	882,5	+

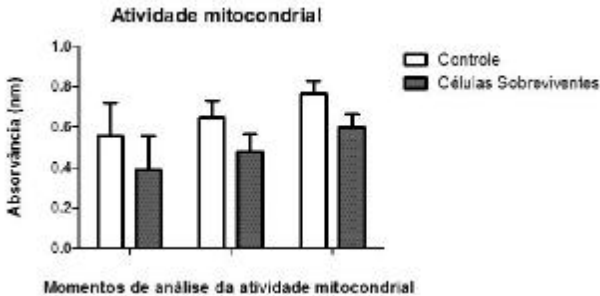
O ensaio de imunocitoquímica realizado para os marcadores de células indiferenciadas Nanog e Sox 2 revelou a presença destes marcadores nas DPSCs utilizadas neste trabalho.

Além disto, o potencial de diferenciação celular para os fenótipos adipocíticos, osteócitos e condrocíticos foi confirmado após o uso de meios indutivos de diferenciação e coloração celular com Oil Red, Alizarin Red e Alcian Blue, respectivamente (Figura 9).

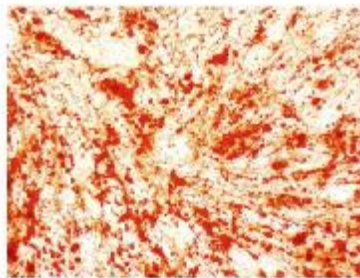


**Figura 9: Diferenciação das células derivadas da polpa dentária humana cultivadas em meios indutivos adipogênico, osteogênico e condrogênico e fixadas com paraformaldeído 4%. (A)** Células cultivadas em meio de cultura adipogênico e coradas com Oil Red para visualização de lóculos de lípidos em vermelho. **(B)** Células cultivadas em meio de cultura osteogênico tendo sua matriz extracelular corada em vermelho com Alizarin Red. **(C)** Células cultivadas em meio de cultura condrogênico tendo sua matriz extracelular corada com Alcian Blue; setas vermelhas indicam condrocitos diferenciados.

Por fim, análise do MTT demonstrou que as células estavam viáveis no momento da sua aplicação *in vivo*, confirmando a utilização de células-tronco mesenquimais do tecido de polpa dentária humana viáveis no presente trabalho (Figura 10). Foi avaliada também a capacidade de diferenciação osteogênica nas células sobreviventes ao processo de aplicação *in vivo* (Figura 11).



**Figura 10. Atividade mitocondrial de células-tronco da polpa dentária humana de células mantidas em estufa e sobreviventes ao processo de aplicação *in vivo*.** Conversão do MTT em cristais de formazan em culturas de células-tronco mesenquimais isoladas da polpa dentária humana. Teste realizado com n=3, Anova. Programa utilizado Graphpad Prism versão 5.0.



**Figura 11. Diferenciação das células derivadas da polpa dentária humana sobreviventes do processo de aplicação *in vivo* seguido de tratamento com meio osteogênico e fixadas com paraformaldeído 4%.** Células cultivadas em meio de cultura osteogênico tendo sua

matriz extracelular corada em vermelho com Alizarin Red.

## **5.2 Análise das amostras para MEV**

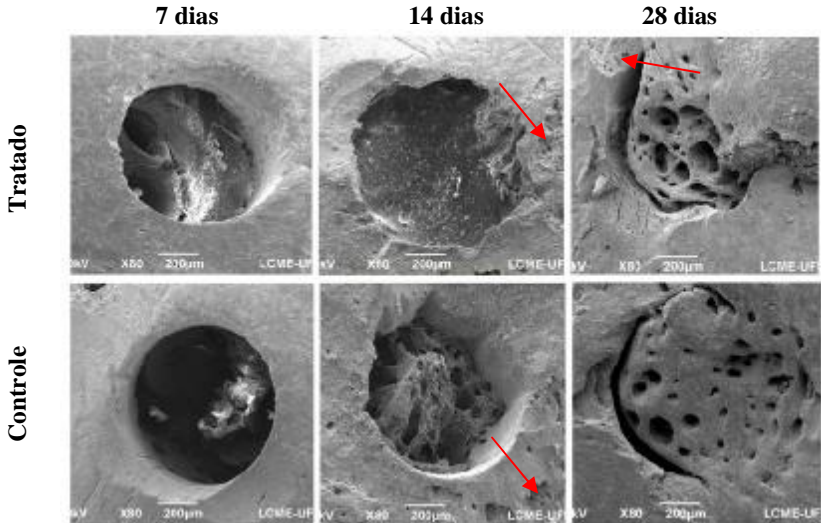
Um animal foi submetido à cirurgia para a realização do defeito ósseo mandibular e sacrificado após o procedimento cirúrgico para coleta da amostra de tempo zero, utilizada para estabelecer os critérios de avaliação da formação óssea nos animais dos demais grupos. Sua análise exibiu um defeito ósseo circular, bem delimitado, de aproximadamente 1mm de diâmetro, localizado na porção distal do 1º molar inferior.

O grupo tratado (Tto) e não tratado (ST) exibiram na análise realizada aos 7 dias pós cirurgia defeitos mandibulares com margens regulares e pequena quantidade de tecido ósseo esponjoso neoformado no interior da cavidade. No grupo Tto não se observou reabsorção óssea, enquanto que no ST 50% das amostras tiveram uma pequena quantidade de osso cortical externo ao defeito reabsorvido (Figura 12).

Nos grupos de 14 dias de observação verificaram-se margens dos defeitos um pouco irregulares e o padrão de formação óssea se manteve no interior/fundo da cavidade. No grupo Tto observa-se formação óssea consistente com poucos espaços medulares. Apenas uma das amostras teve pequena reabsorção de osso cortical na margem externa do defeito. No grupo ST observa-se formação de osso esponjoso com espaços medulares bem definidos. Todas as amostras tiveram pequena reabsorção de cortical na margem externa do defeito (Figura 12).

Nos animais de 28 dias de observação verificou-se em todas as amostras traços das margens do defeito com áreas recobertas por osso neoformado, indicando que o padrão de formação óssea se manteve e ao alcançar a superfície do defeito conectou-se com o osso adjacente e foi recoberto por tecido ósseo cortical. O grupo Tto obteve 75% de suas amostras com alguma reabsorção de osso cortical extrínseco ao defeito, enquanto que no ST este foi observado em 50% das amostras (Figura 12).

Aparentemente não houve diferença morfológica expressiva entre a regeneração dos defeitos tratados com DPSCs e os não tratados, havendo o mesmo padrão de formação óssea no decorrer do tempo para ambas as amostras.

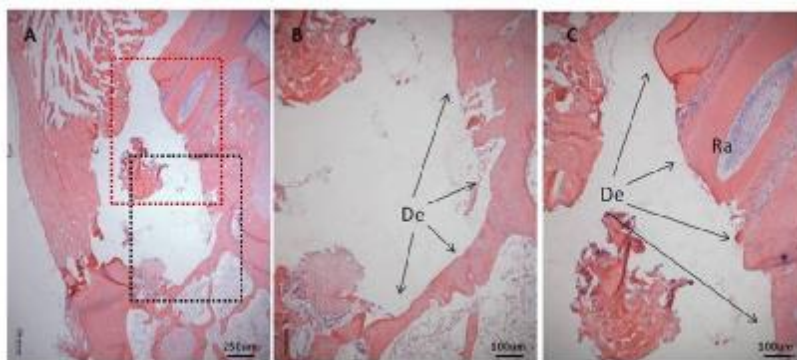


**Figura 12: Fotomicrografia de MEV das amostras analisadas.** 7 dias: início do reparo ósseo no tratado e controle, sendo a regeneração predominante no fundo da cavidade; bordas externas do defeito aparecem nítidas; 14 dias: regeneração em curso no tratado e no controle, havendo diminuição da profundidade da cavidade; 28 dias: regeneração avançada no tratado e controle, não havendo mais profundidade na cavidade e ocorrendo fusão dos seus bordos com o tecido ósseo neoformado, de aspecto esponjoso. Setas vermelhas indicam áreas de reabsorção de osso cortical.



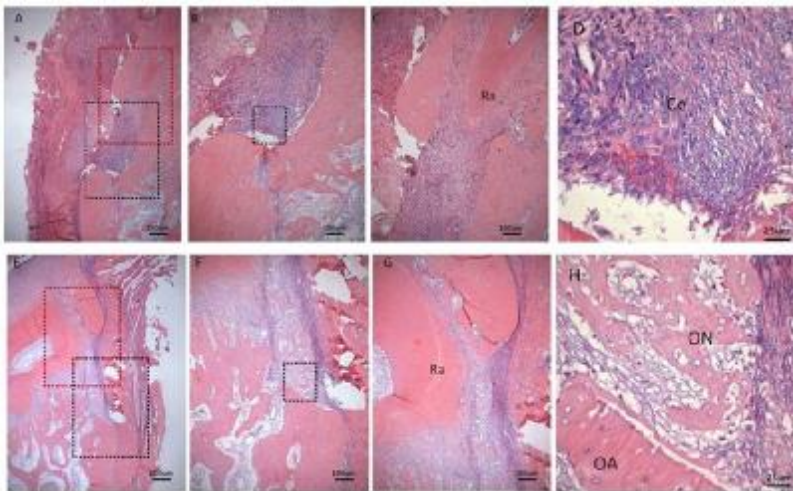
### 5.3 Análise Histológica descritiva e medição da área óssea neoformada (Hematoxilina e Eosina)

Assim como para a análise em MEV, um animal foi submetido à cirurgia para ser o tempo zero da análise e utilizado para estabelecer os critérios de descrição da formação óssea nos animais dos demais grupos. Sendo assim, a análise histológica desta amostra revelou uma cavidade vazia, cortical vestibular rompida e o defeito ósseo abrangendo osso medular até a região próxima das raízes do 1º molar inferior (Figura 13).



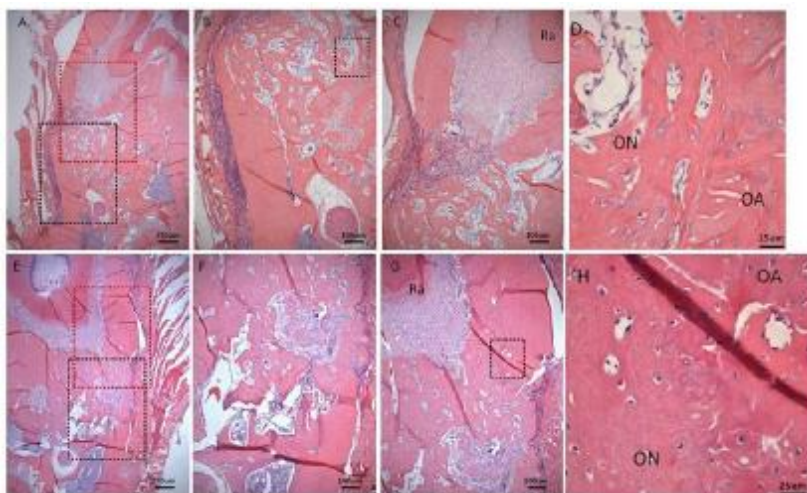
**Figura 13: Fotomicrografia de amostras de tempo zero.** (A): região do defeito em visualização panorâmica; (B): maior aumento da área demarcada em preto em (A); (C): maior aumento da área demarcada em vermelho em (A). De: defeito ósseo / Ra: raiz do dente.

O grupo Tto revelou aos 7 dias de pós-operatório pequena formação óssea e áreas de inflamação. Em uma das amostras observou-se cavidade totalmente preenchida por tecido conjuntivo degenerado, compatível com inflamação. O grupo ST exibiu formação óssea aparentemente mais avançada, com trabéculas evidentes e pequenas áreas de inflamação (Figura 14).



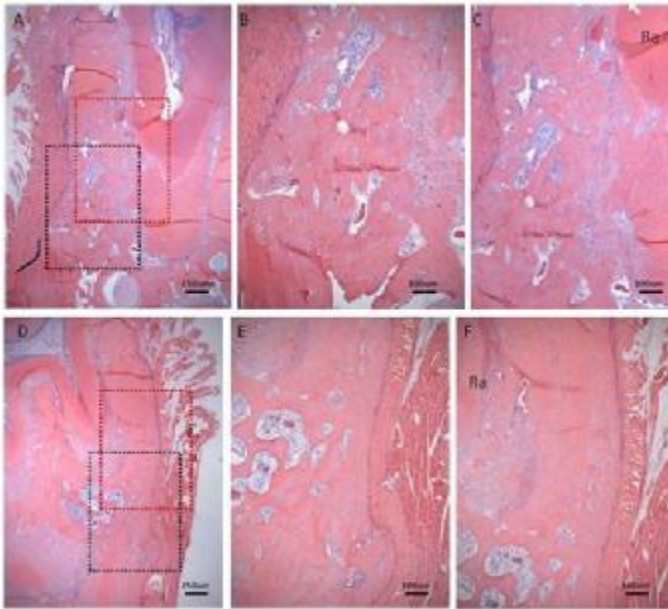
**Figura 14: Fotomicrografia de amostras de 7 dias de pós-operatório.** (A,B,C,D): com o tratamento com DPSCs; (E,F,G,H): controle. (A): região do defeito em visualização panorâmica; (B): maior aumento da área demarcada em preto em (A); (C): maior aumento da área demarcada em vermelho em (A); (D): maior aumento da área demarcada em (B); (E): região do defeito em visualização panorâmica; F: maior aumento da área demarcada em preto em (E); (G): maior aumento da área demarcada em vermelho em (E); (H): maior aumento da área demarcada em (F). Ra: raiz do dente / Ce: células inflamatórias / ON: osso novo / AO: osso antigo. Hematoxilina-Eosina.

Na análise realizada aos 14 dias pós-cirúrgico averigua-se no grupo Tto pequena formação óssea com predomínio de áreas de inflamação. Apenas uma das amostras exibiu avançada formação óssea com trabéculas consistentes. Já no grupo ST observa-se formação óssea mais avançada, com trabéculas ósseas consistentes e poucas áreas de inflamação. Apenas uma amostra apresentou neoformação óssea menos avançada e circunscrita por tecido inflamatório (Figura 15).



**Figura 15: Fotomicrografia de amostras de 14 dias de pós-operatório.** (A,B,C,D): com o tratamento com DPSCs; (E,F,G,H): controle. (A): visualização panorâmica; (B): maior aumento da área demarcada em preto em (A); (C): maior aumento da área demarcada em vermelho em (A); (D): maior aumento da área demarcada em (B); (E): região do defeito em visualização panorâmica; (F): maior aumento da área demarcada em preto em (E); (G): maior aumento da área demarcada em vermelho em (E); (H): maior aumento da área demarcada em (F). Ra: raiz do dente / ON: osso novo / OA: osso antigo. Hematoxilina-Eosina.

Aos 28 dias de pós-operatório, as amostras do grupo Tto e ST revelaram avançada formação óssea, com predominância de tecido ósseo neoformado no interior do defeito e adjacente à cortical óssea rompida no ato cirúrgico, sem tecidos contendo células inflamatórias (Figura 16).



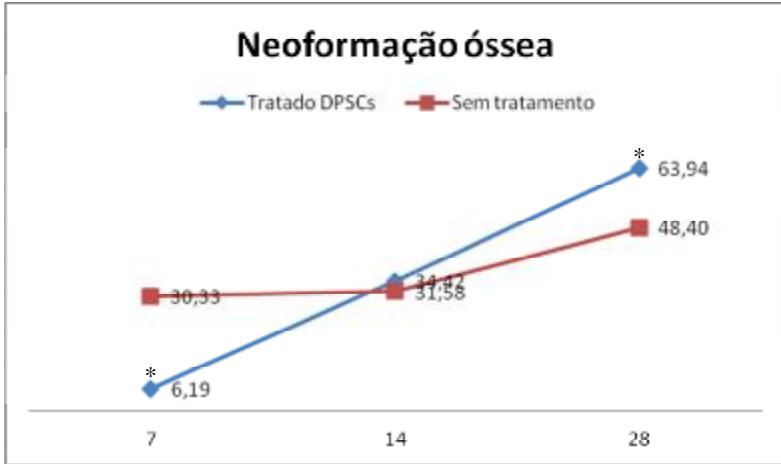
**Figura 16: Fotomicrografia de amostras de 28 dias de pós-operatório.** (A,B,C): com o tratamento com DPSCs; (D,E,F): controle. (A): região do defeito em visualização panorâmica; (B): maior aumento da área demarcada em preto em (A); (C): maior aumento da área demarcada em vermelho em (A); (D): região do defeito em visualização panorâmica; (E): maior aumento da área demarcada em preto em (D); (F): maior aumento da área demarcada em vermelho em (D); (H): maior aumento da área demarcada em (F). Ra: raiz do dente. Hematoxilina-Eosina.

A tabela 3 e o gráfico 1 apresentam os resultados para a contagem de área de neoformação óssea nos grupos ST e Tto em função do tempo de observação. Embora em 7 dias as amostras ST apresentem aparentemente uma formação óssea mais acentuada quando comparado com Tto, não há diferença estatística significativa

( $p=0,13$ ), o mesmo ocorrendo para 14 dias ( $p=0,91$ ). Em 28 dias este processo de formação óssea alcançou um pico e apresentou-se intenso tanto ST quanto no Tto, sem haver também diferença estatística significativa ( $p=0,48$ ). Para o grupo Tto não houve diferença estatística significativa entre os tempos de 7 para 14 dias ( $p=0,16$ ) e de 14 para 28 dias ( $p=0,09$ ); entretanto, houve diferença de 7 para 28 dias ( $p=0,01$ ). Já no grupo ST não houve diferença estatística entre os tempos experimentais (7 para 14 dias,  $p=0,97$ ; 14 para 28 dias,  $p=0,04$ ; 7 para 28 dias,  $p=0,11$ ).

**Tabela 3: Dados da contagem de área óssea neoformada.**

	Tratado DPSCs		Sem Tratamento	
	Evento	Percentual	Evento	Percentual
T7.1	246	15,97	545	35,39
T7.2	26	1,69	684	44,42
T7.3	14	0,91	172	11,17
Média	95,33	6,19	467	30,33
T14.1	769	49,94	4	0,26
T14.2	76	4,94	334	21,69
T14.3	745	48,38	1121	72,79
Média	530	34,42	486,33	31,58
T28.1	1084	70,39	651	42,27
T28.2	826	53,64	1137	73,83
T28.3	1044	67,79	448	29,09
Média	984,67	63,94	745,33	48,40



**Gráfico 1: Área de neoformação óssea para os grupos tratados e sem tratamento em função do tempo de observação. (\*) diferença estatística significativa,  $p=0,01$ ; para os demais não houve diferença. Valores do gráfico expressos em porcentagem.**

## 6. DISCUSSÃO

Anormalidades na quantidade e na qualidade do tecido ósseo estão ligadas à perda óssea, à resistência diminuída do esqueleto e ao risco aumentado de fraturas (Yamada *et al.*, 2014). O campo de engenharia de tecidos e medicina regenerativa tem explorado a utilização de células-tronco com perspectivas no tratamento de perdas ósseas (Yamada *et al.*, 2014). As aplicações terapêuticas de células-tronco mesenquimais (MSCs) têm recebido atenção não apenas pelo seu potencial de diferenciação e auto-renovação, mas também devido ao seu efeito imunossupressivo e imunomodulatório nos linfócitos e outras células pró-inflamatórias (Di Nicola *et al.*, 2002; Ren *et al.*, 2009). Estas características têm feito das MSCs candidatas à terapia celular em diversas doenças refratárias, incluindo ossos e articulações (Liu *et al.*, 2014). O presente estudo se propôs a avaliar a capacidade das DPSCs em regenerar defeitos ósseos induzidos em mandíbula de ratos, colocando-se como uma alternativa terapêutica à recuperação de tecido ósseo.

Para a realização deste trabalho, utilizou-se um modelo de estudo em que defeitos ósseos foram produzidos cirurgicamente em mandíbulas de ratos, seguindo o protocolo cirúrgico citado nos trabalhos de Oliveira e colaboradores (2011) e Ebina e colaboradores (2009) (Ebina *et al.*, 2009; Maciel-Oliveira, Bradaschia-Correa e Arana-Chavez, 2011). A cirurgia, o tempo de análise (7, 14 e 28 dias) e o processamento do material foram semelhantes aos dos estudos citados. A neoformação óssea observada em nosso estudo no grupo ST (controle) foi semelhante ao dos trabalhos destes autores, sendo o tempo de 28 dias suficiente para avaliar o fechamento do defeito ósseo confeccionado.

Estudos mostram que as DPSCs são facilmente coletadas, possuem alta capacidade de diferenciação celular e interação com biomateriais (Graziano *et al.*, 2008; Yamada *et al.*, 2010b), grande plasticidade *in vivo* e *in vitro* (Caplan, 1991; Gronthos *et al.*, 2000b; Kerkis *et al.*, 2006; Costa, A. M., 2009), capacidade de regeneração de dentina (Iohara *et al.*, 2004), de regeneração pulpar (Cordeiro *et al.*, 2007), de diferenciação em osteoblastos e produção de tecido mineralizado (Harada *et al.*, 1999; Gronthos *et al.*, 2000b; Harada e Ohshima, 2004; Graziano *et al.*, 2008; Chadipiralla *et al.*, 2010), além de apresentarem atividade imunossupressora com grande potencial em aplicações clínicas (Pierdomenico *et al.*, 2005b). Com isso, diversos

estudos têm utilizado estas células com finalidade no tratamento de perdas ósseas (Shilpa *et al.*, 2013).

Em nosso estudo realizamos testes para caracterizar o fenótipo mesenquimal das células. A imunofluorescência revelou que as células expressaram em conjunto os marcadores de células mesenquimais CD73, CD90 e CD105, encontrados também nos estudos realizado por Chamberlain e colaboradores (2007) e Polli (2011), bem como os fatores de transcrição de pluripotência Nanog e Sox-2, igualmente observados nos trabalhos de Duarte (2013), Navabazam e colaboradores (2013) e Shoi (2014) (Chamberlain *et al.*, 2007; Polli, 2011; Duarte, 2013; Navabazam *et al.*, 2013; Shoi *et al.*, 2014).

Ademais, o potencial de diferenciação celular para os fenótipos adipogênico, osteogênico e condrogênico foram confirmados após o uso de meios indutivos de diferenciação e coloração celular com Oil Red, Alizarin Red e Alcian Blue, respectivamente. Duarte (2013) e Shoi (2014) verificaram os mesmos fenótipos em seus trabalhos (Duarte, 2013; Shoi *et al.*, 2014), enquanto Zhang (2008) demonstrou o potencial das DPSCs de diferenciação *in vivo* para osso e tecido adiposo (Zhang *et al.*, 2008).

A análise morfológica da cultura de DPSCs revelou células fibroblástóides aderidas ao substrato plástico da garrafa de cultura. Segundo Gronthos *et al.* (2000) as DPSCs tipicamente possuem esta morfologia, contudo, diferentes morfologias podem ser observadas nas colônias de DPSCs indicando a presença de diversos progenitores de populações de células-tronco dentro da polpa dental madura (Gronthos *et al.*, 2000a).

Para verificar a viabilidade das DPSCs utilizadas, uma parte excedente das células manipuladas para o protocolo cirúrgico foi destinada para a análise do MTT. Esta análise confirmou que as células estavam viáveis no momento da sua aplicação *in vivo*, mesmo após o estresse do transporte e da manipulação cirúrgica. Esta análise é de suma importância visto que o leito receptor possui também células-tronco próprias que participarão também do processo de neoformação óssea. Desta forma, confirma-se que as células-tronco aplicadas estavam viáveis no momento do uso clínico. Entretanto, vale ressaltar que é necessário aprofundar este estudo a fim de rastrear as células-tronco aplicadas, buscando identificar se contribuíram diretamente para a neoformação óssea, diferenciando-se em osteoblastos, ou de forma indireta, modulando o meio e as células locais onde foram aplicadas.



Na análise histológica realizada observou-se pequenas áreas de inflamação tanto no grupo controle como no experimental, onde as DPSCs, de origem humana, foram aplicadas, indicando que não houve resposta imunológica intensa. O estudo de Pierdomenico (2005) revelou que as células-tronco mesenquimais tem potencial imunossupressivo, também confirmado nos trabalhos de Di Nicola (2002) e Ren (2009), que ainda apontaram a capacidade imunomodulatória destas células sobre os linfócitos e outras células pró-inflamatórias (Di Nicola *et al.*, 2002; Pierdomenico *et al.*, 2005a; Ren *et al.*, 2009). Estas são características importantes que favorecem a aplicação clínica das DPSCs, pois a ausência de processo inflamatório intenso permite a formação de tecido ósseo.

Neste estudo foi realizada análise em MEV, histológica descritiva e medição de área de neoformação óssea nos tempos experimentais em ambos os grupos. Os dados das duas análises, histológica descritiva e MEV, foram importantes, pois nos permitiram delinear melhor os resultados obtidos, uma vez que nos fornecem informações complementares. Em MEV pode-se verificar margens do defeito ósseo em visualização frontal (vestibular), que permite descrever o processo de neoformação óssea e sua localização. Já a análise histológica permitiu visualização do defeito em profundidade, além de colaborar para a análise da qualidade do tecido presente no processo de regeneração e permitirá fazer análises imuno-histoquímicas e dos tipos celulares presentes no processo de formação óssea.

A MEV revelou defeitos mandibulares do grupo tratado (Tto) e não tratado (ST) com margens regulares e formação de pequena quantidade de osso esponjoso no interior/fundo da cavidade. No grupo ST observou-se em duas amostras pequena reabsorção de osso cortical externo ao defeito. Em análise histológica o grupo Tto exibe pequena formação óssea e áreas de inflamação. Em uma das amostras observou-se o defeito totalmente preenchido por tecido conjuntivo degenerado, sem formação óssea, indicativo de inflamação. Em contraste, o grupo ST exibiu formação óssea mais avançada, com trabéculas evidentes e pequenas áreas de inflamação.

O trabalho realizado por Oliveira (2011) utilizou um grupo tratado com Sinvastatina e um grupo não tratado (controle) em defeitos ósseos similares a este estudo. A análise de MEV realizada após 7 dias revelou que o grupo controle manteve o defeito ósseo vazio sem evidências de formação óssea e a Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) mostrou presença de osteoclastos nas margens do

defeito do grupo controle. Este resultado encontra-se em acordo com o encontrado em nosso estudo, demonstrando a presença de reabsorção óssea nas margens do defeito no grupo controle (Maciel-Oliveira, Bradaschia-Correa e Arana-Chavez, 2011).

Em nosso estudo, a análise de MEV realizada aos 14 dias de pós-operatório revelou margens dos defeitos um pouco irregulares, mantendo o padrão de neoformação óssea. O grupo Tto exibiu formação óssea consistente com poucos espaços medulares, e apenas uma das amostras teve pequena reabsorção de osso cortical externo ao defeito. No grupo ST observou-se formação de osso esponjoso com espaços medulares bem definidos, todas as amostras tiveram pequena reabsorção de osso cortical extrínseco ao defeito. Na análise histológica de igual período averiguou-se no grupo Tto pequena formação óssea, predominando áreas de inflamação, e apenas uma das amostras mostrou formação óssea avançada. Já no grupo ST observaram-se em duas amostras formação óssea mais avançada e poucas áreas de inflamação, com apenas uma amostra apresentando menor formação óssea e predomínio de células inflamatórias. Ao que parece, em 14 dias os dois grupos tiveram formação óssea semelhante, o que foi confirmado pela medição da área óssea neoformada. Novamente, no estudo de Oliveira (2011), a análise realizada aos 14 dias após a cirurgia revelou no grupo controle grandes áreas de reabsorção na superfície externa do processo alveolar e dentro dos defeitos (Maciel-Oliveira, Bradaschia-Correa e Arana-Chavez, 2011).

Segundo Junqueira e Carneiro (2004), o crescimento e remodelação dos ossos consiste na formação do tecido ósseo novo associado à reabsorção parcial de tecido ósseo já formado, permitindo a manutenção da conformação óssea durante seu crescimento. Isto explica as reabsorções observadas em osso cortical próximo ao defeito, já que após a cirurgia o metabolismo ósseo se intensifica a fim de reparar a lesão. Além do mais, a cirurgia realizada pode contribuir para a reabsorção óssea, pois é realizada a divulsão e afastamento dos tecidos moles, inclusive do periósteo, para expor o osso e criar o defeito. Uma das principais funções do periósteo é a nutrição do tecido ósseo (Junqueira e Carneiro, 2004), que durante a cirurgia permanece desnudo por alguns minutos podendo sofrer danos, o que implica no processo de reparo (Junqueira e Carneiro, 2004).

A análise de MEV realizada 28 dias após a cirurgia e implantação das células revelou traços das margens do defeito com áreas recobertas por osso compacto neoformado. Verifica-se a

continuidade do padrão de deposição óssea trabecular, que ao alcançar a superfície do defeito conecta-se com o osso adjacente e é recoberto por tecido ósseo compacto. A análise histológica revelou amostras do grupo Tto e ST com avançada formação óssea no interior do defeito e adjacente à cortical rompida pela cirurgia, sem presença de inflamação. Ao que parece, em 28 dias a formação óssea em ambos os grupos é similar, sendo confirmado pela medição da área óssea neoformada.

Apesar de não haver diferença estatística significativa entre os dois grupos analisados (Tto e ST) no grupo Tto encontramos diferença estatística significativa entre os tempos de 7 e 28 dias. Este resultado é interessante, uma vez que o grupo ST iniciou a análise com formação óssea mais evidente, porém sem haver diferença significativa em 14 e 28 dias. Isso demonstra que a utilização das DPSCs causou uma rápida recuperação da neoformação óssea entre 7 e 28 dias.

Vários estudos utilizaram células-tronco da polpa de dentes para o tratamento de diversos defeitos ósseos e obtiveram sucesso. Em contraste, ao que parece, em nosso estudo a utilização das DPSCs não demonstrou ter vantagem relevante em comparação ao grupo não tratado. Entretanto é precoce chegar a esta conclusão uma vez que os trabalhos se diferenciam no que diz respeito ao tipo de defeito ósseo tratado. Além disso, em nosso estudo utilizamos as DPSCs isoladas (sem haver associação com outros componentes ativos) em contraste aos demais que utilizaram as células-tronco associadas com outros componentes: CT derivadas do osso ilíaco associado à HA para tratamento de fenda maxilar artificial em cães (Yoshioka *et al.*, 2012), CT do tecido adiposo associado à HA para tratamento de fenda maxilar em cães (Pourebahim *et al.*, 2013), CT da polpa de dentes decíduos associados ao arcabouço  $\beta$ -TCP para reparo de defeitos maxilares em mini-porcos (Zheng *et al.*, 2009), CT da polpa dentária humana associada à membrana colágena para reconstrução de defeitos cranianos em ratos (Costa, 2009), CT da polpa de dentes decíduos humanos associados ao arcabouço de tecido dental para engenharia de tecido de polpa dental (Cordeiro *et al.*, 2008), CT da polpa dentária humana, da medula óssea e do periosteio associados individualmente ao Plasma Rico em Plaquetas para osseointegração em implantes dentários (Ito *et al.*, 2011).

Desta forma, torna-se imperativo continuar a esmiuçar estes resultados e para isso outras análises serão realizadas. Pretende-se explorar mais a análise histológica e celular, aumentar o número de lâminas para a contagem da área óssea neoformada, contabilizar e

comparar o processo inflamatório no grupo tratado e controle, averiguar a qualidade da formação óssea em ambos os grupos e realizar testes de imuno-histoquímica para rastrear as DPSCs aplicadas no defeito e verificar sua participação na neoformação óssea.

## 7. CONCLUSÃO

Dentro das condições do presente estudo pode-se concluir:

1. O protocolo utilizado para a realização da cultura, armazenamento e utilização das DPSCs é adequado, sendo comprovado o fenótipo mesenquimal das células e a sua viabilidade após aplicação cirúrgica;

2. O protocolo de indução de defeito ósseo em mandíbula de rato pôde ser reproduzido, auxiliando na sua padronização para modelos de estudos futuros de regeneração óssea;

3. A utilização das DPSCs provou uma evidente recuperação óssea entre 7 e 28 dias, entretanto, quando comparado ao grupo controle, não houve diferença.

## REFERÊNCIAS

CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells. **J Orthop Res**, v. 9, n. 5, p. 641-50, Sep 1991. ISSN 0736-0266. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1870029> >.

CHADIPIRALLA, K. et al. Osteogenic differentiation of stem cells derived from human periodontal ligaments and pulp of human exfoliated deciduous teeth. **Cell Tissue Res**, v. 340, n. 2, p. 323-33, May 2010. ISSN 1432-0878. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20309582> >.

CHAMBERLAIN, G. et al. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. **Stem Cells**, v. 25, n. 11, p. 2739-49, Nov 2007. ISSN 1549-4918. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17656645> >.

CORDEIRO, M. M. et al. Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. **J Endod**, v. 34, n. 8, p. 962-9, Aug 2008. ISSN 1878-3554. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18634928> >.

CORDEIRO, M. M. R. et al. Human dental pulp-like tissue engineering using stem cells and endothelial cells. **Brazilian Oral Research**, v. 21, n. 1, p. 23, Sept 2007.

COSTA, A. D. M. **Reconstrução de defeitos ósseos cranianos em ratos com células-tronco da polpa dentária humana: estudo experimental de neoformação óssea**. 2009. 96 (Doutor). Universidade de São Paulo, São Paulo.

COURA, G. D. S. **Investigação do ligamento periodontal como nicho de células tronco ectomesenquimais**. 2007. 98 (Doutor). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina.

DI NICOLA, M. et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. **Blood**, v. 99, n. 10, p. 3838-43, May 2002. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11986244> >.

DUARTE, B. D. P. **Avaliação *in vivo* e *in vitro* da multipotencialidade das células da polpa dentária e do seu potencial ectomesenquimal**. 2013. 66 (Mestre). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina.

EBINA, H. et al. Micro-CT analysis of alveolar bone healing using a rat experimental model of critical-size defects. **Oral Dis**, v. 15, n. 4, p. 273-80, May 2009. ISSN 1601-0825. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19320960> >.

GRAZIANO, A. et al. Dental pulp stem cells: a promising tool for bone regeneration. **Stem Cell Rev**, v. 4, n. 1, p. 21-6, 2008. ISSN 1550-8943. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18300003> >.

GRONTHOS, S. et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 25, p. 13625-30, Dec 2000a. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11087820> >.

GUSKUMA, M. H. et al. Evaluation of the presence of VEGF, BMP2 and CBFA1 proteins in autogenous bone graft: Histometric and immunohistochemical analysis. **J Craniomaxillofac Surg**, Aug 2013. ISSN 1878-4119. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23932545> >.

HARADA, H. et al. Localization of Putative Stem Cells in Dental Epithelium and Their Association with Notch and FGF Signaling. **J Cell Biol**, v. 147, n. 1, p. 105-120, Oct 1999. Disponível em: < <http://www.jcb.org/cgi/content/abstract/147/1/105> >.

HARADA, H.; OHSHIMA, H. New perspectives on tooth development and the dental stem cell niche. **Arch Histol Cytol**, v. 67, n. 1, p. 1-11, Mar 2004. ISSN 0914-9465. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15125018> >.

IOHARA, K. et al. Dentin regeneration by dental pulp stem cell therapy with recombinant human bone morphogenetic protein 2. **J Dent Res**, v. 83, n. 8, p. 590-595, 2004.

ITO, K. et al. Osteogenic potential of effective bone engineering using dental pulp stem cells, bone marrow stem cells, and periosteal cells for osseointegration of dental implants. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 26, n. 5, p. 947-54, 2011 Sep-Oct 2011. ISSN 1942-4434. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22010075> >.

JUNQUEIRA, C. L.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica** 2004.

KERKIS, I. et al. Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. **Cells Tissues Organs**, v. 184, n. 3-4, p. 105-16, 2006. ISSN 1422-6421. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17409736> >.

LIU, Y. et al. Therapeutic application of mesenchymal stem cells in bone and joint diseases. **Clin Exp Med**, v. 14, n. 1, p. 13-24, Feb 2014. ISSN 1591-9528. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23124706> >.

MACIEL-OLIVEIRA, N.; BRADASCHIA-CORREA, V.; ARANA-CHAVEZ, V. E. Early alveolar bone regeneration in rats after topical administration of simvastatin. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 112, n. 2, p. 170-9, Aug 2011. ISSN 1528-395X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21194993> >.

MAIORANA, C. et al. Histomorphometric evaluation of anorganic bovine bone coverage to reduce autogenous grafts resorption: preliminary results. **Open Dent J**, v. 5, p. 71-8, 2011. ISSN 1874-2106. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21566694> >.

MARX, R. E. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 62, n. 4, p. 489-96, Apr 2004. ISSN 0278-2391. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15085519> >.

MARX, R. E. et al. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 85, n. 6, p. 638-46, Jun 1998. ISSN 1079-2104. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9638695> >.



MOOREN, R. E. et al. The effect of platelet-rich plasma on early and late bone healing: an experimental study in goats. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 36, n. 7, p. 626-31, Jul 2007. ISSN 0901-5027. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17521885> >.

NAMPO, T. et al. A new method for alveolar bone repair using extracted teeth for the graft material. **J Periodontol**, v. 81, n. 9, p. 1264-72, Sep 2010. ISSN 1943-3670. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20476887> >.

NAVABAZAM, A. R. et al. Characterization of mesenchymal stem cells from human dental pulp, preapical follicle and periodontal ligament. **Iran J Reprod Med**, v. 11, n. 3, p. 235-42, Mar 2013. ISSN 1680-6433. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24639751> >.

PIERDOMENICO, L. et al. Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. **Transplantation**, v. 80, n. 6, p. 836-42, Sep 2005a. ISSN 0041-1337. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16210973> >.

POLLI, V. A. B. **Avaliação da polpa dentária como nicho de células-tronco/progenitoras derivadas da crista neural**. 2011. 59 (Mestre). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina.

POUREBRAHIM, N. et al. A comparison of tissue-engineered bone from adipose-derived stem cell with autogenous bone repair in maxillary alveolar cleft model in dogs. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 42, n. 5, p. 562-8, May 2013. ISSN 1399-0020. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23219713> >.

REN, G. et al. Species variation in the mechanisms of mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression. **Stem Cells**, v. 27, n. 8, p. 1954-62, Aug 2009. ISSN 1549-4918. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19544427> >.

ROKN, A. et al. Histologic Evaluation of Bone Healing Following Application of Anorganic Bovine Bone and  $\beta$ -tricalcium Phosphate in Rabbit Calvaria. **J Dent (Tehran)**, v. 9, n. 1, p. 35-40, 2012. ISSN 2008-2185. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22924100> >.

ROKN, A. R. et al. Bone formation with two types of grafting materials: a histologic and histomorphometric study. **Open Dent J**, v. 5, p. 96-104, 2011. ISSN 1874-2106. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21760862> >.

SHILPA, P. S. et al. Stem cells: Boon to dentistry and medicine. **Dent Res J (Isfahan)**, v. 10, n. 2, p. 149-54, Mar 2013. ISSN 1735-3327. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23946728> >.

SHOI, K. et al. Characterization of pulp and follicle stem cells from impacted supernumerary maxillary incisors. **Pediatr Dent**, v. 36, n. 3, p. 79-84, 2014 May-Jun 2014. ISSN 1942-5473. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24960375> >.

YAMADA, Y. et al. A feasibility of useful cell-based therapy by bone regeneration with deciduous tooth stem cells, dental pulp stem cells, or bone-marrow-derived mesenchymal stem cells for clinical study using tissue engineering technology. **Tissue Eng Part A**, v. 16, n. 6, p. 1891-900, Jun 2010a. ISSN 1937-335X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20067397> >.

YOSHIOKA, M. et al. Bone regeneration in artificial jaw cleft by use of carbonated hydroxyapatite particles and mesenchymal stem cells derived from iliac bone. **Int J Dent**, v. 2012, p. 352510, 2012. ISSN 1687-8736. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22536240> >.

ZHANG, W. et al. In vivo evaluation of human dental pulp stem cells differentiated towards multiple lineages. **J Tissue Eng Regen Med**, v. 2, n. 2-3, p. 117-25, 2008 Mar-Apr 2008. ISSN 1932-6254. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18338838> >.

ZHENG, Y. et al. Stem cells from deciduous tooth repair mandibular defect in swine. **J Dent Res**, v. 88, n. 3, p. 249-54, Mar 2009. ISSN 1544-0591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19329459> >.



**APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS MORFOLÓGICAS**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**Título do Projeto:** “Utilização de células-tronco de polpa de dentes permanentes humanos (DPSCs) na regeneração de defeitos ósseos mandibulares”

**Pesquisador Responsável:** Profa. Dra. Michelle Tillmann Biz,  
RG:2.802.902

**Pesquisadores participantes:** Prof. Dr. Filipe Modolo Siqueira e Profa. Dra. Andrea Golçalves Trentin

**Telefones para contato:** (48) 37214905/ (48) 99882292

Prezado Senhor (a),

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário (a), do trabalho de pesquisa “Utilização de células-tronco de polpa de dentes permanentes humanos (DPSCs) na regeneração de defeitos ósseos mandibulares”, de responsabilidade da pesquisadora Profa. Dra. Michelle Tillmann Biz. A seguir lhe serão apresentados informações e esclarecimentos a respeito da proposta do trabalho. Qualquer dúvida o (a) Sr (a) poderá esclarecer entrando em contato com o Laboratório de

Engenharia de Tecidos Dentários, da Universidade Federal de Santa Catarina, pelo telefone (48) 37214905.

### INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

Este estudo tem por objetivo analisar o potencial terapêutico de células-tronco derivadas da polpa dental. Atualmente as células-tronco vêm sendo amplamente estudadas em vários países, e sua aplicação terapêutica representa um novo caminho para o tratamento de inúmeras desordens odontológicas, como implantes e reconstrução da estrutura óssea.

Para a realização desta pesquisa serão utilizados a polpa dental retirados da cavidade interna do dente do siso que foi indicado pelo seu dentista para extração. Estes dentes normalmente são descartados em lixos hospitalares após o procedimento cirúrgico. A extração será realizada por um cirurgião dentista. Durante a extração, poderá haver a necessidade de cortar o dente para a sua retirada, neste caso, os pesquisadores descartarão este da pesquisa. No pós-operatório poderá ocorrer dor na região da extração, bem como limitação da abertura de boca. O cirurgião dentista irá acompanhar todo o pós-operatório e havendo necessidade irá medicar o paciente.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS MORFOLÓGICAS**

A polpa dental só será coletada após a cirurgia de retirada do dente do siso ser finalizada. A partir destes fragmentos, realizaremos culturas de células-tronco da polpa dental para compreendermos o potencial destas células para uso em terapias de regeneração. Estudos como estes são necessários, pois nos proporcionarão conhecimentos que futuramente poderão ser empregados no desenvolvimento de terapias utilizando células-tronco da polpa dental, como por exemplo, na reconstituição do tecido ósseo. Reforçamos que os fragmentos de dente que venham a ser doados serão utilizados somente em procedimentos laboratoriais.

Se você estiver de acordo em participar desta pesquisa, permitindo a utilização do fragmento de dente retirado durante a cirurgia e que seria descartado, asseguramos o sigilo sobre sua participação, garantindo sua privacidade. Também garantimos que não haverá qualquer custo ou riscos para o (a) Sr (a) por participar desta pesquisa. Caso não queira mais fazer parte da mesma, pode entrar em contato através dos telefones citados acima.

Como forma de manifestar seu consentimento solicitamos que o (a) Sr (a) assine esse documento (verso).

Assinatura do pesquisador: \_\_\_\_\_

## CONSENTIMENTO DE PARTICIPAÇÃO

Eu, \_\_\_\_\_,

RG \_\_\_\_\_, fui esclarecido (a) sobre a pesquisa “Utilização de células-tronco de polpa de dentes permanentes humanos (DPSCs) na regeneração de defeitos ósseos mandibulares” e concordo em participar do estudo, como voluntário.

**Assinatura do paciente ou responsável:**

\_\_\_\_\_

Florianópolis, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

## ANEXO 1 - Aprovação da pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SANTA CATARINA - UFSC



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Utilização de células tronco de polpa de dentes permanentes humanos (DPSCs) na regeneração de defeitos ósseos mandibulares

**Pesquisador:** Michelle Tillmann Biz

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 169329/13.8.0000.0121

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Santa Catarina

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 424.009

**Data da Relatoria:** 14/10/2013

#### Apresentação do Projeto:

Trata-se de um pesquisa do tipo básica, experimental, quantitativa, analítica, visa avaliar o uso de células tronco da polpa de dentes permanentes humanos (DPSCs) na regeneração de defeitos ósseos mandibulares" proveniente do Departamento de ciências morfológicas. A pesquisa prevê o uso de ratos no processo de implantação das células troncos proveniente de sere humanos.

#### Objetivo da Pesquisa:

Avaliar o potencial da utilização de células tronco da polpa de dentes permanentes humanos (DPSCs) como terapia no processo de regeneração de defeitos ósseos mandibulares. Como Objetivo Secundário: Coletar e aperfeiçoar a cultura de células da polpa de dentes permanentes humanos; Padronizar o protocolo de indução de defeito ósseo na mandíbula para estudos de regeneração; Descrever, tempo-espacialmente, o processo de regeneração óssea alcançada pelas DPSCs; Quantificar a neoformação óssea no processo de regeneração com o uso das DPSCs; Comparar o grau de neoformação óssea alcançada com e sem o uso das DPSCs.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os pesquisadores apontam que: "Não haverá benefício direto para o paciente que doar o dente após a extração. Espera-se que o benefício futuro do protocolo de pesquisa seja o incremento no processo de regeneração óssea". Como riscos: "Não haverá riscos para os participantes uma vez

Endereço: Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima  
 Bairro: TRINDADE CEP: 88.045-900  
 UF: SC Município: FLORIANÓPOLIS  
 Telefone: (48)3721-4200 Fax: (48)3721-9696 E-mail: cep@reitoria.ufsc.br



## ANEXO 2 - Aprovação da pesquisa pela Comissão de Ética no Uso de Animais

### Resultado de submissão de Protocolo

#### Protocolo

PROPSQ

Título

MÉTODOLÓGICAS UTILIZADAS NUM GRUPO DE PESQUISA HISTOPATOLOGIA DA REGENERAÇÃO TENDINAL

Data de Entrega

16/04/2013

#### Resultado:

Aprovado

Data / Prazo

01/11/2013

#### Considerações

Ofício nº 114/CEUA/PROPSQ/2013

De: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais- CEUA

Ac(ã): Prof(a) Dr(a) Michelle Tillmann Biz, Departamento de Ciências Morfológicas – CCB

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO a inclusão de procedimento conforme solicitação anexa.

Adita-se o Ofício nº 041/CEUA/PROPSQ/2013

De: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

Ac(ã): Prof(a) Dr(a) Michelle Tillmann Biz, Departamento de Ciências Morfológicas - CCB

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO, por quatro anos, para a utilização de quinhentos ratos (*Rattus Norvegicus*).

- Procedência do animal: Biotério Central - UFSC

Por ocasião do término desse protocolo, DEVERÁ SER APRESENTADO RELATÓRIO detalhado relacionando o uso de animais no Projeto desenvolvido aos resultados obtidos, conforme formulário ON LINE CEUA.

Atenciosamente,

Relatório Final previsto para 30 dias após término de vigência do protocolo ou no momento de apresentação de um novo protocolo)  
Data 11/06/2017

Data:01/11/2013

Assinar(es):



Prof. Assoc. Carlos Rogério Tenassi, D.Sc.  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PRPE – UFSC  
PRESIDENTE