

Rúbia Teodoro Stuepp

**ANÁLISE DO PROCESSO DE REGENERAÇÃO DE
DEFEITOS ÓSSEOS MANDIBULARES DE RATOS COM O
USO DE CÉLULAS DA POLPA DE DENTES PERMANENTES
HUMANOS (hDPCs)**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Título de Mestre em Odontologia - Área de Concentração Diagnóstico Bucal.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Michelle Tillmann Biz

Co-orientador: Prof. Dr. Filipe Modolo Siqueira

Florianópolis
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Stuepp, Rúbia Teodoro
ANÁLISE DO PROCESSO DE REGENERAÇÃO DE DEFEITOS
ÓSSEOS MANDIBULARES DE RATOS COM O USO DE CÉLULAS DA
POLPA DE DENTES PERMANENTES HUMANOS (hDPCs) /
Rúbia Teodoro Stuepp ; orientador, Michelle
Tillmann Biz; coorientador, Filipe Modolo Siqueira
- SC, 2017.
77 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde,
Programa de Pós-Graduação em Odontologia,
Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Odontologia. 2. Regeneração óssea. 3.
Regeneração. 4. Células-tronco. 5. Diferenciação
celular. I. Biz, Michelle Tillmann. II. Siqueira,
Filipe Modolo. III. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Odontologia.
IV. Título.

Rúbia Teodoro Stuepp

**ANÁLISE DO PROCESSO DE REGENERAÇÃO DE
DEFEITOS ÓSSEOS MANDIBULARES DE RATOS COM O
USO DE CÉLULAS DA POLPA DE DENTES PERMANENTES
HUMANOS (hDPCs)**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre” e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Odontologia.

Florianópolis, 15 de fevereiro de 2017.

Prof.^a Izabel Cristina Santos Almeida, Dr.^a
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Prof.^a Michelle Tillmann Biz, Dr.^a
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Elena Riet Correa Rivero, Dr.^a
Membro Titular
Universidade Federal de Santa Catarina

Rúbia Teodoro Stuepp

Prof.^a Ariadne Cristiane Cabral da Cruz, Dr.^a
Membro Titular
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Bruno das Neves Cavalcanti, Dr.
Membro Titular
College of Dentistry, University of Iowa

Dedico este trabalho aos meus avós **Julita e Jerobal (In memoriam)**, meu espelho de amor e carinho, como forma de agradecimento.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao **Universo** pelas oportunidades que tive, as pessoas maravilhosas que surgiram no meu caminho e a vida que tenho.

À **Michelle Tillmann Biz**, minha orientadora e mentora, que me acompanha desde o primeiro ano da graduação. Obrigada pela confiança, pelos ensinamentos, conversas, conselhos, ajuda e paciência.

Ao meu co-orientador, **Filipe Modolo Siqueira**, sempre disposto a me ajudar e ensinar.

À minha colega **Priscilla Barros Delben**, por sua ajuda imprescindível à realização desta pesquisa e pela sua atenção.

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

Ao técnico do laboratório de histologia, **Gilberto Domingos Marloch**, pela ajuda nos cortes histológicos e coloração das lâminas, e à técnica do Laboratório de Patologia Bucal, **Sônia Márcia Kaminski**, pela ajuda e companhia.

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

Aos professores do programa de pós-graduação, em especial a coordenadora **Izabel C. S. Almeida**, que está sempre batalhando pelos alunos e pelo programa, e os professores do **Departamento de Patologia**, em especial os professores **Rogério, Elena, Liliane e Maria Inês**, sempre dispostos e alegres em ensinar.

À equipe do **CEO** (Centro de Especialidades Odontológicas), pela convivência, pela ajuda, troca de conhecimentos, em especial a professora **Dayane Ribeiro**, por ter me dado a oportunidade de trabalhar e dividir comigo sua experiência, e os colegas **Fátima, Kamilla, Dilma, Maynara, Fernanda, Mariane, Tamires e Arthur**.

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, **Julita** e **Jerobal (in memoriam)**, pelo exemplo de vida, de amor e carinho. Estarão sempre em minha memória!

Aos meus **amigos**, em especial **Paulo Ricardo, Rafael e**

Natália, presentes que a vida me deu.

Aos meus **colegas** de pós-graduação, em especial **Fernanda, Geórgia, Mariana, Eduardo, Angélica, Jussara, Manu, Carol e Diogo**, pela convivência, pela ajuda, troca de conhecimentos e pelo companheirismo, que fizeram meus momentos na pós-graduação mais gostosos de viver.

À **Universidade Federal de Santa Catarina**, que novamente me recebeu, pela oportunidade de ampliar meus conhecimentos através do Programa de Pós-graduação em Odontologia.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho, meus sinceros agradecimentos.

Somos assim: sonhamos o voo, mas tememos a altura. Para voar, é preciso ter coragem para enfrentar o terror do vazio. Porque é só no vazio que o voo acontece. O vazio é o espaço da liberdade, a ausência de certezas.
(Fiódor Dostoiévski)

RESUMO

Células da polpa dental humana (hDPCs) têm sido identificadas como uma população de células-tronco com multipotencial de diferenciação. Este trabalho teve como objetivo analisar o potencial das hDPCs em regenerar defeitos ósseos mandibulares de ratos e avaliar a marcação de progenitores de células da crista neural, HNK1 e Sox10, neste processo. Para examinar a eficácia destas células na regeneração óssea, foram isoladas células da polpa de dentes permanentes e enxertadas em defeitos ósseos mandibulares de ratos. Anteriormente às cirurgias, as hDPCs foram analisadas. As mesmas apresentaram: aderência ao plástico; expressão de CD105, CD90 e CD73 em mais de 95% da população e expressão de CD45 em menos de 2% da população; capacidade de diferenciação em osteoblastos, adipócitos e condrócitos, sendo caracterizadas como células-tronco da polpa dental humana (hDPSCs). Para o protocolo cirúrgico, utilizou-se 9 ratos Wistar, machos, de aproximadamente 250 gramas que foram submetidos à confecção de um defeito ósseo no lado direito e esquerdo da mandíbula, medindo 1mm de altura/ profundidade e 3mm de comprimento, sob a coroa do primeiro molar inferior. No lado direito, grupo tratado, aplicou-se hDPCs, enquanto que no lado esquerdo, grupo controle, nenhum material foi aplicado. As hDPCs remanescentes do protocolo cirúrgico tiveram sua viabilidade analisada através do teste de MTS e ensaio de diferenciação osteogênica. Verificou-se que as células remanescentes estavam viáveis, sem haver diferença estatística significativa quando comparada ao grupo controle, e as mesmas mantiveram a capacidade de diferenciação osteogênica. Três animais de cada grupo foram eutanasiados no tempo de 7, 14 e 28 dias de pós-operatório. As amostras foram avaliadas por microscopia de luz (coloração de hematoxilina e eosina), a área de regeneração foi mensurada pelo programa Image J e a expressão dos marcadores, HNK1 e Sox10, foi avaliada através de imuno-histoquímica. Considerou-se valor de $p < 0,05$ para dados com significância estatística. Os resultados indicaram que em 7 dias de pós-operatório o grupo controle apresentou pronunciada formação óssea quando comparado ao grupo tratado ($p = 0,03$). Aos 14 dias, o grupo tratado mostrou aumento na formação óssea, mas não houve diferença estatística significativa entre os grupos ($p = 0,62$). No período final de avaliação não houve diferença entre o grupo controle e o tratado ($p = 0,89$). Foi observada marcação moderada para HNK1 e Sox10 em osteoblastos e osteócitos em 7 dias, e intensa em 14 e 28 dias, sem diferença entre controle e tratado. Dentro dos padrões do presente estudo, pode-se concluir que, embora houve um rápido aumento na formação óssea entre 7 e 14 dias de pós-operatório com o uso das hDPCs, não há evidências de que o uso destas células beneficiou a formação óssea quando comparado ao grupo controle nos períodos analisados. HNK1 e o Sox10 estão presentes em osteoblastos e osteócitos em

processo de regeneração.

Palavras-chave: Regeneração óssea, regeneração, células-tronco, diferenciação celular.

ABSTRACT

Human dental pulp cells (hDPCs) have been identified as a stem cell population with multipotential differentiation capabilities. The aim of this study was to analyze the potential of hDPCs in regenerating mandibular bone defects of rats and to evaluate the immunoexpression of progenitors of neural crest cells, HNK1 and Sox10, in this process. To examine the efficacy of these stem cells in bone regeneration, we isolated human dental pulp cells from permanent teeth and engrafted in mandibular bone defects of rats. Prior to surgery procedures, the hDPCs were analyzed: plastic-adherent; > 95% expression of CD105, CD90 and CD73; < 2% expression of CD45; and differentiation into osteoblasts, adipocytes and chondroblasts; and therefore characterized as human dental pulp stem cells (hDPSCs). Surgery procedures were performed in 9 male Wistar rats. The bone defect was prepared under the mandibular first molar, in the right and left mandible with 1mm of height/depth and 3mm length. On the right side, treated group, the hDPCs were applied, while on the left side, control group, no treatment was performed. The remaining hDPCs of the surgical protocol had their viability analyzed through the MTS test and osteogenic differentiation assay. The remaining cells were viable, without significant statistical difference when compared to the control group, and they maintained the capacity for osteogenic differentiation. Three animals of each group were euthanized at 7, 14 and 28 days post-surgery. Samples were evaluated by light microscopy (hematoxylin and eosin staining), the regeneration area was measured by Image J software and the presence of the markers HKN1 and Sox10 was evaluated by immunochemistry. A value of $p < 0.05$ was considered for data with statistical significance. Results indicated that within 7 days, control group presented a pronounced bone formation when compared with the treated group ($p = 0,03$). In 14 days, the treated group showed an increase in bone formation, but with no statistical difference among groups ($p = 0,62$). At the final period evaluated there was no difference between both groups ($p = 0,89$). Moderate staining for HNK1 and Sox10 was observed in osteoblasts and new osteocytes at 7 days, and intense at 14 and 28 days, with no difference between control and treated groups. In conclusion, although there was a rapid increase in bone formation between 7 and 14 days with the use of hDPCs, with regard the methods used in this study, there is no evidence that the use of these cells improve bone formation in comparison to the control group during the periods analyzed. HNK1 and Sox10 are present in osteoblasts and osteocytes during the regeneration process.

Keywords: Bone regeneration, regeneration, stem cell, cell differentiation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Caracterização das células-tronco mesenquimais de Polpa Dentária.	43
Figura 2. Análise das hDPCs remanescentes da cirurgia.	44
Figura 3. Análise histológica do osso neoformado.	45
Figura 4. Porcentagem média da formação óssea no grupo tratado e sem tratamento nos tempos de 7, 14 e 28 dias de pós-operatório.	46
Figura 5. Porcentagem média da formação óssea no grupo tratado e sem tratamento nos tempos de 7, 14 e 28 dias de pós-operatório.	46
Figura 6. Análise imuno-histoquímica para HNK1 e Sox10.	48
Figura 7. Ilustração da posição e dimensões do defeito ósseo confeccionado.	59

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Intensidade de marcação para HNK1 e Sox10. 47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina
- 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 (*Polymerase Chain Reaction Reverse Transcriptase*)
- CN – Crista Neural
- DPSCs – Células-tronco da Polpa de Dentes Permanentes (*dental pulp stem cells*)
- MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura
- HNK-1 – do inglês *Human Natural Killer-1*
- SOX-10 – do inglês *SRY (sex determining region Y)-box 10*
- hDPCs – Células da polpa dental humana (*human dental pulp cells*)
- hDPSCs – Células-tronco da polpa dental humana (*human dental pulp cells*)
- Grupo Tto – Grupo Tratado
- CEPSH – Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
- CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais
- α -MEM – Meio Essencial Mínimo α (*α -Minimum Essential Medium*)
- SFB – Soro Fetal Bovino
- Dra. – Doutora
- EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-acético (*thylene diamine tetraacetic acid*)
- PBS – Água Salina Tamponada Fosfatada (*phosphate-buffered saline*)
- DAB – Diaminobenzidina
- MSCs – Células-tronco Mesenquimais (*mesenchymal stem cells*)
- TGF- β – Fator de Crescimento de Transformação Beta (*transforming growth factor beta*)
- MTS – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium
- β -TCP – Beta Fosfato Tricálcico (*beta-Tricalcium phosphate*)
- HA – Hidroxiapatita
- TCP – Fosfato Tricálcico (*Tricalcium phosphate*)

LISTA DE SÍMBOLOS

< – Menor
> – Maior
 α – Alfa
% – Porcento
mL – Mililitro
g – Grama
mm – Milímetro
 μL – Microlitro
 μm – Micrometro
 H_2O_2 – Peróxido de hidrogênio
M – Molar
pH – Potencial hidrogeniônico
® – Marca registrada
°C – Grau Celsius
= – Igual
 CO_2 – Gás Carbônico
 μM – Micromolar
 μg – Micrograma
mM – Milimolar
 β – Beta
ng – Nanograma

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	27
2	OBJETIVOS	33
2.1	OBJETIVO GERAL	33
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
3	ARTIGO	34
4	METODOLOGIA EXPANDIDA	57
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	63
	REFERÊNCIAS	65
	APÊNDICES	73
	APÊNDICE A - TCLE.....	73
	ANEXOS	75
	ANEXO A - TERMO COSUBSTANCIADO DO CEP SH	75
	ANEXO B –TERMO CEUA	77

1. INTRODUÇÃO

A regeneração de defeitos ósseos tem sido um grande objetivo para clínicos e pesquisadores em todo o mundo (Zang *et al.*, 2016). Embora o osso possua grande capacidade de reparação e regeneração, defeitos ósseos de tamanhos críticos, definidos como defeitos que não se regeneram espontaneamente durante a vida do animal (Schmitz e Hollinger, 1986), são incapazes de regenerar completamente, e diversas condições clínicas, como a localização e o ambiente do defeito ósseo, podem resultar em uma cicatrização prejudicada. Sendo assim, grandes defeitos ósseos são um problema na cirurgia craniomaxilofacial, bem como na ortopedia de forma geral (Verrier *et al.*, 2016; Zang *et al.*, 2016).

A reconstrução com enxerto é a opção mais comumente utilizada. Na prática clínica, o tratamento padrão para grandes defeitos ósseos é o uso de enxerto de osso autógeno ou alogênico (Verrier *et al.*, 2016). O material autógeno é o único que possui os três requisitos considerados essenciais para um material enxertivo: osteoindução, osteocondução e osteogênese. Isto fez com que o enxerto autógeno se tornasse o padrão ouro no tratamento de regeneração óssea (Nampo *et al.*, 2010). Entretanto, as múltiplas limitações associadas ao uso de enxertos autólogos e bancos de ossos (volume insuficiente de tecido, morbidade do hospedeiro (autógeno), atividade osteogênica inconsistente, falhas biomecânicas tardias e possibilidade de transmissão de doenças alogênicas) têm impulsionado pesquisadores a buscar soluções alternativas para a terapia óssea (Yoshioka *et al.*, 2012; Verrier *et al.*, 2016).

A bioengenharia objetiva regenerar tecidos ou órgãos usando três elementos: células-tronco, arcabouço e fatores de crescimento (Bianco e Robey, 2001). Neste contexto, a engenharia de tecido ósseo, com o objetivo de fornecer materiais novos e eficazes para promover a regeneração óssea, tem sido considerada como uma alternativa promissora aos tratamentos atuais (Zang *et al.*, 2016).

Desde que se descobriu que as células-tronco adultas têm capacidade de formar diferentes tipos de tecidos, pesquisas voltadas ao uso destas células têm recebido considerável atenção, isto porque se acredita em um importante papel a ser desempenhado futuramente por

estas células no tratamento de distúrbios médicos e odontológicos (Rosa *et al.*, 2012; Shilpa *et al.*, 2013).

A célula-tronco é definida como uma célula que tem a habilidade de se dividir e se replicar continuamente, e gerar células que podem se diferenciar em outros tipos celulares. 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, enquanto a segunda encontra-se presente nos tecidos adultos, sendo aqui consideradas as células provenientes do organismo pós-nascimento, como as células do cordão umbilical (Shilpa *et al.*, 2013).

Há ainda outra classificação segundo o potencial de diferenciação em outros tipos celulares. As células-tronco totipotentes são capazes de dar origem a todas as células do organismo, além dos anexos embrionários; as pluripotentes originam todos os tipos celulares que constituem o indivíduo, mas não origina os anexos embrionários; já as multipotentes originam apenas determinadas linhagens celulares. As células-tronco totipotentes e pluripotentes são originárias de embriões; já as multipotentes são originárias de tecidos pós-natais (Wagers e 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, além de eliminar os entraves éticos da utilização de células-tronco embrionárias (Rosa *et al.*, 2012).

Quando induzidas *in vitro* ou *in vivo* para diferenciação, essas células possuem a capacidade de se auto-renovar e de se diferenciar em determinadas células. As células-tronco adultas podem ser obtidas de diversos tecidos, como medula óssea, tecido adiposo, polpa de dente decíduo ou permanente, músculo, entre outros. Devido à sua fácil obtenção para uso experimental e possibilidade de cultivo, surgem diversas perspectivas para o seu uso na medicina regenerativa, especialmente por apresentar a vantagem de imunocompatibilidade das células autólogas (De Mendonça Costa *et al.*, 2008).

No campo da Odontologia, a descoberta da presença de células-tronco nos tecidos dentais levantou a possibilidade de utilizá-las para a engenharia de tecidos e tratamento de doenças como periodontite, cárie dental, perdas ósseas, entre outras (Cordeiro *et al.*, 2008; Demarco *et al.*,

2011). Atualmente, estas células são isoladas a partir de células mesenquimais da polpa de dentes decíduos e permanentes, células encontradas na papila apical, no folículo dentário, no ligamento periodontal, entre outros (Demarco *et al.*, 2011; Shilpa *et al.*, 2013).

As células-tronco de origem dentária possuem características de células-tronco mesenquimais e seus grupos apresentam capacidade distinta para a diferenciação celular. Estas células têm potencial osteogênico (Yamada *et al.*, 2010), portanto podem formar osso *in vivo*, têm capacidade de regeneração pulpar (Crowley *et al.*, 1990), de produzir dentina, além de gerar neurônios e secretar fatores neurotróficos, propiciando possibilidades de tratamento de doenças neurodegenerativas e reparo de neurônios motores (Shilpa *et al.*, 2013).

Atualmente, o Laboratório de Células-Tronco e Regeneração Tecidual (LACERT), do Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Celular, juntamente com o Laboratório de Bioengenharia de Tecidos Dentários (LABITED), do Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Ciências Morfológicas, têm explorado o potencial das células-tronco de tecidos dentais. O trabalho realizado por Coura (2008) revelou que o ligamento periodontal humano é um nicho de células-tronco que apresentam marcadores de células-tronco da crista neural (CN) e capacidade de diferenciação em derivados mesodermis e neurais (Coura *et al.*, 2008)

A CN é uma estrutura transitória formada por um grupo de células que se originam das margens dorsais das pregas neurais durante o processo de neurulação do desenvolvimento de vertebrados (Le Douarin *et al.*, 2004; Dupin *et al.*, 2007). Durante e depois do fechamento do tubo neural em embriões, as células da CN desprendem-se da ectoderme e adquirem um fenótipo migratório, permitindo sua multiplicação, e dando início à migração destas células por todo o embrião (Le Douarin, 1999).

Células da CN são células progenitoras altamente multipotentes que contribuem extensivamente para o desenvolvimento dos vertebrados dando origem a vários tipos celulares (Le Douarin & Kalcheim, 1999). Em embriões de mamíferos, as células da CN, após a sua migração, irão originar o mesênquima facial. A característica migratória e origem ectodermal

concedem às células da CN uma significativa colaboração para a formação de estruturas da cabeça e pescoço destes animais (Creuzet *et al.*, 2005). Como exemplo, as células da CN cefálica, irão dar origem aos neurônios dos gânglios cervicais e células gliais, células pigmentares da pele (exceto as da retina), condrócitos, osteócitos, adipócitos, odontoblastos e a maioria das células musculares lisas dos vasos da cabeça (Le Lièvre e Le Douarin, 1975; Etchevers *et al.*, 2001)

Neste sentido, a pesquisa de Polli (2011) apontou as células-tronco da polpa dentária como células-tronco mesenquimais através da observação da diferenciação destas células para o fenótipo mesodermal (osteócito, adipócito e células de músculo liso). Além disso, revelou que estas células têm origem na Crista Neural (CN) através dos resultados positivos para alguns marcadores de células-tronco embrionárias (OCT4) e de células-tronco da CN (Snail, Nestina), e negativas para outros (Nanog, p75 e Sox10) avaliados por RT-PCR (do inglês: *transcriptase reversa* PCR) e imunocitoquímica (Polli, 2011).

Duarte (2013) analisou o potencial das células-tronco da polpa dentária durante as fases de desenvolvimento de ratos (*in vivo*) e em cultivo de células-tronco da polpa dentária humana (*in vitro*). Os resultados obtidos do 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 CN sugerem que a polpa dentária de ratos pode se manter em estado multipotente durante todo o seu desenvolvimento até a idade adulta. O resultado da pesquisa *in vitro* verificou expressão gênica positiva para marcadores de células pluripotentes e da CN nas células-tronco da polpa dentária humana, sugerindo que as mesmas contêm células progenitoras multipotentes. Ainda, a análise imunofenotípica realizada nas unidades formadoras de colônias nas células-tronco da polpa dental humana observou células positivas para marcadores de derivados ectodermis e mesodermis em uma mesma colônia, o que aponta que as células da polpa dentária possuem potencial ectomesenquimal na fase adulta e ao longo do desenvolvimento dentário (Duarte, 2013).

Seguindo estas premissas, o grupo de pesquisa do LABITED em associação com o LACERT desenvolveu uma pesquisa onde a polpa de terceiros molares hígidos extraídos foi coletada e cultivada para

células-tronco mesenquimais seguindo o protocolo de Gronthos (2000). As células foram caracterizadas: positivas para os marcadores CD105, CD90 e CD73 (acima de 92%); negativas para CD45 (abaixo de 2%); diferenciação para os fenótipos mesenquimais adipocíticos, condrocíticos e osteocíticos; aderência ao plástico e morfologia fibroblastóide. As células foram aplicadas em defeitos ósseos induzidos em mandíbulas de ratos, sendo os tempos de observação de 7, 14 e 28 dias pós-operatórios. As amostras foram analisadas em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (Stuepp, 2014).

Em MEV pode-se verificar que em 7 dias houve o início do reparo ósseo no grupo tratado e no grupo controle, sendo a regeneração predominante no fundo da cavidade, com bordas externas do defeito nítidas; em 14 dias a regeneração estava em curso tanto no tratado quanto no controle, havendo diminuição da profundidade da cavidade; em 28 dias ambos os grupos apresentavam regeneração avançada, não havendo mais profundidade na cavidade e ocorrendo fusão dos seus bordos com o tecido ósseo neoformado (Stuepp, 2014). Contudo, tal resultado mereceu uma análise mais detalhada buscando quantificar o tecido ósseo neoformado nos grupos analisados, sendo este um dos objetivos deste estudo.

Também em estudo prévio conduzido no Laboratório de Bioengenharia dos Tecidos Dentários, foi avaliada a presença dos marcadores Sox10 e HNK1 durante a osteogênese dos maxilares: Sox10 está presente em células indiferenciadas em estágios iniciais da osteogênese dos maxilares; Sox10 e HNK1 presentes em osteoblastos no início da osteogênese dos maxilares (Tomazelli *et al.*, 2015).

O antígeno HNK1 (human natural killer 1) é conhecido como uma porção de carboidratos ligados a várias moléculas que fazem adesão e reconhecimento celular (Nordlander, 1993). O anticorpo anti-HNK1, específico para marcação deste carboidrato, foi desenvolvido para reconhecimento da célula de defesa *human natural killer*. Sua expressão, primeiramente foi observada em neurônios maduros, células da glia, células de Schwann e em uma subpopulação de leucócitos. Posteriormente, foi visto que são expressas, também, em células da crista neural durante os estágios iniciais de migração, devido à adesão deste açúcar nas proteínas dessas células. Após o processo migratório de diferenciação dessas células sua expressão não é mais observada

(Vincent e Thiery, 1984; Bronner-Fraser, 1986; Luidier *et al.*, 1992; Nordlander, 1993).

Já o Sox10 (Sry-related HMG-BOX gene 10) é um gene que codifica uma família de fatores de transcrição expressos em células da crista neural em processo migratório e também em seus derivados já diferenciados como em células gliais do sistema nervoso periférico, tanto autônomo quanto entérico e melanócitos. O Sox10 pode regular o destino das células da crista neural em migração de acordo com estímulos extracelulares específicos, e também desencadear a diferenciação destas células, sendo essencial para o desenvolvimento embrionário (Dutton *et al.*, 2001; Kipanyula *et al.*, 2014).

Apesar dos resultados encontrados da expressão de HNK1 e Sox10 durante a osteogênese dos maxilares, o estudo não permitiu identificar o papel destes marcadores nestas células (Tomazelli *et al.*, 2015), porém, pode-se especular que o Sox10 esteja relacionado com a manutenção do estado indiferenciado de progenitores celulares com características da crista neural (Kim *et al.*, 2003; Sauka-Spengler e Bronner-Fraser, 2008; Kipanyula *et al.*, 2014), enquanto que para HNK1, a marcação após o processo migratório de diferenciação destas células é um achado recente (Tomazelli *et al.*, 2015). Sendo assim, não se pode deixar de avaliar no padrão de regeneração dos defeitos ósseos maxilares com o uso de células da polpa de dentes permanentes humanos, a marcação para HNK1 e Sox10, buscando uma correlação desta marcação com o processo de osteogênese dos maxilares.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar o potencial das hDPCs em regenerar defeitos ósseos mandibulares de ratos e avaliar a marcação de progenitores de células da crista neural, HNK1 e Sox10, neste processo.

2.2 Objetivos Específicos

- . Caracterizar as células provenientes da polpa de dentes permanentes humanos;
- . Avaliar a viabilidade das hDPCs remanescentes do protocolo cirúrgico;
- . Descrever, têmporo-especialmente, o processo de regeneração óssea alcançada pelas hDPSCs;
- . Quantificar a neoformação óssea no processo de regeneração com e sem o uso das hDPSCs;
- . Analisar a distribuição têmporo-especial dos marcadores HNK1 e Sox10 durante a regeneração dos defeitos ósseos mandibulares.

3. ARTIGO

Artigo formatado conforme normas da revista *Brazilian Dental Journal*, com exceção do idioma e das referências (ABNT, autor-data).

TÍTULO

Utilização de células da polpa dental humana na regeneração óssea mandibular de ratos

RESUMO

Células da polpa dental humana (hDPCs) foram identificadas como população de células-tronco com multipotencial de diferenciação. Para examinar a eficácia destas células na regeneração óssea, as mesmas foram isoladas células da polpa de dentes permanentes e enxertadas em defeitos ósseos mandibulares de ratos; defeitos ósseos sem células foram o grupo controle. As amostras foram avaliadas por microscopia de luz; a regeneração óssea foi mensurada pelo programa Image J e a expressão dos marcadores HNK1 e Sox10 foi avaliada por imuno-histoquímica. As células da polpa dental humana foram analisadas: aderência ao plástico; > 95% expressaram CD105, CD73 e CD90; < 2% expressou CD45; obteve-se a diferenciação em osteoblastos, adipócitos e condrócitos, sendo então caracterizadas como células tronco da polpa de dentes permanentes humanos (hDPSC). Os resultados indicaram que em 7 dias de pós-operatório o grupo controle apresentou pronunciada formação óssea quando comparado com o grupo tratado ($p = 0,03$). Aos 14 dias, o grupo tratado mostrou aumento na formação óssea, mas sem diferença significativa ($p = 0,62$). No período final de avaliação não houve diferença entre controle e tratado ($p = 0,89$). Foi observada marcação moderada para HNK1 e Sox10 em osteoblastos e osteócitos jovens em 7 dias, e intensa em 14 e 28 dias, sem diferença entre controle e tratado. Conclui-se que não há evidências de que o uso destas células beneficiou a formação óssea quando comparado ao grupo controle nos períodos analisados. HNK1 e o Sox10 estão presentes em osteoblastos e osteócitos em processo de regeneração.

Palavras-chave: regeneração óssea, regeneração, células-tronco, diferenciação celular.

ABSTRACT

Human dental pulp cells (hDPCs) have been identified as a stem cell population with multipotential differentiation capabilities. To examine the efficacy of these stem cells in bone regeneration, human dental pulp cells from permanent teeth were grafted in mandibular bone defects; bone defects without cells were control group. Samples were evaluated by light microscopy and the regeneration area was measured by Image J software. Expression of the markers Sox10 and HNK1 was evaluated by immunochemistry. Human dental pulp cells were analyzed: plastic-adherent; > 95% expression of CD105, CD73 and CD90; < 2% expression of CD45; and differentiation into osteoblasts, adipocytes and chondroblasts, and therefore characterized as human dental pulp stem cells (hDPSCs). Results indicated that within 7 days, control group presented a pronounced bone formation when compared with the treated group ($p = 0.03$). In 14 days, the treated group showed an increase in bone formation, but with no difference ($p = 0.62$). In the final period evaluated there were no difference between control and treated group ($p=0.89$). Moderate staining for HNK1 and Sox10 was observed in osteoblasts and new osteocytes at 7 days, and intense at 14 and 28 days, with no difference between control and treated. In conclusion, there is no evidence that the use of these cells improve bone formation in comparison to the control group during the periods analyzed. HNK1 and Sox10 are present in osteoblasts and osteocytes during the regeneration process.

Keywords: bone regeneration, regeneration, stem cell, cell differentiation.

INTRODUÇÃO

A maioria das cirurgias maxilares envolvem o processo alveolar e o reparo de defeitos ósseos nesta área ainda hoje é um desafio. Terapias baseadas em células-tronco são alternativas promissoras para a regeneração óssea (Petite *et al.*, 2000; Bianco *et al.*, 2001; Zheng *et al.*, 2009). Células-tronco mesenquimais (MSCs) são auto-renováveis e se diferenciam em todas as linhagens celulares que formam tecido conjuntivo e mesenquimal (Caplan, 1991; Pittenger *et al.*, 1999; Alhadlaq e Mao, 2004) e podem ser empregadas como a fonte de células

para a regeneração óssea baseada em células-tronco (Jiang *et al.*, 2002).

Células-tronco de polpa dental (DPSCs) são de interesse para terapias, como a regeneração óssea, uma vez que advém de uma fonte facilmente acessível (Junqueira e Carneiro, 2004; Demarco *et al.*, 2011; Rosa *et al.*, 2012), tem alta capacidade de proliferação e diferenciação, interação com biomateriais (Graziano *et al.*, 2008; Yamada *et al.*, 2010), regeneração pulpar (Cordeiro *et al.*, 2008) e apresentam atividade imunossupressora com grande potencial para aplicação clínica (Pierdomenico *et al.*, 2005a). Além disso, estudos anteriores mostraram que a polpa dental contém células proliferativas que são análogas às células ósseas, isto porque elas expressam marcadores osteogênicos e respondem a diversos fatores de crescimento osteo/odontogênico na diferenciação *in vitro* (Hanks *et al.*, 1998; Unda *et al.*, 2000; Ueno *et al.*, 2001) e podem facilmente se diferenciar em osteoblastos e produzir tecido mineralizado (Gronthos *et al.*, 2000; Harada e Ohshima, 2004; Graziano *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008; Chadipiralla *et al.*, 2010).

Em relação ao processo de formação óssea, Tomazelli e colaboradores (2015) avaliaram a marcação de Sox10 e HNK1, marcadores de células da crista neural (CN), durante a osteogênese dos maxilares. Os autores verificaram que Sox10 está presente em células indiferenciadas em estágios iniciais da osteogênese dos maxilares; e Sox10 e HNK1 presentes em osteoblastos no início da osteogênese dos maxilares (Tomazelli *et al.*, 2015). Pode-se especular que, na osteogênese dos maxilares, Sox10 esteja relacionado com a manutenção do estado indiferenciado de progenitores celulares com características da CN (Kim *et al.*, 2003; Sauka-Spengler e Bronner-Fraser, 2008; Kipanyula *et al.*, 2014), enquanto que HNK1, a marcação após o processo migratório de diferenciação das células da CN é um achado recente (Tomazelli *et al.*, 2015). Entretanto, este estudo não avaliou a expressão destes marcadores em processo de regeneração óssea.

Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a regeneração óssea promovida por células provenientes de polpa dental humana enxertadas em defeitos ósseos em ratos e avaliar a marcação para HNK1 e Sox10, buscando uma correlação desta marcação com o processo de osteogênese dos maxilares.

MATERIAIS E MÉTODOS

Estudo Animal

Nove ratos Wistar machos (2 meses de idade, pesando 250 g cada) foram utilizados neste estudo. Os animais foram mantidos sob condições convencionais, com acesso livre a água e fornecimento regular de alimento macio. Não foram utilizadas medicações após a cirurgia. Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de Cetamina 10% e Xilazina 2% (Syntec, SP, Brasil) (0.3ml/100g/peso). O osso do processo alveolar vestibular foi exposto através de uma incisão na junção mucogengival e um defeito ósseo foi realizado sob a coroa do primeiro molar inferior com uma broca carbide número 1 em baixa rotação e sob irrigação de solução salina, atingindo dimensões finais de 1 mm de profundidade/altura e 3 mm de comprimento. O tamanho do defeito ósseo foi verificado em um estereomicroscópio cirúrgico nos aumentos de 8 a 20 vezes. O defeito ósseo do lado direito foi tratado com as células (grupo tratado) e o lado esquerdo não recebeu nenhum tratamento (grupo controle). Em ambos os grupos o tecido mole foi fechado com suturas interrompidas utilizando fio de sutura 4-0 reabsorvível (Technofio, GO, Brasil). Os animais foram aleatoriamente divididos em 3 períodos de análise (7, 14 e 28 dias de pós-operatório), contendo 3 animais cada período, e então foram eutanasiados através de overdose de solução anestésica. Este protocolo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFSC (n.114/CEUA/PROPESQ/2013) e as leis nacionais sobre o uso de animais foram observadas.

Cultura das Células da Polpa Dental Humana (hDPCs)

Células da polpa dental humana (hDPCs) foram obtidas de terceiros molares e cultivadas em meio alfa (α) modificado de Dulbecco (α -MEM; Sigma-Aldrich, MO, USA) contendo 20% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco, MO, USA), penicilina (Sigma-Aldrich, MO, USA) e estreptomicina (Sigma-Aldrich, MO, USA) a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂, e foi permitido alcançar 80% de confluência. Todos os procedimentos foram realizados sob a aprovação das diretrizes estabelecidas pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (n.16932913.8.0000.0121).

Análise de Citometria de Fluxo das hDPCs

As células obtidas foram analisadas nas passagens 4,5 e 6 para confirmar o fenótipo mesenquimal. Assim, as células suspensas foram incubadas com FITC-, PE-, PerCP ou Cy conjugado com anticorpo monoclonal contra CD73, CD90, CD105 ou CD45 (BD Biosciences, NJ, USA) por 40 minutos a 4°C no escuro. O isótopo correspondente FITC-, PE-, PerCP ou Cy conjugado com anticorpo de rato foi usado como controle. As células foram analisadas através da citometria FACS Canto II (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, USA).

Ensaio de Diferenciação Celular das hDPCs

A diferenciação adipogênica e osteogênica foi realizada conforme descrito anteriormente (Coura *et al.*, 2008). Brevemente, 5×10^4 células foram semeadas em placas de cultura de 24 cavidades (Corning, NY, USA) e cultivadas em α -MEM suplementado com 10% de SFB. Para a diferenciação adipogênica as células foram suplementadas com 10^{-6} M de dexametasona (Sigma-Aldrich, MO, USA), 50 μ M de indometacina (Sigma-Aldrich, MO, USA), 10 μ g/ml de insulina (Sigma-Aldrich, MO, USA) e 0.5 mM 3-Isobutil-metilxantina (IBMX) (Sigma-Aldrich, MO, USA) além de antibióticos. Para a diferenciação osteogênica as células foram suplementadas com 10^{-7} M de dexametasona, 50 μ g/ml de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich, MO, USA), e 20mM β -glicerofosfato (Sigma-Aldrich, MO, USA), além de antibióticos. O meio de cultura foi trocado a cada 3 dias. As células controle foram cultivadas em meio padrão (α -MEM + 10% SFB +1% PBS).

Após 15 dias de diferenciação adipogênica e 22 dias de diferenciação osteogênica, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 30 minutos em temperatura ambiente e coradas com solução 0,02g/mL Alizarin red (Riedel-de-Haen, Germany) ou com solução 0,25g/mL Oil red-O/ isopropanol fresco diluído com água destilada (3:2) (Sigma-Aldrich, MO, USA).

Para a diferenciação condrogênica as células foram tratadas com α -MEM (Sigma-Aldrich MO, USA), suplementado com 250

ng/mL TGF- β (Sigma-Aldrich, MO, USA), 1x B27 (Gibco, MO, USA), 2,5 mg/mL de dexametasona (Sigma-Aldrich, MO, USA), 10 μ g/mL de insulina (Sigma-Aldrich, MO, USA), 100 mg/mL de albumina (Sigma-Aldrich, MO, USA) e 10 μ g/mL de transferrina, e em seguida coradas com solução de 0,02 g/mL Alcian Blue (Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg, Germany).

Transplante das hDPCs para os defeitos ósseos

Em ensaio de padronização do tamanho do defeito ósseo, foi estipulado que seriam necessárias aproximadamente $1,5 \times 10^5$ células para preenche-lo. Desta forma, neste experimento, foram utilizadas $1,8 \times 10^5$ células, sendo que $1,5 \times 10^5$ células foram transplantadas no defeito ósseo e as $0,3 \times 10^5$ células excedentes foram conduzidas à análise de viabilidade celular após a cirurgia. Para tanto, todas as células foram lavadas com água salina tamponada fosfatada (do inglês: *phosphate-buffered saline*) (PBS) e tratadas com tripsina/EDTA 0,05% em 37°C. Após 1 minuto, foi incorporado 4mL α -MEM suplementado com 15% de SFB. O conteúdo foi centrifugado e as células suspensas com 1mL de PBS. O conteúdo foi centrifugado novamente e o precipitado celular de 100 μ L, depositando cerca de 10 μ L da PSB e células, preenchendo todo o defeito, seguido da sutura dos tecidos moles.

Análise de MTS das hDPCs remanescentes do protocolo cirúrgico

Após o transplante das hDPSCs no defeito ósseo, as células remanescentes (aproximadamente $0,3 \times 10^5$ células) foram mantidas em um tubo de 15mL contendo α -MEM e SFB e transportadas ao laboratório para a avaliação quantitativa da viabilidade celular através do método colorimétrico utilizando o corante MTS (do inglês: *3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium*).

Para tanto, cerca de 10 mil células (das remanescentes) foram semeadas em placas de cultura de 24 poços contendo α -MEM suplementado com 10% SFB. Após 24 horas, as células foram incubadas com MTS por 3 horas e o sobrenadante foi lido por espectrofotometro para avaliar a absorbância que indica o grau de

viabilidade celular. Este procedimento foi realizado em 24, 48 e 72 horas. Como grupo controle, utilizou-se hDPSCs que não foram submetidas ao protocolo de cirurgia.

Além disso, foi realizado ensaio de diferenciação osteogênica das células remanescentes, conforme citado anteriormente.

Análise descritiva e quantitativa da regeneração óssea

Foi utilizado três amostras de cada grupo (controle e tratado) com 7, 14 e 28 dias após a cirurgia. As hemimandíbulas foram fixadas em formaldeído (Synth, SP, Brasil) 10% por 24 horas, descalcificadas com EDTA 4,13% (Synth, SP, Brasil), desidratadas e embebidas em parafina. Cortes semi-seriados (3µm de espessura) foram coletados seguidos de coloração com hematoxilina e eosina (Synth, SP, Brasil). Os cortes foram observados utilizando o microscópio Olympus® Bx41 (Olympus, SP, Brasil) e as imagens foram capturadas com a câmera 3.3 megapixel e o software Q-capture Pro 5.1 (Q-imaging, BC, Canada). Os defeitos ósseos foram analisados e descritos em relação à área de regeneração.

Em relação à quantificação da área óssea neoformada, foi realizada a estatística entre os grupos analisados, controle e tratado, nos grupos de 7, 14 e 28 dias de pós-operatório. Levando em consideração o comprimento do primeiro molar inferior como padrão para o comprimento do defeito ósseo, três lâminas equidistantes de cada amostra foram selecionadas, as imagens foram capturadas conforme descrito anteriormente e usadas para a mensuração da regeneração óssea. A área do defeito ósseo e o osso neoformado foram medidos com o programa NIH Image J (Wayne Rasband, National Institute of Health, USA), dando origem ao percentual médio de osso neoformado de cada amostra. Esta medida foi realizada três vezes em diferentes períodos, e a média final foi calculada para cada grupo.

Reação imuno-histoquímica

Seguindo os parâmetros da análise quantitativa da regeneração óssea, as amostras foram submetidas à técnica de imuno-histoquímica pelo método do polímero marcado HRP.

Os anticorpos primários utilizados foram: anticorpo monoclonal anti-HNK1 (obtido do Developmental Studies Hybridoma Bank; Universidade de Iowa, Iowa, EUA); e o anticorpo policlonal anti-Sox10 (Chemicon -Temecula, CA, USA). Cortes histológicos com 3µm de espessura foram estendidos em lâminas preparadas com poly-L-lisine (Sigma, MO, USA), seguidos de desparafinização e tratados com solução de 6% H₂O₂/metanol durante 30 minutos para o bloqueio da peroxidase endógena, seguido de tampão fosfato salino (PBS), pH 7,4, e água destilada durante 5 minutos cada. Realizou-se a recuperação antigênica com solução de tripsina/EDTA 0,002% durante 10 minutos. O bloqueio dos sítios de ligações não específicas foi realizado ao longo de 40 minutos com leite desnatado 5%. Os anticorpos primários (HNK1 sem diluição; Sox10 diluído 1: 150 em PBS) foram incubados durante 18 horas a 4°C em câmara úmida. Após lavagem em PBS foi utilizado o kit EnVision (Dako, Corporation, Carpinteria, CA, EUA) com anticorpo secundário sem diluição, o qual foi incubado durante 60 minutos. A revelação da reação foi obtida usando DAB (DAB + Substrato Cromógena System®, DAKO North America Inc., Carpinteria, EUA) como substrato. As amostras foram desidratadas em sequências crescentes de álcool etílico e montadas em Entellan (Merck, Darmstadt, GER). Os controles negativos foram incubados na ausência de anticorpo primário. Para o controle positivo, foram utilizadas lâminas de cabeça de ratos neonatos.

A intensidade da imunomarcagem de HNK1 e Sox10 foi categorizada como: sem marcação (-), leve (+/-), moderada (+) ou intensa (++). As lâminas foram observadas em microscópio Olympus® BX41, e as imagens foram capturadas com uma câmera de 3.3 Mpixel (Q-imaging) e captura Q Pro software 5.1 (Q-imaging). A análise foi realizada por um observador cegado em relação ao experimento.

Análise estatística

Para o teste de viabilidade celular, realizou-se a estatística com o teste T, não pareado, $p < 0,05$, com pós-teste Mann-Whitney U.

Para a quantificação da área de regeneração óssea, primeiramente, foi realizado o teste de normalidade Shapiro-Wilk. Em seguida, realizou-se o teste T Pareado para comparar os resultados entre o grupo controle e tratado. Por fim, realizou-se o teste ANOVA, para

verificar os resultados obtidos ao longo do tempo de observação dentro de cada grupo (controle e tratado). Para tanto, utilizou-se o software GraphPad versão 5.03. Os resultados foram expressos como média da porcentagem da área regenerada nos defeitos ósseos \pm desvio-padrão da média (DPM). Nível de significância de $p < 0.05$ foi aceito.

RESULTADOS

Caracterização das células da polpa dental humana (hDPCs)

Em cultura, as hDPCs formaram grupos de células clonogênicas com aderência ao plástico e morfologia fibroblastóide (Fig. 1A). No meio de diferenciação adipogênica, as células adquiriram formato alongado com vesículas coradas pelo corante Oil-red (Fig. 1B). Na presença do meio de diferenciação osteogênica, as células exibiram típica morfologia osteogênica e produziram uma densa matriz extracelular caracterizada pela presença de estruturas nodulares (deposição de cálcio) quando coradas com corante de cálcio Alizarin-red (Fig. 1C). Já na presença do meio de diferenciação condrogênica, as células apresentaram morfologia condrogênica e marcação positiva para a coloração com a solução de Alcian Blue (Fig. 1D).

Em seguida, analisou-se o perfil de marcadores celulares expressos pelas hDPSCs através da imunofluorescência e citometria de fluxo. As figuras 1E-H mostram que as células expressaram marcadores de células-tronco mesenquimais CD73 (99,8%), CD90 (99,7%), CD105 (99,0%) e ausência de expressão de CD45.

Por fim, a análise de MTS das células remanescentes da cirurgia mostrou que as mesmas estavam viáveis, sem haver diferença estatística significativa com o grupo controle (Fig. 2A) e mantiveram a capacidade de diferenciação osteogênica (Fig. 2B).

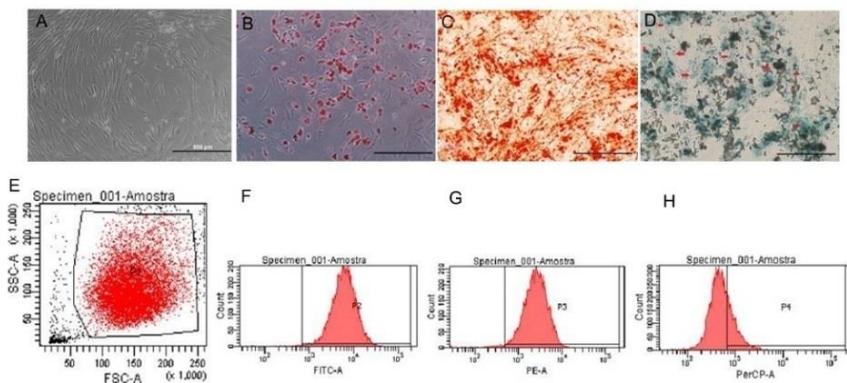


Figura 1. Caracterização das células-tronco mesenquimais de Polpa Dentária. (A) As células de polpa dentária formaram grupos de células clonogênicas com aderência ao plástico e morfologia fibroblastóide. (B) Diferenciação adipocítica: células com o corpo alongado e vesículas de gordura coradas pela solução Oil-red. (C) Diferenciação Osteogênica: células com morfologia osteogênica produziram estruturas nodulares coradas com o corante de cálcio Alizarin-red. (D) Diferenciação condrogênica: células com morfologia condrogênica e marcação positiva para a solução Alcian Blue. (E) Perfil imunofenotípico das hDP. (F) Perfil de marcador de superfície CD-73 PE. (G) Perfil de marcador de superfície CD90-FITC. (H) Perfil de marcador de superfície CD105 PercP. Barras A-D 500 μ m.

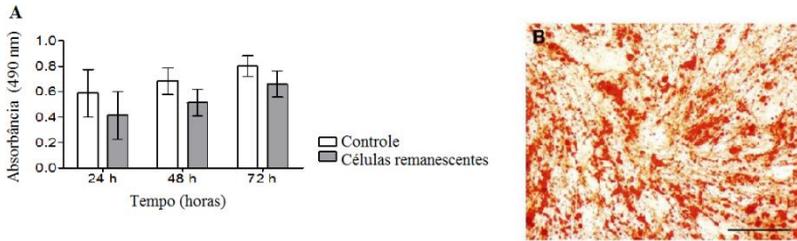


Figura 2. Análise das hDPCs remanescentes da cirurgia.(A) Análise de MTS das hDPCs remanescentes. (B) Diferenciação osteogênica das hDPCs remanescentes: células com morfologia osteogênica produziram estruturas nodulares coradas pelo corante de cálcio Alizarin red. Barra B: 500 μ m.

Análise em microscopia de luz da área óssea neoformada

No tempo de 7 dias após a cirurgia, o grupo tratado exibiu pequena formação óssea e áreas de inflamação. O grupo controle exibiu formação óssea, aparentemente, mais avançada, com trabéculas ósseas visíveis e algumas áreas de inflamação (Fig. 3A-D).

O grupo tratado e controle, aos 14 dias de pós-operatório, mostraram formação óssea, consistente com osso trabecular e pequenas áreas de inflamação (Fig. 3E-H).

Aos 28 dias de pós-operatório, tanto o grupo tratado como o controle mostraram avançada formação óssea, com predominância de osso recém formado dentro das bordas do defeito e adjacente ao osso cortical e sem áreas inflamatórias (Fig. 3I-L).

O gráfico na figura 4 revela a porcentagem da área do defeito ósseo regenerado no grupo tratado e controle em relação ao tempo de observação. Dentro de 7 dias, as amostras do grupo controle apresentaram porcentagem média de formação óssea mais pronunciada que o grupo tratado ($p=0.03$). Em 14 dias, o grupo tratado revelou um aumento na formação óssea comparado aos 7 dias, mas sem diferença estatística significativa quando comparado ao grupo controle ($p=0.62$). Aos 28 dias, a formação óssea aumentou no grupo controle, mas também sem diferença estatística significativa entre os grupos

(p=0.89).

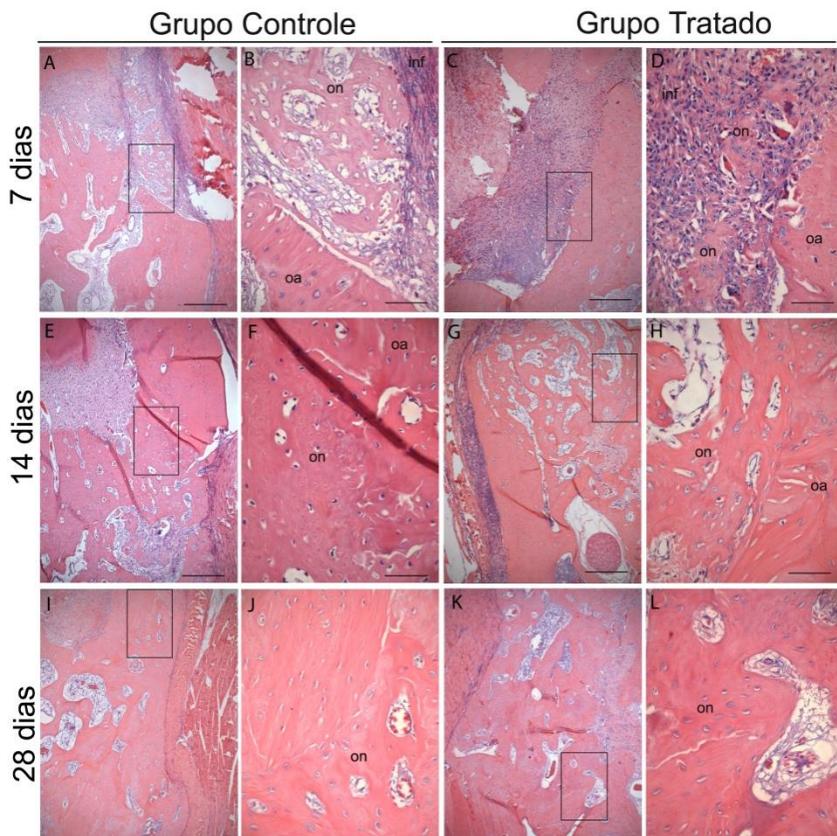


Figura 3. Análise histológica do osso neoformado. (A) 7 dias pós-operatório / grupo controle. (B) Aumento da imagem em (A). (C) 7 dias pós-operatório / grupo tratado. (D) Aumento da imagem em (C). (E) 14 dias pós-operatório / grupo controle. (F) Aumento da imagem em (E). (G) 14 dias pós-operatório / grupo tratado. (H) Aumento da imagem em (G). (I) 28 dias pós-operatório / grupo controle. (J) Aumento da imagem em (I). (K) 28 dias pós-operatório / grupo tratado. (L) Aumento da imagem em (K). (Inf) células inflamatórias; (on) osso novo; (oa) osso antigo. Barras: A, C, E, G, I, K: 200um; B, D, F, H, J, L: 50um.

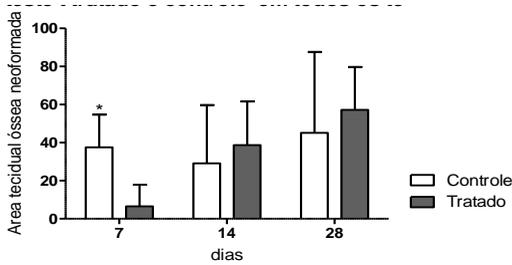


Figura 4. Porcentagem média da formação óssea no grupo tratado e sem tratamento nos tempos de 7, 14 e 28 dias de pós-operatório. (*) Diferença estatisticamente significativa entre grupo controle e tratado em 7 dias, de acordo com o teste T pareado. Níveis de significância foram considerados com $p < 0.05$.

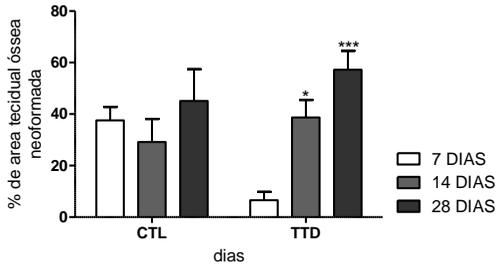


Figura 5. Porcentagem média da formação óssea no grupo tratado e sem tratamento nos tempos de 7, 14 e 28 dias de pós-operatório. (*) Diferença estatisticamente significativa entre os tempos de 7 e 14 dias e entre 7 e 28 dias no grupo tratado, de acordo com o teste ANOVA. Níveis de significância foram considerados com $p < 0.05$.

Análise imuno-histoquímica

Foi observado marcação para HNK1 em osteoblastos e osteócitos. A marcação foi considerada moderada em 7 dias. Em 14 e 28 dias a marcação dessas mesmas células se intensifica. Em 28 dias há maior concentração de células positivas para HNK1 em comparação com 7 e 14 dias, onde há um número considerável de células negativas (Figura 5A-F).

A marcação de Sox10 foi notada positiva em osteoblastos e osteócitos nos tempos experimentais analisados, sendo considerada moderada em 7 dias e intensa em 14 e 28 dias. Assim como o HNK1, em 28 dias há maior concentração de células positivas para Sox10 em comparação com 7 e 14 dias, onde há um número considerável de células negativas (Figura 5H-M).

Tabela 1: Intensidade de marcação para HNK1 e Sox10. Sem marcação (-); Leve (+/-); Moderado (+); Intenso (++)

		7 dias	14 dias	28 dias
HNK1	Tratado	+	++	++
	Controle	+	++	++
Sox10	Tratado	+	++	++
	Controle	+	++	++

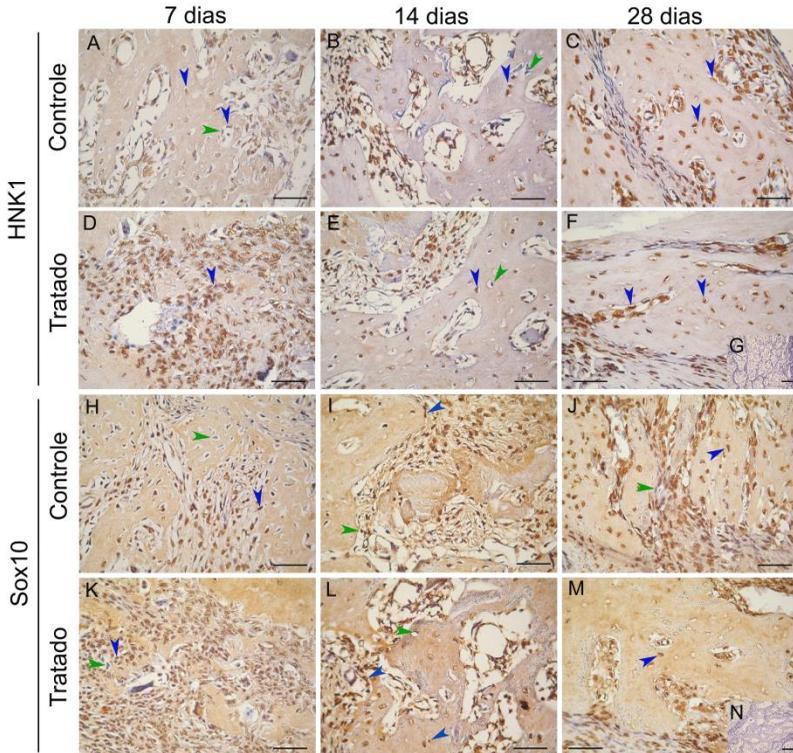


Figura 6. Análise imuno-histoquímica para HNK1 e Sox10.(A-F) HNK1. (H-M) Sox10. (G) Controle negativo de HNK1. (N) Controle negativo de Sox10. (A, D, H e K) 7 dias pós-operatório. (B, E, I e L) 14 dias. (C, F, J e M) 28 dias. (seta azul) células positivas. (seta verde) células negativas. Barras: 50um.

DISCUSSÃO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a regeneração óssea induzida pelas hDPCs em um modelo de defeito ósseo mandibular em ratos. Foi estabelecido um modelo de defeito ósseo não crítico para simular situações cotidianas da clínica odontológica, como o alvéolo dental sem tratamento pós-exodontia.

Foi estabelecida a hipótese de que a utilização das hDPCs iria melhorar a regeneração óssea em um curto período. Portanto, foi realizada a caracterização de células-tronco mesenquimais das hDPCs e a quantificação da área óssea neoformada através da análise de microscopia de luz de lâminas histológicas dentro de um período de 28 dias de pós-operatório.

A análise das hDPCs remanescentes do protocolo cirúrgico provou que as células utilizadas estavam viáveis, mantiveram a capacidade de diferenciação para o fenótipo osteogênico e por isso estavam capazes de interferir no processo de regeneração apesar do estresse do transporte e manipulação cirúrgica.

Neste estudo, não foi utilizado o protocolo de imunossupressão nos animais. Entretanto, nenhum sinal de rejeição foi observado e isto está de acordo com outros autores que referem que as células-tronco de polpa dental podem ter atividade imunossupressora (Pierdomenico *et al.*, 2005b; De Mendonça Costa *et al.*, 2008). Estudos têm demonstrado que as MSCs podem suprimir a produção de citocinas pró-inflamatórias, aumentar os níveis de interleucinas anti-inflamatórias (Zhou *et al.*, 2011), modular a resposta inflamatória e atenuar o dano tecidual causado por inflamação excessiva (Ryan *et al.*, 2005; Parekkadan *et al.*, 2007).

Em bioengenharia, além das células-tronco, também é importante fatores de crescimento que estimulem os corretos sinais biológicos *in vivo*. Para a regeneração óssea, não é necessário o uso adicional de fatores de crescimento uma vez que a matriz óssea mineralizada possui seus próprios fatores de crescimento e pode modular a diferenciação de células mesenquimais (Zimmermann *et al.*, 2015). Além disso, durante o processo de formação do coágulo de fibrina, algumas biomoléculas são liberadas e podem influenciar no processo celular via quimiotaxia ou através da modulação das

interações célula-célula (Hoppe, 2014). Portanto, uma vez que neste estudo as hDPCs foram transplantadas diretamente no defeito ósseo, nenhum fator de crescimento adicional foi utilizado.

Outro componente importante para a bioengenharia é o uso de arcabouço para suportar o crescimento. Entretanto, um dos objetivos deste trabalho, foi verificar se o uso isolado das hDPCs melhoraria o processo de regeneração de defeitos ósseos mandibulares, e para tanto, optou-se por não utilizar arcabouço. Pelos resultados não houve diferença entre o grupo tratado e controle aos 28 dias de pós-operatório. Este fato pode estar relacionado com o não uso do arcabouço, não havendo assim um suporte físico para que as células se mantivessem no interior do defeito ósseo. Entretanto, tal fato deve ser melhor investigado, uma vez que não utilizou-se ferramentas de análises da presença ou não destas células ao longo do tratamento.

Embora o grupo controle obtivesse melhor formação óssea em 7 dias de pós-operatório e não houve diferença na formação óssea com o grupo tratado em 14 e 28 dias de pós-operatório, é interessante analisar o padrão de formação óssea do grupo tratado. O grupo tratado teve um aumento tardio na formação óssea quando comparado ao grupo controle. Embora aos 14 dias de pós-operatório a formação óssea teve um grande aumento, a porcentagem foi igual ao do grupo controle. Este fato nos leva a pensar que provavelmente as hDPCs causaram um atraso no início do processo de formação óssea, entretanto, recuperando rapidamente após 2 semanas.

Em contraste com estes resultados, diversos estudos utilizaram células-tronco da polpa dental para o tratamento de defeitos ósseos com sucesso (Zheng *et al.*, 2009; Asutay *et al.*, 2015; Huojia *et al.*, 2015; Petridis *et al.*, 2015). Entretanto, estes estudos diferem na natureza do defeito ósseo e utilizam as DPSCs associadas a outros componentes, e isto deve ser levado em conta em termos de comparação: células-tronco de dentes decíduos associadas com arcabouço de β -TCP em defeito mandibular de tamanho crítico em suínos (Zheng *et al.*, 2009); DPSCs associadas com pasta de HA/TCP em defeito em calvária de ratos (Asutay *et al.*, 2015); DPSCs com arcabouço de matriz extracelular em defeito crítico em calvária de ratos (Petridis *et al.*, 2015). Parece que as DPSCs possuem benefícios na regeneração de defeitos ósseos quando utilizadas em defeitos ósseos críticos, na qual a regeneração por si só está comprometida, e o uso de arcabouços guia este processo de

regeneração.

Na osteogênese dos maxilares, o mesênquima mandibular que dará origem ao corpo da mandíbula é derivado de células da crista neural (CN) (Noden, 1978) as quais se condensam e diferenciam-se em osteoblastos (Hall e Miyake, 1995; Helms e Schneider, 2003). Tomazelli e colaboradores (2015) demonstraram que marcadores de células de CN, Sox10 e HNK1, estão presentes durante esta osteogênese em osteoblastos (Tomazelli *et al.*, 2015). Da mesma forma, neste estudo, foi observada marcação para HNK1 e Sox10 em osteoblastos e osteócitos, havendo uma intensificação desta marcação ao longo do processo de regeneração, demonstrando a participação das células da crista neural. É provável que Sox10 esteja relacionado com a manutenção do estado indiferenciado de progenitores celulares com características da CN o que irá culminar com processo de diferenciação celular (Kim *et al.*, 2003; Sauka-Spengler e Bronner-Fraser, 2008; Kipanyula *et al.*, 2014). Já a marcação de HNK1 é demonstrada pela segunda vez estando presente após o processo migratório de diferenciação das células da CN, ratificando o achado anterior (Tomazelli *et al.*, 2015). Desta forma, percebe-se que há uma correlação entre o processo de osteogênese dos maxilares e o processo de regeneração de defeitos ósseos no que diz respeito às características das células que participam do processo de diferenciação.

Em geral, de acordo com este estudo, embora houvesse um grande aumento na formação óssea entre 7 e 14 dias com o uso de hDPCs, não há evidências de que o uso destas células isoladamente, sem o uso de arcabouços, melhore a formação óssea quando comparadas com o grupo controle durante o período analisado. HNK1 e o Sox10 estão presentes em osteoblastos e osteócitos em processo de regeneração demonstrando a provável participação das células da crista neural no processo de diferenciação celular, sem haver, entretanto, diferença entre o tratado e controle.

AGRADECIMENTOS

Este estudo foi fomentado por Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação/Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (MCTI/CNPq/Brasil / CNPq - 478217/2013-7; 404.662/2012-9; 456.928/2013-8); Bolsa de mestrado Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brasil) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Santa Catarina (FAPESC, Brasil). Agradecemos aos membros do LABITED (Laboratório de Bioengenharia dos Tecidos Dentários), LACERT (Laboratório de Células-Tronco e Regeneração Tecidual) e LAMEB (Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia) da Universidade Federal de Santa Catarina pelo suporte técnico e excelentes sugestões ao trabalho. Agradecemos o suporte técnico de Gilberto Domingos Marloch no corte histológico das amostras. Os autores declaram não haver conflito de interesses no que diz respeito à autoria e publicação deste artigo.

REFERÊNCIAS

ALHADLAQ, A.; MAO, J. J. Mesenchymal stem cells: isolation and therapeutics. **Stem Cells Dev**, v. 13, n. 4, p. 436-48, Aug 2004. ISSN 1547-3287. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15345137> >.

ASUTAY, F. et al. The effects of dental pulp stem cells on bone regeneration in rat calvarial defect model: micro-computed tomography and histomorphometric analysis. **Arch Oral Biol**, v. 60, n. 12, p. 1729-35, Dec 2015. ISSN 1879-1506. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26433189> >.

BIANCO, P. et al. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. **Stem Cells**, v. 19, n. 3, p. 180-92, 2001. ISSN 1066-5099. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11359943> >.

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> >.

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> >.

COURA, G. S. et al. Human periodontal ligament: a niche of neural crest stem cells. **J Periodontal Res**, v. 43, n. 5, p. 531-6, Oct 2008. ISSN 1600-0765 (Electronic). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18624954 >.

DE MENDONÇA COSTA, A. et al. Reconstruction of large cranial defects in nonimmunosuppressed experimental design with human dental pulp stem cells. **J Craniofac Surg**, v. 19, n. 1, p. 204-10, Jan 2008. ISSN 1049-2275. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18216690> >.

DEMARCO, F. F. et al. Dental pulp tissue engineering. **Braz Dent J**, v. 22, n. 1, p. 3-13, 2011. ISSN 1806-4760. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21519641> >.

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 2000. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11087820> >.

HALL, B. K.; MIYAKE, T. Divide, accumulate, differentiate: cell condensation in skeletal development revisited. **Int J Dev Biol**, v. 39, n. 6, p. 881-93, Dec 1995. ISSN 0214-6282. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8901191> >.

HANKS, C. T. et al. Cloned 3T6 cell line from CD-1 mouse fetal molar dental papillae. **Connect Tissue Res**, v. 37, n. 3-4, p. 233-49, 1998. ISSN 0300-8207. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9862224> >.

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> >.

HELMS, J. A.; SCHNEIDER, R. A. Cranial skeletal biology. **Nature**, v. 423, n. 6937, p. 326-31, May 2003. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12748650> >.

HOPPE, B. Fibrinogen and factor XIII at the intersection of coagulation, fibrinolysis and inflammation. **Thromb Haemost**, v. 112, n. 4, p. 649-58, Oct 2014. ISSN 0340-6245. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25182841> >.

HUOJIA, M. et al. Effect of Dental Pulp Stem Cells (DPSCs) in Repairing Rabbit Alveolar Bone Defect. **Clin Lab**, v. 61, n. 11, p. 1703-8, 2015. ISSN 1433-6510. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26731996> >.

JIANG, Y. et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. **Nature**, v. 418, n. 6893, p. 41-9, Jul 2002. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12077603> >.

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

KIM, J. et al. SOX10 maintains multipotency and inhibits neuronal differentiation of neural crest stem cells. **Neuron**, v. 38, n. 1, p. 17-31, Apr 2003. ISSN 0896-6273. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12691661> >.

KIPANYULA, M. J. et al. Signaling pathways bridging fate determination of neural crest cells to glial lineages in the developing peripheral nervous system. **Cell Signal**, v. 26, n. 4, p. 673-82, Apr 2014. ISSN 1873-3913. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24378534> >.

NODEN, D. M. The control of avian cephalic neural crest cytodifferentiation. I. Skeletal and connective tissues. **Dev Biol**, v. 67, n. 2, p. 296-312, Dec 1978. ISSN 0012-1606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/738529> >.

PAREKKADAN, B. et al. Mesenchymal stem cell-derived molecules reverse fulminant hepatic failure. **PLoS One**, v. 2, n. 9, p. e941, 2007. ISSN 1932-6203. Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17895982> >.

PETITE, H. et al. Tissue-engineered bone regeneration. **Nat Biotechnol**, v. 18, n. 9, p. 959-63, Sep 2000. ISSN 1087-0156. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10973216> >.

PETRIDIS, X. et al. Bone regeneration in critical-size calvarial defects using human dental pulp cells in an extracellular matrix-based scaffold. **J Craniomaxillofac Surg**, v. 43, n. 4, p. 483-90, May 2015. ISSN 1878-4119. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25753474> >.

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> >.

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> >.

PITTENGER, M. F. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v. 284, n. 5411, p. 143-7, Apr 1999. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10102814> >.

ROSA, V. et al. Tissue engineering: from research to dental clinics. **Dent Mater**, v. 28, n. 4, p. 341-8, Apr 2012. ISSN 1879-0097. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22240278> >.

RYAN, J. M. et al. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. **J Inflamm (Lond)**, v. 2, p. 8, Jul 2005. ISSN 1476-9255. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16045800> >.

SAUKA-SPENGLER, T.; BRONNER-FRASER, M. A gene regulatory network orchestrates neural crest formation. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 9, n. 7, p. 557-68, Jul 2008. ISSN 1471-0080. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18523435> >.

TOMAZELLI, K. B. et al. Temporo-spatial analysis of Osterix, HNK1 and Sox10 during odontogenesis and maxillaries osteogenesis. **Tissue Cell**, v. 47, n. 5, p. 465-70, Oct 2015. ISSN 1532-3072. Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26253417> >.

UENO, A. et al. MC3T3-E1-conditioned medium-induced mineralization by clonal rat dental pulp cells. **Matrix Biol**, v. 20, n. 5-6, p. 347-55, Sep 2001. ISSN 0945-053X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11566269> >.

UNDA, F. J. et al. Dissection of the odontoblast differentiation process in vitro by a combination of FGF1, FGF2, and TGFbeta1. **Dev Dyn**, v. 218, n. 3, p. 480-9, Jul 2000. ISSN 1058-8388. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10878613> >.

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 2010. ISSN 1937-335X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20067397> >.

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> >.

ZHOU, B. et al. Administering human adipose-derived mesenchymal stem cells to prevent and treat experimental arthritis. **Clin Immunol**, v. 141, n. 3, p. 328-37, Dec 2011. ISSN 1521-7035. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21944669> >.

ZIMMERMANN, M. et al. Bone-Conditioned Medium Changes Gene Expression in Bone-Derived Fibroblasts. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 30, n. 4, p. 953-8, 2015 Jul-Aug 2015. ISSN 1942-4434. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26252049> >.

METODOLOGIA EXPANDIDA

4.1 DELINEAMENTO DE ESTUDO

O estudo proposto é do tipo experimental.

4.2 ASPECTOS LEGAIS E ÉTICOS

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 A) e pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), sob o protocolo PP0848 (Ofício nº 114/CEUA/PROPESQ/2013) (Anexo B).

4.3 COLETA E CULTURA DAS hDPCs

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

Para a coleta da polpa dental, foi realizado um sulco transversal sobre o limite amelocementário com uma broca tronco-cônica número 3080, em alta rotação, sob refrigeração, aprofundando todo o diâmetro da broca. Com uma espátula lecron, pressionou-se o sulco realizado para seccionar o dente. Uma cureta periodontal foi utilizada para coletar a polpa dental que, em seguida, foi armazenada em um tubo de 30 mL contendo meio alfa (α) modificado de Dulbecco (α -MEM) com 20% de soro fetal bovino (SFB).

Após o isolamento, as células foram cultivadas e foram realizados testes para confirmar o fenótipo mesenquimal: análise morfológica em microscopia de contraste; teste de citometria de fluxo para os marcadores de células-tronco mesenquimais CD105, CD90 e CD73 e células tronco hematopoiéticas CD45; e uso de meios indutivos de diferenciação para os fenótipos adipocíticos, osteocítico e condrocítico, seguido de coloração celular.

Todo o procedimento de cultura e análise das células foi realizado no Laboratório de Células-Tronco e Regeneração Tecidual (LACERT), sob responsabilidade da Professora Dra. Andréa Gonçalves Trentin, e os experimentos foram realizados pela aluna de mestrado do curso de Pós-graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, Priscilla Barros Delben, colaboradores deste projeto de pesquisa.

4.4 CONFECÇÃO DO DEFEITO ÓSSEO MANDIBULAR E TRANSPLANTE DAS hDPCs

Foram utilizados 9 ratos Wistar, com 2 meses de idade, de aproximadamente 250 gramas. Os animais foram submetidos à anestesia geral através da injeção peritoneal de cloridrato de ketamina 5% e xilazina 2% (0,3ml/100g). Após a estabilização do animal na mesa, realizou-se a antisepsia extra e intrabucal com álcool iodado. Para a confecção do defeito ósseo, uma incisão foi realizada com uma lâmina de bisturi número 15 (Lamedid, SP, Br) em mucosa alveolar abaixo da coroa do primeiro molar inferior e, em seguida, se procedeu à divulsão dos tecidos moles e do periósteo. Uma broca esférica de 1mm de diâmetro, em baixa rotação, sob irrigação de soro fisiológico, foi utilizada para realizar o defeito ósseo abaixo da coroa do primeiro molar inferior, atingindo dimensões finais de: 1mm de altura e profundidade e 3mm de comprimento. O tamanho do defeito ósseo foi verificado em um estereomicroscópio cirúrgico nos aumentos de 8 a 20 vezes, tendo como referência a broca utilizada.

No lado direito, foi aplicado as hDPCs (1.5×10^5 células) com uma pipeta em um volume de 100 μ L, seguida de sutura (grupo tratado). O lado esquerdo não recebeu células sendo realizada a sutura após a realização do defeito ósseo (grupo controle).

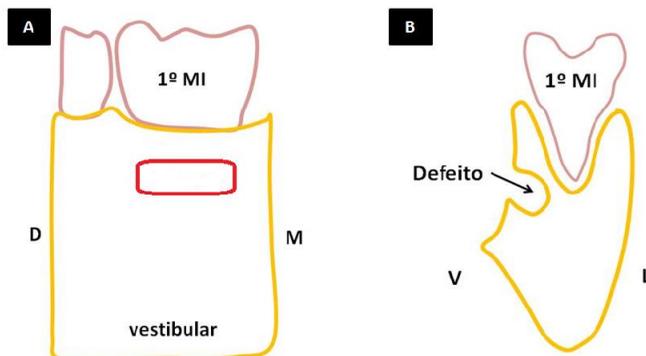


Figura 7. Ilustração da posição e dimensões do defeito ósseo confeccionado. (A) Vista vestibular do defeito ósseo confeccionado, representado pela linha vermelha. (B) Vista vestibúlo-lingual do defeito ósseo confeccionado, indicado pela seta.

4.5 ANÁLISE DE MTS DAS hDPCs REMANESCENTES DO PROTOCOLO CIRÚRGICO

Após o transplante das hDPCs no defeito ósseo, as células remanescentes (aproximadamente $0,3 \times 10^5$ células) foram mantidas em um tubo de 30mL contendo α -MEM e transportadas ao laboratório para a avaliação quantitativa da viabilidade celular através do método colorimétrico utilizando o corante MTS (do inglês: *3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfonil)-2H-tetrazolium*).

Para tanto, as células foram semeadas em placas de cultura de 24 poços contendo α -MEM, 10% SFB e PBS. Após 24 horas, as células foram incubadas com MTS por 3 horas e o sobrenadante foi lido em espectrofotômetro para avaliar a absorbância que indica o grau de viabilidade celular. Este procedimento foi realizado em 24, 48 e 72 horas. Como grupo controle, utilizou-se hDPCs que não foram submetidas ao protocolo de cirurgia.

Além disso, foi realizado ensaio de diferenciação osteogênica das células remanescentes, conforme citado anteriormente.

4.6 COLETA, PROCESSAMENTO E ANÁLISE DAS AMOSTRAS

Os animais foram separados em três grupos de observação: 7, 14 e 28 dias de pós-operatório, com 3 animais cada grupo. Para a eutanásia, os animais receberam sobre-dosagem anestésica. As hemimandíbulas direita e esquerda foram coletadas, o tecido mole adjacente preservado e a peça cirúrgica fixada em formol 10% por 24 horas. As amostras foram desmineralizadas em 4,13% EDTA por 110 dias, sob agitação e com trocas da solução a cada 3 dias. Em seguida, realizou-se o processamento para inclusão em parafina e cortes semi-seriados de 3 μ m foram coletados seguidos de coloração com hematoxilina e eosina (Synth, SP, Brasil).

Os cortes foram observados utilizando o microscópio Olympus® Bx41 (Olympus, SP, Brasil) e as imagens foram capturadas com a câmera 3.3 megapixel e o *software* Q-capture Pro 5.1 (Q-imaging, BC, Canada). Os defeitos ósseos foram analisados e descritos em relação à área de regeneração.

Para a contagem da área óssea neoformada, foi realizada a coloração com Hematoxilina e Eosina de três lâminas equidistantes, levando em consideração o comprimento do primeiro molar inferior como padrão para o comprimento do defeito ósseo. As lâminas tiveram sua identificação mascarada para a análise. Após a obtenção das fotomicrografias foi realizada a análise da área do defeito ósseo e a contagem da área óssea neoformada com o *software* ImageJ (Wayne Rasband, National Institute of Health, USA). Esta medida foi realizada três vezes em diferentes períodos, e a média final foi calculada para cada grupo.

4.7 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA ANTI-HNK1 E Sox10

Para a análise dos marcadores anti-HNK1 e anti-Sox10, foram utilizados cortes histológicos derivados da coleta e processamento para análise da área óssea neoformada. Para tanto, foram selecionados cortes que contemplassem a área do defeito ósseo nos tempos de 7, 14 e 28 dias.

Os anticorpos primários utilizados foram: anticorpo monoclonal anti-HNK1 (obtido do Developmental Studies Hybridoma

Bank; Universidade de Iowa, Iowa, EUA), um marcador de membrana; e o anticorpo policlonal anti-Sox10 (Chemicon -Temecula, CA, USA), de marcação nuclear. Cortes histológicos com 3µm de espessura foram estendidos em lâminas preparadas com poly-L-lisine (Sigma, MO, USA) e após a desparafinização foram tratados com solução de 6% H₂O₂/metanol durante 30 minutos para o bloqueio da peroxidase endógena, seguido de tampão fosfato salino (PBS), pH 7,4, e água destilada durante 5 minutos cada. A recuperação antigênica foi realizada com solução de tripsina/EDTA 0,002% durante 10 minutos. O bloqueio dos sítios de ligações não específicas foi realizado ao longo de 40 minutos com leite desnatado 5%. A incubação com dos anticorpos primários (HNK1 sem diluição; Sox10 diluído 1: 150 em PBS) foi realizada durante 18 horas a 4°C em câmara úmida. Após lavagem em PBS foi utilizado o kit EnVision (Dako, Corporation, Carpinteria, CA, EUA) com anticorpo secundário sem diluição, o qual foi incubado durante 60 minutos. A revelação da reação foi obtida usando DAB (DAB + Substrato Cromógena System®, DAKO North America Inc., Carpinteria, EUA) como substrato. As amostras foram desidratadas em sequências crescentes de álcool etílico e montadas em Entellan (Merck, Darmstadt, GER). Os controles negativos foram incubados na ausência de anticorpo primário. Para o controle positivo, foram utilizadas lâminas de cabeça de ratos neonatos.

A fim de avaliar a intensidade da imunomarcagem de HNK1 e Sox10, a intensidade da coloração foi categorizada como: sem marcação, leve, moderada ou intensa de acordo com a permeação da substância cromógena. As lâminas foram observadas em microscópio Olympus® BX41, e as imagens foram capturadas com uma câmera de 3.3 Mpixel (Q-imaging) e captura Q Pro software 5.1 (Q-imaging). Os dados foram elaborados com o Adobe Photoshop®.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para o teste de viabilidade celular, realizou-se a estatística com o teste T, não pareado, $p < 0,05$, com pós-teste Mann-Whitney U.

Em relação à quantificação da área óssea neoformada, foi realizada a estatística entre os grupos analisados, controle e tratado, nos grupos de 7, 14 e 28 dias de pós-operatório. Primeiramente, foi realizado o teste de normalidade Shapiro-Wilk. Em seguida, realizou-se o teste T

Pareado para comparar o resultados entre o grupo controle e tratado. Por fim, realizou-se o teste ANOVA, para verificar os resultados obtidos ao longo do tempo de observação (28 dias) dentro de cada grupo (controle e tratado). Para tanto, utilizou-se o software GraphPad versão 5.03. Os resultados foram expressos como média da porcentagem da área regenerada nos defeitos ósseos \pm desvio-padrão da média (DPM). Nível de significância de $p < 0.05$ foi aceito.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- As células da polpa dental humana apresentaram características de células-tronco mesenquimais: aderência ao plástico; morfologia fibroblastóide; expressaram marcadores de células-tronco mesenquimais CD73 (99.8%), CD90 (99.7%), CD105 (99.0%) e ausência de expressão de CD45; em meio indutivo apresentaram capacidade de diferenciação para osteoblastos, adipócitos e condroblastos.

- Dentro dos padrões deste estudo, pode-se concluir que embora houve um grande aumento na formação óssea entre 7 e 14 dias com o uso de hDPCs, não há evidências de que o uso destas células melhore a formação óssea quando comparadas com o grupo controle durante o período analisado. Além disso, HNK1 e o Sox10 estão presentes em osteoblastos e osteócitos em processo de regeneração demonstrando a provável participação das células da crista neural no processo de diferenciação celular, sem haver, entretanto, diferença entre o tratado e controle.

- Uma das limitações deste trabalho foi a impossibilidade de rastrear as hDPCs durante o processo de regeneração, o que permitiria melhor compreensão dos resultados. Para tanto, sugere-se em pesquisas futuras a realização de testes, como o PCR em tempo real, para se obter tal resultado.

- Apesar das limitações, essa pesquisa permitiu conhecer melhor o potencial de regeneração óssea das hDPCs, uma vez que foram utilizadas sem o uso de arcabouço.

REFERÊNCIAS

ALHADLAQ, A.; MAO, J. J. Mesenchymal stem cells: isolation and therapeutics. **Stem Cells Dev**, v. 13, n. 4, p. 436-48, Aug 2004. ISSN 1547-3287. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15345137> >.

ASUTAY, F. et al. The effects of dental pulp stem cells on bone regeneration in rat calvarial defect model: micro-computed tomography and histomorphometric analysis. **Arch Oral Biol**, v. 60, n. 12, p. 1729-35, Dec 2015. ISSN 1879-1506. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26433189> >.

BIANCO, P. et al. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. **Stem Cells**, v. 19, n. 3, p. 180-92, 2001. ISSN 1066-5099. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11359943> >.

BIANCO, P.; ROBEY, P. G. Stem cells in tissue engineering. **Nature**, v. 414, n. 6859, p. 118-21, Nov 2001. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11689957> >.

BRONNER-FRASER, M. Analysis of the early stages of trunk neural crest migration in avian embryos using monoclonal antibody HNK-1. **Dev Biol**, v. 115, n. 1, p. 44-55, May 1986. ISSN 0012-1606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3516760> >.

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> >.

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> >.

COURA, G. S. et al. Human periodontal ligament: a niche of neural crest stem cells. **J Periodontal Res**, v. 43, n. 5, p. 531-6, Oct 2008. ISSN 1600-0765 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed> >.

&dopt=Citation&list_uids=18624954 >.

CREUZET, S.; COULY, G.; LE DOUARIN, N. M. Patterning the neural crest derivatives during development of the vertebrate head: insights from avian studies. **J Anat**, v. 207, n. 5, p. 447-59, Nov 2005. ISSN 0021-8782. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16313387> >.

CROWLEY, P.; CHALMERS, I.; KEIRSE, M. J. The effects of corticosteroid administration before preterm delivery: an overview of the evidence from controlled trials. **Br J Obstet Gynaecol**, v. 97, n. 1, p. 11-25, Jan 1990. ISSN 0306-5456. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2137711> >.

DE MENDONÇA COSTA, A. et al. Reconstruction of large cranial defects in nonimmunosuppressed experimental design with human dental pulp stem cells. **J Craniofac Surg**, v. 19, n. 1, p. 204-10, Jan 2008. ISSN 1049-2275. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18216690> >.

DEMARCO, F. F. et al. Dental pulp tissue engineering. **Braz Dent J**, v. 22, n. 1, p. 3-13, 2011. ISSN 1806-4760. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21519641> >.

DUARTE, B. D. P. **Avaliação do potencial ectomesenquimal das células da polpa dentária**. 2013. 66 Universidade Federal de Santa Catarina

DUPIN, E. et al. Neural crest progenitors and stem cells. **C R Biol**, v. 330, n. 6-7, p. 521-9, 2007 Jun-Jul 2007. ISSN 1631-0691. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17631447> >.

DUTTON, K. A. et al. Zebrafish colourless encodes sox10 and specifies non-ectomesenchymal neural crest fates. **Development**, v. 128, n. 21, p. 4113-25, Nov 2001. ISSN 0950-1991. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11684650> >.

ETCHEVERS, H. C. et al. The cephalic neural crest provides pericytes and smooth muscle cells to all blood vessels of the face and forebrain. **Development**, v. 128, n. 7, p. 1059-68, Apr 2001. ISSN 0950-1991. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11245571> >.

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 2000. ISSN 0027-8424. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11087820> >.

HALL, B. K.; MIYAKE, T. Divide, accumulate, differentiate: cell condensation in skeletal development revisited. **Int J Dev Biol**, v. 39, n. 6, p. 881-93, Dec 1995. ISSN 0214-6282. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8901191> >.

HANKS, C. T. et al. Cloned 3T6 cell line from CD-1 mouse fetal molar dental papillae. **Connect Tissue Res**, v. 37, n. 3-4, p. 233-49, 1998. ISSN 0300-8207. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9862224> >.

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> >.

HELMS, J. A.; SCHNEIDER, R. A. Cranial skeletal biology. **Nature**, v. 423, n. 6937, p. 326-31, May 2003. ISSN 0028-0836. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12748650> >.

HOPPE, B. Fibrinogen and factor XIII at the intersection of coagulation, fibrinolysis and inflammation. **Thromb Haemost**, v. 112, n. 4, p. 649-58, Oct 2014. ISSN 0340-6245. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25182841> >.

HUOJIA, M. et al. Effect of Dental Pulp Stem Cells (DPSCs) in Repairing Rabbit Alveolar Bone Defect. **Clin Lab**, v. 61, n. 11, p. 1703-8, 2015. ISSN 1433-6510. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26731996> >.

JIANG, Y. et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. **Nature**, v. 418, n. 6893, p. 41-9, Jul 2002. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12077603> >.

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

KIM, J. et al. SOX10 maintains multipotency and inhibits neuronal differentiation of neural crest stem cells. **Neuron**, v. 38, n. 1, p. 17-31, Apr 2003. ISSN 0896-6273. Disponível em: <

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12691661> >.

KIPANYULA, M. J. et al. Signaling pathways bridging fate determination of neural crest cells to glial lineages in the developing peripheral nervous system. **Cell Signal**, v. 26, n. 4, p. 673-82, Apr 2014. ISSN 1873-3913. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24378534> >.

LE DOUARIN, N. M. **The Neural Crest**. KALCHEIM, C. Cambridge: Cambridge University Press: p.34-35 p. 1999.

LE DOUARIN, N. M. et al. Neural crest cell plasticity and its limits. **Development**, v. 131, n. 19, p. 4637-50, Oct 2004. ISSN 0950-1991. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15358668> >.

LE LIÈVRE, C. S.; LE DOUARIN, N. M. Mesenchymal derivatives of the neural crest: analysis of chimaeric quail and chick embryos. **J Embryol Exp Morphol**, v. 34, n. 1, p. 125-54, Aug 1975. ISSN 0022-0752. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1185098> >.

LUIDER, T. M. et al. Characterization of HNK-1 antigens during the formation of the avian enteric nervous system. **Development**, v. 115, n. 2, p. 561-72, Jun 1992. ISSN 0950-1991. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1385063> >.

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: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20476887> >.

NODEN, D. M. The control of avian cephalic neural crest cytodifferentiation. I. Skeletal and connective tissues. **Dev Biol**, v. 67, n. 2, p. 296-312, Dec 1978. ISSN 0012-1606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/738529> >.

NORDLANDER, R. H. Cellular and subcellular distribution of HNK-1 immunoreactivity in the neural tube of *Xenopus*. **J Comp Neurol**, v. 335, n. 4, p. 538-51, Sep 1993. ISSN 0021-9967. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7693773> >.

PAREKKADAN, B. et al. Mesenchymal stem cell-derived molecules reverse fulminant hepatic failure. **PLoS One**, v. 2, n. 9, p. e941, 2007. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17895982> >.

PETITE, H. et al. Tissue-engineered bone regeneration. **Nat Biotechnol**, v. 18, n. 9, p. 959-63, Sep 2000. ISSN 1087-0156. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10973216> >.

PETRIDIS, X. et al. Bone regeneration in critical-size calvarial defects using human dental pulp cells in an extracellular matrix-based scaffold. **J Craniomaxillofac Surg**, v. 43, n. 4, p. 483-90, May 2015. ISSN 1878-4119. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25753474> >.

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> >.

PITTENGER, M. F. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v. 284, n. 5411, p. 143-7, Apr 1999. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10102814> >.

POLLI, V. A. B. **Avaliação da polpa dentária como nicho de células tronco/progenitoras derivadas da crista neural**: Universidade Federal de Santa Catarina: 60 p. 2011.

ROSA, V. et al. Tissue engineering: from research to dental clinics. **Dent Mater**, v. 28, n. 4, p. 341-8, Apr 2012. ISSN 1879-0097. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22240278> >.

RYAN, J. M. et al. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. **J Inflamm (Lond)**, v. 2, p. 8, Jul 2005. ISSN 1476-9255. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16045800> >.

SAUKA-SPENGLER, T.; BRONNER-FRASER, M. A gene regulatory network orchestrates neural crest formation. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 9, n. 7, p. 557-68, Jul 2008. ISSN 1471-0080. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18523435> >.

SCHMITZ, J. P.; HOLLINGER, J. O. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. **Clin Orthop Relat Res**, n. 205, p. 299-308, Apr 1986. ISSN 0009-921X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3084153> >.

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: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23946728> >.

STUEPP, R. T. **Utilização de células tronco da polpa de dentes permanentes humanos (DPSCs) na regeneração de defeitos ósseos mandibulares**. 2014. 80 (Graduação). Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina

TOMAZELLI, K. B. et al. Temporo-spatial analysis of Osterix, HNK1 and Sox10 during odontogenesis and maxillaries osteogenesis. **Tissue Cell**, v. 47, n. 5, p. 465-70, Oct 2015. ISSN 1532-3072. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26253417> >.

UENO, A. et al. MC3T3-E1-conditioned medium-induced mineralization by clonal rat dental pulp cells. **Matrix Biol**, v. 20, n. 5-6, p. 347-55, Sep 2001. ISSN 0945-053X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11566269> >.

UNDA, F. J. et al. Dissection of the odontoblast differentiation process in vitro by a combination of FGF1, FGF2, and TGFbeta1. **Dev Dyn**, v. 218, n. 3, p. 480-9, Jul 2000. ISSN 1058-8388. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10878613> >.

VERRIER, S. et al. Tissue engineering and regenerative approaches to improving the healing of large bone defects. **Eur Cell Mater**, v. 32, p. 87-110, Jul 2016. ISSN 1473-2262. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27434267> >.

VINCENT, M.; THIERY, J. P. A cell surface marker for neural crest and placodal cells: further evolution in peripheral and central nervous system. **Dev Biol**, v. 103, n. 2, p. 468-81, Jun 1984. ISSN 0012-1606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6202575> >.

WAGERS, A. J.; WEISSMAN, I. L. Plasticity of adult stem cells. **Cell**, v. 116, n. 5, p. 639-48, Mar 2004. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15006347> >.

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 2010. 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: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22536240> >.

ZANG, S. et al. Periodontal Wound Healing by Transplantation of Jaw Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in Chitosan/Anorganic Bovine Bone Carrier Into One-Wall Infrabony Defects in Beagles. **J Periodontol**, v. 87, n. 8, p. 971-81, Aug 2016. ISSN 1943-3670. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27153292> >.

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> >.

ZHOU, B. et al. Administering human adipose-derived mesenchymal stem cells to prevent and treat experimental arthritis. **Clin Immunol**, v. 141, n. 3, p. 328-37, Dec 2011. ISSN 1521-7035. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21944669> >.

ZIMMERMANN, M. et al. Bone-Conditioned Medium Changes Gene Expression in Bone-Derived Fibroblasts. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 30, n. 4, p. 953-8, 2015 Jul-Aug 2015. ISSN 1942-4434. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26252049> >.

APÊNDICES

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 reconstrução 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 _____.

ANEXOS

ANEXO A – Parecer Consubstanciado do CEPESH

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: 16932913.8.0000.0121

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, têmporo-especialmente, 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 doa 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:** 88.040-900
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-9206 **Fax:** (48)3721-9696 **E-mail:** cep@reitoria.ufsc.br

Continuação do Parecer: 424.009

que serão utilizados para a coleta das amostras terceiros molares com indicação para extração".

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

os pesquisadores realizaram as adequações solicitadas no parecer anterior e enviaram a carta de respostas às pendências.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Reajustado o TCLE conforme solicitação.

Recomendações:

não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

FLORIANOPOLIS, 14 de Outubro de 2013

Assinador por:

Washington Portela de Souza
(Coordenador)

Endereço: Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima

Bairro: Trindade

CEP: 88.040-900

UF: SC

Município: FLORIANOPOLIS

Telefone: (48)3721-9206

Fax: (48)3721-9696

E-mail: cep@reitoria.ufsc.br

ANEXO B – Aprovação do CEUA

Resultado de Solicitação de Protocolo

Protocolo
PRO048
Título
MÉTODOS UTILIZADAS PELO GRUPO DE PESQUISA HISTOPATOLOGIA DA REGENERAÇÃO TECIDUAL
Data de Entrada
 19/04/2013

Resultado:
 Aprovado
Data / Prazo
 01/11/2013

Considerações

Ofício nº 114/CEUA/PROPESQ/2013

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

Ao(à): 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/PROPESQ/2013

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

Ao(à): 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 (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)
 Data 12/09/2017

Data 09/11/2013

Parecer(es):



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