

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
CENTRO INTEGRADO DE SAÚDE-FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PPG - MESTRADO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA

Jairo Barros Weiss

Análise comparativa da eficiência na obtenção de células-tronco da polpa dentária humana por meio de instrumentação manual e rotatória.

Juiz de Fora
2016

JAIRO BARROS WEISS

Análise comparativa da eficiência na obtenção de células-tronco da polpa dentária humana por meio de instrumentação manual e rotatória.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós - graduação em Clínica Odontológica, da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre. Área de concentração: Clínica Odontológica

Orientador: Prof. Dr. Antônio Márcio Resende do Carmo

Juiz de Fora

2016

WEISS, J. B. Análise comparativa da eficiência na obtenção de células-tronco da polpa dentária humana por meio de instrumentação manual e rotatória. Juiz de Fora (MG), 2016. 88f..
Apresentação de Dissertação (Curso de Pós-Graduação stricto sensu – Mestrado em Clínica Odontológica) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Juiz de Fora (MG).

Jairo Barros Weiss

Análise comparativa da eficiência na obtenção de células-tronco da polpa dentária humana por meio de instrumentação manual e rotatória.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós - graduação em Clínica Odontológica, da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre. Área de concentração: Clínica Odontológica

Aprovada em ___ de ____ de 20__.

BANCA EXAMINADORA

Professor. Dr. Antônio Márcio Resende do Carmo
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Carlos Magno da Costa Maranduba
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Leandro Marques de Resende
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Mateus Rodrigues Pereira
Centro Universitário Estácio de Sá Juiz de Fora

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Jayro e Luciléa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a conquista deste grande objetivo, dentre os quais destaco:

Meu orientador, Prof. Dr. Antônio Márcio Resende do Carmo, grande incentivador e promotor deste estudo.

Professor Prof. Dr. Leandro Marques de Resende, pelos conselhos e ensinamentos.

Prof. Dr. Carlos Magno da Costa Maranduba, que me abriu os olhos para um universo chamado célula-tronco.

Aos professores Celso Neiva Campos, Ana Maria Pereira Leite e Vagner Medeiros pela convivência nas clínicas de endodontia.

Aos demais professores do PPGCO e da Faculdade de Odontologia, meus sinceros agradecimentos pelos ensinamentos.

À Pós Doutora Fernanda Gonçalves, pela grande dedicação e apoio no desenvolvimento desse trabalho.

À Professora Dr. Beatriz Julião Vieira Aarestrup, muito obrigado pela leitura dos cortes histológicos.

À minha irmã Denise Barros Weiss, pela revisão geral do texto e grande apoio. Da mesma forma, agradeço minha irmã Katia e a meus irmãos Marcelo e Márcio, que tanto me estimularam a continuar esse trabalho.

Aos colegas do Mestrado em Clínica Odontológica da UFJF; Dayanne, Érika, Melissa, Patrícia e Otávio. Foi fundamental a ajuda de vocês. Assim como Gustavo Torres. Obrigado pelo apoio!

Fernanda Rezende, obrigado por manter a ordem e a paz no Biobanco.

Wanessa, Leticia, Sr. Silvério. ... Obrigado pelas gentilezas.

Aos demais professores e funcionários da F.O. registro aqui meu agradecimento.

WEISS, J. B. Análise comparativa da eficiência na obtenção de células-tronco da polpa dentária humana por meio de instrumentação manual e rotatória.

Juiz de Fora (MG), 2016. 88f. Apresentação de Dissertação (Curso de Pós-Graduação stricto sensu – Mestrado em Clínica Odontológica) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Juiz de Fora (MG).

RESUMO

A polpa dentária é considerada uma fonte de células-tronco mesênquimais adultas, e o interesse na obtenção da polpa dentária e na sua estocagem aumentou substancialmente nos últimos anos. As variações na forma de obtenção da polpa mudam drasticamente a característica final do material removido, sendo que manualmente a polpa é obtida em partes maiores, mais estruturada. Já na forma mecanizada, se obtém um material macerado, semi-triturado. A remoção do tecido pulpar por via endodôntica caracteriza uma forma pouco conhecida de se coletar este importante tecido sem a necessidade de extração dentária. Em face das possibilidades de variação na técnica, foi observada a necessidade da elaboração de um estudo para elucidar as variações na coleta dos tecidos pulpares. Trinta polpas dentárias foram colhidas e divididas em dois grupos, sendo quinze polpas removidas por instrumentação mecanizada e outras quinze por instrumentação manual. Após Isolar células-tronco da polpa dentária de dentes permanentes humanos, estas foram caracterizadas quanto à sua viabilidade celular e plasticidade: diferenciação osteogênica e adipogênica. Através da análise dos resultados obtidos observou-se que a técnica de remoção manual da polpa permitiu o estabelecimento de cultura de células-tronco derivadas de polpa dentária de dentes permanentes humanos em 53% das amostras. Não se estabeleceu cultura de células-tronco derivadas de polpa dentária de dentes permanentes humanos, a partir de nenhuma das amostras obtidas pela instrumentação rotatória.

Palavras-chave: Células-Tronco; Tratamento do Canal Radicular; Polpa Dentária.

WEISS, J. B. **Análise comparativa da eficiência na obtenção de células-tronco da polpa dentária humana por meio de instrumentação manual e rotatória.** Juiz de Fora (MG), 2016. 88f. Apresentação de Dissertação (Curso de Pós-Graduação stricto sensu – Mestrado em Clínica Odontológica) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Juiz de Fora (MG).

ABSTRACT

The dental pulp is considered a source of adult mesenchymal stem cells, and the interest in obtaining the dental pulp and its storage has increased substantially in recent years. Variations in the way of obtaining the pulp drastically change the final characteristic of the material removed, and the pulp is obtained manually in larger parts, more structured. In the mechanized mode, obtaining a macerated material, semi-milled. The removal of the pulp tissue via endodontic features a little known form of collecting this important tissue without the need for tooth extraction. Given the range of possibilities in technique, we observed the need to prepare a study to elucidate the changes in the collection of pulp tissues. Thirty dental pulps were collected and divided into two groups, fifteen pulps removed by mechanical instrumentation and fifteen other for manual instrumentation. After isolate stem cells from human dental pulp of permanent teeth, they were characterized as to their cell viability and plasticity: osteogenic differentiation and adipogenic. Through analysis of the results was observed that manual removal technique allowed pulp stem cell culture property derived from human dental pulp of permanent teeth in 53% of samples. Any stem cell culture was established from human dental pulp of samples obtained by rotary instrumentation.

Keywords: *Stem Cells ; Root Canal Therapy ; Dental Pulp.*

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA Análise de variância variada

BM-MSC células-tronco mesenquimais da medula óssea

BMSC células-tronco mesenquimais da medula óssea

CD- Cluster of differentiation- Marcador de tipificação celular

CD29 Marcador de tipificação celular Mesenquimal

CD31 Marcador de tipificação celular Hematopoiético

CD34 Marcador de tipificação celular Hematopoiético

CD45 Marcador de tipificação celular Hematopoiético

CD73 Marcador de tipificação celular Mesenquimal

CD90 Marcador de tipificação celular Mesenquimal

CD105 Marcador de tipificação celular Mesenquimal

CD146 Marcador de tipificação celular Mesenquimal

CD166 Marcador de tipificação celular Mesenquimal

cDNA Ácido desoxirribonucléico complementar

CFU unidades formadoras de colônia

cm² centímetro quadrado

CO₂ gás carbônico

CSF fator de célula-tronco

CTM Célula-tronco mesenquimal

DMEM meio de Eagle modificado por Dulbecco

DPSC células-tronco humanas de polpa dental

EDTA ácido etilenodiaminotetracético

EGF fator de crescimento epidermal

EGF fator de crescimento epiderme

ESCs Células tronco embrionárias

F12 – tipo de meio de cultura

G-CSF Fator de estimulação de colônias de granulócitos.

GFAP Proteína glial fibrilar ácida

hNDPs-SCs células-tronco derivadas de polpa de dente natal humano

IDPSC células-tronco humana imaturas de polpa de dente decíduos

iPSC células-tronco pluripotentes induzidas
ITS Suplemento para meio de cultura contendo insulina e transferrina
KLF4 marcador embrionário.
M Molar
MEC matriz extracelular
MEM meio de cultura celular tipo Eagle
mg/mL miligrama por mililitro
mL Mililitro
mM Milimolar
mmol/L milimol por litro
MPS célula progenitora mesenquimal
MTT Brometo 3 (4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium
MW Peso molecular (do inglês molecular weight)
Nanog marcador de célula mesenquimal
NCm Newton por centímetro
ng Nanograma
nM Nanomolar
°C graus Celsius
P43 Quadragésima terceira amostra colhida – Amostra representativa analisada
P68 Sexagésima oitava amostra colhida - Amostra representativa analisada
P73 Septuagésima terceira amostra colhida – Amostra representativa analisada
PBS solução fosfatada tamponada
PDT tempo de duplicação da população celular
PHA – Fitohemaglutinina é um estimulador de linfócitos T
RANKL ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa β
RNA ácido ribonucléico
RT-PCR reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa
SFB soro fetal bovino
SH2, SH3 e SH4 - antígenos
SHED célula-tronco humana de polpa de dente decíduo exfoliado
STRO-1 marcador de célula-tronco
TGF β 1 fator de crescimento transformador beta 1
TNF α Fator de necrose tumoral α
 μ g/ μ mol Micrograma por micromol

$\mu\text{g/mL}$ micrograma por mililitro

μL Microlitro

μM Micromolar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
3 PROPOSIÇÃO	42
4 MATERIAL E MÉTODOS	44
4.1 Ensaio de MTT	48
4.2 Diferenciação celular	48
4.3 Citometria de Fluxo	49
4.4 Caracterização histológica	50
5 RESULTADOS	52
6. DISCUSSÃO	65
6.1 Discussão dos resultados	66
6.2 Discussão da Metodologia	69
7. CONCLUSÕES	75
REFERÊNCIAS	77
ANEXO	83
Apêndice 1	86
Apendice 2	85
Apêndice 3	88

As células-tronco são classificadas, quanto à sua origem, em embrionárias ou adultas. As células-tronco embrionárias são aquelas extraídas da massa celular interna do blastocisto e são capazes de dar origem aos três folhetos germinativos: endoderma, mesoderma e ectoderma. As células-tronco adultas são as que residem em todos os tecidos já formados, onde mantêm a homeostase e respondem aos estímulos nocivos, conforme relatou Chien (2014). Nesse estudo, abordaremos especificamente as células-tronco adultas, as quais diferem das demais células do organismo por serem indiferenciadas e não especializadas, além de se multiplicarem e se manterem indiferenciadas. Quando estimuladas, podem se diferenciar gerando células especializadas. Por conta disso, são interessantes para uso terapêutico (DA SILVA MEIRELLE et al., 2009).

Células-tronco são uma promissora alternativa para o tratamento de diversas enfermidades, dentre as quais podem-se destacar o uso os cânceres, as doenças autoimunes e as doenças degenerativas, além do uso na reparação óssea (PIERDOMENICO et al., 2005; VASANDAN et al., 2014; CHAN et al., 2014). Elas terão ainda um impacto na medicina regenerativa pelo fato de não causarem rejeição ao serem transplantadas (PIERDOMENICO et al., 2005; SILVA FDE et al., 2014). Além disso, a engenharia tecidual é outro campo promissor e que se baseia na tríade *scaffold*, moléculas sinalizadoras e células. Pelas suas características, as células-tronco adultas são cruciais para o desenvolvimento dessa engenharia tecidual. Células-tronco mesenquimais (do inglês, *Mesenchymal Stem Cells* - MSCs) foram originalmente identificadas por Alexander Friedenstein como unidades formadoras de Colônia de fibroblastos (CFU-F) e células-tronco osteogênicas. No entanto, um grande número de termos tem sido usado para descrever células-tronco mesenquimais incluindo a expressão "células-tronco do estroma," que foi proposta em 1988 por Maureen Owen e colaboradores para indicar que as células residem no estroma ao invés do compartimento hematopoiético. Ao invés de destacar a origem compartimental das células, Arnold Caplan propôs o termo "células-tronco mesenquimais" em 1991 para enfatizar a propriedade de auto-renovação e potencial de diferenciação das células. Mais recentemente, em 2010, Arnold Caplan sugeriu que a sigla MSC permanecesse, mas com outro significado: "células medicinais de sinalização" para refletir que o principal benefício terapêutico do MSCs pode ser atribuído à secreção de moléculas bioativas, indo além do conhecido potencial de regeneração de tecidos (CAPLAN, 2013).

Os tecidos dentais têm sido estudados como fontes potenciais de células-tronco adultas. Dentre esses tecidos, temos a polpa dental, que é um tecido conjuntivo frouxo, derivado de componentes ectodérmicos (SUN et al, 2014). A polpa contém uma população heterogênea de células. Dentre elas, estão fibroblastos, células inflamatórias e do sistema imune, nervos, vasos, e células perivasculares. Este tecido fica localizado no interior da dentina e do esmalte, e contém uma população de células-tronco que pode recuperar a dentina e a polpa quando danificadas. É um tecido conjuntivo com capacidade de reagir às agressões dentárias com formação de dentina reparadora por formação de novos odontoblastos (JESUS et al., 2011).

Durante o desenvolvimento embrionário, a polpa dental é um tecido que alguns autores têm descrito como "ectomesenquimal" porque ele é derivado de células ectodérmicas que crescem na periferia do tubo neural, migram para a região oral e então se diferenciam em células de fenótipo mesenquimal. Células epiteliais dão origem ao esmalte formando ameloblastos e as MSCs dão origem aos odontoblastos da polpa e do ligamento periodontal. (LEDESMA-MARTINEZ; MENDOZA-NUNEZ; SANTIAGO-OSORIO, 2016).

A polpa dentária tem indicação de remoção em situações de inflamação irreversível da polpa (pulpite irreversível) e ainda em casos de polpa sadia de dentes que foram indicados para suporte de prótese, por exemplo. Contudo, a maneira como é realizada a remoção deste tecido pode variar. Classicamente, usa-se um instrumento manual que em geral é uma lima do tipo Headstroen, sendo a polpa removida do interior da cavidade pulpar por movimentos de tração após a inserção da mesma na cavidade (OCHOA-ROMERO et al., 2011) (MACHADO E SANTOS, 1994). Pode-se também realizar a remoção da polpa usando a instrumentação mecanizada, isto é, com o uso de instrumentos acionados a motor. As escolas de endodontia de todo o mundo têm dado preferência ao uso desta nova forma de preparo dos canais. Com a instrumentação rotatória, ocorrem menos erros de desvio no canal radicular original, maior previsibilidade clínica, além de maior conforto ao paciente. Contudo a natureza do material obtido é altamente diferente de quando comparado ao material removido manualmente. As variações na forma de remoção da polpa mudam drasticamente a característica final do material removido. Quando removida manualmente, a polpa é obtida em partes maiores e mais

estruturada. Já na forma mecanizada, se obtém um material macerado, semi-triturado.

Não há registro na literatura se as diferenças no método de remoção têm implicância no cultivo celular e na obtenção de células tronco(HUANG et al., 2009). A realização de estudo comparativo entre a obtenção de células-tronco da polpa dentária por meio de instrumentação rotatória e manual objetivou responder a essa questão. Além disso, ao avaliarmos a viabilidade de obtenção celular na polpa dentária de dentes permanentes, por meio de instrumentação rotatória ou manual, estaremos dando chance para pacientes adultos também estocarem células-tronco dentárias, sem a remoção do elemento dentário.

Contudo, não é conhecido se alterações no modo de remoção da polpa modificam a capacidade de obtenção de células-tronco. Assim, há uma hipótese de que o tecido pulpar obtido durante procedimentos de biopulpectomia poderia ser cultivado, criando um novo campo de obtenção de células-tronco. Assim, surgiriam novas perspectivas na atuação do Cirurgião-Dentista.

De acordo com Gronthos et al. (2000), o reparo pós-natal dos tecidos dentinários ocorre por toda a vida do indivíduo. Este reparo é exercido por uma população especializada de células denominadas odontoblastos. Essa população celular foi comparada a outra população conhecida, que são as células-tronco mesenquimais isoladas da medula óssea (do inglês, *Bone marrow derived Stem Cells* - BMSCs). Até aquele momento, nenhum outro estudo comparou e estudou as características daquelas populações celulares. Foi demonstrado anteriormente que o osso humano é gerado após transplante xenogênico de BMSCs com fosfato de hidroxapatita Tricalcico (HA/TCP) como um veículo de transporte. Contudo, os autores exploraram a possibilidade de que as Células-tronco da polpa dentária (do inglês, *Dental pulp Stem cells* - DPSCs) isoladas também seriam capazes de regenerar uma estrutura de dentina/polpa *in vivo* em condições similares. Para o estudo, foram extraídos terceiros molares de pacientes saudáveis e depois seccionados ao nível da junção amelo-dentinária. A polpa coronária removida foi digerida em solução de colagenase e dispase. Por sua vez, outros pacientes normais foram selecionados e doaram amostra de sua medula óssea que foi aspirada e cultivada em laboratório. Ensaio imunohistoquímicos foram realizados demonstrando intensa similaridade entre os dois tipos celulares. Aproximadamente 5.0×10^6 de DPSCs e BMSCs foram misturadas a 40 mg de HA/TCP e separadas em grupos distintos. O material da mistura foi transplantado até a superfície dorsal de ratos imunocomprometidos. Após seis semanas o material implantado foi removido e fixado em 4% de formalina. Análises do material removido foram realizadas demonstrando que quando foram utilizadas células de polpa dentária, houve uma significativa diferença na quantidade de unidades formadoras de colônia, mostrando assim a alta atividade destas células em comparação com as da medula óssea. Contudo, a natureza do material formado não foi exatamente a mesma. Estruturalmente, quando se utilizou DPSCs, houve uma formação calcificada mais linear, similar a uma matriz dentinária, ao passo que quando se utilizou BMSCs, houve uma estruturação mais lamelar, semelhante a tecido ósseo. Além disso, foi visto que no grupo das BMSCs, houve formação de lipídeos em sua estrutura, o que não foi observado no outro grupo. O estudo concluiu que as células isoladas da polpa dentária humana possuem potencial habilidade para formação de complexo semelhante à dentina e polpa.

Miura *et al.* (2003) isolaram uma população de células-tronco a partir do tecido pulpar de dentes decíduos humanos esfoliados. Foram utilizados dentes incisivos de crianças entre 7 e 8 anos de idade. Seguindo o protocolo estabelecido por Gronthos (2000) para o cultivo da polpa dentária de dentes permanentes, foi realizada a cultura *in vitro*, e o isolamento de uma população distinta de células-tronco multipotentes, que se denominou como Células-tronco de dentes decíduos (do inglês, *Stem Cells from human exfoliated deciduous teeth* - SHED). Como resultado, obtiveram um aumento significativo da potencialidade de proliferação e clonogenicidade quando comparadas com as células-tronco de dentes permanentes e as da medula óssea. Além disso, as SHEDs demonstraram potencial de diferenciação adipogênica, neurogênica e osteogênica. *In vivo*, foram transplantadas SHEDs, induzidas previamente em meio neurogênico por 7 dias, no cérebro de camundongos imunossuprimidos. Foi possível observar após 10 dias, a sobrevivência das mesmas no animal, expressando marcadores neurais. De acordo com os estudos, as SHED não se diferenciaram diretamente em osteoblastos *In vivo*, mas induziram a formação de novo osso demonstrando um potencial ósteo-indutor. Destacou a necessidade de novos estudos para determinar a eficácia do uso em terapias celulares.

No ano de 2005, Pierdomenico *et al.* relataram que as células-tronco da polpa dentária com características mesenquimais não induziam a aloreatividade das células T. Além disso, as MSCs exibem uma capacidade imunorreguladora por supressão das respostas das células T, em modelos animais *in vitro* e *in vivo*, sugerindo o potencial dessas células para uma terapia celular.

Três anos depois da publicação dos achados de Miura e seu grupo de pesquisa (2003), Kerkis *et al.* (2006) isolaram células tronco da polpa de dentes decíduos de crianças de 5 a 7 anos de idade. A polpa dentária dos dentes decíduos removidos foi cuidadosamente removida com um instrumento endodôntico denominado “extirpanervo”. Após isso, foi repartida para as partes ficarem melhor expostas ao meio de cultura. Ao mesmo tempo, outra cultura celular foi iniciada com fibroblastos de pele. Foram usados fibroblastos de passagens iniciais e com cariótipo normal. Com isso foi possível realizar estudos comparativos de análise de eficiência de formação de colônia e curva de crescimento. A cultura inicial foi mantida em meio de DMEM/F12 com suplementação de 15% de soro fetal bovino, FBS (Hyclone), conhecido por prover ambiente ideal. Após cinco dias foi observado

robusto êxodo de células similares a fibroblastos ao redor dos fragmentos da polpa cultivados. O mesmo fragmento de polpa, não digerido por tripsina, foi transferido 15 vezes para placas de petri. Acompanhado de cada transferência, aproximadamente 2×10^6 células surgiram a cada dez dias cobrindo os 35mm da placa. Após duas semanas, as células formaram uma monocamada que foi lavada em PBS e dissociada em 0.25% de tripsina. As culturas obtidas de todos os pacientes tiveram alta taxa de proliferação: aproximadamente 3×10^7 células em duas semanas, o esperado para uma cultura primária em expansão. Curiosamente, apesar da elevada densidade das células que saíram da polpa dentária, não foi observada nenhuma diferenciação nem diminuição da proliferação como poderia ser esperado para culturas de células confluentes, particularmente na ausência de fatores de crescimento específicos (Kerkis et al., 2006). Contudo, tanto a diferenciação quanto a proliferação foram reduzidas na cultura confluyente subsequente à tripsinização. Esta observação levou os autores a acreditar que o explante de polpa dentária em uma cultura antes da passagem inicial com tripsina pode impedir as células-tronco de sofrerem uma diferenciação prematura (Kerkis et al., 2006). Sabe-se que, sob circunstâncias normais de tecido, a maioria das células estaminais deve estar dormente e se dividir em um ritmo muito lento. O marcador embrionário OCT4 foi detectado em 80% das células cultivadas.. Os autores atribuíram a falta de expressão nos outros vinte por cento à contaminação com células não tronco. Nanog, que é um marcador de pluripotência, também foi detectado. Contudo os níveis foram decrescendo nas passagens celulares mais altas. Em suas conclusões, os autores, sugeriram que as células obtidas com a metodologia por eles usada podem não ser as mesmas de Miura et al (2003), o que sugere então a necessidade de mais investigações (Kerkis et al., 2006).

Suchanek et al.(2007) definiram as células-tronco como sendo uma população especial de células com habilidade de manter a homeostase do organismo. Para alcançar essa homeostase, ela possui duas características únicas: proliferação superior ao limite de Hayflick, e diferenciação em células maduras. Seu trabalho descreveu o comportamento biológico dessas células, bem como analisou seu potencial de diferenciação. Foi realizado cultivo de DPSCs em meio otimizado para cultivo de células progenitoras mesenquimais (do inglês, *Mesenchymal Progenitor Cells* – MPCs). Os dentes doados foram divididos em dois grupos principais, formando assim o grupo dos decíduos e o grupo dos dentes

permanentes. Os dentes decíduos foram subdivididos em outros dois grupos: o grupo dos dentes esfoliados espontaneamente e o de dentes decíduos extraídos. Criaram-se também grupos para terceiro molares impactados, terceiros molares erupcionados e por fim, pré-molares erupcionados. A medula óssea foi coletada a partir da área de trocântica de pacientes submetidos à substituição da cabeça do fêmur. As polpas foram tratadas enzimaticamente com colagenase e dispase por 70 minutos. O *pellet* foi obtido por centrifugação. Tanto DPSCs quanto MPCs foram cultivadas sob as mesmas condições usando meio otimizado para cultivo de células adultas progenitoras humanas (MPCs) Exceto no grupo em que se necessitou do uso de corte com disco diamantado, foi possível obter células-tronco do material removido (polpa dentária). Por esse motivo Os autores descartaram esse método de seccionamento por ele ser passível de contaminação de amostra. As amostras se mostraram altamente proliferativas por todo o período de cultivo, e não se observou nenhuma diferenciação espontânea. Os autores concluíram que a polpa dentária representa uma fonte alternativa e facilmente acessível para a obtenção de células-tronco, que são histocompatíveis com tecidos do paciente.

No ano de 2009, Arora et al afirmaram que a evolução da medicina e da terapia celular no tratamento de doenças e lesões junto com o aumento de pessoas afetadas por doenças degenerativas estão fazendo com que novas fontes de células-tronco sejam obtidas. Assim, a utilização de células-tronco provenientes da polpa dentária é promissora, uma vez que o cordão umbilical, que era, em outros tempos, a única opção, está fora do alcance de muitas pessoas. Pesquisas recentes relatam que os dentes decíduos constituem a melhor fonte terapêutica de células-tronco do que os terceiros molares e os dentes extraídos por motivação ortodôntica.

As SHED aparecem na sexta semana durante a fase embrionária e são células imaturas, não especializadas, que durante o processo de diferenciação dão origem a diversos tipos celulares e com multiplicação e crescimento mais rápido do que as células-tronco adultas. Possuem a capacidade de crescer e regenerar tecidos, expressar proteínas nas suas superfícies celulares permitindo-lhes se diferenciar além da polpa dentária, osso e dentina, em células neurais e adipócitos. Contudo ainda apresentam certas limitações quanto à sua aplicabilidade, como determinação do potencial oncogênico e da rejeição imunológica, assim como de pesquisas experimentais em humanos, já que ainda estão restritas a modelos animais.

Toda criança perde os dentes decíduos, o que cria a oportunidade perfeita para recuperar e armazenar esta fonte conveniente de células-tronco. Os Biobancos estão sendo desenvolvidos para realizar a correta armazenagem do material genético, informando aos pais/responsáveis legais e aos Cirurgiões Dentistas a importância da adequada coleta do(s) dente(s), os quais podem ser submetidos, em laboratório especializado, ao isolamento das células-tronco e seu correto armazenamento, quer seja por criopreservação ou congelamento magnético. A padronização dos passos, e principalmente a segurança no armazenamento são imprescindíveis para o sucesso da terapia com células-tronco. Embora a promessa do imenso âmbito e magnitude que terapias com células-tronco terão sobre a população só venha a ser realizada no futuro, as SHED são consideradas, por muitos pesquisadores, como um seguro biológico e um raio de esperança para o tratamento de várias doenças.

As hDPSCs em adultos são provenientes principalmente de tecidos de polpa de terceiros molares permanentes. Na literatura existente, há poucos relatos da obtenção desses tecidos sem a necessidade de procedimento cirúrgico de extração dentária. O objetivo do estudo conduzido por Huang et al., (2009) foi analisar a obtenção de DPSCs a partir de dentes humanos (hDPSCs) fraturados que requerem tratamento de canal. As hDPSCs foram colhidas a partir de tecidos de polpa em dois dentes com fratura da coroa, que requeriam tratamento de canal. O Paciente tinha 41 anos. Os tecidos de ambos os dentes com fratura da coroa foram extraídos quatro dias mais tarde, usando uma lima endodôntica. Para comparação, tecido pulpar de canino decíduo inferior esquerdo de um menino de 10 anos de idade foi cultivado. A superfície do dente decíduo foi limpa primeiro com álcool 70%. O dente então, mantido em gelo e colocado em solução salina tamponada, foi entregue ao laboratório para o isolamento de hDPSCs. Um sulco de 0,5 a 1.0 mm de profundidade foi realizado em torno da circunferência do dente usando uma peça de mão com broca de alta velocidade estéril. A polpa dentária foi exposta através da divisão do dente com um cinzel ao longo da ranhura, e o tecido pulpar foi extraído utilizando uma lima endodôntica. Como resultados os autores perceberam que tanto as hDPSCs derivadas dos dentes fraturados quanto as células do dente decíduo foram capazes de se diferenciar em linhagens adipogênica, condrogênica e osteogênica. Ambos os grupos apresentaram alta expressão de marcadores de células-tronco da medula óssea, incluindo CD29, CD90 e CD105 e exibiu muito

baixa expressão de marcadores específicos para células hematopoiéticas, tais como CD14, CD34, e CD45. Diferenças foram observadas na proliferação entre os grupos. Nas mesmas passagens, a formação de colônias se mostrou diferente. O estudo de HUANG et al. descreveu o isolamento e caracterização com sucesso hDPSCs do tecido pulpar de dentes fraturados, onde não foi realizada a extração do dente. Portanto, a polpa exposta em dentes fraturados pode representar uma valiosa fonte de hDPSCs. Contudo, maiores estudos são necessários para melhor elucidar as diferenças observadas.

Wang et al.(2010) realizaram estudo baseado em um comparativo entre obtenção celular de polpas dentárias de dentes hígidos e de polpas dentárias provenientes de dentes com diagnóstico de pulpíte irreversível. Os autores destacaram a falta de conhecimento sobre as possíveis diferenças no potencial de diferenciação e proliferação em função do estado de inflamação pulpar, típico dos casos de diagnóstico de pulpíte irreversível. Para isso, foram obtidas polpas de dentes permanentes de pacientes com idades entre seis e quarenta anos de idade, recrutados de ambulatórios da Universidade de Carolina do Norte. Polpas saudáveis foram coletadas a partir de oito pacientes que passaram por extração de terceiro molar com indicação ortodôntica formando o grupo controle. Todos os dentes estavam livres de cárie. Polpas dentais comprometidas foram obtidas a partir de oito pacientes com pulpíte irreversível formando assim o grupo teste. Esse grupo exigiu a secção do elemento dental para remover o tecido pulpar dos dentes envolvido, com auxílio de um extirpa nervos. O diagnóstico de pulpíte irreversível foi determinado por especialistas em endodontia baseado no histórico clínico de dor espontânea e intensa, e responsável ao frio com exacerbação dolorosa. Os dentes saudáveis foram lavados com iodo e limpos cuidadosamente para remover todo tecido periodontal e tecido periapical, antes de serem perfurados e seccionados ao meio para obter o tecido pulpar. A polpa foi coletada após a completa exposição da câmara pulpar com uso de lima endodôntica e transferida para meio estéril com 2mM de L-glutamina, penicilina e estreptomicina. Todos os tecidos de polpa foram lavados com α -MEM adicionado de 10% soro fetal bovino digerido e cultivado como descrito por Gronthos. Os antibióticos penicilina e estreptomicina foram usados em todas as etapas de lavagem, digestão enzimática da polpa e cultura para minimizar a contaminação por bactérias. A proliferação celular, expressão do marcador celular STRO-1 e a diferenciação ósteo-odontogênica foram analisadas. A contagem celular

direta demonstrou que as células da polpa inflamada exibem um potencial de proliferação mais baixo do que as células da polpa saudável. Contudo, os autores afirmam que a proliferação foi robusta nos dois grupos. Os resultados sugerem que a inflamação pode afetar a proliferação celular. Estudos futuros incorporando ensaios *in vitro* e *in vivo*, incluindo diferenciação em multi-linhagens, odontogênese e angiogênese são indicados para caracterizar completamente estas células. Estudos com amostras de maior tamanho são necessários para correlacionar o grau de inflamação e apresentação clínica com obtenção de células. A caracterização adicional destas células vai proporcionar uma visão melhor sobre se elas poderiam servir como uma fonte de células multipotentes endógenas em terapia baseada na regeneração de tecidos.

De acordo com Eslaminejad et al. (2010), dentes decíduos e dentes permanentes apresentam células-tronco em suas polpas. Contudo, apesar do pequeno volume de tecido, foi observada quantidade suficiente para a realização de culturas. Cientes disso, os autores realizaram estudo visando comparar os requisitos de cultura e crescimento. Terceiros molares humanos foram obtidos de pacientes adultos jovens com idade entre vinte à vinte e cinco anos. Incisivos decíduos humanos de crianças com sete aos doze anos de idade também tiveram suas polpas removidas após procedimentos de extração. As células-tronco da polpa de terceiros molares humanos permanentes e de incisivos decíduos foram isoladas. A cultura foi expandida e caracterizada. Em seguida, o potencial de proliferação de células foi comparado utilizando múltiplos índices de crescimento celular como PDT (tempo de duplicação de população), atividade de formação de colônia e curva de crescimento. Além disso, as culturas de ambas as células foram otimizadas para máxima proliferação. Para isso, células foram separadas e colocadas em diferentes concentrações de DMEM adicionados a soro fetal bovino nas concentrações de 5%, 10%, 15% e 20%, além de variar a concentração das células semeadas, em 10, 50, 100, 200 e 500-células/cm². Foi escolhida a concentração de 20% e 100 células/cm². As células-tronco das culturas de ambos os tecidos pulpares surgiram como células fibroblásticas capazes de diferenciação em linhagens celulares de osteoblastos, odontoblastos, adipócitos e condrócitos. Em contraste com as células dos dentes molares, as dos incisivos expressaram marcadores neurogênicos *βIII*, *Tubulina* e *Tau*. Ambas as células tiveram elevada taxa de expansão quando expostas e plaqueadas numa solução de 20% de PBS a uma densidade de 100 células/cm².

Tendo em conta a elevada capacidade de proliferação, as células-tronco dos terceiro molares humanos seriam candidatas apropriadas para o uso experimental, pré-clínico e ainda ensaios clínicos.

Para facilitar caracterizações de DPSCs humanas, Dualibi et al. (2011) desenvolveram um novo sistema para correlacionar com precisão o estágio de desenvolvimento de terceiros molares humanos com a previsão de rendimento de obtenção de DPSCs. O estudo utilizou 67 terceiros molares, extraídos de 52 pacientes saudáveis sendo 36 do sexo feminino e 16 do sexo masculino, com idades entre 9 a 25 anos de idade, apresentando boa saúde. Dentes extraídos de pacientes com doenças congênitas ou transmissíveis, doença periodontal ativa ou cárie, foram excluídos do estudo. Os dentes foram classificados em estágios de desenvolvimento, com base no grau de mineralização e desenvolvimento das estruturas de raiz e coroa como se segue: Estágio 1, coroa apenas; Estágio 2, coroa com 1-2mm de raiz ; Estágio 3, coroa com a raiz entre 3-4mm. O estagiamento foi realizado por meio de visualização direta, radiografias e tomografia volumétrica. Os dentes extraídos foram imediatamente colocados em solução de Hank pré-aquecida (37°C) e transportado para o laboratório. O tecido pulpar extirpado a partir da câmara pulpar foi pesado e triturado em pedaços pequenos, com menos de 1 mm de tamanho. Depois a polpa triturada foi lavada em solução de Hank e digerida durante 30 a 40 minutos com 0,4mg/mL de colagenase tipo II, e 0,2mg/mL de dispase. O material obtido foi então cultivado e foram realizados testes de formação de colônias e os dados foram confrontados grupo a grupo. Como esperado, foi encontrada correlação estreita entre idade do doador e fase de desenvolvimento dos dentes colhidos. Foi então observado que o grupo em estágio 1 continha maiores índices de formação de colônias de DPSC em comparação com o estágio 2 e estágio 3 de formação dentária. Também foi observado que os dentes de pacientes mais jovens não produziram necessariamente mais CFUs do que os dentes no mesmo estágio de desenvolvimento colhidos a partir de pacientes mais velhos.

Jesus et al. (2011) realizaram ensaios laboratoriais para medir os efeitos do tempo entre a exodontia e a passagem da polpa para o meio de cultura, na viabilidade celular. Após a aprovação do Comitê de Ética da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, foi obtido tecido pulpar de dentes permanentes hígidos extraídos. Foram estudados um total de vinte e um dentes, obtidos de onze doadores com idades entre treze e trinta e seis anos. Os dentes

foram provenientes de indivíduos saudáveis, extraídos somente após obtenção do termo de consentimento informado. As amostras foram divididas em 5 grupos de acordo com o tempo aguardado para o processamento após a exodontia. Os tempos testados foram: imediatamente; 30 minutos, 1 hora, 2 horas e 5 horas após a extração dentária. O período de tempo entre a extração do dente e remoção da polpa foi registrado com um cronômetro. No primeiro grupo, a polpa foi imediatamente removida e imersa no meio de cultura (G1). O mesmo procedimento foi realizado após 30 minutos no grupo 2 (G2), 1 hora no grupo 3 (G3), 2 horas no grupo 4 (G4) e 5 horas no grupo 5 (G5). Após o período de tempo definido, um sulco longitudinal foi realizado usando um disco diamantado flexível sem atingir o tecido pulpar e os dentes foram seccionados usando uma alavanca cirúrgica. O tecido pulpar foi cuidadosamente separado por uma cureta de dentina estéril. Analisou-se a morfologia das células por meio da microscopia óptica e a proliferação celular, por meio do ensaio de MTT e da contagem de células viáveis. Independentemente do tempo entre a extração do dente e a imersão da polpa em meio de cultura, o estabelecimento da cultura foi semelhante em todos os grupos. A migração das células do fragmento de tecido para a placa ocorreu por volta do décimo dia. Observou-se resultado pelo ensaio de MTT semelhante em todos os grupos ($p < 0,05$). Concluiu-se que aguardar até 5 horas para processamento do dente para coleta do tecido não prejudica o estabelecimento da cultura de células de polpa dental, não afeta a morfologia destas células, nem reduz seu potencial proliferativo. Com isso, os autores sugerem que a rotina profissional do atendimento não seja alterada em função do fato de se estar coletando a polpa.

Com o objetivo de avaliar a viabilidade de dois métodos diferentes de criopreservação para posterior isolamento de células-tronco pulpar, Chen et al. (2011) usaram diferentes tipos de dentes humanos com comprometimento pulpar. Estes dentes tiveram sua vitalidade atestada anteriormente aos procedimentos de extração dentária para posterior remoção do tecido pulpar. Uma ranhura foi realizada em toda a circunferência do dente, tendo 0,5-1,0mm de profundidade usando uma caneta de alta rotação asséptica. A limpeza da superfície do dente foi realizada previamente com DPBS. O dente foi dividido usando um cinzel e a polpa dentária foi então exposta. O tecido pulpar subjacente foi extraído utilizando uma lima endodôntica. O tecido foi então colocado num recipiente contendo solução fosfatada salina tamponada, para subsequente cultura. Como resultados, Chen et al.

(2011) observaram que a taxa de sucesso para o isolamento de hDPSCs e os autores sugerirem que o processamento imediato após a extração pode não ser necessário para o sucesso de isolamento das hDPSCs.

Rosa et al. (2011) fizeram uma revisão de literatura sobre o impacto potencial das células-tronco de polpa dentária para endodontia regenerativa. As células tronco desempenham um papel crucial no desenvolvimento e na regeneração de tecidos. A polpa dentária contém uma pequena subpopulação de células estaminais, que estão envolvidas na resposta da progressão da cárie. Especificamente, as células estaminais substituem odontoblastos que tenham sido submetidos a morte celular como uma consequência de cárie. As células-tronco também secretam fatores que têm o potencial de aumentar a vascularização da polpa e fornecer o oxigênio e os nutrientes necessários para a resposta dentinogênica que é tipicamente observada em dentes com cárie profunda. Entretanto, os mesmos fatores angiogênicos que são necessários para a regeneração da dentina podem vir a contribuir para o desaparecimento da polpa aumentando a permeabilidade vascular e pressão intersticial. Coletivamente, essas descobertas sugerem novos paradigmas de tratamento na área de endodontia. Descobertas recentes têm revelado as células-tronco de polpa dentária como potencial alvo terapêutico em casos de pulpite reversível. É importante notar que estas células podem tornar-se estratégia primária para a revitalização dos dentes permanentes imaturos necrosados. Tais descobertas têm o potencial de mudar fundamentalmente os paradigmas da terapia conservadora de polpa, e talvez para permitir o tratamento no futuro de condições que são atualmente incuráveis em Odontologia.

Para SILVA *et al.* (2012), o surgimento de novas áreas como a medicina regenerativa e a bioengenharia de tecidos deve-se a inúmeras descobertas referentes às aplicações das células-tronco, tanto embrionárias como as adultas, na terapia celular. No entanto, afirmam que é necessário ter cautela na aplicação clínica das mesmas. Os autores ressaltaram alguns aspectos relevantes referentes à biologia das células-tronco, para se ter segurança e obter sucesso na terapia celular. A composição do meio de cultura é um fator crítico para o sucesso da cultura das células-tronco, e a manutenção das mesmas por longos períodos *in vitro*. A adição do soro fetal bovino para a complementação do meio deve ser cautelosa, devido à possibilidade de contaminação das células-tronco com agentes infecciosos e a

transmissão dos mesmos para o paciente Há ainda o risco de incorporação de proteínas de origem animal, provocando reações alérgicas nos seres humanos. A formação de teratomas no organismo do receptor é indesejável para a terapia celular. Mas deve-se ter em mente que transplantes com células-tronco: embrionárias, hematopoiéticas (obtidas pela diferenciação das célula-tronco embrionárias), mesenquimais e as reprogramadas podem resultar em teratomas quando reintroduzidas no corpo. Outra questão abordada é a dose celular a ser transplantada no paciente. É sabido que se deve haver uma correlação entre o número de células e o peso corporal do paciente, porém não há um consenso entre os pesquisadores na literatura. A utilização de células-tronco hematopoiéticas é restrita, podendo somente ser transplantadas em indivíduos com menos de 40 kg e com base na quantidade de células CD34+, que influenciam a sobrevivência do enxerto após os transplantes. Frente a este impasse, pode-se lançar mão da utilização de células-tronco adultas não-hematopoiéticas. O potencial de proliferação/expansão das hMSCs é afetado pelas condições de cultivo *in vitro*, resultando em mudança na morfologia da célula/cultura. Uma investigação sobre o potencial proliferativo das células-tronco é necessária, devido à possibilidade da formação de tumores por algumas dessas células. Além disso, também influencia o cariótipo das células-tronco. A atividade imunossupressora e anti-inflamatória das células-tronco é de grande valia para a terapia celular, uma vez que não havendo problemas de compatibilidade entre os indivíduos, há um aumento na chance de sucesso. Frente ao exposto, os autores concluíram que para a segurança e o sucesso da terapia celular é necessário o conhecimento e a caracterização das células-tronco antes de sua utilização nas terapias celulares.

PEREIRA et al. (2012) buscaram comparar a obtenção de células-tronco a partir de polpas dentárias normais e inflamadas. Foi analisado o potencial de proliferação e potencial de diferenciação a partir de polpas de dentes normais e com pulpite irreversível. Os tecidos foram obtidos a partir de polpa de dentes permanentes de pacientes com idades entre dezessete a quarenta e três anos de idade. Polpas dentais normais foram coletadas de três pacientes (N1, N2 e N3) submetidos à extração do terceiro molar. Estes dentes estavam livres de lesões de cárie. Polpas dentais inflamadas foram obtidas a partir de três pacientes (I1, I2 e I3) com pulpite irreversível pós-tratamento de cárie que exigiam remoção da polpa do

dente afetado. O diagnóstico de pulpíte irreversível foi determinado por um especialista em endodontia, com base em avaliação clínica, incluindo a história de dor espontânea e intensa e dor persistente ao estímulo frio. A vitalidade da polpa foi confirmada no acesso. Dentes com polpas necróticas foram excluídos. O procedimento seguiu a descrição anterior de Gronthos et al (2000). Um sulco longitudinal foi feito nos dentes extraídos usando discos diamantados, sem atingir o tecido pulpar. Os dentes foram fraturados e o tecido pulpar foi gentilmente separado com uma colher de dentina estéril a partir da coroa e raiz. Tecidos de polpas inflamadas foram coletados a partir de câmaras pulpares e canais radiculares com uma lima endodôntica estéril. A polpa extraída foi transferida para o meio estéril α -MEM; suplementado com 10% de soro fetal bovino. Após a digestão enzimática, as suspensões celulares foram lavadas em meio de cultura e colocadas em cultivo. Cada amostra de tecido pulpar normal e inflamado foi processada, cultivada e avaliada separadamente em todos os experimentos. As células foram mantidas em semi-confluência para impedir a diferenciação. Após o isolamento de células e proliferação inicial com a metodologia empregada, culturas de células aderentes semelhantes a fibroblastos foram estabelecidas a partir de dentes humanos normais e com pulpíte irreversível, mostrando assim que polpas irreversivelmente inflamadas contêm células viáveis. Contudo, a taxa de sucesso no estabelecimento de culturas de células foi de aproximadamente 100% a partir de polpas dentárias normais e, considerando polpas inflamadas, esta taxa foi de 70% para dentes extraídos e 50% para amostras obtidas por pulpectomia. Não foi possível isolar as células por pulpectomia em canais muito estreitos. As células obtidas nos dois grupos foram caracterizadas. Não houve diferença estatisticamente significativa no potencial proliferativo do grupo normal e inflamado quanto ao potencial de formação de colônias. Quanto à formação de tecido mineralizado, não houve diferença significativa entre os valores médios das amostras agrupadas, havendo apenas diferenças entre amostras intra-grupos. O autor relata que essas diferenças poderiam ser explicadas pelo menor volume obtido de tecidos pulpares inflamados. À luz dos resultados, inflamação grave não foi suficiente para destruir completamente a população de células-tronco da polpa dentária. Como a polpa dentária inflamada preserva células-tronco, pode ser encarada como uma fonte adequada para a regeneração de polpa dentária e engenharia de tecidos, e não apenas como um simples resíduo biológico. Os resultados reforçam a hipótese de

que a pulpite irreversível não está necessariamente associada com a depleção de células-tronco da polpa funcional. Estudos adicionais devem abordar os eventos moleculares que poderiam afetar a viabilidade e potencial regenerativo da polpa.

Para melhor compreender as características e a dinâmica da migração de células provenientes de regiões perivasculares da polpa após procedimentos de capeamento pulpar, Martens et al.(2012) coletaram terceiros molares de pacientes com 18 a 24 anos. Os dentes tinham motivação ortodôntica para extração. Os dentes foram fraturados mecanicamente e tecido da polpa foi isolado e recolhido em meio de cultura, sendo cortada em pedaços de 1 mm³, transferidos para uma placa de 6 poços contendo meio de cultura e cultivadas pelo método de explante. Para determinar o perfil de marcadores mesenquimais e neurais em culturas de DPCs, a expressão das células nas passagens 2-3 foi analisada. Foi avaliada a expressão dos marcadores mesenquimais habitualmente utilizados (CD29, CD44, CD105, CD117, CD146 e Stro-1), marcadores neurais (nestina e vimentina), marcadores neuronais β -III-tubulina, receptor do factor de crescimento de nervo p75 (NGFRp75), neurofilamento de cadeia pesada (NF-H) e sinaptofisina, marcadores oligodendrogiais e proteína básica de mielina (MBP), além de marcadores astrogiais. Os resultados demonstram a presença de um nicho de células-tronco perivasculares e um segundo nicho no nível da junção amelo-cementária. Um aumento da quantidade de CD29 +, CD44 + CD146 + e de células coradas foram observados a partir desta área cervical para o centro do tecido da polpa e para o vértice. A expressão de marcadores neurais foi relacionada principalmente com as estruturas neurais dentro do tecido. No entanto, algumas células que residem na zona subodontoblastica foram coradas para β -III-tubulina e NGFRp75. Por outro lado, em tecido de polpa dentária adulta, apenas um nicho perivascular estava presente. Isto leva à conclusão de que o nicho na área cervical é perdido durante a maturação do tecido. Uma possível explicação pode ser que esse nicho contenha células da papila dentária que vão migrar apicalmente formando a papila apical em uma fase posterior. É conhecido que, durante o desenvolvimento dos dentes, a papila dental contribuirá para a formação dos dentes e se converte em tecido pulpar dentro da câmara pulpar. À medida que a raiz continua a desenvolver, a localização da papila do dente fica mais apical em relação ao tecido pulpar. Mais pesquisas são necessárias para identificar a localização exata dos nichos que poderiam ser úteis

na compreensão se as células-tronco isoladas são derivadas a partir de uma mesma população de células multipotentes altamente proliferativas ou de progenitores pertencentes a linhagens distintas.

Tirino et al. (2012) relataram através de revisão da literatura as práticas de isolamento, caracterização e estocagem de DPSCs provenientes da polpa dentária, mais utilizadas nos laboratórios envolvidos com terapia celular. Os autores ressaltaram a importância dessas etapas. Contudo, apesar da maioria dos laboratórios compartilharem técnicas semelhantes, novos métodos devem ser buscados pela ciência, visando simplificar técnicas e reduzir custos. Destacam-se aqui os métodos citados pelos autores mais utilizados nos laboratórios, a fim de detectar, isolar, proliferar e diferenciar DPSC, incluindo os seguintes passos: extração e digestão da polpa dental, cultura celular, testes de eficiência de formação de colônia e potencial de proliferação e finalmente, diferenciação.

Tirino et al. (2012) sugerem que a polpa dentária é uma fonte notável de células tronco e a sua coleta é um método não invasivo. Esta prática pode ser realizada no adulto durante vida e nos jovens após a extração cirúrgica do terceiro molar. O dano ao tecido é muito baixo quando coleta-se células-tronco da polpa dentária e vários tipos celulares podem ser obtidos a partir de células-tronco da polpa dentária devido a sua multipotência. O transplante de tecido ósseo formado a partir de células-tronco da polpa dentária, leva à formação do osso adulto vascularizado e integração entre enxerto/hospedeiro. As células-tronco da polpa dentária podem ser criopreservadas e armazenadas por longos períodos. A polpa dental é ideal para engenharia de tecidos e para a utilização clínica em várias patologias que exigem o crescimento do tecido ósseo e reparação. A sua utilização em ensaios clínicos tem demonstrado a sua capacidade de reparação de defeitos ósseos e por isso novos métodos mais simples e eficazes de isolamento, expansão e uso em terapia são necessários.

Visando comparar dois métodos de cultivo celular, Karamzadeh et al.(2012) realizaram a coleta de polpa dentária de dentes terceiros molares. Foi realizada a clivagem da coroa dentária com um disco diamantado. Os autores sugerem que a utilização do disco diamantado, além de simplificar a técnica em detrimento do uso de fórceps, e brocas de alta rotação, seria uma maneira de reduzir a chance de contaminação das amostras pela ausência de refrigeração com água. Em um dos

grupos, a polpa dentária de dente humano foi previamente submetida a uma digestão enzimática - Grupo “hDPSCs ED”. No outro grupo, o explante foi cultivado sem a digestão, sendo apenas realizada a clivagem do material – “hDPSCs OG” . Posteriormente foi realizada a caracterização e comparação da capacidade de diferenciação das células-tronco obtidas. As células foram caracterizadas quanto aos marcadores CD73, CD90, CD105 e CD44, associados a estroma, marcadores hematopoiéticos / endoteliais (CD34, CD45 e CD11b) a ainda marcador perivascular, CD146 e também STRO-1. Em seguida, estes dois protocolos foram comparadas com base na potência de diferenciação em odontoblastos tanto por reação de polimerase em cadeia (qPCR) quanto por coloração de Vermelho de Alizarina. QPCR foram usadas para a avaliação da expressão de genes relacionados com a mineralização. A análise comparativa entre os dois grupos mostrou maior capacidade mineralizadora no grupo “hDPSCs ED”.

Bronckaers et al. (2013) avaliaram as propriedades angiogênicas das HDPSCs. Até agora, pouco se sabe sobre as habilidades angiogênicas das HDPSCs. Para melhor conhecer essas propriedades, eles isolaram células de polpas dentárias obtidas de terceiros molares extraídos por razão ortodôntica. Os pacientes tinham idades entre 15 e 20 anos. Inicialmente, os fatores angiogênicos secretados pelos hDPSC foram identificados por meio de uma matriz de proteína que permite a detecção simultânea de 55 diferentes proteínas relacionadas a angiogênese. Esses resultados foram validados por RT-PCR, ELISA e imunohistoquímica no local. Depois, estudaram o efeito in vitro de hDPSC sobre migração, proliferação endotelial, etapas essenciais da angiogênese. Finalmente, avaliaram a capacidade de hDPSC para induzir a formação de vasos totalmente funcionais em implante colocado em membrana corioalantóica de frango. Diversos fatores endoteliais foram detectados tanto ao nível de mRNA quanto protéico nas células analisadas. Foi observado que as hDPSC não tiveram influência sobre a proliferação de células endoteliais microvasculares humanas HMEC-1, mas foram capazes de induzir significativamente migração in vitro das HMEC-1 Além disso, no teste realizado na membrana corioalantóica de frango, hDPSC foram capazes de induzir significativamente a formação de vasos sanguíneos. Em conclusão, as hDPSC têm a capacidade de induzir a angiogênese, o que significa que esta população de células-tronco tem um grande potencial clínico, não só para a engenharia de tecidos,

mas também para o tratamento de feridas crônicas, acidente vascular cerebral e enfarte do miocárdio.

Para comparar as DPSC isoladas por meio de digestão enzimática (DPSC-EZ) e as DPSC isoladas por expansão/crescimento (DPSC-OG), no que diz respeito às suas propriedades de células-tronco, Hilkens et al.(2013) realizaram estudo em que o potencial de diferenciação em múltiplas linhagens foi avaliado, além de taxa de proliferação, formação de colônias e imunofenotipagem de DPSC-EZ e DPSC-OG. Além disso, a morfologia celular foi avaliada a nível ultra-estrutural. Conformou-se o potencial de diferenciação em linhagens osteogênica, condrogênica e adipogênica de ambos os tipos de células-tronco por meio de imunocoloração para vários marcadores e por análise ultraestrutural detalhada. Para isso, eles se valeram da polpa extraída de terceiros molares, de pacientes com idades variando entre quinze e vinte anos de idade. Os dentes foram fraturados com fórceps, de maneira a não utilizar nenhuma forma de corte com broca. Segundo o autor, isso poderia alterar a viabilidade desse material. O estudo não revelou nenhuma diferença na morfologia celular, na taxa de proliferação, nos marcadores específicos para células-tronco e no potencial de diferenciação mesenquimal entre DPSC isoladas através de digestão enzimática ou no método de explante, quando estas células são mantidas sob a mesma condição de cultura e foram derivadas a partir dos mesmos doadores. Ambos os métodos de isolamento foram capazes de produzir células particularmente capazes de se diferenciarem em osteoblastos e condroblastos. As células-tronco de origem pulpar são uma fonte estratégica promissora para o tratamento de injúrias ósseas e lesões de cartilagem.

Attar et al. (2014) compararam a obtenção de células-tronco de tecidos hiperplasiados de polpas dentárias de molares humanos com polpas dentárias de dentes saudáveis. O estudo, por ser inédito, permitiu a eles nomearem as células-tronco obtidas deste tecido hiperplasiado). As hiperplasias crônicas, também conhecidas como pólipos pulpares, foram atestadas por especialistas em endodontia antes de serem removidas com curetas. Todos os pacientes eram adolescentes com um histórico de lesões de cárie não tratadas, mas sem dor prolongada espontânea. Os pólipos pulpares foram digeridos enzimaticamente antes de as culturas serem estabelecidas. Posteriormente foi realizada diferenciação em adipócitos e osteoblastos, bem como análise fluocitométrica para os seguintes marcadores: CD90, CD73, CD105, CD45, e CD14. Além disso, compararam-se outras

características, como o tempo de duplicação da população. As células isoladas a partir de polpa de pólipos exibiram morfologia fusóide e puderam ser diferenciadas em adipócitos e osteoblastos com sucesso. Estas células expressaram CD90, CD73, CD105 e foram negativas para CD45, CD14. O número total de colônias de células foi maior nos cultivos realizados com células dos pólipos. Contudo, os autores destacam que o volume de material cultivado foi maior em função dos pólipos terem dimensões superiores às de uma polpa dentária normal. E isso explicaria o número total ter sido superior. Estes resultados sugerem que mesmo tecidos de polpa dental de dentes clinicamente comprometidos podem ter células que podem ser utilizadas em regeneração endógena da polpa dentária.

De acordo com o texto de Vasandan et al.(2014), a busca por fontes alternativas ao uso de células-tronco oriundas da medula óssea tem crescido, levando também a uma fonte não tão invasiva para obtê-las. No seu trabalho, foi analisada a polpa dentária e o material removido do ligamento periodontal que seria removido por indicações estéticas em pacientes. Pelo fato de os materiais coletados serem dos mesmos pacientes, eles destacaram a possibilidade única de descartar possíveis alterações de paciente para paciente. A polpa dental, assim como o ligamento periodontal, foi obtida pela extração de terceiros molares em pacientes com idades variando entre 17 a 28 anos. O dente foi cuidadosamente lavado em solução salina contendo antibiótico e o ligamento periodontal tecido foi raspado para posterior processamento. O tecido foi digerido durante a noite com 0,5 mg / ml de colagenase. Para extrair polpa dentária a partir do mesmo dente, ele foi cortado e aberto com uma broca dental de alta velocidade num ambiente estéril; a polpa repartida e digerida durante 3 horas em 2 mg / mL de colagenase. Foram realizados testes de diferenciação em linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica. Análise de citometria de fluxo assim com análise de expressão gênica também foi realizada. Em adição, realizou-se ainda teste de imunoestimulação das citocinas pró-inflamatórias Gama Interferon e TNFa. Vassandan observou que as DPSC e as células-tronco do ligamento periodontal (do inglês, Periodontal Ligament Stem Cells – PDLSCs) exibiram forte potencial condrogênico, mas apenas as DPSC exibiram potencial adipogênico e osteogênico. Ambas as culturas apresentaram baixo potencial de indução de resposta imune, contudo, apenas DPSC foi capaz de atenuar a resposta inflamatória. Isso ressalta o potencial imunomodulador das DPSCs em contraste com as PDLSCs. O estudo ressalta ainda que mesmo sendo

células de regiões anatomicamente muito próximas, as propriedades destas células não são exatamente as mesmas. Mostra ainda a dificuldade em se estabelecer as características “universais” que definam as células tronco, em função da reconhecida pluralidade de marcadores celulares e de respostas funcionais em células tão similares.

Sun et al. (2014) conduziram estudo buscando estudar as características das células-tronco da polpa dentária obtida de dentes afetados por periodontite. Nas revisões por eles realizadas sobre este tema, DPSC isoladas por pulpectomia a partir de dentes diagnosticados com pulpite irreversível têm mostrado uma similar, ou ligeira diminuição da capacidade de formação de colônias, taxa de proliferação e potencial osteo /dentinogênico em comparação com DPSCs isoladas a partir de tecidos normais. Contudo, segundo eles o ambiente inflamatório inevitavelmente leva a certas mudanças na taxa de proliferação. Neste estudo, foram isoladas DPSC a partir de dentes humanos descartados que foram extraídos devido a periodontite agressiva e divididos em três grupos experimentais (Grupos A, B e C) com base no grau de reabsorção óssea induzida pela doença periodontal. O grupo C era o dos dentes mais agressivamente acometidos por periodontite. Células-tronco de terceiros molares foram obtidas e utilizadas como um grupo controle. Doze dentes extraídos a partir de três doadores saudáveis (mulheres, com 23 a 36 anos de idade) devido a periodontite agressiva foram utilizados para este estudo. A vitalidade pulpar de cada dente foi confirmada antes da extração, e os dentes com polpa necrosada completamente foram excluídos. Foram realizados testes de unidade de formação de colônia, proliferação celular, citometria de fluxo, e de potencial de diferenciação. Além disso, uma vez que uma das possíveis aplicações práticas pode ser a revitalização de dentes, foi realizado um transplante do material cultivado agregado a um *scaffold* de HA-TCP para analisar a formação de tecido pulpar ou a ele relacionado. Embora Sun et al. tenham anotado uma redução na capacidade de formação de colônias nos Grupos A, B e C e na taxa de proliferação ($P < 0,05$), as diminuições não foram consistentes com o grau de periodontite. Além disso, as células não mostraram significativa diminuição do potencial de multidiferenciação *in vitro*. Somente DPSC do grupo A e do grupo controle mostraram capacidade de formar *in vivo* material semelhante à dentina quando biomateriais foram transplantados diretamente num modelo de transplante de ectópico. No entanto, quando *scaffolds* de células-tronco foram colocados em

fragmentos de raízes de dentes humanos, todos os grupos se mostraram capazes de formar material com semelhança à dentina e polpa. O aumento da destruição periodontal não foi necessariamente seguido por uma diminuição na quantidade de formação de tecidos semelhantes à dentina polpa. Estes resultados fornecem indícios que permitem crer que os dentes afetados por doença periodontal podem conter células-tronco enquanto a vitalidade da polpa não foi totalmente danificada. Se essas células podem servir como uma fonte de CTMs autólogas multipotentes para terapias regenerativas, ficaria então justificada uma investigação mais aprofundada com amostras maiores e de vários tipos de periodontite.

Eubanks et al.(2014) destacam que, para se poder realizar uso clínico das células da polpa dentária, uma maneira reprodutível de estocar os dentes após extração precisa ser estabelecida. Além disso, deve-se dar preferência a métodos que não incorporem o uso de soro animal nos meios de cultura. A reprodutibilidade dos métodos de expansão e estocagem deve ser desenvolvida para que os clínicos possam ter fácil, acesso a uma solução para depositarem e manterem dentes para posterior cultivo celular. Buscando então preencher estas lacunas, os autores se valeram de trinta e dois terceiros molares obtidos por extração em pacientes com idades de 15 a 22 anos. A partir destes dentes, DPSC foram imediatamente isoladas ou armazenadas durante 24 horas a 4°C antes de serem manipulados A coroa do dente foi cortada acima da junção amelocementária. O tempo de duplicação da população, expressão de marcadores de superfície, e multipotência foram comparados entre DPSC em FBS, e DPSC em solução salina estéril (SH). Foi observado por Eubanks que o tempo de 24 horas não afetou a capacidade de obtenção celular em nenhum dos grupos analisados. Contudo, houve importante diferença quando usado em vez de FBS a solução salina no isolamento inicial de DPSC ($P < 0,01$). Houve taxa de sucesso de isolamento de 89% (FBS) contra 23% (HS). Mas ao se adicionar fibronectina na solução salina estéril, a melhora foi grande, trazendo a taxa de sucesso aos 83%. Apesar disso, a taxa de proliferação foi superior no grupo de solução salina. Finalmente, não houve diferença na expressão de CD73, CD90, CD105, ou multipotência (como medido por diferenciação osteogênica, adipogênica, e condrogênica) entre DPSC em FBS e DPSC em SH. Estes resultados mostram um método clinicamente viável de armazenar os terceiros molares para o isolamento de DPSC. Além disso, DPSC

podem ser isoladas e expandidas a partir de dentes armazenados em meios desprovidos soro fetal bovino e ainda manter as suas características fenotípicas.

Apesar de a polpa coronária ser histologicamente semelhante à polpa radicular, estudos em porcinos têm demonstrado diferenças na população celular. Para analisar essas diferenças em humanos, Toriumi et al. (2015) conduziram estudo com dentes decíduos. Dois dentes decíduos foram seccionados ao nível da junção coronoradicular. A polpa foi cuidadosamente removida e cultivada em meio específico. Foram realizadas análise de marcadores de superfície celular, por meio de citometria de fluxo, análise de expressão gênica por meio de PCR, além de diferenciação osteogênica e adipogênica das amostras. As células obtidas sofreram ainda processo de reprogramação para indução de pluripotência (do inglês, *induced Pluripotent Stem Cells* –iPSC) que são células pluripotentes induzidas. A análise de PCR demonstrou que a expressão endógena do marcador embrionário *KLF4* em células de polpa radicular foi duas vezes maior que em células da coroa, uma diferença estatisticamente significativa. O número de CFU-M nas células da raiz foi 2,4 vezes maior em do que em células de coroa. As células das raízes mostraram uma taxa de proliferação significativamente maior de células de coroa. Os genes *TGFβ2* e *GADD45G* envolvidos na redução do crescimento celular e dano do DNA foram mais baixos em culturas de células da raiz do que em células de coroa. Os valores de indução osteogênica foram os mesmos assim como na indução adipogênica. Em conclusão, foi demonstrado que células da raiz em dentes decíduos também contêm células com características de MSC. Além disso, mostrou-se que a eficiência de reprogramação de células da raiz foi cerca de quatro vezes maior do que as células da coroa. A partir desses resultados, os autores concluíram que as células provenientes da raiz de dentes decíduos podem ser importantes para a geração de iPSC, usadas em terapias de transplante.

No ano de 2015, Garzón et al. realizaram estudo de revisão literária no que concerne ao tema células-tronco da polpa dentária humana e avaliaram suas propriedades já descritas. Eles ressaltaram a capacidade dessas células obtidas da polpa dentária de se diferenciarem em tecidos diversos, sendo os mais citados: ósseo, cartilaginoso e adiposo. Contudo eles hipotetizaram a possibilidade de estudos futuros serem conduzidos para a obtenção de tecidos não mesodérmicos. Fontes alternativas para o recobrimento de queimaduras epiteliais profundas são necessárias e talvez seja possível em futuro próximo observarmos as DPSCs

participando da engenharia tecidual de epitélio de recobrimento externo. Para induzir a diferenciação epidérmica destas células, uma co-cultura de DPSC com fibroblastos dérmicos é proposta usando modelos 3D organotípicos. Ressalta-se ainda a capacidade imunoreguladora das DPSCs, o que resolveria os problemas de rejeição teciduais atualmente enfrentados nas terapias com recobrimento de queimaduras profundas. Além disso, essas culturas têm alta taxa de expansão, permitindo uma rápida obtenção desse material. A expressão elevada de E-Cadherin, proteína transmembrana importante na adesão celular, difere as DPSCs das outras células adultas. Isso pode favorecer as funções reparadoras da pele, onde a adesão celular desempenha um papel importante, apoiando assim a hipótese descrita neste trabalho. A utilização de métodos de cultura 3D organotípicas utilizando fibroblastos dérmicos em combinação com *Scaffolds*, biomateriais e HDPSC proporcionariam ambientes adequados para a diferenciação epitelial e maturação das HDPSC.

Giuroiu *et al.*(2015) realizaram um estudo para avaliar as correspondências e discrepâncias entre o diagnóstico clínico e histológico da polpa dentária. Para isso, um total de 59 pacientes foram selecionados e divididos em dois grupos. No primeiro grupo, 54 pacientes foram diagnosticados com pulpite aguda ou crônica e em um segundo grupo composto por cinco pacientes, estabeleceu-se o grupo controle. Para controle, foram considerados dentes saudáveis com indicação clínica de extração por razão ortodôntica. O diagnóstico clínico de pulpite irreversível foi conseguido tendo em conta os seguintes sinais e sintomas: (1) dor espontânea, (2) A resposta positiva para o teste de sensibilidade de polpa: dor prolongada e máximo de 8 minutos após remoção do estímulo frio causado por Tetrafluoroetano,(3) resposta positiva ao teste de sensibilidade polpa: dor prolongada e máximo de 8 minutos após remoção do estímulo quente causado por guta-percha aquecida, (4) dor prolongada e máxima de 8 minutos para estímulo ao doce, (5) dor de percussão no longo-eixo do dente, e (6) sangramento e dor na palpação do tecido da polpa exposta na cavidade oral. A sensibilidade da polpa testada comparativamente com o dente vizinho ou dentes homólogos. O procedimento de pulpectomia foi realizado com anestesia loco-regional, isolamento absoluto do campo operatório, antissepsia do campo operatório com hipoclorito de sódio a 2%, e preparação da cavidade de acesso. Foi usado uma lima tipo Kerr para a excisão do tecido conjuntivo (polpa). Na análise histopatológica, três amostras foram desconsideradas devido ao baixo volume de polpa obtido não permitir sua análise, restando ao grupo teste 51

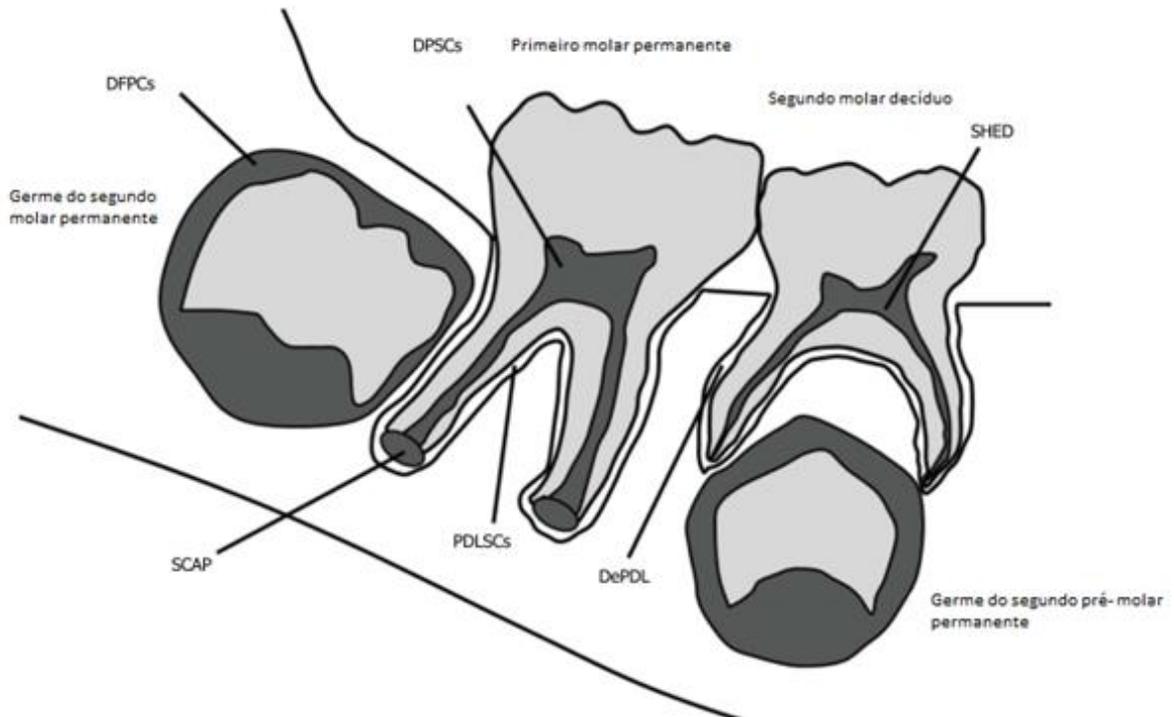
amostras. Dos 19 casos diagnosticados clinicamente como pulpite aguda, 7 casos foram confirmados pelo exame patológico. Para os 32 casos com o diagnóstico clínico de pulpite crônica, o exame histopatológico confirmou 28 casos. Conseqüentemente, foi obtida a correspondência clínica e morfológica em 35 casos (68,62%). A incoerência entre diagnóstico clínico e patológico dos casos ocorreu em 16 deles (31,38%). A discrepância entre os diagnósticos incluiu 12 casos diagnosticados clinicamente como pulpite aguda, mas morfológicamente descritos como pulpite crônica, e 4 casos diagnosticados clinicamente como pulpite crônica, mas com modificações patológicas específicas para pulpite aguda. O estudo apresenta uma correlação relativamente fraca entre o diagnóstico clínico e patológico para pulpite aguda e crônica. Por conseguinte sugere-se que os especialistas devam se concentrar em atualizar as classificações para as patologias da polpa. O autor sugere ainda que os sistemas de classificação podem ser simplificados reduzindo o número de entidades clínicas.

Stella et al. (2015) destacaram a baixa quantidade de dados a respeito da oximetria da polpa. Tendo em conta esta lacuna, o objetivo deste estudo foi usar um oxímetro de pulso para medir os valores de saturação de oxigênio em dentes permanentes com polpa normal divididos em dois grupos de pacientes com diferentes idades (crianças / adolescentes e adultos). A hipótese era que as diferentes características destes dois grupos de pacientes, como diferentes estágios de desenvolvimento da raiz, seria refletida em diferentes valores de saturação de oxigênio. A amostra final composta por 110 dentes de 57 indivíduos: 28 crianças / adolescentes (7-13 anos de idade) e 29 adultos (22-36 anos). Os seguintes critérios de inclusão foram levados em consideração: a presença dos incisivos centrais superiores normais (isto é, sem cáries, restaurações, sinais de necrose), bom estado geral, sem doenças sistêmicas, e sem uso de medicações sistêmicas. Os critérios de exclusão foram presença de fístulas, edema, coroas escuras, mobilidade, ou história de trauma. Uma placa de aço inoxidável foi fabricada especificamente para este estudo. Ela foi concebida para ligar o oxímetro de pulso aos dentes do paciente, assegurando as medições. O nível de saturação de oxigênio médio em incisivos centrais foi maior entre as crianças / adolescentes (84,35%) do que adultos (77,88%). Taxas de saturação de oxigênio medidas nos dedos dos pacientes não foram correlacionadas com saturação obtida nos dentes. Não houve correlação

entre as leituras de saturação de oxigênio e as dimensões do dente (área superfície vestibular), frequência cardíaca, ou tempo de leitura oxímetro.

Em revisão da literatura, Saito et al. (2015) destacaram que nos artigos científicos recentemente publicados, o status atual das células-tronco obtidas da polpa dental. Uma vez que existe um grande interesse no estudo dessas células para posterior uso clínico no combate a doenças, compreender seus aspectos biológicos é importante. Contudo, devido à grande variedade de metodologias usadas para isolar e caracterizar as MSCs, o Comitê de células-tronco e tecidos adultos da sociedade Internacional de Terapia Celular propôs critérios mínimos para definir BMSCs e outros tipos de células-tronco mesenquimais *in vitro*. Resumidamente, as MSCs devem aderir ao plástico em condições de cultura padrão, expressar marcadores (CD) 105, CD73 e CD90, mas não expressar CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79a, CD19, nem moléculas de superfície dos leucócitos humanos, antígeno-DR e terem o potencial para se diferenciarem em linhagens osteogênica, condrogênica e adipogênica. Contudo, os critérios aqui definidos estão estendidos em outros estudos. O autor organizou os dados em uma tabela, onde reuniu estudos com diferentes fontes de células-tronco dos tecidos da cavidade oral. Fez ainda uma representação gráfica dos locais anatômicos de obtenção celular na cavidade oral, que pode ser observada na figura 1 exibida a seguir.

Figura 1:*Adaptação realizada a partir do original de Saito et al.



Ledesma-Martinez et al.(2016), em artigo de revisão, relacionou autores com os marcadores por eles analisados em seus respectivos trabalhos. Pôde-se perceber que há uma grande quantidade de possibilidades de marcação para células tronco obtidas de polpas dentárias. Por meio de extensa tabela, ele elencou os marcadores usado por diversos autores, evidenciado que não há uma padronização na caracterização das células-tronco obtidas de polpas dentárias. Assim, diversos conjuntos de marcadores podem ser utilizados para que se caracterize uma linhagem.

O presente estudo analisou comparativamente a eficiência de obtenção de células-tronco da polpa dentária humana a partir da instrumentação manual e rotatória.

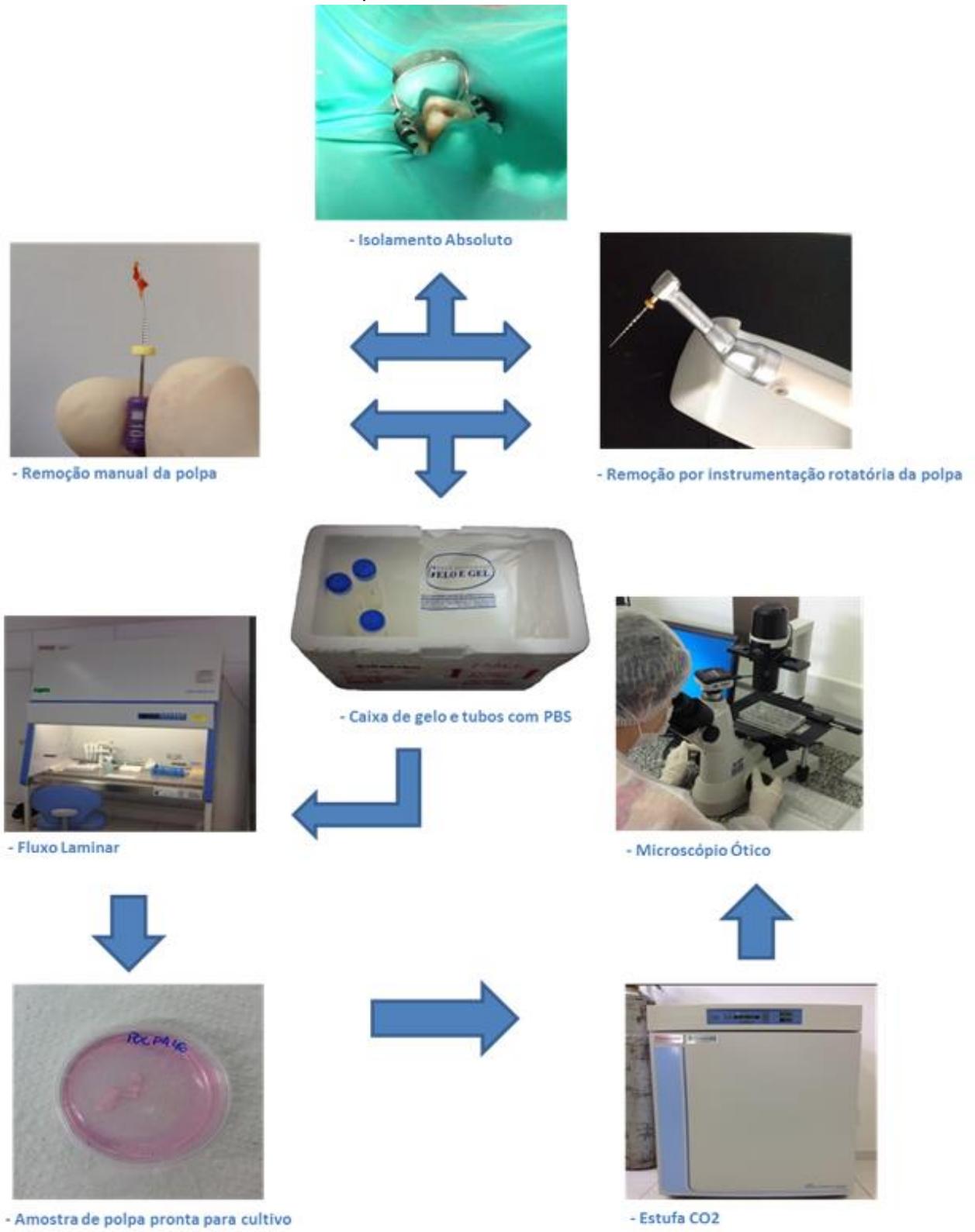
O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital Universitário da UFJF em abril de 2015, CAAE 43823115.6.0000.513, (ANEXO 1). O TCLE foi aprovado juntamente ao Projeto (Anexo 2). Todos os pacientes foram acompanhados pós-tratamento endodôntico, conforme protocolo definido, sem prejuízo ao paciente, independentemente da inclusão no estudo. As amostras e seus respectivos dados clínico-epidemiológicos foram armazenadas no Laboratório da Faculdade de Odontologia.

Foram incluídas na pesquisa todas as polpas vitais de dentes permanentes de pacientes maiores de dezoito anos, sem limite de idade, removidas com a autorização do paciente e com a devida indicação clínica para procedimento. Foram excluídos os elementos com presença de fístulas, edema, coroas escuras, mobilidade ou história de trauma, assim como elementos dentários que não permitissem a realização de isolamento absoluto para a remoção da polpa. Os pacientes foram avaliados em um setor especializado da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Juiz de Fora denominado Triagem e encaminhados para as clínicas de especialidades. Os pacientes foram atendidos pelos alunos de graduação e pós-graduação nas disciplinas clínicas da Faculdade de Odontologia da UFJF, na cidade de Juiz de Fora, sob supervisão do pesquisador responsável. Após anamnese, a verificação da vitalidade pulpar se deu por meios de testes de vitalidade. A partir do diagnóstico da indicação do tratamento endodôntico, o paciente foi informado da necessidade e, concordando com o plano de tratamento, o mesmo assinou o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), permitindo a utilização da polpa dentária na pesquisa. Quinze pacientes tiveram amostras colhidas tanto por instrumentação rotatória quanto por instrumentação manual. Esses quinze pacientes formaram tanto o grupo um quanto o grupo dois. No primeiro grupo, quinze polpas dentárias foram removidas com auxílio de uma instrumentação rotatória (grupo 1). No segundo grupo, quinze polpas foram removidas com lima endodôntica manual (grupo 2).

Os atendimentos foram padronizados, obedecendo à mesma sequência operatória, que iniciou pela profilaxia externa do elemento doador da polpa com o uso de escova de Robison e pasta profilática, isolamento absoluto do dente a ser tratado (com dique de borracha, grampo de isolamento e arco de Ostby), aplicação

de gaze estéril com clorexidina no campo operatório e no dente. Para a realização do acesso endodôntico, utilizamos canetas de alta rotação com brocas esféricas estéreis, e irrigação constante com soro fisiológico estéril, para evitar o aquecimento gerado no processo de corte do esmalte e dentina. No primeiro grupo, quinze polpas dentárias foram removidas com auxílio de uma instrumentação rotatória (grupo 1). O instrumento NiTiProTaper® SX foi utilizado com torque de 3 NCm e 250rpm, como preconizado pelo fabricante. O tempo de instrumentação era definido pela inspeção visual da superfície do instrumento, e o procedimento era interrompido quando se observava material preso ao corpo da lima rotatória. No segundo grupo, quinze polpas foram removidas com lima endodôntica manual (grupo 2). O tecido pulpar foi removido no comprimento de trabalho provisório com limas tipo K (Maillefer, Ballaigues, Suíça), de tamanho compatível com o canal radicular. O tecido pulpar extirpado em ambos os grupos foi colocado em um tubo de coleta estéril contendo solução salina balanceada (FBS). Após a remoção da polpa, os demais procedimentos do tratamento endodôntico tiveram continuidade. O dente foi transportado em um frasco estéril contendo PBS em baixa temperatura promovendo hipotermia, dentro de uma caixa térmica durante o seu transporte. Todas as amostras foram enviadas para análise na Faculdade de Odontologia da UFJF onde se deu início à cultura primária. Uma vez estabelecida a cultura, as células-tronco da polpa dentária obtidas de dentes permanentes humanos foram imunofenotipadas. Adicionalmente, foi realizada a confecção de lâminas para observação histológica dos tecidos a partir de polpas dentárias emblocadas em parafina.

Figura 2: metodologia esquematizada



O isolamento e cultivo das células-tronco da polpa dentária contou com a colaboração do GENETEC ICB/UFJF. O protocolo foi realizado como descrito por (GRONTHOS et al., 2000) e modificado pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Carlos Maranduba. A guarda do material biológico obtido foi realizada durante a pesquisa em Biorrepositório, situado na Faculdade de Odontologia.

4.1 Ensaio de MTT

Para avaliar o padrão de proliferação das células-tronco isoladas, foi utilizado o ensaio de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio, Sigma). No ensaio, 500 células/poço foram plaqueadas inicialmente (Dia 0) em uma placa de 96-poços (Corning) e as leituras foram realizadas nos 3^o, 5^o, 7^o dias. O meio de cultivo foi removido e foram adicionados 180 µl de meio puro acrescidos de 20 µl de MTT. Em seguida a placa foi mantida no escuro na estufa por 4 horas e, após esse período, o meio mais MTT foi removido e 200 µl de álcool isopropílico foram adicionados. A placa foi mantida no escuro na estufa por 1 hora, o sobrenadante foi transferido para uma nova placa e como controle 200 µl de álcool isopropílico ácido foram adicionados. A proliferação foi avaliada em espectrofotômetro à absorvância de 570nm. Os experimentos foram realizados em triplicata. Cerca de 5×10^3 células foram plaqueadas em placas 35x10 mm (Corning) e, a cada dois dias, o meio de cultivo foi removido, as células aderidas foram lavadas em PBS. A seguir, as células foram tratadas com 0,25% de tripsina-EDTA (Gibco) e incubadas a 37°C por 3 minutos. A tripsina foi neutralizada com meio α -mem (Invitrogen) contendo 15% (v/v) de Soro Fetal Bovino (Hyclone) e o sobrenadante foi centrifugado a 1.500rpm por 5 minutos. O pellet formado foi resuspendido em 1 ml de meio α -mem (Invitrogen) e o número de células foi estimado com auxílio da Câmara de Neubauer. As CTPDs foram re-plaqueadas em placas de 35x10 mm (Corning) e os experimentos foram repetidos sucessivamente até a passagem 16. Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.2 Diferenciação celular

Para diferenciação osteogênica, cerca de 5×10^3 células foram cultivadas em placas de 6 poços. Após 24 horas, o meio basal foi substituído pelo meio de diferenciação DMEM Low Glucose (DMEM-LG; Gibco) suplementado com 2% (v/v)

de soro Knockout (Gibco), 1% (v/v) Penicilina/estreptomicina e com os indutores osteogênicos (100 μ M de dexametasona e 50 μ M de 2-fosfato ácido ascórbico, ambos da Sigma). As trocas de meio foram realizadas a cada três ou quatro dias. No 10º dia da diferenciação, ambos os meios de cultura (experimental e controle) foram refeitos sendo suplementados com 200 mM de β -Glicerolfosfato (Sigma). Após 21 dias de cultivo, as amostras foram avaliadas pela coloração de Von Kossa, para determinar a deposição mineral.

4.3 Citometria de Fluxo

A análise de citometria de fluxo foi realizada nas culturas provenientes de polpas dentárias pelo método da instrumentação manual na quinta passagem (amostras P68 e P73). Para avaliar o perfil imunofenótipo dessas células, foi realizada desagregação enzimática com TrypLeExpress (Thermo Fisher Scientific). Foram incubadas com anticorpos conjugados em local abrigado de luz a 4º C, lavado duas vezes com PBS (1x) sem cálcio e magnésio e então, fixados com o Kit de permeabilização celular (Invitrogen, GAS004). Foram utilizados os seguintes anticorpos: FITC Mouse Anti-Human CD31 (BD Pharmingen 555445), APC Mouse Anti-Human CD73 (BD Pharmingen 560847), PE Mouse Anti-Human CD90 (BD Pharmingen 555596), PE Mouse Anti-Human CD166 (BD Pharmingen 559263), and FITC, PE and APC Mouse IgG1 κ Isotype Controls (BD Pharmingen 555748, 554681 and 555749, respectivamente) CD29 (BD Pharmingen:559883); CD146 (BD Pharmingen550315); CD105: (BD Pharmingen561443); CD34: (BD Pharmingen555824); CD45 (BD Pharmingen555482) seguindo sempre as recomendações do fabricante. Um mínimo de 10.000 eventos foram analisados no Guava EasyCyte (GuavaTechnologies) e analisados os resultados no software FlowJo – Single CellsAnalysis . Todo o processo de citometria foi realizado por intermédio de parceria entre nossa equipe e o pesquisador Luiz Caires, PhD Stem-Cells Lab –Human Genome and Stem Cells Research Center-Biosciences Institute – University of São Paulo. Universidade de São Paulo.

4.4 Caracterização histológica

Para a caracterização histológica dos tecidos dentários foram colhidas amostras usando os mesmos métodos descritos anteriormente. Foram separadas por critérios de idade do paciente, conforme descrito abaixo:

Tabela 1: Grupos para caracterização histológica

GRUPOS	Amostras colhidas
• GRUPO 1A Instrumentação Rotatória 20-40 anos	2
• GRUPO 1B Instrumentação Rotatória 41-60 anos	4
• GRUPO 2A Instrumentação Manual 20-40 anos	2
• GRUPO 2B Instrumentação Manual 41-60 anos	4

Os procedimentos histológicos, assim como a avaliação posterior dos resultados foram realizados com o auxílio da Professora Dr. Beatriz Julião Vieira Aarestrup, no Laboratório de Imunopatologia e Patologia Experimental CBR-UFJF. As polpas dentárias foram fixadas em formol 10% (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) para coloração de Hematoxilina-Eosina e paraformaldeído 4% (Sigma-Aldrich) em tampão fosfato 0,1M pH 7,4 para técnica de imunohistoquímica. Os processos de fixação dos tecidos foram feitos por 72 horas a 4°C. A partir disso, os tecidos foram lavados em água corrente por 10 minutos e a desidratação foi feita usando imersões dos dentes em concentrações crescentes de etanóis (70%, 80%, 90%) e, duas vezes de etanol 100% por uma hora cada. Após a polimerização da parafina, os blocos contendo as amostras foram cortados em micrótomo automático Leica RM2165 (Leica, Wetzlar, Alemanha) produzindo cortes sequenciais com aproximadamente 5µm. Os cortes foram cuidadosamente assentados em lâminas histológicas e deixados em estufa a 60°C por 16 horas para uma melhor fixação das amostras e consequente evaporação do resíduo de parafina.

Para realização da coloração por Hematoxilina-Eosina, os cortes de tecido dentário foram desparafinizados com duas imersões em xilol, seguidas de imersões subsequentes em concentrações de etanóis (100%,95%, 70%) por 10 minutos cada e por fim, uma imersão em água destilada de 5 minutos. Em seguida, as lâminas foram colocadas na coloração de Hematoxilina de Harris (Sigma-Aldrich) por 1 minuto e depois em água corrente por 10 minutos, para remoção do excesso do corante. As lâminas foram então coradas em Eosina (Sigma-Aldrich) por 3 minutos posteriormente foi realizado o processo de desidratação com etanol 95% e duas imersões em etanol 100% por 5 minutos cada. As lâminas foram montadas com Permount® (Fischer Scientific, Pittsburg, EUA).

Após a aprovação no comitê de ética em pesquisa, foi iniciada a coleta de amostras, sempre com a assinatura de TCLE. Quinze pacientes tiveram amostras colhidas tanto por instrumentação rotatória quanto por instrumentação manual. Com a aplicação da metodologia descrita foi possível obter células-tronco pelo método da instrumentação manual. O método de instrumentação rotatória não obteve nenhuma amostra de célula-tronco. Os totais de amostras colhidas foram agrupados em tabela apresentada a seguir (Tabela 2), assim como as respectivas médias de idade e contaminação observadas em cada grupo.

Tabela 2: Síntese dos dados obtidos em cada grupo, considerando apenas amostras coletadas no mesmo paciente

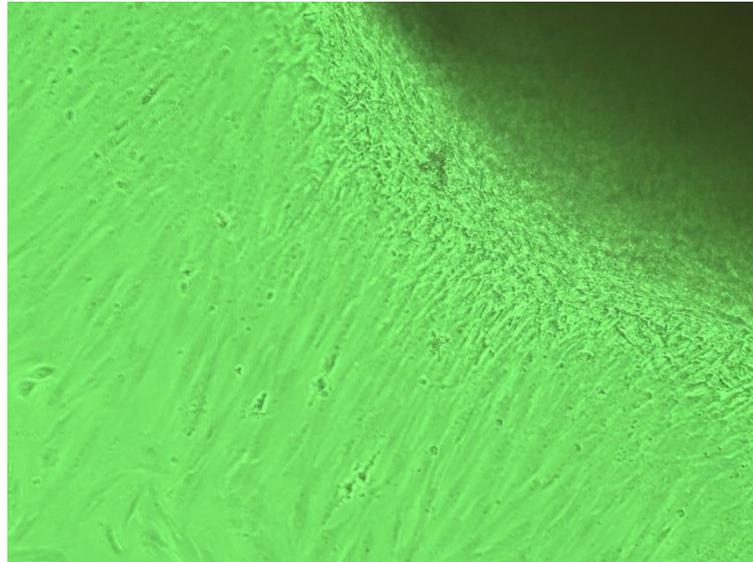
	Grupo 1	Grupo 2
	Instrumentação	instrumentação
	Rotatória	Manual
Total de amostras	15	15
Com células	0 (0%)	8 (53.4%)
Contaminadas	2 (14%)	1 (7%)
Amostras criopreservadas	0	08
Idade média	32.4 anos	34.2 anos
Idade média com células	Não calculável	35.75anos

Um total de doze amostras foram expandidas e criopreservadas para ensaios futuros. Não foi possível realizar a criopreservação em 4 destas amostras devido a uma falha ocorrida no freezer -80°C que levou à perda das mesmas. Dentre essas, se encontrava a amostra P43, que já tinha sido corretamente submetida a ensaios de diferenciação, mostrando sua capacidade em diferenciação adipogênica, osteogênica e odontogênica.

Para confirmação de obtenção de células-tronco, foram caracterizadas linhagens estabelecidas a partir de duas amostras representativas do grupo de instrumentação manual. A amostra denominada P68 (polpa 68) é de um paciente do sexo masculino, 60 anos de idade. O elemento dentário que cedeu a polpa foi um pré-molar (35) hígido. Já a amostra denominada P73 (polpa 73) é de um paciente do

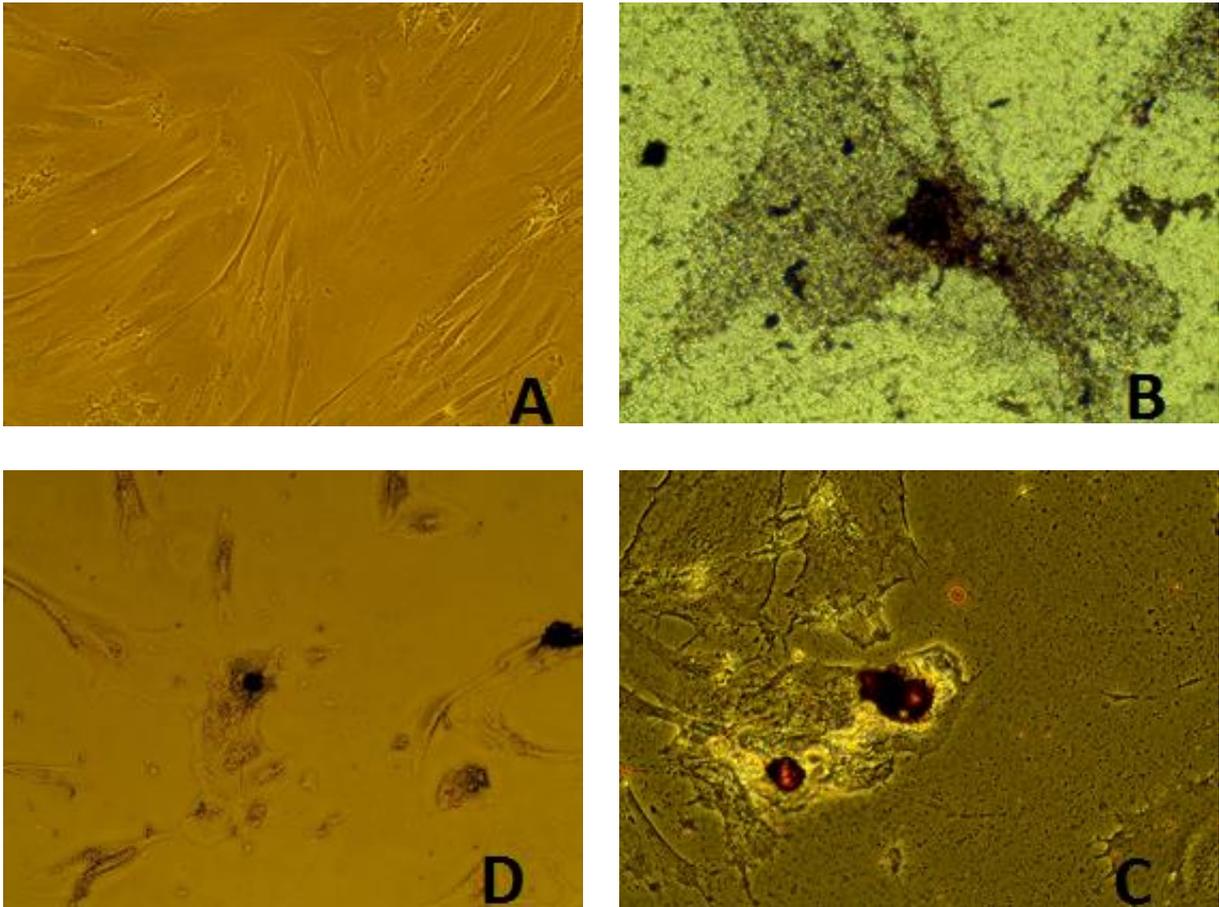
sexo feminino, 18 anos de idade. O elemento dentário que cedeu a polpa foi um terceiro molar (48) hígido.

Figura 3: Imagem em aumento de 100x da amostra P73 evidenciando êxodo celular a partir do explante da polpa.



Como resultados percebemos que as hDPSCs obtidas pelo método da instrumentação manual foram capazes de se diferenciar em linhagens adipogênica, condrogênica e osteogênica, conforme testes realizados na amostra P43., cuja imagem será apresentada na figura a seguir.

Figura 4: Culturas de células pulpares da Amostra representativa P43 na sua quinta passagem foram testadas para a habilidade de diferenciação *in vitro*. (A) células pulpares cultivadas sem indução de diferenciação para controle negativo. Aumento 100x(B) diferenciação osteogênica visualizada pelos depósitos de cálcio corados com *Alizarin Red*.. Aumento 200x(C) diferenciação adipogênica visualizada pela coloração de *OilRed*, mostrando vacúolos de lipídeos corados. Aumento 200x (D) Diferenciação odontogênicavisualizada com a coloração por *AlizarinRed*. - Aumento 100x



Na avaliação imunofenotípica por citometria de fluxo, todas as amostras avaliadas demonstraram expressão de: CD29 (P68 99.22%, P73 97.33%), CD90 (P68 99.81%, P73 99.64%), CD166 (P68 91,5%, P73 75.1%), CD146(P68 34,4%, P73 19.43%), CD73 (P68 99.08%, P73 100%), CD105 (P68 85%, P73 39%). Foi observada ainda, a ausência de expressão do marcador de células hematopoiéticas CD31 (P68 1,85%, P73 1.28%) CD34 (P68 0.5 %, P73 0.4%) CD45(P68 0,91%, P73 1.32%). Esses dados foram compatíveis com os resultados obtidos na revisão de literatura realizada por (LEDESMA-MARTINEZ, 2016) com relação à caracterização imunofenotípica das CTMs.

Figuras 5: Resultados da análise de citometria de fluxo para marcadores de superfície das células pulpares avaliadas na 5ª passagem da amostra representativa P73 na quinta passagem. (Fig 4A e 4B). As células foram incubadas com os anticorpos contra CD29, CD90, CD166, CD146, CD73, CD105, CD31, CD34.

Figura 5A – Histograma da citometria de fluxo Amostra P73

Polpa Dental – P73 (Quinta Passagem)

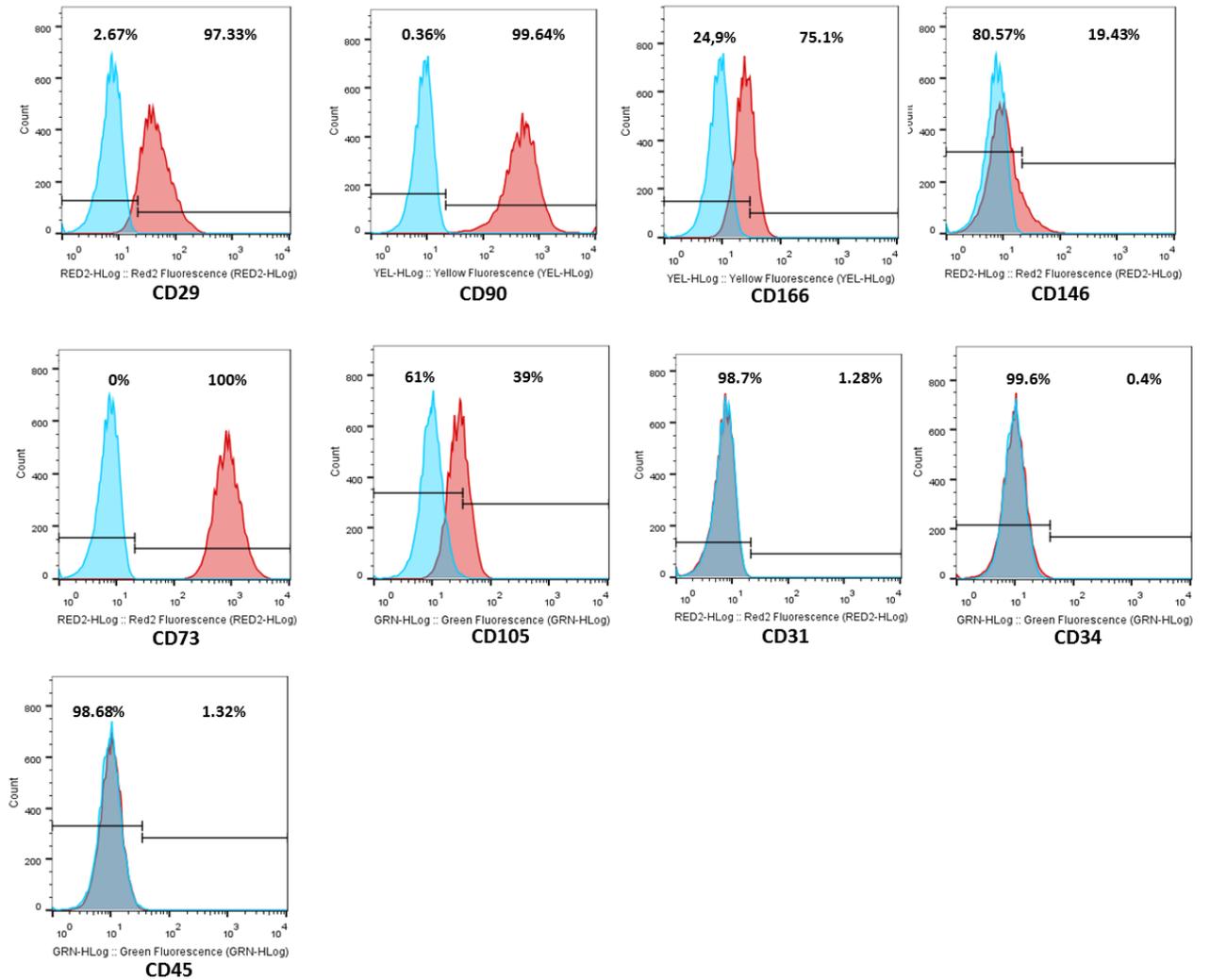
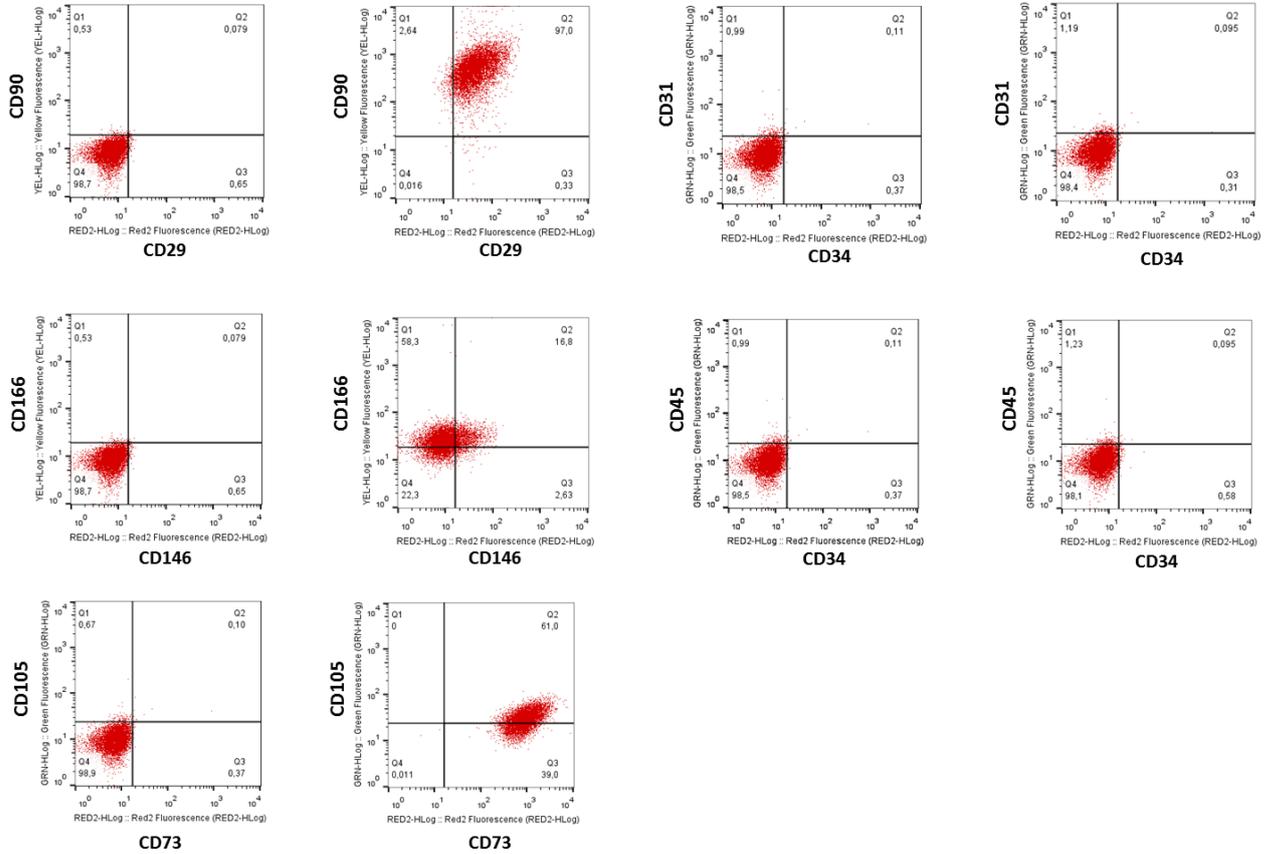


Figura 5B – Estatística de quadrante da citometria de fluxo Amostra P73

Polpa Dental – P73 (Quinta Passagem)



Figuras 6: Resultados da análise de citometria de fluxo para marcadores de superfície das células pulpares avaliadas na 5ª passagem da amostra representativa P68 na quinta passagem. (Fig. 5A e BB). As células foram incubadas com os anticorpos contra CD29, CD90, CD166, CD146, CD73, CD105, CD31, CD34.

Figura 6A – Histograma da citometria de fluxo Amostra P68.

Polpa Dental – P68 (Quinta Passagem)

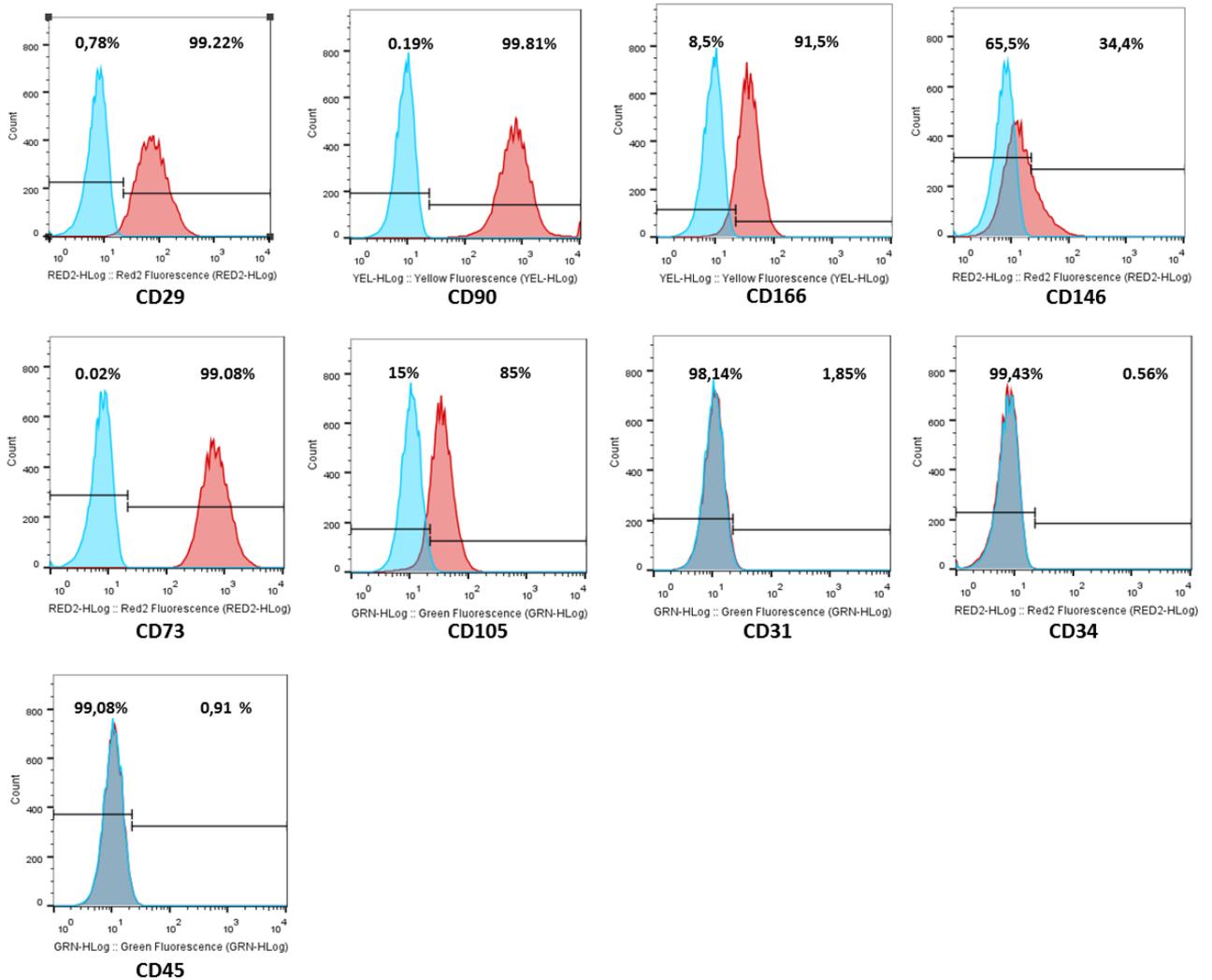
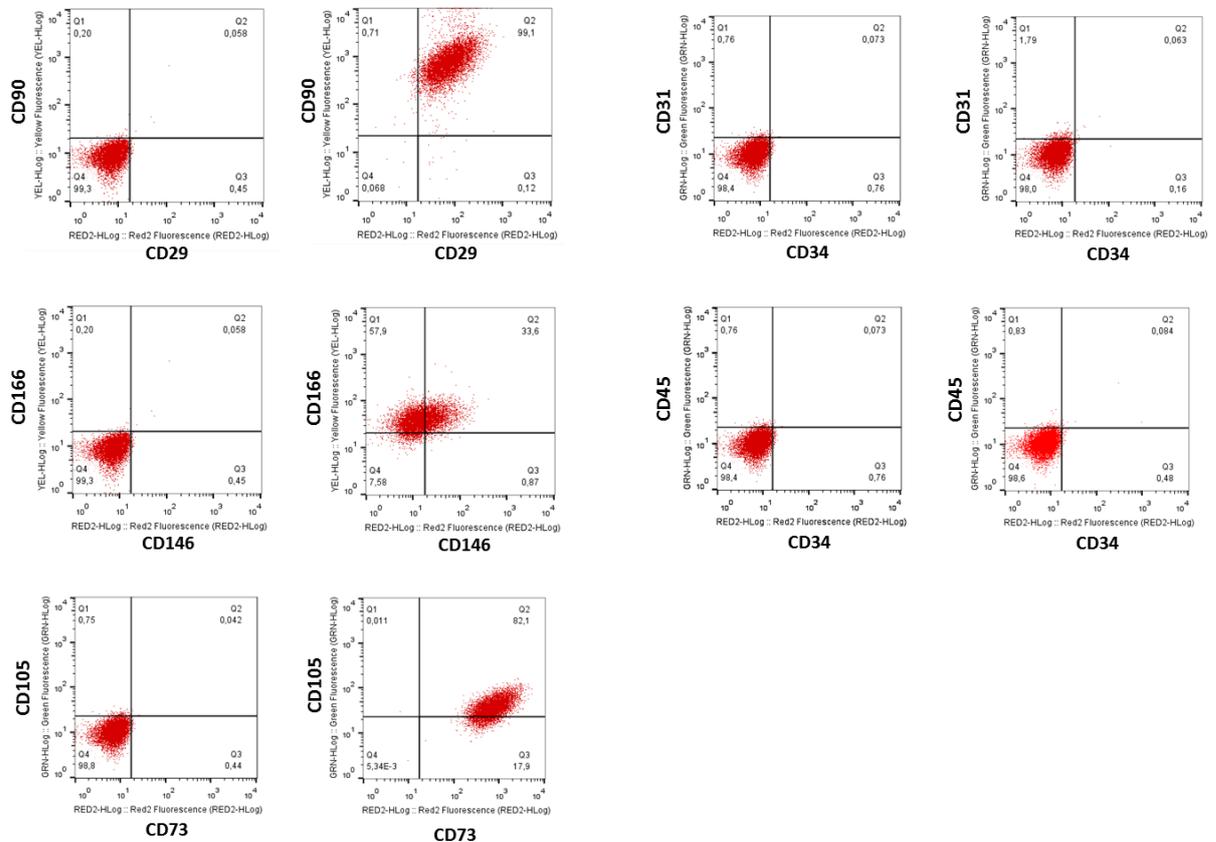


Figura 6B – Estatística de quadrante da citometria de fluxo Amostra P68.

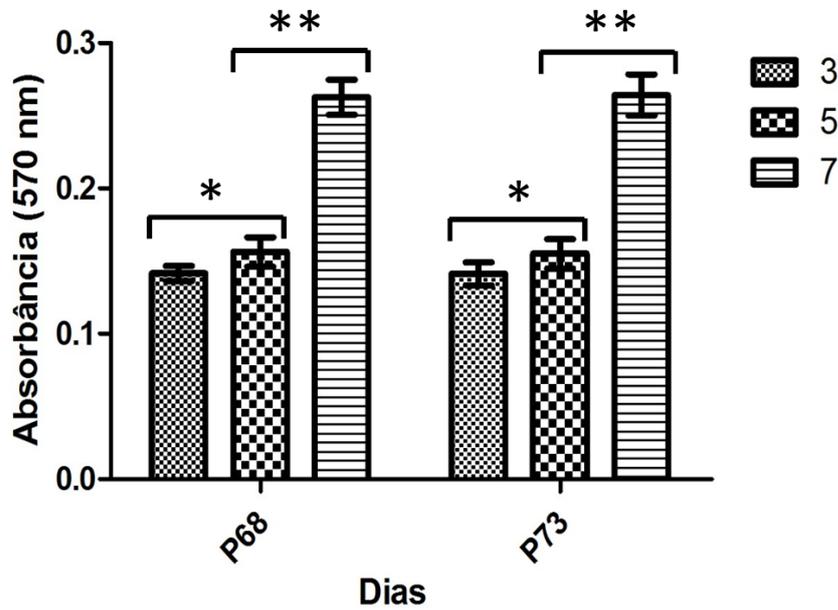
Polpa Dental – P68 (Quinta Passagem)



Análise do metabolismo celular (teste do MTT)

O ensaio de MTT foi realizado para observar a viabilidade celular das linhagens P68 e P73 após respectivamente 3, 5 e 7 dias de cultivo, no comprimento de onda de 570nm. Análises estatísticas dos dados referentes ao metabolismo celular foram submetidos ao teste estatístico de ANOVA. Todos os testes foram considerados ao nível de significância de 5%.

Figura 7: Resultados de ensaio de MTT

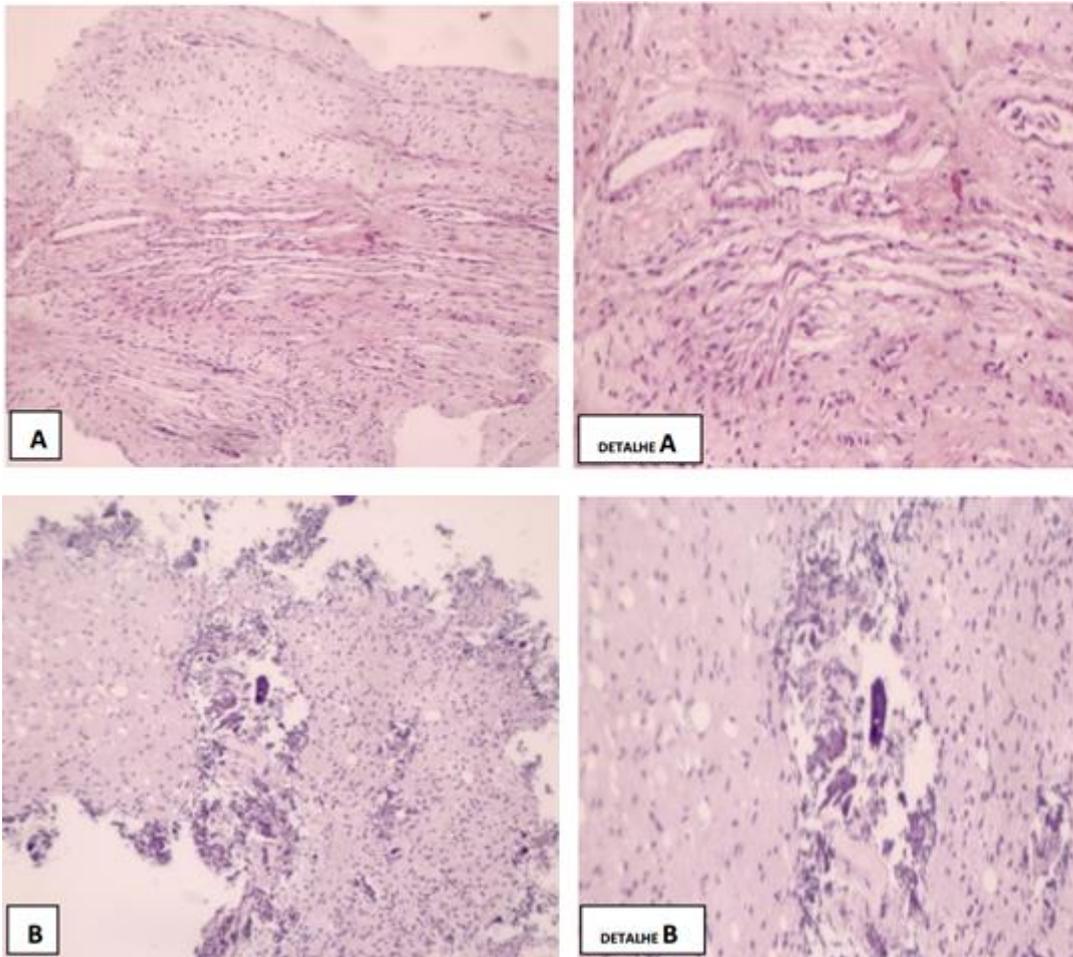


* $P > 0.05$ entre 3 e 5 dias.

** $P < 0.05$ (0.001) entre 5 e 7 dias ou 3 e 7 dias

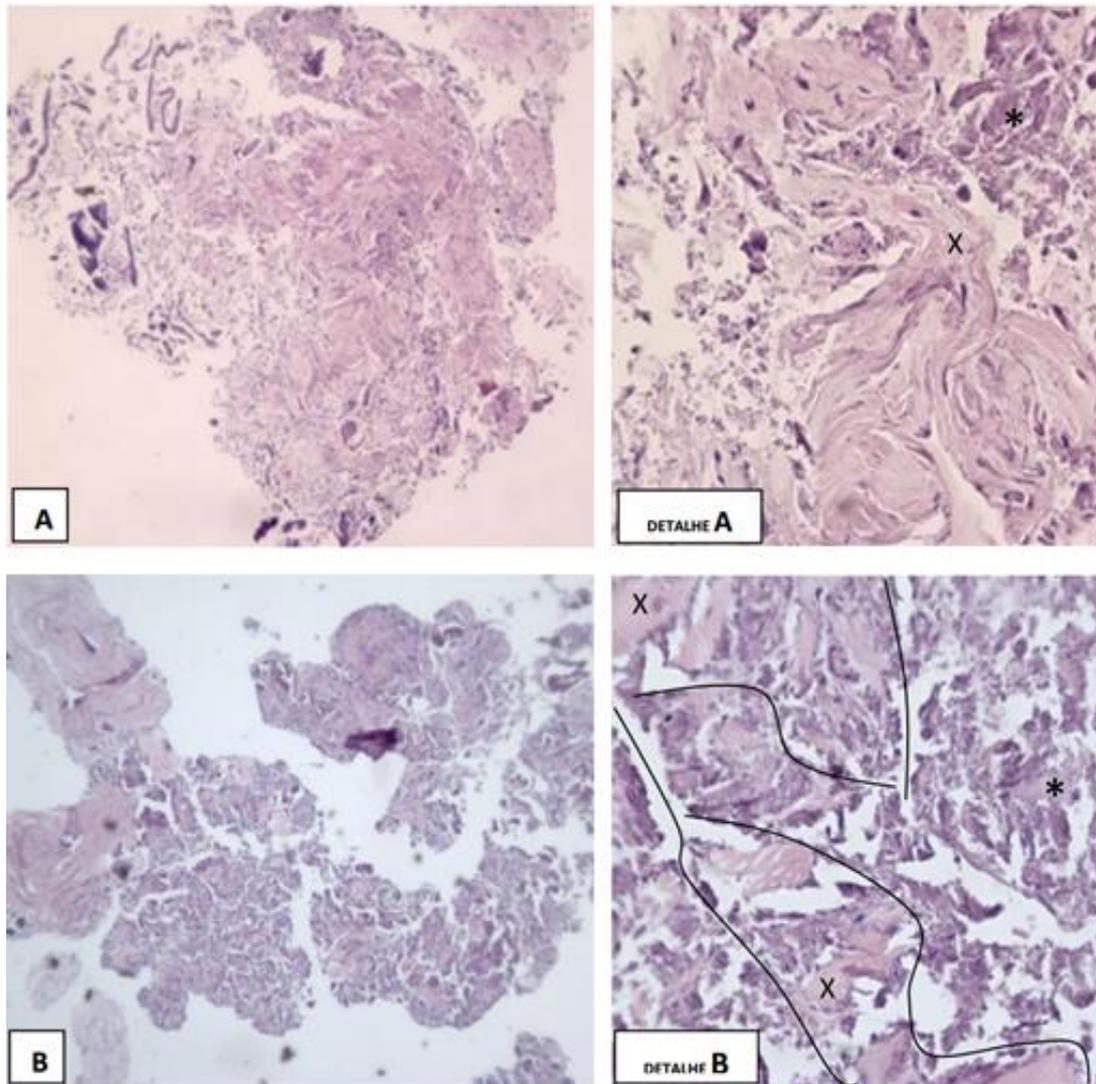
Para a caracterização histológica e análise de possíveis alterações morfológicas dos tecidos dentários, foram colhidas amostras usando os mesmos métodos descritos anteriormente. As amostras foram separadas por critérios de idade do paciente, conforme descrito anteriormente.

Figura 7. Imagens de cortes Histológicos do GRUPO 1A Instrumentação Rotatória 20-40 anos. COLORAÇÃO HE. AUMENTOS ORIGINAIS: PANORÂMICO 200X; DETALHES 400X.



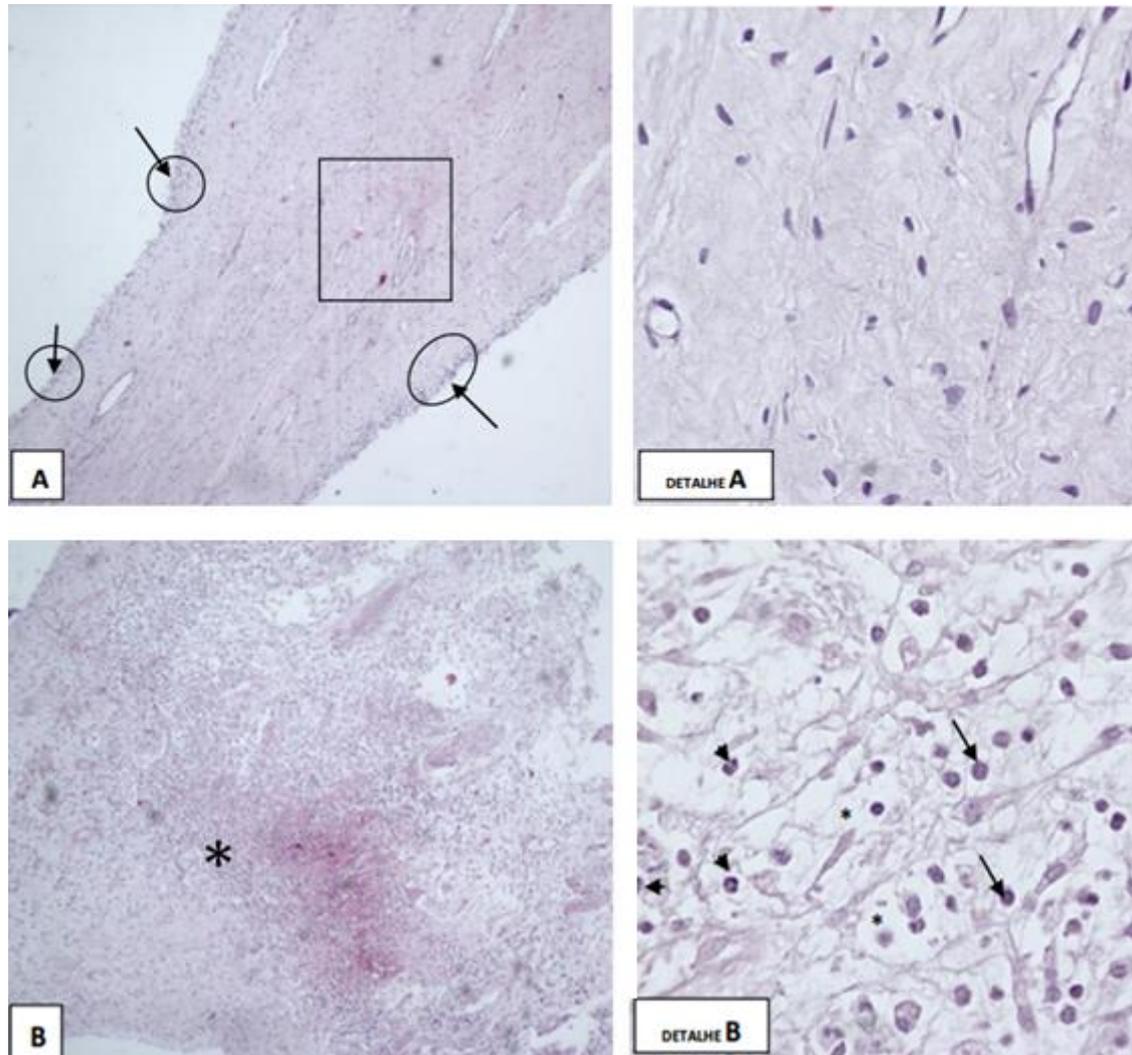
Na figura 7 estão imagens das amostras do GRUPO 1A. Elas se mostraram íntegras em observação panorâmica, mantendo sua estrutura histológica típica (A); destaca-se a preservação da arquitetura vascular e nervosa central, bem como as células desta região (detalhe A). Uma das amostras exibiu infiltrado inflamatório mononuclear de discreto a moderado, difuso e não associado a edema (detalhe B), reação devida à infecção ou traumatismo preexistente, não decorrente do manuseio para obtenção da amostra. Tal reação não prejudicou a integridade da amostra (B)

Figura 8. Imagens de cortes Histológicos do GRUPO 1B Instrumentação Rotatória 41-60 anos. COLORAÇÃO HE. AUMENTOS ORIGINAIS: PANORÂMICO 200X; DETALHES 400X.



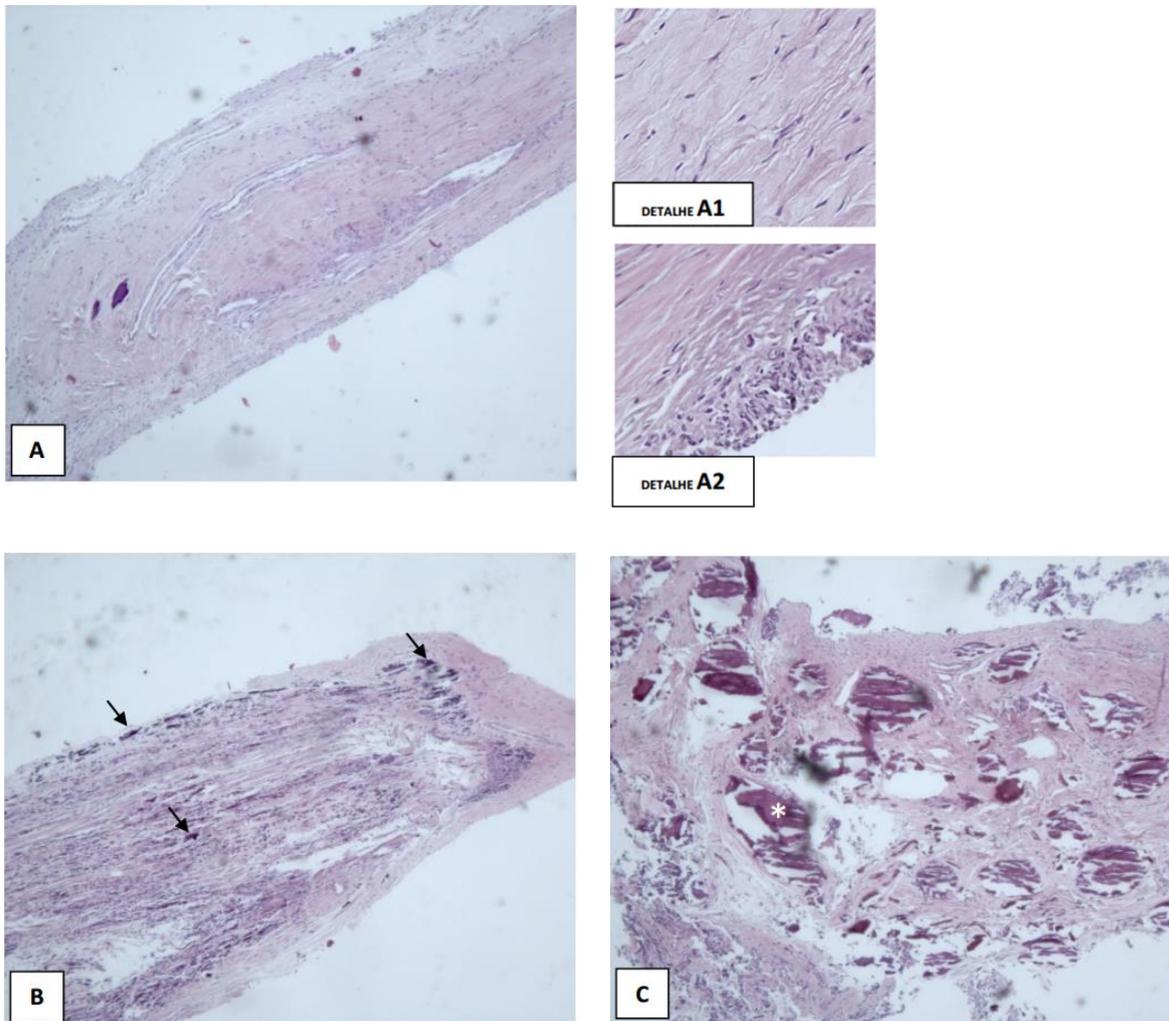
Na figura 8 veem-se imagens das amostras do GRUPO 1B. Elas apresentaram perda da arquitetura típica das camadas pulpares; em observação panorâmica, nota-se que houve um padrão alternado de áreas sugestivas de necrose e de desorganização tecidual com perda da integridade tecidual (ver detalhe A e B). Regiões basofílicas (assinaladas nas imagens com asteriscos), sugestivas de calcificação pulpar foram identificadas bem como áreas eosinofílicas (X), sugerindo necrose por traumatismo ou temperatura no processo de obtenção da amostra (detalhes A e B). Em ambas as regiões não há preservação de estruturas vasculares, nervosas ou possível caracterização celular, seja por parâmetros descritivos ou morfométricos. Destaca-se o padrão alternado nas amostras deste grupo (detalhe B).

Figura 9. Imagens de cortes Histológicos do GRUPO 2A Instrumentação Manual 20-40 anos. COLORAÇÃO HE. AUMENTOS ORIGINAIS: PANORÂMICO 200X; DETALHES 400X.



Na figura 9, observam-se imagens das amostras do GRUPO 2A. Essas amostras se mostraram íntegras em observação panorâmica, mantendo sua estrutura histológica típica em todas as camadas pulpares (A); destaca-se a preservação da arquitetura vascular e nervosa, bem como a celularidade na região central (área delimitada pelo quadrado), além da preservação das camadas subodontoblásticas e, possivelmente, odontoblástica (assinalado na Figura 9 com área delimitada pelos círculos e setas) (detalhe A). Uma das amostras (B) exibiu reação inflamatória moderada mista polimorfonucleares – cabeça de seta; mononucleares – setas), difusa e associada a edema (asterisco) (detalhe B); Tal reação pode ser devida a infecção ou traumatismo agudo preexistente, não decorrente do manuseio para obtenção da amostra; ela não prejudicou a integridade celular da amostra, a despeito de alterar o meio e aumentar a celularidade ocasional do tecido conjuntivo pulpar (detalhe B).

Figura 10. Imagens de cortes Histológicos do GRUPO 2B Instrumentação Manual 41-60 anos. COLORAÇÃO HE. AUMENTOS ORIGINAIS: PANORÂMICO 200X; DETALHES 400X.



Na figura 10, observam-se as imagens das amostras do de GRUPO 2B. Elas apresentaram manutenção geral da arquitetura pulpar (figuras A, B e C), com a presença de integridade celular, a despeito da baixa celularidade. Destaca-se a preservação especialmente nas bordas das amostras (detalhe A2). Regiões basofílicas (setas em B; asteriscos em C), sugestivas de calcificação pulpar foram identificadas nas regiões centrais. Há probabilidade de viabilização celular, porém não é possível caracterização da população por parâmetros descritivos ou morfométricos.

6.1 Discussão dos resultados

A busca de novas fontes de células-tronco mesenquimais como alternativa à medula óssea foi crescente na última década principalmente na medicina humana. Neste sentido, a polpa dentária destaca-se por ser fonte de fácil obtenção, de colheita não invasiva quando realizada durante tratamento endodôntico e com grande possibilidade de formação de bancos de armazenamento na medicina humana. Visando acumular maior conhecimento nesse campo do conhecimento, este trabalho objetivou analisar comparativamente a eficiência de obtenção de células-tronco da polpa dentária humana a partir da instrumentação manual e rotatória. Contudo, não foi possível comparar amostras entre os grupos, já que não se obteve resultados nas amostras do grupo baseado na instrumentação rotatória. Células-tronco de polpa de dentária de dentes permanentes foram isoladas apenas no grupo de instrumentação manual. Para critério estatístico buscamos destacar as amostras colhidas no mesmo paciente, tanto por instrumentação manual quanto por instrumentação rotatória. Isso nos permitiu analisar dois grupos com quantidades iguais de amostras, e excluir as variáveis sexo e tipo de elemento dental, que dessa maneira, eram os mesmos independente do grupo.

Devido à dificuldade em caracterizarmos por completo todas as doze amostras criopreservadas, escolhemos aquelas de pacientes com maior e menor idade. Assim, foi possível demonstrarmos que o método de instrumentação manual foi eficaz mesmo em pacientes de idade mais elevada. Chamou-nos atenção o fato de obtermos sucesso em amostras de pacientes com idades de 63 e 60 anos. Contudo, foi caracterizada apenas amostra do paciente de 60, já que ocorreu um problema no armazenamento de algumas amostras, nos levando à perda das mesmas. Infelizmente esse paciente de 63 anos teve as amostras perdidas durante inesperado defeito no freezer -80°C . Mesmo não sendo objeto direto deste presente trabalho, a equipe percebeu indícios de diferenças no tempo necessário para que se iniciasse o êxodo celular das polpas dos pacientes mais velhos, que foi bastante encorajador para que outros estudos se iniciassem objetivando elucidar a questão da idade no cultivo celular.

Fenotipicamente, as CTMs são caracterizadas por expressarem um conjunto de marcadores de superfície celular e ausência de outros. Com isso, uma lista desses marcadores tem sido descrita para definir essa população. Recentemente, a sociedade internacional de terapia celular propôs um critério mínimo para a definição/identificação de MSC devido às várias definições conflitantes nos artigos disponíveis. Inicialmente, MSC devem ser aderentes ao plástico quando em condições de cultura padrão. Em segundo lugar, MSC devem expressar CD105, CD73 e CD90 e falta de expressão de CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 α ou CD19 e HLA-DR de marcadores de superfície. Ledesma-Martinez et al., (2016) agruparam os marcadores utilizados por diversos autores em tabela. Nossos resultados foram compatíveis com os critérios adotados pela sociedade internacional de terapia celular. Da mesma forma, foram compatíveis com os dados dos autores citados por Ledesma- Martinez et al, quando se observou os mesmos marcadores por nós analisados:CD29 CD90,CD166,CD146,CD73,CD105,CD31, CD34,CD45.

A expressão de CD146 na amostra P73 foi baixa (19.43%) e foi moderada na amostra P68 (34,4%). O CD146 está relacionado com as células-tronco localizadas nos pericitos, sendo descrito como possível mantedor das células-tronco pulpares (SHI; GRONTHOS, 2003). Dessa forma, o nicho perivascular parece não ser o seu único provedor de células-tronco nas amostras analisadas. Os autores acreditam que esta variação sugere a existência de uma população heterogênea dentro da cultura, como já descrito por Miura e equipe (2003).

A vantagem da citometria de fluxo em analisar células individualmente consiste na detecção de uma variedade de estados fisiológicos celulares intermédios que realmente existem numa determinada população, descobrindo assim uma heterogeneidade populacional. Estas culturas são inicialmente heterogêneas, contudo com o passar do tempo tornam-se dominadas por fibroblastos. (SIGMA 2008) A preparação destas culturas ditas primárias é um processo que requer trabalho minucioso e demorado, apresentando como principal desvantagem um tempo de sobrevivência *in vitro* limitada. Apesar desta desvantagem, durante o seu curto período de vida, estas células têm como vantagem a capacidade de reter muitas das características de diferenciação observáveis em células *in vivo* (SIGMA 2008).

A existência de fibroblastos contaminantes pode explicar em parte as discrepâncias observadas nas culturas realizadas no presente trabalho. Para

Bronckaers et al. (2013), é muito claro que as células da polpa dental são ligeiramente positivas para CD146, enquanto as células endoteliais que formam as paredes dos vasos sanguíneos expressam quantidades elevadas de CD146.

O marcador CD105 (endoglina), relacionado com a neoformação vascular, foi analisado. Discrepâncias também foram notadas nas duas amostras analisadas. CD105 (P68 85%, P73 39%). Da mesma maneira que o CD146, CD105 discrepante sugere que estamos analisando populações com características fisiológicas diferentes, apesar de todas serem consideradas células-tronco. Dados discrepantes em CD105 foram notados também por Horibe et al., (2014), ao analisarem subpopulações de células-tronco tanto de pacientes mais velhos quanto mais novos. No trabalho desses autores, as subpopulações de células com maior resposta migratória a fator de estimulação de colônias de granulócitos (G-CSF) tanto no grupo dos pacientes mais velhos quanto nos mais novos, apresentou níveis de CD105 bastante mais elevados comparado aos níveis obtidos no grupo onde não houve essa separação das subpopulações.

Além disso, uma das propriedades biológicas mais importantes na caracterização das CTMs é a capacidade destas células em se diferenciarem em pelo menos três tecidos da linhagem mesenquimal. Desta forma, no presente experimento as amostras estudadas apresentaram capacidade de diferenciação osteogênica, adipogênica e odontogênica quando expostas aos respectivos meios indutores de diferenciação por 14 dias, confirmando os dados obtidos por Huang et al. (2014).

O ensaio de MTT realizado com as linhagens p68 e P73 nos permitiu avaliar que as células obtidas são saudáveis e se proliferam dentro de um padrão adequado, mantendo sua viabilidade ao longo do período analisado de cultivo que foi de 7 dias. Nenhuma diferença foi observada entre 3 e 5 dias, mas entre 5 e 7 dias, houve forte aumento de absorbância, compatível com o aumento da população que se espera observar após sete dias de cultivo. Esses dados foram similares aos observados por Huang et al. (2014).

6.2 Discussão da Metodologia

Apesar do insucesso na instrumentação rotatória, a remoção de polpa dentária por esse método se sustenta como proposta, baseada em questões laboratoriais. Ao se obter explante de polpa dentária, esse é fragmentado antes da cultura primária. Mas ao utilizarmos a forma de instrumentação rotatória, observa-se que a polpa obtida já é altamente fragmentada, deixando o material semi-triturado. Isso teoricamente seria uma vantagem desse método. Kerkiset al, (2006) ., assim como Dualibi et al. (2011), relataram que a polpa deveria ser repartida para as partes ficarem melhor expostas ao meio de cultura. O tecido pulpar extirpado a partir da câmara pulpar era triturado em pedaços pequenos com menos de 1mm de tamanho. Após isso a polpa triturada foi lavada em solução de Hank e digerida durante 30 a 40 minutos com 0,4mg/mL de colagenase tipo II, e 0,2mg/mL de dispase. Na metodologia que empregamos, o material obtido no método de instrumentação rotatória não sofreu digestão, foi lavado em PBS após centrifugação e colocado para cultivo direto. Imaginava-se que, pela intensa fragmentação tecidual, haveria uma facilitação da liberação dessas células-tronco, assim como melhor contato dos fragmentos ao meio de cultura. Mas a tese se mostrou falha, e parece que algum fator não foi levado em consideração, já que não se obteve nenhuma amostra nesse grupo. Em alguns casos, pode-se observar forte diferença visual quanto ao material obtido no grupo de instrumentação rotatória. Às vezes a polpa de enrolava ao instrumento e com poucos segundos de ação da lima no interior da cavidade pulpar, um fragmento mais íntegro era retirado. Contudo, na maioria das vezes o material obtido era similar a um esfregaço tecidual, obtido após um tempo maior de uso do instrumento no canal. O tempo de instrumentação era definido pela inspeção visual da superfície do instrumento, e o procedimento era interrompido quando se observava material preso ao corpo da lima rotatória. Não foi possível, portanto, fixar um tempo de ação do instrumento rotacionado a motor no canal radicular. A observação visual determinou o momento de cessar a remoção da polpa no grupo de instrumentação rotatória. A escolha da utilização do instrumento Protaper SX foi realizada em função do seu ângulo de ataque negativo, design que permite cortar de forma mais suave as paredes do canal, minimizando a produção de detritos de dentina nas amostras de polpas colhidas. Além disso, esse é um

instrumento que faz parte de um sistema popular entre cirurgiões-dentistas, denominado de Protaper Universal.

Segundo Capelli et al., (2004), ao se instrumentar canais radiculares, a temperatura externa radicular pode subir entre 0,4 até 1 grau celsius. Isso não é nocivo ao periodonto, mas mostra que existe aumento de temperatura interna no canal radicular, sendo este aumento um dado ainda não mensurado, mas certamente superior ao que foi observado na superfície radicular. Outro estudo, realizado por Ozkocak et al. (2015) utilizando 3 marcas comerciais diferentes de instrumentos endodônticos, observou aumento na superfície radicular de mais de 10 graus celsius. Deve-se destacar que o instrumento analisado realizava movimento reciprocante, mais moderno que o testado por nossa metodologia (rotatório) e ainda assim foi observado forte aumento de temperatura.

Para melhor elucidar a natureza do material obtido nos dois grupos, foi realizado estudo adicional para a análise histológica do material obtido, no qual polpas dentárias foram obtidas sob as mesmas condições descritas anteriormente para o cultivo. As informações obtidas vieram a corroborar o que foi sugerido na literatura quanto ao aumento de temperatura durante a instrumentação. Foram observadas áreas sugerindo necrose por traumatismo ou temperatura no processo de obtenção da amostra. Em amostra do GRUPO 1B, áreas alternadas foram observadas, gerando padrão compatível com o próprio design do instrumento endodôntico utilizado durante a remoção dessas polpas, que nesse trabalho foi NiTi ProTaper® SX . Essas áreas demonstram uma degradação do colágeno compatível com a causada por desnaturação devido a aquecimento. Esse aumento de temperatura pode ser o fator que impediu o sucesso no grupo de instrumentação rotatória, sendo que esse aumento de temperatura não ocorre no grupo de instrumentação manual. Essas são variáveis não controladas em nossa metodologia, mas que podem ter influenciado os resultados, podendo então ser alvo de trabalhos futuros nos quais se estabeleça uma forma de controle de temperatura durante a instrumentação.

Outro fator a se destacar é o estágio de formação radicular, que pode influenciar na quantidade de unidades formadoras de colônia de células-tronco. Dualibi et al. (2011) ao analisar terceiros-molares de 25 homens e 25 mulheres, observou maior índice de formação de colônias de células-tronco naqueles dentes cuja polpa foi removida quando o estágio de formação radicular era mais inicial.

DIAS (2012) realizou comparativo de obtenção e cultivo da polpa de dentes caninos e molares obtidos a partir de suínos. Nos suínos, apenas os caninos são hipsodontes, elementos dentários com crescimento contínuo. Desse modo, o autor pode realizar com sucesso o estabelecimento de culturas e avaliar as diferenças entre os dentes. A proliferação celular foi superior no canino em relação ao molar. Isso sugere que a maior atividade de desenvolvimento apical típica dos dentes hipsodontes pode interferir no cultivo celular. É importante lembrar que todos os dentes envolvidos na metodologia testada em nosso trabalho eram dentes permanentes e que, portanto, tinham raízes completamente formadas, o que poderia significar uma menor atividade.

Segundo Martens et al. (2012), é conhecido que, durante o desenvolvimento dos dentes, a papila dental contribuirá para a formação dos dentes e se converte em tecido pulpar dentro da câmara pulpar. À medida que a raiz continua a desenvolver, a localização da papila do dente fica mais apical em relação ao tecido pulpar. Para o autor, mais pesquisas são necessárias para identificar a localização exata dos nichos que poderiam ser úteis na compreensão se as células-tronco isoladas são derivadas a partir de uma mesma população de células multipotentes altamente proliferativas ou de progenitores pertencentes a linhagens distintas. Já o trabalho de Kaukua et al. (2014) levanta suspeita sobre a teoria de que as células-tronco estariam constantemente disponíveis na polpa dentária humana, mantendo a homeostase tecidual. Para ele, é possível que essas células sejam mobilizadas a partir da região apical em direção à polpa apenas em situação de necessidade. Essas células teriam ainda sua origem em células de Schwan, A equipe de estudiosos inseriu marcadores fluorescentes nas células glia (ou neuróglia) de ratos, células nervosas que nutrem e auxiliam os neurônios no processo de transmissão de informações. No caso, as células glia acompanhadas estão presentes na boca e nas gengivas, ajudando a transmitir os sinais de dor que partem dos dentes e alcançam o cérebro. Com o tempo, observou-se que algumas células neuróglia deixavam os neurônios das gengivas e se dirigiam ao interior dos dentes, onde se transformaram em células-tronco mesenquimais que, por sua vez, acabaram formando células dentárias. Se essas células não estiverem constantemente disponíveis na polpa, tal fato poderia ajudar a explicar casos nos quais não se obteve êxito em estabelecermos culturas primárias. Talvez as células não estivessem mobilizadas para aquele tecido naquele momento. Contudo, se a

agressão ao tecido pulpar levar a uma migração celular, então polpas inflamadas teriam êxito superior na obtenção de culturas primárias. Essa teoria não se comprovou no trabalho de Pereira et al (2012). No estudo dele a taxa de sucesso no estabelecimento de culturas de células foi de 100% a partir de polpas dentárias normais e, considerando polpas inflamadas, esta taxa foi de 70% para dentes extraídos e 50% para amostras obtidas por pulpectomia. À luz dos resultados obtidos por Pereira, inflamação grave não foi suficiente para destruir completamente a população de células-tronco da polpa dentária. Como a polpa dentária inflamada preserva células-tronco, pode ser encarada como uma fonte potencial para a regeneração de polpa dentária e engenharia de tecidos, e não apenas como um simples resíduo biológico. Os resultados reforçam a hipótese de que a pulpíte irreversível não está necessariamente associada com a depleção total de células-tronco da polpa funcional. Estudos adicionais devem abordar os eventos moleculares que poderiam afetar a viabilidade e potencial regenerativo da polpa. As células-tronco foram detectadas em dentes com pulpíte irreversível, mas não se sabe se eles poderiam ser uma fonte endógena de células multipotentes na regeneração de tecidos (WANG et al. 2010). Além disso, Giuroiu et al. (2015) mostraram a fraca relação entre diagnóstico clínico de pulpíte e diagnóstico histológico, demonstrando assim que polpas consideradas saudáveis clinicamente podem estar afetadas. Medições da pressão local em polpas inflamadas indicam que o seu aumento devido à inflamação é um evento localizado, que não é transmitido para o resto da polpa (ALONGI et al., 2010; TONDER; KVINNSLAND, 1983). Por isso, áreas com células viáveis seriam preservadas mesmo em casos de pulpíte. Isso evidencia a necessidade de estudos para uma maior compreensão do comportamento biológico dessas células bem como de sua própria origem.

A polpa é uma estrutura de tecido única, onde o isolamento de uma amostra de tecido se torna mais difícil com a idade, resultando em volume de tecidos e células significativamente menor. A coleta de amostras em dentes permanentes de pacientes com idade mais avançada poderia então ocorrer com maiores dificuldades e isso tem limitado sua pesquisa neste campo. Pesquisas atuais no campo da regeneração tecidual em Odontologia concentram-se principalmente nos tecidos mais jovens, em populações mais jovens. PDLSC e DPSC, que são tecidos dentais relacionados a MSC, têm o reconhecido potencial para ser isolados em uma dentição permanente.

Foi observado por Bressan et al. (2012) que há um aumento no tempo de replicação celular de culturas obtidas a partir de polpas doadas por pacientes de idade mais avançada, ressaltando que há uma menor atividade dessas células ao longo da idade. Contudo, ele mostrou que elas não perdem suas propriedades de plasticidade, continuando a ser então boas candidatas para uso em terapias celulares. Para Consolaro (2016), os dentes permanentes são mais ricos em células indiferenciadas e com grande potencial regenerativo, ao contrário das células dos dentes decíduos, cujas células da polpa estão em fase apoptótica. Estudo de Chen et al. (2009) sugere a não existência de diferenças entre hDPDCs derivadas de pacientes jovens ou velhos, em termos de taxa de crescimento e plasticidade condrogênica, osteogênica e adipogênica. Quando se observa o fator idade do paciente, é descrito também que as alterações decorrentes do processo fisiológico de redução da câmara pulpar, resultam em uma polpa com menor capacidade de formação de colônias de células-tronco. Contudo, não se sabe até que ponto essas alterações tornam essa polpa inviável para a obtenção de células-tronco. (BRESSAN et al., 2012).

Sloan e Waddington (2009) levantam questões significativas em relação à população de células progenitoras e seus nichos. Seriam esses nichos de células progenitoras finitos? Eles são adequadamente nutridos através de vascularização em polpas senis? O impacto potencial para tratamentos regenerativos é atualmente pouco conhecido. É descrito que há redução de sucesso em pulpotomias relativo ao aumento da idade. Dados de trabalhos clássicos em odontologia restauradora nos mostram baixa taxa de sucesso em capeamento pulpar de dentes permanentes, evidenciando que essa polpa dentária possui uma diferença fisiológica decorrente da idade (WILLERSHAUSEN et al., 2011). Trabalho de (STELLA et al., 2015), mostra que as taxas de saturação de oxigênio se mostraram maiores nos elementos dentários de indivíduos mais jovens, mostrando que gradualmente a estrutura da polpa dentária sofre alterações histomorfológicas. Talvez essas alterações venham a modificar a dinâmica do estabelecimento de culturas primárias em dentes permanentes. Curiosamente, em condições de hipóxia, com tensão de oxigênio igual a 3%, a células da polpa dentária proliferaram significativamente mais do que em condições de tensão de oxigênio a 20% (SAKDEE et al. 2009). Esse é um dado favorável para o cultivo de polpas de dentes permanentes adultos. Além disso, a hipóxia induziu o fator de crescimento endotelial vascular, e células de respostas

pró-angiogênicas para promover a revascularização da polpa dentária hipóxica (Aranha et al. 2010). No entanto, foi proposto que as condições de hipóxia poderiam ampliar o número de células progenitoras da polpa dentária humana, mas não favoreceriam a sua diferenciação (SAKDEE et al. 2009).

Apesar de tudo, em oposição às condições de dificuldade descritas na literatura para o cultivo de polpas dentárias obtidas em dentes permanentes, fomos capazes de obter células-tronco mesmo em pacientes de idade mais elevada. Com isso, ficou demonstrado que o método de obtenção de polpas por via endodôntica é viável. Dessa maneira, surgem novas perspectivas para a endodontia e para a medicina regenerativa ao vislumbrarmos utilidade em um material que é descartado pelos endodontistas.

Através da análise dos resultados obtidos no presente trabalho, considerando os parâmetros e protocolos utilizados para compararmos a eficiência de obtenção de células-tronco da polpa dentária humana a partir da instrumentação manual e rotatória, pode-se concluir que:

A técnica de remoção manual da polpa permitiu o estabelecimento de cultura de células-tronco derivadas de polpa dentária de dentes permanentes humanos em 53% das amostras.

Não se estabeleceu cultura de células-tronco derivadas de polpa dentária de dentes permanentes humanos, a partir de nenhuma das amostras obtidas pela instrumentação rotatória.

Com base na caracterização celular, molecular e funcional das células-tronco derivadas das polpas dentárias cultivadas, sugerimos que as mesmas possuem características mesenquimais.

ALONGI, D. J. et al. Stem/progenitor cells from inflamed human dental pulp retain tissue regeneration potential. **Regen Med**, v. 5, n. 4, p. 617-31, Jul 2010.

ARORA, V.; ARORA, P.; MUNSHI, A. Banking stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED): saving for the future. **Journal of Clinical Pediatric Dentistry**, v. 33, n. 4, p. 289-294, 2009.

ATTAR, A. et al. Dental pulp polyps contain stem cells comparable to the normal dental pulps. **J Clin Exp Dent**, v. 6, n. 1, p. e53-9, Feb 2014.

BRESSAN, E. et al. Donor age-related biological properties of human dental pulp stem cells change in nanostructured scaffolds. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. e49146, 2012.

BRONCKAERS, A. et al. Angiogenic Properties of Human Dental Pulp Stem Cells. **PLoS One**, v. 8, n. 8, 2013.

CAPELLI, A. et al. In vitro evaluation of the thermal alterations on the root surface during preparation with different Ni-Ti rotary instruments. **Braz Dent J**, v. 15, n. 2, p. 115-8, 2004.

CHAN, A. W.; WONG, A. Y.; LEE, H. M. A patent perspective on US stem cell research. **Nat Biotechnol**, v. 32, n. 7, p. 633-637, Jul 8 2014.

CHIEN, K. H.; CHIOU, S. H. Teeth and dental pulp tissue: the origin for generating induced pluripotent stem cells? **J Chin Med Assoc**, v. 77, n. 12, p. 605-7, Dec 2014.

CONSOLARO, A. Should deciduous teeth be preserved in adult patients? How about stem cells? Is it reasonable to preserve them? **Dental Press J Orthod**, v. 21, n. 2, p. 15-27, Mar-Apr 2016.

DUALIBI, M. T. et al. Tooth Tissue Engineering: Optimal Dental Stem Cell Harvest Based on Tooth Development. **Artificial Organs**, v. 35, n. 7, p. E129-E135, Jul 2011.

ESLAMINEJAD, M. B. et al. In vitro Growth and Characterization of Stem Cells from Human Dental Pulp of Deciduous Versus Permanent Teeth. **J Dent (Tehran)**, v. 7, n. 4, p. 185-95, Fall 2010.

EUBANKS, E. J.; TARLE, S. A.; KAIGLER, D. Tooth storage, dental pulp stem cell isolation, and clinical scale expansion without animal serum. **J Endod**, v. 40, n. 5, p. 652-7, May 2014.

Freshney IR. Culture of Animal Cells A Manual of Basic Technique, 5 [sup]th Ed, New Jersey: Wiley Liss Publication, John Wiley Inc.; 2007.

GARZÓN, I.; MARTIN-PIEDRA, M. A.; ALAMINOS, M. Human Dental Pulp Stem Cells. A promising epithelial-like cell source. **Medical Hypotheses**, v. 84, n. 5, p. 516-517, 2015.

GIUROIU, C. L. et al. Dental Pulp: Correspondences and Contradictions between Clinical and Histological Diagnosis. **Biomed Res Int**, v. 2015, p. 960321, 2015.

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 5 2000.

GRONTHOS, S. et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. **J Dent Res**, v. 81, n. 8, p. 531-5, Aug 2002.

HILKENS, P. et al. Effect of isolation methodology on stem cell properties and multilineage differentiation potential of human dental pulp stem cells. **Cell and Tissue Research**, v. 353, n. 1, p. 65-78, Jul 2013.

HORIBE, H. et al. Isolation of a stable subpopulation of mobilized dental pulp stem cells (MDPSCs) with high proliferation, migration, and regeneration potential is independent of age. **PLoS One**, v. 9, n. 5, p. e98553, 2014.

HUANG, A. H. et al. Isolation and characterization of human dental pulp stem/stromal cells from nonextracted crown-fractured teeth requiring root canal therapy. **J Endod**, v. 35, n. 5, p. 673-81, May 2009.

HUANG, C. E. et al. Concurrent expression of Oct4 and Nanog maintains mesenchymal stem-like property of human dental pulp cells. **Int J Mol Sci**, v. 15, n. 10, p. 18623-39, 2014.

JESUS, A. A. D. et al. Coleta e cultura de células-tronco obtidas da polpa de dentes decíduos: técnica e relato de caso clínico. **Dental Press Journal of Orthodontics**, v. 16, p. 111-118, 2011.

KARAMZADEH, R.; ESLAMINEJAD, M. B.; AFLATOONIAN, R. Isolation, Characterization and Comparative Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells Derived from Permanent Teeth by Using Two Different Methods. **Journal of Visualized Experiments : JoVE**, n. 69, p. 4372, 11/24 2012.

KAUKUA, N. et al. Glial origin of mesenchymal stem cells in a tooth model system. **Nature**, v. 513, n. 7519, p. 551-4, Sep 25 2014.

KERKIS, I. et al. Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. **Cells Tissues Organs**, v. 184, n. 3-4, p. 105-116, 2006.

LEDESMA-MARTINEZ, E.; MENDOZA-NUNEZ, V. M.; SANTIAGO-OSORIO, E. Mesenchymal Stem Cells Derived from Dental Pulp: A Review. **Stem Cells Int**, 2016.

LEONARDI, D. P. et al. Undergraduate Students Introduction to Manual and Rotary Root Canal Instrumentation. **The Bulletin of Tokyo Dental College**, v. 53, n. 3, p. 155-159, 2012.

MARTENS, W. et al. Expression pattern of basal markers in human dental pulp stem cells and tissue. **Cells Tissues Organs**, v. 196, n. 6, p. 490-500, 2012.

MIURA, M. et al. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 10, p. 5807-5812, May 13, 2003 2003.

OZKOCAK, I. et al. Temperature increases on the external root surface during endodontic treatment using single file systems. **Niger J Clin Pract**, v. 18, n. 5, p. 676-80, Sep-Oct 2015.

PIERDOMENICO, L. et al. Multipotent Mesenchymal Stem Cells with Immunosuppressive Activity Can Be Easily Isolated from Dental Pulp. **Transplantation**, v. 80, n. 6, p. 836-842, 2005.

ROSA, V.; BOTERO, T. M.; NOR, J. E. Regenerative endodontics in light of the stem cell paradigm. **Int Dent J**, v. 61 Suppl 1, p. 23-8, Aug 2011.

SAITO, M. T. et al. Tooth-derived stem cells: Update and perspectives. **World J Stem Cells**, v. 7, n. 2, p. 399-407, Mar 26 2015.

SHI, S.; GRONTHOS, S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. **J Bone Miner Res**, v. 18, n. 4, p. 696-704, Apr 2003.

SIGMA (2008). Fundamental Techniques in Cell Culture... A Laboratory Handbook, **SIGMA Laborartories**.

SILVA *et al.* Toward personalized cell therapies by using stem cells: seven relevant topics for safety and success in stem cell therapy. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p.1-12, 2012.

SILVA FDE, S. et al. Mesenchymal stem cells derived from human exfoliated deciduous teeth (SHEDs) induce immune modulatory profile in monocyte-derived dendritic cells. **PLoS One**, v. 9, n. 5, p. e98050, 2014.

SLOAN, A. J.; WADDINGTON, R. J. Dental pulp stem cells: what, where, how? **Int J Paediatr Dent**, v. 19, n. 1, p. 61-70, Jan 2009.

STELLA, J. P. et al. Oxygen Saturation in Dental Pulp of Permanent Teeth: Difference between Children/Adolescents and Adults. **J Endod**, Jun 18 2015.

SUCHANEK, J. et al. Human dental pulp stem cells--isolation and long term cultivation. **Acta Medica (Hradec Kralove)**, v. 50, n. 3, p. 195-201, 2007.

SUN, H. H. et al. Investigation of dental pulp stem cells isolated from discarded human teeth extracted due to aggressive periodontitis. **Biomaterials**, v. 35, n. 35, p. 9459-72, Nov 2014.

TIRINO, V. et al. Identification, isolation, characterization, and banking of human dental pulp stem cells. **Methods Mol Biol**, v. 879, p. 443-63, 2012.

TONDER, K. J.; KVINNSLAND, I. Micropuncture measurements of interstitial fluid pressure in normal and inflamed dental pulp in cats. **J Endod**, v. 9, n. 3, p. 105-9, Mar 1983.

TORIUMI, T. et al. Characterization of mesenchymal progenitor cells in the crown and root pulp of primary teeth. **Biomed Res**, v. 36, n. 1, p. 31-45, 2015.

VASANDAN, A. B. et al. Functional differences in mesenchymal stromal cells from human dental pulp and periodontal ligament. **J Cell Mol Med**, v. 18, n. 2, p. 344-54, Feb 2014.

WANG, Z. et al. Putative stem cells in human dental pulp with irreversible pulpitis: an exploratory study. **J Endod**, v. 36, n. 5, p. 820-5, May 2010.

WILLERSHAUSEN, B. et al. Retrospective study on direct pulp capping with calcium hydroxide. **Quintessence Int**, v. 42, n. 2, p. 165-71, Feb 2011.

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE
JUIZ DE FORA-MG



COMPROVANTE DE ENVIO DO PROJETO

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise comparativa da eficiência de obtenção de células-tronco da polpa dentária humana a partir de instrumentação manual e rotatória.

Pesquisador: ANTÔNIO MÁRCIO RESENDE DO CARMO

Versão:

1

CAAE: 43823115.6.0000.5133

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA UFJF

DADOS DO COMPROVANTE

Número do Comprovante: 028544/2015

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

Recomendações:

nenhum

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

nenhum

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Apêndice 1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP HU/UFJF
JUIZ DE FORA – MG – BRASIL

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (Biorrepositório)

O Sr. (a) está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa “**Análise comparativa da eficiência de obtenção de células-tronco da polpa dentária a partir de instrumentação manual e rotatória.**”. Para tanto, pedimos a sua autorização para a coleta, o depósito, o armazenamento, a utilização e descarte do material biológico humano “**POLPA DENTÁRIA,**” cuja utilização está expressamente vinculada somente a esse projeto de pesquisa. Nesta pesquisa pretendemos: (1) obter de células-tronco adultas da polpa dentária humana, (2) caracterizar as células-tronco quanto tipo, capacidade de se multiplicar e envelhecimento celular; e (3) diferenciá-las, visando testar a capacidade de se transformarem em tecidos diferentes. Para esta pesquisa adotaremos os seguintes procedimentos: A “**polpa dentária**” será obtida de dentes permanentes com indicação clínica para tratamento de canal. O material será coletado em frascos apropriados e estéreis. Todas as amostras obtidas serão armazenadas em nitrogênio (-196°C), visando desenvolvimento de pesquisa. A princípio todo material coletado será usado em pesquisa específica até que termine, porém caso seja necessário descartá-lo por razões de estocagem ou espaço os mesmos poderão ocorrer. Entretanto, conforme preconizado na Resolução CNS 441/2011 item 8, os participantes serão notificados sobre perda ou destruição de suas amostras, bem como sobre o encerramento da pesquisa. O descarte do material biológico humano armazenado em BIORREPOSITÓRIO pode ocorrer: a) pela manifesta vontade do sujeito da pesquisa; b) devido à inadequação da amostra por critérios de qualidade; c) por iniciativa da instituição; e d) pela dissolução do BIORREPOSITÓRIO. Os riscos envolvidos na pesquisa consistem em “**RISCOS MÍNIMOS**”, uma vez que os materiais biológicos mencionados são descartados no lixo hospitalar após sua indicação clínica. O benefício que esta pesquisa trará é que permitirá entender melhor os mecanismos moleculares e celulares de certas doenças humanas, usando as células-tronco como modelo, visando melhorar futuros tratamentos. Para participar deste estudo o Sr. (a) não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Apesar disso, caso sejam identificados e comprovados danos provenientes desta pesquisa, o Sr.(a) tem assegurado o direito à indenização. O Sr. (a) terá o esclarecimento sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar e a qualquer tempo e sem quaisquer prejuízos, pode retirar o consentimento de guarda e utilização do material biológico armazenado no Biorrepositório, valendo a desistência a partir da data de formalização desta. A sua participação é voluntária, e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que o Sr. (a) é atendido (a) pelo pesquisador, que tratará sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão. O (A) Sr. (a) não será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em **DUAS VIAS ORIGINAIS**, sendo que uma será arquivada pelo pesquisador responsável, no “**LABORATÓRIO DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA**”, e a outra será fornecida ao Sr. (a). Os dados e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5 (cinco) anos, e após esse tempo serão destruídos. Os pesquisadores tratarão a sua identidade com padrões profissionais

de sigilo, atendendo a legislação brasileira (Resolução Nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde e suas normas complementares), utilizando as informações somente para os fins acadêmicos e científicos.

Eu, _____, portador do documento de Identidade _____ fui informado (a) dos objetivos da pesquisa “**Análise comparativa da eficiência de obtenção de células-tronco da polpa dentária a partir de instrumentação manual e rotatória.**”, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar.

MATERIAL DOADO: POLPA DENTÁRIA

Em caso de **projetos futuros** (Resolução CNS 441/11, item 6 e Portaria MS 2.201/11, capítulo II, artigo 5 e capítulo IV, seção II, artigos 17, 18 e 22) , declaro:

A necessidade de novo consentimento a cada pesquisa.

Sim Não Telefone: _____ .

A dispensa de novo consentimento a cada pesquisa. Sim Não Telefone: _____ .

Em caso de óbito ou condição incapacitante, expresse a minha vontade de cessão dos direitos sobre o material armazenado para:

Sucessores: _____, contato _____ .

Investigador Principal do referido estudo. _____ .

Outros: _____, contato _____ .

Declaro que concordo em participar. Recebi uma via original deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Juiz de Fora, _____ de _____ de 20____ .

Nome	Assinatura participante	Data
------	-------------------------	------

Nome	Assinatura pesquisador	Data
------	------------------------	------

Em caso de dúvidas, com respeito aos aspectos éticos desta pesquisa, você poderá consultar:

CEP HU – Comitê de Ética em Pesquisa HU/UFJF

Hospital universitário Unidade Santa Catarina

Prédio da Administração Sala 27

CEP 36036-110 Telefone 4009-5205

E-mail: cep.hu@ufjf.edu.br

Nome do Pesquisador Responsável: Antônio Márcio Resende do Carmo

Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF)

Faculdade de odontologia –Departamento de Clínica Odontológica

Rua José Lourenço Kelmer, s/n - Campus Universitário

Bairro São Pedro - CEP 36036-900

Juiz de Fora/MG - Brasil

Tel (32) 2102-6300 Ramal 25

Email: antoniomarcio.resende@ufjf.edu.br

Tabela 4: Síntese das metodologias revisadas

AUTOR	TIPO CELULAR	AMOSTRA	METODO DE REMOÇÃO DA POLPA	MEIO DE CULTURA	PLASTICIDADE
GRONTHOS et al. (2000)	hDPCs; BMSCs	Terceiro molares (19-29 anos) (quantidade não informada)	A coroa do dente foi cortada acima da junção amelo-cementária - BROCAS	α -MEM suplementado com 20% FCS 100 μ M L-ácido ascórbico 2mM L-glutamina 100 units/ml penicilina 100 g/ml estreptomicina	Formação in vivo de material dentinóide.
KERKIS et al. (2006)	IDPSCs		Instrumento extirpa nervos, em dente seccionado.	DMEM/F12 com suplementação de 15% de soro fetal bovino, FBS.	Condrogênica, osteogênica, neuronal e miogênica.
SUCHANEK et al. (2007)	DPSCs	16 terceiro molares (12-23 anos) 4 pré molares (12 - 9anos) 2 decíduos (8 anos)	Uso de disco diamantado (método foi descartado) Uso de broca diamantada com refrigeração, fórceps Luer e instrumento extirpa nervos.	α -MEM , 2 % FCS , EGF ,PDGF e dexametasona . Em alguns casos suplementação com ITS.	Não realizada, apenas viabilidade e tempo de duplicação.

Tabela 4: Síntese das metodologias revisadas – continuação

AUTOR	TIPO CELULAR	AMOSTRA	METODO DE REMOÇÃO DA POLPA	MEIO DE CULTURA	PLASTICIDADE
ESLAMINEJAD et al.(2010)	hDPCs	Terceiro molares (20-25 anos) Decíduos (7-12 anos)	?	DMEM suplementado com 15% soro fetal bovino (FBS)	Odontoblastica, osteogênica, adipogênica, condrogênica.
JESUS et al. (2011)	hDPCs	21 dentes permanentes extraídos de 11 pacientes com idades de 13 a 36 anos.	Sulco longitudinal com disco diamantado flexível, sem atingir o tecido pulpar. Secção de dentes com uma alavanca cirúrgica. Separação do tecido pulpar por uma cureta de dentina estéril.	DMEM suplementado com soro fetal bovino 20% e antibiótico-antimicótico 1%,	Deposição de cálcio em meio osteogênico e acúmulos lipídicos em meio adipogênico.
KARAMZADEH; ESLAMINEJAD; AFLATOONIAN.(2012)	hDPCs	Terceiro molares (21-29 anos) (quantidade não informada).	Uso de disco diamantado. Secção ao nível de junção amelodentinária.	α -MEM suplementado com 10% FBS, 100 μ M L 2-fostato - ácido ascórbico, 2 mM L-glutamina, 100 units/ml penicilina, 100 mg/ml streptomina, 0.25 mg/ml anfotericina B.	Odontoblástica.

Tabela 4: Síntese das metodologias revisadas – continuação

AUTOR	TIPO CELULAR	AMOSTRA	METODO DE REMOÇÃO DA	MEIO DE CULTURA	PLASTICIDADE
EUBANKS; TARLE; KAIGLER., (2014)	hDPCs	32 terceiro molares (15-22 anos)	Secção da coroa do dente acima da junção amelo-cementária.	solução salina estéril (n=25) ou α -MEM contendo 15% de soro fetal bovino	Osteogênica, adipogênica, e condrogênica
SUN et al. (2014)	DPSCs	Doze dente permanentes extraídos devido a AGP (mulheres, 23 a 36 anos de idade)	Não informou	α -MEM suplementado com 20% soro fetal bovino , 100 U/mL penicilina-G and 100 mg/mL estreptomomicina	Adipogênica Osteogênica
VASANDAN et al.(2014)	DPSC e PDLSCs	Terceiros molares (quantidade não informada) 17 a 28 anos	Não informou como abriu os molares	KO DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino.	Osteogênica, adipogênica, condrogênica

Tabela 5: Marcadores analisados em nossa metodologia, também testados em outros trabalhos.

	CD29	CD90	CD166	CD146	CD73	CD105	CD31	CD34	CD45
Huang et al. (2009)	X	X				X		X	X
Chen et al. (2011)	X	X				X		X	X
Martens et al. (2012)	X			X		X			
Eubanks et al.(2014)		X			X	X			
Karamzadeh et al. (2012)		X		X	X	X		X	X
Attar et al. (2014)		X			X	X			X
Saito et al. (2015)		X			X			X	X
Ledesma- Martinez et al. (2016)			X				X		
Pierdomenico et al. (2005)								X	X
Silvaet al. (2012)								X	
Kerkis et al., (2006)	X	X	X		X			X	