

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO ENDODONTIA**

Luciane Geanini Pena dos Santos

**EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO DA DENTINA SOBRE A
ENGENHARIA DE TECIDO PULPAR HUMANO**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Odontologia
Orientador: Prof.^a Dr.^a Mabel Mariela Rodríguez Cordeiro

Florianópolis

2016

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

Santos, Luciane Geanini Pena dos
Efeito do pré-tratamento da dentina sobre a engenharia
de tecido pulpar humano / Luciane Geanini Pena dos Santos
; orientadora, Mabel Mariela Rodríguez Cordeiro -
Florianópolis, SC, 2016.
106 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós
Graduação em Odontologia.

Inclui referências

1. Odontologia. 2. Células-tronco. 3. Engenharia
tecidual. 4. Polpa Dental. 5. Procedimento endodôntico
regenerativo. I. Cordeiro, Mabel Mariela Rodríguez. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós
Graduação em Odontologia. III. Título.

Luciane Geanini Pena dos Santos

**EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO DA DENTINA SOBRE A
ENGENHARIA DE TECIDO PULPAR HUMANO**

Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Mabel Mariela Rodríguez Cordeiro
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Dr.^a Vivien Thiemy Sakai
Universidade Federal de Alfenas
(Videoconferência)

Prof.^a Dr.^a Beatriz Dulcineia Mendes de Souza
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Eduardo Antunes Bortoluzzi
Universidade Federal de Santa Catarina

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

Prof. Dr. Wilson Tadeu Felipe
Universidade Federal de Santa Catarina

A **Deus**, pela oportunidade da vida.

Aos meus pais, **Vera e Isoli**
e aos meus irmãos, **Jaqueline e Juninho**
pelo apoio constante e irrestrito
em todos os anos de minha formação.
À sobrinha mais fofa do mundo **Luíza**,
por trazer mais alegria e doçura às nossas vidas.

“Com muita gratidão, dedico a vocês este trabalho”.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao **Prof. Dr. Bruno das Neves Cavalcanti**, pelos ensinamentos e por gentilmente ceder as células-tronco utilizadas nesse experimento. A sua colaboração foi imprescindível para o desenvolvimento desse trabalho.

À minha orientadora, **Prof^a. Dr.^a Mabel Mariela Rodriguez Cordeiro**, pelo incentivo, pelos ensinamentos, por me dar a oportunidade de trabalhar nessa linha de pesquisa que eu amo tanto. Pelo seu exemplo de profissional versátil e competente, e de pessoa amável e atenciosa. Por me ajudar a crescer profissionalmente e pessoalmente.

À minha agora “orientadora de coração”, **Prof^a. Dra. Mara Cristina Santos Felipe**, por acreditar em mim e me dar esta oportunidade.

Obrigada pela dedicação, perfeccionismo, presteza e por tantos ensinamentos desde o tempo do mestrado. Carregarei comigo o seu exemplo de força, luta, competência e superAÇÃO. Te admiro muito!

Ao professor colaborador, **Prof. Dr. Wilson Tadeu Felipe**, pela contribuição, experiência profissional compartilhada e prontidão para qualquer esclarecimento. E pelo incentivo e ensinamentos, quando usei mudar de linha de pesquisa. Obrigada por me ajudar a construir raciocínio lógico e crítico, e por tantos anos de dedicação à Disciplina de Endodontia para nos possibilitar formação de excelência.

Aos professores da banca avaliadora, **Prof.^a Dr.^a Beatriz Dulcineia Mendes de Souza, Prof. Dr. Eduardo Antunes Bortoluzzi, Prof. Dr. Ricardo Castilho Garcez e Prof.^a Dr.^a Vivien Thiemy Sakai**, pelo seus aceites e disponibilidade em colaborar no melhoramento desse trabalho.

AGRADECIMENTOS

À **Ana Maria Hecke Alves e Maria Helena Pozzobon**, pessoas maravilhosas e tão especiais, que foram fundamentais na minha formação profissional e pessoal. Obrigada pelos ensinamentos, pelo afeto e, principalmente, pelo senso de justiça. Vocês são pessoas exemplares. As admiro muito. Obrigada!

À **Cleonice S. Teixeira e a Eduardo Antunes Bortoluzzi**, pelas suas amizades e ensinamentos, pela disponibilidade quando eu precisei, pela dedicação à “Endo” e, especialmente, pelo afeto com que tratam a todos. Vocês são demais! Obrigada!

Às minhas colegas de pós-graduação **Gabriela, Josiane e Maybell**, pelas conversas e companheirismo. Vivemos tantas coisas na pós-graduação, tivemos momentos de riso e de tensão. Mas, nas adversidades, sempre nos apoiamos mutuamente e aprendemos umas com as outras. Estou orgulhosa do nosso crescimento pessoal e profissional.

Ao querido funcionário **Sérgio Batista Andrade**, sempre gentil disposto a ajudar.

À colega de profissão e amiga, **Beatriz Mendes de Souza**, pela sua preciosa amizade. Pela bondade, ajuda, presteza e dedicação. Pelas conversas e conselhos. E por me permitir ser amiga dessa pessoa tão linda e de coração enorme, com quem eu aprendo tanto. Bea, sou muito grata e orgulhosa de ti, amiga!

À colega e amiga **Daniela Sousa Coelho**, pela amizade, coleguismo, dedicação e alegria. Obrigada por estar ao meu lado no “lab” e compartilhar momentos tensos e de superação. Pela disponibilidade e ajuda, sempre incansável e com um sorriso no rosto. Obrigada, Dani!

À querida amiga e colaboradora **Ariadne Cruz**, que incondicionalmente me ajudou no cultivo das células. Também ao Joãozinho, que estava ali na barriga da mamãe, e que já veio ao mundo com a sorte de ter sido gerado por uma pessoa tão boa. Ariadne, obrigada pela sua disponibilidade, ensinamentos e amabilidade. A tua tranquilidade e competência me inspiram.

À querida professora **Eliane Goldfeder**, por compartilhar o seu espaço de trabalho, pelo incentivo e pelo seu exemplo de versatilidade e honestidade. Também pelo seu senso de humor, que muitas vezes salvou dias difíceis. Obrigada pela sua alegria-inteligente!

Aos queridos professores **Paulo Fernando Dias** e **Cristine Bressan**,
pelo acolhimento no Laboratório de Estudos em Bioatividade e
Morfogênese Animal (LEBIMA), pela amabilidade e disponibilidade
quando solicitados.

À **Disciplina de Cirurgia/UFSC**, na pessoa do **Prof. Dr. José Nazareno Gil**, e ao **Centro de Especialidades Odontológicas (CEO)**,
pela colaboração no experimento.

Às queridas **Izabel Almeida** e **Ana Maria Frandolozo**, pela dedicação
ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, pelo empenho e
colaboração para que esse trabalho fosse executado em sua plenitude.

Ao amigo **Rafael Santos**, pela sua ajuda no “lab”, sempre disposto a
colaborar em alguma tarefa e aprender a rotina do laboratório. Muito
obrigada, Rafa!

Aos técnicos de laboratório **Demétrio, Emily e Gilberto**, pela sua
colaboração, disponibilidade, ensinamentos e amabilidade.

Às minhas amadas amigas **Maria Carolina (Lili)**, **Ana Marta (Miúxa)**
e **Fernanda (Fê)**, pela amizade, pelo incentivo, pelo apoio nos

momentos difíceis, pelo riso nos momentos fáceis. Por serem a família que eu escolhi e adoro tanto. Gurias, eu não teria chegado até aqui sem vocês. Muito obrigada, “Bes”!

Ao amigão **Patrick Venturini**, pela amizade incondicional, motivação, apoio e por ser o “amigo-irmão” que se faz presente mesmo estando distante. Pelo exemplo de profissionalismo, determinação e honestidade. Agradeço a Deus por ter te conhecido!

Ao novo e querido amigo **Vincenzo Montuori** (que não vai entender nada porque não fala português), pela sua disponibilidade, colaboração e pelas inúmeras risadas. *Grazie mille, Enzo!*

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC) pelo suporte financeiro.

“A todos que de alguma forma contribuíram para que este trabalho se tornasse realidade”.

RESUMO

No tratamento endodôntico de dentes permanentes imaturos despolpados o preparo mecânico do canal é desaconselhado para não fragilizar ainda mais a estrutura dental. A abordagem clássica permite a desinfecção do canal radicular pelo preparo químico com soluções antimicrobianas e medicação intracanal, mas não a retomada do processo de rizogênese para a complementação do canal radicular. A neoformação de tecido pulpar, por abordagem de engenharia tecidual, tem potencial para melhor resolver essas situações clínicas. Com o uso do Modelo de Fatia Dental/Arcabouço para Engenharia de Tecido Pulpar o objetivo deste trabalho foi desenvolver polpas dentais com morfologia e função semelhantes àquelas do tecido original, em dentinas submetidas a tratamentos com diferentes materiais endodônticos. Para tanto, após o acesso endodôntico e a aplicação dos protocolos de tratamento com hipoclorito de sódio, EDTA, pasta de hidróxido de cálcio ou triantibiótica, fatias de 1 mm de espessura foram obtidas da região cervical de molares, seguido pela produção de arcabouço sintético no espaço da câmara pulpar e semeadura de células-tronco de polpa de dentes permanentes humanos (DPSC). O conjunto fatia dental/arcabouço/células foi implantado em tecido subcutâneo de camundongos. Depois de 35 dias, os implantes foram removidos e processados para análise histo-morfológica, imuno-histoquímica, e microscopia eletrônica confocal. Os resultados das análises histológicas mostraram que houve formação tecidual em todos os grupos, com destaque para o grupo tratado pela pasta Triantibiótica. Da análise em microscopia confocal conclui-se que, mesmo quando tratada por soluções irrigadoras ou pastas antimicrobianas, a dentina apresentou condições de servir como substrato para a sobrevivência e a diferenciação das DPSC em odontoblastos funcionais, com capacidade de deposição de matriz dentinária.

Palavras-chave: Células-tronco, diferenciação celular, engenharia tecidual, polpa dental, procedimento endodôntico regenerativo.

ABSTRACT

In the endodontic treatment of immature permanent teeth, mechanical preparation of the root canal is not recommended to do not further weaken the tooth structure. The classical approach allows the disinfection of the root canal by chemical preparation with antimicrobial solutions and intracanal dressing, but not the resumption of the root formation process for the completion of root canal. The pulp tissue neoformation by tissue engineering approach has the potential of better solving these clinical situations. Using the Tooth Slice/Scaffold Model for Dental Pulp Tissue Engineering, the aim of this study was to develop dental pulps with similar morphology and function to those of the original tissue, in dentin subjected to treatments with different materials. For this purpose, after the endodontic access and application of the treatment protocols with sodium hypochlorite, EDTA, calcium hydroxide or triple antibiotic pastes, 1 mm slices from the cervical region of third molars were obtained, followed by the production of a synthetic polymeric scaffold within the pulp chamber and seeding of dental pulp stem cells from human permanent teeth (DPSC). Tooth slice/scaffold/cells sets were implanted subcutaneously in mice. After 35 days, the implants were retrieved and processed for histomorphological, immunohistochemical, and confocal electron microscopy analyzes. The results of histological analyzes showed that there was tissue formation in all groups, especially the group treated by triple antibiotic paste. From the confocal microscopy analysis, it was concluded that even when treated by irrigating solutions or antimicrobial pastes, dentin is able to serve as substrate for survival and differentiation of DPSC in functional odontoblasts, with dentin matrix deposition capacity.

Keywords: cell differentiation, dental pulp, regenerative endodontics procedure, stem cell, tissue engineering.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Aspecto macroscópico das amostras dos diferentes grupos experimentais quando da recuperação, 35 dias após a implantação.....45
- Figura 2.** Fotomicrografias em microscópica de luz do aspecto histomorfológico dos tecidos encontrados nos diferentes grupos e em diferentes aumentos, após 35 dias de implantação.....47
- Figura 3.** Fotomicrografias em microscópica de luz da marcação imunohistoquímica nas reações com anticorpos DSPP, DMP-1 e SMA.....49
- Figura 4.** Fotomicrografias em microscopia de luz da estrutura dentinária.....51
- Figura 5.** Fotomicrografias em microscopia confocal.....53
- Figura 6.** Fotomicrografia de microscopia confocal da amostra representativa do grupo NaOCl/EDTA.....55
- Figura 7.** Síntese ilustrada da metodologia para o preparo dos dentes69
- Figura 8.** Preparo das fatias dentais/arcabouços de acordo com o Modelo para Engenharia de Tecido Pulpar.....71
- Figura 9.** Esquema de tratamento dos discos implantados no dorso dos camundongos.....74
- Figura 10.** Esquema da estratégia de administração da tetraciclina.....75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AAE: *American Association of Endodontists*
- ASC: célula-tronco do tecido adiposo (do inglês: *Adipose Stromal Cell*)
- BMP: proteína óssea morfogenética
- CD: *cluster* de diferenciação (do inglês: *cluster of differentiation*)
- DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium
- DMP: proteína da matriz dentinária (do inglês: *dentin matrix protein*)
- DPID: dentes permanentes imaturos despolpados
- DPP: fosfoproteína dentinária (do inglês: *dentin phosphoprotein*)
- DPSC: células-tronco da polpa de dentes permanentes (do inglês: *dental pulp stem cell*)
- DSP: sialoproteína dentinária (do inglês: *dentin sialoprotein*)
- DSPP: sialofosfoproteína dentinária (do inglês: *dentin sialophosphoprotein*)
- EDTA: ácido etilendiaminotetracético (do inglês: *ethylenediaminetetraacetic acid*)
- HC: hidróxido de cálcio
- HE: hematoxilina-eosina
- MTA: agregado de trióxido mineral (do inglês: *mineral trioxide aggregate*)
- MEPE: fosfoglicoproteína da matriz extracelular (do inglês: *matrix extracellular phosphoglycoprotein*)
- NaOCl: hipoclorito de sódio
- PBS: solução fosfato tamponada (do inglês: *phosphate buffered saline*)
- PDLSC: células-tronco do ligamento periodontal (do inglês: *periodontal ligament stem cells*)
- pH: potencial hidrogeniônico
- PECAM-1: molécula de adesão plaqueta-célula endotelial-1 (do inglês: *platelet endothelial cell adhesion molecule*)
- PLGA: ácido poliglicólico [do inglês: *poly(lactic-co-glycolic acid)*]
- PLA: ácido polilático [do inglês: *polylactic acid*]
- PLLA: ácido poli-L-lático [do inglês: *poly(L-lactic acid)*]
- SFB: soro fetal bovino
- SHED: polpa de dentes decíduos (do inglês: *Stem cells from human exfoliated deciduous teeth*)
- SMA: actina de músculo liso (do inglês: *smooth muscle Actin*)
- SMC: o músculo liso adulto (do inglês: *smooth muscle cell*)
- rpm: rotação por minuto

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	23
2 OBJETIVOS	31
2.1 Objetivo Geral	31
2.2 Objetivos Específicos	31
3 ARTIGO.....	33
4 METODOLOGIA EXPANDIDA	65
4.1 Obtenção e preparo dos dentes	65
4.2 Cultura de células, semeadura celular e implantação da fatia dental/arcação em camundongos.....	72
4.3 Tratamento com tetraciclina	75
4.4 Eutanásia dos animais e recuperação das amostras	75
4.5 Métodos de análise	76
4.5.1 Análise histo-morfológica.....	76
4.5.2 Análise imuno-histoquímica	77
5 CONCLUSÃO	79
6 REFERÊNCIAS.....	81
7 APÊNDICES.....	87

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

Mesmo com a melhora na saúde bucal da população mundial, problemas globais ainda persistem, como a cárie e o trauma dental. A cárie continua a ser a doença infecciosa mais prevalente em humanos. Em países industrializados, afeta entre 60% e 90% das crianças em idade escolar e a grande maioria dos adultos (Petersen *et al.*, 2005). Em relação ao trauma, embora a cavidade oral compreenda apenas 1% da área total do corpo, 5% das injúrias sofridas pelo indivíduo ocorrem nessa região, principalmente nos primeiros 10 anos de vida. A prevalência de injúrias na dentição permanente entre crianças e adolescentes é de aproximadamente 20% (Andersson, 2013). Esse dado é preocupante considerando que, nessa fase, a dentição permanente ainda está em formação (Nolla, 1960) e danos teciduais severos, gerados por trauma ou infecção, podem comprometer irreversivelmente o tecido pulpar e ocasionar a sua necrose. A perda da vitalidade da polpa dental resulta, então, na interrupção do processo de dentinogênese. Assim, a formação da raiz é incompleta e, por essa razão, dentes permanentes imaturos despolpados (DPID) apresentam raízes com comprimentos inferiores ao comprimento médio, cavidades pulpares amplas e paredes dentinárias delgadas e menos mineralizadas, mais susceptíveis à fratura (Iwaya, Ikawa e Kubota, 2001; Banchs e Trope, 2004; Trope, 2006; Bleicher, 2014) por novas injúrias, comprometendo a sobrevida do elemento dental.

O tratamento endodôntico de dentes permanentes imaturos despolpados, principalmente dos que apresentam periodontite apical, apresenta múltiplos desafios (Trope, 2006). Tradicionalmente, esses dentes são tratados visando a apicificação (Rafter, 2005; Garcia-Godoy e Murray, 2012) ou a formação de uma barreira apical artificial com MTA (Trope, 2006; Garcia-Godoy e Murray, 2012), para permitir a obturação definitiva do canal radicular. Por apresentarem paredes de dentina finas, a instrumentação do canal não pode ser realizada da forma habitual para não fragilizar ainda mais a estrutura radicular (Banchs e Trope, 2004; Nosrat, Seifi e Asgary, 2011). Desse modo, a desinfecção é obtida com mínimo debridamento mecânico e valorizando a irrigação com solução antimicrobiana e uso de medicação intracanal (Banchs e Trope, 2004; Trope, 2006). Entretanto, mesmo que esses cuidados permitam obter a adequada desinfecção do sistema de canais, o dente permanece, indefinidamente, com a estrutura fragilizada e propenso à

fratura (Iwaya, Ikawa e Kubota, 2001; Banchs e Trope, 2004; Trope, 2006), pois o processo de dentinogênese não é restabelecido. Além disso, até o momento, nenhum material sintético conseguiu reproduzir todas as propriedades biomecânicas dos tecidos dentais (Rosa *et al.*, 2013).

Como alternativa ao tratamento endodôntico convencional, as abordagens baseadas em terapias celulares e engenharia tecidual teriam potencial para regeneração/neoformação da polpa dental e, desse modo, retomar o processo de desenvolvimento radicular com perspectiva de resolução mais efetiva dessas situações clínicas. A engenharia tecidual é uma área interdisciplinar envolvendo a engenharia, a biologia e a química, para o desenvolvimento de substitutos biológicos que restaurem ou melhorem a função do tecido (Langer e Vacanti, 1993). Seus princípios estão baseados na inter-relação da tríade células-tronco, arcabouços e fatores de crescimento (Langer e Vacanti, 1993; Nor, 2006; Demarco *et al.*, 2010; Sedgley e Botero, 2012).

As células-tronco são células indiferenciadas que apresentam capacidade de auto-renovação e de produzir células progenitoras. Assim, podem ser multiplicadas e diferenciadas em uma variedade de tipos de células (Gronthos *et al.*, 2002; Huang, Gronthos e Shi, 2009; Sedgley e Botero, 2012) com potencial para reproduzir a arquitetura e a função semelhantes às do tecido alvo (Telles *et al.*, 2011). Segundo a origem são classificadas como embrionárias ou pós-natais. As células embrionárias são provenientes do zigoto ou do blastocisto, e têm potencial ilimitado de diferenciação, sendo então consideradas células totipotentes e pluripotentes, respectivamente (Sloan e Smith, 2007; Huang, 2009; Huang, Gronthos e Shi, 2009; Telles *et al.*, 2011; Sedgley e Botero, 2012). As células de origem pós-natal podem ser de vários tecidos, como a medula óssea (BMMSC), o tecido adiposo (ASC), o músculo liso (SMC) e de fontes dentais como o ligamento periodontal (PDLSC), a polpa de dentes permanentes (DPSC) e a polpa de dentes decíduos (SHED). As células-tronco pós-natais são consideradas células multipotentes, pois têm potencial de diferenciação mais limitado do que as embrionárias (Sedgley e Botero, 2012). Estudos demonstraram que tanto as SHED quanto as DPSC apresentam potencial para diferenciação em odontoblastos e de geração de tecido morfológica e funcionalmente semelhante ao tecido pulpar humano (Cordeiro *et al.*, 2008; Demarco *et al.*, 2010; Sakai *et al.*, 2011). Ainda, apresentam plasticidade para diferenciação em outros tipos de células e de formação de tecidos como osso e músculo, entre outros (Casagrande *et al.*, 2011).

Os arcabouços são estruturas necessárias à migração, adesão, proliferação e organização tridimensional das células, imprescindíveis para a reprodução estrutural e funcional do tecido. Para mimetizar o microambiente observado nos tecidos naturais, uma grande variedade de biomateriais tem sido usada como arcabouço, tais como polímero natural ou sintético, matriz extracelular, hidrogel ou biocerâmica (Galler *et al.*, 2011). Os polímeros sintéticos, como o ácido poliglicólico (PLGA) e o ácido poli-L-láctico (PLLA), possibilitam melhor controle das propriedades químicas e físicas, como o nível de degradação, microestrutura e resistência mecânica do arcabouço (Santana *et al.*, 2012).

Fechando a tríade para a engenharia tecidual, os fatores de crescimento aparecem como elementos fundamentais, pois são essas pequenas proteínas, com efeito bioativo no comportamento e em várias atividades celulares, que induzirão a divisão, diferenciação e migração celular. Quando essas moléculas se ligam a receptores específicos na superfície da membrana celular, engatilham uma cascata de sinais intracelulares que irão estimular ou inibir a transcrição de certos genes e, desta forma, guiar o comportamento da célula (Grando Mattuella *et al.*, 2007). A matriz dentinária possui uma diversidade de fatores de crescimento (Grando Mattuella *et al.*, 2007; Demarco *et al.*, 2010) que são sequestrados da dentina quando ocorre uma queda no pH ocasionada por processos cariosos ou traumáticos (Grando Mattuella *et al.*, 2007), pelo tratamento da dentina com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (Liu *et al.*, 2005) ou pela degradação do arcabouço, como ocorre com o PLLA (Cordeiro *et al.*, 2008). Com a liberação dessas moléculas inicia-se um processo de sinalização morfogenética que está relacionado com a diferenciação de células-tronco em células semelhantes (*like*) a odontoblastos, fibroblastos e células endoteliais (Grando Mattuella *et al.*, 2007).

Os odontoblastos são células pós-mitóticas, altamente especializadas, localizadas na periferia do tecido pulpar. Essas células secretam matriz dentinária e participam da mineralização dessa matriz, pela secreção de proteoglicanas e outras proteínas não colágenas. Ainda, os odontoblastos participam da manutenção do complexo dentina-polpa ao longo da vida do elemento dental, pela secreção de dentina reacional frente a condições patológicas. A atividade dentinogênica dos odontoblastos parece estar relacionada ao seu papel como células sensoriais, sendo capazes de detectar invasão bacteriana e reagir produzindo dentina reacional. Assim como são bem equipadas com canais iônicos, envolvidos na mecanotransdução e nocicepção, o que

torna os odontoblastos adequados para captar estímulos externos e mediar a sensação de dor de dente (Bleicher, 2014). Seu fenótipo é caracterizado pela imunodeteção de proteínas da matriz dentinária como o colágeno tipo I, proteínas da matriz dentinária (DMP), sialofosfoproteína da dentina (DSPP), que é clivada e origina outras duas proteínas, a sialoproteínadentinária (DSP) e a fosfoproteínadentinária (DPP), entre outras. Tais proteínas correspondem aos marcadores de diferenciação em odontoblastos (Sakai *et al.*, 2010).

Além da diferenciação odontoblástica de células-tronco, a diferenciação em células endoteliais é de fundamental importância, pois essas células atuam na angiogênese e na anastomose dos vasos neoformados com os vasos sanguíneos já existentes. Esse processo é imprescindível para a nutrição do novo tecido (Levenberg *et al.*, 2002). É reconhecido que o sucesso de uma abordagem de engenharia tecidual recai no estabelecimento rápido de um adequado suprimento de oxigênio e nutrientes (Brey *et al.*, 2005), crítico para sustentar a alta atividade metabólica das células envolvidas na regeneração tecidual. A expressão da molécula de adesão plaqueta-célula endotelial-1 (PECAM-1/CD 31), uma proteína membro da família das imunoglobulinas, no processo de diferenciação de células-tronco pode refletir o comprometimento com a linhagem endotelial (Sakai *et al.*, 2010), bem como a expressão da actina de músculo liso (SMA), proteína encontrada nas células da musculatura lisa vascular (Yoshihara *et al.*, 2012).

A regeneração/neoformação de estruturas dentais é uma proposição complexa. Porém, considerando que o melhor material para repor a estrutura dental é a própria estrutura dental (Nor, 2006), cientistas têm direcionado seus esforços na busca de conhecimentos que visam reproduzir o processo de odontogênese, mesmo que parcialmente.

O desenvolvimento de modelos de estudo de engenharia tecidual possibilita uma melhor compreensão dos fenômenos e mecanismos envolvidos nos processos de regeneração/neoformação de tecidos dentais. Com esse intuito, por meio do Modelo de Fatia Dental/Arcabouço para Engenharia de Tecido Pulpar (*Tooth Slice/Scaffold Model of Dental Pulp Tissue Engineering*) desenvolvido por (Cordeiro *et al.*, 2008) foi possível produzir tecido semelhante à polpa dental humana, anastomosado com o tecido do organismo hospedeiro pela nova rede vascular formada dentro do tecido e com potencial para retomar o processo de dentinogênese. No modelo supracitado são produzidas fatias de 1 mm de espessura, obtidas por cortes transversais na região cervical de terceiros molares humanos

hígidos. Após a remoção da polpa dental, na cavidade pulpar é produzido arcabouço de PLLA, biodegradável e altamente poroso. No conjunto fatia dental/arcabouço são semeadas células-tronco da polpa dental e o conjunto fatia dental/arcabouço/células-tronco e seus controles (positivo e negativo) são implantados bilateralmente no tecido subcutâneo do dorso de camundongos imunossuprimidos. Após um período de implantação entre 14 e 28 dias, foi observado que o tecido formado na cavidade pulpar das amostras era bem organizado e mostrava características morfológicas similares às da polpa dental humana. Posteriormente, esse mesmo modelo foi aplicado para uma análise mais detalhada do processo de engenharia de polpa dental, especialmente da diferenciação celular de SHED em odontoblastos e células endoteliais (Sakai *et al.*, 2010). Foi observado que células-tronco têm potencial para diferenciação em células semelhantes a odontoblastos funcionais, com capacidade de produzir matriz dentinária e gerar dentina tubular, mimetizando a estrutura da dentina original. Ainda, Coelho (2015) verificou, pela mesma metodologia, porém em camundongos não imunossuprimidos, que é possível desenvolver um tecido semelhante à polpa dental, com presença de terminações nervosas livres e organizadas em feixes nervosos.

É importante frisar que nos trabalhos supracitados a dentina não recebeu qualquer tratamento prévio aos procedimentos de engenharia tecidual. No entanto, no tratamento de dentes despolpados, a desinfecção do canal é fundamental para o reparo. Estudos pré-clínicos e clínicos demonstraram que, para o sucesso da regeneração da polpa dental, a desinfecção do sistema de canais radiculares é um procedimento indispensável (Ruparel *et al.*, 2012) e crítico, especialmente no tratamento de dentes imaturos despolpados, no qual o debridamento mecânico do canal não pode ser realizado para não fragilizar ainda mais a estrutura radicular. Desse modo, a desinfecção do canal é realizada, exclusivamente, por meio de preparo químico. No *Clinical Considerations for a Regenerative Procedure* (American Association of Endodontists - AAE, 2015) é recomendado para a desinfecção o uso de solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) 1,5% e de pasta triantibiótica ou de hidróxido de cálcio (HC). Todavia, esses materiais podem exercer efeitos diretos sobre as células e reduzir a sua viabilidade (Althumairy, Teixeira e Diogenes, 2014; Martin *et al.*, 2014), bem como causar alterações químico-estruturais na dentina e, dessa forma, afetar indiretamente as células, pela alteração do microambiente (Yassen, Chu, *et al.*, 2013; Yassen, Vail, *et al.*, 2013; Diogenes *et al.*, 2014). Alterações na composição da matriz dentinária

podem alterar o papel das células-tronco quando em contato com esse substrato modificado (Diogenes *et al.*, 2014).

O hipoclorito de sódio é o agente antimicrobiano mais usado para desinfecção do sistema de canais nos tratamentos endodônticos (Diogenes *et al.*, 2014). O seu poder antimicrobiano (Vianna *et al.*, 2006; Martinho e Gomes, 2008) e a sua capacidade de dissolução da matéria orgânica (Hand, Smith e Harrison, 1978; Harrison e Hand, 1981) são duas propriedades cruciais no tratamento de dentes imaturos despolpados, que usualmente envolve mínima ou nenhuma preparação mecânica dos canais (Diogenes *et al.*, 2014). Todavia, em concentrações elevadas (acima de 5%) essa solução desnatura o colágeno e desproteínea a matriz dentinária, a qual serve como substrato para as células. Como consequência, prejudica a interação substrato/célula, resultando em diminuição da viabilidade celular (Casagrande *et al.*, 2010; Trevino *et al.*, 2011; Martin *et al.*, 2014) e na inibição da diferenciação de células-tronco em odontoblastos-like (Casagrande *et al.*, 2010; Martin *et al.*, 2014).

Embora o hipoclorito de sódio apresente poder antimicrobiano, o uso de medicação intracanal é indicado para potencializar o efeito de desinfecção da solução irrigadora (Safavi e Nichols, 1994). Assim, a AAE (2015) recomenda o uso das pastas de HC ou triantibiótica como medicação entre sessões. Porém, apesar de as pastas de HC (Bystrom, Claesson e Sundqvist, 1985; Siqueira e Lopes, 1999) e triantibiótica (Hoshino *et al.*, 1996) apresentarem excelente poder antimicrobiano, ambas podem apresentar efeito citotóxico e reduzir a viabilidade celular (Ruparel *et al.*, 2012; Labban *et al.*, 2014).

Ainda, no protocolo da AAE (2015), após o uso da medicação intracanal, é indicada uma irrigação com EDTA. A solução de EDTA age como quelante; assim, quando em contato com as paredes dentinárias, atua sobre a parte mineral, sequestrando o cálcio da dentina. Consequentemente, expõe a parte orgânica e libera proteínas morfogênicas presentes na matriz dentinária, como as proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs) (Casagrande *et al.*, 2010) e a proteína da matriz dentinária (DMP-1) (Almushayt *et al.*, 2006). A diferenciação de células-tronco em odontoblastos está condicionada à liberação dessas proteínas morfogênicas. Quando cultivadas em matriz dentinária desproteínizada ou em arcabouços sem estrutura dentinária adjacente, as células-tronco não expressam marcadores característicos da diferenciação odontoblástica (DSPP, DMP-1, MEPE) (Casagrande *et al.*, 2010). Em contrapartida, a presença de BMPs, especialmente a BMP2, desempenha um papel fundamental no processo de diferenciação

odontoblástica (Casagrande *et al.*, 2010), assim como a DMP-1 (Almushayt *et al.*, 2006), que também parece atuar na mineralização da matriz dentinária.

Enquanto o hipoclorito de sódio e as pastas de HC e triantibiótica parecem desempenhar um efeito deletério sobre as células dependendo da concentração utilizada, a solução de EDTA tem demonstrado potencial para liberar fatores morfogênicos da matriz dentinária (Casagrande *et al.*, 2010) e favorecer a viabilidade e proliferação celular (Martin *et al.*, 2014). Considerando o exposto, e simulando os procedimentos sugeridos para a prática clínica, seria interessante avaliar se é possível a formação de tecido pulpar sobre dentina previamente tratada com produtos usados para a desinfecção do canal (pastas antissépticas) e para a liberação de proteínas morfogênicas (EDTA).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Utilizando o Modelo de Fatia Dental/Arcabouço para Engenharia de Tecido Pulpar (Cordeiro *et al.*, 2008), o objetivo foi avaliar o potencial de DPSC de formar tecido pulpar quando em contato com paredes dentinárias previamente tratadas com produtos utilizados na terapia de dentes permanentes imaturos despulpados.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Avaliar a influência do pré-tratamento da superfície dentinária com NaOCl 1,5%, EDTA 17%, pasta de HC ou triantibiótica sobre o potencial de diferenciação de DPSC em odontoblastos funcionais e células endoteliais, após 35 dias da implantação do conjunto fatia dental/arcabouço/células no tecido subcutâneo do dorso de camundongos.

2.2.2 Avaliar a capacidade de DPSC formarem um tecido morfológica e funcionalmente semelhante ao tecido pulpar original, quando em contato com paredes de dentina previamente tratadas com NaOCl 1,5%, EDTA 17%, pasta de HC ou triantibiótica, 35 dias depois da implantação do conjunto fatia dental/arcabouço/células no tecido subcutâneo do dorso de camundongos.

3 ARTIGO

EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO DA DENTINA SOBRE A ENGENHARIA DE TECIDO PULPAR HUMANO*

* Artigo formatado conforme normas do *Journal of Endodontics*/ISSN 0099-2399

Introdução

Como alternativa ao tratamento endodôntico convencional para dentes imaturos despulpados, abordagens baseadas em terapias celulares e engenharia tecidual têm sido sugeridas em função da possibilidade de permitirem a regeneração/neoformação da polpa dental e, conseqüentemente, a retomada do processo de desenvolvimento radicular. Estudos demonstraram que, para o sucesso da regeneração da polpa dental, a desinfecção do sistema de canais radiculares é um procedimento indispensável (Ruparel *et al.*, 2012) e crítico, pois o debridamento mecânico do canal não pode ser realizado para não fragilizar ainda mais a estrutura radicular. Desse modo, a desinfecção é realizada, exclusivamente, por meio de preparo químico.

No *Clinical Considerations for a Regenerative Procedure*, a *American Association of Endodontists* (AAE, 2015) recomenda o uso de solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) 1,5% e de pasta triantibiótica ou de hidróxido de cálcio (HC) para a desinfecção do canal.

O hipoclorito de sódio é o agente antimicrobiano mais usado em endodontia para desinfecção do sistema de canais radiculares (Diogenes *et al.*, 2014). O seu poder antimicrobiano (Vianna *et al.*, 2006; Martinho e Gomes, 2008) e a sua capacidade de dissolução da matéria orgânica (Hand, Smith e Harrison, 1978; Harrison e Hand, 1981) são propriedades cruciais no tratamento de dentes imaturos despulpados, que usualmente não envolve preparação mecânica dos canais (Diogenes *et al.*, 2014). Todavia, em concentrações elevadas (acima de 5%) essa solução desnatura o colágeno e desproteíniza a matriz dentinária, a qual serve como substrato para as células. Como consequência, prejudica a interação substrato/célula, resultando na diminuição da viabilidade celular (Casagrande *et al.*, 2010; Trevino *et al.*, 2011; Martin *et al.*, 2014) e na inibição da diferenciação de células-tronco em odontoblastos-like (Casagrande *et al.*, 2010; Martin *et al.*, 2014).

Embora o hipoclorito de sódio apresente poder antimicrobiano, o uso de medicação intracanal é indicado para potencializar o efeito dessa solução irrigadora (Safavi e Nichols, 1994). Assim, a AAE (2015) recomenda o uso das pastas de HC ou triantibiótica como medicação entre sessões. Apesar de apresentarem excelente poder antimicrobiano (Bystrom, Claesson e Sundqvist, 1985; Siqueira e Lopes, 1999); Hoshino *et al.*, 1996), tanto a pasta de HC (Labban *et al.*, 2014), quanto a pasta triantibiótica podem apresentar efeito citotóxico e reduzir a viabilidade celular (Ruparel *et al.*, 2012; Labban *et al.*, 2014).

Enquanto o hipoclorito de sódio e as pastas de HC e triantibiótica parecem desempenhar um efeito deletério sobre as células, a solução de EDTA tem demonstrado potencial para, além de liberar fatores morfogênicos da matriz dentinária (Casagrande *et al.*, 2010), favorecer a viabilidade e proliferação celular (Martin *et al.*, 2014). A solução de EDTA age como quelante; assim, quando em contato com as paredes dentinárias, atua sobre a parte mineral, sequestrando o cálcio da dentina. Conseqüentemente, expõe a parte orgânica e libera proteínas morfogênicas presentes na matriz dentinária, como as proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs) (Casagrande *et al.*, 2010) e a proteína da matriz dentinária (DMP-1) (Almushayt *et al.*, 2006). A diferenciação de células-tronco em odontoblastos está condicionada à liberação dessas proteínas morfogênicas. Quando cultivadas em matriz dentinária desproteinizada ou em arcabouços sem estrutura dentinária adjacente, as células-tronco não expressam marcadores característicos da diferenciação odontoblástica (DSPP, DMP-1, MEPE) (Casagrande *et al.*, 2010).

Considerando o exposto, e simulando os procedimentos sugeridos para a prática clínica, o objetivo deste estudo foi avaliar se produtos usados para a desinfecção do canal (pastas antissépticas) e para a liberação de proteínas morfogênicas (EDTA) permitem a formação de tecido pulpar sobre a dentina previamente exposta a essas substâncias.

Material e métodos

Obtenção e preparo dos dentes

Foram utilizados 36 terceiros molares, superiores ou inferiores, hígidos, recém-extraídos de pacientes com idade entre 15 e 22 anos. Após a doação e assinatura do Termo de Assentimento e/ou de Consentimento Livre e Esclarecido, sob aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFSC nº 20000013.8.1001.0121 (Apêndices 1, 2 e 3), os dentes foram imediatamente imersos no meio de transporte, composto por DMEM (cod 11885084, Dulbecco's Modified Eagle Medium) (*Invitrogen*, Carlsbad, CA, USA) suplementado com 20% soro fetal bovino (cod12657029, *Invitrogen*, USA), 1% de penicilina e estreptomicina (cod 15140122, *Invitrogen*, USA) e 1% de anfotericina B (cod 15290018, *Invitrogen*, USA), e mantidos a 4°C até o traslado para o laboratório.

Em 33 dentes, após o acesso endodôntico, as cavidades pulpares foram esvaziadas com extirpa-nervos e irrigados com 2 mL de solução fosfato tamponada- PBS 1X (cod 14200166, *Invitrogen*, Carlsbad, CA, USA) e secos por aspiração e com pontas de papel absorvente. Na sequência, os dentes foram direcionados, aleatoriamente, a 5 grupos experimentais (n = 6/grupo) e 1 grupo-controle negativo (n = 3), de acordo com o tratamento efetuado sobre a dentina.

Nos dentes dos grupos das pastas antimicrobianas, as cavidades pulpares foram irrigadas com 20 mL de NaOCl 1,5% (*Dermus*, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil), seguidos por 20 mL de solução salina, secas com pontas de papel absorvente e preenchidos com pasta de HC (Calen®, *SS White*, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil) ou (G2) pasta Triantibiótica (*Magistrale*, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil), composta por ciprofloxacina, metronidazol e minociclina, na proporção de 1:1:1. As cavidades de acesso foram provisoriamente restauradas com Citodur® (*Dorident*, Viena, Viena, Áustria) e os dentes mantidos em PBS 1X por 21 dias. Após esse período, o material restaurador provisório foi removido e as cavidades pulpares irrigadas com 20 mL de EDTA 17% pH 7,2 (*Merck*, Darmstadt, Hessen, Alemanha), e secas por aspiração.

Nos dentes do Grupo NaOCl/EDTA, as cavidades pulpares foram irrigadas com 20 mL de NaOCl 1,5% (*Dermus*), seguidos por 20 mL de solução salina e, finalmente, com 20 mL de EDTA 17% pH 7,2. Nos do Grupo NaOCl, foram irrigadas com 20mL de NaOCl 1,5% (*Dermus*), seguido por 20 mL de solução salina e nos do Grupo EDTA, irrigadas apenas com 20 mL de EDTA 17%.

Os procedimentos para engenharia tecidual foram baseados no Modelo de Fatia Dental/Arcabouço para Engenharia de Tecido Pulpar (Cordeiro *et al.*, 2008). Brevemente, após os devidos tratamentos da dentina, foram feitas fatias de aproximadamente 1 mm de espessura na região cervical dos molares por meio de cortes transversais. O espaço da cavidade pulpar foi preenchido com partículas de 212 a 300 µm de cloreto de sódio e ácido poli-L-láctico (PLLA) (*Resomer*, *Evonik*, Darmstadt, Alemanha) dissolvido em clorofórmio (*Merck*, Darmstadt, Hessen, Alemanha). Após 24 h, o sal foi removido por lavagens com PBS, assim um arcabouço biodegradável altamente poroso foi obtido. O conjunto fatia dental/arcabouço foi desinfetado e hidrofiliado em incubações sequenciais com concentrações decrescentes de etanol (100-70%) e lavado em PBS.

Nos dentes do grupo-controle negativo (n = 3) foram realizados os procedimentos para engenharia tecidual sem que a dentina recebesse

qualquer tipo de tratamento prévio e sem a semeadura das células. Fatias dentais contendo tecido pulpar original configuraram o grupo-controle positivo (n = 3).

Cultura de células, semeadura das células e implantação da fatia dental/arcabouço em camundongos

Em cada um dos conjuntos fatia dental/arcabouço (grupos pasta de HC, pasta Triantibiótica, NaOCl/EDTA, NaOCl e EDTA) foram semeadas 1×10^6 DPSC (cod PT-5025, *Lonza Walkersville Inc.*; Walkersville, MD, USA), de passagens 6 a 8, cultivadas em meio composto por 80% de DMEM (*Invitrogen*, USA) suplementado com 20% de soro fetal bovino (*Invitrogen*, USA). As células foram suspensas em uma mistura de 1:1 de Matrigel (cod 356234, *Corning*, New York, NY, USA) e meio de cultura, para permitir a sua fixação no arcabouço por meio da geleificação do Matrigel, incubado por 30 min a 37°C.

Os conjuntos fatia dental/arcabouço/DPSC, fatia dental/arcabouço (controle negativo) e as fatias com polpa dental (controle positivo) foram implantados bilateralmente no tecido subcutâneo do dorso de camundongos. Para tanto, foram utilizados 20 camundongos machos (*Mus musculus*), com 5 a 7 semanas de idade, não imunossuprimidos. Para a implantação, as fatias dentais foram distribuídas segundo os tipos de tratamento recebidos. Previamente aos procedimentos cirúrgicos, os animais foram anestesiados por via intramuscular com associação de cloridrato de ketamina (80 mg/kg) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg). Após a tricotomia da região dorsal e antisepsia da área com povidona-iodo 12%, uma incisão longitudinal, no plano sagital mediano, de aproximadamente 2 cm, foi realizada no tecido subcutâneo do dorso dos camundongos. A divulsão do tecido foi realizada lateralmente à incisão e resultou em 2 sítios de implantação. Em cada sítio foi implantada 1 fatia de um dos grupos experimentais ou controle. A ordem de implantação das fatias foi previamente estabelecida, sendo que cada lado do animal recebeu fatias de grupos experimentais diferentes. Finalmente, as bordas da incisão foram aproximadas com auxílio de uma pinça cirúrgica e suturadas com fio de nylon 5.0. Todos os procedimentos foram realizados com instrumentos estéreis e técnica asséptica para evitar contaminação durante os procedimentos operatórios. Os procedimentos apresentados nesse experimento foram submetidos à apreciação e receberam parecer

favorável à execução por parte da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), sob o número de protocolo PP00850 (Apêndice 4).

Tratamento com tetraciclina

Dez dias após a implantação das fatias e, posteriormente, a cada 5 dias, foram injetados 100 µL de hidrócloro de tetraciclina (cod T3383, Sigma-Aldrich) intraperitonealmente (41,6 nmol/g de peso do animal), seguindo protocolo (Sakai *et al.*, 2010). Um incisivo inferior de cada animal que teve as amostras destinadas para a análise em microscopia confocal, foi removido como um controle positivo da técnica de marcação por tetraciclina. Uma fatia dental não implantada configurou um controle negativo.

Eutanásia dos animais e recuperação das amostras

Decorridos 35 dias da implantação das fatias, os animais foram anestesiados como previamente detalhado e eutanasiados por deslocamento cervical. As amostras foram removidas do dorso dos animais e enxaguadas em PBS. Uma amostra de cada grupo foi destinada para análise em microscopia confocal. Para tanto, após o enxague em PBS, os tecidos localizados no interior das cavidades pulpareas foram removidos com pinça clínica, sem tocar nas paredes dentinárias, as fatias foram secas com gaze estéreis e fixadas entre lâminas e lamínulas de vidro com auxílio de adesivo à base de cianoacrilato, para imediata análise em microscópio confocal. As demais amostras de cada grupo foram fixadas em solução de formaldeído tamponado 10% e processadas histologicamente para análise histo-morfológica e imuno-histoquímica.

Análise histo-morfológica

Cinco amostras de cada período dos grupos experimentais e duas de cada grupo-controle foram descalcificadas em ácido fórmico 10% à temperatura ambiente, sob agitação de 100 rpm, com trocas a cada 3 dias até que a dentina não apresentasse mais resistência ao corte. As amostras foram processadas em processador automático (Modelo Leica TP1020, Leica) e incluídas em parafina para a microtomia (cortes teciduais no sentido transversal, de 4 - 5µm) e montagem em lâminas. Um corte de cada amostra foi destinado à coloração pela técnica

convencional da hematoxilina-eosina (HE) e os demais foram reservados para análise imuno-histoquímica.

As lâminas histológicas coradas pela técnica HE foram observadas em microscópio de luz (Microscópio Olympus – Modelo Bx41, Olympus Corporation, Tokyo, Japan) com sistema de captura de imagens, sob aumentos de 40, 100x, 400x e 1000x. Fotomicrografias referentes às áreas de interesse de cada amostra foram registradas, nos aumentos de 400x e 1000x, para posterior análise e descrição morfológica das observações.

Análise imuno-histoquímica

Previamente à incubação com o anticorpo primário, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena dos tecidos com solução de peróxido de hidrogênio a 3% em metanol absoluto, por 20 min; a reativação antigênica em tampão citrato de sódio 0,01 M, pH 6,0 durante 40 min, em banho-maria a 95 – 98°C; e o bloqueio de sítios inespecíficos com SFB 5% em PBS, por 40 min. Os anticorpos específicos contra os antígenos humanos sialofosfoproteínadentinária (DSPP; cod 73632, *Santa Cruz Biotechnology*, Paso Robles, CA, USA) e proteína de matriz dentinária (DMP-1; cod73633, *Santa Cruz Biotechnology*) foram utilizados para a detecção de odontoblastos-like, e actina de músculo liso (SMA; cod53015, *Santa Cruz Biotechnology*) para localização de rede microvascular. As diluições utilizadas foram 1:200, 1:50 e 1:200, respectivamente. A seguir, os cortes histológicos foram incubados com polímero marcado com HRP, conjugado com anticorpos secundários (EnVision + Dual Link System – HRP; *Dako*, Carpinteria, CA, USA), em câmara úmida durante 30 min à temperatura ambiente. A detecção foi realizada utilizando solução cromógena contendo 0,03% de 3,3'-diaminobenzidina (3,3',4,4'-tetra-amino-bifenil-tetra-hidroclorato) e 0,3% de peróxido de hidrogênio (*Dako*). A contra-coloração foi feita com solução de hematoxilina de Harris (*Lafan Química Fina*, Várzea Paulista, SP, Brasil). Para cada reação foi utilizado um controle negativo, o qual foi incubado somente com a solução diluente (abolição do anticorpo primário). Os cortes histológicos foram analisados em microscópio de luz (Microscópio Olympus – Modelo Bx41, Olympus Corporation, Tokyo, Japan) com sistema de captura de imagens, sob aumentos de 40, 100x, 400x e 1000x, percorrendo toda a extensão do tecido. Fotomicrografias referentes às áreas de interesse de cada amostra experimental ou controle foram registradas, sob os aumentos de 400x e 1000x, para descrição

morfológica das observações. Os ajustes para a aquisição das imagens foram iguais para todos os grupos. A reação positiva foi evidenciada pela presença de coloração castanha no local da marcação dos anticorpos.

Análise em microscopia eletrônica confocal

Para avaliar o potencial de diferenciação das DPSC em odontoblastos funcionais, injeções de tetraciclina, conhecida por pigmentar o tecido dentinário, foram administradas nos animais portadores de amostras dos grupos experimentais e controle. Com o intuito de verificar a eficácia da tetraciclina na quelação do cálcio da dentina, e sua conseqüente incorporação no tecido em mineralização, um incisivo inferior de cada animal que teve as amostras destinadas para a análise em microscopia confocal, também foi removido como um controle positivo da técnica de marcação por tetraciclina.

As fatias destinadas à análise em microscopia confocal foram fixadas entre lâminas e lamínulas de vidro com auxílio de adesivo à base de cianoacrilato. Foi utilizado microscópio confocal de varredura a laser (Leica DMI6000 B Microscope, Leica Microsystems, Wetzlar, Hesse, Germany) com Confocal Scanner TCS SP5 (Leica Microsystems) acoplado, utilizando-se os seguintes parâmetros: laser ultravioleta (405nm – 35 mW), filtro de excitação de 405-488 nm e filtro de barreira de 465-495 nm.

Resultados

Ainda que não tenha sido objetivo deste trabalho, quando da remoção das amostras, foi observado que o aspecto macroscópico variou bastante entre os grupos. Nas amostras pertencentes ao grupo controle positivo (polpa dental original – Fig. 1A) foi observada coloração vermelha intensa, condizente com a de um tecido bastante vascularizado. Ainda, foi notada a confluência de vasos do hospedeiro em direção ao espaço da cavidade pulpar. As amostras do grupo controle negativo apresentaram uma coloração esbranquiçada. Já as amostras pertencentes aos grupos nos quais as pastas de HC e Triantibiótica foram utilizadas apresentaram uma coloração intermediária (Fig. 1B). Em um animal portador das amostras desses grupos foi encontrada evidência de reação inflamatória com a presença de exsudato purulento, especialmente na região da amostra do grupo da pasta Triantibiótica. As

amostras desse animal não foram consideradas na análise tecidual apresentada neste trabalho.

As amostras dos grupos em que apenas a irrigação dos canais foi realizada (grupos: NaOCl/EDTA, NaOCl e EDTA) não apresentaram aspecto macroscópico padrão. Em algumas cavidades pulpares foi visualizada coloração vermelha intensa e em outras, coloração esbranquiçada, com presença predominante de arcabouço não degradado (Fig. 1C, D, E).

A Tabela 1 apresenta o resumo da ação dos materiais e os respectivos impactos sobre as células, e conseqüentemente sobre os tecidos formados, no tratamento endodôntico regenerativo.

Análise histo-morfológica

Pela análise histo-morfológica (coloração HE), foi possível observar a presença de tecido conjuntivo no interior da câmara pulpar das amostras de todos os grupos, embora com variações na qualidade dos tecidos. Nas amostras do grupo controle positivo foi observada a presença de um tecido conjuntivo frouxo, organizado, ricamente celularizado, apresentando vasos sanguíneos e feixes nervosos (Fig. 2A, B). Nessas amostras também foi observada uma camada celular mais densa nas subjacências da pré-dentina, compatível com o padrão de organização e localização da camada de odontoblastos.

As amostras dos grupos experimentais apresentaram, em comum, resquícios de arcabouço, especialmente no centro da cavidade pulpar, sendo encontradas quantidades variadas deste material em todos esses grupos. Isto sugere que 35 dias de implantação das amostras foram insuficientes para a degradação completa do arcabouço. É interessante frisar que o padrão de substituição do arcabouço ocorreu de forma centrípeta.

Nas amostras do grupo da pasta de HC (Fig. 2C, D) foi observada a presença de tecido conjuntivo fibroso, pouco celularizado e pouco vascularizado, e com grande quantidade de arcabouço remanescente entre as fibras. O tecido formado nas amostras do grupo da pasta Triantibiótica (Fig. 2E, F) foi o que mais se assemelhou ao do grupo-controle positivo, revelando uma aparência mais celularizada e densa do que a evidenciada nos demais grupos experimentais. A porção mais organizada do tecido foi localizada em regiões subjacentes à dentina, onde a maior concentração de células nessas áreas sugere a reprodução da camada de odontoblastos encontrada em polpas originais,

ainda que essas células não se apresentassem de modo colunar ou polarizadas como odontoblastos maduros. Vale salientar que, apesar da semelhança com o tecido pulpar original, não foram encontrados vasos sanguíneos de grande calibre.

Nas amostras dos grupos em que a dentina foi tratada apenas com soluções irrigadoras foi observada uma precária formação tecidual, com a presença predominante de arcabouço, áreas vazias ou de tecido desorganizado, muito fibroso e pouco celularizado. Os resultados dos grupos NaOCl/EDTA (Fig. 2G, H) e NaOCl (Fig. 2I, J) foram inferiores aos do grupo EDTA (Fig. 2K, L).

Como já esperado, nas amostras do grupo-controle negativo foi observada a predominância de arcabouço, áreas vazias ou tecido conjuntivo fibroso desorganizado e pobremente celularizado (Fig. 2M, N).

Análise imuno-histoquímica

Para melhor avaliar as características dos tecidos formados, foram realizadas reações de imuno-histoquímica utilizando os anticorpos primários anti-DSPP e anti-DMP-1, conhecidos como marcadores de odontoblastos, e anti-SMA, para localização de células endoteliais.

No grupo-controle positivo (tecido pulpar natural) a imunodeteção da proteína DSPP (Fig 3A, D) foi mais evidente quando comparada à da DMP-1 (Fig. 3B). A maior expressão das duas proteínas se deu na porção periférica do tecido pulpar, condizente com a localização natural da camada de odontoblastos. A expressão da proteína SMA (Fig. 3C) mostrou-se bem distribuída por todo o tecido pulpar. Dentre os grupos experimentais, apenas o grupo da pasta Triantibiótica apresentou marcação considerável nas reações realizadas com os referidos anticorpos. Porém, diferentemente do padrão de expressão apresentado pelo tecido pulpar natural, nesse grupo as marcações nas reações com a DSPP (Fig. 3E, H) e DMP-1 (Fig. 3F) não se concentraram apenas na região imediatamente subjacente à dentina, mas sim expressivamente em faixa tecidual mais ampla. Em contrapartida, a marcação pelo SMA (Fig. 3G) foi menos evidente no grupo da pasta Triantibiótica quando comparada ao tecido pulpar natural.

No grupo controle negativo não houve detecção de nenhum marcador (Fig. 3I, J, K, L).

As fotomicrografias obtidas a partir da análise histoquímica permitiram notar que, embora o padrão de marcação do tecido mole tenha sido diferente entre os grupos, na análise do tecido duro (dentina) a marcação apresentou padrão semelhante em todos os grupos. Ademais, foi também constatada a presença de camada de pré-dentina em todos os grupos, com exceção do grupo-controle negativo (Fig. 4).

Análise da marcação por tetraciclina

Por essa análise, foi possível perceber a presença de duas linhas fluorescentes próximas, uma mais fortemente marcada e outra menos evidente, em oposição à região do esmalte dental (Fig. 5A).

No grupo-controle positivo (polpa original) foi detectada uma linha fluorescente espessa na parede interna da câmara pulpar e uma porção de tecido com aspecto menos organizado também marcado pela tetraciclina (Fig. 5B).

Duas linhas fluorescentes foram observadas nas amostras do grupo do HC (Fig. 5C) e apenas uma linha no grupo da pasta Triantibiótica (Fig. 5D). Nos grupos em que a dentina foi tratada apenas com soluções irrigadoras, foi observado que, na amostra da associação NaOCl/EDTA (Fig. 5E, Fig. 6), houve uma forte marcação em área (a1) de 339 μm , composta por diversas linhas marcadas por tetraciclina, uma área menor (a2 - 83,6 μm) sem marcação, nova linha marcada por tetraciclina, outra por área (a3 - 418 μm) sem marcação e mais uma área não marcada (a4 - 79,4 μm) delimitada por duas linhas marcadas. Curiosamente, esse padrão de distribuição da marcação mudou na porção mais retilínea da fatia. As linhas da a1 aparecem mais justapostas, e a área de marcação reduz para 88,2 μm e a3 diminui para 180 μm . Nas amostras dos grupos NaOCl (Fig. 4F) e EDTA (Fig. 4G) foram observadas apenas uma linha marcada por tetraciclina em cada.

No grupo-controle negativo não foi encontrada marcação expressiva e no controle negativo da marcação (amostra não implantada), nenhuma marcação foi observada.

Figura 1. Aspecto macroscópico das amostras dos diferentes grupos experimentais quando da recuperação, 35 dias após a implantação. (A) Grupos-controle positivo e negativo, (B) grupos Triantibiótica - Tri e Hidróxido de Cálcio - HC, (C) grupos NaOCl/EDTA e NaOCl, (D) grupos NaOCl/EDTA e NaOCl e (E) NaOCl e EDTA.

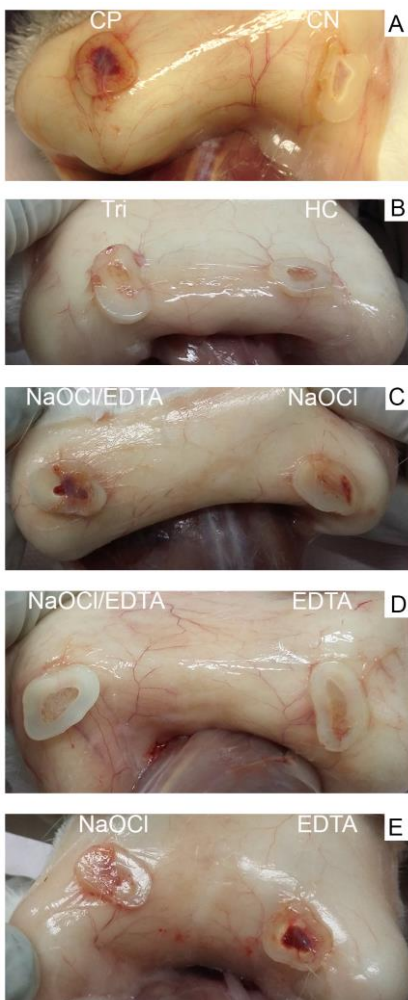


Figura 2. Fotomicrografias em microscópica de luz do aspecto histomorfológico dos tecidos encontrados nos diferentes grupos e em diferentes aumentos, após 35 dias de implantação. Imagens representativas dos grupos (A, B) controle positivo, (C, D) pasta de Hidróxido de Cálcio, (E, F) pasta Triantibiótica, (G, H) NaOCl/EDTA, (I, J) NaOCl, (K, L) EDTA e (M, N) controle negativo. Da esquerda para a direita as imagens de cada grupo são apresentadas nos aumentos de 400x e 1000x, com barras representando 50 μ m e 20 μ m, respectivamente.

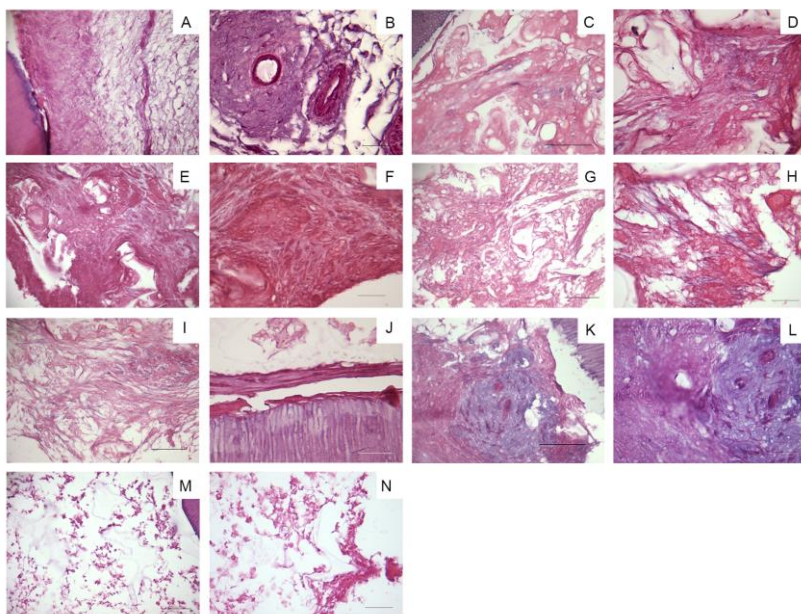


Figura 3. Fotomicrografias em microscopia de luz da marcação imunohistoquímica nas reações com anticorpos DSPP, DMP-1 e SMA nos grupos (A, B, C) controle positivo, (E, F, G) pasta Triantibiótica e (I, J, K) controle negativo, em aumento de 400x (a barra indica 50 μ m). Marcação pela DSPP em aumento de 1000x nos grupos (D) controle positivo, (H) pasta Triantibiótica e (L) controle negativo, a barra indica 20 μ m.

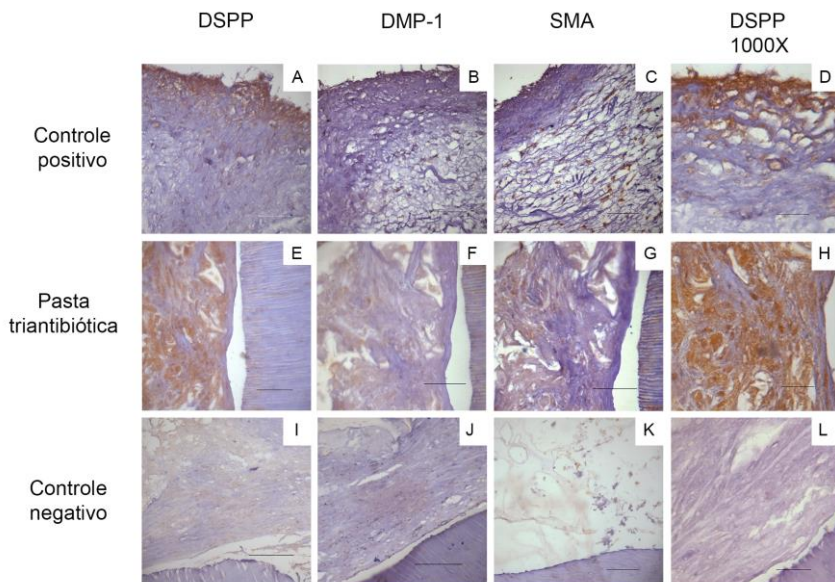


Figura 4. Fotomicrografias da estrutura dentinária, em aumento de 400x, evidenciando a presença de pré-dentina nos grupos (A) controle positivo, (B) Hidróxido de Cálcio, (C) Triantibiótica, (D) NaOCl/EDTA, (E) NaOCl, (F) EDTA, com exceção do (G) controle negativo. A barra indica distância de 50 μ m.

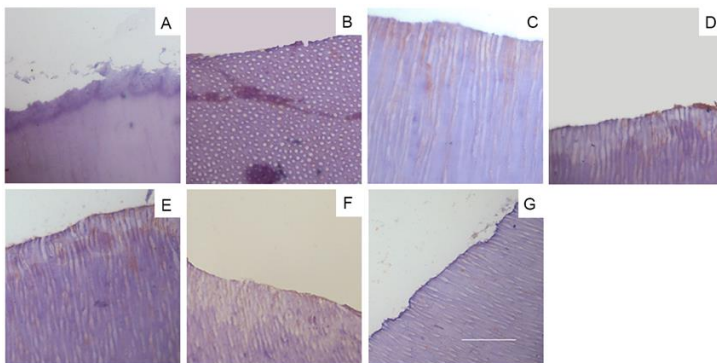
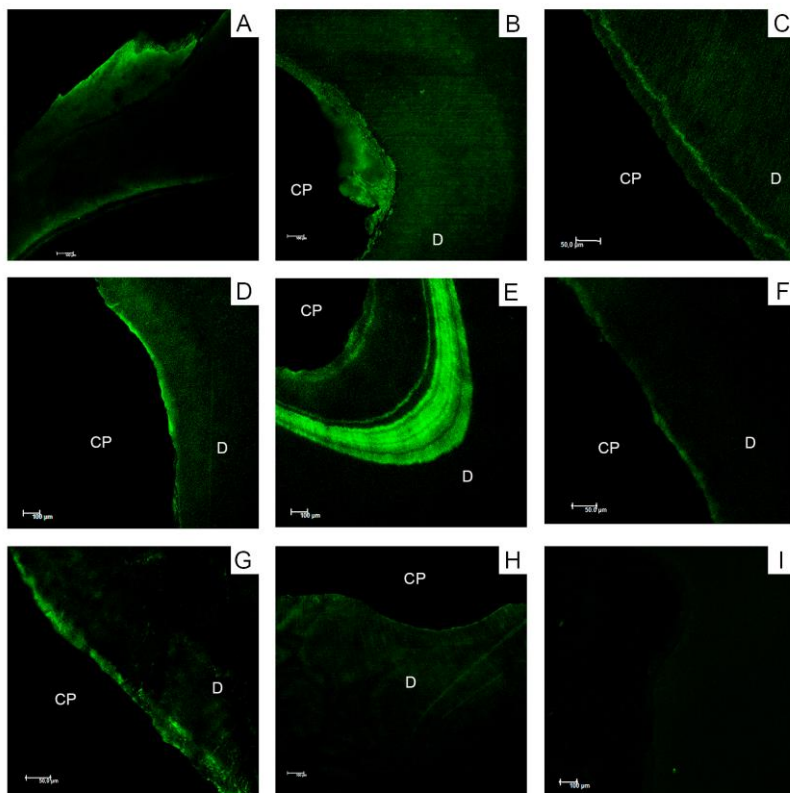


Figura 5. Fotomicrografias de microscopia confocal das amostras representativas de (A) controle positivo da marcação – incisivo de camundongo, grupos (B) controle positivo, (C) pasta de Hidróxido de Cálcio, (D) pasta Triantibiótica, (E) NaOCl/EDTA, (F) NaOCl, (G) EDTA, (H) controle negativo e (I) controle negativo da marcação - fatia dental humana não implantada.



CP: cavidade pulpar; D: dentina.

Figura 6. Fotomicrografia de microscopia confocal da amostra representativa do grupo NaOCl/EDTA.

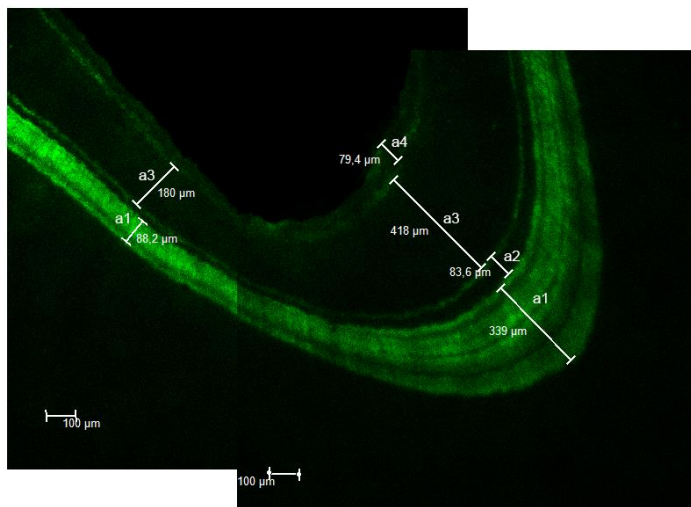


Tabela 1. Resumo da ação dos materiais e os respectivos impactos sobre as células no tratamento endodôntico regenerativo.

Material	Ação	Impacto da ação sobre as células
NaOCl	Desnatura componentes orgânicos	Negativo
EDTA	Desmineraliza a matriz dentinária e favorece a liberação de fatores de crescimento	Positivo
Hidróxido de Cálcio	Desnatura componentes orgânicos	Negativo
Triantibiótica	Desmineraliza a matriz dentinária e favorece a liberação de fatores de crescimento	Positivo

NaOCl: Hipoclorito de sódio

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

Discussão

Abordagens de engenharia tecidual requerem a interação entre células-tronco, arcabouço e proteínas biosinalizadoras (Langer e Vacanti, 1993). Esse princípio que rege a engenharia tecidual também se aplica aos procedimentos endodônticos regenerativos. Esses procedimentos são alternativas biológicas para o tratamento de dentes imaturos despolpados, com o objetivo final de reestabelecer o tecido pulpar (Cordeiro *et al.*, 2008; Sakai *et al.*, 2010) e retomar o processo de dentinogênese para a continuidade do desenvolvimento radicular e fortalecimento da estrutura dental. Modelos de estudo como o Modelo de Fatia Dental/Arcabouço para Engenharia de Tecido Pulpar (Cordeiro *et al.*, 2008) são recursos importantes para melhor compreender os eventos ocorridos no processo de neoformação tecidual e, conseqüentemente, auxiliar no desenvolvimento de protocolos de tratamento mais seguros e previsíveis.

No protocolo para procedimentos endodônticos regenerativos sugerido pela AAE é aconselhado o uso de NaOCl 1,5%, da pasta de HC ou triantibiótica para a desinfecção do canal radicular e de EDTA 17% para biomobilização de proteínas da matriz dentinária e indução de diferenciação nas células-tronco, como recursos para favorecer a neoformação tecidual. Recentemente, estudos demonstraram que a presença de infecção remanescente no canal (Nosrat, 2015) e a ausência de proteínas da matriz dentinária ou a sua não mobilização (Casagrande *et al.*, 2010) prejudicam ou impedem o desenvolvimento do novo tecido. Desse modo, o uso dos materiais supracitados é imprescindível para preparar o microambiente para as células-tronco.

Inicialmente, cabe ressaltar que neste estudo foram utilizados animais não imunossuprimidos. A opção pela não imunossupressão se deu pelos resultados positivos na execução prévia de experimento piloto e trabalho recentemente produzido pelo grupo de pesquisa (Coelho, 2015), nos quais também foram utilizados animais não imunossuprimidos para a implantação de fatias dentais/arcabouço/células-tronco. A ausência de reações do hospedeiro contra o implante (ou do implante contra o hospedeiro), mesmo com a implantação de fatias de dentes humanos e células de origem humana, motivou a, igualmente, não imunossuprimir os camundongos nesta pesquisa. Neste estudo, os animais foram mantidos sob constante monitoramento no período pós-implantação e não foram detectadas alterações locais no epitélio da região dos implantes, nem rompimento

de sutura, bem como não foram notadas alterações sistêmicas ou comportamentais nos animais.

Outra modificação no modelo de estudo para engenharia de tecido pulpar proposto originalmente por Cordeiro *et al.*, (2008) foi realizada com o intuito de simular os procedimentos realizados na rotina clínica da terapia endodôntica. Aqui, previamente ao preparo das fatias dentais, os molares foram acessados endodonticamente e tratados com diferentes protocolos, de acordo com as seguintes associações de matérias: NaOCl/pasta de HC/EDTA, NaOCl/pasta triantibiótica/EDTA, NaOCl/EDTA, NaOCl e EDTA.

No presente estudo, utilizando soluções irrigadoras nas concentrações recomendadas pela AAE, foi observado pela análise histomorfológica, que nas amostras tratadas apenas por irrigação, com as soluções aplicadas isoladamente ou de modo sequencial, houve a formação de um tecido conjuntivo fibroso, pouco celularizado e pobremente vascularizado. Dentre esses grupos, o melhor resultado foi encontrado naquele em que a dentina foi tratada apenas com EDTA. Possivelmente devido ao fato dessa solução desmineralizar a superfície dentinária, expondo a matriz colágena, que serve de substrato para as células, e liberando fatores morfogênicos, que são proteínas com efeito bioativo no comportamento e em várias atividades celulares, que induzem a divisão, diferenciação e migração celular (Grando Mattuella *et al.*, 2007; Demarco *et al.*, 2010). No entanto, cabe ressaltar que embora o tecido formado nas amostras desse grupo tenha sido mais celularizado e organizado do que os das amostras tratadas com NaOCl, o mesmo não apresentou semelhanças histomorfológicas que permitissem a sua comparação com o tecido pulpar natural. Mesmo com diferenças metodológicas, os resultados deste estudo estão de acordo com os encontrados por Casagrande *et al.*, (2010), que também verificaram a formação de um tecido de melhor qualidade na dentina tratada com EDTA, quando comparado ao tecido formado nas amostras tratadas com NaOCl. No estudo desses autores, as amostras foram mergulhadas nas soluções irrigadoras após a produção do arca-bouço e imediatamente antes da sementeira das células. No presente estudo, os tratamentos foram realizados previamente aos procedimentos para engenharia tecidual, por irrigação da cavidade pulpar via seringa/agulha, simulando a abordagem realizada na clínica.

Outro achado que reforça a importância da interação célula/substrato por mecanismos de sinalização está relacionado com a posição topográfica em que ocorreu a neoformação do tecido. Em todos os grupos, a deposição tecidual ocorreu de forma centrípeta sendo que,

usualmente, as áreas mais celularizadas e organizadas dos tecidos estavam voltadas para a região de interface com a dentina.

O arcabouço utilizado também pode ter influenciado no processo de formação tecidual. Neste trabalho, como em outros que utilizaram o mesmo modelo de estudo (Cordeiro *et al.*, 2008; Casagrande *et al.*, 2010; Demarco *et al.*, 2010; Sakai *et al.*, 2010), o uso do PLLA como arcabouço pode ter contribuído no condicionamento da matriz dentinária. A liberação lenta do ácido na degradação do PLLA pode ter colaborado na desmineralização da dentina, pela queda do pH local (Cordeiro *et al.*, 2008; Demarco *et al.*, 2010). Nos grupos em que o EDTA foi utilizado, parece ter ocorrido efeito somatório desses dois agentes, resultando em maior solubilização de proteínas não colágenas da matriz dentinária, permitindo maior exposição do colágeno e biomobilização de proteínas morfogênicas que, como exposto anteriormente, têm correlação com as funções celulares (Galler, D'souza, Federlin, *et al.*, 2011; Martin *et al.*, 2014).

No presente trabalho, quando da recuperação das amostras, remanescentes de arcabouço foram observados em amostras de todos os grupos nos quais o mesmo foi produzido. No estudo de Cordeiro *et al.* (2008), a degradação do arcabouço ocorreu entre duas e quatro semanas, como previamente descrito por outros autores (Nor *et al.*, 2001). Porém, em recente publicação, *overview* a respeito das propriedades do ácido polilático (PLA), foi relatado que a degradação é uma característica crítica do material. A meia vida de hidrólise desse material é relativamente longa, devido ao grupo alquila que prejudica o “ataque” pela água. *In vivo*, o PLLA, derivado do PLA, pode levar até 12 meses para iniciar a sua degradação (Bergstrom e Hayman, 2015).

Adicionalmente ao estudo do efeito das soluções irrigadoras no tratamento da dentina sobre a engenharia de tecido pulpar humano, também foi investigado o efeito de medicações usualmente aplicadas como curativo de demora. As observações histológicas dos grupos nos quais as pastas de HC ou triantibiótica foram usadas, mais uma vez, reforçam a sugestão de que o condicionamento da dentina tem influência positiva na regeneração tecidual. Segundo Yassen, Chu, *et al.* (2013), o baixo pH da pasta triantibiótica parece colaborar na exposição do colágeno e dos bioindutores da matriz dentinária. Em seu estudo, os autores avaliaram a estrutura química da dentina, que serve de substrato para as células, em relação aos níveis de fosfato/amido I, após tratamento com a pasta triantibiótica ou a pasta de HC. Os maiores níveis de fosfato/amido I encontrados nas amostras tratadas com HC sugerem que sua alta alcalinidade (pH = 11,8) poderia induzir a

neutralização e desnaturação de proteínas orgânicas da matriz dentinária (Andreasen, Farik e Munksgaard, 2002; Yassen, Chu, *et al.*, 2013), bem como a degradação do colágeno. O pequeno peso molecular do HC poderia facilitar a sua penetração através da matriz e conduzir a alterações na conformação tridimensional do tropocolágeno.

Confirmando os resultados de Yassen, Chu, *et al.*, (2013), no presente estudo, o grupo da pasta triantibiótica mostrou o melhor resultado na análise histomorfológica do tecido. Neste grupo o tecido conjuntivo formado mostrou-se mais celularizado e com estrutura mais organizada do que nas amostras do grupo tratado com a pasta de HC. Apesar de creditar o resultado superior da pasta triantibiótica ao seu baixo pH, a concentração final da pasta utilizada não foi apresentada por Yassen, Chu, *et al.* (2013). Ruparel *et al.* (2012) demonstraram *in vitro* que o contato de células-tronco da papila dental com pasta triantibiótica na concentração de 1mg/mL reduziu a viabilidade celular em 50%. No presente estudo a concentração final da pasta utilizada foi de 0,1 mg/mL, seguindo recomendações da AAE. Segundo o estudo de Ruparel *et al.* (2012), a concentração de 0,1 mg/mL foi a mais alta utilizada, mantendo a viabilidade celular. Além disso, mesmo não sendo objeto de estudo do presente trabalho, deve se considerar que a concentração da pasta triantibiótica tem repercussão também no resultado estético do tratamento. De acordo com Althumairy, Teixeira e Diogenes (2014), a pasta triantibiótica tende a causar alteração da cor da estrutura dental quando utilizada em concentrações acima de 1mg/mL. Em trabalho paralelo produzido por nosso grupo de pesquisa, foi verificado, por meio de espectrofotometria digital, que a pasta triantibiótica na concentração aqui utilizada mostrou resultado semelhante ao da pasta de HC quanto à alteração de cor, em períodos que variaram de 1 dia a 4 meses de uso das medicações (dados em processo de publicação). Considerando que os procedimentos regenerativos são voltados especialmente para o tratamento de dentes de crianças e jovens adultos, e que esses podem sofrer assédio moral (*bullying*) em decorrência da estética dental alterada, é conveniente que a medicação utilizada tenha potencial para apresentar resultados clínicos e biológicos satisfatórios.

Apesar de o tecido formado nas amostras do grupo pasta Triantibiótica ter sido o mais organizado de todos os grupos estudados, na análise imuno-histoquímica das reações com os anticorpos anti-DSPP e anti-DMP-1, foi observado padrão de marcação diferente do apresentado pelas amostras do grupo-controle positivo (polpa dental original). Neste grupo, a área do tecido predominantemente marcada

pela coloração castanha, sugerindo a reação antígeno-anticorpo, foi aquela imediatamente subjacente à pré-dentina, condizente com a localização da camada de odontoblastos. No grupo da pasta Triantibiótica, houve uma forte marcação de coloração castanha ao longo de todo o tecido, possivelmente em decorrência da impregnação do corante no arcabouço não degradado. Essa impregnação também foi verificada nos demais grupos experimentais.

A qualidade do tecido obtido no final do experimento pode estar relacionada ao tempo para processamento histológico das amostras. Após a recuperação e fixação, as mesmas foram mergulhadas em solução de ácido fórmico 10%, onde permaneceram até que a dentina não apresentasse mais resistência ao corte e permitisse a microtomia do tecido (120 dias). Esse protocolo para desmineralização foi determinado a partir de estudo piloto realizado previamente, no qual foram testadas as soluções de ácido fórmico 10%, EDTA 10%, e ácido fórmico 50% + citrato de sódio 20%, sem agitação e com troca das soluções a cada 48 horas. As amostras mergulhadas em ácido fórmico 10% foram as primeiras a não apresentarem resistência à penetração de alfinete metálico, após 150 dias de desmineralização. Com intuito de acelerar esse tempo, foi adicionada ao protocolo do presente estudo, a agitação da solução em agitador magnético. O tempo foi reduzido para 120 dias, entretanto, esse período foi muito superior ao utilizado em outras pesquisas que empregaram a mesma metodologia, o qual variou de 5 a 15 dias (Cordeiro *et al.*, 2008; Demarco *et al.*, 2010). O período de 5 a 15 dias vai ao encontro dos resultados de pesquisas publicadas recentemente (Gupta *et al.*, 2014; Kapila *et al.*, 2015), que testaram a capacidade de desmineralização do ácido fórmico 10%, EDTA, entre outros, relacionando o tempo para desmineralização à qualidade de tecidos moles e duros ao final do processo. Essas pesquisas revelaram que o tempo médio de desmineralização pelo ácido fórmico 10%, sem aquecimento ou agitação das amostras, foi de 10-12 dias (Gupta *et al.*, 2014), e que sob agitação o tempo foi reduzido para 8-9 dias (Kapila *et al.*, 2015). A diferença do tempo de desmineralização do presente estudo para aqueles supracitados, pode residir na procedência da solução utilizada (diferentes marcas comerciais). Por conseguinte, é necessária melhor investigação para elucidar essa questão.

Nesta pesquisa, enquanto os resultados das análises histomorfológicas e histo-químicas foram prejudicados pelo longo período de processamento, as amostras submetidas à análise em microscopia confocal (tratadas com tetraciclina) apresentaram resultados mais

representativos dos eventos ocorridos, pois essas não foram submetidas a nenhum processamento previamente à análise.

Para avaliar o potencial de diferenciação das DPSC em odontoblastos funcionais, aptos a depositar matriz dentinária e participar da sua mineralização, 10 dias após a implantação das fatias, os camundongos foram tratados periodicamente com injeções de tetraciclina, seguindo protocolo proposto por Sakai *et al.*, (2010). Esse antibiótico, conhecido por pigmentar o tecido dentinário, age por quelatação do cálcio da dentina, se incorporando ao tecido em mineralização (Sanchez, Rogers e Sheridan, 2004). Assim, após a recuperação das amostras do dorso dos animais, as fatias tratadas com tetraciclina foram fixadas entre lâminas e lamínulas, e analisadas em microscópio de varredura confocal. Por essa análise foi possível constatar que todos os grupos experimentais apresentaram marcações por tetraciclina, evidenciada por coloração verde fluorescente, sugerindo que em todos os grupos houve a diferenciação das DPSC em células funcionalmente semelhantes aos odontoblastos naturais, com capacidade de produzir e mineralizar a matriz dentinária.

O grupo NaOCI/EDTA destacou-se dentre os demais por apresentar marcação em várias camadas de dentina neoformada, exibindo áreas de dentina neoformada que variaram de 188,2 μm ($a1 + a3$ na porção reta da fatia) a 920 μm (soma das áreas da porção curva da fatia), após 25 dias de tratamento com tetraciclina. Como a tetraciclina marca a área de tecido em mineralização, a distância entre duas linhas representa a taxa de deposição da dentina no período entre duas aplicações de tetraciclina. Considerando a área reta da fatia, a taxa de deposição da matriz foi de $\pm 7,5 \mu\text{m}/\text{dia}$ e na área curva 36,8 $\mu\text{m}/\text{dia}$. Na literatura foram encontradas médias de deposição de dentina primária que variaram de 4-16 $\mu\text{m}/\text{dia}$ (Kawasaki, Tanaka e Ishikawa, 1977; Sakai *et al.*, 2010). A taxa de deposição de matriz dentinária parece ter relação com o ciclo de vida dos odontoblastos. De modo geral, a atividade secretória dessas células começa lentamente, e aumenta com a maturidade celular, atingindo picos de deposição. Finalmente, a taxa é reduzida quando a célula completa a sua vida útil (Kawasaki, Tanaka e Ishikawa, 1977).

Nesta pesquisa, os procedimentos realizados na clínica durante a terapia endodôntica regenerativa foram simulados em laboratório para estudar a engenharia de tecido pulpar humano em dentina previamente tratada. Apesar das análises histo-morfológica e imuno-histoquímica não permitirem atestar a diferenciação das células-tronco em odontoblastos, a análise em microscopia confocal permitiu-nos aferir

que, independentemente do material utilizado no tratamento, as DPSC diferenciaram em odontoblastos funcionais, com capacidade de depositar e de participar da mineralização de camadas da matriz dentinária neoformadas. Quanto à formação tecidual, mesmo que o processo de desmineralização tenha prejudicado a qualidade final dos tecidos neoformados, a análise histo-morfológica evidenciou que nos grupos tratados com materiais que induzem a exposição de colágeno e a liberação de fatores de crescimento da matriz dentinária (grupo pasta triantibiótica e grupo EDTA), a tendência foi apresentar tecidos de melhor qualidade e mais semelhantes à polpa dental, quando comparados àqueles formados nos demais grupos. Esses achados são importantes, visto que o uso dos materiais aqui testados é recomendado no protocolo clínico para procedimentos endodônticos regenerativos, e as suas ações e interações parecem ter efeito sobre o papel das células e, conseqüentemente, na formação tecidual. Os materiais empregados nessa pesquisa para tratamento do canal são classicamente usados na terapia endodôntica convencional, visando o preparo químico do canal, para posterior obturação com material plástico. Nessa abordagem clássica, o material obturador não costuma interagir com o substrato (dentina tratada). Entretanto, em abordagens regenerativas e de engenharia tecidual, após o preparo químico, o canal recebe uma “obturação biológica”, onde a interação das células com o substrato parece ter papel determinante na formação tecidual e no sucesso do tratamento.

Terapias celulares têm perspectivas para melhor resolver casos de dentes imaturos despolpados em comparação com a terapia endodôntica clássica, que não permite a retomada do processo de dentinogênese ao final do tratamento. O restabelecimento do tecido pulpar, responsável por produzir e manter a dentina, tem potencial para reforçar a estrutura dental e aumentar a sobrevida de dentes tratados pela abordagem regenerativa.

4 METODOLOGIA EXPANDIDA

4.1 Obtenção e preparo dos dentes

Foram utilizados 36 terceiros molares, superiores ou inferiores, hígidos, recém-extraídos de pacientes com idade entre 15 e 22 anos. Após a doação e assinatura do Termo de Assentimento e/ou de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndices 1 e 2), os dentes foram imediatamente imersos no meio de transporte (Fig. 7A), composto por DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (*Invitrogen*, Carlsbad, CA, USA) suplementado com 20% soro fetal bovino (*Invitrogen*, USA), 1% de penicilina e estreptomicina (*Invitrogen*, USA) e 1% de anfotericina B (*Invitrogen*, USA), e mantidos neste meio, a 4°C, para o traslado até o laboratório.

Em 33 dentes, após o acesso endodôntico (Fig. 7B), os canais foram esvaziados com extirpa-nervos (Fig. 7C) (*Dentsply Maillefer*, Ballaigues, Switzerland), irrigados (Fig. 7D) com 2 mL de solução fosfato tamponada- PBS 1X (*Invitrogen*, Carlsbad, CA, USA) e secos por aspiração (Fig. 7E) e com pontas de papel absorvente (*Dentsply Maillefer*, Switzerland - Fig. 7F).

Na sequência, os dentes foram direcionados, aleatoriamente, a 5 grupos experimentais (n = 6/grupo) e 1 grupo-controle negativo (n = 3) (Tabela 2), de acordo com o tratamento efetuado sobre a dentina. Nos dentes dos grupos das pastas antimicrobianas, os canais foram irrigados com 20mL de NaOCl 1,5% (*Dermus*, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil), seguidos por 20 mL de solução salina, secos com pontas de papel absorvente e preenchidos com pasta de HC (Calen[®], SS White, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil – Fig. 7G) ou pasta triantibiótica (*Magistrale*, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil – Fig. 7H), composta por ciprofloxacina, metronidazol e minociclina, na proporção de 1:1:1. As cavidades de acesso foram provisoriamente restauradas com Citodur[®] (*Dorident*, Viena, Viena, Áustria - Fig. 7I, J) e os dentes mantidos em PBS 1X por 21 dias. Após esse período, o material restaurador provisório foi removido e os canais irrigados com 20 mL de EDTA 17% (*Merck*, Darmstadt, Hessen, Alemanha – Fig. 8K), e secos por aspiração (Fig. 7L). Nos dentes do grupo NaOCl/EDTA, os canais foram irrigados com 20mL de NaOCl 1,5% (*Dermus*), seguidos por 20 mL de solução salina e, finalmente, com 20 mL de EDTA 17%. Nos dentes do grupo NaOCl, os canais foram irrigados com 20mL de NaOCl

1,5% (*Dermus*), seguidos por 20 mL de solução salina e nos do EDTA, foram irrigados apenas com 20 mL de EDTA 17%.

Os procedimentos para engenharia tecidual foram baseados no Modelo de Fatia Dental/Arcabouço para Engenharia de Tecido Pulpar (Cordeiro *et al.*, 2008). Após os devidos tratamentos da dentina, foram feitas fatias de aproximadamente 1 mm de espessura na região cervical dos molares por meio de cortes transversais (Fig. 8A, B, C). Na sequência, o espaço da câmara pulpar foi preenchido com partículas de 212 a 300 μm de cloreto de sódio (Fig. 8D, E) e PLLA (*Resomer, Evonik*, Darmstadt, Alemanha) dissolvido em clorofórmio (*Merck*, Darmstadt, Hessen, Alemanha) (Fig. 8F, G, H, I). Após 24 h, o sal foi removido por lavagens com PBS (Fig. 8J) e, finalmente, um arcabouço biodegradável altamente poroso foi obtido. Então, o conjunto fatia dental/arcabouço foi desinfetado e hidrofiliado em incubações sequenciais com concentrações decrescentes de etanol (100-70%) (Fig. 8K) e lavado em PBS (Fig. 8L).

Nos dentes do grupo-controle negativo ($n = 3$) foram realizados os procedimentos para engenharia tecidual sem que a dentina recebesse qualquer tipo de tratamento prévio e sem a semeadura das células. Fatias dentais contendo tecido pulpar original formaram o grupo-controle positivo ($n = 3$).

Tabela 2. Distribuição das amostras segundo os grupos experimentais.

Grupo/Tratamento	N
NaOCl	
Pasta de Hidróxido de Cálcio	6
EDTA	
NaOCl	
Pasta Triantibiótica	6
EDTA	
NaOCl	6
EDTA	6
NaOCl	6
EDTA	6
Controle negativo (sem tratamento e sem células)	3
Controle positivo (tecido original)	3
TOTAL	36

NaOCl: Hipoclorito de sódio

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

Figura 7. Síntese ilustrada da metodologia para o preparo dos dentes dos grupos das pastas de hidróxido de cálcio e triantibiótica. Manutenção dos dentes no meio de transporte (A). Acesso endodôntico (B), esvaziamento dos canais (C), irrigação (D) e aspiração (E), secagem dos canais (F). Pasta de hidróxido de cálcio (G). Pasta Triantibiótica (H). Restaurador provisório (I), restauração das cavidades de acesso (J). Irrigação final (K) e aspiração (L).

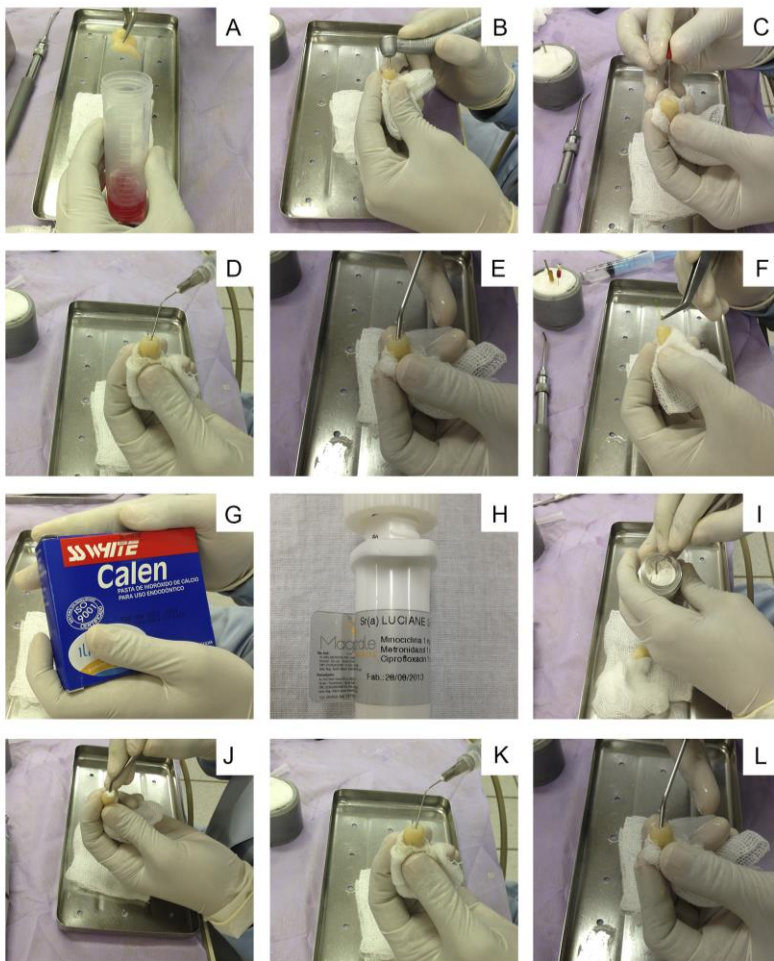
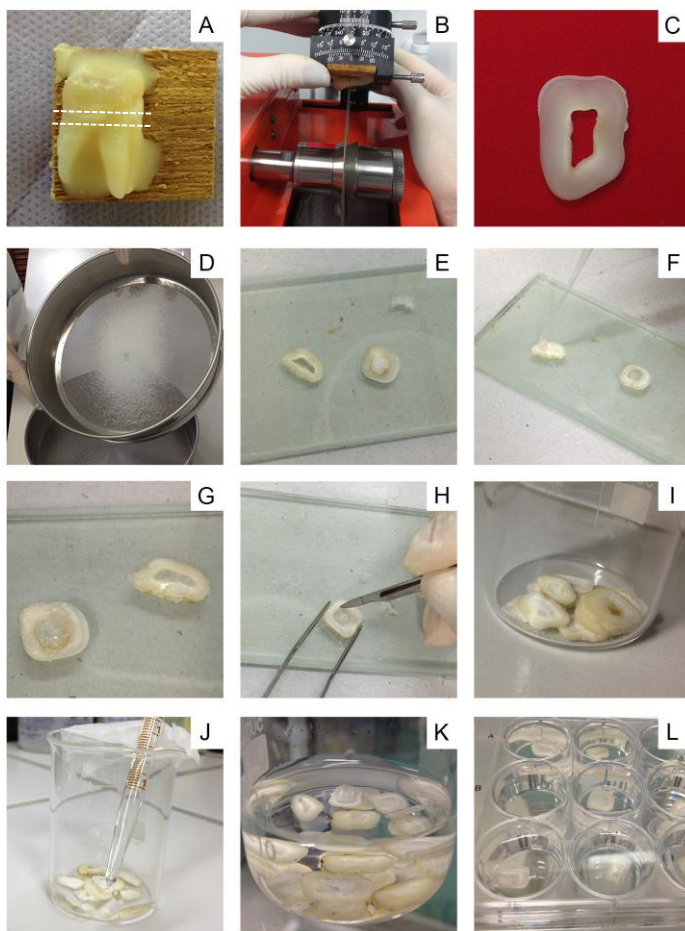


Figura 8. Preparo das fatias dentais/arcabouços, segundo o Modelo para Engenharia de Tecido Pulpar desenvolvido por Cordeiro *et al.* (2008). (A, B, C) Confeção das fatias dentais. (D, E) Peneiração e acomodação das partículas de cloreto de sódio no espaço da câmara pulpar, (F, G) adição do polímero ao sal, (H) remoção dos excessos de sal/polímero, (I) manutenção do conjunto em Becker para polimerização completa, (J) adição de PBS para remoção do sal, (K) desinfecção em etanol e (L) manutenção em PBS.



4.2 Cultura de células, semeadura celular e implantação da fatia dental/arcabouço em camundongos

Em cada um dos conjuntos fatia dental/arcabouço (grupos pasta de HC, pasta Triantibiótica, NaOCl/EDTA, NaOCl e EDTA) foram semeadas 1×10^6 DPSC (PT-5025, Lonza Walkersville, Inc.; Walkersville, MD, USA), de passagens 6 a 8, cultivadas em meio composto por 80% de DMEM (*Invitrogen*, USA) suplementado com 20% de soro fetal bovino (*Invitrogen*, USA). As células foram suspensas em uma mistura de 1:1 de Matrigel (cod 356234, *Corning*, New York, NY, USA) e meio de cultura, para permitir a sua fixação no arcabouço por meio da geleificação do Matrigel, incubado por 30 min a 37°C.

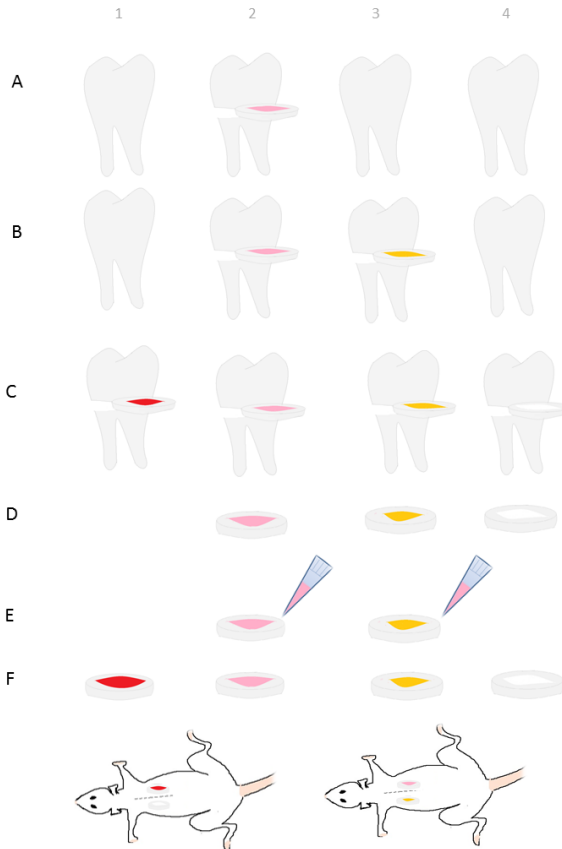
Os conjuntos fatia dental/arcabouço/DPSC, fatia dental/arcabouço (controle negativo) e as fatias com polpa dental (controle positivo) foram implantados bilateralmente no tecido subcutâneo do dorso de camundongos. Para tanto, foram utilizados 18 camundongos machos (*Mus musculus*), com 5 a 7 semanas de idade e peso entre 35 e 40g, não imunossuprimidos, provenientes do Biotério Central/UFSC. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas para 5 camundongos sob ciclo claro/escuro de 12/12 h. A temperatura ambiente da sala foi mantida em $22 \pm 1^\circ\text{C}$ e a umidade do ar em $60 \pm 5\%$.

Para a implantação, os discos de dentina foram distribuídos segundo os tratamentos recebidos. Previamente aos procedimentos cirúrgicos, os animais foram anestesiados por via intramuscular com associação de cloridrato de ketamina (80 mg/kg) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg). Após a tricotomia da região dorsal com a utilização de um aparelho de barbear, foi realizada a antisepsia da área com gaze estéril umedecida em povidona-iodo 12%.

Uma incisão longitudinal, no plano sagital mediano, de aproximadamente 2 cm, foi realizada com auxílio de bisturi e lâmina nº 15c no tecido subcutâneo do dorso dos camundongos. A divulsão do tecido foi realizada lateralmente à incisão com a ajuda de uma tesoura com ponta romba, de forma a se obter 2 sítios de implantação. Em cada sítio foi implantada 1 fatia de um dos grupos experimentais ou controle. A ordem de implantação das amostras foi previamente estabelecida, sendo que cada lado do animal recebeu discos de dentina de grupos experimentais diferentes. A distância das amostras implantadas à linha de incisão foi de aproximadamente 1 cm. As bordas da incisão foram aproximadas com auxílio de uma pinça cirúrgica e suturadas com fio de

nylon 5.0. A Figura 10 apresenta esquema de tratamento dos discos implantados no dorso dos camundongos.

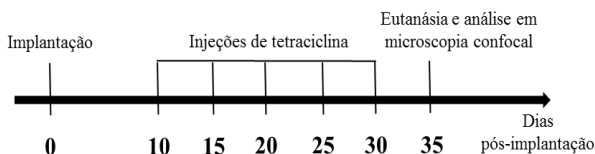
Figura 9. Esquema de tratamento dos discos implantados no dorso dos camundongos. Grupos (1) controle positivo, (2) pasta de Hidróxido de Cálcio e pasta Triantibiótica, (3) NaOCl/EDTA, NaOCl e EDTA, e (4) controle negativo nas fases de (A) curativo de demora, (B) irrigação, (C) preparo da fatia dental, (D) produção do arcaço, (E) sementeira das células e (F) implantação.



4.3 Tratamento com tetraciclina

Dez dias após a implantação das amostras e, posteriormente, a cada 5 dias, foram injetados 100 μ L de hidrocloreto de tetraciclina (T3383, Sigma-Aldrich) intraperitonealmente (41,6 nmol/g de peso do animal), seguindo protocolo de (Sakai *et al.*, 2010). Um incisivo central de cada animal que teve uma das amostras destinadas para a análise em microscopia confocal, também foi removido como um controle positivo da técnica de marcação por tetraciclina. Dois animais com implantes bilaterais (fatias dentais com polpa e fatias dentais com arcabouço sem células) foram mantidos sem tratamento como controles negativos, assim como uma fatia dental não implantada configurou um controle negativo.

Figura 10. Esquema da estratégia de administração da tetraciclina.



4.4 Eutanásia dos animais e recuperação das amostras

Decorridos 35 dias da implantação das amostras, os animais foram anestesiados como previamente detalhado e, na sequência, foi realizada eutanásia por deslocamento cervical. Então, as amostras foram removidas do dorso dos animais e enxaguadas em PBS. Cinco das seis amostras, após o enxague, foram imediatamente colocadas em cassetes plásticos previamente identificados segundo os grupos experimentais e submersos em recipiente de vidro contendo solução de formaldeído tamponado 10%, onde permaneceram por 24 h a 4°C. Uma amostra de cada grupo foi destinada para análise em microscopia confocal. Para tanto, após o enxague em PBS, os tecidos localizados no interior das câmaras pulpares foram removidos com pinça clínica, sem tocar nas

paredes dentinárias e armazenadas em tubos falcons previamente identificados e abrigados da luz em caixa metálica por 24 horas.

4.5 Métodos de análise

Após a fixação, as amostras foram processadas histologicamente para análise histo-morfológica e imuno-histoquímica.

4.5.1 Análise histo-morfológica

Cinco amostras de cada período dos grupos experimentais e uma de cada período dos grupos-controle foram desmineralizadas em 500mL solução de Ácido Fórmico 10% à temperatura ambiente, sob agitação de 100 rpm, com trocas a cada 3 dias por um período de 120 dias. Após a descalcificação, até que a dentina não apresentasse mais resistência ao corte, as amostras foram processadas em processador automático (Modelo Leica TP1020, Leica) seguindo protocolo padrão (Apêndice 5) e, posteriormente, incluídas em parafina por meio de emblocador de amostras (Modelo Leica EG1150H, Leica), para a microtomia e posterior montagem em lâminas. Os cortes teciduais de espessura de 3 – 4 µm foram desparafinados em xilol e reidratados em etanol em concentrações decrescentes. Um corte de cada amostra foi destinado à coloração pela técnica convencional da hematoxilina-eosina (HE) (Apêndice 6) e os demais foram reservados para análise imuno-histoquímica.

As lâminas histológicas coradas pela técnica HE foram observadas em microscópio de luz (Microscópio Olympus – Modelo Bx41, Olympus Corporation, Tokyo, Japan) com sistema de captura de imagens, sob aumentos de 40x, 100x, 400x e 1000x. Fotomicrografias, em aumentos de 400x e 1000x, referentes às áreas de interesse de cada grupo experimental foram registradas para posterior análise e descrição morfológica das observações.

4.5.2 Análise imuno-histoquímica

Previamente à incubação com o anticorpo primário, as amostras foram submetidas ao bloqueio da peroxidase endógena dos tecidos com solução de peróxido de hidrogênio a 3% em metanol absoluto, reativação antigênica em tampão citratode sódio 0,01 M e bloqueio de sítios inespecíficos com SFB 5%. Os anticorpos específicos contra os antígenos humanos sialofosfoproteína dentinária (DSPP; cod 73632, *Santa Cruz Biotechnology*, Paso Robles, CA, USA) e proteína de matriz dentinária1 (DMP-1; cod 73633, *Santa Cruz Biotechnology*) foram utilizados para a detecção de odontoblastos-like e actina de músculo liso (SMA; cod 53015, *Santa Cruz Biotechnology*) para localização de rede microvascular. As diluições utilizadas foram 1:200, 1:50 e 1:200, respectivamente. A seguir, os cortes histológicos foram incubados com polímero marcado com HRP, conjugado com anticorpos secundários (EnVision + Dual Link System – HRP; *Dako*, Carpinteria, CA, USA), em câmara úmida durante 30 min à temperatura ambiente. A detecção foi realizada utilizando solução cromógena contendo 0,03% de 3,3'-diaminobenzidina (3,3',4,4'-tetra-amino-bifenil-tetra-hidrocloro) e 0,3% de peróxido de hidrogênio (*Dako*). A contra-coloração foi feita com solução de hematoxilina de Harris (*Lafan Química Fina*, Várzea Paulista, SP, Brasil). Para cada reação foi utilizado um controle negativo, o qual foi incubado somente com a solução diluente (abolição do anticorpo primário). Os cortes histológicos foram analisados em microscópio de luz (Microscópio Olympus – Modelo Bx41, Olympus Corporation, Tokyo, Japan) com sistema de captura de imagens, sob aumentos de 40, 100x, 400x e 1000x, percorrendo toda a extensão do tecido. Novamente, fotomicrografias em aumentos de 400x e 1000x, referentes às áreas de interesse de cada grupo experimental ou controle foram registradas para descrição das observações. Os ajustes para a aquisição das imagens foram iguais para todos os grupos. A reação positiva foi evidenciada pela presença de coloração castanha no local da marcação dos anticorpos (Apêndice 7).

5 CONCLUSÃO

Afecções como a cárie e o trauma dental são problemas de saúde pública que atingem indivíduos mundialmente e produzem efeitos que vão além de danos fisiológicos/funcionais do órgão dental, podendo implicar na saúde geral e na qualidade de vida do indivíduo. Desse modo, cabe investir em abordagens terapêuticas de excelência para tratar acometimentos orofaciais. Com esse intuito, a engenharia de polpa dental visa restabelecer, de modo biológico, as estruturas do complexo dentina-polpa danificadas ou perdidas por processos patológicos, repercutindo na possibilidade de manutenção do elemento dental e no consequente equilíbrio estético/funcional das estruturas orofaciais.

Assim, nesta pesquisa, foram simulados em laboratório os procedimentos realizados na clínica durante a terapia endodôntica regenerativa, para estudar a engenharia de tecido pulpar humano em dentina previamente tratada. Apesar das análises histo-morfológica e imuno-histoquímica não permitirem atestar a diferenciação das células-tronco em odontoblastos, a análise em microscopia confocal permitiu-nos aferir que, independentemente do material utilizado no tratamento, as DPSC diferenciaram em odontoblastos funcionais, com capacidade de depositar e de participar da mineralização de camadas da matriz dentinária neoformadas. Quanto à formação tecidual, mesmo que o processo de desmineralização tenha prejudicado a qualidade final dos tecidos neoformados, a análise histo-morfológica evidenciou que nos grupos tratados com materiais que induzem a exposição de colágeno e a liberação de fatores de crescimento da matriz dentinária (grupo pasta triantibiótica e grupo EDTA), a tendência foi apresentar tecidos de melhor qualidade e mais semelhantes à polpa dental, quando comparados àqueles formados nos demais grupos. Esses achados são importantes, visto que o uso dos materiais testados nessa pesquisa é recomendado no protocolo clínico para procedimentos endodônticos regenerativos, e as suas ações e interações parecem ter efeito sobre o papel das células e, consequentemente, na formação tecidual.

Os procedimentos aqui realizados têm perspectivas para melhor resolver casos de dentes permanentes imaturos despolpados em comparação com a abordagem endodôntica clássica, que não permite a retomada do processo de dentinogênese ao final do tratamento. O restabelecimento do tecido pulpar, responsável por produzir e manter a dentina, tem potencial para reforçar a estrutura dental e aumentar a sobrevida de dentes tratados pela abordagem regenerativa.

6 REFERÊNCIAS

AMERICAN ASSOCIATION OF ENDODONTICS. Regenerative Endodontics. American Association of Endodontists, Chicago; 2015. Available at: <http://www.aae.org/regenerativeendo/>.

ALMUSHAYT, A. et al. Dentin matrix protein 1 induces cytodifferentiation of dental pulp stem cells into odontoblasts. **Gene Ther**, v. 13, n. 7, p. 611-20, 2006.

ALTHUMAIRY, R. I.; TEIXEIRA, F. B.; DIOGENES, A. Effect of dentin conditioning with intracanal medicaments on survival of stem cells of apical papilla. **J Endod**, v. 40, n. 4, p. 521-5, 2014.

ANDERSSON, L. Epidemiology of traumatic dental injuries. **Pediatr Dent**, v. 35, n. 2, p. 102-5, 2013.

ANDREASEN, J. O.; FARIK, B.; MUNKSGAARD, E. C. Long-term calcium hydroxide as a root canal dressing may increase risk of root fracture. **Dent Traumatol**, v. 18, n. 3, p. 134-7, 2002.

BANCHS, F.; TROPE, M. Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: new treatment protocol? **J Endod**, v.30, p.196-200, 2004.

BERGSTROM, J. S.; HAYMAN, D. An Overview of Mechanical Properties and Material Modeling of Polylactide (PLA) for Medical Applications. **Ann Biomed Eng**, 2015. [Epub ahead of print]

BLEICHER, F. Odontoblast physiology. **Exp Cell Res**, v. 325, n. 2, p. 65-71, 2014.

BREY, E. M. et al. Therapeutic neovascularization: contributions from bioengineering. **Tissue Eng**, v. 11, n. 3-4, p. 567-84, 2005.

BYSTROM, A.; CLAESSON, R.; SUNDQVIST, G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. **Endod Dent Traumatol**, v. 1, n. 5, p. 170-5, 1985.

CASAGRANDE, L. et al. Dental pulp stem cells in regenerative dentistry. **Odontology**, v. 99, n. 1, p. 1-7, 2011.

CASAGRANDE, L. et al.. Dentin-derived BMP-2 and odontoblast differentiation. **J Dent Res**, v. 89, n. 6, p. 603-8, 2010.

COELHO, D. S. **Estudo da inervação na engenharia de tecido pulpar humano**. 2015. 100p. (Master). Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil.

CORDEIRO, M. M. et al. Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. **J Endod**, v. 34, n. 8, p. 962-9, 2008.

DEMARCO, F. F. et al. Effects of morphogen and scaffold porogen on the differentiation of dental pulp stem cells. **J Endod**, v. 36, n. 11, p. 1805-11, 2010.

DIOGENES, A. R. et al. Translational science in disinfection for regenerative endodontics. **J Endod**, v. 40, n. 4 Suppl, p. S52-7, 2014.

GALLER, K. M. et al. Dentin conditioning codetermines cell fate in regenerative endodontics. **J Endod**, v. 37, n. 11, p. 1536-41, 2011.

GALLER, K. M. et al. Scaffolds for dental pulp tissue engineering. **Adv Dent Res**, v. 23, n. 3, p. 333-9, 2011.

GARCIA-GODOY, F.; MURRAY, P. E. Recommendations for using regenerative endodontic procedures in permanent immature traumatized teeth. **Dent Traumatol**, v. 28, n. 1, p. 33-41, 2012.

GRANDO MATTUELLA, L. et al. Vascular endothelial growth factor and its relationship with the dental pulp. **J Endod**, v. 33, n. 5, p. 524-30.

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

GUPTA, S. et al. Qualitative histological evaluation of hard and soft tissue components of human permanent teeth using various decalcifying

agents - a comparative study. **J Clin Diagn Res**, v. 8, n. 9, p. Zc69-72, 2014.

HAND, R. E.; SMITH, M. L.; HARRISON, J. W. Analysis of the effect of dilution on the necrotic tissue dissolution property of sodium hypochlorite. **J Endod**, v. 4, n. 2, p. 60-4, 1978.

HARRISON, J. W.; HAND, R. E. The effect of dilution and organic matter on the anti-bacterial property of 5.25% sodium hypochlorite. **J Endod**, v. 7, n. 3, p. 128-32, 1981.

HOSHINO, E. et al. In-vitro antibacterial susceptibility of bacteria taken from infected root dentine to a mixture of ciprofloxacin, metronidazole and minocycline. **Int Endod J**, v. 29, n. 2, p. 125-30, 1996.

HUANG, G. T. Pulp and dentin tissue engineering and regeneration: current progress. **Regen Med**, v. 4, n. 5, p. 697-707, 2009.

HUANG, G. T.; GRONTHOS, S.; SHI, S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. **J Dent Res**, v. 88, n. 9, p. 792-806, 2009.

IWAYA, S. I.; IKAWA, M.; KUBOTA, M. Revascularization of an immature permanent tooth with apical periodontitis and sinus tract. **Dent Traumatol**, v. 17, n. 4, p. 185-7, 2001.

KAPILA, S. N. et al. Driving the Mineral out Faster: Simple Modifications of the Decalcification Technique. **J Clin Diagn Res**, v. 9, n. 9, p. Zc93-7, 2015.

KAWASAKI, K.; TANAKA, S.; ISHIKAWA, T. On the incremental lines in human dentine as revealed by tetracycline labeling. **J Anat**, v. 123, n. Pt 2, p. 427-36, 1977.

LABBAN, N. et al. The direct cytotoxic effects of medicaments used in endodontic regeneration on human dental pulp cells. **Dent Traumatol**, v. 30, n. 6, p. 429-34, 2014.

LANGER, R.; VACANTI, J. P. Tissue engineering. **Science**, v. 260, n. 5110, p. 920-6, 1993.

LEVENBERG, S. et al. Endothelial cells derived from human embryonic stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 7, p. 4391-4396, 2002.

LIU, J. et al. In vitro differentiation and mineralization of human dental pulp cells induced by dentin extract. **In Vitro Cell Dev Biol Anim**, v. 41, n. 7, p. 232-8, 2005.

MARTIN, D. E. et al. Concentration-dependent effect of sodium hypochlorite on stem cells of apical papilla survival and differentiation. **J Endod**, v. 40, n. 1, p. 51-5, 2014.

MARTINHO, F. C.; GOMES, B. P. Quantification of endotoxins and cultivable bacteria in root canal infection before and after chemomechanical preparation with 2.5% sodium hypochlorite. **J Endod**, v. 34, n. 3, p. 268-72, 2008.

NOLLA, C. M. **The development of permanent teeth.**: J Dent Child. 27: 254-66 p. 1960.

NOR, J. E. Tooth regeneration in operative dentistry. **Oper Dent**, v. 31, n. 6, p. 633-42, 2006.

NOR, J. E. et al. Engineering and characterization of functional human microvessels in immunodeficient mice. **Lab Invest**, v. 81, n. 4, p. 453-63, 2001.

NOSRAT, A. **The Effect of Residual Bacteria on Dental Pulp Regeneration.** 2015. 81p. 1589490 ProQuest Dissertations and Theses, University of Maryland, Baltimore, Ann Arbor.

NOSRAT, A.; SEIFI, A.; ASGARY, S. Regenerative endodontic treatment (revascularization) for necrotic immature permanent molars: a review and report of two cases with a new biomaterial. **J Endod.**, v.37, n.4, p.562-7. 2011.

PETERSEN, P. E. et al. The global burden of oral diseases and risks to oral health. **Bull World Health Organ**, v. 83, n. 9, p. 661-9, 2005.

RAFTER, M. Apexification: a review. **Dent Traumatol**, v. 21, n. 1, p. 1-8, 2005.

- ROSA, V. et al. Dental pulp tissue engineering in full-length human root canals. **J Dent Res**, v. 92, n. 11, p. 970-975, 2013.
- RUPAREL, N. B. et al. Direct effect of intracanal medicaments on survival of stem cells of the apical papilla. **J Endod**, v. 38, n. 10, p. 1372-5, 2012.
- SAFAVI, K. E.; NICHOLS, F. C. Alteration of biological properties of bacterial lipopolysaccharide by calcium hydroxide treatment. **J Endod**, v. 20, n. 3, p. 127-9, 1994.
- SAKAI, V. T. et al. Tooth slice/scaffold model of dental pulp tissue engineering. **Adv Dent Res**, v. 23, n. 3, p. 325-32, 2011.
- SAKAI, V. T. et al. SHED differentiate into functional odontoblasts and endothelium. **J Dent Res**, v. 89, n. 8, p. 791-796, 2010.
- SANCHEZ, A. R.; ROGERS, R. S., 3RD; SHERIDAN, P. J. Tetracycline and other tetracycline-derivative staining of the teeth and oral cavity. **Int J Dermatol**, v. 43, n. 10, p. 709-15, 2004.
- SANTANA, B. P. et al. Nano-/microfiber scaffold for tissue engineering: physical and biological properties. **J Biomed Mater Res A**, v. 100, n. 11, p. 3051-8, 2012.
- SEDGLEY, C. M.; BOTERO, T. M. Dental stem cells and their sources. **Dent Clin North Am**, v. 56, n. 3, p. 549-61, 2012.
- SIQUEIRA, J. F., JR.; LOPES, H. P. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. **Int Endod J**, v. 32, n. 5, p. 361-9, 1999.
- SLOAN, A. J.; SMITH, A. J. Stem cells and the dental pulp: potential roles in dentine regeneration and repair. **Oral Dis**, v. 13, n. 2, p. 151-7, 2007.
- TELLES, P. D. et al. Pulp tissue from primary teeth: new source of stem cells. **J Appl Oral Sci**, v. 19, n. 3, p. 189-94, 2011.

TREVINO, E. G. et al. Effect of irrigants on the survival of human stem cells of the apical papilla in a platelet-rich plasma scaffold in human root tips. **J Endod**, v. 37, n. 8, p. 1109-15, 2011.

TROPE, M. Treatment of immature teeth with non-vital pulps and apical periodontitis. **Endod Top**, v. 14, n. 1, p. 51-9, 2006.

VIANNA, M. E. et al. In vivo evaluation of microbial reduction after chemo-mechanical preparation of human root canals containing necrotic pulp tissue. **Int Endod J**, v. 39, n. 6, p. 484-92, 2006.

YASSEN, G. H. et al. Effect of medicaments used in endodontic regeneration technique on the chemical structure of human immature radicular dentin: an in vitro study. **J Endod**, v. 39, n. 2, p. 269-73, 2013.

YASSEN, G. H. et al. The effect of medicaments used in endodontic regeneration on root fracture and microhardness of radicular dentine. **Int Endod J**, v. 46, n. 7, p. 688-95, 2013.

YOSHIBA, N. et al. Immunohistochemical analysis of two stem cell markers of alpha-smooth muscle actin and STRO-1 during wound healing of human dental pulp. **Histochem Cell Biol**, v. 138, n. 4, p. 583-92, 2012.

7 APÊNDICES

Apêndice 1. Termo de Assentimento



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Este formulário de assentimento informado é destinado à adolescentes com idades entre 15 e 18 anos que estamos convidando a participar da pesquisa **“Efeito do pré-tratamento da dentina na engenharia de tecido pulpar humano”**, que será realizada pela aluna Luciane Geanini Pena dos Santos, do curso de Doutorado em Odontologia, área de concentração em Endodontia, sob orientação da Prof.^a Dr.^a Mara Cristina Santos Felipe e co-orientação da Prof.^a Dr.^a Mabel Mariela Rodríguez Cordeiro, pesquisa essa submetida à apreciação ética pelo Comitê de Ética na Pesquisa com seres Humanos (CEPSH) e pautada segundo a Resolução 466/2012. O objetivo desta pesquisa é avaliar se células-tronco mesenquimais (células muito jovens) da polpa dental (“nervo”) de dentes de leite são capazes de formar uma nova polpa após o tratamento da dentina do canal radicular com diferentes produtos, normalmente usados para desinfecção da dentina. Para isso serão utilizados dentes permanentes, extraídos por motivos alheios a esta pesquisa, de pacientes com idades entre 15 e 22 anos. Os possíveis riscos e/ou desconforto que serão enfrentados são aqueles já associados aos procedimentos da extração, os quais não têm qualquer relação com a presente pesquisa, e nem haverá necessidade de procedimentos adicionais àqueles próprios à extração do dente. Se o paciente tiver alguma dúvida em relação ao estudo pode entrar em contato, a qualquer momento, pelos telefones (48) 3721-9549 (Profa. Mara Felipe) ou (48) 3721-4904 (Profa. Mabel Cordeiro) ou pelo endereço: Universidade Federal de Santa Catarina – Campus Trindade, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Odontologia, Laboratório de Endodontia. Se o paciente estiver de acordo em doar seu

dente, garantimos que o mesmo será utilizado somente neste trabalho, e não haverá ligação entre o dente doado e o paciente doador, ficando o dente à disposição do doador para devolução até o início da pesquisa.

Luciane Geanini Pena dos Santos
(Pesquisador)

Prof.^a Dr.^a Mara Cristina Santos Felipe
(Orientador)

Prof.^a Dr.^a Mabel Mariela Rodríguez Cordeiro
(Co-orientador)

Florianópolis, _____ de _____ de 20_____

TERMO DE ESCLARECIMENTO E ASSENTIMENTO

Assentimento informado para doação de dente permanente extraído por motivos alheios a esta pesquisa de pacientes com idade entre 15 e 18 anos, doado para a pesquisa intitulada **“Efeito do pré-tratamento da dentina na engenharia de tecido pulpar humano”**, que será realizada pela aluna Luciane Geanini Pena dos Santos, do curso de Doutorado em Odontologia, área de concentração em Endodontia, sob orientação da Prof.^a Dr.^a Mara Cristina Santos Felipe e co-orientação da Prof.^a Dr.^a Mabel Mariela Rodríguez Cordeiro.

Oi, meu nome é Luciane e meu trabalho é pesquisar um modo de fazer outro tecido pulpar (“nervo”) em um dente cujo nervo foi tirado ou morreu. Eu e minhas orientadoras queremos saber se, depois de fazer diferentes tratamentos (normalmente usados para destruir bactérias) sobre a dentina (tecido que faz parte do dente) será possível recuperar o nervo perdido. Se esta pesquisa confirmar essa possibilidade, isso permitirá a evolução da engenharia tecidual, da qualidade dos tratamentos efetuados, e permitirá que outros adolescentes mantenham seus dentes saudáveis.

Como pesquisadora principal, vou convidá-lo a participar desta pesquisa e vou lhe dar todas as informações necessárias. Você pode escolher se quer participar ou não. Conversei sobre a pesquisa com seus pais ou responsáveis e eles sabem que também estou pedindo seu acordo. Se você quiser participar da pesquisa doando seu dente, seus pais ou responsáveis também terão que concordar. Mas se você não desejar participar, não é obrigado, mesmo que seus pais tenham concordado. Você pode discutir qualquer coisa deste formulário com seus pais, amigos ou qualquer um com quem você se sentir a vontade de conversar. Você pode decidir se quer participar ou não depois de ter conversado sobre a pesquisa.

Pode haver algumas palavras que você não entenda ou coisas que você quer que eu explique mais detalhadamente porque você ficou mais interessado ou preocupado. Por favor, peça que eu pare a qualquer momento e eu explicarei.

Estamos fazendo pesquisa em fatias de dentes (3^{os} molares, sisos) de pacientes adolescentes (15 a 18 anos) e adultos jovens (até 22 anos). Por isso eu vim falar com você. Depois da remoção de seu dente, faremos o esvaziamento dos canais (vamos tirar o nervo) e colocaremos medicamentos dentro deles. Depois de fazer fatias do dente doado,

vamos tentar fazer um novo nervo em um pedaço do dente que você doou. Você não precisa participar desta pesquisa se não quiser. É você quem decide. Decidir não participar é seu direito, e nada mudará no seu tratamento de saúde, e este serviço de saúde continuará disponível para você.

Se você aceitar, não falaremos para outras pessoas que você está participando da pesquisa e também não compartilharemos informação sobre você com ninguém.

Se tiver alguma dúvida, você pode me perguntar agora ou depois. Você pode nos localizar pelos telefones (48) 3721-9549 (P Prof.^a Mara Felipe) ou (48) 3721-4904 (Prof.^a Mabel Cordeiro) ou pelo endereço: Universidade Federal de Santa Catarina – Campus Trindade, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Odontologia, Laboratório de Endodontia, teremos prazer em tirar as suas dúvidas.

TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu _____, concordo em doar meu dente para a pesquisa de nome **“Efeito do pré-tratamento da dentina na engenharia de tecido pulpar humano”**. Eu entendi que a pesquisa será sobre um modo de tentar fazer um novo tecido pulpar (nervo) em um dente em que o nervo foi perdido. Eu também entendi que a decisão de doar o meu dente é somente minha; mesmo que meus pais ou responsáveis concordem, eu posso me negar a participar da pesquisa.

Antes de decidir sobre a doação do dente, pude conversar com pessoas que eu confio. Ficou claro que eu não seria prejudicado se decidisse participar ou não da pesquisa. Entendi que o dente doado será usado apenas para esta pesquisa e que não serei identificado pelo dente, e que ninguém terá acesso às minhas informações pessoais.

Fui informado de que, se eu quiser perguntar alguma coisa ou desistir de doar meu dente até o início da pesquisa, posso falar com os pesquisadores pelos telefones (48) 3721 9549 (Prof.^a Mara Felipe) ou (48) 3721 4904 (Prof.^a Mabel Cordeiro) ou no endereço: Universidade Federal de Santa Catarina – Campus Trindade, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Odontologia, Laboratório de Endodontia.

Identificação do dente doado: _____

Assinatura do adolescente

Assinatura dos pais/representante legal

Assinatura do pesquisador

Florianópolis, _____ de _____ de 20____

Apêndice 2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

TERMO DE ESCLARECIMENTO E CONSENTIMENTO

Eu, Luciane Geanini Pena dos Santos, aluna do curso de Doutorado em Odontologia, área de concentração em Endodontia, desenvolverei a pesquisa intitulada **“Efeito do pré-tratamento da dentina sobre a engenharia de tecido pulpar humano”**, sob orientação da Prof.^a Dr.^a Mara Cristina Santos Felipe e co-orientação da Prof.^a Dr.^a Mabel Mariela Rodríguez Cordeiro, pesquisa essa submetida à apreciação ética pelo Comitê de Ética na Pesquisa com seres Humanos (CEPSH) e pautada segundo a Resolução 466/2012. Utilizando o Modelo de Fatia Dental/Arcabouço para Engenharia de Tecido Pulpar, o objetivo é avaliar *in vivo* se células-tronco mesenquimais provenientes da polpa dental (nervo) de dentes decíduos humanos (dentes de leite) são capazes de formar um novo tecido pulpar (nervo do dente) após o tratamento da superfície dentinária do canal radicular (paredes de dentro da raiz do dente) com protocolos para desinfecção de dentes permanentes imaturos despolpados (sem nervo). Para isso serão utilizados dentes permanentes extraídos por motivos alheios a esta pesquisa. Os riscos e/ou desconforto são aqueles associados aos procedimentos da extração que não têm qualquer relação com a presente pesquisa, e nem haverá necessidade de

procedimentos adicionais àqueles inerentes à extração do dente. Se você tiver alguma dúvida em relação ao estudo pode entrar em contato, a qualquer momento, pelos telefones (48) 3721 9549 (Prof.^a Mara Felipe) ou (48) 3721 4904 (Prof.^a Mabel Cordeiro) ou pelo endereço: Universidade Federal de Santa Catarina – Campus Trindade, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Odontologia, Laboratório de Endodontia. Se você estiver de acordo em doar o seu dente, garanto que o mesmo será utilizado somente neste trabalho, e que não haverá ligação entre o dente doado e o paciente doador, ficando o dente à sua disposição para devolução, até o início da pesquisa.

Luciane Geanini Pena dos Santos
(Pesquisador)

Prof.^a Dr.^a Mara Cristina Santos Felipe
(Orientador)

Prof.^a Dr.^a Mabel Mariela Rodríguez Cordeiro
(Co-orientador)

Assinatura do paciente/representante legal

Florianópolis, _____ de _____ de 20 _____

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu _____, fui esclarecido sobre a pesquisa “**Efeito do pré-tratamento da dentina sobre a engenharia de tecido pulpar humano**”, e concordo em doar meu dente, extraído por motivos alheios a esta pesquisa, seja utilizado na realização da mesma.

Identificação do dente doado: _____

Documento de Registro Geral do paciente doador: _____

Assinatura do doador e /ou representante legal

Assinatura do pesquisador

Florianópolis, _____ de _____ de 20 _____

CONTATOS DOS PESQUISADORES

Universidade Federal de Santa Catarina – Campus Trindade, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Odontologia, Laboratório de Endodontia

Telefones: (48) 3721 9549 (Prof.^a Mara Felipe) ou (48) 3721 4904 (Prof.^a Mabel Cordeiro)

Apêndice 3. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeito do pré-tratamento da dentina sobre a engenharia de tecido pulpar humano

Pesquisador: Mara Cristina Santos Felipe

Área Temática:

Versão: 5

CAAE: 20000013.8.1001.0121

Instituição Proponente: Universidade Federal de Santa Catarina

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 717.559

Data da Relatoria: 14/07/2014

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

FLORIANOPOLIS, 14 de Julho de 2014

Assinado por:
Washington Portela de Souza
(Coordenador)

Endereço: Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima
Bairro: Trindade CEP: 88.040-900
UF: SC Município: FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-0206 Fax: (48)3721-9696 E-mail: cep@reitoria.ufsc.br

Apêndice 4. Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)

17/10/13

notes.ufsc.br/aplic/ceua.nsf/48fc5b9fe6931c868325702e0075533b/743bcdda96a8943f83257b6e004eadd7?OpenDocument

Resultado de Solicitação de Protocolo

Protocolo
PP00850

Título

Metodologia utilizada para estudo da Engenharia de Tecido Pulpar Humano

Data de Entrada

19/04/2013

Resultado:

Aprovado

Data/Prazo

03/05/2013

Considerações

Ofício nº 032/CEUA/PROPESQ/2013

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

Ao(a): Prof(a) Dr(a) Mabel Mariela Rodriguez Cordeiro, Departamento de Ciências Morfológicas - CCB

Prezado(a) Professor(a),

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

- APROVADO, por quatro anos, para a utilização de quinhentos camundongos (*Mus musculus*).

- Procedência do animal: Biotério Central da UFSC

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

Atenciosamente,

Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)

Data 17/08/2017

Data 17/05/2013

Parecer(es):



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

Apêndice 5. Protocolo de processamento histológico das amostras

Etapa	Estágio	Reagente	Duração
1	Hidratação	Álcool Etílico 70%	1 h
2	Hidratação	Álcool Etílico 80%	1 h
3	Hidratação	Álcool Etílico 90%	1 h
4	Hidratação	Álcool Etílico 100% I	1 h
5	Hidratação	Álcool Etílico 100% II	1 h
6	Diafanização	Xilol I	40 min
7	Diafanização	Xilol II	40 min
8	Inclusão	Parafina I	3 h
9	Inclusão	Parafina II	3 h
10	Inclusão	Parafina III	3 h

Apêndice 6. Protocolo para coloração hematoxilina- eosina

Etapa	Estágio	Reagente	Duração
1	Desparafinização	Xilol I	15 min
2	Desparafinização	Xilol I	5 min
3	Hidratação	Álcool Etílico 100%	5 min
4	Hidratação	Álcool Etílico 90%	5 min
5	Hidratação	Álcool Etílico 70%	5 min
6	Enxague	Água destilada	Passagem
7	Coloração	Hematoxilina	5 min
8	Enxague	Enxague	Passagem
9	Coloração	Eosina	3 min
10	Desidratação	Álcool Etílico 95%	Passagem
11	Desidratação	Álcool Etílico 100% I	Passagem
12	Desidratação	Álcool Etílico 100% II	5 min
13	Diafanização	Xilol I	5 min
14	Diafanização	Xilol II	5 min

Apêndice 7. Protocolo para as reações de imuno-histoquímica

Desparafinização

Estufa (30 min)

Xilol I (15 min)

Xilol II (5 min)

Reidratação

Etanol 100% (5 min)

Etanol 90% (5 min)

Etanol 70% (5 min)

Água destilada (passagem)

Inibição da peroxidase endógena

Peroxido de hidrogênio 3% em metanol (20 min em ambiente escuro)

Enxague

Água destilada (5 min)

PBS (5 min)

Reativação antigênica

Tampão citrato de sódio 0,01 M (40 min a 93 -98°C em banho-maria)

Enxague

PBS (20 min)

Bloqueio de sítios inespecíficos

SFB 5% (40 min)

Enxague

PBS (5 min)

PBS (5 min)

Incubação do anticorpo primário

DSPP (diluição 1:200)

DMP-1(diluição 1:50)

SMA (diluição 1:200)

Volume médio de solução para cada amostra: 50 µL. Incubação por 12 – 16h.

Enxague:

PBS (5 min)

PBS (5 min)

Incubação do anticorpo secundário

Polímero marcado com HRP, conjugado com anticorpos secundários - EnVision + Dual Link System – HRP® (30 min em ambiente úmido e escuro)

Enxague

PBS (5 min)

Coloração

DAB (20 µL) de DAB +substrato (1 mL) (± 18 min em ambiente escuro)

Enxague:

PBS (5 min)

PBS (5 min)

Contra-coloração

Hematoxilina (5 min)

Enxague (“azulificação”)

Água corrente (15 min)

Desidratação

Álcool etílico 70% (5min)

Álcool etílico 100% I (5min)

Álcool etílico 100% II (5min)

Xylol I (5min)

Xylol II (5min)

Aplicação de lamínulas

Permout®