EDUARDO FELIPPE DUAILIBI NETO

**Desenvolvimento de metodologia radiográfica e volumétrica dos diferentes
estágios de desenvolvimento dentário para qualificação de material biológico
em Engenharia Tecidual**

São Paulo

2013

EDUARDO FELIPPE DUAILIBI NETO

**Desenvolvimento de metodologia radiográfica e volumétrica dos diferentes
estágios de desenvolvimento dentário para qualificação de material biológico
em Engenharia Tecidual**

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Diagnóstico Bucal

Orientador: Prof. Dr. Israel Chilvarquer

São Paulo

2013

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Duailibi Neto, Eduardo Felipe.

Desenvolvimento de metodologia radiográfica e volumétrica dos diferentes estágios de desenvolvimento dentário para qualificação de material biológico em Engenharia Tecidual / Eduardo Felipe Duailibi

Neto : orientador Israel Chilvarquer. -- São Paulo, 2013.

70 p. : fig. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia - Área de Concentração: Diagnóstico Bucal. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida.

1.Células tronco. 2. Engenharia tecidual. 3. Radiografia periapical.
4. Tomografia computadorizada por emissão 5. Regeneração
tecidual. I. Chilvarquer, Israel. II. Título.

Duailibi Neto EF. Desenvolvimento de metodologia radiográfica e volumétrica dos diferentes estágios de desenvolvimento dentário para qualificação de material biológico em Engenharia Tecidual. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Aprovado em: / /2013

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Aos meus pais Silvio e Mônica, meus exemplos de integridade, competência, caráter e afeto, sempre presentes e compartilhados comigo,

Ao meu irmão Michel, pela amizade, apoio, incentivo e amor,

À minha avó Isis Ferreira, pelo amor incondicional e incentivo em tempos difíceis,

Aos meus avós Maria Zenóbia e Eduardo Felipe pelo exemplo de amor mútuo e inspiração em lutar pela vida,

À minha namorada Ariane Venzon, por me ensinar que o sentido das palavras amor, fidelidade e amizade em todos estes anos,

Ao meu querido amigo e companheiro, Prof. Dr. Israel Chilvarquer, pela paciência, ensinamentos e oportunidades à mim proporcionadas,

Dedico este estudo à vocês.

AGRADECIMENTOS

Ao meu estimado mestre e mentor científico Prof. Dr. Israel Chilvarquer, pelo exemplo de integridade e profissionalismo à mim dedicados, minha eterna gratidão,

Aos professores da FOU SP em especial aos professores da disciplina de Radiologia e Imageologia, agradeço pelo acolhimento e paciência durante todos estes anos,

Ao Prof. Dr. Claudio de Freitas que, além de me ensinar o significado da palavra professor, mostrou à mim o sentido da palavra superação,

À Profa. Dra. Titular Marlene Fenyo por acreditar em mim, todo meu respeito e admiração, agradeço todas as oportunidades na minha segunda casa, a FOU SP,

Ao amigo Prof. Dr. Jorge Vicente Lopes da Silva juntamente a toda sua equipe da Divisão de Tecnologia 3D do Centro de Tecnologia da Informação Renato Archer pelo acolhimento, paciência e conhecimentos à mim compartilhados,

Ao estimado amigo Prof. Dr. Jorge Elie Hayek, agradeço pela paciência e confiança a mim dispensados,

À querida amiga Profa. Dra. Marcia Provenzano, agradeço por sua amizade e carinho dedicados todos estes anos,

À Maria Aparecida Pinto agradeço pelo auxílio e competência,

À Tatiana Toporcov agradeço a execução da análise estatística e por me ensinar o sentido da palavra profissionalismo,

Aos meus colegas de pós-graduação meu agradecimento por muitos momentos de convívio compartilhados dividindo dificuldades e conquistas na nossa pós graduação,

Aos meus companheiros de trabalho Michel Lipiec, Rosana Miranda, Ricardo Rocha, Fatima Kang, Fabiane Rocha, Gabriela Chalaupka, Sheila Schainer, Angélica Hernandez, Tiago Zanetti, Rodrigo Moreno e Claudio Coppede, agradeço pela amizade e carinho demonstrado,

Aos funcionários do INDOR pelo aprendizado no trabalho em equipe e superação nos momentos de maior dificuldade, o meu muito obrigado,

Agradeço à minha Tia Teresa Duailibi pelo apoio incondicional neste período

A minha querida amiga e secretária Sirley Marçal, pelo carinho e dedicação sempre presentes,

Aos meu queridos amigos de Plastimodelismo do Grupo de Plastimodelismo e Pesquisa Santos Dumont, meus leais aliados na batalha da vida, agradeço os momentos de lazer proporcionados,

À minha querida amiga Maria de Los Angeles Amoroso, pela dedicação, respeito e carinho durante todos estes anos, minha gratidão,

Aos meus amigos Carla Molina, Julio César, Lucas Pabis, Juliana Rueda, Marcelo Gonçalves e Carina Tanaka, com saudades dos anos maravilhosos vividos durante a nossa graduação, agradeço a amizade e compartilho este importante momento na minha vida,

Ao Serviço de Documentação Odontológica da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo pela atenção e empenho para a análise deste estudo minha eterna gratidão,

À todos os pacientes e profissionais que contribuíram direta ou indiretamente na realização deste estudo minha mais profunda gratidão,

“Alguns homens veem as coisas como são e dizem ‘Por quê?’
Eu sonho com as coisas que nunca foram e digo ‘Por que não?’”
Geroge Bernard Shaw

RESUMO

Duailibi Neto EF. Desenvolvimento de metodologia radiográfica e volumétrica dos diferentes estágios de desenvolvimento dentário para qualificação de material biológico em Engenharia Tecidual [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2013. Versão Corrigida

A utilização de Células-tronco e técnicas da Engenharia Tecidual representa um grande avanço tecnológico e beneficiará muitos pacientes com suas conquistas. A descoberta de germes dentários como uma fonte confiável de células-tronco possibilitou diversas pesquisas nesta área. Duailibi et al. (2011) sugeriram uma nova classificação de desenvolvimento dentário baseada pela quantidade de material biológico coletado indicando a necessidade de métodos de diagnóstico por imagem para esta nova classificação. Na literatura diversos trabalhos indicam métodos de classificação dentária e métodos para estimar a idade fisiológica de indivíduos. O presente estudo tem o objetivo de adaptar alguns destes métodos para estimar o estágio de desenvolvimento proposto por Duailibi et al. (2011) consequentemente indicando a quantidade de células-tronco esperadas nas amostras. Para tanto, submeteu-se uma coleção de 67 dentes previamente classificados por Duailibi et al. (2011) à técnica rpcl e à tcfc para a obtenção de imagens e a aplicação de técnicas de estimativas por proporções lineares e volumétricas. Os resultados por análises lineares indicaram valores de R^2 para o método de proporção de comprimento CDCP de 0,14050; CCCP de 0,65369; CCCR de 0,5408; CDCR de 0,54074; o método de proporção de área APAD de 0,23925; e método de proporção de volume VPVD de 0,08553, com valor de p menor ou igual à 0,05. Concluindo este estudo indica-se o método de rpcl utilizando a análise do comprimento entre coroa e polpa como o mais indicado para estimar o estágio de desenvolvimento.

Palavras-chaves: Células-tronco humana. Germes dentários. Métodos de estimativa etária. Radiografia periapicais de cone longo. Tomografia computadorizada de feixe cônico. Engenharia Tecidual.

ABSTRACT

Duailibi Neto, EF. Development of radiographic and volumetric methodologies from diferentes tooth development stages as a qualification for harvesting biological material for Tissue Engeneering [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2013. Versão Corrigida.

The usage of human dental stem cells and tissue engineering technics represents a huge tecnological development and it may benefits many patients in a promissing future. The discovery of suitable source of human dental stem cells were made using tooth buds. Duailibi et al. 2011 indicated a new tooth classification on a stem cell harvesting based research, sugesting new methods for diagnosis these stages. Several method were developed for dental age assesement. The presente study aims to evaluate some of these dental age technics and make adaptations for estimating Duailibi et al. 2011 tooth stages. A 67 tooth sample previoulsy classificated by Duailbi et al. 2011 were submitted through periapical parallel long cone X-rays and CBCT analysis. Age estimation ratio methods were applied by measuring tooth/root lenth, crown/root lenth, tooth/pulp lenth, crown/pulp lenth, tooth/poulp área and tooth/pulp volume. Results indicated by linear regression analisys a R^2 value of tooth/pulp lenth 0,14050; crown/pulp lenth 0,65369; crown/root lenth 0,5408; tooth/root lenth 0,54074; pulp/tooth volume 0,23925; e tooth/pulp volume de 0,08553, with p value of 0,005. In conclusion , the best method for estimating Duailibi et al. 2011 tooth classification technic is made by using periapical long cone X-ray's using crown/pulp lenth ratio.

Keywords: Human stem cells. Tooth buds. Dental age estimation methods. Long Cone periapical X-rays. CBCT. Tissue Engineering.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 4.1 - Classificação dentária baseada nas unidades formadoras de colônias de células-tronco propostas por Duailibi et al. 2011. Linha A: fotografias dos 6 estágios; Linha A1 radiografia periapical dos seis estágios propostos; Linha A2 As reconstruções tridimensionais obtidas por TCFC demonstra os estágios propostos 44
- Figura 4.2 - A: Escalímetro de alumínio confeccionado com 3cm de comprimento 1 cm de largura e 1 cm de altura mínima. Observa-se também dez degraus distanciando-se 0,3 cm entre si com altura de 0,1 cm; B: Imagem mostrando os dez tons de cinzas indicados pelo escalímetro padronizando os tons de cinza observados em todas as radiografias. . 45
- Figura 4.3 - A: suporte de acrílico confeccionado evidenciando a mesma posição do cabeçote de raios-X com mesma distância e mesmos angulos verticais e horizontais iguais em todas as radiografias; B: radiografia obtida evidenciando os mesmos dez tons cinzas desejados; C: observa-se as medias realizadas na imagem do escalímetro de alumínio indicando as mesmas dimensões do objeto real indicando ausência de distorções .. 46
- Figura 4.4 - A: Foto do sistema DIGORA; B: Configuração do programa computacional Osrix C: As ferramentas de mensuração lineares indicada pela letra L a ferramenta me medição de comprimento e a letra C a ferramenta de medição de área. 47
- Figura 4.5 - A mostrando equipamento de TCFC utilizado ; B: Protocolo de aquisição da imagem do equipamento Prexion 3D; C: Protocolo de aquisição do recipiente acrílico evidenciando o posicionamento dos elementos dentários perpendicular ao plano horizontal 48

Figura 4.6 - Imagem esquerda arquitetura do programa computacional InVesalius utilizado evidenciando a determinação da superfície do contorno dos elementos dentários analisados.....	49
Figura 4.7 - Imagem como resultado final do processo do cálculo volumétrico dos elementos dentários. Observa-se várias colorações cada uma representando volumes distintos; A: imagem obtida no estágio 1; B: imagem obtida no estágio 2; C: imagem obtida no estágio 3; D: imagem obtida no estágio 4; E: imagem obtida no estágio 5; F:imagem obtida no estágio 6.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 – Resultados da regressão linear para o teste de proporção do CDCP.. 52

Tabela 5.2 – Resultado da regressão linear para o teste de proporção do CCCP. .. 52

Tabela 5.3 – Resultado da regressão linear para o teste de proporção do CCCR. .. 53

Tabela 5.4 – Resultado da regressão linear para o teste da proporção do CDCR. .. 53

Tabela 5.5 – Resultado da regressão linear para o teste da proporção da APAD.... 53

Tabela 5.6 – Resultado da regressão linear para o teste da proporção do VPVD.... 53

.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APAD	método da proporção da área tecido mineral dentário e do espaço do tecido pulpar
BM	Biologia Molecular
C	Estratégia condutiva
CDCP	método da proporção do comprimento tecido dentário e do espaço do tecido pulpar
CCCP	método da proporção do comprimento tecido coronário dentário e do espaço do tecido pulpar
CCCR	método da proporção do comprimento tecido coronário dentário e do espaço do tecido mineral radicular
CDCR	método da proporção do comprimento tecido dentário e do espaço do tecido mineral radicular
CFU's	Unidades formadoras de colônias
cm	centímetros
cm ²	centímetros quadrados
cm ³	centímetros cúbicos
construct	agregados (arcabouço + células)
CTCMol	Centro de Terapia Celular e Molecular

DSC	Células tronco de origem dentária
DICOM	<i>digital imaging communication in medicine</i>
ET	Engenharia Tecidual
FOP	Faculdade de Odontologia de Piracicaba
hDSC	células-tronco dentárias humanas provenientes de germes dentários
hDSC	Células trono de origem dentária Humana
I	Estratégia Indutiva
kVp	kilovoltagem pico
LET	Laboratório de Engenharia Tecidual
mA	miliamperagem
MicroTC	Micro Tomografia Computadorizada
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
pc	Programa computacional
real Time PCR	reação de cadeia de polimerase em tempo real
rpcl	Radiografia periapical cone longo
scaffold	arcabouço

TCFC	Tomografia computadorizada por Feixe Cônico
TGF β -1	Fator de Crescimento Tecidual Beta 1
TRANSC	Transplantação Celular
Unicamp	Universidade Estadual de Campinas
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
VPVD	método da proporção do volume tecido mineral dentário e do espaço do tecido pulpar
wl	Window Level
ww	Window Width

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	22
2.1 ENGENHARIA TECIDUAL	22
2.2 DESENVOLVIMENTO DENTÁRIO E ESTIMATIVAS ETÁRIAS.....	30
3 PROPOSIÇÃO	42
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	43
4.1 FORMAÇÃO DA AMOSTRA.....	43
4.2 RADIOGRAFIA PERIAPICAL DE CONE LONGO E ANÁLISES LINEARES	44
4.3 TOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA DE FEIXE CÔNICO E ANÁLISES VOLUMÉTRICAS	47
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA E TABULAÇÃO DOS DADOS	50
5 RESULTADOS	52
6 DISCUSSÃO	55
7 CONCLUSÕES	62
REFERÊNCIAS	63
ANEXOS.....	69

1 INTRODUÇÃO

A Engenharia Tecidual (ET) é uma ciência que integra os princípios da Biologia com as técnicas da Engenharia. Seu objetivo é gerar tecidos e/ou órgãos substitutos. As primeiras idéias de cultura de tecidos e órgãos pertencem a Alexis Carrel e Charles Lindenberg que em 1938 imaginaram, que as terapias futuras poderiam regenerar tecidos. O desenvolvimento das técnicas biológicas para o estudo celular permitiu o domínio da cultura de células como sugerido por Carrel em 1907 e a capacidade de obter células viáveis para estudos derivadas diretamente de seres humanos como os estudos de Schoenebeck et al. (2009) que utilizaram estas técnicas para o cultivo de células-tronco dentárias humanas (hDSC's) derivadas de germes dentários. O aperfeiçoamento da Biologia Molecular (BM) possibilitando a compreensão de marcadores e fatores de crescimento permitiu a compreensão do mecanismo de crescimento e diferenciação celular sendo esta uma das ferramentas da ET.

Atualmente, a possibilidade da criação de neo-órgãos pela ET tornou-se uma realidade com um horizonte próximo. Descritas por Langer e Vacanti (1993) e Kaigler e Mooney (2001), as estratégias da ET são divididas em três estratégias: a Condutiva (C); a Indutiva (I); e a Transplantação Celular (TRANSC). A estratégia C consiste na implantação cirúrgica de biomateriais, pelos quais as células do leito receptor crescerão, facilitando assim a regeneração tecidual. A estratégia I consiste na aplicação de fatores de crescimento teciduais para estimular a migração e diferenciação celular no local a ser regenerado. Diferentemente das outras duas, C e I, a TRANSC emprega a implantação de células semeadas em uma matriz biodegradável ocorrendo neo-formação tecidual bem como a substituição da matriz por tecido organizado. A TRANSC é utilizada nos estudos para a construção do substituto biológico de dentes, ossos e cartilagem além de outros tecidos moles devido a possibilidade de regenerar a forma com a utilização de matrizes e a capacidade de carreamento de células tronco dentárias.

Ao nortear a ET utilizando a estratégia de TRANSC vislumbra-se que doador e receptor de células sejam o mesmo indivíduo. Para tanto, a obtenção das células viáveis e sua agregação a uma matriz polimérica sintética ou natural biodegradável e tridimensional, scaffold, na forma do órgão que se pretende construir seguido por

uma implantação cirúrgica deste conjunto denominado *construct*, no local a ser regenerado é o objetivo deste método. A correta vascularização do *construct* implantado, haverá o crescimento e a diferenciação tecidual. Essa abordagem foi descrita por vários investigadores, incluindo Sitter et al. (1996), utilizando dois métodos de cultivo celular, o estático, em garrafas de cultura com mono camadas e o fluxo contínuo em bioreatores. O *construct* é implantado cirurgicamente em órgãos lesados ou ausentes almejando sua regeneração funcional. Os clássicos experimentos com hepatócitos realizados Kim e Vacanti (1999), compararam as vantagens e desvantagens da terapia com ET para a regeneração de vários tecidos tais como, o fígado, o intestino delgado, a válvula cardíaca e a cartilagem, em relação ao transplantes de órgãos, conclui-se um maior êxito da abordagem utilizando a ET quando comparadas àquelas obtidas com terapias convencionais. Duailibi et al. (2011) descreveram alterações cromossômicas severas decorrentes da manipulação laboratorial de células-tronco concluindo a importância de avaliar-se a viabilidade celular para a utilização em ET.

No campo da Odontologia, as técnicas de ET são utilizadas com sucesso em uma variedade de aplicações. Duailibi et al. (2004) e Duailibi et al. (2008) comprovaram a capacidade da ET em regenerar tecidos dentários tais como: polpa, dentária, esmalte, dentina, ligamento periodontal e osso alveolar. Os desafios existentes para o sucesso da ET estão na escolha da combinação ideal de materiais biodegradáveis, células e fatores de crescimento solúveis para serem aplicados ao problema clínico. Zhang et al. (2009) sugeriram um modelo de construct híbrido, com células oriundas de germes dentários e medula óssea indicando também a formação de tecidos dentários bem como tecido ósseo. As propriedades físicas do scaffold para a construção do complexo sistema de tecidos dentários e mineralizados, deverá ser semelhante as características físicas dos tecidos .

A Odontologia ainda representa um outro campo no desenvolvimento da ET. Em 2009, Yalvac et al. isolaram e caracterizaram por meio de mapeamento de expressão gênica células-tronco humanas oriundas de germes de terceiros molares, classificaram este tipo celular como um excelente modelo de estudo de reprogramação celular. A capacidade de diferenciação em diversos tipos de tecido sugere-se uma alternativa ao transplante autólogo caracterizando-as como hDSC's.

Neste contexto a ET surgirá como uma alternativa à clínica odontológica desenvolvendo novas modalidades terapêuticas criando um novo paradigma

odontológico com a visão de regeneração e não reparação. Schoenebec et al., em 2009, sugeriram pela primeira vez na literatura uma nova classificação de desenvolvimento dentário baseando-a no tipo de população celular observada. Seu estudo não explorou as características dos germes dentários observados. Em 2011, Duailibi et al. exploraram as características de vários estágios de desenvolvimento dentário apresentando a comunidade científica uma classificação de seis estágios distintos de desenvolvimento baseando-a na quantidade observada de CFU's. Estas unidades são agregados mistos de populações de células-tronco mesênquimais e ectodérmicas oriundas de germes dentários.

Um dos grandes desafios da pesquisa em ET para uso na regeneração de tecidos duros e moles consiste no local doador de células. Muitos são os sítios doadores de células-tronco humanas, entre estes locais, os germes de terceiros molares apresentam-se em uma posição de destaque visto que, possuem células de origem mesenquimal e ectodérmicas bem como a capacidade destas células se organizarem e formarem CFU's. No entanto, como elucidado no trabalho de Duailibi et al. (2011) esta capacidade diminui significativamente conforme ocorre a formação do órgão dentário. O diagnóstico correto destes estágios é fundamental para o desenvolvimento de pesquisas nesta área e sua posterior aplicação pela ET. A utilização de técnicas de estimativa etária, quais utilizam apenas um elemento para aferir a maturidade fisiológica, sugerem uma boa ferramenta para indicar os estágios de desenvolvimento indicados por Duailibi et al. (2011). Murray et al. (2002) realizaram análises histomorfométricas em células oriundas de diferentes elementos dentários de pacientes com idades distintas. Comprovou-se alterações celulares com alterações dentárias indicando-se histologicamente elementos dentários como indicadores de maturidade fisiológica.

Gustafson (1950) sugeriu uma metodologia capaz de verificar a correlação de alterações dentárias com a idade fisiológica de indivíduos. Seu método foi o primeiro aceito pela comunidade científica. Atualmente a técnica de eleição para estimar a maturação fisiológica, de dentes em formação, consiste no método proposto por Nola, em 1960, e no Brasil o método de eleição foi proposto por Nicodemo (1967). No entanto atribui-se o êxito dos métodos citados a capacidade de avaliar-se um conjunto de elementos afim e determinar a faixa etária de indivíduos. Várias metodologias foram descritas, mas dois tipos destacam-se, os

destrutivos como o método histológico proposto por Maples (1978) e o método proposto por Dermirjian et al. (1973).

A utilização de elementos dentários como biomarcadores de maturidade fisiológica foi comprovada pelo trabalho de Morse (1991). Seu trabalho correlacionou alterações no complexo dentina polpa com a idade de pacientes. Kvaal e Solheim et al. (1994) elucidaram a utilização de radiografias periapicais como um método para determinar a correlação de idade fisiológica com elementos dentários. Seus métodos consistem na utilização de medidas lineares de comprimento de largura e aferindo proporções entre as medidas do elemento dentário de maneira a compensar distorções das técnicas radiográficas.

Com surgimento da radiografia digital novas medidas puderam ser obtidas conferindo alta precisão do método. Cameriere et al. (2004b) indicaram a utilização da proporção da área dos tecidos dentários. No entanto, atualmente a utilização de pc de autoCad™ permite alta precisão nas medidas e sua aplicação em diversos tipos populacionais conforme utilizado por Zaher et al. (2011) na população egípcia e Babshet et al. (2011) aplicando-o na população indiana.

O desenvolvimento de técnicas de micro tomografia e de tomografia computadorizada de feixe cônico (TCFC) permitiram a obtenção de medidas volumétricas e suas respectivas proporções. A proporção dos volumes de tecidos orais e sua correlação com a maturidade fisiológica foi inicialmente comprovada com a utilização MicroTC por Yang et al. (2006) e Aboshi et al. (2010). No entanto, a utilização na prática clínica é altamente limitada e seus custos elevados; sugeriu-se a utilização da TCFC como uma alternativa operacional de menores custos materiais que a MicroTC. Jagannathan (2011) comprovou a aplicabilidade da técnica utilizando TCFC. Ainda os resultado não representam uma alternativa ideal para a substituição de proporções lineares.

O diagnóstico dos estágios de desenvolvimento dentário proposto por Duailibi et al. (2011) é bastante complexo. Atualmente as coletas de material biológico realizadas pelo LET do CTCMol da UNIFESP utiliza o método visual de análise de imagens obtidas por meio de técnicas radiográficas panorâmicas e radiografias periapicais de cone longo. Porém, devido a distorções destas técnicas principalmente na região de molares superiores e na região posterior do túber da maxila dificultam a coleta do material biológico. Adaptações de metodologias radiográficas que estimam a idade fisiológica são necessárias para auxiliar as

referidas pesquisas de forma a otimizar o processo de análise e coleta de material biológico neste novo campo do conhecimento a Engenharia Tecidual.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ENGENHARIA TECIDUAL

Carrel (1907) realizou transplantes de vasos sanguíneos provenientes da espécie Canina para organismos de outra espécie, no caso, a espécie felina. Neste estudo, ao contrário do esperado, não se observou reação inflamatória pós-transplantes. Fato este possível devido a técnica de manutenção do tecido em baixas temperaturas utilizando meio nutritivo no tecido. Segundo o autor, este fato não permitiu o início do processo de decomposição, de maneira que dificultou a instalação de processo inflamatório não rejeitando o tecido recém instalado. Este pioneiro trabalho concluiu que no futuro próximo a capacidade de cultivo e manutenção de tecidos vivos em fora do seu local de origem, bem como suas partes.

Carrel e Lindbergh (1935) estudaram o cultivo de órgãos de animais em um líquido nutritivo, fora de seu local de seu origem. Eles removeram um ovário de felino recém morto, mantendo os tecidos circunvizinhos tais como: artérias, veias, nervos e tecido conjuntivo junto ao órgão. Utilizando uma bomba peristáltica perfusora, perfundiram uma substância nutritiva no órgão recém extraído. A substância nutritiva era composta por glucose, aminoácidos, insulina tiroxina, vitamina A e plasma sanguíneo humano; em alguns experimentos o autor também utilizava hemoglobina humana juntamente com uma solução de fenol vermelho como indicador de atividade metabólica e infecção bacteriana. Este conjunto foi mantido em uma estufa à 37°C de temperatura e alterações no peso bem como alterações na quantidade de células por meio de biópsia foram observadas quando comparado ao estágio inicial. Os resultados ilustram ser possível cultivar órgãos fora do local de origem. Ao final do estudo discutiram a criação de novas tecnologias gerando substitutos biológicos.

Langer e Vacanti (1993) definiram a ET como a ciência que integra os princípios da Biologia com as técnicas da Engenharia. Segundo os autores, o objetivo da ET é regenerar funcional e morfológicamente os tecidos mortos e

danificados. Para tanto, sugerem três estratégias diferentes, Condutiva(C), a Indutiva (I) e a Transplantação Celular (TRANSC). A estratégia C consiste na implantação cirúrgica de biomateriais, pelos quais as células do leito receptor crescerão, facilitando assim a regeneração tecidual. A estratégia I consiste na aplicação de fatores de crescimento teciduais para estimular a migração e diferenciação celular no local a ser regenerado. A TRANSC utiliza células ao invés de tecido organizado, para tanto, a obtenção das células e sua agregação a uma matriz sintética polimérica biodegradável e tridimensional, *scaffold*, na forma do órgão que se pretende construir e a posterior implantação deste conjunto, denominado *construct*, no local a ser regenerado. Com a correta vascularização do *construct* implantado, haverá o crescimento e a diferenciação tecidual, bem como, substituição do *scaffold* por tecido funcional objetivando sempre doador e receptor como mesmo indivíduo. Visando uma estratégia de TRANSC, sugerem alguns desafios para serem superados, no entanto esta ciência representa um grande avanço a ciência Moderna.

Sittinger et al. (1996) utilizaram o modelo doador e receptor de células como mesmo indivíduo, elucidaram a necessidade do desenvolvimento de novos sistemas de cultura para aplicação em ET. A cultura de células representa o maior desafio para a aplicação da Engenharia Tecidual. Para a expansão das células na cultura necessita-se das suas características funcionais o que muitas vezes acabam se perdendo. Devido a este fato, sugeriram a expansão da cultura e o uso de fluxo contínuo no *construct*. Assim, para a aplicação da ET com a estratégia de TRANSC uma quantidade grande de células é imprescindível para o sucesso.

Mooney et al. (1996) elucidaram a capacidade de células derivadas da polpa dental humana, em cultura, de formar tecidos semelhantes a polpa dentária. Em seu trabalho, células de polpa dentária são obtidas e expandidas em cultura. Posteriormente, são inseridas em um *scaffold* de Ácido Poliglicólico gerando um *construct*. Nesta estrutura formada observaram a adesão de células e a secreção de matriz extracelular formando um tecido semelhante à polpa dentária em 60 dias. Ao final, os autores sugerem uma aplicação destas células para a regeneração de tecidos orais.

Kim e Vacanti (1999) realizaram uma revisão sistemática da literatura comparando os resultados obtidos com o uso da ET ao atual estágio de transplantes de órgãos. Indicaram com sucesso o uso da técnica de transplante de órgãos,

porém, há uma escassez de doadores quando comparados ao real número de pacientes necessitados de novos tecidos e órgãos principalmente na população pediátrica. Elucidando vários trabalhos do grupo com hepatócitos, os autores indicaram a capacidade da técnica de ET em regenerar tecidos utilizando células-tronco semeadas em polímeros biodegradáveis. Segundo os autores, a técnica permitirá o transplantes de neo órgãos com elevadas taxas de sucesso de modo que os pacientes recém implantados não apresentem quadros de rejeição tecidual visto que, há altíssima semelhança entre o tecido criado com o tecido perdido.

Kaigler e Mooney (2001) descreveram o impacto desta nova ciência na odontologia. Segundo os autores, esta nova ciência alterará a evolução nos tratamentos das afecções do complexo buco-maxilofaciais com a possibilidade de regeneração de vários tecidos tais como: osso, cartilagem, mucosa oral epitélio, dentina e polpa dentária. Ressaltaram a necessidade do cirurgião dentista de evoluir juntamente com as técnicas de biologia molecular adaptando-se ao promissor futuro da odontologia.

Young et al. (2002) desenvolveram coroas dentárias utilizando-se de células-tronco e técnicas de ET. Dissociaram tecidos oriundos de germes de terceiros molares de porcos em culturas de células-tronco obtendo-se populações mistas de células mesenquimais e ectodérmicas. Posteriormente, utilizaram ácido poli glicóico como *scaffold* e semearam as populações de células obtidas com germes de porcos formando um construct. Após 30 semanas da implantação cirúrgica do *constructo*, observou-se a formação de dentina e tecido semelhante ao tecido pulpar. Os resultados indicaram a presença de células-tronco derivadas de germes de terceiros molares.

Duailibi et al. (2004) demonstraram ser viável a produção de tecidos dentários por meio da Engenharia Tecidual com técnica de TRANSC. Células-tronco foram obtidas pela extração de germes dentários de ratos Lewis. Estas foram expandidas em cultura e posteriormente semeadas em *scaffold*. Posteriormente este conjunto foi implantado no omento de ratos Lewis. Este trabalho demonstrou a capacidade de obter tecidos dentários oriundos de cultura de células de ratos Lewis e a capacidade de *scaffold* em gerar e suportar o crescimento de estruturas dentárias maduras. O trabalho indicou a possibilidade de formar tecidos dentários com técnicas de Engenharia de Tecidos tendo doador e receptor como mesmo indivíduo, visto que o

construct formado era implantado no mesmo rato Lewis que doara as células-tronco oriundas de germes dentários.

Duailibi et al. (2006) exploraram conceitos para a obtenção do substituto biológico do dente. Em seu artigo indica-se o desenvolvimento dentário como modelo natural a ser seguido para a regeneração do elemento dentário sugerindo que alguns aspectos do desenvolvimento dentário possam ser abordados no desenvolvimento do substituto biológico dentário. Decorre-se ao fato de alguns tecidos dentários de origem mesenquimal terem a capacidade de regeneração, mesmo que em diferentes níveis, osso alveolar, dentina, cemento e ligamento periodontal possuem tal capacidade; enquanto o tecido oriundo de células ectodérmicas como o esmalte dentário representa um desafio técnico. A caracterização de células tronco dentárias foi obtida utilizando um modelo de ratos transgênicos e demonstra a capacidade da dentição decídua e dentição permanente em fornecer células de origem mesenquimal, apenas o modelo capaz de fornecer células de origem ectodérmicas e mesenquimais descoberto foi a coleta de germes dentários. Concluindo o artigo, descreve-se a engenharia tecidual como uma promessa a alterar tratamentos de várias doenças com desenvolvimento de técnicas e a fusão da pesquisa em área básica e a pesquisa clínica.

Duailibi et al. (2008) desenvolveram um método capaz de implantar um substituto biológico dentário na mandíbula de ratos Lewis mantendo características funcionais e morfológicas de dentes naturais. Células provenientes de germes dentários de ratos foram semeadas em um scaffold biodegradável e implantados em mandíbulas de ratos. Após um período de 12 semanas, observou-se a formação de tecidos dentários organizados, bem como o surgimento de osso alveolar e ligamento periodontal. Análises radiográficas, histológicas e imunohistoquímicas evidenciaram a formação de tecidos organizados semelhantes aos padrões de tecidos naturais. Os resultados indicaram a capacidade da técnica de ET ser aplicada na obtenção do substituto biológico do dente bem como a capacidade do conjunto ser implantado em sítio de perda dentária.

Zhang et al. (2009) propuseram um modelo de construct híbrido para o tecido dentário e o tecido ósseo. A pesquisadora utilizou células-tronco provenientes de germes dentários e células-tronco oriundas da medula óssea para criar um construct híbrido, posteriormente perfundiu células tronco de germe dentário no *scaffold* formado. Este conjunto foi implantado em mandíbulas de porcos e coletados após

12 e 20 semanas. As amostras foram analisadas com o uso de microtomografia, microscopia eletrônica de varredura e análise imunohistoquímica. Os resultados indicaram o modelo de *construct* viável para o substituto biológico dentário, demonstrando o surgimento de estruturas organizadas tais como: esmalte, dentina, polpa, periodonto; e ligamento periodontal.

Schoenebeck et al. (2009) realizaram uma caracterização molecular de terceiros molares humanos. Seu objetivo era verificar a expressão gênica em células oriundas de diversas regiões de germes de terceiros molares em dois estágios distintos de desenvolvimento: o primeiro formação coronária completa; e o segundo formação radicular completa sem fechamento do ápice dentário. Os autores coletaram os 40 terceiros molares oriundos de 23 pacientes de 11 à 18 anos de idade. Realizando cultura celular de diferentes regiões do germe dentário, e utilizaram Real Time PCR para realizar o mapeamento de 16 genes marcadores de células-tronco dentárias. Seus resultados indicaram a presença de marcadores distintos em diferentes regiões dos germes dentários, a região central pulpar apresentou-se como a mais diferenciada enquanto a região circunvizinha ao tecido pulpar demonstrou-se com uma marcação maior de células indiferenciadas. Sugere-se ao final do estudo a criação de uma nova classificação de desenvolvimento dentário baseando-a no tipo de população celular residente em cada sítio do germe dentário para assim uma futura aplicação da técnica.

Yalvac et al. (2009) isolaram e caracterizaram células-tronco derivadas de germes dentários de terceiros molares humanos. O estudo verificou a expressão de fatores de transcrição tais como: oct4; sox2; klf4; nanog; e c-myc para determinar a pluripotência celular. A utilização da citometria de fluxo indicou a presença de CD73, CD90, CD105 e CD166 e a ausência de marcadores CD34, CD45 e CD133 sugerindo uma característica celular mesênquimal de células-tronco oriundas de germes dentários. A expressão dos fatores de transcrição sox2, c-myc e klf4 como mRNA se mostrou mais elevada quando comparada à células tronco embrionárias, sugerindo pela primeira vez na literatura que as células-tronco oriundas de germes dentários humanos possam ser um excelente modelo de estudos de reprogramação de células somáticas para sua diferenciação em vários tipos de tecidos, bem como uma alternativa para transplante autólogo.

Zhang e Yelick (2010) revisaram o progresso dos estudos quanto a regeneração e revascularização pulpar. Inicialmente sua revisão sistemática de

artigos elucidam a biologia e fisiologia do tecido pulpar. Ressalta-se a capacidade limitada do tecido pulpar em se regenerar frente a um agente agressor e ser altamente dependente da diferenciação celular e transformação de células-tronco em odontoblastos. Seguindo sua revisão a pesquisadora evidencia a existência de dois métodos para a regeneração e a revascularização pulpar. O primeiro consiste na terapia de manutenção da vitalidade pulpar, esta pode ocorrer de duas formas: a primeira pelo capeamento pulpar direto; a segunda pelo método do capeamento pulpar indireto. Ambas atualmente estão em fase de transição pois o desenvolvimento de biomateriais capazes de liberar fatores de crescimento, como a estratégia C da ET, parece promissor para o futuro da terapia, mas a técnica depende do processo inflamatório pulpar. O segundo método pode ser obtido pela engenharia tecidual. Sugere-se a utilização de célula-tronco pluripotentes induzidas, onde junto com o desenvolvimento de *scaffold* apresentar-se-ão como uma alternativa ao atual estágio da endodontia como um substituto autólogo.

Oda et al. (2010) avaliaram a capacidade das células-tronco oriundas de germes dentários em serem induzidas a células-tronco pluripotentes. O estudo utilizou células oriundas de germes dentários de três pacientes com idades de 10, 13 e 16 anos. Os resultados indicaram uma alta capacidade do processo de indução celular ser aplicado em células oriundas de germes de terceiros molares, assemelhando-se muito com células-tronco embrionárias. O estudo elucidou discretas alterações tais como: morfológicas; expressão de marcadores; expressão gênica; e a capacidade de se diferenciarem nas três camadas celulares embrionárias, similares as células-tronco embrionárias. Destacou-se, ao final do experimento, que o material estudado é um de descarte clínico que pode por sua vez pode ser aproveitado como fonte de material biológico para novas alternativas terapêuticas.

Yen e Yelick (2011) realizaram uma extensa revisão de literatura com o objetivo de resumir estratégias para o desenvolvimento do substituto biológico dentário utilizando células oriundas de germes dentários. Elucidando vários componentes do desenvolvimento dentário mencionados pela pesquisadora, destaca-se a capacidade das células-tronco mesênquimais oriundas de germes dentários possuírem a mesma capacidade de células-tronco oriundas de elementos dentários decíduos esfoliados. Concluindo sua revisão a autora indicou a capacidade de células oriundas de germes dentários possuírem capacidade

regenerativa para vários outros tecidos. O desenvolvimento de técnicas permitirá a criopreservação destes tecidos para sua posterior aplicação em alternativas terapêuticas regenerativas.

Lin et al. (2011) avaliaram a capacidade do tecido periodontal formado com a utilização de DSC's em melhorar a utilização de implantes osteointegrados. Gerado em laboratório, o tecido periodontal oriundos de células-tronco foi aplicado em implantes osteointegrados instalados em sítios de molares de ratos imunossuprimidos. Os resultados indicaram a capacidade de formação de tecido periodontal organizado ao redor de superfícies de titânio. Concluindo seu estudo sugere-se o desenvolvimento da engenharia tecidual na odontologia como um promissor campo na melhoria de terapias e sua aplicação acontecer a curto prazo.

Karbanová et al. (2011) realizaram cultura de células-tronco derivadas da polpa dentária oriundas de terceiros molares humanos em meio de cultura contendo diferentes tipos de fatores de crescimento. A utilização de citometria de fluxo, permitiu a observação da expressão de diversos marcadores caracterizando estas células como oriundas da camada embrionária mesênquimal. A cultura destas células em meio osteogênico proporcionou a expressão de osteonectina e osteopontina o que em cultura observou-se a formação de colágeno tipo 1. O cultivo destas células em meio de cultura suplementado por TGF β -1 permitiu a formação de matiz extracelular semelhante a matriz de tecido cartilaginoso. O cultivo sob influência de meio de cultura com fatores de crescimento de vasos endoteliais permitiu a expressão de genes e marcadores característicos de tecido vascular endotelial. Já o cultivo em meio neurogênico permitiu a expressão de marcadores característicos do tecido neural. Concluindo o estudo, os autores indicaram hDSC's uma fonte de células-tronco somáticas apropriada para o desenvolvimento da ET, bem como sua capacidade em diferenciar-se em diversos tipos de tecidos.

Estrela et al. (2011) realizaram uma extensa revisão de literatura sobre células-tronco mesenquimais e suas perspectivas para a regeneração tecidual. Sua revisão indicou 5 fontes de células-tronco mesenquimais presentes na cavidade oral, são elas: Células-tronco oriundas da polpa dentária de elementos adultos, células oriundas da bainha de Hertwig de elementos em sua final formação apical, células oriundas da polpa de elementos decíduos esfoliados; células oriundas do ligamento periodontal e células oriundas de germes dentários humano. O estudo indicou que apenas células oriundas da polpa dentária de elementos permanentes

com um potencial moderado de proliferação, enfatizando-se a capacidade de todas as células em todos os tipos de sítios encontrados em serem induzida a pluripotência. Este fato permitirá ao sítio doador uma viabilidade no fornecimento de material para a engenharia tecidual.

Nakahara (2011) em um artigo de revisão da literatura elucidou a comunidade odontológica o pouco caso de muitos cirurgiões dentistas frente aos novos avanços na ET, apresentaram diversos artigos científicos indicando a pluripotência das células tronco dentárias frente as atuais fontes utilizadas em medicina regenerativa. Este artigo mostrou as duas áreas para aplicação de células-tronco oriundas de germes dentários: a primeira, consiste na aplicação de terapias celulares para desordens hematopoiéticas e outras disfunções sistêmicas; e a segunda a aplicação destas células na regeneração e criação de novos órgãos dentre os quais o órgão dentário.

Duailibi et al. (2011) sugeriram uma coleta de material biológico baseado em seis estágios de desenvolvimento dentário. Neste trabalho, não apenas a mineralização do tecido dentário indicou uma maturação cronológica mas também sinalizou uma maturação fisiológica. O estudo inferiu uma nova classificação de desenvolvimento dentário determinada por 6 estágios distintos de acordo com a quantidade de CFU's de células-tronco em cultura. Como conclusão indicou uma coleta no estágio 1 como o momento ideal, por manter a quantidade de unidades formadoras de colônias em número adequado após 21 dias em cultura. Embora gerada uma classificação, não encontraram um método de diagnóstico por imagem eficiente para determinar estes estágios de desenvolvimento.

Atari et al. (2012) apresentaram a comunidade científica uma nova linhagem derivada de células-tronco oriundos de polpa de terceiros molares. A cultura primária com meio de cultura contendo fatores de crescimento específicos permitiu o isolamento e caracterização. A utilização do *real time PCR* permitiu avaliar a expressão gênica de *ssea4*, *oct3/4*, *nanog*, *sox2*, *lin28*, *CD13*, *CD105*, *CD90*, *CD29*, *CD73* e *stro1*. Os resultados indicaram que estas células eram similares às células oriundas dos três tipos de tecido embrionário: mesoderma; ectoderma; e endoderma, concluindo o trabalho, o que os autores classificaram como o tipo celular analisado uma excelente alternativa com qualidade e facilidade de acesso para a medicina regenerativa.

Egusa et al. (2012) realizaram uma revisão sistemática dividida em duas publicações distintas. Apresentaram à comunidade científica em uma primeira etapa, o atual estágio de diversas linhas de pesquisa de células-tronco na odontologia. Na segunda parte do trabalho salientaram as possíveis aplicações clínicas deste tema na odontologia. No oitavo tema abordado pelos autores destacaram a possibilidade de criação de bancos de criopreservação de tecidos orais. A presença de hDSCs com elevada capacidade de indução conforme justificada pelos autores, possibilitou a criação destes depósitos de tecidos, apesar da ausência de pesquisas indicando a viabilidade de hDSCs após o processo de criopreservação.

2.2 DESENVOLVIMENTO DENTÁRIO E ESTIMATIVAS ETÁRIAS

Gustafson (1950) caracterizou os elementos dentários como indicadores de maturidade fisiológica. A publicação elucidou alterações em dentes já completamente formados como indicativo de maturação fisiológica sendo amplamente aceita na época pela comunidade científica. Alterações como: atrição dentária, recessão gengival, transparência radicular, reabsorção radicular, aposição de cemento secundário e deposição de dentina secundária. Seus resultados comprovaram pela primeira vez na ciência que as alterações observadas, podem ser indicativas de maturidade etária, levantando a suspeita de desenvolvimento de metodologia para a indicação da faixa etária do paciente.

Nolla (1960) determinou que a esfoliação e o desenvolvimento dentário são bons instrumentos para quantificar a maturidade fisiológica nas duas primeiras décadas de vida. Em seu trabalho determinaram curvas de crescimento normais para 25 crianças do gênero masculino e 25 crianças do gênero feminino Utilizando a técnica radiográfica de lateral de mandíbula criaram um índice de ilustrações de dez estágios do desenvolvimento dentário. Este índice inicia no estágio 0, antes da formação da cripta e evolui até o estágio 10 após a completa formação das raízes. Associando o conjunto de ilustrações com as curvas de crescimento, estima-se a idade fisiológica de pacientes.

Nicodemo (1967) utilizou uma amostra de pacientes brasileiros oriundos do Vale do Paraíba e analisou o terceiro molar por meio de radiografias periapicais e

radiografias provenientes da técnica lateral de mandíbula. Sua metodologia consistia na classificação de oito dos dez estágios propostos por Nolla (1960). Correlacionando os oito estágios observados em uma tabela comparativa com a faixa etária. Entre suas conclusões destaca-se a ausência de variação entre os lados das arcadas dentárias e o não dimorfismo sexual.

Moraes (1973) realizou a continuação do trabalho proposto por Nicodemo, em 1967. No entanto alterou a amostra de dentes utilizada observando incisivos e molares permanentes. Correlacionando-os em uma tabela semelhantes a tabela proposta por Nicodemo (1973). Nos seus resultados observa-se semelhanças com as conclusões observadas por Nicodemo (1967).

Médici Filho (1973) continuou o trabalho proposto por Nicodemo (1967). Sua amostra continha a análise de oito estágios de desenvolvimento de caninos e pré-molares e também seus dados foram combinados em uma tabela com resultados semelhantes ao proposto por Nicodemo.

Dermirjian et al. (1973) elucidou um novo método para a quantificação da maturidade fisiológica. Sugerindo este método pela análise de radiografias panorâmicas. Em seu estudo, utilizaram radiografias de 1446 crianças do gênero masculino e 1482 crianças do gênero feminino com idades entre 2 e 20 anos. Concluíram a presença de 8 estágios de desenvolvimento, iniciando o processo de calcificação no estágio A e terminando no fechamento do forame apical no estágio H.

Nicodemo et al. (1974) combinaram os resultados observados nos estudos previamente citados de Nicodemo (1967) e Moraes (1973). Tal combinação, culminou com a criação na primeira tabela classificatória do Brasil utilizando oito estágios de desenvolvimento de todos os dentes humanos permanentes. A técnica consiste na análise de radiografias panorâmicas atribuindo ao estágio de desenvolvimento de cada dente uma pontuação, ao final, a pontuação é somada e aplicada em uma equação matemática, permitindo a obtenção da idade fisiológica de indivíduos. Tal método é muito usado em nosso país e permite a identificação, e solução de diversos casos ilustrando a capacidade de estágios dentários em indicar maturidade fisiológica.

Gustafson e Koch (1974) indicaram o estabelecimento de três estágios de formação dentária. O primeiro consiste no início da calcificação coronária; o segundo, o término da calcificação coronária; o terceiro e último estágio consiste no

término da formação radicular com fechamento do forame apical. A partir de análise de ortopantomografias, classifica-se cada dente do paciente nos estágios propostos e a combinação destes dados, resulta em uma estimativa da idade fisiológica do paciente.

Maples (1978) mostrou que ser possível determinar a idade fisiológica dos indivíduos por meio de uma técnica histológica. Seus experimentos evidenciaram a capacidade do segundo molar em determinar a cronologia etária de indivíduos adultos. Comprovando a capacidade de um único elemento dentário ser capaz de indicar a maturidade etária assim como a análise de epífares e a análise das estruturas craniais. No entanto, sua técnica consiste na análise histológica necessitando a destruição do objeto de estudo dificultando sua aplicação em determinadas situações.

Metzger et al. (1980) modificaram o método de avaliar maturidade fisiológica proposto por Gustafson em 1950. Em seus estudos foi demonstrado que há uma dificuldade em avaliar a transparência e formação de dentina secundária na espessura radicular proposta por Gustafson (1950). Seus estudos mostraram que ao analisar uma espessura de dentina mais fina aumenta-se a acurácia da análise diminuindo assim a necessidade de observadores experientes para a estimativa etária de ossadas arqueológicas.

Nitzan et al. (1986) descreveram variações morfológicas de elementos dentários inclusos durante o processo de envelhecimento com o objetivo de ilustrar estas alterações sem a influência de fatores externos. Sua amostra constituiu de elementos dentários totalmente inclusos provenientes de pacientes de 11 à 76 anos. A análise histológica, permitiu contabilizar a distribuição de nódulos pulpare, pré-dentina, dentina secundária, dentina primária e cemento com a idade de pacientes. Seus resultados indicam que a espessura de pré-dentina e de cemento aumentam linearmente com o envelhecimento, enquanto a formação de dentina secundária e nódulos pulpare progridem de maneira aleatória com a idade quando comparados com pré-dentina e cemento. A dentina primária possui alterações similares em todas as faixas etárias.

Morse (1991) relatou alterações pulpare decorrentes do envelhecimento. Realizou uma revisão sistemática dos artigos publicados discutindo a capacidade dos elementos dentários serem úteis como biomarcadores de maturidade fisiológica. Na primeira parte de seu trabalho, descreve-se o complexo dentina polpa

juntamente com suas associações à outros tecidos. Na segunda parte revisa-se alterações do complexo dentina-polpa e demais estruturas dentárias com o envelhecimento, buscando uma diferenciação entre alterações fisiológicas e alteração decorrentes do envelhecimento. Na terceira parte de sua revisão decorre da análise de trabalhos de teorias de envelhecimento com os acontecimentos na cavidade pulpar decorrentes da evolução etária. Em sua quarta e ultima parte discute-se alterações pulpares decorrentes da atuação profissional e a qual ponto estas manobras poderiam influenciar a capacidade do complexo dentina polpa em atuar como um biomarcador de maturidade fisiológica. Concluindo seu trabalho detalha-se os elementos dentários como biomarcadores de maturidade fisiológica.

Morse et al. (1993) analisaram dentes anteriores de 500 pacientes por meio de radiografias estudando a largura e comprimento da cavidade pulpar juntamente com alterações em diversas faixas etárias. Seus resultados indicaram ser possível distinguir a faixa etária de pacientes. Havendo em pacientes idosos diminuição do comprimento e largura da cavidade pulpar. Os autores reafirmaram a dificuldade em estabelecer estimativas etárias de indivíduos após as primeiras duas décadas de vida afirmando a necessidade do desenvolvimento de novas metodologias capazes de serem utilizadas em todas as faixas etárias com maior precisão que os métodos descritos até então.

Kvaal e Solheim (1994) analisaram radiografias periapicais de 100 pacientes da faculdade de odontologia de Oslo. Para compensar as angulações os autores utilizaram proporções entre: o comprimento do dente e da raiz; o comprimento da polpa e da raiz dentária; o comprimento da polpa e da coroa dentária; e da largura da polpa com a largura da raiz. A análise estatística determinou diferenças estatisticamente significantes entre a idade cronológica e a proporção analisadas dos elementos dentários. A única exceção foi a proporção da coroa pela raiz do dente. Concluindo que radiografias odontológicas são uma alternativa comprovada à técnica de maturação fisiológica pela análise histológica a qual requer destruição do objeto de estudo. Deste modo permiti-se a determinação da maturidade fisiológica em indivíduos adultos, juntamente com as proporções dentárias como ferramenta.

Bolanos et al. (2000) demonstraram ser capaz de uma estimativa etária com uma maior precisão utilizando o método proposto por Nolla. Foram analisadas 374 radiografias panorâmicas de 195 pacientes do gênero feminino e 179 pacientes do gênero masculino. Seus resultados indicam uma maior precisão do método em

crianças de até 10 anos sendo mais indicada a análise dos elementos 21, 43 e 46 para indivíduos do gênero masculino e elementos 21 46 e 47 para pacientes do gênero feminino. Quando se desconhece a idade do paciente os dentes de eleição que vão melhor estimar a idade fisiológica 43, 46, 47 e 44 para pacientes do gênero masculino e 44, 47 e 43 para pacientes do gênero feminino.

Willems et al. (2002) realizaram uma comparação de dois métodos de estimativa etária: o método morfológico utilizado foi o comprimento da região translúcida radicular; e o método radiográfico aplicado utiliza medidas de comprimento do órgão dentário e suas proporções como proposto por Kvaal e Solheim (1994). A análise morfológica foi realizada utilizando uma amostra composta por 160 dentes e dois observadores. Já a análise radiográfica foi realizada com a utilização de um total de 72 dentes e três observadores foram necessários. Seus resultados indicam que o método radiográfico apresenta uma maior precisão para estimar intervalo etário de indivíduos, sugerindo que os avanços no campo da informação na radiologia odontológica digital seriam uma alternativa para aumentar esta precisão dos métodos de estimativa etária radiográficos.

Mesotten et al. (2002) demonstraram ser possível em estimar a idade cronológica de indivíduos utilizando apenas os estágios de desenvolvimento dos terceiros molares. A análise de 1175 radiografias panorâmicas provenientes de pacientes na faixa etária de 16 e 22 anos de idade. Aos terceiros molares atribuiu-se valores correspondentes ao estágio de desenvolvimento dente. A análise de regressão linear matemática permitiu a obtenção de funções matemáticas que ao atribuir valores aos terceiros molares estabelece a faixa etária tendo uma variação de 1,52 anos de indivíduos do gênero masculino e 1,56 anos para indivíduos de gênero feminino quando os 4 terceiros molares estão presentes.

Murray et al. (2002) correlacionaram alterações na densidade celular pulpar juntamente com alterações de área e espessura com a idade. A amostra era composta por 60 pacientes na faixa etária de 10 à 59 anos submetidos a extração dentária de razão terapêutica. O total obtido de 50 incisivos, 39 caninos, 51 pré-molares e 7 molares que possibilitou a análise histomorfométrica da densidade celular da polpa dentária. Seus resultados indicam que há uma diminuição assimétrica da densidade celular ao envelhecer. Há uma diminuição muito maior na raiz que na coroa dentária, no entanto seu trabalho demonstra alterações celulares na cavidade pulpar durante o processo de envelhecimento.

Vandevoort et al. (2004) correlacionaram pela primeira vez a idade cronológica com o volume dentário e polpa dentária com auxílio do sistema de MicroTC. Utilizando uma resolução espacial de 0,25 microm, 43 elementos dentários uniradiculares provenientes de 25 pacientes de idade conhecida foram escaneados pelo sistema. Desenvolveu um pc para a reconstrução espacial dos elementos dentários capaz de calcular o volume do tecido dentário e o volume da cavidade pulpar. Seus resultados indicam uma fraca correlação do volume dentário com a capacidade de indicar idade cronológica de indivíduos. Embora a fraca correlação, os autores discutiram e afirmaram que embora a fraca correlação dos resultados com a maturidade fisiológica o desenvolvimento do pc juntamente com os avanços tecnológicos permitirão o desenvolvimento de uma técnica de análise volumétrica melhor de modo que a estimativa etária terá um futuro muito promissor.

Oi et al. (2004) descreveram alterações morfológicas na polpa dentária com o uso de MicroCT. O avanço tecnológico permitiu redução da espessura de voxels e assim a análise em reconstruções tridimensionais o que até então era limitado. Sua amostra constituiu-se de em pré-molares superiores classificados segundo a faixa etária de sua origem. Analisando características tridimensionais morfológicas da cavidade tais como: o volume da cavidade pulpar; e o diâmetro da cavidade pulpar. Concluindo que a largura da camara pulpar diminui com a idade; o volume decresce com o passar do tempo concentrando este ocorrido na camara pulpar coronária; e constatou-se que há uma redução no diâmetro do canal radicular com o passar da idade. Este estudo comprova a presença de alterações pulpares durante o envelhecimento.

Cameriere et al. (2004a) desenvolveram um método que fosse capaz de auxiliar a idade de indivíduos os quais não possuíam registros legais, afim de estabelecer critérios para a identificação da maioridade legal. Propuseram a análise da proporção da área da polpa pela área do dente no segundo molar permanente. Analisando 312 radiografias panorâmicas de 135 homens e 177 mulheres com idades entre 14 e 24 anos de idade. Seus resultados não foram muito promissores, o autor discute o tipo de técnica feita para as análises quanto a distorção e formação de artefatos de imagem que pode ter afetado os resultados. Seus resultados consistem em um intervalo de valores que pode ser utilizado para a identificação etária do indivíduo com 92% de probabilidade em acertar a idade fisiológica do paciente.

Cameriere et al. (2004b) buscaram um método que conseguisse aumentar a precisão das estimativas de idade fisiológica dos indivíduos propondo a análise das variações dimensionais da cavidade pulpar como um indicativo de maturidade fisiológica com o uso de apenas um único dente. Os avanços tecnológicos da tecnologia da informação, juntamente com o desenvolvimento de técnicas radiográficas digitais, permitiu a análise da câmara pulpar individualmente. Sua idéia inicial era avaliar a formação de dentina secundária, até então esta não estava incluída nos estágios de desenvolvimento anteriormente citados. Utilizaram uma amostra de 100 pacientes destes, 46 pacientes eram do gênero masculino e 54 pacientes do gênero feminino o elemento selecionado foi o canino superior direito. Neste elemento, aferiu-se: o comprimento do dente; a proporção entre o comprimento do dente e da polpa; a proporção entre a largura do dente com a largura da polpa; e a proporção da área do dente com a área da polpa. Seus resultados indicaram que a precisão do método foi uma estimativa com menos de quatro anos de diferença.

Yang et al. (2006) tinham o objetivo de correlacionar a proporção do volume do dente pelo volume da polpa com a idade cronológica do indivíduo criando um pc de segmentação para esta finalidade. Em seu trabalho 28 dentes uni-radiculares de pacientes com idade conhecida foram utilizados e suas imagens foram obtidas por meio de TCFC. Os autores utilizaram-se do princípio de Arquimedes para calcular o volume real dos elementos dentários e assim, calibrando as reconstruções tridimensionais. Seus resultados contrariam os resultados encontrados anteriormente por Vandevort; o presente estudo confirmou ser possível estimar a idade fisiológica com o uso da proporção do volume do dente pelo volume da polpa com uma análise de regressão linear. Caracterizando o sistema de tomografia de feixe cônico como uma alternativa de aquisição de imagens tridimensionais de tecidos dentários juntamente com uma capacidade em obter dados para o cálculo da proporção do volume dos tecidos dentários.

Someda et al. (2009) tinham o objetivo de investigar métodos tridimensionais de estimativa etária (proporção volume do dente pelo volume pulpar) considerando o gênero do paciente, incluindo medidas de esmalte e dentina. Para isto fez uso de uma coleção dentária do departamento de anatomia humana da universidade de Tokyo. Totalizando a amostra em 155 incisivos centrais inferiores previamente catalogados de acordo com a faixa etária dos pacientes, a qual possuía uma

variação de 12 e 79 anos. Os elementos foram submetidos a uma análise de equipamento de MicroTC. Os dados foram analisados utilizando o pc TRI-3DBON, o qual permitiu o cálculo volumétrico dos tecidos dentários tais como: o dente completo, somente a dentina do elemento, apenas a porção coronária, apenas a porção radicular e apenas a porção coronária sem o esmalte. Seus resultados indicam ser possível correlacionar alterações na proporção do volume dentário pelo volume pulpar indicando análises volumétricas sem a segmentação do esmalte dentário.

Aboshi et al. (2010) avaliaram a capacidade de correlacionar a estimativa etária pelo método de proporção de volume em segundo pré molar inferior utilizando regiões seccionais do elemento. Um total de 50 elementos sendo 27 oriundos de pacientes do gênero masculino e 23 oriundos do gênero feminino foram analisados por um dispositivo de MicroTC. O uso do pc TRI-3DBON permitiu a segmentação parcial do elemento dentário e a análise da proporção tecido dentário e câmara pulpar em 4 partes: a primeira consiste na porção coronária do elemento; a segunda consiste na porção cervical radicular; terceira na porção de raiz média; e a quarta e última porção consiste na porção apical do elemento dentário. Seus resultados indicam que a porção cervical evidencia alterações dimensionais mais evidentes durante o envelhecimento. Concluindo que as alterações volumétricas são um método confiável para se estimar maturidade fisiológica, há regiões específicas que concentram mais alterações com o passar do tempo e podem ainda aumentar a precisão da técnica.

Lewis et al. (2010) revisaram os métodos de estimativa etária que utilizam o terceiro molar como elemento de referência para a indicação de maioridade legal. Eles compararam os padrões de desenvolvimento do elemento nos diversos tipos de populações americanas com o método proposto por Demirjian et al. (1973). A técnica se mostrou válida ao correlacionar a maioridade legal americana com terceiro molar. Ao atingir o estágio H proposto por Demirjian grande parte da população estará acima dos 18 anos de idade. O autor enfatiza o método exclusivamente visual de modo que o examinador estará totalmente dependente dos artefatos de técnica radiográfica podendo estes interferir no resultado final da perícia.

Jagannathan (2011) verificou a aplicabilidade da técnica volumétrica de estimativa etária na população indiana. Um total de 140 caninos inferiores provenientes de pacientes com idades entre 10 e 70 anos foi utilizado. Os elementos

foram escaneados pelo dispositivo de TCFC de pequeno volume de captura. Os resultados demonstrados por gráficos e uma análise de regressão linear foi aplicada para a obtenção de uma equação matemática. Os resultados indicaram a capacidade da técnica em ser aplicada na população indiana, bem como sua utilidade em estimar a maturidade fisiológica de indivíduos. Discute-se no final do artigo a necessidade de haver várias equações para os vários tipos de populações.

Star et al. (2011) analisaram a capacidade da técnica de estimativa etária pela proporção do volume dentário e pulpar em ser aplicada por imagens provenientes de consultórios de cirurgias dentistas. Para a análise foram utilizados 111 exames de 57 pacientes do gênero feminino e 54 pacientes do gênero masculino com idades variando entre 10 e 65 anos. O cálculo volumétrico dos tecidos foi obtido via um processo de segmentação com a utilização de pc manipulador de imagens DICOM. Foram analisados um total 118 dentes dos quais 65 eram incisivos, 32 eram caninos e 15 eram pré-molares. Os resultados indicam uma capacidade crescente em estimar a idade fisiológica de pacientes sendo que os elementos que melhor ilustram esta capacidade são os incisivos centrais seguidos pelos pré-molares e caninos. O estudo também indicou a presença de diferenças consideráveis entre as equações por regressão linear de acordo com gênero dos pacientes, indicando cálculos distintos entre indivíduos de gênero masculino e feminino. Discute-se a capacidade da técnica, juntamente com os avanços tecnológicos que acontecerão com o tempo na técnica tomográfica de feixe cônico; voxels cada vez menores, resoluções espaciais maiores; e aumento na tonalidade da escala de cinzas irão ainda melhorar a estimativa etária e assim melhorar a precisão do método.

Zaher et al. (2011) demonstraram a aplicabilidade da técnica proposta por Cameriere et al. (2004a e b) a obtenção da estimativa etária pelo método da proporção da área dentária pela área da polpa na população egípcia. Sua amostra era composta por 144 radiografias periapicais de incisivos centrais superiores provenientes de indivíduos com idade entre 12 e 60 anos. Estas radiografias foram digitalizadas com o auxílio de câmera digital. Utilizando um pc de edição de imagens determinou-se pontos de equalização na imagem, posteriormente esta imagem foi exportada para um pc de autoCAD. Este foi capaz de determinar, com uma ferramenta ponto/área, a região da área do dente com a área da polpa e posteriormente sua análise. Seus resultados permitiram a construção de equações por meio de regressões lineares, estas foram capazes de estimar a maturação

fisiológica com um intervalo de erro entre 1,2 anos a 5,6 anos. Concluindo que o método proposto por Cameriere era válido para a estimativa etária de indivíduos.

De Luca et al. (2011) avaliaram a confiabilidade do método de estimativa etária pela análise da proporção entre a área do dente e a área da polpa. Sua amostra era composta por um conjunto de 103 caninos inferiores oriundos de um banco de dados. A faixa etária da amostra obtida varia de 18 à 75 anos. Estes elementos foram radiografados e posteriormente as radiografias periapicais obtidas foram escaneadas e digitalizadas. Para a análise da área, utilizou-se um pc de manipulação de imagens comum, o Adobe Photoshop™. Posteriormente foi aplicada as equações propostas por Cameriere et al. (2004a e b). Os resultados indicaram que o canino pode ser usado para a estimativa etária com a técnica de análise da proporção.

Tardivo et al. (2011), em um estudo preliminar, avaliaram a capacidade das reconstruções volumétricas em determinar a idade fisiológica. Admitindo-se que o melhor método para indicar maturidade fisiológica é a radiografia periapical, o autor apresenta a tomografia como uma promessa para aumentar a precisão da estimativa etária. Os autores analisaram 58 exames de tomografia volumétrica oriundos de pacientes do gênero masculino e feminino de idades variando entre 14 e 74 Anos. Um total de 133 caninos sem distinção entre maxila e mandíbula foram segmentados utilizando o pc Mimics. Os resultados indicam uma alta correlação entre medidas volumétricas do elemento canino e a estimativa etária juntamente com uma capacidade de indicar com 100% de precisão do gênero do paciente.

Maret et al. (2011) realizaram uma revisão de literatura da técnica tomográfica de feixe cônico e sua aplicação na estimativa etária. Inicialmente o trabalho demonstra métodos de estimativa etária baseados exclusivamente em medidas lineares com o uso de radiografias convencionais, destacando os artefatos de técnica existentes e suas interferências nos resultados finais. O desenvolvimento de técnicas tridimensionais permitiu a obtenção de novos dados que até então eram difíceis de serem adquiridos; entre eles os autores destacaram a capacidade das técnicas em estimar volumes dentários. O trabalho indica o uso da microTC em estabelecer estas medidas volumétricas dentárias e sua correlação com as estimativas etárias citando vários trabalhos publicados. Indicando uma análise de regressão linear os autores enfatizaram a capacidade da tomografia de feixe cônico ser utilizada para a obtenção de dados tridimensionais de elementos dentários.

Concluindo seu artigo enfatiza-se a técnica volumétrica como uma alternativa aos métodos utilizados até então indicando a utilização de acervos de exames para aumentar as amostras analisadas em diversos tipos populacionais.

Babshet et al. (2011) compararam a precisão do método de estimativa etária pela análise da proporção da área dentária em uma amostra indiana comparando resultados utilizando a análise de um único elemento dentário e vários elementos. Usando 178 radiografias de canino inferior provenientes de 61 pacientes com variação etária de 21 a 71 anos, os autores determinou a área da polpa dentária e a área do tecido dentário utilizando um pc autoCAD de engenharia. Seus resultados indicaram uma maior correlação do incisivo lateral inferior para as estimativas mais precisas de idade, não relatando diferenças entre as análises unitárias e as análises utilizando mais dentes.

Cameriere et al. (2012) aplicaram seu método descrito em 2004 em outros dentes diferentes, com exceção do dente canino utilizando radiografias panorâmicas. Sua amostra era composta por 606 radiografias panorâmicas provenientes de 289 pacientes do gênero feminino e 317 pacientes do gênero masculino com idades entre 18 e 75 anos. Utilizando análise de regressão linear, seus resultados indicaram um resultado de R^2 0,69 para estimativas com análise de um único elemento e um valor de 0.75 para análises de vários prés molares. Seus resultados mostraram uma equivalência na análise de proporções de elementos analisados, indicando uma capacidade da técnica em analisar maturidade fisiológica com apenas um único elemento.

Oliveira et al. (2012) analisaram a mineralização de terceiros molares como indicadores de idade cronológica na população brasileira. Seu objetivo era determinar a maioridade legal utilizando como parâmetros a mineralização dos terceiros molares. Para tanto os autores utilizaram 407 radiografias panorâmicas de homens e mulheres a partir dos cinco anos de idade. Utilizando o método de Demirjian et al. proposto em 1973. Os resultados indicaram que gerações mais novas na população brasileira estão atingindo a mineralização do terceiro molar inferior mais cedo que gerações anteriores e o resto das populações de outras nacionalidades. Não houve variação entre os gêneros e 96,8% e 98,6% dos homens e mulheres respectivamente atingiram completa mineralização do terceiro molar aos dezoito anos.

Cantekin et al. (2012), com o mesmo objetivo de Oliveira et al. (2012), determinaram a mineralização do terceiro molar e sua relação com a estimativa etária da população de crianças e adolescente do leste da Turquia. Utilizando radiografias panorâmicas convencionais de 1348 pacientes sendo 622 pacientes do gênero masculino e 726 pacientes do gênero feminino o grupo aplicou o método de Demirjian et al. (1973). Seus resultados indicaram uma taxa de mineralização tardia quando comparada ao resto da população mundial. Mulheres turcas possuem uma mineralização precoce do terceiro molar inferior quando comparadas com a população turca masculina.

Olze et al. (2012) utilizaram os critérios determinados por Gustafson e Koch (1974) e os aplicaram em radiografias por meio da técnica panorâmica. O objetivo era determinar a aplicabilidade da técnica em ser utilizada com radiografias para estimar a cronologia etária de pacientes. Um total de 1299 radiografias panorâmicas de 650 e 649 pacientes do gênero masculino e feminino respectivamente com idades entre 15 e 40 anos foram requisitadas. Os resultados indicaram valores de R^2 entre 0,65 e 0,73 indicando uma confiabilidade desta adaptação do método de Gustafson (1950) no entanto, com uma alta dependência da técnica da radiografia observada.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo neste estudo foi avaliar a viabilidade dos métodos de estimativa etária por meio de análises obtidas por radiografias periapicais cilindro longo (RPCL) e tomografias computadorizadas de feixe cônico (TCFC) para o diagnóstico dos estágios de desenvolvimento dentário propostos pela nova classificação de Duailibi et al. 2011.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 FORMAÇÃO DA AMOSTRA

A atual proposta de trabalho consiste em uma parceria entre o projeto intitulado: “Protocolo para o estudo in vitro/vivo do substituto biológico do dente implantado em mandíbula/omental de ratos imunossuprimidos utilizando técnica de engenharia de tecidos e cultura de células humanas” previamente aprovado pelo CEP da UNIFESP (Anexo A). A autorização para a execução dos experimentos deste trabalho foi aprovada pelo Comitê de Ética em pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo campus capital com o protocolo 144/11 e CAAE 0166.0.017.000-11 documento em anexo (Anexo B).

A amostra analisada foi composta por 67 terceiros molares inferiores e superiores classificados segundo a quantidade de unidades formadoras de colônia de células-tronco Duailibi et al. (2011) (Figura 4.1). Os elementos dentários foram obtidos por cirurgias de exodontia realizadas na FFO-Fundectó, em clínicas particulares e a disciplina de cirurgia plástica da UNIFESP.

Duailibi et al. (2011) formaram esta coleção de germes dentários padronizando-os segundo a quantidade de unidades formadoras de colônias. Estas foram observadas nas garrafas de cultura após 14 e 21 dias com a coloração de Violeta Cresil; e segundo a quantidade observada os elementos foram classificados. Ao final observa-se a criação de um modelo de seis estágios de desenvolvimento dentário distintos de modo que quanto maior o estágio menor a quantidade e qualidade das células-tronco nele obtidas.

A coleção de elementos dentários provinha de 52 pacientes sendo 36 pacientes do gênero feminino e 16 pacientes provenientes do gênero masculino. Os critérios de inclusão na pesquisa foram a perfeita avaliação de saúde geral e bucal de cada paciente. Como critérios de exclusão da pesquisa foram determinados que as doenças congênitas, transmissíveis, doença periodontal, lesões de cárie, condições de higiene oral precárias e presença de fraturas nos elementos dentários.

Figura 4.1 - Classificação dentária baseada nas unidades formadoras de colônias de células-tronco propostas por Duailibi et al. 2011. Linha A: fotografias dos 6 estágios; Linha A1 radiografia periapical dos seis estágios propostos; Linha A2 As reconstruções tridimensionais obtidas por TCFC demonstra os estágios propostos

4.2 RADIOGRAFIA PERIAPICAL DE CILINDRO LONGO E ANÁLISES LINEARES

Na primeira etapa do presente estudo realizamos a análise de radiografias periapicais da técnica de cone longo (rpcl) aplicando da metodologia de Kvaal e Solheim (1994) (proporções de comprimento) e a metodologia de Carmeriere et al. (2004a) (proporções de área) em todos os elementos da coleção. Para tanto, utilizamos o equipamento de raios-X periapical Intrex VSK (GWL Technologies Inc, Doylestown, PA, EUA) com 70 kVp, 10mA com tempo de exposição de 0.25 segundos. Para o registro da imagem utilizamos o sistema de placa de fósforo e digitalizadora DIGORA (SOREDEX Milwaukee, Winsconsin, Estados Unidos da América).

A padronização da escala de tons de cinza na radiografia foi obtida com o uso do escalímetro em alumínio equivalente. Assim, confeccionou-se um dispositivo em alumínio puro equivalente obtido pela Votorantim Metais (Aluminio, São Paulo, Brasil) de comprimento 3 cm largura de 1cm em 10 degraus de 0,1cm de altura 0,3cm de comprimento uma altura total de 1cm. Assim ao se realizar a radiografia observa-se dez tons de cinza diferentes, mais radiopaco no degrau mais alto e com tonalidade mais radiolúcida no degrau mais baixo (Figura 4.2). Deste modo padronizou-se também o tempo de exposição de 0,25 segundos, de modo que este, foi o único capaz de apresentar as dez tonalidades de tons de cinza observadas juntamente com o tecido mineral dentário.

Figura 4.2 - A: Escalímetro de alumínio confeccionado com 3cm de comprimento 1 cm de largura e 1 cm de altura mínima. Observa-se também dez degraus distanciando-se 0,3 cm entre si com altura de 0,1 cm; B: Imagem mostrando os dez tons de cinzas indicados pelo escalímetro padronizando os tons de cinza observados em todas as radiografias

Foi confeccionado um suporte em acrílico com base de madeira para evitar distorções e manter as angulações verticais e horizontais iguais em todas as radiografias, gentilmente cedido pelo Prof. Titular Frab Norberto Boscolo (FOP-Unicamp). O suporte possui uma base de madeira plana com 30 cm de comprimento e 22 cm de largura; possui uma caixa de acrílico posicionada perpendicular à base de madeira distanciando-se 40 cm o cabeçote do aparelho de raios-X da placa de fósforo G2 (DIGORA). Este dispositivo possui um orifício que permite correto posicionamento do cone localizador no cabeçote do aparelho de raios-X. A eficácia do dispositivo confeccionado foi aferida com a análise rpcl do escalímetro de alumínio. A realização de medidas de comprimento na radiografia obtida, confere com as reais dimensões do objeto em questão (Figura 4.3).

A utilização de paquímetro do tipo universal (Starret, Itu, São Paulo Brasil) permitiu a seleção do maior comprimento do longo eixo dentário e da maior distância mesio distal dos elementos. Assim com a utilização de cera utilidade do tipo 7 (Epoxiglass, Diadema, São Paulo, Brasil) os elementos dentários foram posicionados de modo que os longos eixos determinados estivessem em posição paralela a superfície dos sensores. O escalímetro foi posicionado na lateral do sensor radiográfico e a exposição aos raios-X foi executada. Após o processamento da imagem obtida pelo sistema Digora mencionado anteriormente e a visualização da imagem no pc Digora for windows, as imagens foram exportadas em formato DICOM (diagnostic imaging communication in medicine). Posteriormente, as mesmas foram importadas para o pc OsiriX-DICOM Viewer (Pixmeo, Geneva, Suíça). Este pc permitiu a realização das medidas lineares como comprimento e a medição da área dos elementos dentários com as respectivas ferramentas de regiões de interesse (Figura 4.4).

Figura 4.3 – A: suporte de acrílico confeccionado evidenciando a mesma posição do cabeçote de raios-X com mesma distância e mesmos ângulos verticais e horizontais iguais em todas as radiografias; B: radiografia obtida evidenciando os mesmos dez tons cinzas desejados; C: observa-se as medidas realizadas na imagem do escalímetro de alumínio indicando as mesmas dimensões do objeto real indicando ausência de distorções

Figura 4.4 – A: Foto do sistema DIGORA; B: Configuração do programa computacional Osirix C: As ferramentas de mensuração lineares indicada pela letra L a ferramenta de medição de comprimento e a letra C a ferramenta de medição de área

4.3 TOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA DE FEIXE CÔNICO E ANÁLISES VOLUMÉTRICAS

A segunda etapa deste trabalho consistiu na análise da proporção do volume das estruturas do órgão dentário. Para tanto os elementos dentários foram posicionados dentro de um recipiente de poliestireno circular de 25 mm³ com auxílio de uma lâmina de cera utilidade 7 (Epoxiglass, Diadema, São Paulo, Brasil) de 4 cm de comprimento e 4 centímetros de largura. Os elementos dentários foram posicionados de modo que o longo eixo permanecesse perpendicular ao plano horizontal distanciando-se 2mm entre si. Posteriormente este recipiente foi preenchido por água comum. Este conjunto foi submetido ao exame de TCFC de pequeno volume.

As imagens foram obtidas com a utilização do TCFC Prexion (XTrillion Inc., Toquio, Japão). Para a obtenção da melhor qualidade de imagem, configuramos um campo de visão cúbico de 5 cm³ utilizando 90kVp 4mA e 37 segundos de exposição (Figura 4.5). Posteriormente as imagens foram exportadas em formato DICOM (Diagnostic Imaging and Communication in Medicine) com voxels de 0,125 mm. Os arquivos foram importados no programa computacional InVesalius (Divisão de

Tecnologia 3D-Centro de Tecnologia da Informação Renato Archer) o qual permitiu a reconstrução volumétrica dos elementos analisados.

Figura 4.5 - A mostrando equipamento de TCFC utilizado ; B: Protocolo de aquisição da imagem do equipamento Prexion 3D; C: Protocolo de aquisição do recipiente acrílico evidenciando o posicionamento dos elementos dentários perpendicular ao plano horizontal

Para realizar o cálculo do volume dentário com os dados oriundos de TCFC no pc InVesalius a padronização de alguns fatores foi necessária. Inicialmente padronizamos o modo de observar as imagens. Para tanto utilizando um método visual, selecionamos uma escala de contraste e brilho indicada pelo pc como Window Width (WW) e Window Level (WL) padrão de 295 e 776 unidades respectivamente. Para a seleção e segmentação dos volumes de tecidos mineralizados, selecionamos a opção de determinar um intervalo de tons de cinza variando de 947 unidades a 3986 unidades. Este intervalo foi determinado pelo método visual, e foi selecionado pela precisão em determinar o contorno observado da superfície dentária. Após esta etapa, geramos a reconstrução tridimensional e posteriormente selecionamos a opção de separar as superfícies desconexas, onde automaticamente o pc isolava os diferentes volumes de tecido mineralizado de diferentes elementos presentes na imagem atribuindo cores e mensurando em centímetros cúbicos (cm³) o volume dos objetos (Figura 4.6).

Figura 4.6 - Imagem esquerda arquitetura do programa computacional Invesalius utilizado evidenciando a determinação da superfície do contorno dos elementos dentários analisados

Para o cálculo volumétrico da região do tecido pulpar utilizamos um limiar de tons de cinza de -1024 unidades a 780 unidades, determinados com uma ferramenta pincel. Tal dispositivo permitiu selecionar o espaço ocupado pelo tecido pulpar nos

elementos analisados nos 3 planos de observação: axial, coronal e sagital. Padronizamos o término da marcação do espaço pulpar com o término da circunferência uniforme do elemento dental no corte de observação axial. Ao finalizar estas etapas, realizamos a reconstrução tridimensional das imagens selecionadas e utilizamos a opção de separar as superfícies desconexas mencionada anteriormente. Deste modo, temos um resultado final da segmentação do tecido mineral dentário e da região do espaço da polpa dentária. (Figura 4.7). Usando este protocolo, fomos capazes de aplicar o método da proporção do volume (VPVD) como indicado por Yang et al. (2006).

Figura 4.7: Imagem como resultado final do processo do cálculo volumétrico dos elementos dentários. Observa-se várias colorações cada uma representando volumes distintos; A: imagem obtida no estágio 1; B: imagem obtida no estágio 2; C: imagem obtida no estágio 3; D: imagem obtida no estágio 4; E: imagem obtida no estágio 5; F: imagem obtida no estágio 6

4.4 ANALISE ESTATÍSTICA E TABULAÇÃO DOS DADOS

A coleta dos dados dos experimentos foi realizada com a organização de uma planilha. Cada elemento dentário proveniente da coleção previamente mencionada na secção 3.1 deste capítulo, foi nomeado com uma letra do alfabeto seguido por um algarismo romano, variando de 1 a 6, representando o estágio de desenvolvimento proposto por Duailibi et al. (2011). Individualmente, os elementos foram registrados nesta planilha.

As mensurações de comprimento de polpa, comprimento de coroa, comprimento de raiz, comprimento do dente, área do dente, área da polpa, volume do dente e volume da polpa foram anotadas e catalogadas nas fichas manualmente. Posteriormente estes dados foram tabulados com a utilização de planilhas digitais por meio do pc Excel (Microsoft Corporation, Santa Rosa, CA, USA). O pc permitiu a programação das células juntamente com a execução da função matemática de divisão simples para a obtenção das proporções.

Posteriormente os dados foram transferidos para o pc de análises estatísticas STATA SE11 (Stata Corporation, College Station, TX, USA). Foram consideradas variáveis independentes as razões CCCP, CCCR, CDCR, CDCP, APAD, VPVD e a variável dependente foi o estágio que variou de 1 a 6. A distribuição das variáveis foi considerada normal de modo que o teste selecionado a regressão linear sendo consideradas estatisticamente significantes as associações com valor de p inferior a 0,05.

5 RESULTADOS

A distribuição dos estágios de desenvolvimento dentário entre pacientes do gênero feminino e masculino está representada na quadro 5.1.

Estágio	Gênero	
	Masculino	Feminino
1	8	12
2	8	9
3	7	5
4	3	9
5	4	1
6	1	0
TOTAL	31	36

Quadro 5.1 – Resultado da distribuição entre os gêneros dos estágios de desenvolvimento propostos por Duailibi et al. (2011)

A análise de regressão linear é a representação da distribuição da dispersão dos resultados por meio de uma função matemática linear simples. Os valores de R^2 indicam a correlação desta distribuição com a função ou seja, quanto maior o valor adquirido, maior a representação do modelo de desenvolvimento analisado. O valor do coeficiente indica a razão de proporcionalidade da função: valores positivos indicam uma razão diretamente proporcional; já os valores negativos indicam uma razão inversamente proporcional.

A tabela 5.1 representa o resultado regressão linear do teste de proporção segundo o método de CDCP. O valor de R equivale há 0,3749, já o valor adquirido de R^2 é 0,1406 com um valor de coeficiente negativo.

Tabela 5.1 - Resultados da regressão linear para o teste de proporção do CDCP

R	R^2	Coeficiente	Intervalo de Confiança 95%	P
0,3749	0,1406	-0,3146019	-0.4798014 - 0.1494024	0,0003

A tabela 5.2 representa o resultado de regressão linear do teste de proporção segundo o método de CCCP. O valor de R equivale há 0,8085, já o valor adquirido de R^2 é 0,6537 com um valor de coeficiente negativo.

Tabela 5.2 – Resultado da regressão linear para o teste de proporção do CCCP

R	R^2	Coeficiente	Intervalo de Confiança 95%	P
0,8085	0,6537	-0.7115209	-.8448231 - .5782187	0,0000

A tabela 5.3 representa o resultado de regressão linear do teste de proporção segundo o método de CCCR. O valor de R equivale há 0,7353, já o valor adquirido de R^2 é 0,5308 com um valor de coeficiente negativo.

Tabela 5.3 – Resultado da regressão linear para o teste de proporção do CCCR

R	R^2	Coeficiente	Intervalo de Confiança 95%	P
0,7353	0,5408	-209,5065	-260.2265 - 158.7865	0,0000

A tabela 5.4 representa o resultado de regressão linear do teste de proporção segundo o método de CDCR. O valor de R equivale há 0,7353, já o valor adquirido de R^2 é 0,5407 com um valor de coeficiente negativo.

Tabela 5.4 – Resultado da regressão linear para o teste da proporção do CDCR

R	R^2	Coeficiente	Intervalo de Confiança 95%	P
0,7353	0,5407	-205.1095	-254.7085 - 155.5105	0.0000

A tabela 5.5 representa o resultado de regressão linear do teste de proporção segundo o método de APAD. O valor de R equivale há 0,4890, já o valor adquirido de R^2 é 0,2392 com um valor de coeficiente positivo.

Tabela 5.5 – Resultado da regressão linear para o teste da proporção da APAD

R	R ²	Coeficiente	Intervalo de Confiança 95%	P
0,4890	0,2392	0,0189135	.0099276 .0278993	0,0001

A tabela 5.6 representa o resultado de regressão linear do teste de proporção segundo o método de VPVD. O valor de R equivale há 0,2924, já o valor adquirido de R² é 0,0855 com um valor de coeficiente negativo

Tabela 5.6 – Resultado da regressão linear para o teste da proporção do VPVD

R	R ²	Coeficiente	Intervalo de Confiança 95%	P
0,2924	0.0855	-.0075672	-.0128826 - .0022517	0.0060

O quadro 5.2 compara os resultados dos seis métodos analisados e indica a função derivada correspondente à cada um. Observamos neste quadro os valores de R² e valores de R de modo estas variáveis representadas pelos valores mais altos indicam a maior correlação da função adquirida com o modelo de desenvolvimento proposto.

Teste Proposto	R ²	R	Função
CDCP	0,1406	0,3749	y=-0,4469x+3,5158
CCCP	0,6537	0,8085	y=-0,9187x+4,3177
CCCR	0,5408	0,7353	y=-868x+4,312
CDCR	0,5407	0,7353	y= -0,9073x+1,1873
APAD	0,2392	0,4890	y= 12,65x+0,0878
VPVD	0.0855	0,2924	y=-11,303x+3,844

Quadro 5.2 – Quadro comparativo do resultado das análises de regressão linear e funções matemáticas adquiridas

6 DISCUSSÃO

A ET representa um grande avanço para todas as ciências de saúde. Os visionários trabalhos de Carrel (1907) e Carrel e Lindbergh (1935) ilustram a necessidade humana em ansiar terapias alternativas. Os trabalhos de Langer e Vacanti (1993) determinaram os conceitos da ET, conceitos estes que permanecem atuais e são a base de qualquer terapia cujo objetivo seja a regeneração tecidual. Entre as estratégias propostas pelos autores a TRANSC apresenta-se como um sonho a ser almejado. Os problemas revisados por Kim e Vacanti (1999) ilustram a dificuldade em se obter doadores de órgãos e registram as complicações decorrentes da atual terapia de transplantes de órgãos. Sittinger et al. (1996) introduziram o modelo doador e receptor como mesmo indivíduo. Deste modo, as complicações elucidadas por Kim e Vacanti (1999) seriam reduzidas em transplantes pois, com a utilização da TRANSC, será possível a criação de órgãos do próprio paciente mas, ainda assim, a quantidade de células bem como sua origem e qualidade é um desafio a se superar .

Na Odontologia, Kaigler e Mooney (2001) e Mooney et al.(1996) descreveram como o desenvolvimento da ET poderá alterar paradigmas na profissão. Seus estudos desenvolvidos em 1996 indicaram pela primeira vez na literatura uma capacidade de regeneração do tecido pulpar. No entanto, em 2002 no trabalho desenvolvido por Young et al. indicou-se a presença de células-tronco dentais derivadas de germes de terceiros molares de porcos. Duailibi et al. (2004), Duailibi et al. (2006) e Duailibi et al. (2008) indicaram a capacidade de células-tronco derivadas de terceiros molares de ratos Lewis em diferenciar-se e, com a utilização scaffold biodegradáveis, gerar todos os tecidos dentários. O desenvolvimento de novas técnicas permitiu Zhang et al. (2009), a utilizar em células-tronco humanas para a formação de scaffold. No entanto, a aplicação da regeneração tecidual para o substituto biológico do dente na espécie humana representa um longo caminho para a ciência.

Diversos trabalhos indicam a utilização do terceiro molar como indicador de maturidade fisiológica (Lewis ; Senn, 2010; Oliveira et al., 2012; Cantekin et al., 2012). A utilização de diversas aplicações com a utilização de hdsc's oriundas de

germes de terceiros molares possibilitará várias alternativas à clínica odontológica (Oda et al., 2010; Estrela et al., 2011; Karbanová et al., 2011; Lin et al., 2011; Nakahara et al., 2011; Yen et al., 2011; Egusa et al., 2012).

Deste modo, a técnica desenvolvida no presente estudo facilitará e padronizará a coleta deste recurso.

A presença de células-tronco em germes de terceiros molares de ratos e porcos possibilitou diversas pesquisas comprovando também a presença de células indiferenciadas em germes dentários humanos como os trabalhos de Schoenebeck et al. (2009) e Yalvac et al. (2009), os quais indicaram a possibilidade do desenvolvimento de uma nova forma de classificar os germes dentários. Duailibi et al. (2011) propuseram uma nova classificação de desenvolvimento dentário utilizando CFU's para indicar seis novos estágios. Conforme o desenvolvimento dos estágios ocorre a formação radicular, mas a medida que acontece, observa-se redução na quantidade de CFU's. Deste modo, o diagnóstico correto destes estágios padronizará pesquisas e coleta de material biológico.

A amostra do presente estudo foi resultado do trabalho realizado por Duailibi et al. (2011), os elementos dentários analisados foram armazenados, classificados e catalogados em uma coleção, a qual tinha como a base a quantidade de CFU's observadas. Gentilmente os coordenadores do LET do CTCMol da UNIFESP permitiram a utilização desta coleção dentária.

O objetivo da coleção era sua aplicação para desenvolvimento de metodologias que fossem capazes de diagnosticar e estimar o estágio de desenvolvimento dos elementos dentários.

Neste trabalho não foi realizada a distinção entre elementos de acordo com o seu posicionamento superior ou inferior na arcada dentária. Entretanto, considerável quantidade de elementos da amostra consistia em dentes superiores. A utilização da análise do método radiográfico visual até então utilizada para reconhecimento dos estágios propostos, apresentava problemas de distorção e sobreposições de imagens dificultando a reprodutibilidade do método. A técnica visual utilizada na pesquisa de Duailibi et al. (2011) era embasada nos estudos propostos por Nolla (1960), Nicodemo (1967), Moraes (1973), Medici Filho (1973), Demirjian et al. (1973), Gustafson e Koch (1974), Nicodemo et al. (1974), Olze et al. (2012). No entanto, vários erros de interpretação ocorriam no momento da coleta de material,

assim sendo, nos propusemos a desenvolver uma metodologia otimizada para análise desta nova classificação dentária.

A literatura consultada demonstrava uma grande quantidade de métodos para análises de elementos dentários e sua correlação com a maturidade fisiológica. No entanto para o presente estudo era necessário selecionar métodos não destrutivos das estruturas dentais e sua respectiva morfologia nos diversos estágios de desenvolvimento. Dentre os estudos encontrados podemos citar os métodos propostos por; Gustafson (1950); Maples (1978); Metzger et al. (1980); Nitzan et al. (1986); Mesotten et al. (2002); Cantekin et al. (2012) e Oliveira et al. (2012).

Alterações entre padrões de crescimento com diferenças entre os gêneros foram relatadas por Bolanos et al. (2000) porém, o objetivo do estudo não era encontrar padrões entre gêneros distintos e sim determinar um método reprodutível clinicamente para a classificação e diagnóstico por imagem de estimativa dos estágios de desenvolvimento dental. O quadro 5.1 evidencia a distribuição similar entre os gêneros na amostra estudada.

Kvaal e Solheim (1994) sugeriram a utilização da proporção de medidas de comprimento oriundas do órgão dental para a estimativa etária. Selecionamos esta técnica devida sua capacidade em anular distorções e angulações nas radiografias, sua fácil reprodutibilidade e capacidade em estimar a idade cronológica com a utilização de um único elemento dentário. A técnica é suportada pelos conceitos evidenciados por Morse (1991) e Morse et al. (1993) que classificam os elementos dentais como excelentes biomarcadores de maturidade fisiológica. Maturidade fisiológica está elucidada por Murray et al. (2002) indicando que representam as alterações celulares no tecido pulpar ao passar dos anos. Estas alterações também foram observadas nos estudos de Schoenebeck et al. (2009) e Duailibi et al. (2011). Embora a técnica de proporção de Kvaal e Solheim (1994) funcionar, não há, até o presente momento, fatores que padronizem o uso da técnica. Deste modo, padronizamos uma tonalidade mínima de tons de cinza observada na radiografia com o uso do escalímetro e suporte confeccionados padronizaram as angulações das radiografias.

Os trabalhos não indicam um padrão para a aplicação desta técnica, a grande maioria das publicações indicam a utilização desta técnica em pacientes adultos; porém, não há contraindicações para a aplicação desta em dentes no processo de desenvolvimento. Nossos resultados indicaram altos valores de R^2 representando

uma alta confiabilidade da técnica em estimar os estágios propostos por Duailibi et al. (2011). Todas as funções adquiridas como fruto da regressão linear indicam uma reta descendente, ou seja, os valores da proporção CCCP, CDCP, CCCR e CDCR são inversamente proporcionais aos estágios de desenvolvimento dentário propostos. As tabelas 5.1, 5.2, 5.3 e 5.4 mostram os resultados adquiridos para as análises lineares; o coeficiente negativo indicado nelas reafirmam a proporção inversa. Este fato equivale a afirmar que o aumento do comprimento do espaço pulpar e o comprimento do tecido mineral radicular diminuem o valor da proporção. Como consequência a esta diminuição, o elemento analisado se desenvolve e sua quantidade de células diminui, assim como as CFU's. Estes acontecimentos, concordam com a literatura que indica pelos trabalhos de Murray et al. (2002) e Schoenebeck et al. (2009) uma diminuição na quantidade de células conforme desenvolvimento dentário.

Os valores de R^2 , como dito anteriormente, são interpretados como a confiabilidade da função adquirida. Quanto maior seu valor, maior correlação da técnica de proporção aferida a função obtida. O valor encontrado de R^2 mais baixo foi da proporção CDCP. Atribui-se a este fato os valores obtidos de comprimento do dente e da polpa variarem juntos, assim, os valores de proporção observados foram muito dispersos indicados pelo valor de R^2 de 0,1406. Já os valores obtidos de nas outras técnicas proporções CCCR, CCCP, CDCR apresentaram valores de R^2 maiores de modo que ocorreram menos variações entre os comprimentos analisados.

Nossos resultados concordam com os achados pro Willems et al. (2002). A utilização de proporções lineares de comprimento permitiram a análise com elevada precisão, embora o autor indicasse também a utilização de mais fatores para permitir maior acurácia da técnica, não havia no momento dos experimentos outros fatores que favorecessem a aplicação. Com o intuito de buscar métodos mais fidedignos com o nosso objetivo, encontramos na literatura dois novos métodos. Estes até o presente momento emergem como uma alternativa ao método proposto por Kvaal e Solheim (1994).

O método proposto por Cameriere et al. (2004a) e Cameriere et al. (2004b) utilizam adventos do desenvolvimento da tecnologia da informação para realizar novas medidas de proporção, utilizando medidas da área da região do tecido mineral do dental e do espaço da cavidade pulpar. O método proposto tinha por objetivo

inicial realizar a estimativa etária em indivíduos adultos. Assim como o método proposto por Kvaal e Solheim (1994) não há um padrão. Os resultados obtidos com a técnica consiste na digitalização de radiografias convencionais por meio de máquinas fotográficas digitais e a utilização de um software de edição de imagens capaz de aferir a área pontuada (Cameriere et al. 2004a; Cameriere et al. 2004b; Zaher et al. 2011; Babshet et al 2011; De Luca et al. 2011; Cameriere et al 2012). Como as metodologias descritas não utilizaram um padrão que julgamos ideal para a validação do método, utilizamos imagens em formato DICOM, esta imagem possui as reais dimensões da radiografia, consequentemente as dimensões em proporções corretas dos objetos radiografados. A utilização do software leitor de DICOM Osirix foi necessária pois, além da capacidade de ler formatos DICOM é capaz de determinar a área em uma ferramenta de simples utilização. Desta forma, fomos capazes de determinar as corretas proporções necessárias.

Em nossos resultados, utilizando a metodologia de proporção utilizando APAD, não foram promissores. Embora o valor de p tenha indicado uma diferença estatisticamente significativa o valor adquirido de R^2 foi relativamente inferior aos valores adquiridos das medidas que utilizaram os comprimentos com exceção da proporção CDCP. Parte deste fato consiste na variação da medida da área da polpa pela área do dente, segundo o valor de R^2 , estima-se que apenas 48,9% dos valores adquiridos estão correlacionados com a função obtida. Diferentemente do esperado como nos experimentos anteriores, o coeficiente obtido possui valor positivo.

A variação da função observada foi diretamente proporcional aos estágios de desenvolvimento, ou seja, quanto maior a proporção observada, maior o estágio em que o dente se encontra e, pelo trabalho de Duailibi et al. (2011), menor a quantidade de CFU's observada. O aumento do tecido mineral observado e o desenvolvimento do tecido pulpar permite o desenvolvimento do tecido dentário, como consequência, a quantidade de células diminui e o estágio proposto aumenta.

Nossos resultados estão de acordo com os propostos por Murray et al. (2002) e Schoenebeck et al. (2009).

Finalmente último método proposto consiste na utilização da proporção do volume dos tecidos e espaços dentários observados. Este método iniciou-se com os trabalhos de Oi et al. (2004) e Vandervoort et al. (2004). Assim como nos outros métodos, neste também não há uma padronização. Inicialmente, a correlação do

volume, com a idade de pacientes foi obtida com o uso de equipamentos de micro-ct como os trabalhos de Yang et al. (2006), Someda et al. (2009) e Aboshi et al. (2010).

No entanto, embora ainda não exista um padrão de segmentação que determine os valores e técnicas corretas para o cálculo o volume dentário, trabalhos utilizando o equipamentos atuais de uso clínico como a TCFC apresentaram resultados similares aos encontrados utilizando micro-ct tais como os achados de Jagannathan et al. (2011), Star et al. (2011) e Tartivo et al. 2011.

Em nosso experimento evidenciamos, pela análise de regressão linear, um valor de p estatisticamente significativo.

O valor de R^2 aferido consiste em 0,0855 e representa um total aproximado de 30% dos valores de proporção aferidos correspondentes a função adquirida. O valor do coeficiente negativo obtido indica uma relação inversa ou seja, conforme mais alto o valor adquirido, menor o estágio de desenvolvimento dentário e está de acordo com os estudos por Muray et al. (2002) e Schoenebeck et al. (2009).

Embora todos os resultados tenham sido estatisticamente significantes, o valor de R^2 indica que nem todas as técnicas de proporções realizadas são compatíveis. Nosso modelo ideal seria aquele que o valor de R^2 fosse mais próximo do valor de 1.

Em nosso estudo este valor obtido corresponde a 0,6537 o que equivale aproximadamente à 80% dos valores observados correspondentes na função obtida.

Neste trabalho verificamos que os piores métodos para aferir os estágios de desenvolvimento propostos, correspondem as tecnologias que utilizam volume e área.

Inicialmente nosso intuito era de utilizar a metodologia volumétrica que era obtida pela TCFC visando resultados mais precisos, pois a grande maioria dos autores da literatura utilizaram a microTC e a TCFC acreditando ser a tecnologia de excelência. Ao analisar os resultados provenientes da proporção com a utilização de volumes, não obtivemos este resultado. Em nosso estudo buscamos a utilização do equipamento clínico com menor campo de visão o que resultaria em um aumento da resolução espacial consequentemente, maior acurácia nas medidas aferidas assim como Maret et al. (2011). No entanto isto não se refletiu nos resultados de nosso experimento.

A utilização de metodologias como a citometria de fluxo permitirá sub-classificar estes elementos, de modo que possamos talvez cataloga-los segundo a

expressão de marcadores nas células obtidas como proposto por Schoenebeck et al. (2009). Deste modo, talvez possamos explorar em experimentos futuros a tecnologia de proporção volumétrica comparando reconstruções de diferentes regiões do órgão dentário tal como o trabalho realizado por Aboshi et al. (2010) e Atari et al. (2012).

7 CONCLUSÕES

Após a análise minuciosa da literatura obtida e consultada pudemos concluir com nossos experimentos :

1. A nova classificação de estágios para desenvolvimento dentário proposta por Duailibi et al. (2011) foi validada em 80% para a proporção de comprimento entre a coroa e a polpa utilizando a radiografia periapical de cilindro longo como ferramenta para a obtenção de imagens
2. Métodos de análise de diagnóstico por imagem utilizando proporção de volume e área dos tecidos dentários não responderam de forma válida aos propostos por Duailibi et al. (2011)
3. Futuros estudos utilizando subclassificações por marcadores celulares e expressões gênicas para análise de desenvolvimento dentário por meio de diagnóstico por imagem poderão otimizar os resultados obtidos desta pesquisa

REFERÊNCIAS¹

Aboshi H, Takahashi T, Komuro T. Age estimation using microfocus X-ray computed tomography of lower premolars. *Forensic Sci Int*. 2010 Jul 15;200(1-3):35–40.

Atari M, Barajas M, Hernández-Alfaro F, Gil C, Fabregat M, Padró EF, et al. Isolation of pluripotent stem cells from human third molar dental pulp. *Histol Histopathol*. 2011;26(8):1057–70.

Atari M, Gil-Recio C, Fabregat M, García-Fernández DA, Barajas M, Carrasco M, et al. Dental Pulp of the Third Molar: A New Source of Pluripotent-like Stem Cells. *J Cell Sci*. 2012 Mar 30.

Babshet M, Acharya AB, Naikmasur VG. Age estimation from pulp/tooth area ratio (PTR) in an Indian sample: A preliminary comparison of three mandibular teeth used alone and in combination. *J Forensic Leg Med*. 2011 Nov;18(8):350–4.

Bolanos MV, Manrique MC, Bolanos MJ, Briones MT. Approaches to chronological age assessment based on dental calcification. *Forensic Sci Int*. 2000;110(2):97–106.

Cameriere R, Ferrante L, Cingolani M. Precision and reliability of pulp/tooth area ratio (RA) of second molar as indicator of adult age. *J Forensic Sci*. 2004a ;49(6):1319–23.

Cameriere R, Ferrante L, Cingolani M. Variations in pulp/tooth area ratio as an indicator of age: a preliminary study. *J. Forensic Sci* 2004b. Mar;49(2):317–9.

Cameriere R, De Luca S, Alemán I, Ferrante L, Cingolani M. Age estimation by pulp/tooth ratio in lower premolars by orthopantomography. *Forensic Sci Int*. 2012 Jan 10;214(1-3):105–12.

Cantekin K, Yilmaz Y, Demirci T, Celikoglu M. Morphologic analysis of third-molar mineralization for eastern Turkish children and youth. *J Forensic Sci*. 2012 Mar;57(2):531–4.

Carrel A. Heterotransplantation of blood vessels preserved in cold storage. *J Exp Med*. 1907 Mar 14;9(2):226–8.

¹ De acordo com o Estilo Vancouver

Carrel A, Lindbergh CA. The culture of whole organs. *Science*. 1935 Jun 21;81(2112):621–3.

De Luca S, Bautista J, Alemán I, Cameriere R. Age-at-Death Estimation by Pulp/Tooth Area Ratio in Canines: Study of a 20th-Century Mexican Sample of Prisoners to Test Cameriere's Method. *J Forensic Sci*. 2011 Apr 15;56(5):1302–9.

Demirjian, A.; Goldstein, H.; Tanner, J.M. A new system of dental age assessment. *Hum Biol*. 1973 May; 45(2): 211-227.

Duailibi MT, Duailibi SE, Young CS, Bartlett JD, Vacanti JP, Yelick PC. Bioengineered teeth from cultured rat tooth bud cells. *J Dent Res*. 2004 Jul;83(7):523–8.

Duailibi SE, Duailibi MT, Vacanti JP, Yelick PC. Prospects for tooth regeneration. *Periodontol 2000*. 2006;41:177–87.

Duailibi SE, Duailibi MT, Zhang W, Asrican R, Vacanti JP, Yelick PC. Bioengineered dental tissues grown in the rat jaw. *J Dent Res*. 2008 Aug;87(8):745–50.

Duailibi MT, Duailibi SE, Duailibi Neto EF, Negreiros RM, Jorge WA, Ferreira LM, et al. Tooth Tissue Engineering: Optimal Dental Stem Cell Harvest Based on Tooth Development. *Artif Organs*. 2011 Jul;35(7):E129–35.

Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I, Akiyama K. Stem cells in dentistry - Part II: Clinical applications. *J Prosthodont Res*. 2012 Nov 5.

Estrela C, de Alencar AHG, Kitten GT, Vencio EF, Gava E. Mesenchymal stem cells in the dental tissues: perspectives for tissue regeneration. *Braz Dent J*. 2011;22(2):91–8.

Gustafson G. Age determination on teeth, *J. Am. Dent. Assoc*. 41 (1950) 45–54.

Gustafson, G.; Koch, G. Age estimation up to 16 years of age on dental development. *Odontol Revy*, (Lund). 1974; 25(3): 297-306.

Jagannathan N. Age estimation in an Indian population using pulp/tooth volume ratio

of mandibular canines obtained from cone beam computed tomography. *J Forensic Odontostomatol*. 2011;29(2):E1–6.

Kaigler D, Mooney D. Tissue engineering's impact on dentistry. *J Dent Educ*. 2001 May;65(5):456–62.

Karbanová J, Soukup T, Suchánek J, Pytlík R, Corbeil D, Mokřý J. Characterization of Dental Pulp Stem Cells from Impacted Third Molars Cultured in Low Serum-Containing Medium. *Cells Tissues Organs* (Print). 2011;193(6):344–65.

Kim SS, Vacanti JP. The current status of tissue engineering as potential therapy. *Semin Pediatr Surg*. 1999 Aug;8(3):119–23.

Kvaal S, Solheim T. A non-destructive dental method for age estimation. *J Forensic Odontostomatol*. 1994 Jun;12(1):6–11.

Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science*. 1993 May 14;260(5110):920–6.

Lewis JM, Senn DR. Dental age estimation utilizing third molar development: A review of principles, methods, and population studies used in the United States. *Forensic Sci Int*. 2010 Sep 10;201(1-3):79–83.

Lin Y, Gallucci GO, Buser D, Bosshardt D, Belser UC, Yelick PC. Bioengineered periodontal tissue formed on titanium dental implants. *J Dent Res*. 2011 Feb;90(2):251–6.

Maples WR. An improved technique using dental histology for estimation of adult age. *J Forensic Sci*. 1978 Oct;23(4):764–70.

Maret D, Peters OA, Dedouit F, Telmon N, Sixou M. Cone-Beam Computed Tomography: a useful tool for dental age estimation? *Med Hypotheses*. 2011 May;76(5):700–2.

Médici Filho E. Cronologia da mineralização dos caninos, pré- molares e segundos molares, pelo método radiográfico. [tese]. São José dos Campos: UNESP: Faculdade de Odontologia. 1973

Mesotten K, Gunst K, Carbonez A, Willems G. Dental age estimation and third molars: a preliminary study. *Forensic Sci Int*. 2002 Sep 26;129(2):110–5.

Metzger Z, Buchner A, Gorsky M. Gustafson's method for age determination from teeth--a modification for the use of dentists in identification teams. *J Forensic Sci.* 1980 Oct;25(4):742–9.

Mooney DJ, Powell C, Piana J, Rutherford B. Engineering dental pulp-like tissue in vitro. *Biotechnol Prog.* 1996 Oct;12(6):865–8.

Moraes, L.C. Cronologia da mineralização dos incisivos e primeiros molares permanentes, pelo método radiográfico [tese]. São José dos Campos: Unesp: Faculdade de Odontologia; 1973

Morse DR. Age-related changes of the dental pulp complex and their relationship to systemic aging. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1991 Dec;72(6):721–45.

Morse DR, Esposito JV, Schoor RS. A radiographic study of aging changes of the dental pulp and dentin in normal teeth. *Quintessence Int.* 1993 May;24(5):329–33.

Murray PE, Stanley HR, Matthews JB, Sloan AJ, Smith AJ. Age-related odontometric changes of human teeth. *YMOE.* 2002 Apr;93(4):474–82.

Nakahara T. Potential feasibility of dental stem cells for regenerative therapies: stem cell transplantation and whole-tooth engineering. *Odontology.* 2011 Jul;99(2):105–11.

Nicodemo RA. Contribuição para o estudo da cronologia da mineralização dos terceiros molares, pelo método radiográfico, em leucodermas, brasileiros, residentes no Vale do Paraíba [tese] São José dos Campos: Unesp, Faculdade de Odontologia; 1967

Nicodemo, R.A; Moraes, L.C. Médici Filho, E. Tabela Cronológica de mineralização dos dentes permanentes, entre brasileiros. *Rev Fac Odontol.* 1974;3(1): 55-6

Nitzan DW, Michaeli Y, Weinreb M, Azaz B. The effect of aging on tooth morphology: a study on impacted teeth. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 1986 Jan;61(1):54–60.

Nolla CM. the development of permanent teeth. *J Dent Child* 1960;27(4): 254-66

Oda Y, Yoshimura Y, Ohnishi H, Tadokoro M, Katsube Y, Sasao M, et al. Induction of Pluripotent Stem Cells from Human Third Molar Mesenchymal Stromal Cells. *J*

Biol Chem. 2010 Sep 10;285(38):29270–8.

Oi T, Saka H, Ide Y. Three-dimensional observation of pulp cavities in the maxillary first premolar tooth using micro-CT. *Int Endod J*. 2004;37(1):46–51.

Oliveira FT, Capellozza ALÁ, Lauris JRP, de Bullen IRFR. Mineralization of mandibular third molars can estimate chronological age-Brazilian indices. *Forensic Sci Int* 2012 Jan 16.

Olze A, Hertel J, Schulz R, Wierer T, Schmeling A. Radiographic evaluation of Gustafson's criteria for the purpose of forensic age diagnostics. *Int J Legal Med*. 2012 Jul;126(4):615–21.

Schoenebeck B, Hartschen HJ, Schindel M, Degistirici O, Siemonsmeier J, Goetz W, et al. Molecular Characterization of Human Impacted Third Molars: Diversification of Compartments. *Cells Tissues Organs* (Print). 2009;189(5):356–70.

Sittinger M, Bujia J, Rotter N, Reitzel D, Minuth WW, Burmester GR. Tissue engineering and autologous transplant formation: practical approaches with resorbable biomaterials and new cell culture techniques. *Biomaterials*. 1996 Feb;17(3):237–42.

Someda H, Saka H, Matsunaga S, Ide Y, Nakahara K, Hirata S, et al. Age estimation based on three-dimensional measurement of mandibular central incisors in Japanese. *Forensic Sci Int*. 2009 Mar 10;185(1-3):110–4.

Star H, Thevissen P, Jacobs R, Fieuws S, Solheim T, Willems G. Human dental age estimation by calculation of pulp-tooth volume ratios yielded on clinically acquired cone beam computed tomography images of monoradicular teeth. *J Forensic Sci*. 2011 Jan;56 Suppl 1:S77–82.

Tardivo D, Sastre J, Ruquet M, Thollon L, Adalian P, Leonetti G, et al. Three-dimensional modeling of the various volumes of canines to determine age and sex: a preliminary study. *J Forensic Sci*. 2011 May;56(3):766–70.

Vandevoort FM, Bergmans L, Van Cleynenbreugel J, Bielen DJ, Lambrechts P, Wevers M, et al. Age calculation using X-ray microfocus computed tomographical scanning of teeth: a pilot study. *J Forensic Sci*. 2004 Jul;49(4):787–90.

Yalvac ME, Ramazanoglu M, Rizvanov AA, Sahin F, Bayrak OF, Salli U, et al.

Isolation and characterization of stem cells derived from human third molar tooth germs of young adults: implications in neo-vascularization, osteo-, adipo- and neurogenesis. *Pharmacogenomics J.* 2009 Sep 1;10(2):105–13.

Yang F, Jacobs R, Willems G. Dental age estimation through volume matching of teeth imaged by cone-beam CT. *Forensic Sci. Int.* 2006 May 15;159 Suppl 1:S78–83.

Yen A-H, Yelick PC. Dental tissue regeneration - a mini-review. *Gerontology.* 2011;57(1):85–94.

Young CS, Terada S, Vacanti JP, Honda M, Bartlett JD, Yelick PC. Tissue engineering of complex tooth structures on biodegradable polymer scaffolds. *J Dent Res.* 2002 Oct;81(10):695–700.

Willems G, Moulin-Romsee C, Solheim T. Non-destructive dental-age calculation methods in adults: intra- and inter-observer effects. *Forensic Sci Int.* 2002 May 23;126(3):221–6.

Zaher JF, Fawzy IA, Habib SR, Ali MM. Age estimation from pulp/tooth area ratio in maxillary incisors among Egyptians using dental radiographic images. *J Forensic Leg Med.* 2011 Feb;18(2):62–5.

Zhang W, Abukawa H, Troulis MJ, Kaban LB, Vacanti JP, Yelick PC. Tissue engineered hybrid tooth-bone constructs. *Methods.* 2009 Feb;47(2):122–8.

Zhang W, Yelick PC. Vital pulp therapy-current progress of dental pulp regeneration and revascularization. *Int J Dent.* 2010;2010:856087.

ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética em pesquisa da Universidade Federal de São Paulo do projeto que permitiu a formação da coleção dentária

Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 6 de abril de 2004.
CEP 0595/01
FWA 00001891

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a) SÍLVIO EDUARDO DUALIBI
Disciplina/Departamento: Otorrinolaringologia da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: "Abordagem experimental para a produção do substituto biológico do dente: Identificação da expressão genética do implante de polímero reabsorvível semeado com células dentais em mandíbula de ratos".

Prezado(a) Pesquisador(a),

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU e APROVOU** o(s) a(s) **Extensão 1** intitulada "Protocolo para o estudo in vitro/vivo do substituto biológico do dente implantado em mandíbula/omental de ratos imuno-suprimidos utilizando técnicas de engenharia de tecidos e cultura de células dentais humanas" do projeto de pesquisa inicial acima referenciado.

Atenciosamente,

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

OBS: Informamos que, de acordo com a carta Circular nº 003-CONEP/CNS de 14 de fevereiro de 2001 não há necessidade do parecer da CONEP para emendas aos protocolos, salvo quando o CEP solicitar. Nos projetos de Grupo I e II, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las à ANVISA junto com o parecer aprobatório do CEP/UNIFESP.

"Resaltamos que é de essencial importância que seja verificado, antes da divulgação dos processos e/ou resultados obtidos nesta pesquisa, se os mesmos são potencialmente patenteáveis ou passíveis de outras formas de proteção intelectual/industrial. A proteção por meio do depósito de patente, ou de outras formas de proteção da propriedade intelectual, evita a ação indevida de terceiros e confere maior segurança quando da publicação dos resultados da pesquisa."

Rua Botucatu, 572 - 1º andar - conj. 14 - CEP 04023-062 - São Paulo / Brasil
Tel.: (011) 5571-1062 - 5539.7162

ANEXO B - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de São Paulo para o estudo realizado

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

PARECER DE APROVAÇÃO
Protocolo 144/11
CAAE 0166.0.017.000-11

O grupo de trabalho indicado pelo Comitê de Ética em Pesquisa **APROVOU** o protocolo de pesquisa "**Desenvolvimento de metodologia radiográfica e volumétrica dos diferentes estágios de desenvolvimento dentário para qualificação de material biológico para Engenharia Tecidual**", de responsabilidade do pesquisador Eduardo F. Duailibi Neto, sob orientação do Prof. Dr. Israel Chilvarquer.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em "cd". Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 08 de fevereiro de 2012.

Prof. Dra. Marcia Turolla Wanderley
Coordenadora do CEP-FOUSP