CLEBER KEITI NABESHIMA

**Análise do efeito do fator de crescimento endotelial na angiogênese
em canais de dentes de ratos com apicigênese completa**

São Paulo
2015

CLEBER KEITI NABESHIMA

**Análise do efeito do fator de crescimento endotelial na angiogênese
em canais de dentes de ratos com apicigênese completa**

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Doutor, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas.

Área de Concentração: Endodontia

Orientador: Prof. Dr. Manoel Eduardo de Lima Machado

São Paulo

2015

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

Nabeshima, Cleber Keiti.

Análise do efeito do fator de crescimento endotelial na angiogênese em canais de dentes de ratos com apicigênese completa / Cleber Keiti Nabeshima ; orientador Manoel Eduardo de Lima Machado. -- São Paulo, 2015.

118p. : fig.; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Endodontia. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida

1. Pulpectomia. 2. Canal radicular. 3. Ratos. 4. Endodontia. I. Machado, Manoel Eduardo de Lima. II. Título.

Nabeshima CK. Análise do efeito do fator de crescimento endotelial na angiogênese em canais de dentes de ratos com apicigênese completa. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências Odontológicas.

Aprovado em: ____/____/2015

Banca Examinadora

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

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Julgamento: _____ Assinatura: _____

*Dedico a conquista deste título e conclusão desta etapa, primeiramente aos meus pais, **Mauro** e **Sueli**, a quem devo todo o esforço e trabalho; e a três grandes pessoas que não estão mais presentes aqui em matéria, **Ba** (vó) in memorian, que sempre estará em meu coração em todos os dias da minha vida; **Di** (vô) in memorian, que nos deixou com um enorme vazio; e principalmente ao meu irmão **Ricardo** in memorian, que prometeu não perder minha apresentação de doutoramento, infelizmente, eu não poderei vê-lo, mas poderei senti-lo...*

AGRADECIMENTOS

Toda trajetória é composta por obstáculos. E ninguém consegue vencê-los sozinho. Nestes longos anos, digo longos porque a trajetória desta minha fase iniciou-se antes do Doutorado, eu pude contar com o apoio e ajuda de muitas pessoas. Pessoas que com certeza fizeram a diferença para que eu atingisse meus objetivos. Logo, eu não poderia deixar de agradecer neste momento tão importante.

*Primeiramente aos meus pais, **Mauro** e **Sueli**, por ter me dado todo o apoio necessário, incentivo, educação e principalmente por serem a base de tudo. Sem eles, este título não teria a menor graça... À minha irmã **Mariana**, que me tem como exemplo na busca de seus ideais.*

*Ao **professor Machado**, por ter aberto as portas da maior Universidade da América Latina e uma das mais renomadas do Mundo. Obrigado pelas oportunidades de conhecer grandes nomes dos mais diversos Países, e ao mesmo tempo, ser reconhecido por eles como um nome em prol da Endodontia. E sobretudo, obrigado pelo companheirismo e grandes ensinamentos que só comprovam que você é o “El Magnífico...”*

*À **professora Letícia** meus eternos agradecimentos por ser a maior incentivadora, e peça fundamental para que tudo isso acontecesse. Aprendi muito com você, e pode ter certeza que muitas coisas eu lembrarei por toda a minha vida.*

*Ao **Edgar** e ao **Hector**, que chegaram como meros aprendizes, e hoje são grandes companheiros. A execução de todo este trabalho só foi possível com a ajuda deles. Muito obrigado por dividir opiniões e frustrações. Tenho certeza que os dois terão um futuro brilhante pela frente, afinal, para eles está apenas começando, e poderão sempre contar comigo no que precisar.*

*Ao **professor Victor**, que em tão pouco tempo de contato, pude confirmar que é um grande professor e pesquisador. O que aprendi com ele nestes meses, foi indescritível, um exemplo de responsabilidade e intelectualidade. Muito obrigado por ter aberto seu laboratório para execução do meu trabalho, e por ter despendido de tempo para me ajudar e tirar dúvidas do que fosse necessário.*

À **Elis**, que foi de extrema importância em toda a execução deste projeto. Ela nos ensinou praticamente tudo na prática, com muita paciência e dedicação. É um exemplo de responsabilidade, amizade, e humildade. Muito obrigado por ter nos ajudado, por ter passado horas do seu horário de trabalho, e por ter pensado junto conosco em busca de soluções.

Ao **professor Giulio** por estar sempre disponível para discutir sobre nossos projetos paralelos, e através deles, me dar a chance de participar de uma linha nova para mim. Obrigado por compartilhar seus conhecimentos nos créditos e encontros de discussões, atividades que foram importantíssimas para minha formação.

Aos demais professores da disciplina de Endodontia da FOU SP: **professor Celso Caldeira**, que pelos créditos, eu tive o prazer de poder aprender mais com ele sobre traumatismo e regeneração, aliás, créditos que me deu a ideia do presente estudo. **Professora Éricka e professora Carla**, novas na casa, mas em tão pouco tempo conquistaram seu espaço dividindo conhecimentos; aprendi muito com elas tanto como pesquisador quanto professor, obrigado pelas conversas e muitos esclarecimentos científicos. Ao **professor Marcelo**, por ser um exemplo de harmonia, atenção e educação, obrigado por todos os seus ensinamentos e incentivos. Ao **professor Aun**, que também tive o prazer de conhecer e aprender com sua vasta experiência acadêmica.

À **professora Márcia Marques e professora Silvana Cai**, pelos nossos projetos paralelos, e pela atenção me dada nos momentos em que foi preciso. Obrigado por compartilhar seus conhecimentos, foi uma grande honra para mim, ter tido essa proximidade com vocês.

Aos colegas de pós-graduação da Endodontia, **Simony, Laila, Vítor, Ceci, Guilherme, Nilton, Aline, Laís, Amanda, Ana Laura, Alexandre, Nágila, Manu, Elaine, George, Regina, Sandra, Giovanna**, e também de outros departamentos, **Simone** da Ortodontia e **Juliana** do Biomateriais. Muito obrigado pelas conversas, pelo companheirismo, e por dividir experiência, conhecimento, alegrias e frustrações.

Ao **Mário**, que foi a primeira pessoa que me incentivou e apoiou a seguir para o Doutorado, acreditando na minha capacidade, mesmo sabendo dos obstáculos

que vinham pela frente. As palavras dele naquele momento tiveram um enorme peso para minha decisão e seguir confiante nesta fase.

À **Márcia**, agora mestre, uma pessoa em que pude me apoiar em vários momentos difíceis, e que me ajudou bastante dividindo tarefas importantes. Tenho certeza que aprendemos muito um com o outro, e que esta vivência nos tornou grandes amigos, e que iremos compartilhar desta cumplicidade por um longo tempo. Admiro muito, como profissional, como pessoa, e principalmente como vencedora.

À todos os funcionários da Dentística: **Selma, Leandro, Davi, Ana Maria, Soninha e Débora**; do LBO: **Edilene e Douglas**; e da pós-graduação: **Cátia e Alessandra**. Muito obrigado por me atenderem e me ajudar sempre que procurei.

Às pós-doutorandas **Vivian** do LBO, **Stella** da Dentística e **Rejane** da Dentística, muito obrigado por compartilhar seus conhecimentos, sempre incentivando a execução deste projeto.

À **professora Cláudia e Luciana** da FMVZ-USP que me forneceu os ratos para o presente estudo. Muito obrigado pela atenção e paciência.

À **Glauci** da biblioteca, por sua simpatia e grande ajuda na revisão desta tese.

À **Márcia** da Fórmula e Ação, que me forneceu as substâncias irrigantes deste projeto, e por sempre ser nossa parceira em diversas pesquisas em prol da Endodontia.

Aos grandes amigos, **Cintia Y., Cintia M., Érika, Érica, Mary, Maria Paula, Ângela, Raul, Arlindo, Massaro, Zólio, Thaís, Milagre, Naiara**, muito obrigado por estarem sempre na torcida. Vocês são pessoas muito especiais.

Rodrigo Villagra... muito obrigado, de coração, por estar sempre junto, ouvindo... estando presente... dando conselhos... a sua amizade vale muito... ou melhor, ela não tem preço...

Ao **CNPq** pela bolsa de Doutorado concedida através do Departamento.

Aos responsáveis pela **FOUSP** por promover o Programa de Pós-graduação.

E a todos os **familiares, funcionários e pessoas** que me ajudaram direta ou indiretamente para nesta etapa.

*“Quanto mais aumenta nosso conhecimento,
mais evidente fica nossa ignorância.”*

John F. Kennedy

RESUMO

Nabeshima CK. Análise do efeito do fator de crescimento endotelial na angiogênese em canais de dentes de ratos com apicigênese completa. [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2015. Versão Corrigida

A bioengenharia tecidual tem sido aplicada na Endodontia na busca de tratamentos mais biológicos. A revascularização pulpar tem sido observada em dentes com ápice aberto, porém há poucos estudos direcionados aos dentes com ápice formado. A angiogênese é primordial para a nutrição celular durante a regeneração tecidual. O objetivo deste estudo foi analisar o efeito do fator de crescimento endotelial (VEGF) na angiogênese após pulpectomia de canais radiculares de rato com apicigênese completa. A câmara pulpar dos primeiros molares superiores de 12 ratos machos Wistar com 13 semanas foi acessada. A polpa radicular do canal mésio vestibular foi removida e o canal instrumentado até a lima K25. Com uma lima K20, além do limite foraminal, foi induzido o sangramento periapical para o canal radicular. Os dentes do lado direito da arcada foram preenchidos com coágulo sanguíneo (GS), e nos dentes do lado esquerdo foi utilizado VEGF₁₆₅ recombinante (Prospec, Israel) adicionado ao coágulo (GV). Os dentes foram selados com ionômero de vidro fotopolimerizável, e 60 dias depois os animais foram sacrificados. A maxila foi dissecada, fixada, descalcificada e incluída em parafina. Cortes transversais seriados foram feitos e corados com hematoxilina-eosina para avaliação morfológica ou incubados com anticorpo de coelho anti-fator VIII (Bioss, EUA) para análise da angiogênese. A análise histológica demonstrou canais preenchidos por tecido conjuntivo sem presença de odontoblastos nos dois grupos. A imuno-histoquímica demonstrou positividade para o anticorpo no tecido neoformado em ambos os grupos. No grupo 1 foi predominante a marcação difusa, e no grupo 2 foi a marcação definida. Pode-se concluir que o uso de VEGF acelera a angiogênese que ocorre em canais pulpectomizados de molares com apicigênese completa.

Palavras-Chave: Angiogênese. Fator de crescimento endotelial. Apicigênese completa.

ABSTRACT

Nabeshima CK. Analysis of the effect of vascular endothelial growth factor on angiogenesis of root canal in mature teeth of rats [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2015. Corrected Version

The tissue engineering has been applied in Endodontics in search of more biological treatments. The pulp revascularization has been observed in immature teeth, but there are few studies directed to the closed-apex teeth. Angiogenesis is essential for cellular nutrition during tissue regeneration. The aim of this study was to analyze the effect of vascular endothelial growth factor (VEGF) in angiogenesis after pulp removal in rats with mature teeth. The pulp chamber of upper first molars of 12 male Wistar rats with 13-weeks-old was accessed. The pulp of the mesiobuccal root canal was removed, and the root canal was shaped up to 25K-file. Then, a 20K-file was introduced beyond the apex to induce bleeding. The teeth on the right side of the arch are filled using blood clot alone (GS) and the teeth on the left side was filled using blood clot + VEGF₁₆₅ recombinant (Prospec, Israel) (GV). The teeth were coronally sealed using light-curing glass ionomer, and the animals were sacrificed after 60 days. The samples were dissected, fixed, decalcified and included in paraffin. Transverse serial sections were made, and stained using hematoxylin-eosin to morphological evaluation or expressed by immunostaining using anti-Factor VIII rabbit antibody (BIOSs, USA) to angiogenesis analysis. Morphological analysis showed root canals filled by connective tissue without the presence of odontoblasts in both groups. Immunohistochemistry showed positivity for the antibody in the new tissue in both groups, with marking defined in group 2. Diffuse marking was predominant in the group 1, and the well-made type was predominant in the group 2. It can be concluded that the use of VEGF accelerates angiogenesis that occurs in root canal of closed-apex molars after pulpectomy.

Keywords: Angiogenesis. Vascular endothelial growth factor. Mature teeth

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 4.1 – (A) Abridor de boca e afastador de bochecha. (B) Compasso com trava rosqueável adaptado. (C) Afastador de bochecha confeccionado com fio de ortodontia74
- Figura 4.2 – Tratamento no primeiro molar superior. (A) cirurgia de acesso com broca esférica em baixa rotação. (B) Localização do canal méso vestibular. (C) Irrigação do canal radicular com hipoclorito de sódio 2,5% em tubete após instrumentação. (D) Indução de coágulo sanguíneo76
- Figura 5.1 – Fotomicrografia mostrando todos os canais do primeiro molar superior em corte transversal. Em (B) canal méso vestibular tratado apresentando formação de tecido conjuntivo frouxo sem a presença de odontoblastos. Em (C) canal méso lingual não instrumentado, mantendo a polpa vital caracterizada pela presença da camada de odontoblastos.....83
- Figura 5.2 – Fotomicrografia do corte transversal do terço cervical do canal méso vestibular corado em HE. (A-B) Grupo tratado somente com coágulo apresentando tecido necrótico em pontos isolados e bem evidentes (setas). (C-D) Grupo tratado com coágulo adicionado de VEGF apresentando tecido necrótico em menor volume e evidência.....84
- Figura 5.3 – Fotomicrografia do corte transversal do terço médio do canal méso vestibular corado em HE. (A) Grupo tratado somente com coágulo apresentando tecido necrótico ainda bem evidente (seta). (B) Grupo adicionado de VEGF apresentando menos tecido necrótico em evidência85
- Figura 5.4 – Fotomicrografia do corte transversal do terço apical do canal méso vestibular corado em HE. (A) Grupo tratado somente com coágulo apresentando tecido necrótico ainda bem evidente (setas). (B) Grupo adicionado de VEGF apresentando tecido necrótico menos evidente (setas)86

- Figura 5.5 – Fotomicrografia do corte transversal de diferentes terço do canal méso vestibular corado em HE. Note a presença de vasos funcionais preenchidos por células sanguíneas (setas) nos terços médio (B), e apical (E) do grupo tratado somente com coágulo, e cervical (A), médio (C), e apical (E) do grupo adicionado de VEGF87
- Figura 5.6 – Fotomicrografia mostrando tecido com aspecto lacunar (setas) no canal radicular do primeiro molar superior em corte transversal. (A) Terço médio. (B) Terço apical88
- Figura 5.7 – Fotomicrografia do terço apical do canal méso vestibular corado em HE. Reabsorção radicular externa em cimento (c) não atingindo dentina (d), e acompanhado de células inflamatórias (setas)88
- Figura 5.8 – Fotomicrografia do canal méso vestibular tratado somente com coágulo sanguíneo submetido à imuno-histoquímica para expressão de angiogênese. Positividade com marcação bem definida nos terços cervical (A), médio (B), e apical (C). Positividade com marcação difusa nos terços cervical (D), médio (E), e apical (F). Negatividade nos terços médio (G), e apical (H)90
- Figura 5.9 – Fotomicrografia do canal méso vestibular tratado com coágulo sanguíneo adicionado de VEGF submetido à imuno-histoquímica para expressão de angiogênese. Positividade com marcação bem definida nos terços cervical (A), médio (B), e apical (C). Positividade com marcação difusa nos terços cervical (D), médio (E), e apical (F). Negatividade nos terços cervical (G), médio (H), e apical (I)91
- Figura 5.10 – Fotomicrografia do corte transversal do segundo molar superior hígido sem tratamento. Em (A) e (B) negatividade da expressão imuno-histoquímica. Em (C) e (D) coloração em HE com tecido pulpar com características normais e vasos funcionais preenchidos com sangue. Note camada de odontoblastos presente na zona periférica da polpa (setas)92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
COX-2	ciclo-oxigenase 2
ELISA	ensaio imuno-sorbente linkado á enzima
FGF2	fator de crescimento de fibroblasto 2
bFGF	fator de crescimento de fibroblasto básico
PDGF	fator de crescimento derivado de plaqueta
VEGF	fator de crescimento endotelial
TG-VEGF	fator de crescimento endotelial em transglutamato
EGF	fator de crescimento epidérmico
NGF	fator de crescimento nervoso
P1GF	fator de crescimento placentário
TGF β 1	fator de crescimento transformante β 1
RUNX-2	fator de transcrição 2 relacionado ao Runt
TNF- α	fator necrótico tumoral α
BAP	fosfatase alcalina óssea
G	grama
HE	Hematoxilina e Eosina
IL-1 α	interleucina-1 α
HLA-1	leucócito antígeno humano 1
LPS	lipopolissacarídeo
μ g	micrograma
μ L	microlitro
mL	mililitro
mm	milímetros
HEMA	monômero de metacrilato hidroxetil-2
M	molar
Ng	nanograma

ng/mL	nanograma por mililitro
NP	neurofilina
PRP	Plasma rico em plaquetas
DMP-1	proteína de matriz dentinária 1
BMP-7	proteína da matriz óssea 7
mRNA	RNA mensageiro
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa
VEGFR	receptor de fator de crescimento endotelial
DSP	sialoproteína dentinária
BSP	sialoproteína óssea
PBS	tampão fosfato salino
MTA	trióxido agregado mineral

LISTA DE SÍMBOLOS

°C graus Celsius

% por cento

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 REVASCULARIZAÇÃO PULPAR	18
2.2 BIOENGENHARIA TECIDUAL EM ENDODONTIA	37
2.3 DESCOBERTA DO VEGF E SUA RELAÇÃO COM A ENDODONTIA	59
2.4 ATENÇÃO METODOLÓGICA.....	70
3 PROPOSIÇÃO	72
4 MATERIAL E MÉTODOS	73
4.1 PREPARO DOS ANIMAIS	73
4.2 PREPARO ENDODÔNTICO	74
4.3 PREPARO DO VEGF	76
4.4 DIVISÃO DOS GRUPOS.....	77
4.5 PÓS OPERATÓRIO	78
4.6 AQUISIÇÃO DOS CORTES.....	78
4.6.1 Fixação	78
4.6.2 Parafinização	79
4.6.3 Inclusão.....	79
4.7 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO	80
4.7.1 Coloração por HE	80
4.7.2 Imuno-histoquímica	80
4.8 ANÁLISE DAS AMOSTRAS.....	82
5 RESULTADOS.....	83
5.1 ANÁLISE MORFOLÓGICA	83
5.2 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	89
6 DISCUSSÃO	93
7 CONCLUSÃO	102
REFERÊNCIAS.....	103
ANEXOS	117

1 INTRODUÇÃO

Os princípios norteadores da Endodontia estão baseados na limpeza e assepsia do sistema de canais radiculares, e a posterior manutenção deste quadro através da modelagem e selamento / obturação. Embora o índice de sucesso do tratamento endodôntico seja alto, o insucesso pode se apresentar por particularidades científicas ainda inexploradas relacionadas à presença bacteriana e/ou complexidade imunológica do hospedeiro. A abordagem, chamada de Odontologia biológica e regenerativa, é um dos campos de investigação que prometem mudar os atuais paradigmas baseando-se na bioengenharia tecidual, pois objetiva tratamentos mais biológicos e menos invasivos. Neste particular, dentre as especialidades odontológicas, a Endodontia está incluída entre as que mais têm se destacado nesta área.

Um ponto de destaque em procedimentos da Endodontia Biológica é a neoformação tecidual na câmara pulpar, que dentre seus diversos protocolos, destaca-se a utilização de coágulo sanguíneo intracanal. Contudo, a maioria dos experimentos relatados a este tratamento, é destinada a dentes traumatizados com ápice aberto. Desta forma, esta abordagem terapêutica focando o ápice formado é pouco explorada, exigindo uma maior atenção por parte dos investigadores. Dado a esta grande relevância, esta condição passa a ser tema do presente ensaio.

Para a formação tecidual, a bioengenharia se define, por conceito, através da tríade: células – arcabouço – fatores de crescimento / moléculas sinalizadoras. No entanto, é importante lembrar que a vascularização é imprescindível para que todo o processo de crescimento tecidual se desenvolva. Desta forma, a angiogênese pode ser considerada como o ponto primordial na neoformação de tecidos. Neste aspecto, desenvolvimento de estudos no sentido de sugerir uma terapia que permita a formação vascular em uma câmara pulpar vazia é fundamental, para que as células recebam nutrientes necessários para sua proliferação e diferenciação, objetivando a estrutura do futuro tecido.

Dentre diversos fatores de crescimento existentes, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) tem sido apontado como um dos principais envolvidos no processo de angiogênese. Além disso, promove aumento de proliferação e diferenciação celular, possui quimiotaxia a células endoteliais e células homing, fato

de extrema importância diante de quadros livres de células, como ocorre em dentes despolpados.

Diante do exposto, sugerem-se estudos envolvendo VEGF associado ao coágulo sanguíneo observando a possibilidade de potencialização das chances de uma possível revascularização na câmara pulpar vazia em dentes com apicigênese completa.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A neoformação tecidual em Endodontia tem sido um tema vasto e complexo que se divide em estudos com propostas diferentes. Claro que não são fatos desvinculados, mesmo porque, num dado momento a interpretação destes novos dados e esclarecimento de hipóteses testadas se encontram e se complementam. Para melhor compreensão dos assuntos relacionados ao presente estudo, a revisão da literatura foi dividida em quatro partes: num primeiro momento revisamos a trajetória dos trabalhos relacionados à neoformação tecidual titulada por “revascularização pulpar”, na sequência, foi apresentado ensaios em torno dos conceitos da bioengenharia tecidual aplicada à Endodontia, e então, uma revisão mais específica do VEGF e sua relação com a Endodontia. Por fim, um último tópico foi aberto, dado a alguns pontos importantes relacionados à metodologia empregada no presente estudo.

2.1 REVASCULARIZAÇÃO PULPAR

O termo revascularização tem sido utilizado para definir o procedimento clínico realizado em dentes com necrose pulpar e ápice aberto, cuja finalidade é revitalizar o espaço do canal radicular com um tecido capaz de promover a formação apical e aumentar a espessura da parede dentinária. Embora este tratamento tenha sido amplamente destacado e pareça algo extremamente recente, relatos sobre o protocolo deste tratamento já era descrito por Nygaard-Östby (1961), quando observando a importância do sangue e do coágulo sanguíneo em reparações de fraturas ósseas, questionou o porquê estes elementos eram vistos de forma negativa sobre o tratamento endodôntico. O autor propôs avaliar o comportamento dos tecidos periapicais em canais despolpados e preenchidos apicalmente com sangue. Primeiramente, dentes de cães foram extraídos para apicectomia, sendo então reimplantados, abertos para remoção da polpa, e obturados somente no terço cervical. Os animais foram sacrificados em períodos de 42 a 1019 dias, e os espécimes removidos para processamento histológico. Paralelamente, pacientes

humanos com idades entre 21 a 42 anos, portadores de condições endodônticas diversas – polpa clinicamente intacta, pulpite crônica aberta, necrose parcial, necrose pulpar com radiolusclência periapical – tiveram o canal acessado para a remoção de tecido pulpar ou necrótico com limas e substâncias químicas, e então, obturados no terço cervical após sangramento do periápice para o canal (ampliação foraminal sem sobreinstrumentação). Canais com polpa vital foi feito em única sessão, e com polpa necrosada foi realizado em múltiplas sessões utilizando medicação intracanal com formaldeído 4%. A região apical foi removida cirurgicamente ou o dente extraído em períodos variáveis de 13 dias a 3 anos e meio para processamento histológico. Os resultados apresentaram quadros semelhantes em ambos os modelos experimentais, independente da condição endodôntica dos pacientes humanos. Todos os casos apresentaram formação de de tecido conjuntivo denso. A análise em função do tempo demonstrou que a reparação acontece com a reabsorção do coágulo sanguíneo, sendo substituído por tecido de granulação, e posterior deposição de fibras, e que este processo acontece gradativamente do forame apical para o sentido da obturação. Foi comum a presença de reabsorção radicular com intensa resposta inflamatória nos tempos iniciais, porém esta reabsorção tendeu a cessar, e foi reparada por deposição de tecido semelhante ao cimento. Cimento também foi depositado nas paredes do canal e no forame apical. Sugeriu-se que o coágulo de sangue no canal radicular não é proveniente de fonte sanguínea, e sim do tecido de granulação do periápice. Assim, o autor enfatiza que não teve intenção de estabelecer um novo protocolo endodôntico, mas modificar alguns princípios rígidos de tratamento.

Diante a deposição de tecido mineralizado na região apical, foi proposto o uso de coágulo sanguíneo intracanal na apicificação de dentes com ápice aberto. Assim, Erausquin e Muruzábal (1968) verificaram o crescimento de tecido vital e deposição de tecido mineralizado em dentes de ratos com ápice aberto, obturados totalmente com coágulo sanguíneo após extirpação pulpar. Em sete dias após o tratamento, maior parte dos espécimes já possuía tecido invaginado via forame apical, aos 15 dias observaram-se os primeiros indícios de tecido intracanal calcificado, aos 30 dias os espécimes apresentavam o conduto quase inteiramente preenchido por novo tecido formado por calcificações, e aos 60 dias os canais estavam calcificados.

Nygaard-Östby e Hjortdal (1971) repetiram seu experimento de 1961, em pacientes humanos com idades entre 18 a 44 anos, portadores de pulpite ou polpa

necrótica. Os resultados demonstraram formação de tecido conjuntivo denso com deposição de cemento celular em maior parte dos dentes provenientes de polpa viva; algumas amostras deste grupo apresentaram tecido amorfo sugestivo de restos de fibrina do sangue localizado em meio do tecido neoformado mais cervicalmente. Casos provenientes de polpa necrosada e alguns de polpa viva não resultaram em reparo, demonstrando tecido de granulação ou canal vazio associado à formação de granulomas e cistos. Os autores justificam a falta de reparação nesses casos por coágulo insuficiente no canal radicular, e ação negativa de substâncias químicas nos tecidos periapicais.

Ham et al. (1972) avaliaram 2 protocolos objetivando a apicificação de dentes necrosados. Para isso foram utilizados canais com ápice aberto e periodontite apical induzida em dentes de macacos, que foram irrigados com cloramina T 4% e medicação intracanal com clorofenol canforado. Amostra bacteriana foi coletada após 3 dias, sendo os passos anteriores repetidos até que a cultura fosse negativa para o crescimento bacteriano. Então, dois protocolos distintos foram utilizados para o preenchimento do canal: mistura de hidróxido de cálcio, sulfato de bário e paramonoclorofenol canforado, ou coágulo sanguíneo induzido do periápice. Os animais foram sacrificados após 120, 148, e 165 dias para processamento histológico por HE. Em ambos os grupos foi possível observar deposição de tecido duro semelhante ao cemento nas paredes de dentina e na região apical, no entanto nenhuma das amostras estava com o ápice totalmente completo. Células inflamatórias e restos de hidróxido de cálcio ou fibrinas de coágulo foram observados na região média do tecido conjuntivo formado na luz do canal.

Myers e Fountain (1974) propuseram a regeneração pulpar de dentes com ápice fechado portadores de polpa necrótica e periodontite apical. Os autores utilizaram macacos, cujo forame apical de seus dentes foi ampliado através de sobreinstrumentação e câmara pulpar preenchida com sangue. Após o tempo de até seis meses os grupos experimentais não tiveram diferença significativa com o grupo controle; houve crescimento tecidual intracanal por invaginação em somente 1 mm apical com presença de processo inflamatório severo.

Com a proposta de verificar a revascularização de dentes reimplantados, Skoglung et al. (1978) extraíram dentes unirradiculares com ápice aberto de cães e depois de 10 minutos reimplantaram em seu local de origem. Sulfato de bário foi injetado pela veia jugular nos tempos experimentais de 1 a 180 dias, e assim, os

animais sacrificados. Após fixação e descalcificação, os espécimes foram submetidos à microradiografia. As imagens revelaram formação progressiva de vasos em função do tempo em todos os espécimes, onde em 1 dia não houve nenhuma imagem sugestiva de vasos, em 4 e 10 dias foi observado micro vasos posicionados em paralelo ao longo eixo do dente, em 30 dias surgiram vasos mais visíveis limitados no terço apical, avançando em todo o espaço pulpar e com ramificações e anastomoses aos 180 dias.

Hørsted e Nygaard-Östby (1978) propuseram analisar o tecido invaginado de dentes obturados aquém do forame apical em humanos. Pacientes com dentes unirradiculares com indicação para extração tiveram a câmara pulpar acessada, a polpa removida, e o canal instrumentado 2 a 4 milímetros aquém do forame apical. Assim, foi induzido o sangramento do periápice para o canal, e assim obturado no limite de instrumentação. Os dentes foram extraídos nos tempos de 2, 6, e 10 meses, e processados para análise histológica em HE. Em 2 meses, a análise microscópica demonstrou presença de tecido conjuntivo levemente inflamado com partículas de dentina próxima à obturação; e em 6 e 10 meses, tecido fibroso bem desenvolvido, rico em células e bem vascularizado. Os autores concluíram que espaço vazio deixado por obturação aquém do forame apical será em curto prazo preenchido por tecido conjuntivo fibroso.

Com a finalidade de caracterizar o tecido intraradicular formado após reimplantação dentária, Skoglung e Tronstad (1981) repetiram seu experimento anterior, porém realizaram o processamento histológico para análise dos espécimes. Aos 30 dias foi possível observar um tecido rico em células e altamente vascularizado estendendo-se até o corno pulpar com diminuição celular e vascular aos 180 dias. Em alguns dentes a polpa de origem sobreviveu mantendo suas características normais com a camada de odontoblastos intacta.

Para analisar a revascularização de dentes reimplantados, Claus et al. (2004) utilizaram dentes com ápice aberto de cães, que foram extraídos e a polpa removida, e então reimplantados, sendo observados por cortes histológicos nos períodos de 7 a 30 dias. As imagens demonstraram progressiva neoformação de tecido conjuntivo altamente vascularizado que foi avançando os terços em direção ápico cervical em função do tempo. Células inflamatórias foram observadas em todos os tempos, havendo inclusive a presença de reabsorção interna e/ou externa em alguns dentes.

Em 2004, Banchs e Trope propõem um protocolo de tratamento de dentes com apicigênese incompleta e portadores de periodontite apical visando à revascularização. Para os autores, a limpeza deverá ser realizada com farta irrigação com hipoclorito de sódio 5,25% e medicado intracanal com pasta tri antibiótica composta de ciprofloxacina, metronidazol e aminociclina, sendo posteriormente fechado definitivamente com sangue coagulado proveniente de estimulação periapical. Desde esta data, este protocolo tem sido considerado padrão para os casos que se propõem a revascularização.

Chueh e Huang (2006) apresentaram 4 casos de dentes com ápice aberto portadores de periodontite periapical que foram tratados através de irrigação com hipoclorito de sódio 2,5% seguida de medição intracanal com hidróxido de cálcio. Todos os casos apresentaram reparação óssea da lesão e formação apical no período entre 7 meses a 5 anos após o tratamento.

Thibodeau et al. (2007) avaliaram a utilização adicional de colágeno tipo I ao coágulo sanguíneo no tratamento de revascularização de canais com ápice aberto e periodontite apical induzida em dentes de cães. Após irrigação com hipoclorito de sódio 1,25% e medicação intracanal com pasta tri antibiótica por 4 semanas, os dentes foram reabertos, novamente irrigados e selados de acordo com a divisão dos grupos: grupo 1, canal vazio com barreira cervical de MTA; grupo 2 selado com coágulo de sangue estimulado do periápice; grupo 3 selado com solução de colágeno tipo I; grupo 4 selado com solução de colágeno tipo I + coágulo sanguíneo. Análises radiográfica e histológica foram realizadas, e demonstraram maior fechamento apical no grupo 2 do que no grupo 1; ausência de imagem radiolúcida periapical e presença de tecido vital não apresentaram diferença entre os grupos.

Cotti et al. (2008) descreveram um caso de um incisivo central traumatizado com ápice aberto portador de periodontite apical e fístula submetido à revascularização. O canal foi irrigado com hipoclorito de sódio 5,25% e peróxido de hidrogênio 3%, seguido de medicação intracanal com hidróxido de cálcio somente no terço cervical. Após 15 dias, a medicação foi removida através de irrigação com hipoclorito de sódio 5,25%, sangramento foi estimulado para preenchimento do canal com coágulo sanguíneo, e uma barreira cervical com MTA foi realizada. Barreira coronária calcificada, aumento progressivo de parede dentinária e fechamento apical foram observados 8 meses após o tratamento.

Jung et al. (2008) apresentaram uma série de 9 casos clínicos, porém 5 destes casos foram selados com MTA sobre possível tecido vital intracanal, e os demais 4 casos fechados com coágulo. Todos os casos se apresentaram assintomáticos, sem periodontite apical aparente, acompanhado de fechamento apical, aumento de espessura da parede dentinária e comprimento radicular, no controle de 5 anos.

Shah et al. (2008) apresentaram 14 casos de dentes anteriores com polpa necrosada e ápice aberto que foram tratados através de irrigação com hipoclorito de sódio 2,5% e peróxido de hidrogênio 3% seguido de medicação intracanal com formocresol embebido em bolinha de algodão. Dentes apresentando drenagem purulenta via canal foram deixados abertos no período de 24 - 48 horas. Numa segunda sessão, a irrigação foi novamente realizada e sangramento do tecido periapical foi induzido para o canal, sendo então selado com ionômero de vidro. O controle radiográfico foi realizado trimestralmente no período de até 3 anos e meio. Na maior parte dos casos foi observado o estreitamento da ampla abertura apical; o espessamento da parede dentinária lateral foi observada em 57% dos casos.

Reynolds et al. (2009) descreveram um caso de dens invaginaus bilateral de segundos pré-molares inferiores com ápice aberto, fístula e periodontite apical. Os dentes foram submetidos à irrigação com hipoclorito de sódio 6%, seguido de solução salina e gluconato de clorexidina 2%. Pasta tri antibiótica foi utilizada como medicação intracanal e, sangramento apical induzido foi realizado para o preenchimento do canal radicular com selamento cervical com MTA após desaparecimento de sinais e sintomas. Evidência radiográfica de reparação óssea perirradicular e significativo desenvolvimento radicular foram observados no controle de 18 meses após o tratamento.

Ding et al. (2009) apresentaram 12 casos de dentes com ápice aberto e polpa necrosada submetido ao protocolo convencional de revascularização. Seis pacientes foram excluídos do estudo devido sintomatologia dolorosa após a medicação ou falha do sangramento apical, outros 3 paciente não retornaram ao controle radiográfico. Os 3 pacientes remanescentes apresentaram completo desenvolvimento radicular com fechamento apical e resposta positiva ao teste elétrico de sensibilidade pulpar no período de 12 – 15 meses após o tratamento.

Bose et al. (2009) realizaram um estudo clínico retrospectivo para avaliar os resultados radiográficos obtidos em casos de regeneração endodôntica em dentes

com ápice aberto e polpa necrosada utilizando diferentes protocolos de tratamento – pasta tri antibiótica, hidróxido de cálcio e formocresol. Apicificação com MTA e tratamento endodôntico convencional foram utilizados como grupo controle. A avaliação demonstrou que os tratamentos realizados com pasta tri antibiótica ou hidróxido de cálcio resultam em maior comprimento radicular que dentes tratados convencionalmente ou por apicificação com MTA. A pasta tri antibiótica produziu maior espessamento de parede dentinária que o hidróxido de cálcio ou formocresol. O hidróxido de cálcio colocado somente no terço cervical produziu melhores resultados do que utilizado além do limite do terço coronário radicular. Os autores concluíram que a pasta tri antibiótica ou o hidróxido de cálcio utilizado como medicação intracanal podem ajudar a promover o desenvolvimento com complexo dentino pulpar em casos de ápice aberto e polpa necrosada.

Shin et al. (2009) descreveram um caso de um dente com ápice aberto diagnosticado como necrose pulpar e que foi indicado a apicificação com hidróxido de cálcio. Durante a exploração do conduto, notou-se se tratar de uma necrose parcial devido à presença de tecido vital em parte do canal. Diante disto, optou-se pelo tratamento de revascularização em sessão única. O dente foi irrigado com hipoclorito de sódio 6% seguido de clorexidina 2% deixada por 5 minutos. Nenhuma instrumentação foi feita, o terço cervical foi preenchido com MTA, e o restante do canal deixado vazio. Fechamento apical foi observado no controle radiográfico de 13 meses.

Com a proposta de caracterizar o tecido intracanal formado na revascularização, Wang et al. (2010) utilizaram dos dentes de cães tratados no estudo de Thibodeau et al. (2007), que foram processados para análise histopatológica com coloração de HE. De todas as amostras, 43,9% criaram tecido duro e 29,3% tecido vital, o restante não desenvolveu nenhum tecido no canal radicular. O tecido intrapulpar foi caracterizado pela presença de odontoblastos de forma desorganizada, ligamento periodontal, pontos calcificados semelhantes a células ósseas e tecido inflamado altamente vascularizado. Aumento de espessura de parede dentinária e comprimento radicular foram presenciados devido à invaginação e/ou deposição de tecido calcificado semelhante ao cimento.

Kvinnsland et al. (2010) relataram um caso de dente traumatizado com ápice aberto e polpa vital que foi diagnosticado erroneamente portador de polpa necrosada. Após diagnóstico, o canal foi aberto e notado a presença de tecido vital,

sendo então, instrumentado até a lima K100 sob irrigação com hipoclorito de sódio 0,5%. Devido ao alto sangramento, hidróxido de cálcio foi colocado somente no terço cervical do dente. Quatro meses após o tratamento, foi observado continuação da formação radicular com espessamento da parede dentinária, além de uma barreira calcificada no terço cervical do canal. Formação radicular continuada e ápice fechado foram constatados em 15 meses.

Petrino et al. (2010) descreveram algumas dicas importantes baseadas na descrição de 3 casos de dentes com ápice aberto e polpa necrosada (2 dentes por caso) submetidos ao tratamento de revascularização convencional. O primeiro caso descrito foi de um garoto com 13 anos de idade, que apresentou dificuldade na indução de sangramento periapical para a formação de coágulo. Sangramento suficiente só foi conseguido na terceira sessão, quando foi abortado o uso de anestesia local com vasoconstritor. O segundo caso foi de um garoto de 11 anos de idade que apresentou dificuldade na inserção de MTA sobre o coágulo sanguíneo. Uma membrana de colágeno reabsorvível (CollaTape) foi utilizada sobre o coágulo para melhor estabilidade e controle do tampão cervical de MTA. O terceiro caso, foi uma garota de 6 anos de idade que foi submetida às propostas dos 2 casos anteriores: uso de anestésico sem vasoconstritor e uso de uma membrana de colágeno reabsorvível sob o MTA. Neste caso, foi utilizada uma membrana (CollaTampão) de manipulação mais fácil. Para todos os dentes tratados houve reparação óssea periapical; destes dentes, três apresentaram desenvolvimento radicular continuado e dois apresentaram formação de barreira apical. Somente um caso não apresentou mudança nas condições de formação radicular. Os autores afirmam que a revascularização pode ser aplicada na formação continuada de dentes com ápice aberto, porém alguns detalhes devem ser observados como o uso a anestesia sem vasoconstritor e o uso de um material para melhor controle de inserção do MTA.

Da Silva et al. (2010) avaliaram diferentes protocolos de desinfecção do sistema de canais radiculares de dentes de cães com ápice aberto e periodontite apical induzida submetidos à revascularização pulpar. No grupo 1 foi utilizada irrigação com pressão apical negativa (EndoVac); e no grupo 2 irrigação positiva convencional seguida de medicação intracanal com pasta tri antibiótica. Ambas as substâncias irrigantes foram o hipoclorito de sódio 2,5%. Os animais foram sacrificados depois de 90 dias, e as amostras fixadas, parafinizadas, seccionadas e

processadas para coloração de HE e Tricome de Mallory. A análise demonstrou formação tecidual progressivo por terços, onde a pressão negativa resultou em maior formação mineralizada, tecido conjuntivo periapical organizado, e maior avanço da reparação óssea periapical. Os autores concluem que a irrigação com pressão negativa pode ser considerada um protocolo de desinfecção promissora utilizado na revascularização, sugerindo que o uso da medicação intracanal antibiótica não é necessária.

Iwaya et al. (2011) reportaram um caso de incisivo central inferior com ápice aberto e periodontite apical que foi submetido ao protocolo de revascularização após luxação. A irrigação foi realizada com hipoclorito de sódio 5% e peróxido de hidrogênio 3%, e medicação intracanal com hidróxido de cálcio. Na quinta visita foi visualizada a formação de um tecido vital dentro do canal, que foi preenchido com uma pasta de hidróxido de cálcio + iodofórmio. Resposta positiva ao teste elétrico e ponte dentinária estava formada 13 meses após a medicação. O controle de 30 meses apresentou ápice fechado e espessamento da parede dentinária.

Torabinejad e Turman (2011) propuseram a substituição de coágulo sanguíneo por plasma rico em plaquetas (PRP), onde através do relato de um caso clínico apresentaram reparação de periodontite apical, desenvolvimento radicular continuado com fechamento apical e resposta positiva ao teste de sensibilidade pulpar. Os autores afirmaram que o PRP pode ser um arcabouço ideal substituto do sangramento induzido.

Yamauchi et al. (2011a) propuseram algumas estratégias para melhores resultados do protocolo de revascularização pulpar. Os autores utilizaram 64 canais com ápice aberto e periodontite apical induzida em dentes de cães. Após irrigação com hipoclorito de sódio 2,5% e medicação intracanal com pasta tri antibiótica, em 14 dias os canais foram preenchidos utilizando diferentes protocolos: no grupo 1 foi utilizado coágulo sanguíneo da estimulação de sangramento periapical; no grupo 2, EDTA 17% foi utilizado por 2 minutos antes do preenchimento com coágulo; no grupo 3, foi inserida uma esponja de colágeno tipo I ao sangue estimulado da região periapical; no grupo 4, EDTA 17% foi utilizado antes da inserção da esponja de colágeno ao sangue do canal. Após 105 dias, os dentes foram radiografados, e os animais sacrificados para análise histológica por HE. A respeito da análise radiográfica quanto à presença/ausência de radiolusência periapical e espessamento da parede dentinária, melhores resultados foram obtidos nos grupos

em que utilizara a esponja de colágeno. Em todos os grupos foi observado tecido mineralizado semelhante ao osso depositado nas paredes do canal e em ilhotas no tecido conectivo na luz do canal, no entanto, maior deposição na parede dentinária e fechamento apical foi observado nos grupos que utilizaram esponja de colágeno. Maior conexão do tecido mineralizado formado e a dentina pré-existente ocorreu nos grupos tratados com EDTA 17%. Sugeriu-se que tecidos mineralizados de diferentes composições foram formados pela terapia de revascularização. Os autores concluíram que o uso de esponja de colágeno e exposição da matriz dentinária por EDTA 17% proporcionam melhores resultados na revascularização de dentes com ápice aberto.

Nosrat et al. (2011) propuseram a uma mistura enriquecida de cálcio em alternativa ao MTA. Os autores descreveram 2 casos clínicos de dentes com ápice aberto e polpa necrosada submetidos ao protocolo de revascularização padrão, sendo colocado sobre o coágulo uma mistura enriquecida de cálcio. Ambos os casos apresentaram reparação óssea apical e desenvolvimento radicular continuado no controle de 15 meses.

Scarparo et al. (2011), buscando um modelo experimental animal para o estudo de regeneração pulpar, observaram a o tratamento de periodontite apical e fechamento radicular em molares de ratos. Canais com ápice aberto e periodontite apical induzida foram submetidos à irrigação com hipoclorito de sódio 2,5% e medicação intracanal com pasta tri antibiótica. Assim, os dentes foram radiografados e os animais foram sacrificados nos tempos experimentais de 3, 6, e 9 semanas para processamento histopatológico. Os resultados demonstraram redução da periodontite apical e aumento do comprimento radicular no tempo de seis semanas. Deposição de tecido mineralizado semelhante ao cimento na região apical e superfície externa da raiz foram vistas através dos cortes histológicos. Os autores concluíram que o protocolo utilizado é capaz de reduzir a periodontite apical, e que o modelo animal em ratos poderá ser utilizado para melhoria das estratégias terapêuticas em Endodontia.

Cehreli et al. (2011) apresentaram 6 casos de molares com ápice e aberto e periodontite apical submetidos ao protocolo de revascularização utilizando hidróxido de cálcio como medicação intracanal entre sessões. Todos os dentes apresentaram evidência radiográfica de reparação periapical, com progressivo espessamento da parede dentinária e desenvolvimento apical continuado no período de 10 meses.

Frente à hipótese de dois tipos de tecidos mineralizados provenientes da terapia de revascularização, Yamauchi et al. (2011b) submeteram as amostras de seu estudo anterior à análise histoquímica com picrossírius (visualização das fibras colágenas) e imuno-histoquímica com anti- BSP e DSP (expressão de proteínas não colágenas do osso e dentina, respectivamente, associadas ao processo de mineralização). A análise histoquímica demonstrou que o tecido duro formado junto à parede dentinária apresentava uma matriz colágena não maturada e com direção não ordenada, diferindo da dentina que possuía matriz colágena desenvolvida e de forma ordenada. As ilhotas de tecido duro em meio do tecido conectivo tinha muita semelhança ao osso. Expressão positiva de DSP foi observada na dentina e no tecido mineralizado formado próximo da dentina. Expressão positiva de BSP foi observada nas ilhotas de tecido mineralizado, na matriz do osso alveolar e ligamento periodontal. Os autores concluíram que tecido mineralizado formado no canal são diferente e possuem características distintas.

Com base em 20 casos clínicos de dentes com ápice aberto e periodontite apical submetidos ao protocolo de revascularização, Chen et al. (2012) afirmaram que este tratamento pode resultar em 5 diferentes resultados: 1 – espessamento da parede dentinária e maturação radicular continuada; 2 – desenvolvimento radicular insignificante, porém com ápice fechado; 3 – desenvolvimento radicular continuada com forame apical aberto; 4 – severa calcificação do canal radicular; 5 – barreira de tecido duro formado entre o tampão cervical de MTA e o ápice radicular.

Scarparo et al. (2012) avaliaram a formação de tecido intracanal e desenvolvimento radicular em dentes imaturos de ratos selados com pasta tri antibiótica ou derivado de matriz dentinária (Emdogain). Em três semanas, somente o grupo utilizando pasta tri antibiótica apresentou aumento radicular diferente do grupo controle. Em seis semanas ambos os grupos apresentaram redução de lesão periapical, aumento radicular com formação de tecido duro no interior do conduto.

Kim et al. (2012) reportaram o acompanhamento prolongado de 3 casos de dentes submetidos ao protocolo convencional de revascularização. O acompanhamento de 24, 48 e 42 meses apresentavam ausência de sinais e sintomas, e sucesso da terapia com reparação óssea periapical e aumento da parede dentinária.

Torabinejad e Faras (2012) descreveram a análise histológica pulpar do mesmo caso reportado em 2011. Por solicitação do responsável pelo paciente, o

tratamento endodôntico convencional foi realizado 14 meses após tratamento inicial devido ao quadro clínico diagnosticado como pulpite reversível. O tecido pulpar removido foi analisado e observou-se presença de fibroblastos, tecido conectivo celular fibroso e vasos sanguíneos, porém odontoblastos não foram encontrados.

Shimizu et al. (2012) realizaram a análise histopatológica de um paciente com dente apresentando pulpite irreversível e ápice aberto submetido anteriormente ao tratamento de revascularização. Após 3 semanas e meia da aplicação do protocolo de revascularização, o canal analisado apresentou grande parte de preenchimento com tecido conjuntivo semelhante à polpa dentária com presença de pré dentina e camada odontoblástica. Nenhum tecido calcificado foi formado no canal, sendo possível observar células epiteliais ao redor do ápice.

Jeeruphan et al. (2012) realizaram um estudo retrospectivo através de análise radiográfica de 61 casos clínicos para comparar três tipos de tratamento de dentes com ápice aberto: apicificação com hidróxido de cálcio ou MTA e terapia de revascularização com coágulo sanguíneo. O protocolo de revascularização exibiu maiores taxas de aumento do comprimento radicular e espessamento da parede dentinária.

Martin et al. (2013) descreveram um caso de um molar inferior com ápice aberto e lesão periapical que foi submetido a dois protocolos de revascularização e depois processado para análise histológica. Os canais foram acessados e instrumentados com limas manuais com uso de hipoclorito de sódio 5,25%. Pasta tri antibiótica foi utilizada como medicação intracanal, e após 5 meses foi induzido sangramento do periápice para os canais radiculares. Os canais mesiais foram mantidos somente com coágulo, e o canal distal foi adicionado PRP autólogo, sendo assim selados separadamente com MTA. Progressão de reparação periapical foi observada nos controles de 7 e 14 meses após tratamento. Em 2 anos e 1 mês o canal distal parecia estar obliterado e os mesiais com tamanho reduzido pelo espessamento da parede dentinária, no entanto devido fratura coronária severa o dente foi extraído e processado para análise histológica pela coloração de HE. Em ambos os canais foram observados tecido cementóide/osteóide e tecido conectivo fibroso não inflamado. Tecido parecido com polpa dentária apresentando odontoblastos não foi encontrado.

Yang et al. (2013) reportaram um caso de revascularização de um dens invaginatus com ápice aberto e periodontite apical. Após irrigação dos canais com

hipoclorito de sódio 5,25%, medicação intracanal com pasta tri antibiótico foi inserida e deixada por uma semana. Após 4 sessões de troca da medicação, o canal secundário foi obturado com Guttaflow, o canal principal preenchido com coágulo de sangue induzido do periápice, e o dente selado com ionômero de vidro. Após 24 meses, a o exame tomográfico apresentou reparação da lesão periapical, o ápice estava fechado e a parede dentinária mais espessa.

Soares et al. (2013) propuseram o uso de hidróxido de cálcio e clorexidina gel 2% no protocolo de revascularização pulpar. Os autores apresentaram um caso de um incisivo central superior traumatizado com ápice aberto e necrose pulpar que foi instrumentado nos terços cervical e médio com limas manuais utilizando clorexidina 2% gel. O dente foi fechado com medicação intracanal de hidróxido de cálcio + clorexidina 2% gel, e após 21 dias o canal foi irrigado com EDTA 17% seguido de estimulação de sangramento periapical para o canal e selamento com MTA. O controle tomográfico demonstrou diminuição da câmara pulpar ao devido espessamento da parede dentinária e fechamento apical sem presença de calcificação completa do canal no período de 2 anos após o tratamento.

A ampla abertura apical tem sido um dos pré-requisitos para a formação de tecido intracanal. Laureys et al. (2013) questionaram a ampliação mínima de 1 milímetro do forame apical. Assim, os autores fizeram a apicectomia de 15 dentes anteriores extraídos de cães, deixando o forame apical dos dentes com diâmetros variados (0,24 – 1,09 mm), e assim reimplantados em seu lugar de origem. Os animais foram sacrificados depois de 90 dias, e as amostras fixadas e processadas histologicamente para a coloração de HE. Todos os espécimes apresentaram formação de tecido intracanal em ao menos um terço do canal radicular, independente do diâmetro apical. As 6 amostras que apresentaram tecido vital em toda a câmara pulpar possuía diâmetro entre 0,32 a 0,65 mm. Os autores concluíram que diâmetros menos do que 1 mm não impede a revascularização e crescimento tecidual intracanal.

Forghani et al. (2013) relatou um caso de fratura coronária de dois incisivos centrais com relato prévio de trauma. O incisivo esquerdo estava vital com uma pequena exposição pulpar, e o incisivo direito apresentou polpa necrosada com periodontite apical. Ambos os dentes apresentavam-se com ápice aberto, assim, foi estabelecido tratamento de capeamento pulpar com MTA no incisivo esquerdo e revascularização utilizando protocolo padrão no incisivo direito. O controle

radiográfico de 18 meses apresentou aumento do comprimento radicular e fechamento apical em ambos os dentes, porém o dente submetido ao capeamento direto apresentou maior espessamento da parede dentinária.

Tawfik et al. (2013) induziram periodontite apical em 216 canais de cães com ápice aberto, e submeteram ao protocolo de revascularização variando o preenchimento final destes canais: barreira apical com MTA, coágulo sanguíneo + selamento cervical com MTA, e coágulo sanguíneo adicionado de fator de crescimento de fibroblasto associado a hidrogel, barreira cervical com MTA + canal vazio. Os dentes foram radiografados e os animais sacrificados nos tempos experimentais de 7, 21, e 90 dias para processamento histopatológico corado por HE. Aumento do comprimento radicular, espessura da parede dentinária e fechamento apical foram observados nos grupos utilizando coágulo com e sem fator de crescimento somente no tempo experimental de 90 dias. Análise histopatológica revelou aumento de células inflamatórias na região periapical no dente fechado vazio somente com barreira cervical de MTA nos tempos de 21 e 90 dias. Crescimento de tecido conectivo semelhante ao ligamento periodontal foi observado nos canais fechados com coágulo sanguíneo com ou sem fator de crescimento em 21 e 90 dias com diferença significativa aos canais fechados vazios ou com barreira apical de MTA. Formação de tecido duro semelhante ao cimento foi observado aos 21 dias em todos nos canais, porém maior quantidade foi apresentada nos dentes com barreira apical de MTA. Aos 90 dias, a formação de tecido furo foi semelhante nos dentes fechado com barreira apical de MTA e com coágulo sanguíneo com ou sem fator de crescimento; dentes fechado vazio com barreira cervical de MTA apresentaram menor deposição de tecido duro neste tempo experimental. Os autores concluíram que o coágulo sanguíneo reflete em bons resultados na revascularização pulpar, no entanto, a adição de fatores de crescimento de fibroblasto não produz resultados mais significantes.

Jarhav et al. (2013) descreveram três casos clínicos de incisivos centrais bilateralmente com ápice aberto e portador de periodontite apical tratados com ou sem uso de plasma rico em plaquetas (PRP). Os dentes foram abertos, levemente instrumentados, irrigados com hipoclorito de sódio 2,5%, e utilizada medicação intracanal com pasta tri antibiótica. Após 4 semanas, o canal foi reaberto, e estimulado o sangramento apical para o canal radicular. Um dente foi deixado somente com coágulo, e o outro foi adicionado plasma rico em plaquetas preparado

na hora através centrifugação de sangue coletado do paciente. Ambos os dentes foram selados com ionômero de vidro, e acompanhados radiograficamente. Ambos os grupos apresentaram espessamento de parede dentinária, fechamento apical e reparação óssea no controle de 6 e 12 meses. No entanto melhores resultados foram observados com o uso do PRP.

Keswani e Pandey (2013) sugeriram a substituição do coágulo sanguíneo pela fibrina rica em plaquetas no protocolo convencional de revascularização. Os autores apresentaram um caso clínico de um incisivo central superior com ápice aberto e portador de lesão periapical submetido a este protocolo proposto. O controle radiográfico de 12 e 15 meses apresentou espessamento da parede dentinária, aumento do comprimento radicular e fechamento apical.

Becerra et al. (2014) descreveram um caso de um pré-molar inferior submetido previamente ao protocolo de revascularização padrão, e que teve de ser extraído devido tratamento ortodôntico. No controle de 2 anos da revascularização, o dente foi fixado e processado para análise histológica por HE. As imagens demonstraram presença de tecido conectivo fibroso com formação deposição de tecido duro semelhante ao cimento na parede dentinária. Células inflamatórias foram observadas no terço coronário e médio da raiz. Os autores concluíram que o tecido formado neste caso clínico foi bem semelhante aos estudos encontrados na literatura com modelo animal.

Diante de uma série de protocolos propostos para o fechamento apical de dentes com ápice aberto e polpa necrosada, e o uso de um fator de crescimento adicionado ao protocolo convencional de revascularização, Nagy et al. (2014) avaliaram o sucesso clínico de 3 protocolos após irrigação e medicação intracanal: tampão apical de MTA, coágulo sanguíneo + tampão cervical de MTA, fator de crescimento de fibroblasto com hidrogel artificial adicionado ao coágulo sanguíneo + tampão cervical de MTA. Evidência de reparação óssea foi observada em quase todos os casos no controle radiográfico de 18 meses. Aumento progressivo do comprimento radicular e espessamento da parede dentinária foram observados no grupo do coágulo com ou sem fator de crescimento, sem diferença significativa entre eles.

Shiehazadeh et al. (2014) propuseram o uso de células-tronco associado ao arcabouço de ácido polilático de polietileno-glicol-poliglicólico nos casos de revascularização pulpar. Os autores descrevem três casos clínicos em que os

dentes com ápice aberto e lesão periapical presente foram tratados através de irrigação com hipoclorito de sódio 5,25%, preenchido com arcabouço + células-tronco nos 5 milímetros apicais, e selados com ionômero de vidro. As células-tronco foram coletadas 5 dias antes do tratamento, e assim, cultivadas e preparadas em laboratório. No caso 1, as células foram coletadas da papila apical do dente a ser tratado com auxílio de um instrumento projetado pelos autores; no caso 2, as células foram coletadas de polpa dental de um dente decíduo; e no caso 3, as células foram coletadas da papila apical de um terceiro molar. Todas as células foram coletadas do próprio paciente receptor. Todos os casos apresentaram desenvolvimento apical e reparação óssea no controle de 3 a 4 meses após o tratamento.

Hargreaves et al. (2014) afirmam que mais de 150 casos clínicos de revascularização pulpar foram publicados em diversas revistas científicas do mundo, e que propõem uma grande variedade de protocolos. Os autores chamam a atenção para a necessidade de um protocolo padrão e de uma pesquisa clínica translacional para que este tratamento seja considerado sucesso a nível prático e populacional. Os objetivos destas pesquisas devem ser muito bem traçados, para estabelecer se o que é importante é o tecido que está sendo formado no canal radicular ou se o tratamento atinge seus objetivos em manter o dente em função na cavidade oral.

Maior parte dos casos de dentes submetidos ao tratamento de revascularização tem sido acompanhada de periodontite apical. Diante da variedade de microrganismos presentes na infecção endodôntica, Nagata et al. (2014) avaliaram a composição microbiológica de dentes com ápice aberto portadores de periodontite apical, e verificaram a redução bacteriana durante o tratamento de revascularização, variando a medicação intracanal. Pasta tri antibiótica foi utilizada no grupo 1, e hidróxido de cálcio + clorexidina 2% no grupo 2. *Actinomyces naeslundii*, *Porphyromonas endodontalis*, *Parvimonas micra*, e *Fusobacterium nucleatum* foram as bactérias mais prevalentes, demonstrando similaridade aos casos de periodontite apical primária. O uso da irrigação com hipoclorito de sódio 6% sem instrumentação proporcionou redução bacteriana significativa em relação à amostragem bacteriana inicial. Complementação da irrigação com clorexidina 2% e as 2 medicações intracanaís testadas foram irrelevantes, já que a maior parte da contaminação já foi eliminada na primeira irrigação.

Johns et al. (2014) propuseram o uso da terapia laser fotodinâmica para a assepsia do canal radicular durante o protocolo de revascularização. Os autores

apresentam um caso de dois incisivos centrais com ápice aberto associado à lesão periapical, no qual foi submetido à irrigação com hipoclorito de sódio 5,25%, seguido da fotoativação em azul de toluidina com laser diodo. Amostra sanguínea do paciente foi coletada para aquisição da fibrina rica em plaqueta, a qual foi levada ao canal radicular. Após condensação da fibrina, um tampão cervical de MTA foi colocado e o acesso coronário selado com cimento provisório e resina composta. No controle de 10 meses, ambos os dentes apresentaram espessamento da parede dentinária, aumento do comprimento radicular, regressão da radiolusência periapical e fechamento apical.

Os pré-ameloblastos são células presentes na odontogênese que participam na diferenciação da papila dentária para a formação de odontoblastos. A partir deste conceito, Yoo et al. (2014) investigaram o uso de um meio condicionado com pré-ameloblastos em canais com ápice aberto e periodontite apical induzida em dentes de cães. Os canais foram irrigados com hipoclorito de sódio 3,5% e medicados intracanal com pasta tri antibiótica por 14 dias, sendo então induzido sangramento periapical para o canal. No grupo experimental, foi inserida junto ao sangue induzido uma esponja de colágeno embebida de meio condicionado com pré-ameloblastos, que foi preparado laboratorialmente a partir de células de camundongos. No grupo controle somente esponja de colágeno foi inserida ao canal com sangue. Os dentes foram radiografados e os animais sacrificados depois de 12 semanas para análise histológica em HE. O espessamento radicular não diferiu entre os grupos, no entanto, o fechamento apical foi maior no grupo utilizando meio condicionado. Tecido semelhante à polpa dentária com abundante suprimento vascular foi significativamente maior no grupo com meio condicionado. O novo tecido mineralizado formado e depositados sobre a superfície de dentina pré-existente apresentou similaridade com tecido ósseo/cementário. Os autores concluíram que o meio condicionado com pré-ameloblastos projetam efeitos favoráveis na revascularização de dentes com ápice aberto e periodontite apical.

Para verificar a taxa de sucesso do protocolo de revascularização, Khademi et al. (2014) utilizaram 36 dentes com ápice aberto de cães, onde no grupo 1, foi induzida periodontite apical e posteriormente realizado o tratamento de revascularização pelo protocolo convencional; e no grupo 2, a polpa foi removida assepticamente e o dente fechado com coágulo sanguíneo. A avaliação radiográfica apresentou resultados semelhantes entre os grupos, porém no tempo de

acompanhamento diferente. No grupo 1, fechamento apical foi observado em 70% e espessamento da parede dentinária em 40% em 6 meses, enquanto que no grupo 2, fechamento apical foi observado em 77% e espessamento da parede dentinária em 44% em 3 meses.

Fiane et al. (2014) realizaram uma análise histológica da polpa após reimplantação em diferentes tempos de dentes humanos extraídos com ápice aberto ou fechado. Vinte e quatro pacientes com idades de 10,2 a 19,7 anos tiveram seus pré-molares em diferentes condições apicais extraídos e reimplantados no local de origem, sendo novamente extraídos em diferentes tempos – 1, 2, 3, 6, 12, e 24 semanas – para processamento histopatológico pela coloração de HE. As imagens nos períodos de 1, 2 e 3 semanas foram bem semelhantes, apresentando perda de vascularização normal, matriz fibrosa irregular, camada de odontoblastos alterada, extravasamento de eritrócitos, presença de reabsorção externa. No tempo de 6 semanas, maior parte dos dentes com ápice fechado apresentavam necrose pulpar com presença de amplos espaços vazios e ausência de vascularização normal; formação de dentina terciária foi destacada em dentes com ápice aberto. No tempo de 12 semanas, todos os dentes com ápice fechado apresentava necrose pulpar; os dentes com ápice aberto apresentava excessiva formação de tecido duro no terço médio e cervical da polpa; áreas de reabsorção externa ainda eram observadas em ambas as condições apicais. Em 24 semanas, formação dentina terciária abundante foi observada nos dentes com ápice aberto, em alguns casos a dentina ocupava todo o espaço pulpar; odontoblastos não foram observados; deposição de cemento pode ser observado nas áreas de reabsorção. Os autores concluíram que a polpa de dentes com ápice aberto tem a capacidade de regenerar e produzir dentina terciária.

Namour e Theys (2014) realizaram uma revisão de literatura acerca dos protocolos de revascularização, e propõem modificações no protocolo convencional. Segundo os autores, irrigação com EDTA 17% antes do hipoclorito de sódio poderia aumentar o poder de desinfecção da substância química e da medicação intracanal nos túbulos dentinários, além disso, poderia proporcionar a liberação de fatores de crescimento presentes na dentina. Ainda, o uso de fibrina rica em plaqueta deveria ser considerado, uma vez que promove adicional suprimento sanguíneo, e também proporciona um arcabouço mais sólido para o desenvolvimento tecidual.

Nagaveni et al. (2015) propuseram a substituição do coágulo sanguíneo por fibrina rica em plaqueta. Assim, os autores descrevem um caso clínico, onde após

todo o protocolo convencional de irrigação e medicação com pasta tri antibiótica, o canal foi preenchido com fibrina rica em plaqueta e restaurado definitivamente. O controle radiográfico de 12 meses apresentou espessamento da parede dentinária, estreitamento do canal radicular, aumento do comprimento radicular e fechamento apical após o período de 12 meses.

Torabinejad et al. (2015) apresentaram uma análise histológica de dentes de furões com ápice aberto e periodontite apical induzida submetidos ao tratamento de revascularização pulpar com 2 tipos de arcabouço. Após lesão induzida, os canais foram irrigados com hipoclorito de sódio 1% e medicados intracanal com pasta tri antibiótica. Após 3 semanas os canais foram novamente abertos, irrigados com EDTA 17%, secos com cones de papel impregnado de Emdogain (derivado contendo proteínas de esmalte dentário) e preenchido com coágulo sanguíneo ou plasma rico em plaqueta. Ambos os grupos receberam tampão cervical de MTA, e selamento coronário com ionômero de vidro. Após 3 meses os animais foram sacrificados, e os espécimes processados para análise histológica em HE. Formação de tecido duro semelhante ao osso e cimento foi observada na região mais apical. Presença de tecido conjuntivo contendo vasos sanguíneos, fibroblastos e células inflamatórias estavam presentes sobre o tecido duro formado apicalmente. Nenhuma diferença estatística foi encontrada entre os grupos.

McCabe (2015) descreveu através de um caso clínico, um protocolo de revascularização em sessão única. O canal de um incisivo central superior foi acessado, então realizada irrigação com hipoclorito de sódio 5% seguida de EDTA 17%. O canal foi preenchido com coágulo sanguíneo e barreira cervical de MTA. Acompanhamento radiográfico de até 1 ano apresentou espessamento progressivo da parede dentinária, aumento do comprimento radicular e fechamento apical.

Assim, pode-se constatar que a revascularização da cavidade pulpar é estudada desde 1961 através da aplicação clínica direta em animais e humanos; e que durante todos esses anos uma variedade de protocolos modificados tem sido proposta. Todavia, o uso de coágulo sanguíneo está predominante, sendo estabelecido como protocolo padrão deste procedimento até os dias atuais na prática clínica.

2.2 BIOENGENARIA TECIDUAL EM ENDODONTIA

O grande interesse e destaque da bioengenharia tecidual aplicada na endodontia surgiram a partir da ideia de regeneração de tecidos do complexo dentinho pulpar perdidos frente a traumas físicos, químicos e/ou bacterianos. Neste particular, a reparação de dentina agredida por cárie foi o destaque inicial neste cenário. Estudando o potencial de osteoindução da dentina, em 1992, Machado realizou uma revisão de literatura e afirmou que a dentina tem capacidade de induzir tecido mineralizado, porém não promove a formação deste tecido, mas de osso e cartilagem; e que esta formação varia de acordo com o método de descalcificação da dentina, o local de implantação, e o animal utilizado. O autor ainda afirmou que o uso de raspas de dentina na obturação do canal radicular parece não interferir no processo de reparação.

Em 1996, Mooney et al. verificaram a possibilidade do desenvolvimento do tecido pulpar a partir de cultivo celular laboratorial. Os autores coletaram e semearam fibroblastos provenientes de polpa dental humana, e os cultivaram numa matriz sintética de polímero biodegradável por 60 dias. A análise através de microscopia eletrônica de varredura apresentou diminuição do volume da matriz sintética com proliferação celular crescente em função do tempo. Cortes corados por HE demonstraram similaridade entre as células cultivadas em polímero com células de polpa adulta normal. Assim, foi concluído que é possível o desenvolvimento laboratorial de tecidos que podem contribuir na engenharia de uma variedade de outros tecidos.

Células capazes em se diferenciar a células específicas de acordo com um estímulo têm sido denominadas células-tronco, e desde a sua descoberta, tem grande destaque na medicina para a recuperação de tecidos danificados do corpo humano. Ruch (1998) afirmou que a proliferação de odontoblastos está relacionada na diferenciação de células progenitoras residentes em algum lugar da polpa dental. Neste conceito, Gronthos et al. (2000) verificaram a hipótese da presença de células-tronco na polpa dentária. Os autores cultivaram células da polpa humana de um terceiro molar para aquisição de uma suspensão de células simples, e posteriormente, semearam em meio osteogênico. Assim foram submetidas à imuno-histoquímica com diversos anticorpos marcadores, e análise da atividade de

fosfatase alcalina e coloração com vermelho de alizarina. Células foram adicionadas a fosfato tricálcio/hidroxiapatita e implantadas no dorso de camundongos imunodeprimidos. A imuno-histoquímica apresentou negatividade para células hematopoiéticas, nervos, cartilagem, gordura, e odontoblastos, e positividade para endotélio, músculo liso, osso e fibroblasto. Atividade de fosfatase alcalina e coloração com vermelho de alizarina foi positiva, indicando a capacidade de diferenciação celular. A análise das células transplantadas e coradas por HE após 6 semanas demonstrou formação de tecido semelhante à dentina com matriz colágena vascularizada e organizada perpendicular à uma camada de odontoblastos. RT-PCR confirmou a equivalência do tecido formado no camundongo ao humano doador. Os autores concluíram que a polpa dental pós-natal contém células que são clonogênicas, altamente proliferativa e capaz de regenerar tecidos, propriedades que as definem como células-tronco.

Buscando caracterizar a auto renovação, capacidade de diferenciação de multi linhagem e eficiência clonogênica, Gronthos et al. (2002) isolaram novamente células-tronco da polpa humana dentária, semearam em meio adipogênico e as implantaram em dorso de camundongos com fosfato tricálcio/hidroxiapatita. Análises através de imuno-histoquímica, histoquímica, microscopia eletrônica de varredura, RT-PCR, hibridização e citometria de fluxo demonstraram que as células foram capazes de criar dentina ectópica associada a tecido semelhante à polpa. A multi diferenciação foi observada pela presença da formação de células adiposas e neurais.

Shi e Gronthos (2003) questionaram a localização das células-tronco no tecido pulpar, logo, os autores coletaram o tecido pulpar de terceiros molares de humanos e analisaram as células-tronco através de imuno-histoquímica. Em seguida, as células foram implantadas em dorso de camundongos com fosfato tricálcio/hidroxiapatita e analisadas por PCR. Os resultados demonstraram que as células-tronco estão localizadas próximo à microvascularização do tecido de origem, e que estas células tiveram positividade ao 3G5, marcador de pericito. Pericitos são células indiferenciadas que servem de suporte para pequenos vasos da circulação sanguínea, logo, suspeita-se que as células-tronco da polpa dental possam ser derivadas de pericitos.

Pensando nas diversas fontes de células-tronco, e o destaque das mesmas provenientes de polpa dental de adultos, Miura et al. (2003) decidiram verificar a

presença e analisar células-tronco em tecido pulpar de dentes decíduos. Células simples foram isoladas de polpas de dentes decíduos extraídos, e incubadas com diversos meios de diferenciação celular. Depois de confirmada a presença de células-tronco multipotente, elas foram adicionadas à hidroxiapatita/ fosfato tricálcico em pó e injetadas em cérebro de camundongos. Os resultados *in vitro* demonstraram que as células isoladas foram capazes de se diferenciarem em células neuronais, adipócitos, fibroblastos e odontoblastos; e no estudo *in vivo* foi possível observar formação óssea, dentinária e sobrevivência celular com expressão de marcadores neuronais. Segundos os autores, com base em estudos anteriores, o poder de proliferação destas células é maior que as células-tronco provenientes da polpa dental adulta e do osso. Assim, concluíram que a polpa de dentes decíduos é uma excelente fonte de células-tronco multipotentes.

Diante de diversas fontes de células troncos encontradas nos tecidos, Batouli et al. (2003) propuseram analisar as diferenças das células tronco provenientes da polpa dental e do osso. Células tronco da polpa dental humana e do osso foram isoladas e semeadas, e então preparadas com pó de hidroxiapatita/ fosfato tricálcico. O composto foi implantado em dorso de ratos no período de até 16 semanas, e processados histologicamente em HE e imuno-histoquímica com anti-DSP. Os resultados demonstraram formação de tecidos distintos relacionados à origem das células-tronco. A partir de 4 semanas, células-tronco do osso promoveram diferenciação osteoblástica e formação de tecido calcificado, com desenvolvimento de medula hematopoiética e tecido conjuntivo em 8 semanas. Em contraste, células-tronco da polpa resultaram em diferenciação odontoblástica em 4 semanas, e tecido semelhante à polpa apresentando tecido conjuntivo fibroso, vasos sanguíneos e odontoblastos em 8 semanas. A expressão de DSP só foi positiva nas células do tecido originado a partir de células-tronco da polpa. Os autores concluíram que a osteogênese e dentinogênese mediados por células-tronco do osso e da polpa dentária respectivamente, podem ser regulados por mecanismos distintos, levando a diferente organização de tecido mineralizado.

Em vista da importância de fatores de crescimento na diferenciação celular, Saito et al. (2004) observaram a ação do BMP-2 sobre as células-tronco da polpa humana. Células-tronco foram extraídas da polpa de terceiro molar, cultivadas com em diferentes concentrações de BMP-2, e quantificadas no período de até 20 dias.

Os resultados apresentaram que a concentração de BMP-2 não influenciou na proliferação celular, porém produziu diferenciação para odontoblastos.

Huang et al. (2006a) observaram a diferenciação das células-tronco quando cultivadas em discos de dentina tratado com EDTA 17% / ácido cítrico 19% ou em colágeno tipo I. Os resultados demonstraram que as células-tronco cultivadas sobre o disco de dentina não demonstraram proliferação, porém houve diferenciação em odontoblastos, inclusive com presença de prolongamentos avançando pelo túbulo dentinário. O cultivo celular sobre o colágeno tipo I não foi benéfico devido à contração da matriz de colágeno causada pela célula. No mesmo ano, Huang et al. (2006b) repetiram seu estudo anterior, e confirmaram a formação de células com características odontoblásticas com prolongamentos adentrando os túbulos dentinários.

Papaccio et al. (2006) verificaram a diferenciação das células-tronco da polpa dental em osteoblastos. Células-tronco foram isoladas a partir da polpa dentária humana de pacientes adultos, e cultivadas em meio de diferenciação osteogênica. Após desenvolvimento de um tecido in vitro, o mesmo foi transplantado no dorso de ratos imunodeprimidos por 4 semanas. As células do experimento in vitro foram analisadas por histoquímica, imunofluorescência, e microscopia eletrônica, enquanto os espécimes do estudo in vivo foram analisados por coloração de HE, e microscopia polarizada. Os resultados demonstraram que as células cultivadas em placa se diferenciaram em osteoblastos com positividade à atividade de fosfatase alcalina e calceína, que indicam a produção de tecido mineralizado; e de RUNX-2, osteocalcina, osteonectina e BAP, que são marcadores da membrana osteoblástica e de tecido duro. O transplante do tecido adquirido em laboratório apresentou a formação de osso lamelar, e a positividade ao HLA-1 confirmou a origem humana do tecido adquirido. Assim, os autores concluíram que células-tronco da polpa dentária possuem um grande atrativo para aplicação clínica do reparo ósseo.

Com a ideia de que a matriz dentinária descalcificada possui capacidade de osteoindução, Machado et al. (2006) implantaram em dorso de rato, fragmentos de dentina humana desmineralizada através de imersão em ácido hidrocloreídrico. Após os períodos de 7, 15, 30, 60, e 120 dias, os animais foram sacrificados, e as amostras processadas para análise histopatológica em HE. Os resultados apresentaram presença de tecido calcificado em 180 dias, demonstrando o potencial de osteoindução da dentina desmineralizada.

A necessidade de uma estrutura para receber as células-tronco durante a aplicação da bioengenharia tecidual fez com que diversos tipos de arcabouços fossem propostos. Assim, Zhang et al. (2006) analisaram a performance das células-tronco da polpa dental associadas a diferentes arcabouços – colágeno tipo I, cerâmica porosa com forato tricálcico / hidroxiapatita, e fibras de titânio. Células-tronco provenientes de um biobanco foram cultivadas sobre cada arcabouço testado no período de 4 semanas sendo então analisados através de microscopia eletrônica de varredura e RT-PCR. Trinta amostras de cada material foram também implantadas em dorso de ratos imunodeprimidos por até 12 semanas, e então processadas para análise em microscopia de luz e RT-PCR. Os resultados demonstraram que houve deposição de matriz celular mineralizada e expressão positiva de DSPP em todos os grupos das amostras cultivadas in vitro, o que também foi confirmado no estudo in vivo associado ao tecido bem vascularizado. No entanto, calcificação limitada in vivo foi observada no arcabouço cerâmico. Os autores concluíram que para a aplicação clínica, futuros estudos são importantes para melhor compreensão do comportamento in vivo das células-tronco frente a diferentes arcabouços.

Com o isolamento de células-tronco da polpa dental de dentes permanentes e dentes decíduos, Sonoyama et al. (2006) isolaram e analisaram células da papila apical, e encontraram positividade à molécula de superfície STRO-1, indicando a presença de células-tronco mesenquimais. Após cultivo em meios de diferenciação, pôde-se observar que a diferenciação para diversos tipos celulares como adipócitos, osteoblastos e odontoblastos. Para comprovar a diferenciação funcional, formação de nódulos mineralizados in vitro foi identificada através de vermelho de alizarina, e formação de dentina in vivo foi observada na implantação destas células + fosfato tricálcico/ hidroxiapatita em dorso de ratos imunodeprimidos. A comparação do DNA e produção de fosfatase alcalina destas células, denominadas células-tronco da papila dental, demonstrou ser a única população de células-tronco pós-natal distinta das células da polpa dental com maior potencial de regeneração e capacidade de migração.

No entanto, Kerkis et al. (2006) descreveram a identificação de outra população de células-tronco proveniente da polpa de dentes decíduos. Estas células, denominadas células-tronco imaturas da polpa dental, apresentaram características diferentes das células de dentes decíduos previamente descritas,

demonstrando positividade a marcadores presentes em células-tronco mesenquimais e também em marcadores presentes somente em células-tronco embrionárias. No estudo, elas demonstraram diferenciação celular uniforme com formação de músculo esquelético e liso, cartilagem, osso, e em especial neurônios morfolologicamente semelhantes a neurônios primários, que até o momento não havia sido descrito na literatura. A injeção intraperitoneal destas células em ratos levou ao crescimento de um tecido denso em diversos órgãos dos animais, e a análise sanguínea por RT-PCR revelou a presença de genes humanos. Os autores concluíram que se trata de uma nova linhagem de células-tronco que pode ter um grande potencial no tratamento de neurotrauma, infarto do miocárdio, danos no tecido conjuntivo, entre outros, no entanto mais estudos são necessários para se estabelecer sua relação com as células-tronco da polpa de dentes decíduos e permanentes.

Machado (2007) afirmou que células indiferenciadas da polpa dental ficam localizadas na zona rica em células próxima da região central da polpa, e que estas células descendem da papila dental primitiva. Além disso, sob a reação inflamatória, estas células podem formar células de defesa, fibroblastos e odontoblastos através de diferenciação celular.

Diante da capacidade de diferenciação das células-tronco e a importância da vascularização para a formação tecidual, assim, D'Aquino et al. (2007) analisaram a diferenciação de células-tronco da polpa humana em osteoblastos e sua relação com a angiogênese. Células-tronco extraídas da polpa humana de pacientes adultos foram isoladas e cultivadas em meio osteogênico. Após diferenciação, as células foram marcadas por anticorpos marcadores de osteoblastos e células endoteliais. Então, o tecido ósseo obtido através do cultivo celular por 60 dias foi implantado no dorso de rato imunodeprimido. Outro grupo utilizando células-tronco + arcabouço também foi realizado. Os animais foram sacrificados nos tempos de 30, 45 e 60 dias, e as amostras analisadas através de coloração com HE, tricômico de Mallory, e imunofluorescência com diversos marcadores. A análise do experimento *in vitro* apresentou positividade à osteocalcina (marcador de osteoblasto) e ao VEGFR-2 (Receptor relacionado à atividade angiogênica) nos osteoblastos, e em algumas amostras positividade à células endoteliais. Além disso, endoteliócitos formando vasos também foram encontrados na cultura celular. No estudo *in vitro* foi observada a formação de um tecido semelhante ao osso humano adulto integrado a um

suprimento sanguíneo em ambos os grupos experimentais. Assim, os autores concluem que há uma evidência direta na participação de células-tronco da polpa humana no processo de osteogênese e angiogênese, e que as células-tronco diferenciam sinergicamente em osteoblastos e endoteliócitos.

Após a identificação de células-tronco na papila dental, Sonoyama et al. (2008) buscaram caracterizar estas células, por meios de análise histológica, imuno-histoquímica, e imunocitofluorescência da papila apical de terceiros molares humanos com rizogênese incompleta. Os autores observaram que a papila dental é um tecido distinto da polpa por ser menos celular e vascular, apresentando potencial de diferenciação duas a três vezes maiores que as células da polpa. Assim como as células-tronco da polpa, ela possui potencial osteo/dentinogênico, possuindo genes de receptores de fator de crescimento semelhantes. Assim, os autores concluíram que as células-tronco da papila dental são similares às células-tronco da polpa, porém são fontes distintas de células progenitoras.

Prescott et al. (2008) chamaram a atenção para a importância da tríade células- tronco/arcabouço/fatores de crescimento no conceito de bioengenharia tecidual. Nisto os autores propuseram avaliar a importância de cada componente desta tríade. Perfurações na furca de terceiros molares humanos extraídos foram feitas e preenchidas de acordo com a divisão dos grupos: grupo 1 – MTA; grupo 2 – arcabouço de colágeno; grupo 3 – arcabouço de colágeno + proteína da matriz dentinária 1 (DMP-1); grupo 4 – arcabouço de colágeno + DMP-1 + células-tronco da polpa dental; grupo 5 – arcabouço de colágeno + células-tronco. Os dentes foram implantados no dorso de ratos por 6 semanas e analisadas histologicamente por coloração em HE, safranina-O, von Kossa e tricome de Masson. No grupo 1 foram observadas somente algumas células vermelhas na zona periférica da perfuração; no grupo 2 e 5 observou-se colágeno e arcabouço em processo de degradação; no grupo 3 houve formação de matriz colágena na zona periférica e presença de arcabouço ainda em degradação; e no grupo 4 foi possível observar maior volume de matriz colágena com células semelhantes a fibroblastos e células endoteliais formando vasos sanguíneos. Assim, os autores concluem que a tríade células-tronco/arcabouço/fatores de crescimento podem induzir a formação de matriz organizada, o que não acontece na ausência de um de seus componentes.

He et al. (2008) estudaram o efeito do fator de crescimento transformante $\beta 1$ (TGF $\beta 1$) e o fator de crescimento de fibroblasto 2 (FGF2) na diferenciação de

células-tronco da polpa dental. Células-tronco foram isoladas de polpa dental humana e cultivadas em meio adicionado de TGF β 1 ou FGF2 ou TGF β 1+FGF2, sendo então analisadas através de MTT, atividade de fosfatase alcalina, microscopia eletrônica de transmissão, coloração em von Kossa, imunocitoquímica e RT-PCR. Os resultados demonstraram maior proliferação celular com o uso individual de FGF2, e diferenciação nos grupos de TGF β 1 e FGF2+TGF β 1. Maior atividade de fosfatase alcalina foi observada com uso individual de TGF β 1, porém maiores nódulos mineralizados foram observados em FGF2+TGF β 1. Assim, os autores concluíram que FGF2 promove a proliferação, TGF β 1 e FGF2+TGF β 1 promovem a diferenciação, e FGF2 age sinergicamente para a diferenciação morfológica e funcional da célula.

Na busca da formação de tecido pulpar organizado a partir de células-tronco, Cordeiro et al. (2008) propuseram analisar a arquitetura celular do tecido pulpar formado em fatias de dentina contendo células-tronco. Células-tronco de dentes decíduos foram isoladas, semeadas, e inoculadas com ou sem células endoteliais em arca-bouço de polímero acomodado em fatias de dentina em dorso de ratos imunodeprimidos. Após 28 dias, as amostras foram removidas e analisadas por coloração em HE, imuno-histoquímica utilizando anticorpo anti-fator VIII e anti-DSP, e microscopia eletrônica de transmissão. As imagens demonstraram a formação de tecido semelhante à polpa fisiológica. Positividade ao anti-DSP indicou a diferenciação celular em odontoblasto, e ao anti fator-VIII indicou diferenciação em células endoteliais, contudo não houve diferença da associação ou não de células endoteliais às células-tronco. A microscopia eletrônica de transmissão demonstrou alta atividade secretora dos odontoblastos. Assim, os autores concluíram que células-tronco podem se diferenciar em odontoblastos e células endoteliais, originando tecido pulpar organizado com aspecto fisiológico.

O laser de baixa intensidade tem sido apontado como promotor de proliferação celular. Assim, Eduardo et al. (2008) analisaram o efeito do laser de baixa potencia sobre células tronco da polpa. Células da polpa dental humana provenientes de biobanco foram cultivadas e submetidas ao déficit nutricional, sendo então, irradiadas com laser diodo InGaAlP, e analisadas por MTT. Células sem irradiação laser correspondeu o grupo controle. Os resultados demonstraram maior viabilidade e proliferação celular do grupo irradiado com o laser. Os autores

concluíram que o laser de baixa intensidade associado às células tronco da polpa dental poderiam ser importantes na engenharia tecidual e medicina regenerativa.

A respeito dos diferentes tipos de arcabouços, Gerbhardt et al. (2009) objetivaram analisar a sobrevivência de células-tronco em arcabouços de polímero de ácido polilático, colágeno e biocerâmico de fosfato de cálcio. Células-tronco da polpa dental provenientes de um biobanco foram cultivadas com cada arcabouço o período experimental de até 14 dias, e então, o tecido adquirido foi processado histologicamente e analisado quanto ao número de células metabolicamente vitais. Os resultados demonstraram que os arcabouços de polímero e de colágeno promoveram excelente sobrevivência celular, e que foram diferentes do arcabouço biocerâmico. Assim, os autores concluíram que o polímero e o colágeno juntamente com as células-tronco podem ser combinados para o uso de tratamento dental regenerativo.

Diante do conceito de que células-tronco podem ter maior capacidade de renovação em meios com baixo nível de oxigênio, Sakdee et al. (2009) verificaram a proliferação de células-tronco da polpa dental extraídas de terceiro molar humano cultivadas em condições de hipóxia ou normóxia. Análise das células cultivadas no período de até 14 dias e observadas através de imunofluorescência de STRO-1 demonstrou que a condição de hipóxia aumenta significativamente a proliferação de células-tronco da polpa dental.

A migração celular ao sítio de ação é um dos pontos importantes para a reparação de tecidos injuriados. Neste contexto, Howard et al. (2010) verificaram se células-tronco da polpa humana possuem migração celular provocada por quimiotactantes (esfingosina-1-fosfato recombinante, fator de crescimento de fibroblasto, fator de crescimento epidérmico, fator de crescimento transformante $\beta 1$) e proteínas da matriz extracelular (colágeno I, colágeno IV, laminina, fibronectina). Células-tronco isoladas de dentes decíduos foram cultivadas e inoculadas na câmara superior de uma placa de duplo compartimento. As células foram aderidas em filtro impregnado pelas proteínas da matriz extracelular, e incubadas por 2 horas. Então, a câmara superior foi levada à câmara inferior contendo os quimiotactantes, sendo incubados por mais 4 horas. A câmara superior contendo o filtro foi removida, e as células foram fixadas para contagem e análise por checkerboard. Células presas no lado superior do filtro foram células não migradas, e as células presas no lado inferior do filtro foram células migradas. Os resultados demonstraram alta

capacidade de migração das células-tronco principalmente pela ação da laminina, esfingosina-1-fosfato recombinante e fator de crescimento transformante $\beta 1$. Os autores concluíram que quimiotactantes e proteínas da matriz extracelular são importantes promotores de migração das células-tronco.

Harumi Miyagi et al. (2010) afirmaram que proteínas da matriz extracelular presentes na polpa humana também podem ser produzidas por células-tronco, e que os estágios de maturação da polpa refletem em diferentes composições das proteínas da matriz extracelular. Neste contexto, os autores analisaram a expressão de proteínas da matriz extracelular (colágeno tipo I, fibronectina e tenascina) em células-troncos de diversos doadores. Células-tronco de polpa dental imatura de dentes decíduos (um dente com reabsorção radicular parcial e outro com reabsorção radicular total) e permanentes foram isoladas e analisadas através de imunofluorescência e RT-PCR. Os resultados apresentaram menor evidência de colágeno tipo I nas células provenientes do dente permanente; e a fibronectina e a tenascina estava menos evidente nas células provenientes do dente decíduo com reabsorção total, embora o teste de RT-PCT tenha demonstrado expressão similar destas proteínas em todas as células analisadas. Assim, os autores concluíram que a condição de maturidade da polpa dental influencia na expressão de proteínas da matriz extracelular em células-tronco.

Apesar de diversas fontes de células-tronco serem estudadas, as mesmas requerem de técnicas, muitas vezes de custo elevado, para sua extração. Assim, Kim et al. (2010) verificaram o uso de células homing induzidas por quimiotaxia na formação tecidual em dentes despulpados. Dentes uniradiculares humanos foram extraídos e os canais preparados através de instrumentação com limas manuais e rotatórias. Fatores de crescimento recombinante humano (VEGF, bFGF, PDGF, NGF, BMP-7) foram utilizados individual ou em conjunto associados ao colágeno gel, e injetados no canal radicular. Então, os dentes foram implantados em dorso de camundongos por 3 semanas, e as amostras processadas para análise histológica em HE, imuno-histoquímica e ELISA para o fator de von Willerbrand, DSP e NGF. Todas as amostras apresentaram formação de tecido altamente celular e vascularizado semelhante ao tecido pulpar. FGF e VEGF expressaram maior quantidade de marcadores angiogênico e odontogênico que o PDGF, enquanto o marcador neurogênico estava mais alto com o uso do FGF. Os autores concluíram

que células homing induzidas por quimiotaxia possui potente efeito sobre a recelularização e revascularização do canal radicular.

O plasma rico em plaquetas (PRP) é um derivado obtido a partir da centrifugação de sangue, e tem sido reconhecido como uma excelente fonte de fatores de crescimento. Liu et al. (2011) analisaram o efeito do PRP sobre células-tronco da polpa dental em produzir tecido mineralizado. Células-tronco extraídas da polpa dentária humana de terceiros molares foram associadas ao PRP e implantadas no dorso de camundongos em até 8 semanas, sendo assim analisadas através de coloração em HE e imuno-histoquímica. O grupo controle foi composto de células-tronco ou PRP utilizados separadamente. Os resultados demonstraram formação de tecido mineralizado com positividade à osteopontina, osteocalcina, e colágeno tipo I na associação de células-tronco + PRP. O uso individual não produziu tecido mineralizado. Os autores concluíram que o PRP possui biocompatibilidade com células-tronco da polpa dental e produzem mineralização das mesmas, sugerindo ser indicado o seu uso como arcabouço.

Alsanea et al. (2011) buscaram o reparo de perfurações de furca com o uso de bioengenharia tecidual. Os autores promoveram perfurações em molares humanos extraídos e preencheram com trióxido agregado mineral ou protocolo variado de células-tronco de polpa dental, proteína de matriz dentinária 1 (DMP-1) e colágeno (somente colágeno ou colágeno + DMP1 ou colágeno + células-tronco ou colágeno + células-tronco + DMP1). Assim, os dentes foram implantados em dorso de rato e analisados por cortes histológicos corados por HE e tricome de Masson, e imuno-histoquímica com anti-DSP. A tríade colágeno + células-tronco + DMP-1 formou tecido altamente celular e vascularizado com deposição de matriz mineralizada, onde os autores sugerem que a DMP-1 parece estar mais ligada à angiogênese, no qual cria condições para diferenciação das células-tronco em odontoblastos.

Com a proposta de analisar a proliferação de células maduras da polpa dentária frente a diferentes arcabouços – polímero de ácido polilático, colágeno, e biocerâmico de fosfato de cálcio – Chandrhasa et al. (2011) prepararam fatias de dentina com polpa vital de terceiros molares extraídos, e as cultivaram em contato com os arcabouços analisados por 7, 14, 21, e 30 dias, sendo assim as células foram coradas para observação de metabolismo celular ativo e processadas para análise histológica. Todas as amostras tiveram proliferação de células com fenótipo

de fibroblasto em função do tempo, não sendo observados outros fenótipos celulares e nem produção de mineralização. Arcabouço de polímero apresentou melhores resultados, seguido do colágeno e do biocerâmico. Os autores concluíram que os arcabouços aumentam a proliferação de células maduras da polpa, e que a taxa de proliferação é dependente da composição do arcabouço.

Substancias químicas são utilizadas durante o preparo do canal radicular, e o EDTA 17% é um agente quelante que aumenta a limpeza do canal resultando em túbulos dentinários mais abertos. Galler et al. (2011) avaliaram o efeito da superfície dentinária condicionada com EDTA 17% sobre a regeneração pulpar. Células-tronco isoladas da polpa dental de terceiros molares humanos adultos foram semeadas e adicionadas em hidrogel contendo fatores de crescimento (VEGF, TGF- β 1, e FGF2), e assim levadas em cilindros de dentina de canais previamente instrumentados e com a superfície dentinária condicionada com o uso de hipoclorito de sódio 5,25% ou EDTA 17%. Os cilindros de dentina foram implantados em dorso de camundongos por 6 semanas, e assim processados para análise histológica em HE, tricome de Masson e TRAP, e imuno-histoquímica com anti-DSP. Tecido pulpar vascularizado estava presente em ambos os grupos. No entanto o grupo condicionado com hipoclorito de sódio 5,25% apresentou superfície dentinária irregular com presença de células clásticas, enquanto no grupo condicionado com EDTA 17% a superfície dentinária estava mais lisa apresentando odontoblastos em contato direto com seus prolongamentos adentrando os túbulos. Células clásticas não foram observadas no grupo do EDTA 17%. Os autores concluíram que o condicionamento da parede dentinária influencia na regeneração pulpar com células-tronco.

Ácido polilático nanofibroso tem sido um polímero sintético utilizado como arcabouço, no entanto, Wang et al. (2011) afirmam que a falta de uma estrutura porosa é uma limitação. Assim, os autores analisam a utilização do ácido polilático poroso sobre células-tronco diante de diferenciação odontogênica. Células-tronco da polpa dental humana proveniente de um biobanco foram semeadas e levadas aos dois arcabouços suplementados por meio de diferenciação odontogênica. As amostras foram então analisadas por fluorescência, microscopia eletrônica de varredura, atividade de fosfatase alcalina, real time RT-PCR, e quantificação de cálcio. Num segundo momento, os arcabouços previamente preparados e não preparados em meio de diferenciação odontogênica foram implantados no dorso de

camundongos por 8 semanas, sendo então analisados por coloração em HE, von Kossa, tricome de Masson, e imuno-histoquímica com anti-DSP. Os resultados demonstraram que o arcabouço nanofibroso promoveu maior proliferação e diferenciação celular com aumento da atividade de fosfatase alcalina, expressão de genes odontogênicos, e deposição mineral. Assim, os autores concluíram que o arcabouço de ácido polilático nanofibroso promove melhor diferenciação odontogênica de células-tronco da polpa dental e formação de tecido dentinário do que o arcabouço poroso.

Lee et al. (2011) analisaram a ação de meio condicionado com pré-ameloblastos sobre células-tronco da polpa dental adulta. Na primeira parte do estudo, os autores realizaram cocultura de células-tronco da polpa dentária humana ou de linhagem odontoblástica com células do botão apical de camundongos em até 10 dias, sendo submetido à análise através de RT-PCR, real time PCR, Western blot. Na segunda parte, células do botão apical de camundongos foram utilizadas para produzir meio condicionado de pré-ameloblastos, e então células-tronco da polpa dentária humana ou de linhagem odontoblástica foram semeadas neste meio por 2 semanas. As células-tronco associadas à hidroxiapatita / fosfato tricálcico foram implantadas em dorso de camundongos por até 12 semanas para processamento imuno-histoquímico, enquanto as células de linhagem odontoblástica submetidas à análise de luciferase e vermelho de alizarina. Os resultados demonstraram que houve diferenciação celular em odontoblastos e aumento da expressão de proteína da matriz dentinária em ambas as coculturas. A implantação em dorso de camundongos resultou na formação de tecido semelhante à polpa dentária com presença de odontoblastos. A cultura em meio condicionado demonstrou a formação de nódulos mineralizados e a presença de 113 tipos de proteínas, onde somente 23 foram identificadas. Assim, os autores concluíram que o meio condicionado a partir de fatores derivados de pré-ameloblastos induz a diferenciação odontogênica e promove a formação de dentina.

O desenvolvimento do complexo dentinho-pulpar e a relação com células da papila e pré-ameloblastos foi descrito por Katchburian e Arana (2012). Durante a fase de campânula, células do epitélio interno do órgão do esmalte sofrem uma série de modificações que originarão os pré-ameloblastos. Os autores afirmam que a interação entre as células do órgão do esmalte e da papila dentária é essencial para a diferenciação dos odontoblastos. Num segundo momento, os autores enfatizaram

que pesquisas de células-tronco, em combinação de engenharia dos tecidos têm demonstrado potencial para aplicação em tratamentos que buscam a neoformação de tecidos ósseo e dentário.

Dissanayaka et al. (2012) chamaram a atenção para a importância do suprimento sanguíneo para a regeneração endodôntica. Assim, os autores propuseram verificar a ação sinérgica de células-tronco da polpa dental com células endoteliais diante da diferenciação osteo/odontogênica e angiogênese. Células-tronco foram isoladas da polpa dental de terceiros molares humanos extraídos, e semeadas em cocultura direta com células endoteliais da veia umbilical em diferentes proporções e em meio odontogênico por 21 dias. Grupo controle foi composto pela cultura individual de cada tipo celular. Assim, para a avaliação dentinária, as células foram submetidas à análise da atividade de fosfatase alcalina, vermelho de alizarina, imunofluorescência de DSP, RT-PCT e real time PCR; e para a avaliação angiogênica, foi analisada a imagem de vasos formados em matrigel, imunofluorescência com anticorpos CD31 e von Willerbrand, e real time PCR. Maior atividade de fosfatase alcalina foi registrada em 14 dias com a associação de células-tronco: endoteliais na proporção 5:1 e 1:1, mantendo-se alta, porém com leve redução até os 21 dias. Maior formação de nódulos mineralizados foi observada na proporção de 5:1, seguido de 1:1. Imunofluorescência confirmou a positividade para os anticorpos analisados com aumento da expressão tanto na análise dentinária quanto angiogênica em todas as coculturas. Marcadores angiogênicos foram detectados com maior expressão nas coculturas com níveis maiores no tempo de até 7 dias, e redução até os 21 dias analisados. A presença de células-tronco resultou numa formação mais estruturada com vasos mais calibrosos e extensos que a cultura individual de célula endotelial. Os autores concluíram que cocultura direta de células-tronco da polpa dental com células endoteliais aumenta a diferenciação celular com fenótipos osteo/odontogênicos e angiogênicos.

Buscando demonstrar a importância da vascularização na bioengenharia pulpar, Srisuwan et al. (2012) apresentaram um modelo de câmara vascularizada em tecido muscular de rato. Artéria femoral e veia epigástrica foram dissecadas na parte superior interna da pata do rato, e feita anastomose passando por dentro de um tubo de silicone com as extremidades seladas. Os tubos foram preenchidos com células-tronco da polpa dental em matriz colágena com ou sem fatores de crescimento FGF2 e BMP-4 envoltos ou adicionados a fragmentos de dentina. O

tecido formado após 2, 4, 6, e 8 semanas foi removido e processado para análise em HE, tricome de Masson, imuno-histoquímica com anti-DSP, histoquímica de lectina, e DAPI. Tecido formado apresentando neovascularização e fibroblastos com células da polpa dental próximas à dentina e pericitos vasculares foram observadas em 2 semanas. Menor densidade de vasos com pedículo vascular obstruído e presença de células inflamatórias foi observada nas células envoltas por dentina, e maior formação vascular com menor reação inflamatória foi vista no uso de fragmentos. Sobrevivência celular foi confirmada no tempo de 8 semanas e positividade à DSP foi detectada no tecido neoformado. Assim os autores concluíram que a vascularização resulta na sobrevivência funcional de células da polpa dental, e que o modelo metodológico empregado pode ser indicado para o estudo de bioengenharia pulpar.

O estudo de moléculas sinalizadoras é importante para melhor compreensão da diferenciação celular, e segundo Kim et al. (2012), o SIRT1 tem sido apontado como potente regulador da diferenciação de células-tronco do ligamento periodontal. Assim, os autores avaliaram a função do SIRT1 durante a diferenciação de células-tronco da polpa humana. Células-tronco da polpa humana foram semeadas em meio de cultura osteogênica com inibidores e indutores do SIRT1 em até 14 dias, e a expressão de marcadores odontogênicos e angiogênicos foram analisadas através de vermelho de alizarina, RT-PCR e Western blot. Os resultados demonstraram que a expressão de SIRT1 foi observada nos estágios iniciais de odontogênese com pico máximo em 1 dia seguido de queda da expressão. Indutores de SIRT1 aumentaram a formação de nódulo mineralizado, e sobreregularam a expressão de marcadores odontogênicos e angiogênicos, enquanto os inibidores promoveram diminuição a diferenciação celular e sub regulação dos fatores angiogênicos. Assim, os autores concluíram que a ativação do SIRT1 pode promover efeito terapêutico na regeneração pulpar e engenharia tecidual dentinária.

A partir da disponibilidade dos arcabouços de diferentes naturezas, Kodonas et al. (2012) analisaram o uso do arcabouço orgânico (esponja de colágeno tipo I) e sintético (polímero biodegradável) na regeneração pulpar. Incisivos e pré-molares superiores de mini porcos foram extraídos e utilizados para confecção de tubos de dentina. Células-tronco da polpa dental do mesmo animal foram previamente isoladas, e levadas ao tubo de dentina juntamente com os arcabouços testados, e assim os tubos dentina reimplantados em seus respectivos alvéolos. Nos tempos de

6 e 10 semanas, as amostras foram processadas para coloração em HE, tricome de Masson, e imuno-histoquímica com anti- DMP-1 e BSP-2. No período de 6 semanas observou-se degradação de ambos os arcabouços sendo substituídos por proliferação celular, além de nova matriz extracelular sendo depositada próxima à pré dentina. Em 10 semanas, foi observada matriz orgânica já formada com células colunares próxima à dentina, e positividade à marcação imuno-histoquímica. Tubos reimplantados vazios ou somente com arcabouço apresentaram reabsorção da parede dentinária e ausência de proliferação celular.

Yang et al. (2012) verificaram a influência do fator necrótico tumoral (TNF- α) sobre a mineralização de células da papila apical. Células-tronco da papila apical de terceiros molares humanos com ápice aberto foram isoladas e cultivadas na presença de TNF- α em diversas concentrações (0-50 ng/ml) por 4 dias, e analisadas por MTT. Então as células foram novamente incubadas em meio osteogênico por mais 28 dias, e analisadas por vermelho de alizarina e imunocitoquímica com anti-BSP e DSP. Genes de mineralização foram analisados através de real time PCR nos tempos de 7, 14 e 21 dias. Maior viabilidade celular foi observada nas maiores concentrações de TNF- α (10-50 ng/ml), e maior atividade de mineralização com o uso da concentração de 10 ng/ml de TNF- α . A imunocitoquímica detectou positividade com os dois anticorpos. A expressão de genes de mineralização variou nos tempos avaliados. Os autores concluíram que o TNF- α pode promover mineralização em curto tempo, mas possui atividade inibitória em tempos maiores.

Machado et al. (2013) implantaram em dorso de ratos, fragmentos de dentina desmineralizadas por EDTA 17% no período de 30 e 60 dias para demonstrar o potencial de osteoindução da matriz dentinária desmineralizada. Após o período experimental, as amostras foram removidas, fixadas, e processadas histologicamente para coloração em HE. Os resultados demonstraram infiltrado inflamatório e ainda a presença do material implantado sendo reabsorvido no tempo de 60 dias. Os autores concluíram que o tempo experimental de 60 dias não foi suficiente para analisar o potencial de osteoindução da matriz dentinária desmineralizada em dorso de rato.

Buscando estabelecer a importância do suprimento sanguíneo na regeneração tecidual, Srisuwan et al. (2013) realizaram dois experimentos com ratos. Células-tronco da polpa dental de ratos foram extraídas, cultivadas, e adicionadas em colágeno com microesferas de gelatina conjugada com FGF-2,

VEGF e PDGF. No primeiro experimento, canais de dentes extraídos de ratos foram preparados, e suas extremidades removidas para obtenção de um tubo e dentina. A extremidade superior foi selada com ionômero de vidro, o e tubo preenchido com células-tronco + arcabouço com microesferas conjugadas de fatores de crescimento. Assim, o tubo foi implantado em fêmur de rato com a extremidade aberta voltada para o osso, representando uma condição rica em suprimento sanguíneo. No segundo experimento, incisivos de ratos foram extraídos, 2 mm apicais removidos para eliminar qualquer fonte de células-tronco apical, o canal foi esvaziado e preenchido com células-tronco + arcabouço com microesferas conjugadas de fatores de crescimento, e então, os dentes reimplantados novamente em seu local de origem. Em ambos os experimentos, os animais sacrificados em 4 e 8 semanas, e processados para coloração em HE e histoquímica fluorescente com DAPI. Os resultados demonstraram a formação de tecido conjuntivo fibroso vascularizado que foi avançando coronalmente em função do tempo em todas as amostras implantadas do fêmur, enquanto nenhum tecido vital foi formado nos dentes reimplantados em seu local de origem. Os autores concluíram que os modelos experimentais apresentados demonstraram a importância do suprimento sanguíneo para o sucesso da revascularização e regeneração tecidual.

Bronckaers et al. (2013) analisaram a propriedade angiogênica de células-tronco da polpa dental. As células-tronco foram isoladas de terceiros molares humanos e cultivadas, sendo o meio condicionado pelas células submetido à análise de anticorpos para identificação de fatores angiogênicos, e as células analisadas por ELISA e RT-PCR. Células-tronco foram incubadas em cocultura com células endoteliais para análise de proliferação por MTT, e submetidas ao teste de migração em placa de duplo compartimento. Teste da membrana corioalantóica de embrião de galinha foi utilizado para verificar a formação de vasos. Diversos fatores pro-angiogênicos e anti-angiogênicos foram detectados a nível proteico e genético. As células-tronco não influenciaram na proliferação das células endoteliais, contudo, promoveu migração *in vitro* destas células. O teste da membrana corioalantóica apresentou que as células-tronco da polpa dental foi capaz de produzir a formação de vasos. Os autores concluíram que as células-tronco da polpa dental possuem habilidade angiogênica, e que possui grande potencial para a aplicação de bioengenharia tecidual e também no tratamento de lesões crônicas, derrames e infarto do miocárdio.

Dando sequencia ao seu estudo de 2011, Choung et al. (2013) avaliaram a ação do meio condicionado com pré-ameloblastos na regeneração pulpar em canais vazios. Células-tronco da polpa foram isoladas de terceiros molares extraídos, e separadamente, meio de cultura foi condicionado com o cultivo de células do botão apical de camundongos. Células-tronco em fibrina gel associados ou não com meio condicionado foram levados a tubos de dentina preparados a partir de dentes unirradiculares extraídos e implantados em dorso de ratos imunodeprimidos. Após 12 semanas as amostras foram processadas para análise em HE, tricome de Masson, imuno-histoquímica com anti- DSP e nestina, e microscopia eletrônica de varredura. Os resultados demonstraram a formação de tecido em ambos os grupos, no entanto, além do tecido conjuntivo, o grupo sem meio condicionado apresentou a formação de tecido muscular esquelético e dentina reparativa, enquanto o grupo utilizando meio condicionado demonstrou a presença de odontoblastos organizados com prolongamentos adentrando túbulos dentinários. Imuno-histoquímica detectou positividade aos dois anticorpos em ambos os grupos, porém, no grupo com meio condicionado DSP foi mais expressado próximo aos túbulos dentinários e nestina estava mais evidente, enquanto no grupo sem meio, a expressão de DSP estava mais dispersa e a nestina com menos evidência. Assim, os autores concluíram que o meio condicionado com pré-ameloblastos induzem a regeneração pulpar de células da polpa humana com estrutura fisiológica em canal vazio.

MicroRNAs são cadeias de peptídeos que regulam a diferenciação de diversos tipos celulares em condições fisiológicas e patológicas. Liu et al. (2014) analisaram a influência do microRNA-424 sobre as células da polpa dental humana durante o processo de angiogênese. Células da polpa foram isoladas a partir de terceiros molares extraídos e infectadas com e sem vetor lentivírus de microRNA-424. Após cultivo em meio angiogênico, as amostras foram analisadas por qRT-PCR, Western blot e microscopia invertida. Os resultados demonstraram que as células da polpa cultivadas sem o lentivirus apresentaram potencial angiogênico, porém a expressão de micro-RNA foi sub regulada após a diferenciação. Foi detectada maior sobre expressão de microRNA-424 nas amostras infectadas com vetor, o que inibiu a diferenciação celular e a expressão de fatores angiogênicos, que por sua vez foram elevados com a inibição do microRNA-424. Os autores concluíram que o microRNA-424 possui função reguladora negativa na diferenciação

endotelial de células da polpa humana, e a inibição do mesmo pode contribuir para o reparo e regeneração pulpar.

Ruangsawasdi et al. (2014) avaliaram o uso de fibrina gel como arcabouço na regeneração endodôntica. Pré molares de humanos com ápice aberto foram extraídos e toda a polpa removida com lima endodôntica, sendo então imersos em hipoclorito de sódio 5% e EDTA 17% por 5 minutos cada. Então fibrina 1% gel (fibrinogênio + cálcio) foi injetada no canal radicular, e os dentes medindo 9 milímetros implantados em subcutâneo da calvária de ratos. Canais vazios foram o grupo controle. Após 12 semanas os espécimes foram removidos e processados para análise histológica em tricome Goldner e imuno-histoquímica com anti- BSP e DSP. Em ambos os grupos houve invaginação de tecido dentro do canal, no entanto o preenchimento do grupo com canal vazio foi parcial, não atingindo o terço coronário. O tecido encontrado no grupo com fibrina apresentou-se semelhante ao tecido pulpar com zona rica em células, zona livre de células, e camada odontoblástica com prolongamentos adentrando os túbulos dentinários. Imuno-histoquímica apresentou positividade de BSP e DSP na camada células junto à parede dentinária do grupo com fibrina, e negatividade no grupo com canal vazio. Assim, foi concluído que a fibrina gel melhora a infiltração celular e a interação célula-dentina.

Para estabelecer a relação entre a diferenciação celular e a dentina tratada com EDTA, Pang et al. (2014) semearam células tronco provenientes de terceiros molares humanos sobre discos de dentina tratados ou não com EDTA. Após 3 dias de cultura, as células cultivadas sobre os discos tratados apresentaram maior densidade celular e nível de expressão de fibronectina. Após 3 semanas, este mesmo grupo demonstrou presença da expressão de DSP e DMP-1, ausentes no grupo sem tratamento com EDTA. Os autores concluíram que tratamento dentinário com EDTA induz a diferenciação odonto/osteoblástica de células tronco da polpa dental.

Limjeerajarus et al. (2014) afirmaram que a prostaciclina é um agente vasodilatante fisiológico capaz de promover angiogênese e proliferação celular. No entanto, devido sua instabilidade, o iloprost, um análogo sintético, pode ser aplicado com a mesma finalidade, porém com mais estabilidade química. Neste conceito, os autores propuseram investigar a influência do iloprost sobre as células da polpa dental. Células da polpa dental foram isoladas de dentes humanos extraídos e

cultivadas com iloprost em três concentrações, sendo então analisadas por MTT e real time PCR. O meio de cultura foi coletado e avaliado por ELISA. Para o estudo in vivo, primeiros molares superiores foram injuriados com o uso de broca em baixa rotação até a exposição pulpar, sendo então utilizado iloprost em diferentes concentrações. O fluxo sanguíneo do dente tratado foi verificado através de fluxometria por laser doppler nos tempos de 0, 24 e 72 horas após o tratamento. O iloprost produziu maior proliferação e sobreexpressão da expressão de mRNA de VEGF, FGF-2, e PDGF nas células da polpa após período de 24 horas, e foi dose dependente. O fluxo sanguíneo do grupo tratado com iloprost foi maior que o grupo controle no período de 72 horas. Assim, foi concluído que o iloprost pode ser um agente candidato para a neovascularização da polpa dental.

Vanacker et al. (2014) avaliaram o potencial de diferenciação de células-tronco da papila apical submetidas à condição de hipóxia. Células-tronco da papila apical de dentes permanentes com ápice aberto foram isoladas, cultivadas em condição de hipóxia e normóxia, e então quantificada a proliferação celular através de microscopia, e verificada a expressão de VEGF por ELISA. As células-tronco foram novamente semeadas em hipóxia e normóxia em meios de diferenciação osteo-, adipo-, e neurogênica, sendo posteriormente analisadas por qRT-PCR. A hipóxia não afetou a proliferação celular, mas expressou sobreexpressão de genes específicos para diferenciação osteo-, neuro-, e angiogênica, e de VEGF. Os autores concluíram que a hipóxia induz a diferenciação de células-tronco da papila apical mantendo o lançamento de fatores pró-angiogênicos como o VEGF, e que estas células representam um potencial terapêutico para doenças neurodegenerativas.

Citocinas pro inflamatórias, como o TNF- α , parecem levar à apoptose celular; e fatores de crescimento angiogênicos que promovem proliferação e diferenciação celular estão aumentados no processo inflamatório. Assim, Boyle et al. (2014) avaliaram o efeito do TNF- α e fatores angiogênicos em mediar a proliferação e diferenciação de células-tronco da polpa dental. Células-tronco foram isoladas da polpa de terceiros molares humanos extraídos, e cultivadas juntamente com TNF- α em meio odontogênico. O período de até 6 horas foi considerado curto prazo, e o tempo de até 14 dias foi denominado longo prazo. As amostras foram analisadas por real time PCR, citometria de fluxo, MTT, vermelho de alizarina, atividade de fosfatase alcalina, western blot. Os resultados demonstraram que a exposição do TNF- α em curto prazo induziu apoptose com sobreexpressão de VEGF e moléculas

sinalizadoras pró-inflamatórias. No entanto, em longo prazo observou-se aumento da proliferação celular. Contudo, tal proliferação induzida por VEGF foi melhorada por inibidores de moléculas sinalizadoras pró-inflamatórias ativadas por TNF- α , que também melhorou a subregulação induzida por TNF- α de proteínas essenciais para a diferenciação, e aumentou o potencial de mineralização celular. Os autores concluíram que o TNF- α induz moléculas sinalizadoras pró-inflamatórias para a sobrerregulação de fatores antiapoptóticos, levando ao aumento de proliferação de células-tronco da polpa dental, mas diminui seu potencial de diferenciação.

Li et al. (2014) analisaram a ação do PRP sobre células-tronco da polpa dental e células progenitoras endoteliais durante o processo de angiogênese. Células progenitoras endoteliais de sangue do cordão umbilical humano foram semeadas em cultura simples ou cocultura com células-tronco da polpa dental extraídas de terceiros molares humanos adicionados ou não com PRP preparado a partir da centrifugação de sangue do cordão umbilical. Assim as amostras foram analisadas por real time PCR, Western blot, microscopia invertida. O nível de expressão de todos os marcadores e formação de estrutura semelhante a vasos apresentaram-se maiores nas coculturas, e maiores nos grupos adicionados de PRP. Os autores concluíram que o PRP e a cocultura promovem a formação de vasos, e o PRP pode promover a formação de vasos a partir de células progenitoras endoteliais.

A partir de várias metodologias, Dissanayaka et al. (2015) verificaram a interação de células-tronco da polpa humana com células endoteliais da veia umbilical encapsuladas em mono ou cocultura em matriz de peptídeo hidrogel. A viabilidade celular foi observada nos períodos de 1, 4 e 14 dias com o uso de um kit de fluorescência Live/Dead, que demonstrou maior taxa de células vivas na cocultura; o número celular em monocultura se mantiveram semelhantes até 4 dias, porém as células endoteliais da veia umbilical não sobreviveram ao período superior à 14 dias. Na sequência a quantificação de VEGF em mono e cocultura foi verificada pelo método de ELISA, que resultou em maior quantidade de VEGF nas monoculturas de células-tronco que em cocultura; além disso, a diminuição de VEGF da cocultura foi proporcional ao aumento de células da veia umbilical; os autores acreditam que à medida que o VEGF é secretado pelas células-tronco, o mesmo é imediatamente utilizado pelas células da veia umbilical para ativar sinalizadores de migração celular e formação vascular. Para análise morfológica e organização celular dos vasos, as

amostras foram monitoradas por 2 semanas utilizando microscopia confocal, que apresentou formação de rede vascular estável em 2 semanas em cocultura; as amostras de monocultura não demonstrou nenhuma formação vascular. Diferenciação odonto/osteoblástica das células troco foi verificada através de mineralização detectada por fosfatase alcalina e coloração do von Kossa; ambas as análises demonstraram maior quantidade de mineralização na cocultura. E por último, a regeneração pulpar in vivo foi visualizada através de amostras injetadas no canal radicular de dentes unirradiculares instrumentados e com acesso coronário selado, sendo implantados no dorso de ratos. Após 4 semanas, os animais foram sacrificados e as amostras processadas para coloração em H.E. e imuno-histoquímica utilizando anticorpo mitocondrial específico e CD31. Tecido organizado semelhante à polpa com vascularização integrada ao hospedeiro e formação de odontoblastos próximo à dentina foram observados nos grupos de monocultura com células-tronco e cocultura, porém este tecido não alcançou o terço coronário da raiz. A densidade vascular foi maior no grupo de cocultura. Os autores destacam a importância de um meio, como o hidrogel, capaz de permitir a interação e migração celular.

Diniz et al. (2015) avaliaram a diferenciação de células troncos da polpa dental incluídas em um arcabouço hidrogel termosensível capaz encapsular células e mantê-las aderidas em seu local de ação. Células tronco da polpa dental de terceiros molares extraídos foram isoladas e cultivadas, sendo então, adicionadas ao hidrogel e mantidas sobre o gelo durante 12 horas, e então incubadas a 37 °C para formação do gel com células encapsuladas. O composto foi cultivado em meio de cultura regular para observar a viabilidade celular, e em meios osteogênico e adipogênico para verificar a diferenciação através de vermelho de alizarina, óleo vermelho O, e RT-PCR. A análise das células encapsuladas demonstrou alta viabilidade após o encapsulamento. Vermelho de alizarina, óleo vermelho O, e RT-PCR demonstraram grande atividade secretora e diferenciação celular das células encapsuladas. Os autores concluíram que o hidrogel termosensível é um arcabouço promissor para encapsular células tronco da polpa dental, e pode ser considerado para a liberação de células durante a engenharia tecidual.

Yuan et al. (2015) analisaram cocultura de células-tronco da papila apical e células endoteliais em condição de hipóxia. Células-tronco da papila apical de terceiros molares humanos com ápice aberto foram isoladas, cultivadas juntamente

com células endoteliais de veia umbilical em hipóxia, sendo então observada a formação de tubos através de microscopia invertida. Para análise da expressão de VEGF e outros fatores angiogênicos após cocultura, um kit comercial foi utilizado para separar as células-tronco e endoteliais, sendo então analisadas por real time PCR. Para verificar o efeito da hipóxia na síntese de fatores angiogênicos, células-tronco foram cultivadas sob hipóxia e analisadas por Western blot, e sobrenadantes analisados por ELISA. Os resultados demonstraram que as células-tronco da papila apical cocultivadas com células endoteliais aumentaram a formação de vasos, onde as células endoteliais formaram a estrutura tronco tubular, enquanto que as células-tronco estavam localizadas adjacentes às células endoteliais, assemelhando-se a pericitos. Em condição de hipóxia, fatores angiogênicos estavam sobrerregulados. Contudo a quantidade de VEGF sobrenadante foi baixa, sugerindo que o VEGF secretado pelas células-tronco pode ser utilizado pelas células endoteliais para acelerar a formação vascular. Os autores concluíram que a hipóxia estimula a resposta angiogênica em células-tronco.

Com base na revisão da literatura acerca da bioengenharia tecidual aplicada à Endodontia, constata-se que os objetivos desta aplicabilidade e dos protocolos de revascularização são distintos. Enquanto a revascularização propõe a apicigênese, a bioengenharia busca a formação de tecido pulpar ou tecido mineralizado para reparação óssea ou dentinária. No entanto, ambos possuem em comum a importância da presença vascular para que suas propostas sejam atingidas; e a bioengenharia demonstra que o processo é bem complexo, e que se baseia na tríade células – arcabouço – moléculas sinalizadoras.

2.3 DESCOBERTA DO VEGF E SUA RELAÇÃO COM A ENDODONTIA

O primeiro relato relacionado ao VEGF está datado no ano de 1983, quando Senger et al. (1983) questionaram o grande acúmulo anormal de fluídos durante o crescimento de tumores. Nesta ocasião, os autores analisaram este processo em porcos da Guiné, hamsters e camundongos que apresentavam maior permeabilidade vascular em relação ao grupo controle. Os aurores afirmaram que este aumento de permeabilidade estaria ligado à presença de um potente fator não

encontrado no plasma ou soro normal. Em 1986, o mesmo grupo de pesquisadores identificou tal fator em humanos portadores de tumor, nomeado fator de permeabilidade vascular (VPF); sendo em 1990 também por Senger et al., analisada sua sequência de aminoácidos, e observada a diferença com outros mediadores de aumento de permeabilidade presentes no plasma e em enzimas glandulares.

Berse et al. (1992) observaram através de análise molecular e hibridização *in situ*, que o gene de expressão do fator de permeabilidade vascular também estava presente em diversos órgãos adultos, tais como pulmão, rins, glândula adrenal, coração, fígado e mucosa do estômago. Segundo os autores, o alto nível deste fator encontrado em células epiteliais do alvéolo pulmonar, glomérulo renal, córtex da adrenal e em miócitos cardíacos sugeriam uma possível função na regulação da permeabilidade microvascular, que é essencial para nutrição tecidual e remoção de catabólitos.

Em 1993, Senger et al. descreveram o fator de permeabilidade vascular, também conhecido como fator de crescimento endotelial (VEGF), como uma citocina multifuncional que age diretamente em células endoteliais através de receptores específicos. Os autores esclarecem seu aumento em células cancerígenas, porém menciona sua participação no processo de reparação através da inflamação crônica e sua presença no desenvolvimento embrionário de diversos órgãos.

Klagsbrun e D'Amore (1996) descreveram que o VEGF é produzido por diversos tipos celulares incluindo células tumorais, macrófagos, células T, células do músculo liso, do rim, queratinócitos, do neurônio e osteoblastos. Ainda, o VEGF foi identificado em 4 tipos – A, B, C, e ligado à proteína – e o tipo A é subdividido em 4 grupos de acordo com o número de aminoácidos de sua cadeia – 121, 165, 189, 206. Segundo os autores, além da proliferação celular, o VEGF possui quimiotaxia que induz a migração de células endoteliais e não-endoteliais como monócitos, células musculares, células epiteliais da retina, osteoblastos, entre outros, e o VEGF165 é o tipo que possui maior potencial mitogênico. Terapia angiogênica induzida por VEGF tem sido proposta no campo da Medicina para o tratamento de tecido isquêmico cerebral e do coração.

Com o conceito de que a exposição pulpar ao LPS bacteriano resulta em aumento de permeabilidade vascular e conseqüentemente ao quadro de pulpíte, Matsushita et al. (1999) verificaram a liberação de VEGF em células da polpa humana expostas ao LPS bacteriano. Células de pré-molares hígidos foram

semeadas e expostas ao LPS de *Prevotella intermedia* e *Escherichia coli*, sendo então verificada a expressão de RNAm do VEGF e sua concentração através de Northern blot e ELISA, respectivamente. Ambas as análises demonstraram que o VEGF estava presente na cultura celular sem exposição ao LPS, todavia, a expressão e concentração foram aumentadas com a presença do LPS.

Buscando entender o mecanismo de ação do VEGF sobre a polpa, Matsushita et al. (2000) observaram a quimiotaxia, proliferação e diferenciação de células da polpa dental. Células da polpa de pré-molares hígidos foram semeadas e levadas ao compartimento superior de uma placa dupla com filtro, sendo colocado no compartimento inferior meio adicionado de VEGF. Após incubação o filtro foi removido, e as células migradas por quimiotaxia ao VEGF foram contadas. Proliferação celular e atividade de fosfatase alcalina foram verificadas a partir do cultivo das células da polpa em meio adicionado de VEGF. Os autores puderam observar grande quimiotaxia com aumento de proliferação celular e produção de fosfatase alcalina, indicando a diferenciação celular em células capazes de produzir tecido mineralizado.

Sob a hipótese de que fatores de crescimento são lançados da matriz dentinária diante injúrias ao complexo dentinho pulpar, Roberts-Clark e Smith (2000) verificaram a presença de fatores angiogênicos na dentina. Fração solúvel e insolúvel da dentina foram submetidas ao teste de ELISA, que demonstrou a presença fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF-AB), fator de crescimento endotelial (VEGF), fator de crescimento de placenta (P1GF), fator de crescimento fibroblástico (FGF2), e fator de crescimento epidérmico (EGF). O VEGF estava pouco concentrado na fração solúvel, porém em grande quantidade na fração insolúvel.

A quantidade da expressão de VEGF e densidade vascular de polpas sadias e inflamadas foi observada por Artese et al. (2002). Polpas sadias e com pulpite irreversível foram removidas de dentes humanos e submetidas à imuno-histoquímica de VEGF e do fator VIII. A análise demonstrou presença de VEGF em ambas as condições pulpares, no entanto, a expressão foi maior na polpa inflamada. Em relação à densidade, maior quantidade vasos foi observada na polpa sadia. Os autores justificam os resultados com base na condição local de cada quadro; polpa com pulpite irreversível provém de grande quantidade de infiltrado inflamatório, e células do sistema imune podem secretar maior quantidade de VEGF, no entanto, a

baixa quantidade de vasos poderia estar relacionada à falha da função vascular e diminuição do fluxo sanguíneo.

Bacteróides pigmentado de preto tem sido encontrado em lesões pulpares e relacionado à sintomatologia dolorosa gerada por mediadores inflamatórios e enzimas de degradação. Neste contexto, Yang et al. (2004) verificaram a influencia destas bactérias na liberação de VEGF na polpa. Fibroblastos de polpa humana foram cultivados e expostos à *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia*, sendo então submetido à RT-PCR. Os resultados confirmaram a hipótese que bacteroides pigmentado de preto induzem ao aumento da expressão de VEGF em fibroblastos da polpa.

Chu et al. (2004) verificaram a indução de VEGF por citocinas pró-inflamatórias em fibroblastos da polpa e gengiva. Fibroblastos do tecido gengival e da polpa de terceiros molares humanos impactados foram removidos e semeadas em meio de cultura. Após exposição à interleucina-1 α (IL-1 α) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) por 2, 6 e 24h, as amostras foram submetidas ao RT-PCR. Ambas as citocinas apresentaram aumento na expressão de VEGF, no entanto, o TNF- α expressou maior quantidade de VEGF nas células da polpa.

Tran-Hung et al. (2006) demonstraram a capacidade de liberação de fatores de crescimento dos fibroblastos da polpa humana após injúria. Primeiramente, fibroblastos da polpa humana foram cultivados em contato direto com células endoteliais, que demonstraram formação de uma rede tubular num período de 6 dias. Num segundo momento, meios condicionados com fibroblastos injuriados mecanicamente e sem injúria foram utilizados para cultivo de células endoteliais, que demonstraram formação vascular em ambas as condições, porém vasos mais densos foram obtidos no meio condicionado por células injuriadas. Imuno-histoquímica revelou baixo nível de VEGF e FGF-2 em fibroblastos da polpa, porém esta expressão aumentou no grupo de células injuriadas. Assim, os autores explicam que a injúria faz que haja maior liberação de VEGF e FGF-2 pelos fibroblastos da polpa ao meio, no qual promoverá maior angiogênese. Fibroblastos de origem não pulpar utilizados como controle não apresentaram nenhuma formação de estrutura vascular no período de 6 dias, demonstrando que o potencial angiogênico do fibroblasto é uma característica da célula pulpar.

A respeito da reação inflamatória, a COX-2 é uma enzima envolvida na produção de diversas prostaglandinas. Assim, Güven et al. (2007) verificou a relação

da COX-2 e do VEGF durante o processo inflamatório pulpar. Polpa inflamada e sadia foram extraídas de terceiros molares humanos e submetidas à imuno-histoquímica do VEGF, COX-2 e CD34. Ambas as condições pulpares apresentaram presença de vasos, porém VEGF e COX-2 não foram expressadas em polpa sadia, sendo fortemente marcadas na polpa inflamada. Os autores sugerem que a COX-2 possivelmente produz o aumento da secreção de VEGF.

Otrock et al. (2007) descreveram uma atualização quanto aos tipos de VEGF e seus receptores. Os autores afirmam a existência de 7 tipos de VEGF - A, B, C, D, E, F, e fator de crescimento placentário (P1GF) – e 5 receptores específicos – VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, e neurofilina 1 e 2 (NP-1, NP-2). A interação do fator de crescimento com seus receptores irão ativar moléculas sinalizadoras que promoverão eventos específicos, tais como migração celular endotelial, aumento de permeabilidade vascular, sobrevivência celular, e proliferação endotelial.

Grando Mattuella et al. (2007) realizaram uma revisão de literatura acerca do VEGF e sua relação com a polpa dentária. Os autores afirmam que o VEGF₁₆₅ é a isoforma mais encontrada de todos os tipos de VEGF, e ele se liga aos receptores VEGFR-1, VEGFR-2 e NP-1. O VEGFR-2 é o que apresenta maior atividade sinalizadora, resultando em grande atividade mitogênica na proliferação de células endoteliais, além de mediar migração celular e permeabilidade vascular. Em relação à polpa dentária, o VEGF parece ter expressão aumentada diante dos processos inflamatórios e agressões químicas ou bacterianas. Os autores destacam a necessidade de mais estudos para verificar a quantidade e localização dos diferentes tipos de VEGF e seus receptores em polpa dentária.

Gonçalves et al. (2007) propuseram verificar a angiogênese em polpa vital humana através de modelo experimental *in vitro* e *in vivo*. Para tal, os autores utilizaram de fatias de molares humanos recém extraídos, onde para o estudo *in vitro*, metade dos espécimes foram cultivados após preparo prévio com VEGF₁₆₅; para o estudo *in vivo*, as fatias de dentina foram implantadas em dorso de rato num período de 7 dias. Ambos os estudos foram submetidos à imuno-histoquímica, e a avaliação feita através de densidade ótica, no qual apresentaram que o VEGF aumentou significativamente a quantidade de microvasos, e a polpa se manteve vital e altamente vascularizada no estudo *in vivo*.

Tran-Hung et al. (2008) verificaram o efeito do monômero de metacrilato hidroxetil-2 (HEMA) liberado em adesivos e cimentos de ionômero de vidro sobre a

liberação de fatores angiogênicos por células injuriadas da polpa humana. A análise através do método de ELISA demonstrou que células intactas da polpa humana apresentavam alta taxa de PDGF-AB, VEGF, FGF-2, nos quais aumentaram significativamente 5 horas após injúria celular, retornando seu valor inicial 1 hora depois. A exposição das células injuriadas ao HEMA resultou em diminuição de FGF-2, aumento de VEGF, e não alterou o PDGF-AB.

Mullane et al. (2008) avaliaram a influência do fator de crescimento endotelial (VEGF) e do fator de crescimento de fibroblasto (FGF-2) na revascularização pulpar. Os autores seguiram a mesma metodologia proposta por Gonçalves et al. (2007), porém com uso de VEGF₁₆₅ ou rhFGF-2 no estudo in vitro, e para o estudo in vivo, preparou a dentina previamente com presença ou ausência de VEGF₁₆₅. Os resultados mostraram que o VEGF e FGF-2 aumentam significativamente a microvascularização pulpar.

Aranha et al. (2010) investigaram a influência da hipóxia sobre o processo de angiogênese em célula da polpa dental. Células-tronco e fibroblastos da polpa dental provenientes de biobanco foram semeadas sob condições de normóxia ou hipóxia, e analisadas por imunocitoquímica para avaliação de fator de transcrição hipóxia-indutível 1 (proteína ativadora de fatores de crescimento pró angiogênicos), e por ELISA para verificar a expressão de VEGF e bFGF. Então, para verificar a formação de rede vascular, o meio condicionado por estas células foram levado a uma matriz de colágeno tipo I gel, sendo incubado novamente com células-tronco ou fibroblastos submetidas à normóxia ou hipóxia. Ainda, células endoteliais cultivadas em meio condicionado foram analisadas por western blot para avaliação de proliferação celular. Os resultados demonstraram que a hipóxia aumentou o nível de HIF-1 e a expressão de VEGF, porém não induziu bFGF. A proliferação celular aumentou em 24 horas após o cultivo sob as duas condições, porém após 72 horas, células endoteliais cultivadas em meio condicionado por fibroblastos em hipóxia proliferaram mais que os demais grupos. Início de formação vascular também foi mais evidente neste grupo. Os autores concluíram que a hipóxia induz resposta pró angiogênica de células específicas, e que o VEGF participa da revascularização em polpa dental hipóxica.

D'Alimonte et al. (2011) buscaram demonstrar através de cultura celular o efeito do VEGF em células-tronco da polpa dental de terceiros molares. Os autores observaram que o VEGF é capaz de aumentar a proliferação das células-tronco, e

que diante de um meio osteogênico, estas células diferenciam-se em osteoblastos, onde o aumento do tempo de contato e concentração do VEGF é proporcional ao crescimento celular.

Zhang et al. (2011) verificaram a ação de componentes da matriz dentinária sobre a angiogênese. Componentes da matriz dentinária foram extraídos a partir da ação do EDTA 17% sobre a dentina de um dente humano extraído. Células endoteliais da veia umbilical foram cultivadas em meio de proliferação celular puro ou suplementado com suramina (inibidor angiogênico) ou fator de crescimento endotelial (VEGF), ou componentes da matriz dentinária em diversas concentrações (0,0001-5 mg/ml) por 11 dias. A angiogênese foi observada através de imunohistoquímica de marcadores endoteliais (PECAM1 e von Villerbrand), e a proliferação celular analisada por coloração em azul de Trypan. Os resultados demonstraram que a ação dos componentes da matriz dentinária foi dose dependente, ou seja, concentrações mais baixas apresentaram atividade pró-angiogênica (até 0,01 mg/ml), e altas concentrações diminuiu a angiogênese. A suramina inibiu o crescimento de vasos formados, e o VEGF aumentou com semelhança aos componentes da matriz dentinária. Os autores concluíram que componentes lançados da matriz dentinária podem contribuir na angiogênese durante a regeneração pulpar.

Bletsa et al. (2012) verificaram a presença do VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, VEGFR-2 e VEGFR-3 em periodontite apical induzida em molares de ratos. Os autores identificaram a presença dos VEGFRs em células ósseas e vasos sanguíneos em tecidos normais, sugerindo a funcionalidade dos VEGFs no remodelamento tecidual ósseo e células endoteliais. Na periodontite apical, tanto os VEGFs quanto os VEGFRs apresentaram-se sobrerregulados e expressados em diversas células ósseas, imunológicas e endoteliais. Análise histopatológica pôde demonstrar áreas de reabsorção radicular promovida pela ativação de osteoclastos através de VEGFR-2 e VEGFR-3 em sua superfície.

Diante de uma série de alterações sistêmicas adquiridas pelo diabetes mellitus, e dentre a regeneração tecidual, Ilic et al. (2012) analisaram o nível de VEGF e BMP-2 secretados na polpa de pacientes saudáveis e com diabetes tipo II. Polpas humanas de pacientes saudáveis ou portadores de diabetes tipo II foram coletadas de dentes hígidos ou de dentes tratados por capeamento indireto, e analisadas por ELISA. Os resultados expressaram maiores níveis de ambos os

fatores em dentes hígidos de pacientes diabéticos. Entretanto o capeamento indireto leva à queda destes valores em ambos os tipos de pacientes.

Lee et al. (2012) avaliaram o efeito do VEGF e do FGF-s sobre células-tronco do ligamento periodontal. Células-tronco do ligamento periodontal de terceiros molares humanos foram cultivados na presença de VEGF ou FGF-2 ou na combinação de ambos. Para análise in vitro, a taxa de proliferação foi verificada por MTT, e a diferenciação celular observada através do acúmulo de cálcio evidenciado com vermelho de alizarina e teste da atividade de fosfatase alcalina após cultivo em meio osteogênico. Para análise in vivo, as células tratadas foram encapsuladas em carreadores e implantadas em dorso de camundongos por 8 semanas, e assim submetidas à coloração por HE e imuno-histoquímica (Runx-2, colágeno tipo I, fosfatase alcalina). Os resultados demonstraram que o VEGF aumentou acúmulo de nódulos de cálcio, atividade de fosfatase alcalina e formação de tecido duro, no entanto não promoveu aumento de proliferação celular. O FGF-2, por sua vez, aumentou a proliferação celular, porém, diminuiu o acúmulo de cálcio, atividade de fosfatase alcalina e sub regulou os níveis de marcadores osteogênicos. A associação de ambos os fatores obteve aumento de proliferação celular, porém sem a presença de formação de nódulos e atividade de fosfatase alcalina suprimida. O estudo in vivo demonstrou estrutura de tecido mineralizado em volta dos carreadores, no entanto o VEGF produziu tecido mais duro, e o FGF-2 produziu tecido menos duro que o controle. Assim, os autores discutem que a interação dos fatores de crescimento pode influenciar na proliferação e diferenciação celular.

Prolil hidroxilase é uma proteína que diminui a angiogênese pela inibição da ativação de VEGF. Inibidores desta proteína têm sido utilizados farmacologicamente em pacientes diabéticos para aumentar a capacidade de regeneração tecidual através de angiogênese. Assim, Müller et al. (2012) verificaram o efeito de inibidores de prolil hidroxilase sobre células derivadas da polpa dental. Células da polpa dental humana foram extraídas de terceiros molares e cultivadas com a presença de diferentes concentrações de inibidores de prolil hidroxilase (N-dimetil glicina, desferroxamina, mimosina, cloreto de cobalto). Viabilidade celular foi analisada através de MTT, ação dos inibidores sobre ativadores de VEGF foi observada por western blot, e a expressão de VEGF por ELISA. Os resultados demonstraram que todos os inibidores em altas concentrações reduziram a viabilidade e proliferação celular, porém em concentrações não tóxicas elevaram os níveis de VEGF e de

ativadores intracelular. Os autores concluíram que inibidores de prolil hidroxilase podem estimular a produção de VEGF em células da polpa dental, sugerindo aumento da capacidade pró angiogênica.

A proliferação e diferenciação endotelial envolve uma série de mecanismos não bem compreendidos. Neste sentido, Bento et al. (2013) propuseram entender melhor este processo, analisando moléculas sinalizadoras como o STAT3, ERK e Akt. Para o estudo in vitro, células-tronco de dentes decíduos humanos esfoliados foram cultivadas com meio de diferenciação endotelial suplementado com VEGF₁₆₅, e analisadas por Western blot e RT-PCR após marcação endotelial do VEGFR-2 e CD31. Para o estudo in vivo, fatias de dentina com arcabouço semeado com células-tronco e um silenciador de VEGFR-1 (MEK1) foram implantadas no dorso de rato por 28 dias e então processadas para imuno-histoquímica do CD31. No estudo in vitro, houve marcação positiva do VEGFR-2 e CD31, indicando a diferenciação das células-tronco para endotélio. No estudo in vitro, a expressão de CD31 foi reduzida pela presença do MEK1. Os autores afirmam que o meio angiogênico suplementado com VEGF induz potente ativação do ERK e Akt que favorecem a diferenciação celular, porém inibe a fosforilação do STAT3 que favorece a manutenção das células indiferenciadas. A inibição do ERK restaura a fosforilação do STAT3, e assim inibe a diferenciação endotelial. Assim, concluíram que há uma forte relação entre VEGF/MEK1/ERK como chave reguladora da diferenciação endotelial de células-tronco da polpa dental.

Apesar da existência de vários tipos de VEGF e VEGFR, os diversos estudos sobre a proliferação e diferenciação endotelial na polpa dental focam diretamente no VEGF-A e VEGFR-2, por possuírem maior participação na angiogênese. No entanto, Virtej et al. (2013) chamam atenção para os demais tipos de VEGF e VEGFR, onde cada tipo de VEGF se liga a VEGFR com funções específicas. Enquanto o VEGFR-2 media a mitogênese, migração celular e permeabilidade vascular, o VEGFR-1 não apresenta estas respostas; e o VEGFR-3 está ligado à formação de vasos linfáticos. Assim, os autores propuseram investigar a presença dos demais tipos de VEGF e VEGFR na polpa humana. Imuno-histoquímica e dupla imunofluorescência foram utilizadas para expressar e localizar os tipos de VEGF e VEGFR, e o qPCR foi utilizado para investigar os genes sinalizadores. Todos os VEGF (-A, -B, -C, e -D) foram expressos na polpa, podendo exercer ambos os efeitos autócrino (ação sobre ela mesma) e parácrino (ação sobre outra célula) em vasos sanguíneos e células

imunes que apresentaram VEGFR-2 e VEGFR-3. Macrófago com receptor endotelial envolvido em angiogênese também estavam presentes na polpa, porém vasos linfáticos não foram detectados. Vinte e seis de 84 moléculas sinalizadoras de VEGF foram detectadas com alto nível de quantificação. Assim, os autores concluíram que a polpa humana apresenta vários tipos de VEGF com alta quantidade de moléculas sinalizadoras envolvendo resposta imune e atividade vascular.

Dando continuidade a estudos anteriores, Virtej et al. (2013) verificaram a presença do VEGF -A, -C, e -D, e expressão de VEGFR -2, e -3 em lesões periapicais de humanos. Tecidos da região periapical de pacientes portadores de periodontite apical crônica foram utilizados para a proposta deste estudo, e amostras de ligamento periodontal sadio foram utilizadas como controle. Imuno-histoquímica e dupla imunofluorescência foram utilizadas para expressar e localizar os tipos de VEGF e VEGFR, e o qPCR foi utilizado para investigar os genes sinalizadores. Todos os VEGFs e VEGFRs investigados foram identificados em vasos sanguíneos e células imunológicas – neutrófilo, macrófago, linfócito T, e linfócito B -, porém não se observou presença de vasos linfáticos. Moléculas sinalizadoras envolvidas na angiogênese mediada por VEGF foram identificadas na lesão, porém, com níveis de quantificação desregulada em relação ao ligamento periodontal sadio. Os autores concluíram que a lesão periapical pode alterar a mediação angiogênica do VEGF e suas moléculas sinalizadoras.

Cai et al. (2014) analisaram a formação de osso heterotópico e neovascularização em matriz de fibrina gel variando a proporção de BMP-2 e TG-VEGF. Tubos com contendo a matriz gel e BMP-2 e TG-VEGF em diferentes proporções (1:0, 10:1, 5:1, 3:1) foram implantados em músculo esquelético de coelhos brancos da Nova Zelândia. Após 8 semanas os animais foram sacrificados e as amostras submetidas à microtomografia computadorizada, processamento histopatológico por HE, e imuno-histoquímica do anti-CD31. Os autores observaram células endoteliais em todas as amostras com TG-VEGF, independente da proporção. No entanto a formação de osso heterotópico foi significativamente aumentada no grupo com BMP-2 + TG-VEGF na proporção 10:1, demonstrando a ação benéfica do VEGF na formação de osso heterotópico, e que o efeito sinérgico de fatores de crescimento está interligado à proporção utilizada dos mesmos.

O SIRT1 e o VEGF são dois sinalizadores presentes no processo inflamatório, Shin et al. (2014) verificaram se estes dois sinalizadores são responsáveis pela

angiogênese induzida pelo TNF- α e LPS. Células-tronco da polpa humana provenientes de biobanco foram cultivadas na presença de TNF- α e LPS por 24 horas, sendo então as amostras analisadas por RT-PCR e western blot. O meio de cultura foi submetido ao teste de ELISA para verificar a concentração de VEGF, e utilizado para cultivo de células endoteliais, sendo posteriormente analisada a formação de vasos. Teste de migração celular também foi realizado com meio de cultura condicionado e células endoteliais. A ação sinérgica do TNF- α e o LPS promoveu aumento da expressão de SIRT1 e VEGF regulados por moléculas sinalizadoras. O tratamento com meio condicionado resultou na migração celular induzida e formação de vasos alongados e robustos. Assim, foi concluído que TNF- α e o LPS levam à sobreregulação de SIRT1 e VEGF, promovendo angiogênese.

Li et al. (2015) questionaram alguns substratos injetáveis utilizados como preenchedores durante a regeneração de tecidos moles, e afirmaram que estes produtos, na maioria das vezes, possuem inadequada neovascularização, que podem levar à necrose. Neste contexto, os autores propuseram um hidrogel derivado de gelatina injetável capaz de controlar a liberação de fatores de crescimento endotelial para induzir angiogênese. Tiramina é introduzida na gelatina para promover ligação enzimática e formar um gel após a injeção, e a heparina é utilizada para ligação ao VEGF incorporado na gelatina. Assim, a heparina protege o VEGF de denaturação e degradação proteolítica, e controla a liberação do mesmo. Estudo in vitro confirmou a alta bioatividade do VEGF durante 3 semanas, e a implantação do biogel experimental em dorso de ratos por 2 semanas apresentou angiogênese aumentada.

Diante da literatura descrita, observa-se que o histórico do VEGF desde a sua descoberta é curto, e as pesquisas aplicadas na Odontologia, e mais especificamente na Endodontia estão apenas em seu estágio inicial. Sua presença no tecido pulpar, tanto na condição fisiológica quanto patológica é clara, e tem forte ligação com a função de homeostasia. Devido às suas características de promover proliferação, diferenciação e quimiotaxia, e sobretudo, ser o maior fator angiogênico, ele se destaca, e sugere-se que sua aplicabilidade pode vir a contribuir com a neoformação tecidual.

2.4 ATENÇÃO METODOLÓGICA

O modelo metodológico utilizado na execução de um experimento é um ponto importante para se obter resultados mais próximos da realidade clínica. Assim, estudos *in loco*, podem ser observados na literatura. Nisto, Nygaard-Östby (1961) utilizou de cães e humanos para verificar a influência do coágulo sanguíneo na reparação dentes com obturação além do limite de trabalho. Erausquin e Muruzábal (1968) preferiram o uso de ratos para analisar o crescimento de tecido vital e deposição de tecido mineralizado em dentes com ápice aberto. Já, Ham et al. (1972) utilizaram de macacos para avaliar diferentes protocolos de apicificação.

Assim, sucessivos estudos vieram utilizando estes animais para avaliação de revascularização, como o de Myers e Fountain (1974) que utilizaram macacos e Skoglung et al. (1978) que utilizaram cães. Machado (1992) discute em sua revisão de literatura sobre o potencial de osteoindução da dentina que o modelo animal pode influenciar nos resultados da pesquisa, e que o rato é uma opção com resultados satisfatórios.

Além do modelo animal, o processamento dos espécimes é parte importante da pesquisa. Massa e Arana-Chavez (2000) afirmam que alguns protocolos convencionais de fixação e desidratação expõem os tecidos em tempos prolongados a soluções aquosas, e isto pode interferir na estrutura do tecido pela perda de proteínas. Assim, os autores descrevem uma técnica de fixação com tempo significativamente reduzido com o uso de irradiação de micro-ondas.

A partir do estudo de Banchs e Trope (2004) que descreveram um protocolo de revascularização com apresentação de um caso clínico, houve o incentivo de posteriores publicações de casos aplicados em humanos, porém a avaliação de resultados se baseava em sinais radiográficos.

A necessidade de estudar histologicamente o tecido intracanal formado pela revascularização, fez com que estudos em animais voltassem a ser utilizados nestas pesquisas. Thibodeau et al. (2007) utilizaram de cães para este propósito, sendo seguido por Da Silva et al. (2010) e Yamauchi et al. (2011a).

Scarparo et al. (2011), buscando um modelo experimental animal para o estudo de regeneração pulpar, observaram os estágios de maturação apical e desenvolvimento de periodontite apical em molares de ratos. Os autores descreveram que a raiz em dentes com polpa vital está completamente formada em

13 semanas, e que sete semanas é tempo suficiente para desenvolvimento de abscesso periapical nos casos de polpa necrosada. Para demonstrar a aplicabilidade do modelo nos estudos de regeneração pulpar, canais com ápice aberto e periodontite apical induzida foram submetidos ao protocolo de revascularização. Os resultados demonstraram redução da periodontite apical e aumento do comprimento radicular no tempo de seis semanas. Deposição de tecido mineralizado semelhante ao cimento na região apical e superfície externa da raiz foram vistas através dos cortes histológicos. Os autores concluíram que o protocolo utilizado é capaz de reduzir a periodontite apical, e que o modelo animal em ratos poderá ser utilizado para melhoria das estratégias terapêuticas em Endodontia. Vantagens como baixo custo e resposta biológica rápida são fatores favoráveis citados pelos autores.

Torabinejad e Faras (2012) justificaram a extração de um dente humano previamente submetido à revascularização, e assim realizaram o processamento histológico para o estudo do tecido obtido pela tratamento anterior. O mesmo aconteceu no estudo de Martin et al. (2013).

No entanto, para mais uma opção de modelo animal destinado ao estudo de terapias endodônticas, Torabinejad et al. (2015) apresentaram a utilização de furões, que demonstraram ser uma boa alternativa ao estudo de endodontia regenerativa.

Sendo assim, observa-se que vários modelos in vivo têm sido sugeridos para o estudo de terapias relacionadas à Endodontia, e que diante das condições éticas, a escolha de um modelo animal proporciona a possibilidade de análises histológicas para melhor compreensão dos fenômenos moleculares da neofirmação tecidual. No entanto, atenção especial ao processamento deste material é importante para melhor preservação do espécime após o procedimento experimental.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo foi analisar o efeito do fator de crescimento endotelial (VEGF) na angiogênese após pulpectomia de canais radiculares em molares de rato com apicigênese completa

4 MATERIAL E MÉTODOS

Primeiramente o projeto foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (CEUA-FOUSP) sob o protocolo de número 018/2014, e após sua aprovação, 12 ratos machos, da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) com idade de 13 semanas, foram adquiridos do biotério de criação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

4.1 PREPARO DOS ANIMAIS

Os animais foram recebidos do biotério de criação em pelo menos 07 dias antes do experimento para que estes fossem habituados em suas gaiolas, evitando-se assim o stress dos animais. Assim, eles foram mantidos na quantidade de 04 animais por gaiola nas dimensões de 45 x 30 x 15 cm (Beiramar, São Paulo, SP, Brasil) com maravalha. O ambiente foi climatizado em 23°C em ciclo claro/escuro de 12 horas, e alimentação livre com ração em pellets para roedores e água *ad libitum*.

Na data do experimento, o animal foi individualmente removido de sua gaiola, pesado, e anestesiado via intramuscular, utilizando mistura de Xilazina 2% (Anasedan, Ceva, Paulínia, SP, Brasil) com Ketamina 10% (Dopalen, Ceva, Paulínia, SP, Brasil) na proporção de 1:1, e dose de 0,1 ml /100 g de peso corpóreo, e fixado numa mesa operacional com o ventre voltado para cima.

Como abridor de boca (Figura 4.1A), um compasso com trava rosqueável (CTG-2, Daiwa-Göller, São Paulo, SP, Brasil) foi adaptado com alças confeccionadas de fio ortodôntico 08 (Morelli, Sorocaba, SP, Brasil) fixado nas extremidades livres (Figura 4.1B). Um afastador de bochecha também foi confeccionado com fio ortodôntico 08 moldado em forma de alça e dobrado no ângulo de 90° (Figura 4.1C).

Figura 4.1 – (A) Abridor de boca e afastador de bochecha. (B) Compasso com trava rosqueável adaptado. (C) Afastador de bochecha confeccionado com fio de ortodontia

4.2 PREPARO ENDODÔNTICO

Com o animal fixo e boca aberta, iniciou-se o acesso à câmara pulpar do primeiro molar superior utilizando broca esférica carbide 1/2 em baixa rotação (microdont, São Paulo, SP, Brasil) (Figura 4.2A). A polpa coronária foi removida com auxílio de curetas de pulpotomia número 1 (Fava, São Paulo, SP, Brasil), e realizada irrigação com hipoclorito de sódio 2,5% em tubete (Fórmula e Ação, São Paulo, SP, Brasil) montados em seringa tipo carpule (SSWhite, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e agulha odontológica curta (Injex, Ourinhos, SP, Brasil). Aspiração concomitante foi realizada com cânula de aspiração ligada em bomba à vácuo portátil (Neovoni, São Paulo, SP, Brasil). Bolinhas de algodão esterilizadas trocadas com frequência serviram para manter o campo operatório seco livre de saliva. Então, o canal méso

vestibular foi localizado e explorado com uma lima K10 (Dentsply Maillefer, Ballaigues, VD, Switzerland) (Figura 4.2B).

Então, a polpa radicular foi removida através da instrumentação do conduto com preparo a partir de uma lima inicial K15 até K25 associado ao total de 1,8 ml de hipoclorito de sódio 2,5% (Figura 4.2C). O limite de trabalho estabelecido foi de 2 milímetros seguindo estudos pilotos e confirmada pela sensação tátil. Para controle da medida, as limas eram marcadas no comprimento de trabalho com uma caneta marcadora permanente de ponta média (Pilot Pen, São Paulo, SP, Brasil), e quando necessária, a lima era dobrada para facilitar a sua inserção ao canal radicular que possui inclinação para mesial. Irrigação final foi realizada com mais 1,0 ml de hipoclorito de sódio 2,5% seguido de 1,0 ml de EDTA 17% (Fórmula e Ação, São Paulo, SP, Brasil), e os canais foram secos com cones de papel número 25 (Dentsply Maillefer, Ballaigues, VD, Switzerland).

Com uma lima K8, o forame apical foi localizado e ampliado até uma lima K20. Sangramento periapical foi induzido através da inserção de uma lima K15 ultrapassando 1 milímetro do limite de trabalho (Figura 4.2D).

Todo o procedimento operatório foi feito com uso de microscópio operatório de mesa (DF Vasconcellos, Valença, RJ, Brasil).

Figura 4.2 – Tratamento no primeiro molar superior. (A) cirurgia de acesso com broca esférica em baixa rotação. (B) Localização do canal mésio vestibular. (C) Irrigação do canal radicular com hipoclorito de sódio 2,5% em tubete após instrumentação. (D) Indução de coágulo sanguíneo

4.3 PREPARO DO VEGF

Para reconstituição do VEGF liofilizado (proteína recombinante VEGF₁₆₅ de rato; Prospec, Ness-Ziona, MH, Israel), seguiram-se as recomendações do fabricante: 100 µg de VEGF liofilizado para 1,0 mL de água milli-Q. Logo, 0,1 mL de água milli-Q foi adicionado a 10 µg de VEGF liofilizado e levado ao vórtex. Para aquisição da concentração de 50 ng/mL, 1,0 µL de VEGF reconstituído foi diluído em

1999 μL de água milli-Q ($50 \text{ ng/mL} = 0,005\mu\text{g}/0,1\text{ml}$; logo, a proporção de $10 \mu\text{g}$ para $0,005 \mu\text{g}$ é 2000 vezes).

4.4 DIVISÃO DOS GRUPOS

Os dentes foram divididos em dois grupos ($n=12$ por grupo), sendo que os dentes localizados do lado direito da arcada corresponderam ao grupo 1, e do lado esquerdo ao grupo 2, como descrito a seguir:

Grupo 1 (controle) – O sangramento do periápice foi estimulado até o total preenchimento do canal com sangue, e então, deixado em repouso durante 5 minutos para a formação de coágulo.

Grupo 2 – foi estimulada a formação de coágulo como descrito no grupo anterior, e então, com uma micropipeta de $0,5 - 10\mu\text{L}$ (Nichiryo, Koshigaya, JP-11, Japão), $5 \mu\text{L}$ de VEGF preparado na concentração de 50 ng/mL foi levado à câmara pulpar, e com uma lima K10 sendo levada até o ápice, o VEGF foi incorporado ao coágulo, ficando em repouso por mais 5 minutos.

O acesso coronário foi selado com ionômero de vidro fotopolimerizável (Vitremmer, 3M, Saint Paul, MN, USA) utilizado conforme as recomendações do fabricante: a cavidade foi seca com bolinha de algodão esterilizada, e o primer vitremer foi aplicado durante 30 segundos sobre a dentina, excesso foi removido com microbrush extra fino (KG Sorensen, Cotia, SP, Brasil), e fotopolimerizado por 20 segundos. Vitremer pó e líquido foi espatulado na proporção de 1 medida de pó para 1 gota de líquido, e levado à cavidade com auxílio de um explorador de ponta reta (SSWhite, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), sendo então fotopolimerizado por 40 segundos. Com auxílio de um microbrush, uma camada de gloss foi aplicada sobre a superfície, e fotopolimerizada por 20 segundos.

4.5 PÓS OPERATÓRIO

Logo após o procedimento experimental, os animais foram colocados em uma gaiola individual com maravalha e observados até o retorno da anestesia. Após o retorno, o animal voltou para a gaiola inicial, tendo dieta livre como descrito inicialmente. Diariamente, os animais operados foram observados quanto à sua mudança de comportamento (indício de sintomatologia dolorosa).

Após período de 60 dias, os animais foram sacrificados por decaptação, e o maxilar dissecado com auxílio de um bisturi número 11 (Embramac, Campinas, SP, Brasil), alicate de cutícula (Mundial, Caxias do Sul, RS, Brasil) e tesoura cirúrgica curva (ABC, São Paulo, SP, Brasil). Após remoção de todo o tecido mole e excesso de tecido duro as amostras foram fixadas.

4.6 AQUISIÇÃO DOS CORTES

4.6.1 Fixação

A fixação dos espécimes seguiu o protocolo padrão do Laboratório de Biologia Oral da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo: as amostras foram imersas em 30 mL de fixador composto de glutaraldeído 0,1% + 4% de formaldeído em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 preparado 30 minutos antes do sacrifício dos animais. Então, o fixador com o espécime foi levado para 3 ciclos de 5 minutos cada, em aquecimento controlado de 37 °C em micro-ondas (Pelco 3400, Ted Pella, Redding, CA, USA) com agitação por bolhas de ar (cooler pump Pelco 3420, Ted Pella, Redding, CA, USA), e mais 4 horas à temperatura ambiente em agitação lenta, e deixada em 4 °C overnight (Massa; Arana-Chavez, 2000).

4.6.2 Parafinização

Após fixação, as amostras foram lavadas em 6 ciclos de 10 minutos em tampão fosfato 0,05 M, e descalcificadas por imersão em EDTA 4,13% pH 7,2 renovado diariamente por 40 dias. Após este período, as amostras foram novamente lavadas em tampão fosfato, e com auxílio de uma lâmina de barbear foram clivadas removendo excesso de tecido ao redor do dente. Um bisel na superfície oclusal, indo da borda oclusal mesial até o rebordo ósseo distal, foi realizado para compensar a inclinação da raiz mesial e deixá-la mais perpendicular no momento da inclusão e corte.

Nova lavagem foi realizada com 6 ciclos de 10 minutos em tampão fosfato, e então, feita a desidratação através de imersão em bateria de etanol ascendente: 30% - 30% - 50% - 50% - 70% - 70% - 80% - 90% - 95% - 95% - 100% - 100% - 100% - 100%, com posterior clarificação utilizando 3 banhos em xilol, seguido de infiltração com 3 banhos de paraplast (Sigma-Audrich, Saint Louis, MO, USA) aquecida em temperatura entre 56 a 60 °C.

4.6.3 Inclusão

Para inclusão, com auxílio de uma pinça aquecida (SSwhite, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), as amostras foram posicionadas no molde preenchido com paraplast aquecido, com a superfície oclusal voltada para o fundo do molde. Assim o cassete de identificação foi posicionado e completado com paraplast, sendo então levado para refrigeração.

Após resfriamento, a amostra incluída foi removida da forma, e levada em -15 °C por 1 hora, e então, posicionada no micrótomo para aquisição de secções transversais seriadas de 5 µm. As fatias foram imersas em água à temperatura ambiente e depois em água à 40 - 45 °C, e assim, posicionadas sobre uma lâmina previamente identificada.

Neste momento, cada corte foi intercalado entre lâmina não silanizada para coloração em HE, e silanizada para imuno-histoquímica (Sigma-Audrich, Saint Louis,

MO, USA). O ponto inicial dos cortes válidos foi estabelecido com aparecimento do canal sem a furca, e o momento final foi onde a luz do canal não fosse mais visualizada.

Para definir os diferentes terços, o número total de cortes válidos foi dividido por 2, o que originou a altura do terço médio. Este valor somado a 3 cortes para cervical e 3 cortes para apical definiu o intervalo médio. Os primeiros 7 cortes cervicais válidos corresponderam ao terço cervical, e os 7 últimos cortes apicais válidos corresponderam ao terço apical. Um corte em cada terço de cada sequência (lâmina não silanizada e silanizada) foi escolhido para processamento histológico por HE e imuno-histoquímica.

4.7 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

4.7.1 Coloração por HE

Para desparafinização, coloração e montagem, as amostras foram levadas a 60 °C em estufa durante 1 hora, sendo então, imersas em: xilol – xilol – etanol 100% - etanol 95% - etanol 70% - água destilada – Hematoxilina de mayer por 3 minutos – água corrente por 10 minutos – mergulho adicional em água destilada – Eosina alcoólica por 2 minutos – 3 mergulhos em água destilada – seguido de desidratação em etanol 95% – etanol 100% - etanol 100% - etanol 100% / xilol 1:1 – xilol – xilol, sendo então montada com Entellan (Merck, Darmstadt, HE, Deutschland) e lamínula.

4.7.2 Imuno-histoquímica

O processamento imuno-histoquímico foi realizado utilizando Kit da DAKO Cytomation EnVision + System HRP coelho (AEC) (K4008, Dako, Carpinteria, CA, USA) e anticorpo policlonal coelho anti-Factor VIII (Bioss, Woburn, MA USA): As

lâminas foram pré-aquecidas por 15 minutos à temperatura de 60°C, seguida de desparafinização através de xilol aquecido a 60°C, e de xilol na temperatura ambiente por 15 minutos cada. Então, foi realizada hidratação com bateria de etanol: 100% - 100% - 95% - 90 % - 80% - 70%, seguida de recuperação antigênica através de imersão em tampão citrato pH 6 em banho maria à temperatura de 60 a 95 °C por 20 minutos. Após 2 lavagens em água destilada, 1 gota de bloqueador (peroxidase block, Dako) foi aplicada em cada corte e mantida por 5 minutos para o bloqueio de peroxidase endógena.

Nova lavagem com água destilada e 2 vezes o TRIS por 2 minutos cada foi realizada, e as bordas de cada corte secadas cuidadosamente com auxílio de uma gaze. Assim, foi aplicada uma gota do anticorpo primário na concentração de 1:300 (1 µL de anticorpo em 299 µL de tampão PBS) sobre cada corte, e mantidas no escuro por 6 horas.

Duas lavagens com TRIS por 5 minutos foram feitas, as bordas dos cortes foram secas cuidadosamente, e 1 gota do anticorpo secundário e sistema de detecção (Labelled polymer – HRP, anti-rabbit, Dako) foi aplicada sobre cada corte por 30 minutos em ciclo escuro, seguido de mais 2 lavagens em TRIS por 5 minutos cada.

Assim, foi aplicada sobre o corte, 1 gota da solução de cromógeno AEC (AEC + substrate chromogen, Dako), mantido em ciclo escuro por 30 minutos, seguido de mais 2 lavagens em TRIS por 5 minutos cada.

As lâminas foram imersas em Hematoxilina de Mayer (Sigma-Audrich, Saint Louis, MO, USA) por 1 minuto para contra coloração, sendo em seguida lavadas 3 vezes por 5 minutos cada em solução de hidróxido de amônio (Merck, Darmstadt, HE, Deutschland) diluído (2,5 ml de hidróxido de amônio para 1 litro de água milli-Q). Sendo então montada com meio de montagem aquoso (Abcam, Cambridge, MA, USA) e lamínula.

Para grupo controle da imuno-histoquímica, os segundos molares superiores hígidos foram utilizados e processados na mesma forma descrita.

4.8 ANÁLISE DAS AMOSTRAS

Todos os cortes foram vistos em microscópio de luz (BX60, Olympus Optical, Tokyo, JHS, Japan) integrado à câmera de captura (DP72, Olympus Optical, Tokyo, JHS, Japan) com os aumentos de 40x, 100x, 200x e 400x, sempre focalizando primeiro, o centro da luz do canal. Análise morfológica do tecido formado intracanal foi realizada através da coloração de HE. Os cortes adquiridos e submetidos à imuno-histoquímica foram analisados pela positividade e negatividade da expressão do anticorpo angiogênico, sendo notada o tipo de marcação (bem definida ou difusa) nos diferentes terços. A formação e presença de vascularização funcional madura nos cortes que apresentaram negatividade foram confirmados pela análise em HE. Imagens ilustrativas foram adquiridas através do software Cell-F 3.4 (Olympus Soft Imaging Solutions GMBH, Münster, NW, Deutschland).

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE MORFOLÓGICA

A análise morfológica do tecido neoformado no canal méso vestibular foi observada através da coloração em HE, no qual revelou que as secções apresentaram formação de tecido conjuntivo frouxo em ambos os grupos e todos os terços. Em nenhum dos tecidos formados se observou odontoblastos (Figura 5.1B), em contraste com a polpa localizada nos canais não instrumentados (Figura 5.1C).

Figura 5.1 – Fotomicrografia mostrando todos os canais do primeiro molar superior em corte transversal. Em (B) canal méso vestibular tratado apresentando formação de tecido conjuntivo frouxo sem a presença de odontoblastos. Em (C) canal méso lingual não instrumentado, mantendo a polpa vital caracterizada pela presença da camada de odontoblastos

O terço cervical dos dois grupos apresentou preenchimento total do canal méso vestibular com tecido neoformado. No entanto, tecido necrótico rodeado por fibras colágenas e distribuídos em diversos pontos espalhados na circunferência do canal tratado foram observados em várias amostras neste nível, estando em maior evidência nos dentes do grupo tratado somente com coágulo sanguíneo (Figura 5.2A).

Figura 5.2 – Fotomicrografia do corte transversal do terço cervical do canal méso vestibular corado em HE. (A-B) Grupo tratado somente com coágulo apresentando tecido necrótico em pontos isolados e bem evidentes (setas). (C-D) Grupo tratado com coágulo adicionado de VEGF apresentando tecido necrótico em menor volume e evidência

No terço médio, diversas amostras ainda apresentava tecido necrótico rodeado por fibras colágenas e bem evidente em meio do tecido conjuntivo no grupo tratado somente com coágulo (Figura 5.3A), enquanto as amostras do grupo

adicionado de VEGF apresentaram diminuição de pontos necróticos não sendo visualizados de forma expressiva (Figura 5.3B).

Figura 5.3 – Fotomicrografia do corte transversal do terço médio do canal méso vestibular corado em HE. (A) Grupo tratado somente com coágulo apresentando tecido necrótico ainda bem evidente (seta). (B) Grupo adicionado de VEGF apresentando menos tecido necrótico em evidência

No terço apical, tecido necrótico ainda estava evidente em algumas amostras do grupo tratado somente com coágulo (Figura 5.4A); e no grupo adicionado de VEGF, somente algumas secções possuíam pontos necróticos discretos e perceptíveis (Figura 5.4B). Neste terço foi comum a observação da junção dentina – cimento.

Figura 5.4 – Fotomicrografia do corte transversal do terço apical do canal mésio vestibular corado em HE. (A) Grupo tratado somente com coágulo apresentando tecido necrótico ainda bem evidente (setas). (B) Grupo adicionado de VEGF apresentando tecido necrótico menos evidente (setas)

Algumas amostras, em menor proporção, apresentaram a formação de um tecido desenvolvido altamente celular com presença de fibroblastos e de vasos funcionais preenchidos de células sanguíneas. Tal quadro foi encontrado em secções dos três terços no grupo adicionado de VEGF (Figura 5.5A, B, D), todavia, no grupo tratado somente com coágulo, isto só foi observado nos terços médio e apical (Figura 5.5C, E).

Figura 5.5 – Fotomicrografia do corte transversal de diferentes terço do canal méso vestibular corado em HE. Note a presença de vasos funcionais preenchidos por células sanguíneas (setas) nos terços médio (B), e apical (E) do grupo tratado somente com coágulo, e cervical (A), médio (C), e apical (E) do grupo adicionado de VEGF

Ainda, em algumas secções do terço médio e apical em ambos os grupos, foi possível observar a deposição de um tecido lacunar semelhante à dentina terciária e/ou cemento à parede do canal (Figura 5.6).

Figura 5.6 – Fotomicrografia mostrando tecido com aspecto lacunar (setas) no canal radicular do primeiro molar superior em corte transversal. (A) Terço médio. (B) Terço apical

Durante a análise das secções do terço apical de ambos os grupos tratados, foi frequente a observação de reabsorção radicular externa limitada ao cemento acompanhada de células inflamatórias, quadro não observado nas regiões média e cervical (Figura 5.7).

Figura 5.7 – Fotomicrografia do terço apical do canal mésio vestibular corado em HE. Reabsorção radicular externa em cemento (c) não atingindo dentina (d), e acompanhado de células inflamatórias (setas)

5.2 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA

A análise imuno-histoquímica demonstrou positividade para o anticorpo anti-fator-VIII recombinante no tecido neoformado na maioria dos espécimes de ambos os grupos e secções (Figuras 5.8 e 5.9). Marcações caracterizadas no tipo difusa e bem definida demonstraram a angiogênese em dois estágios de maturação da formação vascular: inicial e final, respectivamente. Além disso, negatividade ao anticorpo anti-fator-VIII recombinante também foi observada em alguns espécimes.

Predominância de marcação difusa nos terços cervical e médio (Figura 5.8D, E), e marcação bem definida no terço apical (Figura 5.8C) foram observadas no grupo tratado somente com coágulo sanguíneo; havendo algumas secções não predominantes no terço cervical e médio com marcação do tipo bem definida (Figura 5.8A, B), e difusa no terço apical (Figura 5.8F). Negatividade de marcação ao anticorpo anti-fator VIII recombinante foi observada nos terços médio e apical de somente uma amostra neste grupo (Figura 5.8G, H), fato não observado em nenhuma secção do terço cervical.

Figura 5.8 - Fotomicrografia do canal méseo vestibular tratado somente com coágulo sanguíneo submetido à imuno-histoquímica para expressão de angiogênese. Positividade com marcação bem definida nos terços cervical (A), médio (B), e apical (C). Positividade com marcação difusa nos terços cervical (D), médio (E), e apical (F). Negatividade nos terços médio (G), e apical (H)

No grupo tratado grupo tratado com VEGF₁₆₅ recombinante, houve predominância de marcação bem definida em todos os terços (Figura 5.9A-C), porém também foi observadas marcações do tipo difusa e marcação negativa (Figura 5.9D-I). Negatividade estava presente em mais de uma amostra neste grupo, porém não foi predominante.

Figura 5.9 - Fotomicrografia do canal méseo vestibular tratado com coágulo sanguíneo adicionado de VEGF submetido à imuno-histoquímica para expressão de angiogênese. Positividade com marcação bem definida nos terços cervical (A), médio (B), e apical (C). Positividade com marcação difusa nos terços cervical (D), médio (E), e apical (F). Negatividade nos terços cervical (G), médio (H), e apical (I)

Todas as secções em ambos os grupos que demonstraram negatividade ao anticorpo anti-fator-VIII recombinante tiveram formação de tecido altamente celular e vascularizado confirmado pela coloração em HE (Figuras 5.5, 5.8G-H e 9-G-I).

Segundos molares hígidos foram utilizados para o controle da marcação imuno-histoquímica. Estas amostras apresentaram negatividade em todos os espécimes (Figura 5.10A-B). Características de tecido pulpar organizado normal foram confirmadas pela coloração de HE (Figura 5.10C-D). Note na figura 5.10 a

presença de vasos maduros funcionais bem definidos na região central com fibroblastos espalhados pela polpa e camada de odontoblastos na zona periférica.

Figura 5.10 – Fotomicrografia do corte transversal do segundo molar superior hígido sem tratamento. Em (A) e (B) negatividade da expressão imuno-histoquímica. Em (C) e (D) coloração em HE com tecido pulpar com características normais e vasos funcionais preenchidos com sangue. Note camada de odontoblastos presente na zona periférica da polpa (setas)

6 DISCUSSÃO

A proposta de uma Endodontia biológica tem sido o anseio dos profissionais há muito tempo. Neste particular, os recentes avanços biotecnológicos aplicados através da bioengenharia tecidual parecem apontar para algumas possíveis soluções ou alternativas. Embora tenha ganhado grande destaque após os estudos de Banchs e Trope (2004), a formação de tecido intracanal já vem sendo estudada há meio século, e foi bem estabelecido que este tecido formado se trata da invaginação dos tecidos periapicais (Erausquin, Muruzábal, 1968; Ham et al., 1972; Myers, Fountain, 1974; Hørsted; Nygaard-Östby, 1978; Wang et al., 2010; Da Silva et al., 2010; Yamauchi et al., 2011a; Scarparo et al., 2011; Yamauchi et al., 2011b; Scarparo et al., 2012; Torabinejad; Faras, 2012; Martin et al., 2013; Tawfik et al., 2013; Becerra et al., 2014; Yoo et al., 2014; Torabinejad et al., 2015). Todavia, uma possível justificativa para a formação desses novos tecidos, seja a osteoindução, possibilitando uma obturação fisiológica do canal radicular por deposição de tecido mineralizado (Machado et al., 2006), ou mesmo ajudando a formação radicular, visto que o tecido neoformado não é caracterizado como polpa.

Frente a esta questão, diversos casos clínicos utilizam coágulo sanguíneo intracanal em dentes com ápice aberto propondo a revascularização da câmara pulpar e formação radicular (Erausquin; Muruzábal, 1968; Ham et al., 1972; Banchs, Trope 2004; Thibodeau et al., 2007; Cotti et al., 2008; Jung et al., 2008; Shah et al., 2008; Reynolds et al., 2009; Ding et al., 2009; Wang et al., 2010; Petrino et al., 2010; Yamauchi et al., 2011a; Nosrat et al., 2011; Yamauchi et al., 2011b; Kim et al., 2012; Shimizu et al., 2012; Jeeruphan et al., 2012; Martin et al., 2013; Yang et al., 2013; Soares et al., 2013; Forghani et al., 2013; Tawfik et al., 2013; Jarhav et al., 2013; Becerra et al., 2014; Nagy et al., 2014; Yoo et al., 2014; Khademi et al., 2014; McCabe, 2015; Torabinejad et al., 2015); ainda, outros propõem a substituição do coágulo por medicamentos ou derivados orgânicos alternativos tais como colágeno e plasma ou fibrina rico em plaquetas (Chueh; Huang, 2006; Bose et al., 2009; Kvinnsland et al., 2010; Da Silva et al., 2010; Torabinejad; Turman, 2011; Scarparo et al., 2011; Cehreli et al., 2011; Scarparo et al., 2012; Torabinejad; Faras, 2012; Keswani; Pandey, 2013; Johns et al., 2014; Nagaveni et al., 2015). Entretanto em uma análise crítica destes protocolos, observa-se um tecido composto por células

inflamatórias, ligamentos periodontais, fibras colágenas e tecido mineralizado, onde não são observados odontoblastos (Erausquin; Muruzábal, 1968; Ham et al., 1972; Myers; Fountain 1974; Da Silva et al., 2010; Yamauchi et al., 2011a; Scarparo et al., 2011; Yamauchi et al., 2011b; Scarparo et al., 2012; Torabinejad; Faras, 2012; Martin et al., 2013; Tawfik et al., 2013; Becerra et al., 2014; Torabinejad et al., 2015). Desta forma, este novo tecido não pode ser caracterizado como um tecido pulpar. As interpretações frente à formação de tecidos calcificados, quando presente nestes casos, estão associadas à deposição de tecido mineralizado nas paredes do canal radicular e na região apical. Tal circunstância poderá induzir o observador a crer que se trata no desenvolvimento continuado da raiz, mas através da análise deste tecido neoformado, observa-se que ele não apresenta características morfológicas semelhantes à dentina primária (Ham et al., 1972; Myers; Fountain 1974; Wang et al., 2010; Da Silva et al., 2010; Yamauchi et al., 2011a; Scarparo et al., 2011; Yamauchi et al., 2011b; Scarparo et al., 2012; Martin et al., 2013; Tawfik et al., 2013; Becerra et al., 2014; Yoo et al., 2014; Torabinejad et al., 2015). Ademais, tais ensaios estão associados a elementos dentais com ápice aberto, e quando se alterna esta variável para ápice fechado ou maduros somente a luz do conduto na região apical é calcificada (Machado, 2007).

Frente a esta temática, desde a descoberta das células tronco na polpa dental (Gronthos et al., 2000) e suas diferentes fontes relacionadas (Shi, Gronthos, 2003; Miura et al., 2003; Sonoyama et al., 2006; Kersis et al., 2006), novos estudos buscando a neoformação de tecido pulpar tem sido alvo de pesquisas da comunidade científica (Huang et al., 2006a; Huang et al., 2006b; Prescott et al., 2008; Cordeiro et al., 2008; Mullane et al., 2008; Gerbhardt et al., 2009; Kim et al., 2010; Liu et al., 2011; Alsanea et al., 2011; Galler et al., 2011; Wang et al., 2011; Zhang et al., 2011; Srisuwan et al., 2012; Kodonas et al., 2012; Bronckaers et al., 2013; Choung et al., 2013; Ruangsawasdi et al., 2014; Dissanayaka et al., 2015). Entretanto, para que exista esta possibilidade, primeiro é importante a presença de suprimento sanguíneo para nutrição celular (Gonçalves et al., 2007; Srisuwan et al., 2012; Fiane et al., 2014), frente a isto, a literatura tem demonstrado que fatores de crescimento angiogênicos podem resultar em neovascularização (Tran-Hung et al., 2006; Güven et al., 2007; Gonçalves et al., 2007; Mullane et al., 2008; Aranha et al., 2010; Zhang et al., 2011; Müller et al., 2012; Bronckaers et al., 2013; Li et al., 2014;

Shin et al., 2014; Li et al., 2015). Assim sendo, tal fenômeno merece ser estudado e constitui a proposta deste trabalho.

Frente à escolha dos diversos tipos de fatores de crescimento angiogênicos, o VEGF tem sido apontado como um dos principais para a vascularização (Klagsbrun, D'Amore, 1996; Gonçalves et al., 2007; Mullane et al., 2008), por promover aumento de proliferação e/ou diferenciação celular (Senger et al., 1983; Senger et al., 1986; Senger et al., 1990; Berse et al., 1992; Senger et al., 1993; Gonçalves et al., 2007; D'Alimonte et al., 2011; Lee et al., 2012; Cai et al., 2014; Li et al., 2015). Todavia, alguns tipos de VEGF podem determinar comportamentos diferentes, frente ao número de aminoácidos e os receptores com o qual se comunicam (Klagsbrun; D'Amore, 1996; Orrock et al., 2007; Virtej et al., 2013a; Virtej et al., 2013b). No presente estudo, optou-se pelo VEGF-A, dado a sua maior especificidade em receptores relacionados à angiogênese (Grando Mattuella et al., 2007; Orrock et al., 2007), e o subtipo VEGF₁₆₅ que possui maior potencial mitógeno sobre as células endoteliais (Klagsbrun, D'Amore, 1996; Grando Mattuella et al., 2007). Além disso, segue trabalhos prévios que obtiveram resultados positivos em relação à formação de vasos utilizando esse tipo e subtipo (Gonçalves et al., 2007; Mullane et al., 2008; Bento et al., 2013). A escolha da dosagem de 50 ng/ml seguiu o estudo de Gonçalves et al. (2007) que ajustaram a concentração ideal para ratos.

A metodologia utilizada para a avaliação da angiogênese tem como justificativa, a princípio, os resultados de estudos *in vitro* através de cultura celular (Tran-Hung et al., 2006; D'Aquino et al., 2007; Aranha et al., 2010; Zhang et al., 2011; Dissanayaka et al., 2012; Kim et al., 2012; Bento et al., 2013; Bronckaers et al., 2013; Liu et al., 2014; Limjeerajarus et al., 2014; Vanacker et al., 2014; Shin et al., 2014; Boyle et al., 2014; Li et al., 2014; Dissanayaka et al., 2015; Yuan et al., 2015). Estes ensaios são considerados aptos para uma avaliação inicial, quando do estudo de substâncias que por falta de conhecimento não devem ser aplicadas diretamente ao uso clínico. No entanto, apresentam limitações dado a ausência de complexidade imunológica de um organismo vivo. Desta forma, a opção por ensaios *in vivo* tem sido altamente considerada. As metodologias variam entre implantações de discos de dentina, coroas dentárias e tubos de silicone em subcutâneo de ratos (Zhang et al., 2006; Gonçalves et al., 2007; Prescott et al., 2008; Cordeiro et al., 2008; Mullane et al., 2008; Kim et al., 2010; Alsanea et al., 2011; Srisuwan et al., 2012; Bento et al., 2013), que apresentam como limitante as condições do tecido

conjuntivo que é altamente vascularizado e diferente ao do alvéolo dentário. Ademais, ensaios têm demonstrado que é possível o estudo de bioengenharia tecidual em dentes in loco simulando assim uma realidade mais próxima (Nygaard-Östby, 1961; Skoglung et al., 1978; Hørsted; Nygaard-Östby, 1978; Skoglung; Tronstad, 1981; Claus et al., 2004; Thibodeau et al., 2007; Wang et al., 2010; Da Silva et al., 2010; Torabinejad; Turman, 2011; Yamauchi et al., 2011a; Scarparo et al., 2011; Yamauchi et al., 2011b; Scarparo et al., 2012; Shimizu et al., 2012; Martin et al., 2013; Laureys et al., 2013; Tawfik et al., 2013; Becerra et al., 2014; Limjeerajarus et al., 2014; Yoo et al., 2014; Fiane et al. (2014); Torabinejad et al., 2015.

Quanto ao modelo animal, os ratos têm sido utilizados por diversos autores (Erausquin; Muruzábal, 1968; Myers; Fountain, 1974; Papaccio et al., 2006; Machado et al., 2006; Zhang et al., 2006; Sonoyama et al., 2006; D'Aquino et al., 2007; Gonçalves et al., 2007; Prescott et al., 2008; Cordeiro et al., 2008; Mullane et al., 2008; Alsanea et al., 2011; Scarparo et al., 2011; Scarparo et al., 2012; Betsa et al., 2012; Srisuwan et al., 2012; Bento et al., 2013; Machado et al., 2013; Choung et al., 2013; Ruangsawasdi et al., 2014; Dissanayaka et al., 2015; Li et al., 2015), devido a fácil acessibilidade, custo reduzido e fácil reprodução em curto período de tempo. Além disso, o metabolismo do rato é bem acelerado, resultando em tempos experimentais mais curtos e com respostas mais rápidas que em humanos (Scarparo et al., 2011). Inicialmente, o tempo experimental escolhido foi o de 40 dias, baseado no experimento de Scarparo et al. (2012). Todavia, pôde ser observado no ensaio piloto que este tempo não foi capaz de produzir um tecido maduro suficiente que pudesse ser marcado pela imuno-histoquímica. Desta forma, passou-se observar 60 dias como tempo experimental ideal para o presente estudo. A diferença de tempo aos experimentos poderia ser explicada pela condição apical dos dentes estudados, uma vez que utilizamos dentes com ápice fechado, e Scarparo et al. (2012) utilizou-se de dentes com ápice aberto. Este ponto parece ser importante, pois mesmo utilizando o mesmo modelo animal (ratos), estes estágios de formação apical são duas condições distintas, como comprovado no estudo de Fiane et al. (2014) que observaram reparação dificultada em dentes com ápice fechado. Quanto à idade dos animais, foi estabelecida a de 13 semanas, fundamentada nos estudos de Scarparo et al. (2011) que avaliaram a fase de

maturação dentária pós-natal e observaram formação radicular completa neste período.

Para potencializar a remoção de restos orgânicos no canal após a remoção do tecido pulpar, foi realizada irrigação com hipoclorito de sódio. No entanto, o condicionamento da parede dentinária com o uso de EDTA 17% teve como base a recomendação de estudos que afirmaram melhores resultados de regeneração pulpar com esta condição (Huang et al., 2006; Yamauchi et al., 2011; Galler et al., 2011; Namour; Theys, 2014), dada à característica da dentina que provém de uma série de proteínas da matriz extracelular, tais como os fatores de crescimento / moléculas sinalizadoras que induzem a proliferação e/ ou diferenciação celular (Roberts-Clark; Smith, 2000; Machado et al., 2006; Zhang et al., 2011; Namour; Theys, 2014)

A literatura discute diversos tipos de arcabouços que são necessários para estruturar as células que darão origem ao futuro tecido (Zhang et al., 2006; Prescott et al., 2008; Gerbhardt et al., 2009; Chandrhasa et al., 2011; Torabinejad; Turman, 2011; Liu et al., 2011; Wang et al., 2011; Kodonas et al., 2012; Keswani; Pandey, 2013; Ruangsawasdi et al., 2014; Namour; Theys, 2014; Nagaveni et al., 2015; Li et al., 2015). Neste trabalho optou-se pelo uso do coágulo sanguíneo que tem sido o mais utilizado clinicamente entre todos os arcabouços disponíveis desde a década de 60 (Erausquin, Muruzábal, 1968; Ham et al., 1972; Banchs, Trope 2004; Thibodeau et al., 2007; Cotti et al., 2008; Jung et al., 2008; Shah et al., 2008; Reynolds et al., 2009; Ding et al., 2009; Wang et al., 2010; Petrino et al., 2010; Yamauchi et al., 2011a; Nosrat et al., 2011; Yamauchi et al., 2011b; Kim et al., 2012; Shimizu et al., 2012; Jeeruphan et al., 2012; Martin et al., 2013; Yang et al., 2013; Soares et al., 2013; Forghani et al., 2013; Tawfik et al., 2013; Jarhav et al., 2013; Becerra et al., 2014; Nagy et al., 2014; Yoo et al., 2014; Khademi et al., 2014; Torabinejad et al., 2015; McCabe, 2015). Além disso, é de fácil obtenção; não requer aparatos especiais; é autólogo, sendo assim não provoca incompatibilidade tecidual; e não aumenta o custo do tratamento.

A avaliação morfológica por HE segue o protocolo padrão em todos os ensaios que estão relacionados à análise histopatológica (Erausquin; Muruzábal, 1968; Nygaard-Östby; Hjortdal, 1971; Ham et al., 1972; Myers; Fountain, 1974; Hørsted; Nygaard-Östby, 1978; Skoglung; Tronstad, 1981; Mooney et al., 1996; Gronthos et al., 2000; Batouli et al., 2003; Claus et al., 2004; Papaccio et al., 2006;

Machado et al., 2006; Zhang et al., 2006; D'Aquino et al., 2007; Thibodeau et al., 2007; Sonoyama et al., 2008; Prescott et al., 2008; Cordeiro et al., 2008; Wang et al., 2010; Da Silva et al., 2010; Kim et al., 2010; Yamauchi et al., 2011a; Liu et al., 2011; Alsanea et al., 2011; Scarparo et al., 2011; Galler et al., 2011; Wang et al., 2011; Lee et al., 2011; Yamauchi et al., 2011b; Scarparo et al., 2012; Srisuwan et al., 2012; Lee et al., 2012; Torabinejad; Faras, 2012; Kodonas et al., 2012; Shimizu et al., 2012; Machado et al., 2013; Srisuwan et al., 2013; Martin et al., 2013; Laureys et al., 2013; Tawfik et al., 2013; Choung et al., 2013; Becerra et al., 2014; Yoo et al., 2014; Fiane et al., 2014; Cai et al., 2014; Dissanayaka et al., 2015; Torabinejad et al., 2015), a associação com a imuno-histoquímica permite a identificação da estrutura específica com mais clareza. Para tanto foi utilizado o anti-fator VIII, também chamado de von Willerbrand, por ser marcador específico de angiogênese (Gonçalves et al., 2007; Cordeiro et al., 2008; Mullane et al., 2008; Kim et al., 2010; Zhang et al., 2011; Dissanayaka et al., 2012).

Frente a análise dos resultados em HE foi observado a formação de tecido intraradicular em todos os espécimes, estando de acordo com diversos estudos na literatura (Nygaard-Östby, 1961; Erausquin, Muruzábal, 1968; Ham et al., 1972; Hørsted, Nygaard-Östby, 1978; Da Silva et al., 2010; Yamauchi et al., 2011a; Scarparo et al., 2011; Yamauchi et al., 2011b; Scarparo et al., 2012; Torabinejad, Faras, 2012; Shimizu et al., 2012; Martin et al., 2013; Tawfik et al., 2013; Becerra et al., 2014; Yoo et al., 2014; Torabinejad et al., 2015). Entretanto, no presente ensaio observou-se a formação de tecido conjuntivo frouxo, diferente dos demais estudos que em sua maioria encontraram a formação de tecido conjuntivo denso proveniente de tecido invaginado do periápice (Nygaard-Östby, 1961; Nygaard-Östby; Hjortdal; 1971; Ham et al., 1972; Hørsted; Nygaard-Östby, 1978; Da Silva et al., 2010; Yamauchi et al., 2011a; Yamauchi et al., 2011b; Torabinejad; Faras, 2012; Shimizu et al., 2012; Martin et al., 2013; Tawfik et al., 2013; Becerra et al., 2014; Torabinejad et al., 2015). Dado as inúmeras variáveis que podem influenciar nos resultados, tais como espécie utilizada – animais e humanos, tempo experimental, e a própria condição do estágio de formação apical, o presente ensaio não pretende definir o tema em questão, e sim colaborar ao estudo do tema em dentes com apicigênese completa.

Dentre as características morfológicas observadas no tecido neoformado, pode-se ressaltar a presença de ilhas de necrose espalhadas pelo tecido conjuntivo.

Tais pontos de necrose podem estar relacionados a restos de coágulo sanguíneo que ainda não haviam sido totalmente reabsorvidos, como também observado por outros autores (Nygaard-Östby; Hjortdal, 1971; Ham et al., 1972), porém outra explicação lógica para este fator seria a presença de restos de detritos provenientes da ampliação foraminal. A lima foi levada até o forame apical, e ainda, realizada posterior limagem no periápice para promoção de sangramento, este processo pode trazer restos de dentina e/ou cimento para o interior do coágulo durante a retirada do instrumento. Neste particular, outros autores observaram lascas ou espículas de dentina em meio de tecido neoformado após tratamento de revascularização (Martin et al., 2013; Becerra et al., 2014) . No presente estudo, a maior evidência destes pontos de necrose foi visualizada no terço cervical, região com maior manipulação devido à inserção do selamento coronário após a formação de coágulo, soma-se a isso que a região cervical apresenta uma reparação mais complexa e demorada, dado a sua distancia apical, fonte do processo de revascularização (Claus et al., 2004; Da Silva et al., 2010; Laureys et al., 2013; Tawfik et al., 2013). Em relação aos grupos, este quadro foi mais frequente no grupo que utilizou somente o coágulo sanguíneo, sugerindo neoformação tecidual mais desenvolvida com o uso do VEGF. Nisto, uma relação com maior presença de vasos formados e funcionais observados no grupo com uso do VEGF pode ser estabelecida com o estágio mais avançado de desenvolvimento tecidual, pois, macrófagos vindos destes vasos são os principais responsáveis pela remoção de tecido necrótico e de granulação dando sequencia à reparação (Machado, 2007).

A presença de um tecido mineralizado depositado nas paredes do canal também foi observada em algumas amostras. Todavia, não se pode afirmar que este tecido foi formado após o tratamento. Além disso, a literatura afirma que deposição de tecido semelhante ao osso ou cimento acontece nas paredes dentinárias de dentes com ápice aberto submetidos ao protocolo de revascularização (Erausquin, Muruzábal, 1968; Ham et al., 1972; Wang et al., 2010; Yamauchi et al., 2011a; Scarparo et al., 2011; Yamauchi et al., 2011b; Scarparo et al., 2012; Martin et al., 2013; Tawfik et al., 2013; Becerra et al., 2014; Yoo et al., 2014; Torabinejad et al., 2015), porém vale discutir que a dentina reacional também possui aspecto semelhante ao osso e cimento (Katchburian; Arana, 2012). Sendo assim, não se pode afirmar a natureza do tecido mineralizado presente sem a sua caracterização através de marcadores específicos ou análise molecular de proteínas existentes,

portanto seria prematura a consideração de que este tecido formado seja osso ou tenha origem pulpar.

A observação das secções do terço apical demonstrou presença de reabsorções radiculares externas, o que também foi observado por outros autores (Nygaard-Östby, 1961; Ham et al., 1972; Claus et al., 2004; Fiane et al., 2014). Este fato poderia ser explicado pelo trauma mecânico criado pelas limas ao induzir o sangramento periapical. Segundo Machado (2007), traumas físico-químicos e/ ou bacterianos desenvolvem uma reação inflamatória; no contexto destes eventos reacionais, a reabsorção é um fato saudável e natural que irá cessar dando lugar ao processo de reparação. Neste conceito, Nygaard-Östby (1961) afirmou que estas reabsorções, em longo prazo, serão reparadas por deposição de tecido mineralizado.

A marcação imuno-histoquímica apresentou positividade em maior parte dos espécimes, representando processo de angiogênese ativa em ambos os grupos. Isto está de acordo com estudos que também obtiveram positividade angiogênica com ou sem o uso do VEGF aplicado na bioengenharia tecidual (Gonçalves et al., 2007; Mullane et al., 2008; Kim et al., 2010; Dissanayaka et al., 2012; Bento et al., 2013; Cai et al., 2014). A formação vascular sem a aplicação de VEGF pode ser justificada por fatores de crescimento presentes na dentina (Roberts-Clark; Smith, 2000; Machado et al., 2006; Zhang et al., 2011; Namour; Theys, 2014), e também no próprio sangue como demonstraram resultados positivos de revascularização em estudos baseados em concentrados sanguíneos (Torabinejad; Turman, 2011; Liu et al., 2011; Martin et al., 2013; Jarhav et al., 2013; Keswani; Pandey, 2013; Johns et al., 2014; Li et al., 2014; Nagaveni et al., 2015).

Marcações do tipo definida e difusa foram identificadas e correlacionadas ao estágio de maturação angiogênica. Como consta na literatura, a angiogênese acontece pela ação do fator de crescimento, no caso deste estudo o VEGF, na ativação de moléculas sinalizadoras (Chu et al., 2004; Güven et al., 2007; Bento et al., 2013; Virtej et al., 2013a; Shin et al., 2014), supostamente, podem levar a esta característica de marcação difusa no estímulo inicial da formação vascular. Logo, esta marcação está ligada a estágios iniciais da angiogênese, quando moléculas sinalizadoras estão ativas em maior proporção. Já a marcação definida estaria relacionada ao estágio final da angiogênese, quando os vasos já estão quase maturados. Este quadro parece estar estabelecido nas amostras com negatividade,

onde vasos completamente maduros e funcionais são confirmados na coloração de HE, não apresentam marcação imuno-histoquímica, e estiveram sobre a estimulação do VEGF e suas moléculas sinalizadoras. O grupo controle da imuno-histoquímica confirma que estes tecidos são neoformados e provenientes do tratamento aplicado, uma vez que estas amostras não possuem odontoblastos que caracterizariam o tecido pulpar como apresenta o grupo de dentes hígidos. Ainda no que se refere ao estágio de maturação, foi observada predominância da marcação tipo difusa nos terços cervical e médio no grupo tratado somente com coágulo sanguíneo, e de marcação definida destes terços no grupo tratado com VEGF. Isto sugere que o processo de angiogênese foi mais rápido quando o VEGF foi utilizado. Além disso, maior número de amostras com negatividade imuno-histoquímica e tecido formado bem vascularizado foi observado também no grupo tratado com VEGF. Nota-se também que nenhuma amostra do terço cervical do grupo tratado somente com coágulo sanguíneo atingiu este grau de maturação.

Assim, o tratamento endodôntico biológico livre de materiais definitivos sintéticos parece estar cada vez próximo de uma realidade. E nisto, poderemos afirmar que mudanças no paradigma da Endodontia serão reais. Ambos os protocolos de tratamento resultaram na angiogênese do canal radicular vazio, e o uso do VEGF contribuiu de forma positiva neste processo, através de uma neorevascularização mais rápida.

7 CONCLUSÕES

Diante dos resultados observados e das condições experimentais e metodológicas, é lícito concluir que é possível a neoformação tecidual de canais de molares pulpectomizados com apicigênese completa, e que o uso de VEGF acelera a angiogênese no período experimental avaliado.

REFERÊNCIAS¹

Alsanea R, Ravindran S, Fayad MI, Johnson BR, Wenckus CS, Hao J, George A. Biomimetic approach to perforation repair using dental pulp stem cells and dentin matrix protein 1. *J Endod*. 2011 Aug;37(8):1092-7.

Aranha AM, Zhang Z, Neiva KG, Costa CA, Hebling J, Nör JE. Hypoxia enhances the angiogenic potential of human dental pulp cells. *J Endod*. 2010 Oct;36(10):1633-7.

Artese L, Rubini C, Ferrero G, Fioroni M, Santinelli A, Piattelli A. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in healthy and inflamed human dental pulps. *J Endod*. 2002 Jan;28(1):20-3.

Banchs F, Trope M. Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: new treatment protocol? *J Endod*. 2004 Apr;30(4):196-200.

Batouli S, Miura M, Brahim J, Tsutsui TW, Fisher LW, Gronthos S, Robey PG, Shi S. Comparison of stem-cell-mediated osteogenesis and dentinogenesis. *J Dent Res*. 2003 Dec;82(12):976-81.

Becerra P, Ricucci D, Loghin S, Gibbs JL, Lin LM. Histologic study of a human immature permanent premolar with chronic apical abscess after revascularization/revitalization. *J Endod*. 2014 Jan;40(1):133-9.

Bento LW, Zhang Z, Imai A, Nör F, Dong Z, Shi S, Araujo FB, Nör JE. Endothelial differentiation of SHED requires MEK1/ERK signaling. *J Dent Res*. 2013 Jan;92(1):51-7.

Berse B, Brown LF, Van de Water L, Dvorak HF, Senger DR. Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) gene is expressed differentially in normal tissues, macrophages, and tumors. *Mol Biol Cell*. 1992 Feb;3(2):211-20.

Bletsa A, Virtej A, Berggreen E. Vascular endothelial growth factors and receptors are up-regulated during development of apical periodontitis. *J Endod*. 2012 May;38(5):628-35.

Bose R, Nummikoski P, Hargreaves K. A retrospective evaluation of radiographic outcomes in immature teeth with necrotic root canal systems treated with regenerative endodontic procedures. *J Endod*. 2009 Oct;35(10):1343-9.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

Boyle M, Chun C, Strojny C, et al. Chronic Inflammation and Angiogenic Signaling Axis Impairs Differentiation of Dental-Pulp Stem Cells. Asakura A. PLoS ONE. 2014 Nov;9(11):e113419. doi:10.1371/journal.pone.0113419.

Bronckaers A, Hilkens P, Fanton Y, et al. Angiogenic Properties of Human Dental Pulp Stem Cells. PLoS ONE. 2013 Aug;8(8):e71104. doi:10.1371/journal.pone.0071104.

Cai WX, Zheng LW, Li CL, Ma L, Ehrbar M, Weber FE, Zwahlen RA. Effect of different rhBMP-2 and TG-VEGF ratios on the formation of heterotopic bone and neovessels. Biomed Res Int. 2014;2014:571510. doi: 10.1155/2014/571510.

Cehreli ZC, Isbitiren B, Sara S, Erbas G. Regenerative endodontic treatment (revascularization) of immature necrotic molars medicated with calcium hydroxide: a case series. J Endod. 2011 Sep;37(9):1327-30.

Chandrasekhar S, Murray PE, Namerow KN. Proliferation of mature ex vivo human dental pulp using tissue engineering scaffolds. J Endod. 2011 Sep;37(9):1236-9.

Chen MY, Chen KL, Chen CA, Tayebaty F, Rosenberg PA, Lin LM. Responses of immature permanent teeth with infected necrotic pulp tissue and apical periodontitis/abscess to revascularization procedures. Int Endod J. 2012 Mar;45(3):294-305.

Choung HW, Lee JH, Lee DS, Choung PH, Park JC. The role of preameloblast-conditioned medium in dental pulp regeneration. J Mol Histol. 2013 Dec;44(6):715-21.

Chu SC, Tsai CH, Yang SF, Huang FM, Su YF, Hsieh YS, Chang YC. Induction of vascular endothelial growth factor gene expression by proinflammatory cytokines in human pulp and gingival fibroblasts. J Endod. 2004 Oct;30(10):704-7.

Chueh LH, Huang GT. Immature teeth with periradicular periodontitis or abscess undergoing apexogenesis: a paradigm shift. J Endod. 2006 Dec;32(12):1205-13.

Claus I, Laureys W, Cornelissen R, Dermaut LR. Histologic analysis of pulpal revascularization of autotransplanted immature teeth after removal of the original pulp tissue. Am J Orthod Dentofacial Orthop. 2004 Jan;125(1):93-9.

Cordeiro MM, Dong Z, Kaneko T, Zhang Z, Miyazawa M, Shi S, Smith AJ, Nör JE. Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. *J Endod*. 2008 Aug;34(8):962-9.

Cotti E, Mereu M, Lusso D. Regenerative treatment of an immature, traumatized tooth with apical periodontitis: report of a case. *J Endod*. 2008 May;34(5):611-6.

D' Alimonte I, Nargi E, Mastrangelo F, Falco G, Lanuti P, Marchisio M, et al. Vascular endothelial growth factor enhances in vitro proliferation and osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2011 Jan-Mar;25(1):57-69.

D' Aquino R, Graziano A, Sampaolesi M, Laino G, Pirozzi G, De Rosa A, Papaccio G. Human postnatal dental pulp cells co-differentiate into osteoblasts and endotheliocytes: a pivotal synergy leading to adult bone tissue formation. *Cell Death Differ*. 2007 Jun;14(6):1162-71.

Da Silva LA, Nelson-Filho P, da Silva RA, Flores DS, Heilborn C, Johnson JD, et al. Revascularization and periapical repair after endodontic treatment using apical negative pressure irrigation versus conventional irrigation plus triantibiotic intracanal dressing in dogs' teeth with apical periodontitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010 May;109(5):779-87.

Ding RY, Cheung GS, Chen J, Yin XZ, Wang QQ, Zhang CF. Pulp revascularization of immature teeth with apical periodontitis: a clinical study. *J Endod*. 2009 May;35(5):745-9.

Diniz IM, Chen C, Xu X, Ansari S, Zadeh HH, Marques MM, et al. Pluronic F-127 hydrogel as a promising arcabouço for encapsulation of dental-derived mesenchymal stem cells. *J Mater Sci Mater Med*. 2015 Mar;26(3):153. doi: 10.1007/s10856-015-5493-4.

Dissanayaka WL, Zhan X, Zhang C, Hargreaves KM, Jin L, Tong EH. Coculture of dental pulp stem cells with endothelial cells enhances osteo-/odontogenic and angiogenic potential in vitro. *J Endod*. 2012 Apr;38(4):454-63.

Dissanayaka WL, Hargreaves KM, Jin L, Samaranayake LP, Zhang C. The interplay of dental pulp stem cells and endothelial cells in an injectable peptide hydrogel on angiogenesis and pulp regeneration in vivo. *Tissue Eng Part A*. 2015 Feb;21(3-4):550-63.

Eduardo F de P, Bueno DF, de Freitas PM, Marques MM, Passos-Bueno MR, Eduardo C de P, et al. Stem cell proliferation under low intensity laser irradiation: a preliminary study. *Lasers Surg Med*. 2008 Aug;40(6):433-8.

Erausquin J, Muruzabal M. Evolution of blood clot after root canal treatment in rat molars. *J Dent Res*. 1968 Jan-Feb;47(1):34-40.

Fiane JE, Breivik M, Vandevska-Radunovic V. A histomorphometric and radiographic study of replanted human premolars. *Eur J Orthod*. 2014 Dec;36(6):641-8.

Forghani M, Parisay I, Maghsoudlou A. Apexogenesis and revascularization treatment procedures for two traumatized immature permanent maxillary incisors: a case report. *Restor Dent Endod*. 2013 Aug;38(3):178-81.

Galler KM, D'Souza RN, Federlin M, Cavender AC, Hartgerink JD, Hecker S, Schmalz G. Dentin conditioning codetermines cell fate in regenerative endodontics. *J Endod*. 2011 Nov;37(11):1536-41.

Gebhardt M, Murray PE, Namerow KN, Kuttler S, Garcia-Godoy F. Cell survival within pulp and periodontal constructs. *J Endod*. 2009 Jan;35(1):63-6.

Gonçalves SB, Dong Z, Bramante CM, Holland GR, Smith AJ, Nör JE. Tooth slice-based models for the study of human dental pulp angiogenesis. *J Endod*. 2007 Jul;33(7):811-4.

Grando Mattuella L, Westphalen Bento L, de Figueiredo JA, Nör JE, de Araujo FB, Fossati AC. Vascular endothelial growth factor and its relationship with the dental pulp. *J Endod*. 2007 May;33(5):524-30.

Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Dec;97(25):13625-30.

Gronthos S, Brahimi J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, DenBesten P, Robey PG, Shi S. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res*. 2002 Aug;81(8):531-5.

Güven G, Altun C, Günhan O, Gurbuz T, Basak F, Akbulut E, Cehreli ZC. Co-expression of cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor in inflamed human pulp: an immunohistochemical study. *J Endod*. 2007 Jan;33(1):18-20.

Ham JW, Patterson SS, Mitchell DF. Induced apical closure of immature pulpless teeth in monkeys. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1972 Mar;33(3):438-49.

Hargreaves KM, Diogenes A, Teixeira FB. Paradigm lost: a perspective on the design and interpretation of regenerative endodontic research. *J Endod*. 2014 Apr;40(4 Suppl):S65-9.

Harumi Miyagi SP, Kerkis I, da Costa Maranduba CM, Gomes CM, Martins MD, Marques MM. Expression of extracellular matrix proteins in human dental pulp stem cells depends on the donor tooth conditions. *J Endod*. 2010 May;36(5):826-31.

He H, Yu J, Liu Y, Lu S, Liu H, Shi J, Jin Y. Effects of FGF2 and TGFbeta1 on the differentiation of human dental pulp stem cells in vitro. *Cell Biol Int*. 2008 Jul;32(7):827-34.

Hørsted P, Nygaard-Ostby B. Tissue formation in the root canal after total pulpectomy and partial root filling. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1978 Aug;46(2):275-82.

Howard C, Murray PE, Namerow KN. Dental pulp stem cell migration. *J Endod*. 2010 Dec;36(12):1963-6.

Huang GT, Sonoyama W, Chen J, Park SH. In vitro characterization of human dental pulp cells: various isolation methods and culturing environments. *Cell Tissue Res*. 2006a May;324(2):225-36.

Huang GT, Shagrameanova K, Chan SW. Formation of odontoblast-like cells from cultured human dental pulp cells on dentin in vitro. *J Endod*. 2006b Nov;32(11):1066-73.

Ilić J, Radović K, Roganović J, Brković B, Stojić D. The levels of vascular endothelial growth factor and bone morphogenetic protein 2 in dental pulp tissue of healthy and diabetic patients. *J Endod*. 2012 Jun;38(6):764-8.

Iwaya S, Ikawa M, Kubota M. Revascularization of an immature permanent tooth with periradicular abscess after luxation. *Dent Traumatol*. 2011 Feb;27(1):55-8.

Jadhav GR, Shah N, Logani A. Comparative outcome of revascularization in bilateral, non-vital, immature maxillary anterior teeth supplemented with or without platelet rich plasma: A case series. *J Conserv Dent*. 2013 Nov;16(6):568-72.

Jeeruphan T, Jantararat J, Yanpiset K, Suwannapan L, Khewsawai P, Hargreaves KM. Mahidol study 1: comparison of radiographic and survival outcomes of immature teeth treated with either regenerative endodontic or apexification methods: a retrospective study. *J Endod.* 2012 Oct;38(10):1330-6.

Johns DA, Shivashankar VY, Krishnamma S, Johns M. Use of photoactivated disinfection and platelet-rich fibrin in regenerative Endodontics. *J Conserv Dent.* 2014 Sep;17(5):487-90.

Jung IY, Lee SJ, Hargreaves KM. Biologically based treatment of immature permanent teeth with pulpal necrosis: a case series. *J Endod.* 2008 Jul;34(7):876-87.

Katchburian E, Arana V. *Histologia e embriologia oral: texto, atlas, correlações clínicas.* 3a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2012. 282 p.

Kerkis I, Kerkis A, Dozortsev D, Stukart-Parsons GC, Gomes Massironi SM, Pereira LV, Caplan AI, Cerruti HF. Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. *Cells Tissues Organs.* 2006;184(3-4):105-16.

Keswani D, Pandey RK. Revascularization of an immature tooth with a necrotic pulp using platelet-rich fibrin: a case report. *Int Endod J.* 2013 Nov;46(11):1096-104.

Khademi AA, Dianat O, Mahjour F, Razavi SM, Younessian F. Outcomes of revascularization treatment in immature dog's teeth. *Dent Traumatol.* 2014 Oct;30(5):374-9.

Kim JY, Xin X, Moiola EK, Chung J, Lee CH, Chen M, Fu SY, Koch PD, Mao JJ. Regeneration of dental-pulp-like tissue by chemotaxis-induced cell homing. *Tissue Eng Part A.* 2010 Oct;16(10):3023-31.

Kim DS, Park HJ, Yeom JH, Seo JS, Ryu GJ, Park KH, Shin SI, Kim SY. Long-term follow-ups of revascularized immature necrotic teeth: three case reports. *Int J Oral Sci.* 2012 Jun;4(2):109-13.

Kim JJ, Kim SJ, Kim YS, Kim SY, Park SH, Kim EC. The role of SIRT1 on angiogenic and odontogenic potential in human dental pulp cells. *J Endod.* 2012 Jul;38(7):899-906.

Klagsbrun M, D'Amore PA. Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1996 Oct;7(3):259-70.

Kodonas K, Gogos C, Papadimitriou S, Kouzi-Koliakou K, Tziafas D. Experimental formation of dentin-like structure in the root canal implant model using cryopreserved swine dental pulp progenitor cells. *J Endod*. 2012 Jul;38(7):913-9.

Kvinnsland SR, Bårdsen A, Fristad I. Apexogenesis after initial root canal treatment of an immature maxillary incisor: a case report. *Int Endod J*. 2010 Jan;43(1):76-83.

Laureys WG, Cuvelier CA, Dermaut LR, De Pauw GA. The critical apical diameter to obtain regeneration of the pulp tissue after tooth transplantation, replantation, or regenerative endodontic treatment. *J Endod*. 2013 Jun;39(6):759-63.

Lee JH, Lee DS, Choung HW, Shon WJ, Seo BM, Lee EH, et al. Odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells induced by preameloblast-derived factors. *Biomaterials*. 2011 Dec;32(36):9696-706.

Lee JH, Um S, Jang JH, Seo BM. Effects of VEGF and FGF-2 on proliferation and differentiation of human periodontal ligament stem cells. *Cell Tissue Res*. 2012 Jun;348(3):475-84.

Li X, Hou J, Wu B, Chen T, Luo A. Effects of platelet-rich plasma and cell coculture on angiogenesis in human dental pulp stem cells and endothelial progenitor cells. *J Endod*. 2014 Nov;40(11):1810-4.

Li Z, Qu T, Ding C, Ma C, Sun H, Li S, et al. Injectable gelatin derivative hydrogels with sustained vascular endothelial growth factor release for induced angiogenesis. *Acta Biomater*. 2015 Feb;13:88-100.

Limjeerajarus CN, Osathanon T, Manokawinchoke J, Pavasant P. Iloprost up-regulates vascular endothelial growth factor expression in human dental pulp cells in vitro and enhances pulpal blood flow in vivo. *J Endod*. 2014 Jul;40(7):925-30.

Liu ZN, Jiang T, Wang YX. [Platelet-rich plasma promotes potential mineralizing capacity of human dental pulp cells in vivo]. *Beijing Da Xue Xue Bao*. 2011 Apr;43(2):276-9.

Liu W, Gong Q, Ling J, Zhang W, Liu Z, Quan J. Role of miR-424 on angiogenic potential in human dental pulp cells. *J Endod*. 2014 Jan;40(1):76-82.

Machado MEL. Considerações em torno da capacidade indutora da dentina na formação de tecidos duros e sua possível utilização no tratamento endodôntico [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 1992.

Machado ME, Souza AS, Araújo VC. Histological evaluation of the osteoinduction capability of human dentine. *Int Endod J*. 2006 Nov;39(11):855-9.

Machado MEL. *Endodontia da biologia à técnica*. São Paulo: Editora Santos; 2007. 484 p.

Machado MEL, Marques VDD, Nabeshima CK. Histological evaluation of the osteoinductive potential of demineralized dentin matrix. *Rev Odonto Ciênc*. 2013 Jan;28(1):8-12.

Martin G, Ricucci D, Gibbs JL, Lin LM. Histological findings of revascularized/revitalized immature permanent molar with apical periodontitis using platelet-rich plasma. *J Endod*. 2013 Jan;39(1):138-44.

Massa LF, Arana-Chavez VE. Ultrastructural preservation of rat embryonic dental tissues after rapid fixation and dehydration under microwave irradiation. *Eur J Oral Sci*. 2000 Feb;108(1):74-7.

Matsushita K, Motani R, Sakuta T, Nagaoka S, Matsuyama T, Abeyama K, Maruyama I, Takada H, Torii M. Lipopolysaccharide enhances the production of vascular endothelial growth factor by human pulp cells in culture. *Infect Immun*. 1999 Apr;67(4):1633-9.

Matsushita K, Motani R, Sakuta T, Yamaguchi N, Koga T, Matsuo K, et al. The role of vascular endothelial growth factor in human dental pulp cells: induction of chemotaxis, proliferation, and differentiation and activation of the AP-1-dependent signaling pathway. *J Dent Res*. 2000 Aug;79(8):1596-603.

McCabe P. Revascularization of an immature tooth with apical periodontitis using a single visit protocol: a case report. *Int Endod J*. 2015 May;48(5):484-97.

Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 May;100(10):5807-12.

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

Mullane EM, Dong Z, Sedgley CM, Hu JC, Botero TM, Holland GR, et al. Effects of VEGF and FGF2 on the revascularization of severed human dental pulps. *J Dent Res*. 2008 Dec;87(12):1144-8.

Müller HD, Cviki B, Gruber R, Watzek G, Agis H. Prolyl hydroxylase inhibitors increase the production of vascular endothelial growth factor in dental pulp-derived cells. *J Endod*. 2012 Nov;38(11):1498-503.

Myers WC, Fountain SB. Dental pulp regeneration aided by blood and blood substitutes after experimentally induced periapical infection. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1974 Mar;37(3):441-50.

Nagata JY, Soares AJ, Souza-Filho FJ, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JF, et al. Microbial evaluation of traumatized teeth treated with triple antibiotic paste or calcium hydroxide with 2% chlorhexidine gel in pulp revascularization. *J Endod*. 2014 Jun;40(6):778-83.

Nagaveni NB, Poornima P, Joshi JS, Pathak S, Nandini DB. Revascularization of immature, nonvital permanent tooth using platelet-rich fibrin in children. *Pediatr Dent*. 2015 Jan-Feb;37(1):1-6.

Nagy MM, Tawfik HE, Hashem AA, Abu-Seida AM. Regenerative potential of immature permanent teeth with necrotic pulps after different regenerative protocols. *J Endod*. 2014 Feb;40(2):192-8.

Namour M, Theys S. Pulp Revascularization of Immature Permanent Teeth: A Review of the Literature and a Proposal of a New Clinical Protocol. *The Scientific World Journal*. 2014 Oct; 2014:737503. doi:10.1155/2014/737503.

Nosrat A, Seifi A, Asgary S. Regenerative endodontic treatment (revascularization) for necrotic immature permanent molars: a review and report of two cases with a new biomaterial. *J Endod*. 2011 Apr;37(4):562-7.

Nygaard-Östby. The role of the blood clot in endodontic therapy. An experimental histologic study. *Acta Odont Scand*. 1961 Dec;19:324-53.

Nygaard-Ostby B, Hjortdal O. Tissue formation in the root canal following pulp removal. *Scand J Dent Res*. 1971 Jun;79(3):333-49.

Otrock ZK, Makarem JA, Shamseddine AI. Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors: review. *Blood Cells Mol Dis*. 2007 May-Jun;38(3):258-68.

Pang NS, Lee SJ, Kim E, Shin DM, Cho SW, Park W, Zhang X, Jung IY. Effect of EDTA on attachment and differentiation of dental pulp stem cells. *J Endod*. 2014 Jun;40(6):811-7.

Papaccio G, Graziano A, d'Aquino R, Graziano MF, Pirozzi G, Menditti D, et al. Long-term cryopreservation of dental pulp stem cells (SBP-DPSCs) and their differentiated osteoblasts: a cell source for tissue repair. *J Cell Physiol*. 2006 Aug;208(2):319-25.

Petrino JA, Boda KK, Shambarger S, Bowles WR, McClanahan SB. Challenges in regenerative endodontics: a case series. *J Endod*. 2010 Mar;36(3):536-41.

Prescott RS, Alsanea R, Fayad MI, Johnson BR, Wenckus CS, Hao J, et al. In vivo generation of dental pulp-like tissue by using dental pulp stem cells, a collagen arcabouço, and dentin matrix protein 1 after subcutaneous transplantation in mice. *J Endod*. 2008 Apr;34(4):421-6.

Reynolds K, Johnson JD, Cohenca N. Pulp revascularization of necrotic bilateral bicuspid using a modified novel technique to eliminate potential coronal discolouration: a case report. *Int Endod J*. 2009 Jan;42(1):84-92.

Roberts-Clark DJ, Smith AJ. Angiogenic growth factors in human dentine matrix. *Arch Oral Biol*. 2000 Nov;45(11):1013-6.

Ruangasawadi N, Zehnder M, Weber FE. Fibrin gel improves tissue ingrowth and cell differentiation in human immature premolars implanted in rats. *J Endod*. 2014 Feb;40(2):246-50.

Ruch JV. Odontoblast commitment and differentiation. *Biochem Cell Biol*. 1998;76(6):923-38.

Saito T, Ogawa M, Hata Y, Bessho K. Acceleration effect of human recombinant bone morphogenetic protein-2 on differentiation of human pulp cells into odontoblasts. *J Endod*. 2004 Apr;30(4):205-8.

Sakdee JB, White RR, Pagonis TC, Hauschka PV. Hypoxia-amplified proliferation of human dental pulp cells. *J Endod*. 2009 Jun;35(6):818-23.

Scarpato RK, Dondoni L, Böttcher DE, Grecca FS, Rockenbach MI, Batista EL Jr. Response to intracanal medication in immature teeth with pulp necrosis: an experimental model in rat molars. *J Endod*. 2011 Aug;37(8):1069-73.

Scarpato RK, Dondoni L, Böttcher DE, Grecca FS, Figueiredo JA, Batista EL Jr. Apical periodontium response to enamel matrix derivative as an intracanal medication in rat immature teeth with pulp necrosis: radiographic and histologic findings. *J Endod*. 2012 Apr;38(4):449-53.

Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*. 1983 Feb 25;219(4587):983-5.

Senger DR, Perruzzi CA, Feder J, Dvorak HF. A highly conserved vascular permeability factor secreted by a variety of human and rodent tumor cell lines. *Cancer Res*. 1986 Nov;46(11):5629-32.

Senger DR, Connolly DT, Van de Water L, Feder J, Dvorak HF. Purification and NH₂-terminal amino acid sequence of guinea pig tumor-secreted vascular permeability factor. *Cancer Res*. 1990 Mar 15;50(6):1774-8.

Senger DR, Van de Water L, Brown LF, Nagy JA, Yeo KT, Yeo TK, et al. Vascular permeability factor (VPF, VEGF) in tumor biology. *Cancer Metastasis Rev*. 1993 Sep;12(3-4):303-24.

Shah N, Logani A, Bhaskar U, Aggarwal V. Efficacy of revascularization to induce apexification/apexogenesis in infected, nonvital, immature teeth: a pilot clinical study. *J Endod*. 2008 Aug;34(8):919-25.

Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res*. 2003 Apr;18(4):696-704.

Shiehzadeh V, Aghmasheh F, Shiehzadeh F, Joulae M, Kosarieh E, Shiehzadeh F. Healing of large periapical lesions following delivery of dental stem cells with an injectable arcabouço: new method and three case reports. *Indian J Dent Res*. 2014 Mar-Apr;25(2):248-53.

Shimizu E, Jong G, Partridge N, Rosenberg PA, Lin LM. Histologic observation of a human immature permanent tooth with irreversible pulpitis after revascularization/regeneration procedure. *J Endod*. 2012 Sep;38(9):1293-7.

Shin SY, Albert JS, Mortman RE. One step pulp revascularization treatment of an immature permanent tooth with chronic apical abscess:a case report. *Int Endod J*. 2009 Dec;42(12):1118-26.

Shin MR, Kang SK, Kim YS, Lee SY, Hong SC, Kim EC. TNF- α and LPS activate angiogenesis via VEGF and SIRT1 signalling in human dental pulp cells. *Int Endod J*. 2014 Oct 13; [Epub ahead of print]. doi: 10.1111/iej.12396.

Skoglund A, Tronstad L, Wallenius K. A microangiographic study of vascular changes in replanted and autotransplanted teeth of young dogs. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1978 Jan;45(1):17-28.

Skoglund A, Tronstad L. Pulpal changes in replanted and autotransplanted immature teeth of dogs. *J Endod.* 1981 Jul;7(7):309-16.

Soares Ade J, Lins FF, Nagata JY, Gomes BP, Zaia AA, Ferraz CC, et al. Pulp revascularization after root canal decontamination with calcium hydroxide and 2% chlorhexidine gel. *J Endod.* 2013 Mar;39(3):417-20.

Sonoyama W, Liu Y, Fang D, Yamaza T, Seo BM, Zhang C, et al. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PLoS One.* 2006 Dec 20;1:e79. doi: 10.1371/journal.pone.0000079.

Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan RS, Wang S, Shi S, et al. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *J Endod.* 2008 Feb;34(2):166-71.

Srisuwan T, Tilkorn DJ, Al-Benna S, Vashi A, Penington A, Messer HH, et al. Survival of rat functional dental pulp cells in vascularized tissue engineering chambers. *Tissue Cell.* 2012 Apr;44(2):111-21.

Srisuwan T, Tilkorn DJ, Al-Benna S, Abberton K, Messer HH, Thompson EW. Revascularization and tissue regeneration of an empty root canal space is enhanced by a direct blood supply and stem cells. *Dent Traumatol.* 2013 Apr;29(2):84-91.

Tawfik H, Abu-Seida AM, Hashem AA, Nagy MM. Regenerative potential following revascularization of immature permanent teeth with necrotic pulps. *Int Endod J.* 2013 Oct;46(10):910-22.

Thibodeau B, Teixeira F, Yamauchi M, Caplan DJ, Trope M. Pulp revascularization of immature dog teeth with apical periodontitis. *J Endod.* 2007 Jun;33(6):680-9.

Torabinejad M, Turman M. Revitalization of tooth with necrotic pulp and open apex by using platelet-rich plasma: a case report. *J Endod.* 2011 Feb;37(2):265-8.

Torabinejad M, Faras H. A clinical and histological report of a tooth with an open apex treated with regenerative endodontics using platelet-rich plasma. *J Endod.* 2012 Jun;38(6):864-8.

Torabinejad M, Milan M, Shabahang S, Wright KR, Faras H. Histologic Examination of Teeth with Necrotic Pulps and Periapical Lesions Treated with 2 Arcabouços: An Animal Investigation. *J Endod.* 2015 Mar 6; [Epub ahead of print]. doi: 10.1016/j.joen.2015.01.026.

Tran-Hung L, Mathieu S, About I. Role of human pulp fibroblasts in angiogenesis. *J Dent Res*. 2006 Sep;85(9):819-23.

Tran-Hung L, Laurent P, Camps J, About I. Quantification of angiogenic growth factors released by human dental cells after injury. *Arch Oral Biol*. 2008 Jan;53(1):9-13.

Vanacker J, Viswanath A, De Berdt P, Everard A, Cani PD, Bouzin C, et al. Hypoxia modulates the differentiation potential of stem cells of the apical papilla. *J Endod*. 2014 Sep;40(9):1410-8.

Virtej A, Løes S, Iden O, Bletsa A, Berggreen E. Vascular endothelial growth factors signalling in normal human dental pulp: a study of gene and protein expression. *Eur J Oral Sci*. 2013a Apr;121(2):92-100.

Virtej A, Løes SS, Berggreen E, Bletsa A. Localization and signaling patterns of vascular endothelial growth factors and receptors in human periapical lesions. *J Endod*. 2013b May;39(5):605-11.

Wang X, Thibodeau B, Trope M, Lin LM, Huang GT. Histologic characterization of regenerated tissues in canal space after the revitalization/revascularization procedure of immature dog teeth with apical periodontitis. *J Endod*. 2010 Jan;36(1):56-63.

Wang J, Ma H, Jin X, Hu J, Liu X, Ni L, et al. The effect of arcabouço architecture on odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells. *Biomaterials*. 2011 Nov;32(31):7822-30.

Yamauchi N, Yamauchi S, Nagaoka H, Duggan D, Zhong S, Lee SM, et al. Tissue engineering strategies for immature teeth with apical periodontitis. *J Endod*. 2011a Mar;37(3):390-7.

Yamauchi N, Nagaoka H, Yamauchi S, Teixeira FB, Miguez P, Yamauchi M. Immunohistological characterization of newly formed tissues after regenerative procedure in immature dog teeth. *J Endod*. 2011b Dec;37(12):1636-41.

Yang LC, Tsai CH, Huang FM, Su YF, Lai CC, Liu CM, et al. Induction of vascular endothelial growth factor expression in human pulp fibroblasts stimulated with black-pigmented *Bacteroides*. *Int Endod J*. 2004 Sep;37(9):588-92.

Yang H, Ma L, Han X, Yang L, Tian C, Wang Y. The effects of tumor necrosis factor- α on mineralization of human dental apical papilla cells. *J Endod*. 2012 Jul;38(7):960-4.

Yang J, Zhao Y, Qin M, Ge L. Pulp revascularization of immature dens invaginatus with periapical periodontitis. *J Endod*. 2013 Feb;39(2):288-92.

Yoo YJ, Lee W, Cho YA, Park JC, Shon WJ, Baek SH. Effect of conditioned medium from preameloblasts on regenerative cellular differentiation of the immature teeth with necrotic pulp and apical periodontitis. *J Endod*. 2014 Sep;40(9):1355-61.

Yuan C, Wang P, Zhu L, Dissanayaka WL, Green DW, Tong EH, et al. Coculture of stem cells from apical papilla and human umbilical vein endothelial cell under hypoxia increases the formation of three-dimensional vessel-like structures in vitro. *Tissue Eng Part A*. 2015 Mar;21(5-6):1163-72.

Zhang W, Walboomers XF, van Kuppevelt TH, Daamen WF, Bian Z, Jansen JA. The performance of human dental pulp stem cells on different three-dimensional arcabouço materials. *Biomaterials*. 2006 Nov;27(33):5658-68.

Zhang R, Cooper PR, Smith G, Nör JE, Smith AJ. Angiogenic activity of dentin matrix components. *J Endod*. 2011 Jan;37(1):26-30.

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA**

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
Tel. (11) 3091 7840-202

Certificado

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **018/2014** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a). **Manoel Eduardo de Lima Machado** Coordenador(a) da Linha de Pesquisa "**Análise da angiogênese em dentes de ratos com apicigênese completa utilizando fator de crescimento endotelial (VEGF)**" do qual participa(am) o(s) pesquisador(es) **Victor Elias Arana-Chavez, Cleber Keiti Nabeshima**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **30/09/2014**, com validade de **03 (três)** anos.

São Paulo, 01 de outubro de 2014.

Prof. Dr. Victor Elias Arana-Chavez
Coordenador do CEUA-FOUSP

ANEXO B – Informações do VEGF rato recombinante fornecido pelo fabricante

DATA SHEET

**Recombinant Rat Vascular Endothelial Growth Factor
VEGF Rat**

Cat # cyt- 392
Lot # 407RVEGF01
Issuance Date: 24 November 2013

Synonyms	Vascular endothelial growth factor A, VEGF-A, Vascular permeability factor, VPF, VEGF, MGC70609.
Description	Vascular Endothelial Growth Factor Rat Recombinant produced in E.Coli is a double, non-glycosylated, polypeptide chain containing 165 amino acids and having a molecular mass of 38,750 Dalton. The VEGF is purified by proprietary chromatographic techniques.
Source	Escherichia Coli.
Physical Appearance	Sterile Filtered White lyophilized (freeze-dried) powder.
Formulation	The protein was lyophilized from 10mM NaP, pH 7.5.
Solubility	It is recommended to reconstitute the lyophilized Vascular Endothelial Growth Factor in sterile 18MΩ-cm H ₂ O not less than 100µg/ml, which can then be further diluted to other aqueous solutions.
Stability	Lyophilized Vascular Endothelial Growth Factor although stable at room temperature for 3 weeks, should be stored desiccated below -18°C. Upon reconstitution VEGF should be stored at 4°C between 2-7 days and for future use below -18°C. For long term storage it is recommended to add a carrier protein (0.1% HSA or BSA). Please prevent freeze-thaw cycles.
Purity	Greater than 97.0% as determined by: (a) Analysis by RP-HPLC. (b) Analysis by SDS-PAGE.
Amino acid sequence	MAPTTEGEQK AHEVVKFMDV YQRSYCRPIE TLVDIFQEYP DEIEYIFKPS CVPLMRCAGC CNDEALECVP TSESNVTMQI MRIKPHQSQH IGEMSFLQHS RCECRPKKDR TKPEKHCEPC SERRKHLFVQ DPQCKCCK NTSRCKARQ LELNERTCRC DKPRR.
Biological Activity	Determined by the dose-dependent stimulation of the proliferation of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) using a concentration range of 4.0-8.0 ng/ml.

ProSpec's products are furnished for **LABORATORY RESEARCH USE ONLY.**

ProSpec-Tany TechnoGene Ltd.
Po. Box 4157, Ness Ziona 7414003, Israel

International Tel: +972-8-9471175
International Fax: +972-8-9460534
USA Toll Free Phone: 1-866-245-0885
USA Toll Free Fax: 1-866-796-4944

Germany Toll Free Phone: 00-800-800-6666
Germany Toll Free Fax: 00-800-800-67890

info@prospecbio.com www.prospecbio.com