UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

LOURDES CHIOK OCAÑA

**Estudo da localização e composição de nichos de células-tronco dentais
frente a resposta à injúria**

BAURU
2018

LOURDES CHIOK OCAÑA

**Estudo da localização e composição de nichos de células-tronco dentais
frente a resposta à injúria**

Tese apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências no Programa de Ciências
Odontológicas Aplicadas, na área de concentração
Dentística.

Orientador: Prof. Dr. Adilson Yoshio Furuse

Co-orientadora: Profª. Dra. Andrea Mantesso Pobocik

Versão Corrigida

BAURU

2018

Chiok Ocaña, Lourdes

Estudo da localização e composição de nichos de células-tronco dentais frente a resposta à injúria / Lourdes Chiok Ocaña – Bauru, 2018.

173 p. : il. ; 31cm.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Bauru.
Universidade de São Paulo

Orientador: Prof. Dr. Adilson Yoshio Furuse

Nota: A versão original desta tese encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação/tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: 01331212.4.0000.5417
Data: 27/06/12

Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA
FOUSP
Protocolo nº: 011/2013
Data 24/06/2013

FOLHA DE APROVAÇÃO

DEDICATÓRIA

Ao meu pai **Deus** por me permitir vir a terra para aprender mais algumas lições!

Ao meus queridos pais **Lourdes e José**, meus companheiros e sustento durante todo o caminho da pós-graduação, por compartilharem comigo todos meus acertos e desacertos sempre do meu lado me dando forças para continuar e perseguir o meu sonho. Eu não sei como posso retribuir tudo o que fizeram por mim! Só posso agradecer!

A minha irmã **Glenny**, que com sua alegria de viver nos contagia a cada dia e nos ensina a aproveitar a vida.

Ao meu sobrinho **Mateo José**, quem com sua chegada tem iluminado e colorido a vida de toda a família.

Aos meus queridos tios, **Lucy, Margarita, Mirella, Angelica, Maria F, Juan, Gloria, Charo** e primos/as que mesmo estando longe sempre estiveram torcendo por mim.

Ao meu padrinho de batismo **José Luis Pérez-Albela**, um segundo pai para mim, sempre presente na minha vida com seus ensinamentos espirituais mostrandome os verdadeiros caminhos da vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a este país, o Brasil, que me recebeu de braços abertos e me permitiu conhece-lo mostrando-me gente generosa por onde eu passei.

A querida FOB que como boa mãe acolhe a todos os seus filhos sem importar de onde vierem. Onde aprendi desde a especialização, o amor a pesquisa e como ela amplia teus horizontes e te faz compreender melhor a clínica.

Aos professores do Departamento de Dentística, Endodontia e Materiais Dentários que tive a oportunidade de conhecer e que muito contribuíram com a minha formação na pós-graduação, Prof. Dr. Eduardo Batista Franco, Prof. Dr. Carlos Eduardo Francischone, Profa. Dra. Maria Teresa Atta, Prof. Dr. Ricardo Marins de Carvalho, Prof. Dr. Aquira Ishikiriyama, Prof. Dra. Maria Fidela de Lima Navarro e Prof. Dr. José Mondelli. Em especial ao Prof. Dr. Francisco Lia Mondelli e a Profa. Linda Wang pela sua compreensão e colaboração para que eu finalizasse o doutorado.

A Prof. Dra. Maria Fidela de Lima Navarro pela sua generosidade em receber a Profa. Andrea Mantesso na sua casa para que ela pudesse vir a Bauru. Por todas as vezes que encontrei com a Sra. nos corredores e sempre me falar palavras de incentivo para continuar.

Ao Prof. Dr. José Carlos Pereira, me orientador durante o mestrado e parte do doutorado. Saiba que tenho uma profunda admiração pelo senhor, pela pessoa verdadeira e honesta que é. Só posso agradecer por todos os momentos compartilhados e por me dar liberdade de escolher uma linha de pesquisa que não era especificamente a sua.

Ao meu orientador Prof. Dr. Adilson Yoshio Furuse, pela confiança depositada em mim, pelos ensinamentos na pesquisa e os conselhos para a vida profissional. Obrigada pela oportunidade.

A Profª. Dra. Andrea Mantesso, minha co-orientadora, obrigada por me receber em São Paulo, e me acolher no seu grupo de pesquisa mesmo sem me conhecer depositou sua confiança para realização desta pesquisa. Por todos os ensinamentos recebidos na área de células-tronco. Pela pessoa generosa e verdadeira que sempre foi comigo. Obrigada por tudo!

Aos companheiros da pós-graduação do Departamento de Dentística, Alfredo, Mauro, Fernanda, Lorena, Angélica, Jackie pelos gratos momentos de convívio.

Ao Departamento de Histologia (meu segundo lar) e seus professores: Prof. Dr. Gerson Francisco de Assis, Prof. Dr. Rumio Taga, Profª. Dra. Camila Rodini e Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet pessoas sempre dispostas a ajudar aos alunos. As técnicas do laboratório: Dani e Patricia, por toda sua colaboração com esta pesquisa. Aos queridos amigos da histologia: Nathy, Rafael, Angelica, Ricardo, Ever, Priscila, Andrea, Michelle, Carol, Dani e Paulinha obrigada por compartilhar momentos tão legais, pelas comidinhas frequentes (histo coffee, histo party) e por me adotarem como se fosse uma a mais. As funcionárias Teresa e Divina por sempre me tratarem com tanto carinho!

Um agradecimento especial a Profª Dra. Camila Rodini por me acolher quando voltei a FOB por me escutar e me ajudar a concluir a pesquisa do doutorado, sempre serei grata a Sra!

A Tania Cestari, que conheci desde o mestrado e sempre foi essa pessoa generosa e disposta a ajudar os outros. Você merece tudo de bom que a vida pode lhe dar, só posso lhe agradecer por tudo o que me ensinou, não só de pesquisa senão para a vida!

A Dona Cleusa, conheci ainda no mestrado como funcionária da clínica da pós-graduação e depois viramos amigas. Obrigada pela convívio, pelos ensinamentos da vida, por me falar sempre de Deus, pela sua ajuda todas as vezes que eu voltei para Bauru, por todas as vezes que me deu pousada na sua casa. Deus a abençoe!

Aos grandes amigos que fiz na pós-graduação e que levo para à vida, Rosalyn Chidiak, Ronald Ordinola, Emilio Rodriguez, Lucyene Miguita, Nathalia Lopes, Odair Bim Júnior, Milene Andregueti, Flavia Rosin, Ana Teresa Semeano, Priscila Tobouti e Nelise Lascane. Obrigada por estarem comigo sempre que eu precisei.

A Márcia Graeff do Centro Integrado de Pesquisa, por toda ajuda na realização das imagens no microscopio confocal de varredura a laser e sobretudo pela paciência para tirar tantas fotografias e ainda procurar células tão pequenas. Valeu!

Aos professores do Departamento de Estomatologia, Disciplina de Patologia Oral e Maxilofacial da FOU SP, Profa. Dra Marina Gallottini, Profa. Dra. Suzana Orsini, Profa. Dra. Karem Lopez, Profa. Dra. Marília Trierveiler, Prof. Dr. Fabio Daumas, Prof. Dr. Décio dos Santos e Profa. Dra. Andrea Mantesso por me permitirem usar seus laboratórios para a realização de grande parte desta pesquisa.

Aos amigos e colegas da Disciplina de Patologia Oral da FOU SP, Flavia Rosin, Marina Teixeira, Bruno Sedassari, Nelise Lascane, Fernanda Pigatti, Carol Mussi, Karin Sá Fernandes, Carina Esteves pelos ensinamentos e gratos momentos de convívio.

Aos técnicos de laboratório do Departamento de Estomatologia, Disciplina de Patologia Oral e Maxilofacial da FOU SP, Juvani Lago, Adriana Fraga e Elisa dos Santos pela sua ajuda na cultura de células assim como no processamento das amostras.

A Profa. Dra. Luciana Corrêa do Departamento de Estomatologia, Disciplina de Patologia Geral. Agradeço pela sua colaboração na realização desta pesquisa, por todas as vezes que me escutou e me ajudou dando sempre bons conselhos. Sou muito grata a Sra!

Agradeço a todos funcionários da FOB que de forma direta ou indireta, colaboraram com minha formação pessoal e profissional. Meu muito obrigada a todos!

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À Universidade de São Paulo, por meio do atual reitor Professor Dr. Vahan Agopyan.

À Faculdade de Odontologia de Bauru, por meio do atual diretor Professor Dr. Carlos Ferreira dos Santos.

À Comissão do Programa de Pós-Graduação por meio da atual presidente Professora Dra. Izabel Regina Fischer Rubira de Bullen.

Ào Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro para a execução desse trabalho.

The greatest enemy of knowledge is not ignorance, it
is the illusion of knowledge”

Stephen Hawking

RESUMO

Em busca de novas estratégias para o reparo de tecidos pulpare com células-tronco faz-se necessário compreender melhor o nicho em que elas se encontram. Uma forma é observar o mecanismo de ativação sobre estas células durante o reparo de tecidos pulpare após sofrer uma injúria. Assim, foi proposto estudar a localização e composição do nicho das células-tronco da polpa dental através da exposição pulpar induzida *in vitro* em dentes humanos e *in vivo* em dentes de ratos, através da incorporação de Bromodeoxiuridina (BrdU) e Iododeoxiuridina (IdU) e co-expressão com proteínas de células-tronco. Para o ensaio *in vitro*, 33 terceiros molares humanos com rizogênese incompleta foram divididos em 3 grupos: dentes com exposição pulpar induzida e mantidos em cultivo (GCE, grupo cultura exposição) (n=15); dentes sem injúria e mantidos em cultivo (GCC, grupo cultura controle) (n=15); dentes hígidos apenas (GH, grupo hígido) (n=3). Os grupos GCE e GCC, foram cultivados com BrdU (10 µl/ml) por 24h e posteriormente analisados após 2, 5 e 14 dias. Para o ensaio *in vivo*, 12 ratos *Wistar* receberam IdU (1mg/ml) diluído na água por 30 dias. Após 45 dias foram divididos em 2 grupos: grupo *in vivo* com exposição pulpar (GIVE) (n=17 dentes) e grupo *in vivo* controle (GIVC) (n=16 dentes). No GIVE foi realizada a exposição pulpar no primeiro molar e em seguida restaurado com Coltosol. Após 2, 4 e 8 dias pós-operatórios as amostras foram coletadas e processadas para análise histológica e imuno-histoquímica. As proteínas CD90, CD146, PDGFrβ e BrdU foram analisadas em duas áreas: lesão e centro em molares humanos enquanto, as proteínas CD90, NG2 e IdU foram analisadas em uma área única, em molares de rato. As análises estatísticas foram efetuadas pelos testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis, $p \leq 5\%$. Em dentes humanos, na área de lesão do grupo GCE, células BrdU positivas foram encontradas nos três períodos, sendo presentes em maior número células PDGFrβ positivas nos dias 2 e 5 e células CD90 positivas no 14º dia; no centro pulpar, no 2º dia pós injúria houve um número semelhante de células CD90, CD146 e PDGFrβ positivas, sendo encontradas em maior porcentagem no 5º dia células PDGFrβ e CD90 positivas e 14º dia células CD90 positivas. No grupo GCC na área equivalente à lesão, células CD90 (2 e 5 dias) e PDGFrβ (14 dias) positivas foram encontradas em maior percentual; no centro pulpar, o número de células positivas para CD90, CD146 e PDGFrβ foi semelhante em todos os períodos, sendo encontradas células BrdU positivas no 2º dia. Em molares de ratos, no GIVE houveram mais células NG2 positivas no 2º dia, IdU no 4º dia e CD90 no 8º dia. No GIVC, o CD90 foi altamente expresso em todos os períodos analisados, a

proteína NG2 também foi expressa em odontoblastos e CD90 na camada subodontoblástica em molares de rato. Todas as proteínas mencionadas coexistem no tecido pulpar humano e animal formando populações celulares heterogêneas perivasculares e perineurais encontradas em maior concentração em regiões próximas à área de injúria, sugerindo que nichos perivasculares e perineurais participam em conjunto na homeostase pulpar em resposta à injúria.

Palavras-Chave: Nicho de células-tronco. Polpa Dentária. Bromodesoxiuridina.

ABSTRACT

Study of localization and composition of dental stem cell niches in response to injury

In pursuit of new strategies for pulp tissue repair with stem cells, it is necessary to better understand the niche in which they are found. One way is to observe the mechanism of these cells activation during the repair of pulp tissues after suffering an injury. Thus, it was proposed to study the location and composition of the dental pulp stem cell niche through induced dental pulp exposure *in vitro* in human teeth and *in vivo* in rat teeth by incorporating Bromodeoxyuridine (BrdU) and Iododeoxyuridine (IdU) and co-expression with stem cell proteins. For the *in vitro* assay, 33 human third molars with incomplete rhizogenesis were divided into 3 groups: teeth with induced pulp exposure and maintained in culture (GCE, group cultured with pulp exposure) (n = 15); healthy teeth maintained in culture (GCC, control cultured group) (n = 15); healthy teeth only (GH, healthy group) (n = 3). GCE and GCC groups were cultured with BrdU (10 μ l / ml) for 24 h and subsequently analyzed after 2, 5 and 14 days. For the *in vivo* assay, 12 Wistar rats received IdU (1mg / ml) diluted in water for 30 days. After 45 days were divided into 2 groups: *in vivo* group with pulp exposure (GIVE) (n = 17 teeth) and *in vivo* control group (GIVC) (n = 16 teeth). In GIVE, the pulp exposure was performed on the first molar and then restored with Coltosol. After 2, 4 and 8 postoperative days the samples were collected and processed for histological and immunohistochemical analysis. CD90, CD146, PDGFr β and BrdU proteins were analyzed in two areas: injury and center in human molars whereas, CD90, NG2 and IdU were analysed in a single area in rat molars. Statistical analyzes were performed by the Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests, $p \leq 5\%$. In human teeth, in the lesion area of the GCE group, BrdU positive cells were found in the three periods, while a greater number of PDGFr β positive cells on days 2 and 5 and CD90 positive cells on the 14th day was found; in the pulp center, on the second day after injury there were a similar number of CD90, CD146 and PDGFr β positive cells, and found in greater percentage in the 5th day PDGFr β and CD90 positive cells and in 14th day CD90 positive cells. In the GCC group, in the area equivalent to injury site, CD90 (2 and 5 days) and PDGFr β (14 days) positive cells were found in a higher percentage; in the pulp center, the number of cells positive for CD90, CD146 and PDGFr β was similar in all periods, and BrdU positive cells were found on day 2. In rat molars, GIVE presented more positive cells for NG2 on day 2, for IdU on day 4 and CD90 on day 8. In the GIVC, CD90

was highly expressed in all periods analysed, the NG2 protein was also expressed in odontoblasts and CD90 in the subodontoblastic layer in rat molars. All mentioned proteins coexist in the human and animal pulp tissue forming heterogeneous perivascular and perineural cellular populations found in greater concentration in regions near the area of injury, suggesting that perivascular and perineural niches participate together in pulpal homeostasis in response to injury.

Keywords: Stem Cell Niche. Dental Pulp. Bromodeoxyuridine.

LISTA DE TABELAS E QUADROS

- TABELAS

Tabela 1	- Perfil de marcadores encontrados em células-tronco de polpa dental, adaptada de Bakopoulou e About (2016).	31
Tabela 2	- Grupos experimentais para molares humanos:	52
Tabela 3	- Distribuição dos grupos experimentais in vivo, de acordo com o número de molares de rato e de animais de acordo com os períodos analisados.....	54
Tabela 4	- Anticorpos primários e secundários e condições experimentais utilizadas nas técnicas de IHQ e IF.....	57
Tabela 5A	- Dados estatísticos obtidos para o percentual de células marcadas para BrdU (%) na área da LESÃO para os grupos GCE e GCC nos diferentes períodos experimentais.....	83
Tabela 5B	- Dados estatísticos obtidos para o percentual de células marcadas para BrdU (%) na área do CENTRO da polpa para os grupos GCE e GCC nos diferentes períodos experimentais.....	84
Tabela 6A	- Dados estatísticos obtidos para o percentual de células marcadas para CD90 (%) na área da LESÃO para os grupos GCE e GCC nos diferentes períodos experimentais.....	85
Tabela 6B	- Dados estatísticos obtidos para o percentual de células marcadas para CD90 (%) na área do CENTRO para os grupos GCE e GCC nos diferentes períodos experimentais.....	85
Tabela 7A	- Dados estatísticos obtidos para o percentual de células marcadas para CD146 (%) na área da LESÃO para os grupos GCE e GCC nos diferentes períodos experimentais.....	86
Tabela 7B	- Dados estatísticos obtidos para o percentual de células marcadas para CD146 (%) na área do CENTRO para os grupos GCE e GCC nos diferentes períodos experimentais.....	87

Tabela 8A - Dados estatísticos obtidos para o percentual de células marcadas para PDGF-receptor β (%) na área da LESÃO para os grupos GCE e GCC nos diferentes períodos experimentais.....	88
Tabela 8B - Dados estatísticos obtidos para o percentual de células marcadas para PDGF-receptor β (%) na área do CENTRO para os grupos GCE e GCC nos diferentes períodos experimentais	88
Tabela 9 - Número final de amostras nos grupos experimentais de animais	98
Tabela 10 - Dados estatísticos obtidos para o percentual de células marcadas para IdU (%) para os grupos GIVE e GIVC nos diferentes períodos experimentais. ..	116
Tabela 11 - Dados estatísticos obtidos para o percentual de células marcadas para CD90 (%) para os grupos IVE e IVC nos diferentes períodos experimentais.	117
Tabela 12 - Dados estatísticos obtidos para o percentual de células marcadas para NG2 (%) para os grupos IVE e IVC nos diferentes períodos experimentais.....	117
 - QUADROS	
Quadro 1 - Resumo das marcações em dentes humanos	81
Quadro 2 - Resumo das marcações em molares animais	115

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

Figura 1	- Cultura de órgão.....	51
Figura 2	- Procedimento cirúrgico em animais	54
Figura 3	- Padronização da captura de imagens das áreas pulpare para quantificação	59
Figura 4	- Características histológicas do tecido pulpar no grupo hígido (GH) (B e C) e os grupos cultura controle (GCC) nos diferentes períodos 2 (D e E), 5 (F e G) e 14 dias (H e I)	65
Figura 5	- Características histológicas do tecido pulpar no grupo hígido (GH) e no grupo cultura exposição (GCE) nos diferentes períodos 2, 4 e 8 dias.....	67
Figura 6	- Expressão de CD90, CD146 e PDGFr β no grupo hígido (GH)	69
Figura 7	- Expressão da proteína Bromodeoxiuridina (BrdU) no grupo cultura controle (GCC) e grupo cultura exposição (GCE) nos períodos de 2, 5 e 14 dias	71
Figura 8	- Expressão da proteína CD90 nos grupos cultura controle (GCC) e grupo cultura exposição (GCE) nos períodos 2, 5 e 14 dias	73
Figura 9	- Expressão da proteína CD146 nos grupos cultura controle (GCC) e grupo cultura exposição (GCE) nos períodos 2, 5 e 14 dias	76
Figura 10	- Expressão da proteína PDGFr β nos grupos cultura controle (GCC) e grupo cultura exposição (GCE) nos períodos 2, 5 e 14 dias	79
Figura 11	- Co-expressão de CD90/BrdU em tecido pulpar de molares humanos com e sem exposição pulpar	92
Figura 12	- Co-expressão de CD146/BrdU em tecido pulpar de molares humanos.....	94
Figura 13	- Co-expressão de PDGFr β /BrdU em tecido pulpar de molares humanos	96
Figura 14	- Características histológicas do tecido pulpar no grupo <i>in vivo</i> controle (GIVC).....	100
Figura 15	- Características histológicas do tecido pulpar no grupo <i>in vivo</i> exposição (GIVE) ..	102
Figura 16	- Expressão da proteína Iododeoxiuridina (IdU) no grupo <i>in vivo</i> controle (GIVC)..	105

Figura 17	- Expressão da proteína Iododeoxiuridina (IdU) no grupo <i>in vivo</i> exposição (GIVE).....	107
Figura 17	- Expressão da proteína CD90 no grupo <i>in vivo</i> controle (GIVC)	108
Figura 18	- Expressão da proteína CD90 no grupo <i>in vivo</i> exposição (GIVE).....	110
Figura 19	- Expressão da proteína NG2, no grupo <i>in vivo</i> controle (GIVC)	112
Figura 20	- Expressão da proteína NG2, no grupo <i>in vivo</i> exposição (GIVE).....	114
Figura 21	- Esquema baseado nos artigos de Blocki et al. (2013); Loibl et al. (2014); Petersen e Adameyko, (2017).....	137

- GRÁFICOS

Gráfico 1	- Porcentagem da expressão das diferentes proteínas analisadas em tecido pulpar humano nos grupos GCC e GCE na área de Lesão.....	89
Gráfico 2	- Porcentagem da expressão das diferentes proteínas utilizadas em tecido pulpar humano nos grupos GCC e GCE na área Centro.	90
Gráfico 3	- Comparação das porcentagens expressas pelas diferentes proteínas analisadas em tecido pulpar humano por áreas: Lesão e Centro nos grupos GCC e GCE.	90
Gráfico 4	- Porcentagem da expressão das diferentes proteínas utilizadas em tecido pulpar animal nos grupos <i>in vivo</i> exposição (GIVE) e grupo <i>in vivo</i> controle (GIVC).	118
Gráfico 5	- Comparação das porcentagens expressas pelas diferentes proteínas utilizadas em tecido pulpar animal nos GIVC e GIVE.	118

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1	Nichos de células-tronco	25
2.1.1	Matriz extracelular (MEC)	26
2.1.2	Quiescência	27
2.2	Células-tronco mesenquimais	28
2.2.1	Células-tronco dentais	29
2.2.2	Células-tronco da polpa dental de dente permanente (CTPD)	30
2.3	Marcadores moleculares de células-tronco mesenquimais.....	34
2.3.1	Marcadores de proliferação celular	34
2.3.2	Cluster de diferenciação 90 (CD90).....	35
2.3.3	Cluster de diferenciação 146 (CD146).....	36
2.3.4	Receptor β do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR β)	38
2.3.5	Neural/Glial Antígeno 2 (NG2)	39
3	PROPOSIÇÃO	45
3.1	Objetivo Específico	45
4	MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1	Parte I: Modelo humano	49
4.1.1	Obtenção das amostras	49
4.1.1.1	Critérios de inclusão	49
4.1.1.2	Critérios de exclusão	49
4.1.2	Transporte, modelo de injúria e cultivo de dentes humanos	50
4.2	Parte II: Modelo animal.....	52
4.2.1	Obtenção dos animais.....	52
4.2.2	Ensaio de incorporação de 5-Iodo-2'-deoxiuridina (IdU).....	52
4.2.3	Procedimento cirúrgico	53
4.3	Fixação, descalcificação e inclusão dos espécimes.....	54
4.4	Coloração por hematoxilina e eosina	55

4.5	Imuno-histoquímica (IHQ)	55
4.6	Imunofluorescência (IF)	56
4.7	Análise das amostras	57
4.7.1	Análise morfológica dos cortes teciduais da área da lesão corados por HE.....	57
4.7.2	Determinação do percentual de células positivas para cada proteína alvo: BrdU, CD90, CD146, PDGFr β e NG2 por meio da IHQ	58
4.8	Análise estatística	60
5	RESULTADOS.....	63
5.1	Parte I: Resultados do modelo humano	63
5.1.1	Análise morfológica do dente hígido com rizogênese incompleta (Grupo GH) corados por HE.....	63
5.1.2	Grupos cultura controle (GCC).....	64
5.1.2.1	Grupo cultura controle - 2 dias	64
5.1.2.2	Grupo cultura controle - 5 dias	64
5.1.2.3	Grupo cultura controle - 14 dias	64
5.1.3	Grupos cultura exposição (GCE).....	65
5.1.3.1	Grupo cultura exposição - 2 dias.....	65
5.1.3.2	Grupo cultura exposição - 5 dias.....	66
5.1.3.3	Grupo cultura exposição - 14 dias.....	66
5.1.4	Padrão da imunomarcção das proteínas alvo em molares humanos (Grupo Hígido, GH)	68
5.1.5	Imunomarcção nos Grupo Experimentais Humanos.....	70
5.1.5.1	Grupo cultura controle (GCC) – BrdU	70
5.1.5.2	Grupo cultura exposição (GCE) – BrdU	70
5.1.5.3	Grupo cultura controle (GCC) – CD90	72
5.1.5.4	Grupo cultura exposição (GCE) - CD90	72
5.1.5.5	Grupo cultura controle (GCC) – CD146	75
5.1.5.6	Grupo cultura exposição (GCE) – CD146.....	75
5.1.5.7	Grupo cultura controle (GCC) – PDGFr β	78
5.1.5.8	Grupo cultura exposição (GCE) – PDGFr β	78
5.1.5.9	Quadro resumo das marcações em dentes humanos	81

5.1.6	Percentual e dados estatísticos de células imunomarcadas para cada proteína em molares humanos.....	83
5.1.6.1	BrdU	83
5.1.6.2	CD90.....	84
5.1.6.3	CD146.....	86
5.1.6.4	PDGFr β	87
5.1.6.5	Gráficos estatísticos.....	89
5.1.7	Dupla marcação por imunofluorescência em molares humanos (co-expressão)	90
5.1.7.1	CD90/BrdU	91
5.1.7.2	CD146/BrdU	93
5.1.7.3	PDGFR β /BrdU	95
5.1.7.4	Desenho esquemático das marcações encontradas em molares humanos.....	97
5.2	Parte II: Modelo animal	97
5.2.1	Análise morfológica dos cortes teciduais de ratos corados por HE	98
5.2.1.1	Análise morfológica do grupo in vivo controle (GIVC) em ratos	98
5.2.1.2	Análise morfológica do grupo in vivo exposição (GIVE) em ratos.....	100
5.2.2	Padrão da imunomarkação das proteínas alvo em molares de ratos	103
5.2.2.1	Grupo in vivo controle (GIVC) – IdU	103
5.2.2.2	Grupo in vivo exposição (GIVE) – IdU	106
5.2.2.3	Grupo in vivo controle (GIVC) – CD90.....	107
5.2.2.4	Grupo in vivo exposição (GIVE) - CD90.....	109
5.2.2.5	Grupo in vivo controle (GIVC) - NG2	111
5.2.2.6	Grupo in vivo exposição (GIVE) - NG2	113
5.2.2.7	Quadro resumo das marcações em molares animais	115
5.2.2.8	Percentual de células imunomarcadas para cada proteína alvo em molares animais.....	116
5.2.2.9	Gráficos estatísticos.....	118
5.2.2.10	Desenho esquemático das marcações encontradas em molares de ratos.....	119
6	DISCUSSÃO.....	123
7	CONCLUSÕES	141
	REFERENCIAS	145
	ANEXOS.....	165

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

Apesar da palavra “nicho” ser citada na literatura há mais de 39 anos (SCHOFIELD, 1978), o conhecimento sobre o funcionamento e constituição deste microambiente ainda é precário nos tecidos dentais humanos, seja em homeostase ou em resposta à injúria. Avanços no entendimento sobre nichos de células-tronco e aplicação clínica em humanos é encontrado principalmente com células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea, as quais servem de exemplo a ser seguido para a melhor compreensão de outros nichos de células-tronco mesenquimais em diferentes tecidos (SCADDEN, 2014), como a polpa dental.

Uma peça chave para entendermos o funcionamento destes nichos é identificar as células que o formam. Entre outras técnicas, a expressão gênica tem se usado para purificação de células extraídas de tecido enquanto, marcadores de superfície utilizam-se para identificação de células *in situ*. Até hoje não existe um marcador molecular que identifique todas as células-tronco e, que exclua todas as que não são, além disso, devemos levar em consideração a heterogeneidade das populações celulares dentro de um mesmo tecido assim como, a expressão espaço-temporal de alguns marcadores por tanto, esta informação, muitas vezes deve ser suplementada com a localização anatômica.

Alguns marcadores tem mostrado indícios de certa especificidade para células-tronco de origem mesenquimal e recentemente de origem glial, assim o CD90 esta associado com células-tronco mesenquimais (CTMs) de origem dental derivadas de células de Schwann (KAUKUA et al., 2014); *in vitro*, tem mostrado que controla a diferenciação osteogênica e adipogênica das CTMs atuando como um obstáculo na via do comprometimento para diferenciação (MORAES et al., 2016). Por outro lado, o CD146 já é considerado um marcador de linhagem perivascular para CTMs (CRISAN et al., 2008) e associa-se a promoção e regulação da neurogênese e da angiogênese (LIU et al., 2016). Da mesma forma, a sinalização do PDGFr β é necessária para o recrutamento de pericitos durante a angiogênese em diversos órgãos (ENGE et al., 2002; BJARNEGARD et al., 2004). Na polpa dental, é necessário para manter o estado indiferenciado e/ou a capacidade de proliferação de células progenitoras da polpa (SHIWEI et al., 2016) e associa-se a regeneração de nervos periféricos (YAMAZAKI et al., 2009). O NG2 é um marcador de pericitos, associado a vasos de pequeno calibre em tecido humano e animal (camundongos e ratos). Além disso, no sistema nervoso periférico, o NG2 também pode marcar células perineurais de feixes vâsculo-nervosos

(RICHARD et al., 2014). Assim também, pericitos NG2 podem gerar CTMs dentro de áreas de injúria e criar um ambiente regenerativo através da liberação de fatores tróficos bioativos (ZHANG et al., 2013).

Aliado aos marcadores de superfície, a utilização de marcadores de proliferação celular tem demonstrado ser uma ferramenta valiosa para ajudar a identificar diferentes populações celulares no nicho. A incorporação de análogos sintéticos da timidina como a Bromodeoxiuridina (BrdU) e Iododeoxiuridina (IdU) no DNA celular possibilita rastrear células que se dividem lentamente, uma característica das células-tronco adultas, devido a isso, chamadas de LRC (do inglês *label-retaining cell*) (COTSARELIS et al., 1990; ZHANG et al., 2003; TUMBAR et al., 2004).

Muito do que é sabido na literatura acerca de nichos de células-tronco de polpa dental é através de experimentos em animais (FENG et al., 2011), devido às limitações técnicas e éticas quanto ao uso de pesquisas *in vivo* com humanos. Uma forma viável de reproduzir a análise *in vivo* de tecidos humanos são os modelos experimentais utilizando o cultivo de dentes humanos com vitalidade pulpar em laboratório (TECLES et al., 2005; TECLES et al., 2008; ARTHUR et al., 2009). Estes dentes mostram vitalidade suficiente para analisar a mobilização celular e sinais de diferenciação em períodos de até 28 dias, fornecendo assim, uma ferramenta importante para o estudo dos mecanismos de regulação molecular em tecidos pulpares humanos. O cultivo de dentes em laboratório permite analisar a resposta celular em um ambiente controlado e removendo possíveis fatores sistêmicos (como por exemplo, células provenientes da circulação sanguínea). Esse controle favorece uma visualização objetiva da resposta tecidual e a localização das células de interesse que estão respondendo à determinado estímulo (como por exemplo a injúria).

Por outro lado, o modelo animal, é mais abrangente e fornece instrumentos que ajudam a compreender fenômenos que ainda não podem ser estudados em seres humanos, permitindo verificar o que pode ocorrer *in vivo*, mesmo que, algumas diferenças existam no metabolismo entre animais e humanos (NEVES et al., 2017)

Assim, foi proposto um estudo utilizando a técnica de cultura de dentes humanos, assim como um estudo em modelo animal, *in vivo*, para a análise dos nichos de células-tronco dentais com a finalidade de trazer resultados importantes, inéditos e necessários para melhor elucidar sobre o comportamento destas células frente à uma injúria pulpar.

2 Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

Sabe-se que após uma lesão/injúria ou trauma o organismo estabelece uma estratégia para reparar o defeito produzido. Dentre as estratégias incluem-se uma cascata de eventos que leva à resolução da lesão da melhor forma possível de acordo com as necessidades daquele tecido no momento, seja através do reparo/cicatrização ou a regeneração. Infelizmente, na maioria dos casos o mais visível é a cicatrização, o que faz com que o tecido perca a função. No caso de tecidos orais, como especificamente a polpa dental, não é diferente e muitas vezes leva à necrose tecidual.

Como parte dos mecanismos para resolução do tecido, temos dois componentes importantes: 1) a ordem ou sinal para ativar toda a maquinaria celular que parte de uma estrutura tridimensional denominada “nicho” ou microambiente celular; e 2) quem executa a ordem, por exemplo, um tipo de célula com características especiais, chamada de célula-tronco, que irá atuar na regeneração e reparação tecidual, substituindo e repopulando o microambiente tecidual. Nesta breve revisão vamos centrar sobre estes dois componentes do mecanismo de reparo/regeneração após uma lesão pulpar.

2.1 Nichos de células-tronco

Foram as observações de Schofield (1978) em medula óssea de ratos que definiram que as células-tronco (CsT) tinham localização anatômica específica, cunhando o termo “nicho” pela primeira vez. Atualmente considera-se o nicho de CsT um microambiente especializado, complexo e dinâmico (LANE et al., 2014) que existe nos tecidos *in vivo* e que apresenta características especiais. Sua função principal é especificar o destino das CsT regulando a divisão celular (GHAEMI et al., 2013). Dentro do nicho as CsT são mantidas em estado quiescente, protegidas de mutações aberrantes (SCHOFIELD, 1978) induzidas a autorrenovação ou comprometidas para um estado mais diferenciado (FERRARO et al., 2010). O nicho é capaz de especificar se haverá divisão simétrica ou assimétrica dependendo da necessidade (GHAEMI et al., 2013). A divisão simétrica, produz duas CsT ou duas células filhas diferenciadas, e a assimétrica, produz uma célula filha idêntica a ela mesma (uma CsT) e outra diferenciada (KNOBLICH, 2008). A posição das células filhas dentro do nicho

determina se as células continuam quiescentes ou se iniciam a diferenciação celular através de diferentes níveis de exposição a determinados fatores/estímulos (GHAEMI et al., 2013).

Em ocasiões especiais, o nicho pode manter suas principais funções e propriedades ainda na ausência temporal de CsT, como nos casos de depleção de CsT nos tratamentos de radiação permitindo o recrutamento e *homing* (habilidade da célula-tronco encontrar seu nicho) de CsT exógenas para o nicho preexistente (FERRARO et al., 2010). Na pele, tem se demonstrado que o nicho do folículo piloso disponível criado pós-ablação com laser pode ser repovoado com uma população de células que não são tronco que toma as funções das mesmas (ROMPOLAS et al., 2013) mostrando os mecanismos que o nicho tem para sobreviver ainda sem CsT buscando manter o equilíbrio do nicho.

Por natureza os nichos são únicos e específicos, porém todos possuem componentes celulares e não celulares. Entre os componentes celulares, além das CsT, estão presentes as seguintes células residentes no nicho (FERRARO et al., 2010): células endoteliais, células neurais e fibroblastos. Também existem as células circulantes, “visitantes” do nicho que podem incluir: células do sistema imune, que protegem contra patógenos, ou que respondem ao dano tecidual. Entre os componentes acelulares encontram-se os fatores secretados no microambiente (quimiocinas, hormônios entre outros), o controle imunológico, a matriz extracelular, os parâmetros físicos (elasticidade, rigidez) e o controle metabólico (LANE et al., 2014).

Por outro lado, a lista de células do nicho que contribuem com o microambiente de CsT continua crescendo. Por exemplo, progênie de CsT se tornam células do nicho para regular o comportamento das CsT (HSU; FUCHS, 2012) (SCADDEN, 2014). Estas progênie fornecem sinais para manter a quiescência e prevenir a ativação excessiva da proliferação de CsT, desse modo, preservando um pool de CsT funcional (SO; CHEUNG, 2018)

2.1.1 Matriz extracelular (MEC)

A matriz extracelular (MEC) merece um tópico a parte, pois nos últimos anos tem mostrado um papel fundamental no controle da quiescência e da ativação celular. A MEC atua como um sistema de ancoragem onde CsT, células estromais e sinais moleculares estão embebidas. Sua função é reter as CsT no local, para localizar sinais e criar gradientes que

possam guiar as CsT no seu processo de autorenovação e diferenciação (FERRARO et al., 2010). Em alguns casos a MEC também ancora fatores de crescimento solúveis aumentando no local a concentração de agonistas aos quais as populações alvo no nicho estão expostas (BRIZZI et al., 2012). Por tanto, a matriz extracelular não somente serve de ancoragem para as CsT mas também direciona seu destino (HALLE; WATT, 1989). Estudos recentes mostram que sinais sistêmicos produzidos por injúria s remotas não atuam diretamente sobre as CsT em vez disso, eles são traduzidos em sinais que remodelam a matriz extracelular que rodeia as CsT e prepara as CsT quiescentes para uma ativação celular mais rápida (RODGERS et al., 2014).

2.1.2 Quiescência

Nos mamíferos adultos, a maioria das células estão fora do ciclo celular ativo, podem ser células terminalmente diferenciadas, ou em estado senescente, ou em quiescência (YAO, 2014). Quando não há condições favoráveis para o crescimento das células, por exemplo na deficiência de soro, estas são retiradas do ciclo e entram em quiescência (PARDEE, 1974). As células em estado quiescente, também chamada de fase G₀, se mantém por um tempo prolongado sem dividir-se sob condições normais. O diferencial entre elas e as outras é a reversibilidade da detenção do ciclo celular sendo uma característica que as distingue (SO; CHEUNG, 2018).

Células quiescentes tem tamanho menor, são metabolicamente menos ativas com síntese de proteína e RNA total suprimido além disso, mostram aumento da autofagia (COLLER et al., 2006; VALENTINE; YANG, 2008). Embora tenha se pensado que o estado quiescente é um estado de completo repouso celular, novas descobertas estão mudando essa percepção. Estudos sugerem que, além de ter uma assinatura molecular da detenção do ciclo celular, células em quiescência ativamente expressam genes que previnem a diferenciação terminal e assim preservam a reversibilidade do ciclo (COLLER et al., 2006) (SO; CHEUNG, 2018).

As CsT derivadas de diferentes tecidos residem em nichos onde os níveis de oxigênio estão mais baixos que os níveis no tecido circulante, desta forma, permanecem em um compartimento anatômico distinto onde as células podem manter-se em baixas taxas de proliferação e limiar de estresse oxidativo (MOHYELDIN et al., 2010), o que favorece manterem-se em um estado de quiescência.

2.2 Células-tronco mesenquimais

Os primeiros relatos da existência de células-tronco mesenquimais são atribuídos a Friedenstein et al. (1974) definindo-as como progenitoras mesenquimais com capacidade de formar unidades formadoras de colônias fibroblásticas, aderentes ao plástico, com capacidade clonogênica (FRIEDENSTEIN et al., 1974b). Mais tarde chamadas de células estromais da medula (EAVES et al., 1991) e atualmente denominadas como células-tronco mesenquimais (CTMs) baseada em suas capacidades clonogênicas e habilidades para se diferenciar em linhagens mesenquimais (CAPLAN, 1991). Podem ser facilmente isoladas de múltiplos tecidos como vasos do cordão umbilical, tecido adiposo, músculo, placenta, pulmão, córnea, vasos sanguíneos, polpa dental entre outros NIH (2016); sem a necessidade de obtê-las através de grandes procedimentos invasivos e, atualmente, usadas para transplantes alógenos pela baixa imunogenicidade e por tratarem-se de células derivadas de tecidos adultos com menos impedimentos éticos (SALGADO et al., 2006) (TEIXEIRA et al., 2013).

As CTMs tem sido definidas, há mais de uma década, de acordo com os critérios da *International Society for Cellular Therapy* (ISCT) como células multipotentes, com capacidade para se diferenciar em pelo menos 3 linhagens, osteogênica, condrogênica e adipogênica, com propriedades de autorenovação, capazes de aderir a placa de cultura e mostrar a presença de marcadores de superfície como o CD105, CD73, CD90 assim como, a ausência de marcadores hematopoiéticos como CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79a ou CD19 e antígeno leucocitário humano (HLA-DR) (DOMINICI et al., 2006). Outras linhagens como células neurais (HUANG et al., 2009) (HUANG; GRONTHOS; SHI, 2009), cardiomiócitos, hepatócitos e células endoteliais também têm sido originadas de CTMs (NOMBELA-ARRIETA et al., 2011).

Inicialmente, os estudos focavam na possibilidade de aplicação clínica das CTMs devido a sua capacidade de gerar diferentes tecidos, podendo ser utilizadas na geração de substituir tecidos perdidos (DOMINICI et al., 2006), porém estas células têm demonstrado um potencial terapêutico além desta capacidade, mas como também pela influência que estas células têm de promover sobre o ambiente extracelular onde residem, através da secreção de fatores de crescimento (GNECCHI et al., 2005). Atualmente, aceita-se que os efeitos regeneradores das CTMs estão principalmente associados a seu secretoma, composto pela fração solúvel proteica, constituída por fatores de crescimento, citocinas e uma fração vesicular, composta por microvesículas e exossomos os quais estão envolvidos na

transferência de proteínas e material genético (miRNA) para outras células (TEIXEIRA et al., 2013). Este secretoma pode ter ações sobre outros nichos. Estudos mostram que a injeção do secretoma de CTMs, por si só, é capaz de modular a sobrevivência e a diferenciação neuronal dentro do hipocampo de rato adulto (TEIXEIRA et al., 2015).

2.2.1 Células-tronco dentais

A procura por células-tronco mesenquimais pós-natais em tecidos específicos levou a descoberta de populações em tecidos dentários saudáveis, entre eles, no tecido pulpar de dentes permanentes (DPSCs do inglês, *Dental Pulp Stem Cells*) (GRONTHOS et al., 2000); no tecido pulpar de dentes decíduos (SHED do inglês, *Stem Cell Human Exfoliated Deciduous Teeth*) (MIURA et al., 2003); na papila dentária de dentes permanentes em desenvolvimento (SCAP do inglês, *Stem Cell Apical Papilla*) (SONOYAMA et al., 2006, 2008); no ligamento periodontal (PDLSCs do inglês, *Periodontal Dental Ligament Stem Cells*) (SEO et al., 2004); no epitélio dental (EpSCs do inglês, *Epithelial Stem Cells*) (IZUMI et al., 2007); no folículo dental (DFPCs do inglês, *Dental Follicle Precursor Cells*) (MORSCZECK et al., 2005); células progenitoras multipotentes da gengiva (GMPC do inglês, *Gingival Multipotent Progenitor Cell*) (ZHANG et al., 2009) e células mesenquimais estromais derivadas da medula óssea de ossos gnáticos (ABMMSC do inglês, *Alveolar Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells*) (HAN et al., 2009; LEE et al., 2011; EGUSA et al., 2012).

Também há relatos do isolamento de células-tronco mesenquimais de tecidos dentais não saudáveis, como de dentes com pulpíte (ALONGI et al., 2010; MALEKFAR et al., 2016) e até mesmo derivados de áreas de dentes com cistos periapicais (MARRELLI et al., 2013).

No geral, células-tronco de origem dental mostram potencial de multidiferenciação, com capacidade para dar origem pelo menos a quatro linhagens: osteo/odontogênica, adipogênica, condrogênica e neurogênica. Esta última, talvez devido à interação precoce do mesênquima dental com a crista neural. Assim sendo, as células-tronco dentais derivadas do ectomesênquima dental podem possuir características semelhantes às das células da crista neural (HUANG et al., 2009)(HUANG; GRONTHOS; SHI, 2009).

2.2.2 Células-tronco da polpa dental de dente permanente (CTPD)

Podem ser isoladas facilmente e de forma não invasiva, de terceiros molares e pré-molares extraídos por ortodontia, no caso de dentes hígidos, assim como, de dentes com lesão cáriosa com inflamação pulpar (ALONGI et al., 2010; MALEKFAR et al., 2016). Sua origem, motivo de intensa investigação nos últimos anos, está associada a crista neural e expressam tanto marcadores de CTMs como de CsT neuroectodérmicas (BAKOPOULOU; ABOUT, 2016). Sua alta taxa de proliferação quando comparada com outras fontes de CTMs, como medula óssea (GRONTHOS et al., 2000) e tecido adiposo, facilitam sua expansão *ex vivo* em número suficiente (WANG et al., 2012; ABDULLAH et al., 2014) fazendo delas excelentes candidatas para o uso de terapia celular ou engenharia tecidual.

A lista de marcadores que expressam nas CTPD só tem crescido nos últimos anos e parece que ainda pode aumentar. As CTPD expressam um amplo leque de marcadores associados à sua origem embrionária (células da crista neural e uma subpopulação de origem glial) (KAUKUA et al., 2014), associados a seu grau de indiferenciação (marcadores embrionários/pluripotentes), e a sua característica de células-tronco mesenquimais/*stemness* (marcadores mesenquimais) mostrando assim sua heterogeneidade.

Entre os marcadores embrionários mais comumente expressos por estas células temos o Oct-4, Nanog e Sox-2, os dois primeiros são fatores de transcrição envolvidos na manutenção da pluripotência (AL-HABIB et al., 2013; ULLAH et al., 2016). Marcadores de CsT neurais como nestin e marcadores de CsT da crista neural como Musashi-1, p75, Snail-1, -2, Slug, Sox-9 (KARBANOVA et al., 2011; ABE et al., 2012) entre outros, podem ser expressos pelas CTPD. Além deles, outros marcadores de linhagem neural como Doublecortin (DCX, células progenitoras neuronais), β III-tubulin (células neuronais precoce), NeuN (neurônios maduros), GFAP (proteína glial fibrilar (CsT neurais e astrócitos), S-100 (células de Schwann), A2B5 e CNPase (células progenitoras de oligodendrócitos) (SAKAI et al., 2012), Tenascin C, c-FOS e (OSATHANON et al., 2014) estão associados a diferentes estágios de maturação neural.

Os critérios adotados para defini-las como células-tronco é através dos seguintes marcadores: CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD146, CD166 (AKPINAR et al., 2014); CD59, Endostatin, FGF β , FGFR3, FGFR1, Fosfatase Alcalina, DSP, MEPE (HUANG et al., 2009), ALDH-1 (MACHADO et al., 2016), α Actina de Músculo Liso), colágeno tipo I,

Osteonectina, Osteopontina e Osteocalcina (GRONTHOS et al., 2000) e expressão negativa de CD14, CD24, CD34, CD45 (HUANG et al., 2009). Outras análises fenotípicas mostraram também a presença de HLA I e expressão negativa de CD71, HLA II (SUCHANEK et al., 2009). Por outro lado, uma pequena população de CTPD (5 a 10%) expressa o marcador STRO-1 (antígeno usado para identificar precursores osteogênicos na medula óssea) dita como população conhecida pelo seu potencial de diferenciação osteo/odontogênico e pelas ótimas propriedades de “stemness” (HUANG et al., 2009; MATHIEU et al., 2013). Um pequeno resumo sobre os marcadores é mostrado na Tabela 1.

Estudos apontam que a combinação de marcadores tem mostrado a localização de populações específicas dentro da polpa (imunolocalização) com maior eficiência. Subpopulações que expressam STRO-1, CD146 e o antígeno de pericitos 3G5 residem no nicho perivascular da polpa dental (SHI; GRONTHOS, 2003). Células que expressam outro grupo de marcadores como STRO-1, CD90, CD105 e CD146 foram identificadas tanto nas fibras neurais como nos vasos sanguíneos (ALONGI et al., 2010). E a expressão de ALDH-1, CD90 e STRO-1 mostra a localização em áreas perivasculares e em feixes neurais indicando a possibilidade da existência de mais de um nicho de células-tronco em polpa dental humana (MACHADO et al., 2016), visto que isso já foi demonstrado existir em polpa dental de camundongos (FENG et al., 2011).

Tabela 1 - Perfil de marcadores encontrados em células-tronco de polpa dental, adaptada de Bakopoulou e About (2016).

Origem	Marcadores positivos	Marcadores negativos
CTPD	CD90, CD73, CD105, CD146, STRO1, CD106, CD29, CD49, CD51, CD61, CD166, ALDH1, 3G5, CD44, CD9, CD10, CD13, CD59, MSCA1, CD81, CD24, CD271/NGFR, Nestin, DCX, β III-tubulin, NeuN, GFAP, S-100, A2B5, CNPase, Musashi-1, p75, Snail, Slug, Sox-9, Nanog, Oct3/4, SSEAs (-1,-3,-4,-5), Notch (-1,-2 e-3)	CD45, CD34, CD14, CD19, CD31, CD117, CD133, HLA-DR

As CTPD têm mostrado potencialidade ímpar, capazes de diferenciar-se em tecidos dos três folhetos embrionários: linhagens ectodérmica, endodérmica e mesodérmica (LAINO et al., 2005; D'AQUINO et al., 2007) (ARTHUR et al., 2008; ARMINAN et al., 2009) (STEVENS et al., 2008; PATIL et al., 2014).

In vitro, tem demonstrado capacidade para diferenciar-se em múltiplas linhagens, como: osteogênica, cartilaginosa (GRONTHOS et al., 2000) e adipogênica (GRONTHOS et al., 2002) entre as mais comuns, outras como melanócitos, miócitos, cardiomiócitos, hepatócitos-*like* e até neuronios ativos também já foram testadas e comprovadas (LAINO et al., 2005; D'AQUINO et al., 2007; ARTHUR et al., 2008; STEVENS et al., 2008; ARMINAN et al., 2009; PATIL et al., 2014); GRONTHOS et al., 2002). Também conseguem diferenciar-se em agregados similares a ilhotas pancreáticas mostrando liberação de insulina de forma dependente da glicose, confirmando sua funcionalidade de multidiferenciação tecidual *in vitro* (GOVINDASAMY et al., 2011).

Uma característica importante das CTPD para a regeneração de tecido dental é seu potencial para diferenciar-se em células odontoblasto-*like*. *In vitro*, quando semeadas sobre dentina mecânica e quimicamente tratada, estas transformam-se em células parecidas com odontoblastos polarizados e com processos celulares estendendo-se dentro dos túbulos dentinários existentes (GRONTHOS et al., 2000; HUANG et al., 2006a). *In vivo*, a formação de tecido semelhante ao tecido dentino-pulpar foi obtido através de transplante das CTPD com carreador de hidroxiapatita associada ao fosfato tricálcico (HA/TCP), de forma ectópica subcutânea no dorso de camundongos imunocomprometidos. O tecido formado expressa DSPP (Sialofosfoproteína dentinária) proteína específica da dentina (BATOULI et al., 2003; HUANG et al., 2006b; TAKEDA et al., 2008).

Recentemente, tem se conseguido a regeneração ortotópica de tecido pulpar *in vivo* induzida por terapia fotobiomodulatória. A terapia foi baseada no recrutamento de CsT endógenas em coágulo sanguíneo, utilizado como matriz biológica, e a adição de fatores de crescimento das paredes do canal radicular, obtendo formação de tecido semelhante à polpa, com vasos, nervos e células odontoblasto-*like* e CsT perivasculares (MOREIRA et al., 2017).

Outra aplicação para as CTPD, são as pesquisas que almejam a formação de tecido ósseo a partir de CTPD *in vivo*. Para isso, os animais mais usados são: rato, camundongo e coelho, e os locais de transplante para avaliar a engenharia de tecido ósseo mais comuns são: defeitos na calota craneana, defeitos maxilares e mandibulares, e subcutaneamente

(neste último, tentando formar osso ectópico). Um fator que pode influenciar a formação de tecido ósseo é o tipo de matriz condutiva ou carreador (*scaffold*) utilizado, dentre as mais empregadas temos: a HA/TCP, o colágeno, a hidroxiapatita apenas, a beta- tricálcio fosfato (β -TCP), polímeros como o PGLA, etc (LEYENDECKER et al., 2018).

Em defeitos de calvária, o isolamento de uma população específica da polpa dental humana (LNGFR^{Low+}/THY-1^{High+}) carreadas em *Matrigel* promoveram uma formação de novo tecido ósseo central e periférico em camundongos imunocomprometidos (YASUI et al., 2017). Novos tipos de carreadores como as livres de solvente com poliésteres biodegradáveis (PLGC, ou MPEG-(PLLA-co-PGA-co-PCL -PLGC)), associados com as CTPD e fatores osteogênicos mostraram formação de mais de 50% de osso *de novo* através de avaliações com tomografia micro-computadorizada e histologicamente nos defeitos em calvária provocados em camundongos imunocomprometidos (KWON et al., 2015).

Em defeitos mandibulares, o uso da matriz reabsorvível de α - CSH/ACP (alfa sulfato de cálcio hemiidratado/fosfato de cálcio amorfo) promoveu com mais eficiência a regeneração de osso se comparada com matrizes de CSD (sulfato de cálcio desidratado) e CSD/ β -TCP (Sulfato de cálcio/ β -fosfato tricálcico) em suínos (KUO et al., 2015).

A utilização de CTPD para posterior aplicação clínica em humanos é bastante escassa. O primeiro trabalho desta natureza foi o de d'Aquino et al. (2009) que isolou CTPD de terceiros molares extraídos e no local da extração aplicou matriz de esponja de colágeno com as CTPD do próprio paciente, com a finalidade de promover a regeneração óssea, e no lado contrário, como grupo controle, utilizou somente a esponja de colágeno. Três meses após observou-se completa regeneração e com um nível maior de osso cortical comparado com o lado controle. Este novo osso tinha uma arquitetura lamelar contendo canais de Havers e ainda expressava BMP-2, VEGF, osteopontina, osteocalcina e osteonectina. O acompanhamento de três anos mostrou que o tecido ósseo regenerado estava uniformemente vascularizado e compacto e ainda com uma altura vertical melhor se comparada com o lado controle (GIULIANI et al., 2013).

Em outro âmbito, a cocultura de CTPD com células endoteliais melhora significativamente o potencial angiogênico das últimas, especialmente, sob condições de hipóxia (DISSANAYAKA et al., 2012). Já quando colocadas em cultura com células endoteliais da veia do cordão umbilical humano (HUVEC) ou sozinhas e encapsuladas em matrizes 3D (Puramatrix) foram capazes de suportar a sobrevivência, migração celular,

formação de cadeias de capilares e regenerar tecido semelhante à polpa, vascularizado após transplante em camundongos (DISSANAYAKA et al., 2015).

Outros estudos *in vivo* têm demonstrado que as CTPD podem reparar lesões de infarto de miocárdio associado ao aumento no número de vasos e redução do tamanho do infarto, muito provavelmente devido a habilidade de secretar fatores proangiogênicos e antiapoptóticos, sugerindo o uso destas células como alternativa no tratamento deste tipo de lesões em modelos de infarto de miocárdio em ratos (GANDIA et al., 2008).

2.3 Marcadores moleculares de células-tronco mesenquimais

2.3.1 Marcadores de proliferação celular

Durante a replicação do DNA na divisão celular existe um sistema de revisão do DNA que impede a contaminação das bases, este processo é rigidamente controlado e pode ser invadido em sua fase inicial com nucleotídeos análogos radiomarcados (CAVANAGH et al., 2011) como a timidina tritiada. Hoje análogos sintéticos da timidina, como a Bromodeoxiuridina (BrdU), Iododeoxiuridina (IdU) e Clorodeoxiuridina (CldU) são amplamente utilizados para este fim. Quando a maquinaria celular é enganada na hora de selecionar e incorporar uma base “artificial/sintética” durante a síntese de DNA (fase S do ciclo celular), então é possível rastrear células-filhas e sua progênie após essa divisão (CAVANAGH et al., 2011). Dessa forma, a molécula do nucleotídeo análogo entra na corrente sanguínea e permeia os tecidos, uma vez dentro da corrente sanguínea, ela está disponível para todas as células. O BrdU pode ser fornecido através de injeção intravenosa, intraperitoneal, intracerebroventricular ou via oral (ALTMAN; DAS, 1965; TAUPIN, 2007).

Assim, algumas células como as células-tronco adultas, tem a característica de reter a marcação dos análogos por longos períodos devido ao produto da sua divisão celular ser lenta, sendo chamadas de LRC (do inglês *label-retaining cell*), células que retêm a marcação (COTSARELIS et al., 1990; ZHANG et al., 2003; TUMBAR et al., 2004). Contudo, a marcação vai se perdendo progressivamente quando as LRC são induzidas a se dividirem, sendo detectável ainda após 2 ou 3 divisões celulares com uma marcação mais fraca e denominadas como células transientes amplificadas (TAC do inglês *transit amplifying cells*)

ou células progenitoras (BRAUN *et al.*, 2003). Embora, é importante não assumir que LRC e células-tronco são sinônimos (BRAUN; WATT, 2004).

O uso concomitante de marcadores de proliferação com os marcadores expressos de células-tronco auxilia na identificação das diferentes populações celulares no nicho. A marcação com BrdU ou com outros análogos sintéticos de timidina pode ser usada para avaliar a proliferação de uma população celular, assim como analisar a sobrevivência das células marcadas por diferentes períodos. Quando combinada com marcadores fenotípicos pode ser usado para estabelecer o destino das células marcadas durante o período da administração do BrdU (MAGAVI; MACKLIS, 2008).

2.3.2 Cluster de diferenciação 90 (CD90)

O Cluster de diferenciação 90 (CD90), também conhecido como antígeno de diferenciação de timócitos 1 (Thy-1), é uma das proteínas de membrana mais altamente glicosiladas (HAERYFAR; HOSKIN, 2004) e está envolvida em interações célula – célula e célula – matriz (REGE; HAGOOD, 2006), assim como, na proliferação, diferenciação, apoptose, adesão e migração (WEN *et al.*, 2013). Participa também de múltiplas funções biológicas como ativação de células T, cicatrização de feridas, supressão de tumores e fibroses (HAGOOD *et al.*, 2005; LUNG *et al.*, 2005; REGE; HAGOOD, 2006).

O CD90 é expresso em vários tipos celulares principalmente em timócitos, células T, células endoteliais (REGE; HAGOOD, 2006) e fibroblastos (ALT *et al.*, 2011). No sistema nervoso a expressão do CD90 é predominantemente neuronal, e está associada a maturação e a cessação do desenvolvimento da neurite em roedores (BRADLEY *et al.*, 2009) e em algumas células gliais, humanas, associa-se a estágios tardios da diferenciação (KEMSHEAD *et al.*, 1982).

O CD90 também é associado a células indiferenciadas como nas CTMs derivadas da medula óssea (DENNIS *et al.*, 2007). A redução da expressão do CD90 melhora a diferenciação osteogênica e adipogênica das CTMs *in vitro*, sugerindo que ele controla a diferenciação das mesmas atuando como um obstáculo na via da diferenciação (MORAES *et al.*, 2016), podendo estar associada às células indiferenciadas e a outras fases da maturação celular (BRADLEY *et al.*, 2009).

Em tecidos dentais de camundongos, o tecido pulpar de molares e incisivos não erupcionados expressam altos níveis de CD90 e funcionalmente mostram um extenso potencial osteo-dentinogênico (BALIC et al., 2010; BALIC; MINA, 2010). Em ratos, células CD90 da camada subodontoblástica são capazes de se diferenciar em células formadoras de tecido duro e servir como fonte de células odontoblásticas (HOSOYA et al., 2012).

In vitro, células LNGFR^{low+}/Thy-1^{high+} isoladas da polpa dental mostraram ser uma população altamente enriquecida de células clonogênicas com proliferação em longo prazo e potencial de diferenciação multilinhagem. Já, *in vivo*, promoveram a formação de osso em defeitos de calvaria em camundongos (YASUI et al., 2017). Contudo, *in vitro* muitas outras CTMs parecem expressar CD90 já, *in vivo*, a expressão é escassa. Suspeita-se que isto possa acontecer devido a expansão clonal e a seleção de células que se dividem mais rapidamente em cultura (SHARPE, 2016; AN et al., 2018). Em incisivos de camundongos, a subpopulação de CTMs que expressam CD90 contribuem com 30% dos odontoblastos e células pulpares, durante a fase precoce do desenvolvimento pós-natal e nas fases de rápido crescimento do incisivo, especificamente pós-injúria, período no qual é necessário restabelecer o equilíbrio (SHARPE, 2016) (KAUKUA et al., 2014; AN et al., 2018).

Em humanos, recentemente a literatura tem mostrado a presença de CD90, STRO-1 e ALDH-1 ao longo de feixes nervosos e ao redor de vasos sanguíneos (MACHADO et al., 2016) evidenciando a possibilidade da presença de mais de um nicho de CsT num mesmo tecido.

2.3.3 Cluster de diferenciação 146 (CD146)

Também conhecido como molécula de adesão celular de melanoma (Mel-CAM) ou MUC18 ou antígeno A32 ou S-Endo-1, é uma glicoproteína de membrana que pertence a superfamília das imunoglobulinas (Bardin et al., 2001) e está envolvido em interações célula – célula (SHIH, 1999), regulação da migração celular (Ouhtit et al., 2009), de CTMs e angiogênese (BONEBERG et al., 2009; WANG; YAN, 2013), entre outras funções.

Inicialmente foi utilizado como marcador da progressão e metástase de melanomas (LEHMANN et al., 1989) (SERS et al., 1993; SHIH et al., 1998; BARDIN et al., 2001; YANG et al., 2001). É principalmente expresso no endotélio vascular (BARDIN et al. 2001), no músculo liso, na superfície de pericitos (LI et al., 2003; MIDDLETON et al., 2005;

SACCHETTI et al., 2007; CRISAN et al., 2008, 2012) e em células de Schwann (SHIH et al., 1998), entre outros tecidos.

Foi Crisan et al. (2008) que demonstrou a presença de CD146 em células perivasculares ao redor de capilares, arteríolas e vênulas em todos os órgãos analisados (pâncreas, placenta, coração, pele, pulmão, cérebro, músculo esquelético, olho, intestino, tecido adiposo, medula óssea e cordão umbilical). Quando analisada a co-localização com NG2 (marcador de pericitos) todas as células foram também positivas para NG2 demonstrando a natureza pericítica dessas células concluindo que, células perivasculares CD146+/CD34-/CD45-/CD56- (negativas para marcadores hematopoiéticos) mostravam características de CTMs. Este foi o trabalho que definiu o uso do marcador CD146 como um dos marcadores perivasculares para CTMs.

O marcador CD146 é encontrado em CTMs com alta clonogenicidade, multipotencialidade e capacidade de diferenciação (LV *et al.*, 2014). Na medula óssea, a expressão de CD146 em células perivasculares mostrou que estas foram capazes de transferir (após transplante) o microambiente hematopoiético para locais heterotópicos estabelecendo no novo local células idênticas a elas dentro de uma medula óssea nova (em miniatura) (SACCHETTI et al., 2007).

Quando comparada a expressão entre a polpa dental hígida e o cordão umbilical, o CD146 mostrou uma expressão 18,3 vezes maior no cordão umbilical, e esta marcação esteve localizada principalmente na artéria sugerindo que a maioria das células-tronco CD146+ provêm da microvascularização (KANG et al., 2016). Relatos *in vivo*, mostram que a expressão do CD146 em polpa dental está localizada nas paredes dos vasos sanguíneos (MIURA et al., 2003) e no perineuro de feixes nervosos e, quando isoladas, tem a capacidade de diferenciar-se em odontoblastos *in vivo* (SHI; GRONTHOS, 2003).

Ensaios *in vivo*, mostraram que as populações celulares mais abundantes isoladas da polpa dental de terceiros molares com rizogênese incompleta foram CD146+/MSCA-1+, CD271+/MSCA-1+ e CD146+/CD271+ e quando expandidas *in vitro* CD146+/CD56+, MSCA-1+/CD56+ e CD146+/MSCA-1+ evidenciaram estar em maior quantidade (DUCRET et al., 2016).

2.3.4 Receptor β do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR β)

Os membros da família do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) apresentam as isoformas -A, -B, -C e -D (YAMAZAKI et al., 2009). Já os receptores do PDGF, membros da família tirosina quinase, são compostos por duas subunidades PDGFR α e PDGFR β , as quais formam homo e heterodímeros (HELDIN; WESTERMARK, 1999; FUNA; URAMOTO, 2003).

O PDGF foi originalmente isolado das plaquetas sanguíneas como fator de crescimento para células de origem mesenquimal (BASCIANI et al., 2002). É um poderoso fator de regulação que inicia quase todos os eventos de cicatrização (NUTI et al., 2016). Sua principal função é estimular a replicação de CsT capazes de cicatrizar e é essencial para o desenvolvimento vascular (HELDIN; WESTERMARK, 1999).

Já seu receptor, o PDGFR β é expresso em pericitos (CRISAN et al., 2008, 2012; WINKLER et al., 2010), também se acredita que junto com o CD146 seja um marcador de CTMs do endométrio (SCHWAB; GARGETT, 2007). Além disso, é um receptor que participa da sobrevivência autocrina para as células de Schwann *in vitro* (DAVIS; STROOBANT, 1990; ECCLESTON et al., 1990) e sua contribuição na regeneração de nervos periféricos tem sido sugerida.

O PDGF-B é liberado das células endoteliais angiogênicas e se liga ao PDGFR β que se expressa na superfície dos pericitos em desenvolvimento. Camundongos *Knockout* com silenciamento dos genes PDGF-B e PDGFR β apresentam morte perinatal devido a disfunção vascular causada pela deficiência de células murais (pericitos e células de músculo liso vasculares) (LEVÉEN et al., 1994; SORIANO, 1994). Camundongos *knockin*, com ativação de mutações no locus do PDGFR β apresentaram indução da proliferação e inibição da diferenciação de células murais, sugerindo a sinalização do PDGFR β como um importante regulador *in vivo* do potencial progenitor (OLSON; SORIANO, 2011). Uma sinalização deficiente de PDGF-B/PDGFR β produz falha na camada de pericitos que recobrem os capilares, além de desenvolver vasos permeáveis (com vazamento) e perda da barreira hematoencefálica (ARMULIK et al., 2010).

Diversos autores sugerem que o PDGF também pode ser um fator chave para o desenvolvimento do ectomesênquima dental e a diferenciação das células da polpa (NAKASHIMA, 1992; RUTHERFORD et al., 1992; HU et al., 1995; CHAI et al., 1998;

DENHOLM et al., 1998). O PDGF e seu receptor, PDGFR, participam do desenvolvimento da crista neural craniana e cardíaca (TALLQUIST; SORIANO, 2003) assim como na formação do palato (XU et al., 2005). Os receptores do PDGF são encontrados em vários tipos de células como fibroblastos, células musculares lisas, inclusive em células pulpares (DENHOLM et al., 1998; HELDIN et al., 1998; RUTHERFORD et al., 1992).

Os dímeros do PDGF contendo subunidades -AB e -BB e o sistema PDGFr β estimulam a diferenciação terminal de odontoblastos, enquanto que o PDGF-AA exerce um efeito inibitório na diferenciação odontoblástica (YOKOSE et al., 2004). Além, de ser um potente fator mitógeno, o PDGF-BB (TALLQUIST; KAZLAUSKAS, 2004) também é um poderoso agente quimiotático para CTMs e outros tipos de células (SUN et al., 2013; OZAKI et al., 2007; MISHIMA et al., 2008).

Assim, CTPD humana com modificação do gene PDGF-BB podem continuamente secretar a proteína PDGF-BB e essa superexpressão melhorar significativamente a proliferação, angiogênese e a diferenciação odontoblástica das CTPD. Além disso, o PDGF-BB secretado por estas células pode facilitar o *homing* das CsT através da via do PI3K/Akt e melhorar a regeneração *in vivo* do complexo dentino-pulpar (ZHANG et al., 2017)

Por outro lado, o PDGF-BB é fundamental para manter o estado primitivo e a capacidade de proliferação de células progenitoras da polpa (SHIWEI et al., 2016). Em cultura, células pulpares PDGF positivas, junto com outros fatores de crescimento inibem a produção de fosfatase alcalina (ALP) (NAKASHIMA, 1992; RUTHERFORD et al., 1992; DENHOLM et al., 1998) sugerindo que o PDGF não somente está envolvido na osteogênese e condrogênese, como também na dentinogênese na polpa dental (YOKOSE et al., 2004).

2.3.5 Neural/Glial Antígeno 2 (NG2)

A Neural/Glial Antígeno 2 (NG2) é uma glicoproteína de membrana primeiramente descrita no sistema nervoso (MILLER et al., 1995) e encontrada principalmente na superfície de células precursoras de oligodendrócitos no sistema nervoso central (SNC) (LEVINE; NISHIYAMA, 1996). No cérebro, algumas células da glia são positivas para NG2 chamadas comumente de glia-NG2 (NISHIYAMA et al., 2009). Este tipo de células geram astrócitos durante o desenvolvimento embrionário e, em condições patológicas, no cérebro adulto, podem gerar células de Schwann mielinizadas, além de astrócitos (DIMOU; GALLO, 2015).

NG2 também é reconhecido como marcador de células de músculo liso e de pericitos (CRISAN et al., 2008; GRAKO et al., 1995; OZERDEM et al., 2001, 2002). A expressão de NG2 distingue três subtipos de pericitos humanos associados a capilares (NG2+ α SMA-), vênulas (NG2- α SMA+) e arteríolas (NG2+ α SMA+) (CRISAN et al., 2008, 2009).

Em órgãos como pâncreas, placenta, coração, pele, pulmão, cérebro, músculo esquelético, olho, intestino, tecido adiposo, medula óssea e cordão umbilical foram encontradas células perivascularas NG2 ao redor dos capilares (menor que 10 mm de diâmetro) e arteríolas (entre 10 e 100 mm de diâmetro) (CRISAN et al., 2008). Embora esta expressão possa mudar dependendo do tecido, por exemplo, células NG2 no mesentério intestinal estão distribuídas preferencialmente ao redor de arteríolas (MURFEE et al., 2005), já na retina e no cérebro estão ao redor de todos os tipos de vasos (CUERVO et al., 2017). Além disso, no sistema nervoso periférico, o NG2 também pode marcar o pericitos e células perineurais de feixes vâsculo-nervosos (RICHARD et al., 2014).

Além disto, células NG2 tem um papel significativo na estimulação do sistema neural, na inflamação e neurodegeneração (BLUM et al., 2011). Na resposta seguida da desmielinização na medula espinhal de rato identificou-se a presença de duas populações de células NG2+, uma respondendo à injúria através da divisão celular e a outra sem resposta, sugerindo que a população que responde atua como progenitor de oligodendrócitos (ODERFELD-NOWAK et al., 2009).

Na medula óssea de camundongos, aproximadamente 95% das células isoladas expressam NG2 e apresentam não somente autorenovação, mas também se diferenciam em CTMs que expressam CD90 mostrando que estas células podem formar parte da reserva de CTMs. Pericitos NG2 podem gerar CTMs dentro de áreas de injúria e criar um ambiente regenerativo através da liberação de fatores tróficos bioativos (ZHANG et al., 2013).

Durante o desenvolvimento do incisivo de camundongo aproximadamente 12% dos odontoblastos são formados por pericitos NG2+. Isto, muito provavelmente, é consequência devida a proximidade de grandes plexos capilares do nicho de CTMs. Em áreas de injúria pulpar as células NG2+ são capazes de diferenciar-se em odontoblastos-*like* e sintetizar dentina reparadora-*like*, no entanto, os novos odontoblastos derivados de pericitos constituíam somente 15% do total, sugerindo uma outra fonte de CTMs que não é de origem pericítica. Assim, pericitos NG2 representam uma parte da população de CTMs no mesênquima dental (FENG et al., 2011).

Em incisivos de camundongos, células periarteriais Gli1+ não expressam os marcadores típicos de CTMs, contudo, dão origem a pericitos NG2+ que representam uma subpopulação de CTMs que expressam os marcadores tradicionais e contribuem pouco na homeostase, mas estão ativamente envolvidas no reparo pós-injúria (ZHAO et al., 2014). Por outro lado, células NG2+ foram detectadas no mesênquima do incisivo, ao redor de arteríolas, veias e capilares (ZHAO et al., 2014) mostrando que a localização deste marcador pode mudar ao redor de áreas vasculares nos tecidos dentais.

Como mecanismo de regeneração tecidual continua, em incisivos de camundongos, células perivasculares NG2/Nestin (NG2^{ERT2}Cre/Nestin Cre) parecem produzir um tipo de dentina “restauradora” na ponta do incisivo destes animais, evidenciando nesta localização um possível nicho de origem perineural (PANG et al., 2016). Por outro lado, células perivasculares NG2+ também têm sido evidenciadas no ligamento periodontal *in vivo* contribuindo para a estabilidade da estrutura capilar (IWASAKI et al., 2013).

3 Proposição

3 PROPOSIÇÃO

Estudar a localização e composição de nichos das células-tronco da polpa dental frente à resposta à injúria através da exposição pulpar *in vitro* de dentes humanos e *in vivo* de dentes de ratos, utilizando a técnica de imuno-histoquímica e a imunoexpressão de 5-Bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) ou 5-Iodo-2'-deoxiuridina (IdU) com outros marcadores previamente associados a células-tronco.

3.1 Objetivo Específico

Em dentes humanos:

- a) Analisar a localização de células BrdU positivas (supostas células-tronco), PDGFr β , CD90 e CD146 pela técnica imuno-histoquímica.
- b) Analisar a co-expressão de células BrdU positivas com os marcadores PDGFr β , CD90 e CD146, através da técnica de imunofluorescência.
- c) Comparar o padrão de imunomarcção dos marcadores analisados entre os dentes com exposição pulpar e os dentes hígidos *in vitro* em amostras de dentes humanos em diferentes períodos após a injúria.
- d) Verificar a composição estrutural da polpa dental de dentes hígidos e dentes com exposição pulpar quando mantidos em meio de cultivo celular, comparados à dentes hígidos não cultivados.

Em dentes de rato:

- a) Analisar a localização de células IdU positivas (supostas células-tronco), CD90 e NG2 através da técnica de imuno-histoquímica.
 - b) Comparar o padrão de imunomarcção dos marcadores analisados entre os dentes com exposição pulpar e os dentes hígidos *in vivo* nas amostras de dentes de ratos em diferentes períodos após a injúria.
-
-

4 Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Parte I: Modelo humano

4.1.1 Obtenção das amostras

Para realização deste estudo, terceiros molares com rizogênese incompleta (até 50% de raiz formada) foram extraídos por indicação ortodôntica e obtidos pela Clínica da Pós-graduação de Cirurgia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. Previamente, o projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos da FOB-USP (Instituição Proponente) número CAAE 01331212.4.0000.5417. Após aprovação, o projeto foi re-submetido para anuência, ao Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos da FOU SP (Instituição Co-Participante). Os participantes e/ou os responsáveis foram esclarecidos sobre os objetivos da pesquisa e somente foram incluídas amostras de indivíduos que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e que se enquadravam dentro dos critérios de inclusão e exclusão abaixo expostos.

4.1.1.1 Critérios de inclusão:

- Pacientes jovens entre 13 e 18 anos;
- Dentes hígidos;
- Dentes com rizogênese incompleta (até 50% de raiz formada) e com presença de papila apical;
- Prioritariamente dentes semi-erupcionados, na ausência deles, dentes não erupcionados.

4.1.1.2 Critérios de exclusão:

- Dentes com histórico de pericoronarite ou inflamação ou infecção local;
 - Dentes cariados;
 - Dentes sem a presença da papila apical;
 - Dentes seccionados durante o procedimento de extração dental
 - Dentes associados às lesões (cistos ou neoplasias).
-
-

4.1.2 Transporte, modelo de injúria e cultivo de dentes humanos

Após extração, os dentes foram armazenados em tubos Falcon contendo meio de transporte que consistia em: α MEM (Minimum Essential Medium Eagle – α modification, Sigma®, M4526) suplementado com 2% de antibiótico/antimicótico (Gibco®, A5955) (Fig. 1 A). Os tubos contendo os dentes foram transportados em caixas térmicas a 4°C.

Em seguida, em alguns dentes extraídos, foi preparada uma cavidade com profundidade suficiente para causar exposição pulpar na face oclusal (Grupo GCE). Para tanto, foi utilizada alta rotação (Magno 604C Kavo, Joinville, Brasil) com ponta diamantada # 3139 (KG Sorensen, Barueri, Brasil) sob refrigeração, irrigados com solução salina estéril (Fig. 1 B). Outros dentes hígidos, sem cavidades (Grupo GCC), foram mantidos apenas em meio de cultura e serviram como grupo controle sem injúria. Dentes somente extraídos (sem cultivo laboratorial) foram analisados como controle positivo (Grupo GH).

No laboratório, em capela de fluxo laminar, os dentes foram limpos com curetas periodontais estéreis para retirar os tecidos que permaneceram aderidos ao dente pós extração (tecido gengival, ligamento periodontal, restos de capuz, fragmentos de tecido ósseo) (Fig. 1 C) e lavados com PBS 1x contendo 2% de antibiótico/antimicótico (Gibco®, A5955) para remover restos de sangue e evitar a contaminação (Figura 1 D). Prontamente, os dentes foram colocados em placas de 12 poços, com a porção radicular submersa em meio de cultura de manutenção, método adaptado de Tecles et al. (2005) e Tecles et al. (2008), contendo α MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (Fetal Bovine Serum, Gibco®, 10437028), 1% de solução antibiótica/antimicótica (Gibco®, A5955), 100 μ M de ácido ascórbico (Sigma®, A8960), 2 mM de L-glutamina (GlutaMAX™, Gibco®, 35050061) e 5×10^{-5} M de 2-Mercaptoethanol (Sigma®, M3148) (GRONTHOS et al., 2011). O meio foi trocado diariamente.

Para sustentação do dente, um fio ortodôntico foi fixado à coroa com resina fotopolimerizável e apoiado no topo da placa (Fig. 1 E). A parte apical dos dentes ficava, dessa forma, mergulhada em aproximadamente 4 ml de meio de cultura, sem tocar no fundo do poço, com o intuito de facilitar a difusão do meio através da parte apical, como mostrado na figura 1 F.

Figura 1 – Cultura de órgão. A) Transporte do dente em tubos Falcon™ contendo meio de transporte. B) Cavidade preparada em molar humano com alta rotação. C) Limpeza dos dentes com curetas periodontais estéreis. D) Lavagem com PBS (1x) e 2% de antibiótico/antimicótico para evitar a contaminação. E) Molar com exposição pulpar, mostrando o condicionamento ácido necessário para fixação do fio ortodôntico na superfície. F) Dente adaptado na placa de cultura contendo meio com BrdU.

Para analisar a resposta à injúria causada pela exposição pulpar, o lisado contendo a proteína 5-Bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) (Sigma®, B5002) foi diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma®, D2650), aliquotado na concentração de 100 mg/ml e congelado. Para a concentração final, a solução de estoque de BrdU foi diluída na proporção de 10 µl/ml no meio de cultura e adicionada ao poço contendo o dente. Após 24 horas de incorporação de BrdU o meio foi trocado por meio de manutenção, sem BrdU. O cultivo foi realizado em incubadora humidificada apropriada ao cultivo celular a 37°C e 5% CO₂. Ao todo os dentes foram cultivados por 2, 5 e 14 dias, método que foi adaptado como mostrado na tabela 2

Tabela 2 – Grupos experimentais para molares humanos:

Grupos	Procedimento	Períodos			Total de dentes
		2 dias	5 dias	14 dias	
GCE	Exposição pulpar e mantidos em cultura	5	5	5	15
GCC	Sem exposição pulpar e mantidos em cultura	5	5	5	15
GH	Apenas extraídos e processados para análise histológica	Não aplicado			3

Legenda: GCE, grupo em cultivo celular com exposição pulpar. GCC, grupo em cultivo celular controle. GH, grupo dentes hígidos.

4.2 Parte II: Modelo animal

4.2.1 Obtenção dos animais

A parte do projeto de pesquisa que versava sobre animais, foi encaminhado para a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia da Universidade da São Paulo para sua aprovação. Somente após aprovação (# 011/2013) deu-se início a compra dos animais. Doze ratos *Wistar* com 21 dias de vida pós-natal (imediatamente após o desmame), foram obtidos do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da USP.

4.2.2 Ensaio de incorporação de 5-Iodo-2'-deoxiuridina (IdU)

Os animais foram individualmente acondicionados no biotério do Departamento de Cirurgia da FOUSP, em caixas com tampas de metal com ração peletizada e água *Ad libitum* por 1 semana. Na seguinte semana, ratos com 28 dias de vida, começaram a receber 5-Iodo-2'-deoxiuridina (IdU) (Sigma®, I7125) diluído na água (1mg/ml), 50 ml por dia, durante 30 dias e mantidos mais 45 dias com água sem IdU antes de serem submetidos ao procedimento cirúrgico (KURTH et al., 2011).

4.2.3 Procedimento cirúrgico

Os animais foram previamente anestesiados via intramuscular (Fig 2 A) com solução do anestésico Cloridrato de Xilazina (Anasedan®) (0,8mg/kg) e de relaxante muscular à base de Cloridrato de Ketamina (Dopalen®) (50mg/kg). Em seguida, com ajuda de um estereomicroscópio (Zeiss, modelo Stemi SV11) se prosseguiu com a desinfecção da boca dos animais com solução antisséptica (Iodopovidona) e posicionamento de um afastador bucal (Fig. 2 B). Cavidades oclusais foram preparadas nos primeiros molares superiores e inferiores (Grupo GIVE) com ajuda da baixa rotação e broca carbide esférica # ¼ (KG Sorensen, Barueri, SP, Brazil), como mostrado na figura 2 C, sob refrigeração com solução salina estéril gelada. As cavidades foram realizadas ou na cúspide central ou na distal dependendo da facilidade do aceso ao primeiro molar. Os dentes da hemiarcada oposta à cavidade serviram como controle (Grupo GIVC) totalizando dois dentes com cavidades (um molar superior e um inferior) e dois dentes controle por cada animal. Cada grupo experimental foi composto por 4 animais. Imediatamente após o preparo da cavidade foram restauradas com cimento temporário Coltosol (Coltene/Whaledent, Switzerland) (Fig. 2 E). O Cloridrato de Tramadol 50mg/kg em injeção IP foi utilizado como anti-inflamatório e antiálgico. Os animais foram monitorados até acordarem da anestesia e conseguirem beber água sozinhos. Após 2, 4 e 8 dias os animais foram sacrificados em câmara de gás e a maxila e mandíbula extraídas. A tabela 3 mostra a divisão dos grupos experimentais.

Figura 2 – Procedimento cirúrgico em animais. A) Anestesia intramuscular em ratos. B) Posicionamento de afastador bucal para melhor visualização dos primeiros molares. C) Preparo cavitário com baixa rotação com broca #1/4. D) Cavidade com exposição pulpar (seta amarela) em primeiro molar superior. E) Cavidade restaurada com cimento provisório Coltossol. F) Injeção IP de Cloridrato de Tramadol para controlar a dor.

Tabela 3 – Distribuição dos grupos experimentais in vivo, de acordo com o número de molares de rato e de animais de acordo com os períodos analisados

Grupos	Procedimento	Períodos			Total
		2 dias	4 dias	8 dias	
GIVE	Exposição pulpar oclusal restaurado com coltosol	8 dentes	8 dentes	8 dentes	24 dentes
GIVC	Sem exposição pulpar, controle	8 dentes	8 dentes	8 dentes	24 dentes
Total de dentes	-	16	16	16	42
Total de animais	-	4	4	4	12

Legenda: GIVE, Grupo in vivo com exposição pulpar. GIVC, Grupo in vivo controle, sem exposição pulpar.

4.3 Fixação, descalcificação e inclusão dos espécimes

Ao final dos períodos indicados nas tabelas 4.1 e 4.2 os espécimes foram fixados em solução de paraformaldeído a 4%, (Sigma-Aldrich® P6148) por 24 a 36 horas. As amostras foram descalcificadas em EDTA a 10% (Titriplex III, Merck KGaA, Damstadt, Germany)

pelo tempo necessário sob constante agitação e troca de solução três vezes por semana. Para acelerar o processo de descalcificação dos molares humanos, após a fixação, foi removido o esmalte com alta rotação sob refrigeração. Após a descalcificação, as amostras foram hemiseccionadas no longo eixo do dente, permitindo a visualização de toda a extensão interna do dente, desde a área de injúria efetuada na face oclusal dos dentes até o ápice radicular, e lavadas em água corrente por 24 horas, desidratadas em concentrações crescentes de etanol a 70%, 90% e 100%, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina.

4.4 Coloração por hematoxilina e eosina

Foram obtidos cortes seriados de 4µm de espessura. Os cortes foram aderidos à lâmina silanizada (Knittel Glass, Braunschweig, Germany) e corados com a técnica de hematoxilina e eosina (HE) para avaliação morfológica da polpa. Para a coloração por HE, brevemente, os cortes foram desparafinizados com xilol, seguidos de reidratação em banhos seriados em concentrações decrescentes de etanol (100%, 95%, 90%, 85%, 80% e 70%) por 5 minutos cada e corados com hematoxilina por 30 segundos e eosina por 3 min, seguidas de lavagem em água corrente. Posteriormente, os cortes foram desidratados em concentrações crescentes de etanol (70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% e 100%) por 3 minutos cada, diafanizados em xilol (2 banhos), montados com lamínulas para microscopia

4.5 Imuno-histoquímica (IHQ)

Os cortes teciduais cortes seriados de 4µm de espessura foram aderidos à lâmina silanizada (Knittel Glass, Braunschweig, Germany) e desparafinizados com banhos de xilol (30 e 15 minutos) seguido da reidratação em concentrações decrescentes de etanol (100%, 95%, 90%, 85%, 80% e 70%) por 5 minutos cada. Em seguida, os cortes foram lavados em água destilada e incubados em solução para recuperação do antígeno de acordo com o especificado na tabela 5.3. O bloqueio da peroxidase endógena foi obtido através da imersão dos cortes em solução de peróxido de hidrogênio e metanol (1:1) por 20 min. Em seguida, os cortes foram lavados em TBS e submetidos ao bloqueio de sítios inespecíficos com uso de solução de tampão (TBS + 0,2% Triton X-100) (Sigma-Aldrich®, X100), 1% de BSA e 10% de FBS por 30 minutos. Os cortes foram então incubados com os anticorpos primários em

condições descritas na tabela 5.3. Subsequentemente, os cortes foram lavados em solução tampão (3 banhos de 5 minutos) e incubados com o anticorpo secundário Advance® HRP (Dako, K4069, Carpinteria, CA, USA) (humanos) ou EnVison® + System-HRP (Dako, K4004, Carpinteria, CA, USA) (animais) por 30 minutos. Após nova lavagem dos cortes em solução tampão (3 banhos de 5 minutos), as reações foram reveladas pela diaminobenzidina (Dako Liquid DAB, K3468, Carpinteria, CA, USA) por 10 minutos e contra-coradas com Hematoxilina de Mayer por 3 minutos. Finalmente, os cortes foram desidratados em concentrações crescentes de etanol 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% e 100% por 3 minutos cada, diafanizados em xilol e montados com lâminulas para microscopia.

4.6 Imunofluorescência (IF)

Foram realizadas duplas marcações para dentes humanos sempre associando a BrdU (marcador de proliferação e células de ciclagem lenta) a um marcador de membrana previamente associado a células-tronco. As combinações de duplas marcações foram realizadas em amostras humanas com BrdU/CD90, BrdU/CD146 e BrdU/PDGFr β . Os anticorpos secundários fluorescentes foram utilizados de acordo com a espécie de animal na qual o anticorpo primário foi produzido na concentração de 1:50 em molares humanos por 1 hora. Após 3 lavagens em solução tampão, os cortes foram recobertos com uma lâminula de vidro e solução de VectaShield® conjugado ao DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol, dihidroclorato) (Vector Laboratories H-1200, Burlingame, CA, USA) para visualização dos núcleos. A descrição dos anticorpos utilizados, tempo de incubação e tratamento dos tecidos encontram-se na Tabela 4.

Para aquisição das imagens de dupla marcação imagens representativas foram adquiridas utilizando o microscópio confocal Leica TCS SPE (Leica Microsystems IR GmbH, Germany) com as seguintes configurações: aumentos de 10x, 40x e 63x (zoom 2 ou 3), step size de 0,5 μ m.

Tabela 4 – Anticorpos primários e secundários e condições experimentais utilizadas nas técnicas de IHQ e IF

Anticorpo	Código	Fabricante	Diluição	Recuperação antigênica	Tempo de incubação (Horas)
CD90	ab92574	Abcam	1:50 (H)	Citrato, pH 6 (H)	1
			1:100 (A)	EDTA, pH 9 (A)	12
PDGFrβ	ab32570	Abcam	1:50	Tris/edta/tween pH 9 (H)	1
CD146	75769	Abcam	1:40 (H)	Citrato, pH 6	18
NG2	AB5320	Millipore	1:70 (A)	Citrato, pH 6	14
BrdU	ab8152	Abcam	1:10 (H e A)	Pepsina em 0,2N HCL	12
Alexa Fluor 488 Donkey anti-rabbit	711-545-152	Jackson Immuno Research	1:50 (H)	N/A	1
Cy ³ Donkey anti-mouse	715-165-151	Jackson Immuno Research	1:50 (H)	N/A	1

Legenda: (A), animal. (H), humano. N/A, não se aplica

4.7 Análise das amostras

4.7.1 Análise morfológica dos cortes teciduais da área da lesão corados por HE

Para as avaliações das alterações pulpares frente à injúria foram analisados morfológicamente dois cortes para cada molar humano e dois cortes para cada molar de rato ambos corados pela técnica de HE. Os critérios para avaliação morfológica dos molares foram definidos baseando-se nos parâmetros apresentados pelos dentes controle (grupo GH) no estudo em humanos (padrão) e os dentes contralaterais hígidos no estudo em animais (Grupo GIVC).

Em ambos os estudos avaliamos os seguintes critérios:

1) Camada odontoblástica:

- a. Presença e organização da camada odontoblástica
- b. Morfologia da zona acelular
- c. Morfologia da zona rica em células da polpa

2) Processo inflamatório:

- a. Presença e tipo de células inflamatórias
- b. Presença de autólise ou necrose na área da lesão

3) Tecido pulpar adjacente à lesão:

- a. Organização das fibras colágenas e dos fibroblastos
- b. Presença de vasos e/ou alterações vasculares
- c. Presença de nervos e/ou degeneração neural

4.7.2 Determinação do percentual de células positivas para cada proteína alvo: BrdU, CD90, CD146, PDGFr β e NG2 por meio da IHQ

Para cada proteína expressa nos espécimes foi realizada primeiramente uma avaliação qualitativa do padrão de marcação (localização e tipo celular). Posteriormente, padronizou-se a região pulpar para determinação do percentual de células positivas para cada proteína. Nos dentes humanos a extensão da lesão e o volume da polpa coronária envolvida mostrou-se mais de 8 vezes maior em relação ao observado nos animais. Assim, nos molares de humanos foi possível padronizar duas áreas para contagem: 1) Lesão – área imediatamente adjacente a injúria (Figura 3, seta azul) no dente com exposição pulpar ou área correspondente à área de injúria no dente hígido, 2) Centro - área central da polpa, (Figura 3, seta amarela). Em média foram contabilizados 5 campos por área/por dente, como mostrado na figura 3 A e B. No caso dos animais foram padronizados no mínimo 3 campos para contagem nas áreas adjacentes à lesão, que em muitos casos ocupavam quase toda a polpa coronal e parte da radicular, devido ao pequeno tamanho do tecido pulpar em ratos, como mostrado na figura 3 C e D.

Figura 3 – Padronização da captura de imagens das áreas pulpares para quantificação. A) Grupo cultura exposição em molares humanos, retângulos destacando as áreas para quantificação em dois níveis: área de lesão (seta azul) e centro da polpa (seta amarela). B) Grupo cultura controle em molares humanos, retângulos destacando as áreas para quantificação em dois níveis: área semelhante à área de lesão (seta azul) e centro da polpa (seta amarela). C) Grupo *in vivo* controle em molares de ratos, retângulos representando as áreas para quantificação. D) Grupo *in vivo* exposição em molares de ratos, retângulos representando as áreas para quantificação.

As imagens/campos foram capturadas utilizando uma câmera digital AxioCam HRc (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Germany) acoplado ao microscópio Axioskop II microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) utilizando a objetiva de 40x e armazenadas no formato TIF. Com ajuda do software Wright Cell Image Facility- Image J (WCIF Image J, NIH, USA) foram quantificadas as células positivas (NCp) e negativas (NCn). O percentual de células positivas para cada proteína foi determinado pela relação abaixo:

$$PCp = \frac{NCp}{(NCp + NCn) \times 100}$$

4.8 Análise estatística

Os dados quantitativos obtidos para o percentual de células positivas para cada área pulpar (lesão ou centro) de cada marcador foram submetidos ao teste de Mann-Whitney para comparação entre os grupos analisados (GCE x GCC ou GCE x GH ou GIVE x GIVC) em cada período experimental. Em seguida os dados obtidos para cada grupo nos diferentes períodos experimentais (2, 5 e 14 em dentes humanos ou 2, 4 e 8 dias em dentes de ratos) foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis para verificar possíveis alterações quanto ao período da injúria. Todas as análises foram realizadas através do programa Statistic 10.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA), adotando um nível de significância de 5%. Os dados foram representados pela média, desvio padrão, mediana e variação entre os elementos.

5 Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Parte I: Resultados do modelo humano

5.1.1 Análise morfológica do dente hígido com rizogênese incompleta (Grupo GH) corados por HE

A análise morfológica dos molares em cultura foi baseada nas características observadas nos dentes hígidos, abaixo relacionadas:

a) Na área de polpa periférica foram observados:

- Camada de odontoblastos (CO) visíveis constituída por células colunares altas arranjadas em paliçada e de pré-dentina visível suprajacente (Fig. 4 B);
- Presença de zona acelular (ZA) caracterizada por tecido pulpar bem organizado constituído por tecido conjuntivo frouxo com presença de raros fibroblastos arranjados frouxamente entre fibras colágenas evidentes;
- Presença de zona rica em células (CRC) com abundantes fibroblastos;

b) Na área de polpa central foram observados:

- Vasos sanguíneos de calibres variados arteríolas, vênulas e capilares, raros encontravam-se congestionados (Fig. 4 C);
 - Feixes nervosos morfolologicamente bem organizados, maduros e visíveis, que atravessam a polpa desde a raiz até a coroa, mostrando fibras neurais e células de Schwann (Fig. 4 C);
 - Raras células inflamatórias estão presentes no tecido pulpar
-
-

5.1.2 Grupos cultura controle (GCC)

5.1.2.1 Grupo cultura controle - 2 dias

Na área adjacente aos odontoblastos, os dentes sem lesão após 2 dias de cultivo mostraram camada de odontoblastos desorganizada com perda de morfologia colunar alta, ausência de pré-dentina, de zona acelular e com sinais de degeneração (Fig. 4 D).

Na área central, o tecido conjuntivo apresentou-se bastante frouxo, exibindo fibras colágenas delicadas. Foram encontradas algumas células de núcleos arredondados e sem limites celulares visíveis. Vasos sanguíneos de diversos calibres (arteríolas, vênulas e capilares), alguns ectásicos (Fig. 4 G), foram vistos permeando toda a região, assim como feixes vâsculo-nervosos (FVN) preservados mostrando fibras neurais e células de Schwann. Não foram encontradas células inflamatórias no tecido.

5.1.2.2 Grupo cultura controle - 5 dias

Foi possível observar que a camada de odontoblastos encontrava-se desorganizada com perda de morfologia, ausência de pré-dentina e sem definição da zona acelular (Fig. 4 E). O tecido pulpar apresentou características semelhantes ao grupo GCC com dois dias de cultivo. Na área central da polpa verificou-se que estava bastante frouxa, pouco celularizada exibindo fibras colágenas bastante delicadas e áreas de degeneração. Observou-se também vasos sanguíneos com paredes vasculares menos definidas e feixes neurais com sinais de degeneração embora mais preservados que os vasos sanguíneos (Fig. 4 F). Não foram encontradas células inflamatórias no tecido.

5.1.2.3 Grupo cultura controle - 14 dias

O grupo apresentou uma camada de odontoblastos degenerada sem células visíveis, ausência de pré-dentina e zona acelular (Fig. 4 G). Na área central da polpa, observou-se áreas de degeneração com extensas áreas de autólise e as células remanescentes mostraram-se arredondadas e sem limites visíveis. A presença de raros e pequenos vasos sanguíneos foi constante, assim como de feixes neurais degenerados (Fig. 4 H). Não foram encontradas células inflamatórias no tecido.

Figura 4 - Características histológicas do tecido pulpar no grupo hígido (GH) (B e C) e os grupos cultura controle (GCC) nos diferentes períodos 2 (D e E), 5 (F e G) e 14 dias (H e I). A- Esquema da cultura de dente humano. B e C, grupo de dentes que não foram cultivados, mostrando as diferentes estruturas que compõem a polpa dental periférica (B) com camada odontoblástica (CO) (cabeça de seta), zona acelular (ZA) (*) e camada rica em células (CRC) (#). C- Área central da polpa mostra abundantes fibras colágenas e a presença de feixes vâsculo-nervosos (seta) e vasos. D e E - Em 2 dias mostrando na camada odontoblástica com poucas células viáveis (cabeça de seta), ZA pouco preservada e a CRC com células de núcleo fusiforme e fibras colágenas (#). E- Na área central da polpa, após 2 dias observam-se fibras colágenas delicadas. (FC) e vasos sanguíneos congestionados (seta). F- Em 5 dias exibindo uma camada odontoblástica com poucas células viáveis e núcleos arredondados (cabeça de seta), mas com presença de células viáveis na CRC (#) alguns capilares também foram evidentes. G- No centro da polpa, após 5 dias apresentando fibras colágenas (FC) exparsas, com alguns sinais de degeneração e presença de alguns capilares (seta). H- Em 14 dias foram encontradas poucas células viáveis, num panorama geral, na camada odontoblástica com total degeneração (cabeça de seta), na CRC ainda se observam alguns fibroblastos com núcleos fusiformes (#). I – Centro da polpa, após 14 dias foi evidente a degeneração das fibras colágenas (FC) e outras estruturas. escala = 50µm (Objetiva de 40x).

5.1.3 Grupos cultura exposição (GCE)

5.1.3.1 Grupo cultura exposição - 2 dias

Após 2 dias de cultivo, devido a lesão provocada intencionalmente era esperado a ausência de odontoblastos e zona acelular no local de injúria. Isto foi constatado nas análises morfológicas onde a área da lesão encontrava-se recoberta por uma camada de fibrina, com

áreas focais de área de necrose superficial (Fig. 5 D). A zona rica em células mostrou-se abundante em fibroblastos.

A área central da polpa apresentou-se bem organizada, com fibras colágenas mais densas e evidentes. A morfologia celular foi semelhante à observada no grupo hígido, porém vasos sanguíneos congestos e ectásicos foram observados perto da área da lesão, assim como distante da lesão, na polpa centralmente (Fig. 5 E). Feixes vâsculo-nervosos também foram evidentes em ambas localizações. Ocasionalmente, observamos a presença de linfócitos e plasmócitos sugerindo algum grau de inflamação.

5.1.3.2 Grupo cultura exposição - 5 dias

Após 5 dias de cultivo, observamos na área da lesão uma necrose superficial (Fig. 5 F). Nas áreas laterais onde ainda restaram odontoblastos estes perderam a morfologia colunar alta e houve ausência da zona acelular. A zona rica em células apresentou um aumento de celularização.

A área central da polpa apresentou-se menos celularizada se comparadas com o período de 2 dias e grupo controle, exibindo edema marcante entre as células, com fibras colágenas finas e delicadas afastadas entre si. Vasos sanguíneos congestos e ectásicos (hiperemia pulpar) estavam presentes mais intensamente no centro da polpa (Fig. 5 G). Nervos visíveis e morfologicamente bem organizados foram encontrados. Raramente se observou células de defesa. De um modo geral não é possível observar limites citoplasmáticos e os núcleos celulares são pequenos e arredondados.

5.1.3.3 Grupo cultura exposição - 14 dias

Após 14 dias de cultivo, ainda observamos a camada de necrose superficial sob a lesão, porém, ao redor da lesão, foi possível ver uma maior aglomeração de células fusiformes, sugerindo um sinal de migração celular ao local (Fig. 5 H). Ausência da zona acelular e edema acentuado na zona rica em células.

Na área central da polpa foram evidentes, exibindo menos celularidade, fibras colágenas mais finas e frouxas, delicadas e áreas extensas de autólise. Foi observado também uma menor quantidade de vasos sanguíneos e quando presentes, em geral, de pequeno calibre

e todos encontravam-se congestionados (Fig. 5 I). Feixes nervosos foram visíveis, mas com sinais de degeneração na forma de edema intracelular e autólise. Não observamos células de inflamatórias.

Figura 5 – Características histológicas do tecido pulpar no grupo hígido (GH) e no grupo cultura exposição (GCE) nos diferentes períodos 2, 4 e 8 dias. A- Esquema da cultura de órgão. B e C- Tecido pulpar descrito na Figura 6.1.1 B e C. Grupo GCE, 2 dias (D e E) mostrando lesão pulpar (LP) oclusal, com polpa frouxa bem celularizada e presença de vasos (seta azul) e feixes nervosos (seta preta) preservados. Na polpa central após 2 dias, (E) observam-se fibras colágenas evidentes (F), fibroblastos, vasos de diferentes calibres, alguns congestionados (seta azul). Grupo GCE, 5 dias (F e G) mostrando a LP notasse que em contato com a lesão existe uma faixa de maior celularidade (linha pontilhada azul) notasse também fibras colágenas delicadas e presença de feixes vâsculo-nervosos (seta preta) próximo a lesão. Na polpa central, após 5 dias (G) se evidencia menor número de fibras colágenas (F) se compararmos com o período de 2 dias, observa-se também alguns vasos congestionados (seta azul). Grupo GCE, 14 dias (H e I) observa-se uma maior celularidade logo abaixo da lesão pulpar (LP) (linha pontilhada azul) e a presença de pequenos vasos (seta azul) ao redor da lesão. Na polpa central, após 14 dias (I) foi evidente a degradação das fibras colágenas sendo cada vez mais finas e menos eosinofílicas (F) mesmo assim, ainda podem ser observados alguns vasos congestionados (seta azul). D, F e H escala = 200µm. B, C, E, G e I Scale bar = 50µm.

5.1.4 Padrão da imunomarcção das proteínas alvo em molares humanos (Grupo Hírido, GH)

Para o estabelecimento do padrão das imunomarcções no tecido pulpar normal utilizamos inicialmente dentes híridos recém extraídos (GH) como controle positivo. As proteínas CD90 e CD146 marcaram na membrana celular de forma semelhante principalmente na zona acelular e na zona rica em células, em pericitos em torno de pequenos capilares que permeiam estas duas zonas (Fig. 6 B, G) (Fig. 6 C, D) e em feixes vículo-nervosos (Fig. 6 E) espalhados por todo o tecido pulpar. A proteína CD146 também foi observada na parede vascular de vasos de maior calibre (Fig. 6 H) distribuídos pelo tecido pulpar.

A proteína PDGFr β só foi evidenciada pela técnica de imunofluorescência (IF) utilizando como anticorpo secundário fluorescente o Alexa Fluor 488. Foram positivas para o PDGFr β todas as membranas citoplasmáticas dos odontoblastos (Fig. 6 K) e os prolongamentos odontoblásticos localizados dentro dos túbulos dentinários (Fig. 6 L), assim como capilares pequenos e médios. Houve intensa marcação em algumas membranas e citoplasma de células de Schwann presentes em feixes vículo-nervosos espalhados pelo tecido pulpar de forma aleatória, provavelmente devido a presença da mielina.

Figura 6 – Expressão de CD90, CD146 e PDGFR β no grupo hígido (GH). A- Panorama geral da expressão de CD90 na polpa periférica. B- Capilares CD90 positivos na zona acelular e na zona rica em células (cabeça de seta) adjacente à camada odontoblástica na polpa periférica. Polpa central mostrando células perivasculares e periarteriais positivas (seta preta) (C e D). E- Detalhe do quadro preto em D, feixe vâsculo-nervoso (círculo azul) evidenciando a membrana da célula periarterial (seta laranja) CD90+, além disso, a célula de Schwann (círculo vermelho) e finíssimos capilares no meio das fibras nervosas (círculo amarelo) todos CD90+. F- Panorama geral da expressão de CD146 na polpa periférica. G- Capilares CD146 positivos na zona acelular e na zona rica em células (cabeça de seta). Na polpa central, células perivasculares de vasos sanguíneos de diferentes calibres CD146+ (seta preta) (H e I). J- Detalhe do quadro preto em I, membrana de células periarteriais (setas brancas) positivas para CD146. K- Expressão de PDGFR β na polpa periférica, observam-se as membranas de odontoblastos e seus prolongamento PDGFR β +s (setas brancas) assim também, a matriz extracelular intensamente marcada desde a zona acelular até os inícios da polpa central, diminuindo em intensidade conforme a profundidade (linha pontilhada amarela). L) Em outro angulo, mostrando os prolongamentos dos odontoblastos entrando nos túbulos dentinários positivos para PDGFR β (cabeça de seta branca). M) A membrana/citoplasma de pericitos em pequenos capilares mostrando expressão de PDGFR β (seta vermelha). Aumentos: A, F (100x); B, C, D, G, H, I, K, L, M (400x); E, J (1000x).

5.1.5 Imunomarcação nos Grupo Experimentais Humanos

5.1.5.1 Grupo cultura controle (GCC) – BrdU

Algumas marcações para o BrdU puderam ser observadas em capilares e feixes nervosos, no período de 2 dias (Fig. 7 A e B). Não foi observada marcação nos períodos 5 e 14 dias (Fig. 7 C e D).

5.1.5.2 Grupo cultura exposição (GCE) - BrdU

No período experimental de 2 dias pode ser observado discreto aumento de vasos, feixes nervosos e feixes vículo-nervosos próximos à área da lesão positivos para o BrdU (Fig. 7 E) com marcação nuclear em células perivasculares de vasos como capilares, artérias e veias (Fig. 7 F) e em células perineurais de feixes vículo-nervosos na região de polpa coronal adjacente à lesão (Fig 7 G, H). Nos períodos de 5 e 14 dias observou-se uma intensa concentração de células positivas na área da lesão (Fig. 7 I, J, M) e nas proximidades, sendo estas, células perivasculares encontradas em parede de capilares e células perineurais (células de Schwann) de feixes vículo-nervosos (Fig. 7 K, L, N, O, P) evidenciando-se assim, que as células BrdU positivas depois de 14 dias vão progressivamente se concentrando mais próximas à área de injúria, e permanecendo nos nervos e principalmente em vasos sanguíneos. Ressalta-se também que estas marcações foram tornando-se com intensidade variável, apresentando algumas células com marcações mais fracas com o passar do tempo de cultura.

Figura 7 – Expressão da proteína Bromodeoxiuridina (BrdU) no grupo cultura controle (GCC) e grupo cultura exposição (GCE) nos períodos de 2, 5 e 14 dias. No centro da polpa, o grupo GCC com 2 dias, mostrou marcações fracas de BrdU na parede de capilares (cabeça de seta) (A) e no feixe nervoso (seta azul) (B). Com 5 dias (C) e 14 dias (D), o grupo GCC mostrou ausência de marcação de BrdU. No grupo GCE com 2 dias, a polpa periférica mostrou um grande número de vasos sanguíneos e feixes neurais que parecem estar migrando em sentido da área da lesão oclusal (seta pontilhada azul) (E). F- Próximo da lesão evidenciou-se células perivasculares em vasos de médio calibre (cabeça de seta), células perineurais em feixes nervosos (seta azul) positivos para BrdU. G- Detalhe do quadro preto em F, mostra algumas células BrdU+ espalhadas pelo tecido próximas às estruturas como vasos e feixes nervosos (cabeça de seta azul). H- Corte longitudinal do feixe vículo-nervoso mostrando células perineurais (células de Schawnn) (seta azul) e células perivasculares nos vasos que acompanham o feixe (seta preta) positivas para BrdU. No grupo GCE com 5 dias, observou-se a concentração de células BrdU+ sob a lesão (setas pontilhadas azuis) (I). J- Detalhe do quadro preto em I, nota-se as múltiplas células BrdU+ sob a lesão (cabeça de seta azuis). K- Na polpa central, notam-se células perineurais (células de Schawnn) (seta azul) no feixe vículo-nervoso assim como, células espalhadas no tecido (seta preta) ambas BrdU+. L- Vaso sanguíneo formando parte do feixe vículo-nervoso com células perivasculares BrdU+ (seta amarela) e no feixe propriamente dito também apreciamos células perineurais positivas (seta azul). No grupo GCE com 14 dias, observou-se marcação intensa sob a lesão em pequenos capilares (cabeça de seta vermelha) e células espalhadas na área (cabeça de seta preta) (M). N- Vários feixes vículo-nervosos vistos transversalmente apresentaram marcações em células perineurais e em pequenos capilares (cabeça de seta vermelha). O- Detalhe do quadro preto em N, mostrando um único feixe com células perineurais (células de Schawnn) (seta azul) e capilares (seta amarela) BrdU+. P- Outro feixe visto longitudinalmente, na região central da polpa mostrando células perineurais (seta azul), células perivasculares (seta preta) e provavelmente um axônio (seta verde) todos BrdU+. E e I- escala = 200µm (Objetiva de 10x). A até F, J e N - escala = 50µm (Objetiva de 40x). G, H, K, L, M, O e P escala=10 µm (Objetiva de 100x).

5.1.5.3 Grupo cultura controle (GCC) – CD90

Intensa marcação foi observada difusamente por todo o tecido pulpar nos períodos de 2 e 5 dias localizadas na camada subodontoblástica, zona acelular, zona rica em células e polpa central (Fig. 8 A, B). A expressão do CD90 esteve localizada na membrana celular de células perivasculares de vasos sanguíneos de diferentes calibres como capilares, vênulas, artérias, em células perineurais (membrana e citoplasma de células de Schwann) e em feixes vículo-nervosos (Fig. 8 E) por toda a polpa. No período de 14 dias as marcações tornaram-se menos intensas ou quase desapareceram (Fig. 8 H, I).

5.1.5.4 Grupo cultura exposição (GCE) - CD90

No grupo com exposição pulpar induzida foi observado nos períodos experimentais de 2, 5 e 14 dias a positividade para o CD90 na membrana celular de células perivasculares principalmente de capilares geralmente encontrados adjacentes à lesão (Fig. 10 J), assim como na parede de vasos de diferentes calibres como artérias e vênulas que acompanhavam os feixes vículo-nervosos. A positividade também foi observada em células perineurais (citoplasma e membrana da célula de Schwann) e capilares dentro dos feixes vículo-nervosos (Fig. 8 K) distribuídos por toda a porção coronal da polpa. Cabe ressaltar que embora a maioria dos vasos sanguíneos e feixes vículo-nervosos estivessem marcados houveram outros que permaneceram sem marcação ou com marcação muito fraca, quase imperceptível.

Figura 8 – Expressão da proteína CD90 nos grupos cultura controle (GCC) e grupo cultura exposição (GCE) nos períodos 2, 5 e 14 dias. Em um panorama geral das marcações de CD90 na polpa periférica e central no grupo cultura controle nos períodos de 2, 5 e 14 dias foi possível observar muitas células perivasculares positivas em capilares permeando a camada odontoblástica e subodontoblástica (cabeça de seta preta), células perivasculares em vasos sanguíneos de diferentes calibres (cabeça de seta branca) (D) e feixes vâsculo-nervosos (cabeça de seta azul) por toda a polpa (A, D, G). Zona rica em células e polpa central mostrando a quantidade de células positivas em feixes vâsculo-nervosos (cabeça de seta preta) distribuídos pelo tecido (B). Na polpa central, células perivasculares positivas para CD90 em vasos sanguíneos de diferentes calibres (seta verde-capilar), (C). E- Feixes vâsculo-nervosos na polpa central mostrando células perineurais CD90 positivas (membrana celular da célula de Schwann) (circulo vermelho) e em pequenos capilares que permeiam os feixes (cabeça de seta azul). F- Células perivasculares positivas em vasos sanguíneos (seta verde) e próximo uma célula positiva solta no tecido (cabeça de seta vermelha). Marcações fracas na polpa central do grupo GCC de 14 dias, células perineurais (cabeça de seta azul) e célula perivascular (seta verde) no capilar do feixe (H), vaso sanguíneo fracamente positivo (seta verde) (I). No grupo GCE houve maior intensidade nas marcações. Polpa periférica evidenciando marcações CD90 na camada subodontoblástica em feixes e vasos sanguíneos (J e M). K- Detalhe do quadro preto 1 em J, mostrando o corte transversal do feixe vâsculo-nervoso com marcações em células perineurais (células de Schwann) (seta preta), em células perivasculares de artérias (cabeça de seta preta), de capilares (seta azul) e de veias (seta verde). L- Detalhe do quadro preto 2 em J, destaca-se a membrana celular de células perivasculares (provável artéria) (cabeça de seta preta) positivas para CD90 localizada adjacente à lesão. N- Feixe vâsculo-nervoso evidenciando poucas células perivasculares (cabeça de seta preta) no vaso (artéria dilatada) e algumas células perineurais (células de Schwann) (seta azul) todas CD90 positivas. O- Vaso sanguíneo, no centro da polpa, mostrando células perivasculares CD90 positivas (seta preta) rodeado de células inflamatórias. Marcações menos intensas no período de 14 dias, observa-se positividade para CD90 na polpa periférica e central (cabeça de seta preta) em feixes e vasos (P). Sinais de degradação das fibras e fibroblastos na polpa central mesmo assim, evidencia-se o feixe com marcações em células perineurais (seta azul) e perivasculares (cabeça de seta preta) (Q), célula solta no tecido (seta amarela) e células perivasculares (seta preta) (R) todas CD90 positivas. Aumentos: D (25x); A, B, G, J, P (100x); C, E, F, H, I, M, R (400x); K, L, N, O, Q (1000x).

5.1.5.5 Grupo cultura controle (GCC) – CD146

Nos períodos experimentais de 2 e 5 dias foram achadas marcações bem similares às encontradas com CD90, como capilares e vasos de médio calibre na camada subodontoblástica, zona acelular e zona rica em células (Fig. 9 A), além de muitos feixes vâsculo-nervosos espalhados pela polpa periférica e coronal com células positivas para CD146. Quanto a intensidade das marcações de CD146, se comparadas com as de CD90, no geral foram menos intensas. Com 2 e 5 dias as marcações mais intensas se observaram na polpa central, em vasos de diversos calibres (vênulas e arteríolas) e em feixes vâsculo-nervosos (Fig. 9 B). No período de 14 dias as marcações diminuíram notavelmente de intensidade e foram mais evidentes na polpa central.

5.1.5.6 Grupo cultura exposição (GCE) – CD146

Nos grupos com lesão pode-se observar a expressão da proteína de membrana CD146 em locais semelhantes aos encontrados com CD90. Logo abaixo da lesão, células perivasculares em capilares, em vasos de médio calibre, em muitas ocasiões em todas as células da parede do vaso (Fig. 9 I), e em feixes vâsculo-nervosos (célula de Schwann e axônios) (Fig. 9 N). Estas marcações se repetiam no centro do tecido pulpar. Como em todos os outros grupos, com 14 dias, a expressão da proteína foi ficando fraca em função da degradação do tecido.

Figura 9 – Expressão da proteína CD146 nos grupos cultura controle (GCC) e grupo cultura exposição (GCE) nos períodos 2, 5 e 14 dias. Panorama geral das marcações de CD146 na polpa periférica no grupo GCC nos períodos de 2, 5 e 14 dias mostra células perivasculares CD146 positivas em capilares presentes na camada subodontoblástica (cabeça de seta preta) (A) em vasos de diferentes calibres na camada rica em células e polpa central (cabeça de seta preta) (D) e em feixes vículo-nervosos (seta azul) espalhados na polpa (D e G). Na polpa central do grupo GCC feixes vículo-nervosos mostrando células CD146+ no vaso (provavelmente artéria) e nas células perivasculares que a rodeiam (seta verde) (B, E e H), células dos feixes perineurais (célula de Schawnn) (seta azul) (B e E) exibindo marcação granular (E) e quase sem marcação com 14 dias de cultivo (H). No centro da polpa, células perivasculares CD146 positivas em vasos de diferentes calibres, pequenos capilares (cabeça de seta preta) no dia 2 (C), artéria de feixe vículo-nervoso no dia 5 (seta verde) (F) e vasos de grande calibre no 14º dia (setas amarelas) (I). Grupo GCE com 2, 5 e 14 dias, visão geral da polpa periférica e central mostra vasos adjacentes à lesão, capilares em sua maioria (cabeça de seta preta) também se observou intensa marcação em feixes vículo-nervosos próximos e distantes de lesão (seta azul) (J, M e P). Com 14 dias as marcações ficam fracas (P). Feixes vículo-nervosos mostrando positividade próximo da lesão em células perineurais (célula de Schawnn) (seta azul), em células perivasculares de capilares que percorrem o caminho junto das fibras (seta amarela) (K). Prováveis artérias nos extremos de um feixe, de um lado (circulo vermelho) com todas as células perivasculares positivas e de outro (circulo verde) somente algumas células positivas (N). Com 14 dias de cultura ainda se evidenciam algumas células perineurais (seta azul) no feixe (Q). Vasos de variados calibres no centro da polpa, em sua maioria com todas suas células perivasculares positivas para CD146 (seta preta) (L), prováveis artérias (cabeça de seta preta) (O e R). Aumentos: D, G (50x); J, M, P (100x); A, B, C, E, F, H, I, L, Q, R (400x).

5.1.5.7 Grupo cultura controle (GCC) – PDGFr β

Nos dentes em cultura devido a rápida degradação da camada odontoblástica, poucos odontoblastos mostraram ser positivos para PDGFr β ao contrário do que aconteceu no grupo hígido. Por outro lado, na camada subodontoblástica e no centro da polpa células perivasculares de vasos sanguíneos de variados calibres (arteríolas, vênulas, capilares) foram positivos para o marcador PDGFr β (Fig. 10 B, E, F), assim como células perineurais (células de Schwann) presentes nos feixes neurais mostraram positividade para o PDGFr β (Fig. 10 C, H) mantendo praticamente a mesma intensidade de marcação durante todos os períodos.

5.1.5.8 Grupo cultura exposição (GCE) – PDGFr β

No grupo com exposição pulpar, identificamos células PDGFr β positivas de aspecto fusiforme sob a área da lesão, junto de células perivasculares em vasos de diferentes calibres como capilares, artérias e veias (Fig. 10 J). Feixes nervosos também apresentam células perineurais (células de Schwann) positivas em áreas próximas da lesão, assim como distantes na área de polpa central.

Nos feixes foi comum observar intensas marcações em artérias (células periarteriais) (Fig. 10 L). Quanto a intensidade, apenas no período de 14 dias diminuiu levemente. O marcador apresenta uma marcação granular intensa também na matriz extracelular más isto não é uniforme em todos os dentes.

Figura 10 – Expressão da proteína PDGFr β nos grupos cultura controle (GCC) e grupo cultura exposição (GCE) nos períodos 2, 5 e 14 dias. No grupo GCC o PDGFr β foi expresso em algumas células da camada odontoblástica e na zona rica em células observam-se células, além de pericitos em capilares (seta amarela) no dia 2 (A), 5 (D) e 14 (G) assim como, células perineurais (células de Schwann/axônios) em feixes vâsculo-nervosos (seta rosa) (A). Na polpa central do grupo GCC com 5 dias, apreciam-se com frequência feixes vâsculo-nervosos com células perivasculares (seta amarela) e células perineurais (célula de Schwann) positivas para PDGFr β (seta rosa) (B e C). Também observamos vasos de diferente calibre tendo células perivasculares positivas para o marcador (seta amarela) no 5º (E, F) e 14º dia (H e I) e estes podiam situar-se próximos de capilares (seta branca) (E e F) e de feixes neurais (seta rosa) (I). Foi evidente que com 14 dias a intensidade das marcações diminuiu no grupo GCC. No grupo GCE observou-se células de formato fusiforme formando uma camada sob a lesão (cabeça de seta branca), ao redor feixes nervosos com células perineurais intensamente marcadas (células de Schwann) (seta rosa) e vasos de diferentes calibres como capilares e veias (seta amarela/seta branca) no dia 2 (J), 5 (M) e 14 (P). Na polpa central do grupo GCE, muitos feixes vâsculo-nervosos vistos em cortes longitudinais e transversais, exibindo sempre células perineurais positivas (célula de Schwann) (seta rosa) nos dias 2 (K) e 5 (N) próximas de vasos com paredes positivas como capilares (seta branca) (K, O) ou vasos de maior calibre (provavelmente artéria) (seta amarela) (L, N). Destaca-se a intensa marcação da matriz extracelular (*) em L. Observamos que as células com aspecto fusiforme também estavam presentes no centro da polpa (cabeça de seta branca) no período de 5 dias (N e O). A intensidade da marcação diminuiu com 14 dias mas ainda é possível verificar a positividade de células perineurais (seta rosa) em feixes nervosos e vasos (seta amarela) (Q e R). (CO) camada odontoblástica, (D) dentina. Todas as imagens em aumento de 400x.

5.1.5.9 Quadro resumo das marcações em dentes humanos

Quadro 1 - Resumo das marcações em dentes humanos

Grupo	Local	BrdU (nuclear)			CD90 (membrana e citoplasma)			CD146 (membrana e citoplasma)			PDGFrβ (membrana e citoplasma)			
		Períodos (dias)												
		2	5	14	2	5	14	2	5	14	2	5	14	
GCC	Lesão	Núcleo de células perivasculares em capilares. Núcleo de células perineurais (células de Schwann) em FVNs	Sem marcação		Membrana celular de células perivasculares (capilares). Membrana celular/citoplasma de células perineurais (células de Schwann) em FVNs na ZA e ZRC.		As mesmas marcações diminuíram de intensidade ou desapareceram		Membrana celular de células perivasculares (capilares, artérias, veias). Membrana celular de células perineurais (células de Schwann) em FVNs na ZA e ZRC.		Marcações pouco evidentes		Membrana celular de células perivasculares (capilares) na ZA e ZRC. Membrana celular/citoplasma de células perineurais (células de Schwann /axônios) em FVNs.	
	Centro	Sem marcação	Sem marcação		Membrana celular de células perivasculares (capilares, artérias, veias). Membrana celular/citoplasma de células perineurais (células de Schwann) em FVNs.		As mesmas marcações diminuíram de intensidade ou desapareceram		Muitas membranas celulares de células perivasculares (capilares, artérias, veias). Membrana celular de células perineurais (células de Schwann).		Marcações pouco evidentes		Membrana celular/citoplasma de células perineurais (células de Schwann /axônios) em FVNs. Membrana celular de células perivasculares (capilares, artérias, veias).	

GCE	Lesão	Núcleo de células perivasculares (capilares, artérias, veias). Núcleo de células perineurais (células de Schwann) em FVNs adjacente à lesão.	Intensa marcação na área da lesão. Núcleo de células perivasculares (capilares, artérias, veias). Núcleo de células perineurais (células de Schwann) e algumas células adjacentes a estruturas como vasos e FVNs.	Membrana celular de células perivasculares (capilares, artérias, veias). Muitas membranas celular/citoplasma de células perineurais (células de Schwann) em FVNs adjacentes à lesão.	As mesmas marcações diminuíram de intensidade ou desapareceram	Membrana celular de células perivasculares (capilares, artérias, veias). Membrana celular de células perineurais (células de Schwann) adjacentes à lesão	Marcações pouco evidentes	Células fusiformes sob à lesão/ membrana celular de células perivasculares (capilares, artérias, veias). Membrana celular/citoplasma de células perineurais (células de Schwann /axônios) em FVNs.
	Centro	Escassa marcação		Membrana celular de células perivasculares (capilares, artérias, veias). Membrana celular/citoplasma de células perineurais (células de Schwann) em FVNs.	As mesmas marcações diminuíram de intensidade ou desapareceram	Membrana celular de células perivasculares (artérias, veias com toda a parede positiva). Membrana celular de células perineurais (células de Schwann).	Marcações pouco evidentes	Células fusiformes/ membrana celular de células perivasculares (capilares, artérias, veias). Membrana celular/citoplasma de células perineurais (células de Schwann /axônios) em FVNs.

Legenda: GCC, grupo cultura controle. GCE, grupo cultura exposição pulpar. FVNs, feixe vâsculo-nervoso. ZA, zona acelular. ZRC, zona rica em células

5.1.6 Percentual e dados estatísticos de células imunomarcadas para cada proteína em molares humanos

5.1.6.1 BrdU

Os dados numéricos e estatísticos (Tabela 5 A e B) obtidos para o marcador de proliferação celular (BrdU) mostraram que não houve diferenças significativas entre os períodos dos experimentais dentro do mesmo grupo, tanto para grupo GCE ($p = 0.57$) quanto para o grupo GCC ($p = 0.30$). Com relação aos grupos, no mesmo período, observou-se a ocorrência de diferenças estatísticas entre GCE e GCC apenas na área de lesão em todos os períodos experimentais 2 dias ($p = 0.03$), 5 dias ($p = 0.01$) e 14 dias ($p = 0.02$). Na área do centro da polpa não houve diferenças estatísticas significativas em nenhuma das condições avaliadas.

Tabela 5 A – Dados estatísticos obtidos para o percentual de células marcadas para BrdU (%) na área da LESÃO para os grupos GCE e GCC nos diferentes períodos experimentais.

Percentual de células marcadas para BrdU na área da LESÃO					
Grupo Experimental	Dados estatísticos	Períodos experimentais			Kruskal Wallis (p)
		2 dias	5 dias	14 dias	
GCE	Média	6.8	5.0	7.8	$p = 0.57$
	DP	1.4	2.9	7.4	
	Mediana	6.1	3.9	5.4	
	Variação	5.60 – 8.85	2.95 – 9.34	2.10 – 18.5	
GCC	Média	1.1	0.1	0.2	$p = 0.30$
	DP	1.4	0.1	0.3	
	Mediana	0.2	0.1	0.2	
	Variação	0.26 – 2.80	0.0 – 0.29	0.0 – 0.60	
	Mann Whitney (p)	$p = 0.03$	$p = 0.01$	$p = 0.02$	

Tabela 5 B – Dados estatísticos obtidos para o percentual de células marcadas para BrdU (%) na área do CENTRO da polpa para os grupos GCE e GCC nos diferentes períodos experimentais.

Percentual de células marcadas para BrdU na área do CENTRO					
Grupo Experimental	Dados estatísticos	Períodos experimentais			Kruskal Wallis (p)
		2 dias	5 dias	14 dias	
GCE	Média	5.9	2.4	6.5	$p = 0.52$
	DP	6.5	3.4	6.4	
	Mediana	2.0	1.1	5.5	
	Variação	0.0 – 14.16	0.0 – 7.52	0.0 – 14.94	
GCC	Média	3.8	0.4	1.9	$p = 0.29$
	DP	3.4	0.9	2.9	
	Mediana	4.6	0.0	0.7	
	Variação	0.0 – 6.74	0.0 – 2.0	0.0 – 6.2	
	Mann Whitney (p)	$p = 0.88$	$p = 0.22$	$p = 0.30$	

5.1.6.2 CD90

Os dados numéricos e estatísticos (Tabela 6 A e B) obtidos para o marcador de membrana CD90 mostraram que não houve diferenças significativas entre os períodos experimentais para o grupo GCE ($p = 0.24$), porém houve diferença estatística para o grupo GCC ($p = 0.01$). Adicionalmente, houve diferenças estatísticas entre os grupos GCE e GCC na área de Lesão no período de 14 dias ($p = 0.00$). No Centro da polpa houve também diferenças significativas entre os períodos experimentais para o grupo GCE ($p = 0.00$) e com relação aos grupos houve diferença estatística entre GCE e GCC aos 14 dias ($p = 0.00$).

Tabela 6 A – Dados estatísticos obtidos para o percentual de células marcadas para CD90 (%) na área da LESÃO para os grupos GCE e GCC nos diferentes períodos experimentais.

Percentual de células marcadas para CD90 na área da LESÃO					
Grupo Experimental	Dados estatísticos	Períodos experimentais			Kruskal Wallis (p)
		2 dias	5 dias	14 dias	
GCE	Média	22.9	14.1	27.2	$p = 0.24$
	DP	18.2	7.6	14.7	
	Mediana	16.8	11.4	21.2	
	Variação	5.56 – 53.05	8.21 - 25.40	13.63 -51.89	
GCC	Média	19.9	9.0	2.3	$p = 0.01$
	DP	12.1	7.5	1.5	
	Mediana	17.9	7.5	2.3	
	Variação	6.72 - 33.33	1.77 - 18.16	0.93 -4.71	
	Mann Whitney (p)	$p = 1.00$	$p = 0.41$	$p = 0.00$	

Tabela 6 B – Dados estatísticos obtidos para o percentual de células marcadas para CD90 (%) na área do CENTRO para os grupos GCE e GCC nos diferentes períodos experimentais

Percentual de células marcadas para CD90 na área do CENTRO					
Grupo Experimental	Dados estatísticos	Períodos experimentais			Kruskal Wallis (p)
		2 dias	5 dias	14 dias	
GCE	Média	15.96	6.62	27.58	$p = 0.00$
	DP	8.98	2.79	12.02	
	Mediana	13.87	5.76	20.62	
	Variação	6.29 – 30.41	4.28 – 10.67	17.92 – 41.91	
GCC	Média	11.40	13.64	6.49	$p = 0.61$
	DP	6.15	13.47	4.33	
	Mediana	11.61	8.15	6.53	
	Variação	4.30 – 19.05	3.97 – 37.24	0.0 – 12.18	
	Mann Whitney (p)	$p = 0.54$	$p = 0.41$	$p = 0.00$	

5.1.6.3 CD146

Os dados numéricos e estatísticos (Tabela 7 A e B) obtidos para o marcador de membrana CD146 mostraram que não houve diferenças significativas entre os períodos experimentais tanto para grupo GCE ($p = 0.93$) quanto para o grupo GCC ($p = 0.40$). Se compararmos os grupos experimentais GCE e GCC em cada período observaremos que houve diferenças estatísticas apenas na área de lesão em todos os períodos experimentais 2 dias ($p = 0.01$), 5 dias ($p = 0.01$) e 14 dias ($p = 0.01$). Na área do Centro da polpa não houve diferenças significativas entre os períodos experimentais de um mesmo grupo e nem entre os diferentes grupos.

Tabela 7 A – Dados estatísticos obtidos para o percentual de células marcadas para CD146 (%) na área da LESÃO para os grupos GCE e GCC nos diferentes períodos experimentais

Percentual de células marcadas para CD146 na área da LESÃO					
Grupo Experimental	Dados estatísticos	Períodos experimentais			Kruskal Wallis (p)
		2 dias	5 dias	14 dias	
GCE	Média	15.90	13.86	13.49	$p = 0.93$
	DP	7.02	3.39	1.39	
	Mediana	12.73	14.93	13.65	
	Variação	9.19 - 24.49	9.02-16.55	11.67-14.99	
GCC	Média	5.37	2.36	3.63	$p = 0.40$
	DP	3.49	0.78	3.88	
	Mediana	4.46	2.36	1.58	
	Variação	1.23-9.60	1.51-3.56	0.0-8.44	
	Mann Whitney (p)	$p = 0.01$	$p = 0.01$	$p = 0.01$	

Tabela 7 B – Dados estatísticos obtidos para o percentual de células marcadas para CD146 (%) na área do CENTRO para os grupos GCE e GCC nos diferentes períodos experimentais

Percentual de células marcadas para CD146 na área do CENTRO					
Grupo Experimental	Dados estatísticos	Períodos experimentais			Kruskal Wallis (<i>p</i>)
		2 dias	5 dias	14 dias	
GCE	Média	14.67	11.69	15.71	<i>p</i> = 0.76
	DP	10.70	7.24	7.17	
	Mediana	12.71	9.48	16.16	
	Variação	2.38-29.10	5.75-22.04	7.80-22.73	
GCC	Média	15.52	12.00	11.64	<i>p</i> = 0.20
	DP	4.66	4.06	12.60	
	Mediana	15.15	10.67	7.17	
	Variação	11.59-23.07	7.44-16.38	0.87-33.34	
	Mann Whitney (<i>p</i>)	<i>p</i> = 0.84	<i>p</i> = 0.90	<i>p</i> = 0.28	

5.1.6.4 PDGFrβ

Os dados numéricos e estatísticos (Tabela 8 A e B) obtidos para o marcador de membrana PDGFrβ mostraram que não houve diferenças significativas entre os períodos experimentais de um mesmo grupo, tanto para grupo GCE (*p* = 0.24) quanto para o grupo GCC (*p* = 0.62). Comparando os diferentes grupos (GCE vs GCC) observou-se a ocorrência de diferenças estatísticas apenas na área de lesão nos períodos experimentais de 2 dias (*p* = 0.01) e 5 dias (*p* = 0.02). Na área do Centro da polpa não houve diferenças estatísticas significativas em nenhuma das condições avaliadas.

Tabela 8 A – Dados estatísticos obtidos para o percentual de células marcadas para PDGF-receptor β (%) na área da LESÃO para os grupos GCE e GCC nos diferentes períodos experimentais

Percentual de células marcadas para PDGF-receptor β na área da LESÃO					
Grupo Experimental	Dados estatísticos	Períodos experimentais			Kruskal Wallis (p)
		2 dias	5 dias	14 dias	
GCE	Média	27.19	17.72	16.09	$p = 0.24$
	DP	13.89	7.72	8.90	
	Mediana	24.24	16.49	11.24	
	Variação	15.18-51.05	9.93-27.94	8.66-29.96	
GCC	Média	7.38	4.75	9.58	$p = 0.62$
	DP	4.03	3.30	7.63	
	Mediana	6.92	3.38	12.05	
	Variação	2.96-12.73	2.59-9.66	1.02-15.69	
	Mann Whitney (p)	$p = 0.01$	$p = 0.02$	$p = 0.78$	

Tabela 8 B – Dados estatísticos obtidos para o percentual de células marcadas para PDGF-receptor β (%) na área do CENTRO para os grupos GCE e GCC nos diferentes períodos experimentais

Percentual de células marcadas para PDGF-receptor β na área do CENTRO					
Grupo Experimental	Dados estatísticos	Períodos experimentais			Kruskal Wallis (p)
		2 dias	5 dias	14 dias	
GCE	Média	15.9	13.94	21.90	$p = 0.26$
	DP	4.24	2.21	10.04	
	Mediana	16.04	14.65	19.07	
	Variação	11.23-20.33	10.87-15.58	14.71-39.17	
GCC	Média	14.0	15.06	14.93	$p = 0.89$
	DP	6.63	5.39	8.95	
	Mediana	14.56	17.23	19.59	
	Variação	5.39-21.48	7.06-18.72	4.60-20.59	
	Mann Whitney (p)	$p = 0.90$	$p = 0.34$	$p = 0.78$	

5.1.6.5 Gráficos estatísticos

Para comparar os resultados de forma simples, foram construídos gráficos dos dados numéricos obtidos para cada marcador nas diferentes áreas, como mostrado nas figuras 5.4.5, 5.4.6 e 5.4.7.

Gráfico 1 – Porcentagem da expressão das diferentes proteínas analisadas em tecido pulpar humano nos grupos GCC e GCE na área de Lesão.

Gráfico 2 – Porcentagem da expressão das diferentes proteínas utilizadas em tecido pulpar humano nos grupos GCC e GCE na área Centro.

Gráfico 3 – Comparação das porcentagens expressas pelas diferentes proteínas analisadas em tecido pulpar humano por áreas: Lesão e Centro nos grupos GCC e GCE.

5.1.7 Dupla marcação por imunofluorescência em molares humanos (co-expressão)

Após avaliação da expressão das proteínas individualmente, foram realizadas as duplas marcações (co-expressão) nos os grupos GCE em todos os períodos (2, 5 e 14 dias) e no grupo GCC apenas no período de 2 dias, pois os resultados prévios de expressão de BrdU foi observada somente no período de 2 dias de cultivo e ausente nos períodos experimentais

de 5 e 14 dias. Para os marcadores de membrana (CD90, CD145 e PDGFr β) foi usado o anticorpo secundário o Alexa Fluor 488 evidenciando cor verde fluorescente, para o marcador de nuclear (BrdU) foi utilizado o anticorpo secundário Cianidina (Cy3) evidenciando cor vermelha fluorescente. Para contracorar os núcleos, foi utilizado o meio de montagem conjugado a DAPI evidenciado em cor azul. Assim, a co-expressão positiva mostrava a membrana celular/citoplasma em verde, o núcleo em vermelho sobreposto ao núcleo azul, dando um tom arroxeado.

5.1.7.1 CD90/BrdU

Grupo cultura controle CD90/BrdU

No período de 2 dias, a camada odontoblástica que ainda permanecia viável mostrava odontoblastos BrdU+ permeados por capilares com células perivasculares duplamente marcadas (CD90/BrdU+) como mostrado na Fig. 11 B. Na camada subodontoblástica observou-se feixes vâsculo-nervosos com algumas células perineurais duplamente positivas (CD90/BrdU) outras apenas BrdU+ ou somente CD90+, e da mesma forma, foi comum observar capilares, as vezes vistos longitudinalmente, com paredes duplamente marcadas. No centro da polpa, as marcações dos feixes vâsculo-nervosos se repetiam como mostrado na Fig. 11 D.

Grupo cultura exposição CD90/BrdU

Adjacente e distante da lesão, feixes vâsculo-nervosos e vasos sanguíneos de diferentes calibres evidenciaram co-expressão de CD90/BrdU em todos os períodos experimentais 2, 5 e 14 dias. Na camada subodontoblástica que ainda permanecia viável, podiam distinguir-se células esparsas positivas para BrdU ou para CD90 apenas e raras células duplamente positivas em capilares (com apenas uma célula) evidenciando co-expressão dos marcadores (Fig. 11 F).

Adjacente à lesão, também foram observados feixes vâsculo-nervosos exibindo células perineurais, duplamente positivas (CD90/BrdU) cercadas por células positivas para apenas um dos marcadores (CD90 ou BrdU). Vasos de médio calibre apresentaram algumas células perivasculares duplamente positivas na camada externa (pericitos) enquanto que na camada interna somente se visualizou células CD90+ ou BrdU+ (Fig. 11 G). Pequenos vasos, com

somente duas camadas de células perivasculares, quando observados sob grande aumento (63x zoom 2), mostraram a camada mais externa da parede vascular (pericitos) duplamente positiva e algumas células da camada interna BrdU+ (células endoteliais) (Fig. 11 L). Distante da área da lesão grandes feixes vâsculo-nervosos e vasos de médio calibre evidenciaram também co-expressão dos marcadores citados.

Figura 11 – Co-expressão de CD90/BrdU em tecido pulpar de molares humanos com e sem exposição pulpar. A até D- grupo cultura controle (GCC). E até P- grupo cultura exposição pulpar (GCE). HE do grupo GCC. B e C- Alguns odontoblastos BrdU positivos (seta amarela) e capilares mostrando co-expressão de CD90/BrdU (seta branca). D- Feixe vâsculo-nervoso no centro da polpa evidenciando célula perineural com dupla marcação (seta branca) e algumas células BrdU positivas (seta amarela). E, I, M- HE do grupo GCE. F- Capilares co-expressando CD90 e BrdU (seta branca) na camada subodontoblástica. G- Feixe neural com células perineurais duplamente positivas (seta branca) e algumas células apenas BrdU positivas (seta amarela) e vaso sanguíneo de médio calibre com células duplamente positivas (seta branca). H- Feixes e capilares no centro da polpa evidenciando células duplamente positivas (seta branca). J- Sob a lesão, capilares co-expressando CD90/BrdU (seta branca) e poucas células BrdU positivas (seta amarela). K- Em maior aumento células duplamente positivas (seta branca). L- Pequeno vaso sanguíneo no centro da polpa evidenciando pericitos CD90/BrdU (seta branca) e célula endotelial BrdU positiva (seta amarela). N- Área sob a lesão, com intensa marcação CD90 positiva (seta vermelha) e capilares duplamente positivos (seta branca). O- Destaque em maior aumento do Quadro apontado com seta vermelha em N, mostrando capilares positivos (seta branca). P-

Feixes nervosos com células perineurais BrdU positivas (seta amarela) e poucas duplamente positiva (seta branca) no centro da polpa. Quadros brancos mostram simples marcação.

5.1.7.2 CD146/BrdU

Grupo cultura controle CD146/BrdU

No período de 2 dias, a camada odontoblástica e subodontoblástica viável mostrava células positivas para CD146, BrdU e algumas poucas duplamente positivas. Muito próximo foram evidenciados vasos sanguíneos de calibres variados entre eles capilares co-expressando CD146 e BrdU na parede vascular (Fig. 12 C). No centro do tecido pulpar observamos feixes nervosos com células perineurais CD146/BrdU positivas acompanhados de vasos sanguíneos e capilares dispersos no tecido ambos com células perivasculares co-expressando CD146 e BrdU.

Grupo cultura exposição CD146/BrdU

Em todos os períodos avaliados (2, 5 e 14 dias) evidenciamos a co-expressão dos marcadores CD146 e BrdU em diferentes estruturas que compõem o tecido pulpar, seja em áreas imediatas à lesão ou distante dela. A camada subodontoblástica encontrou-se permeada por capilares duplamente positivos (CD146/BrdU) e células BrdU positivas apenas (Fig. 12 F). Muito próximo desta área, foram observados feixes nervosos apresentando células perineurais CD146+/BrdU+ e algumas células BrdU+ dentro e fora dos feixes (Fig. 12 G). Vasos de pequeno calibre também apresentaram células duplamente positivas na parede vascular interna e externa. Na área central da polpa, feixes vâsculo-nervosos e vasos sanguíneos exibiram co-expressão de CD146 e BrdU da mesma forma que na periferia (Fig. 12 L). Com 14 dias de cultura, as marcações ficaram fracas e pouco precisas embora ainda podiam distinguir-se feixes vâsculo-nervosos e vasos sanguíneos duplamente marcados (Fig. 12 P).

Figura 12 – Co-expressão de CD146/BrdU em tecido pulpar de molares humanos. A-HE do grupo cultura controle. B- Capilares co-expressando CD146/BrdU na camada subodontoblástica (seta branca). C- Detalhe do quadro branco em B, vista longitudinal do capilar evidenciando co-expressão de CD146/BrdU na parede vascular (seta branca). D- Feixe vâsculo-nervoso, na polpa central, mostrando o vaso sanguíneo com células da camada externa co-expressando CD146/BrdU (seta branca) e células perineurais também positivas (seta amarela). E, I, M - HE do grupo cultura exposição. F- Capilares muito próximos da lesão mostrando co-expressão de ambos marcadores. Perto é possível observar células BrdU positivas (seta amarela). G- Próximo da lesão, feixe nervoso com algumas células perineurais co-expressando ambos marcadores, junto com muitas células BrdU positivas no interior e fora do feixe (seta amarela). H- Centro da polpa, mostrando pequeno vaso sanguíneo com células perivasculars co-expressando CD146 e BrdU na camada externa e interna (seta branca). Feixes nervosos evidenciando células perineurais co-expressando ambos marcadores (seta branca) imediatamente sob à lesão em J, próximo da lesão em K, e no centro em corte transversal em L, próximo de todos os feixes células BrdU positivas (seta amarela). N- Após 14 dias de cultura, sob a lesão, poucas células duplamente positivas (seta branca) O- Feixe nervoso com uma célula perineural duplamente positiva, próximo da lesão e P- Capilares com células perivasculars (seta vermelha) e feixe (seta branca) ambos co-expressando ambos marcadores no centro da polpa. Quadros brancos mostram simples marcação.

5.1.7.3 PDGFR β /BrdU

Grupo cultura controle PDGFR β /BrdU

O PDGFR β foi o marcador que melhor conseguimos visualizar em todos os períodos e grupos experimentais. Sua expressão foi intensa até os 14 dias do experimento e observou-se frequentemente em FVNs. Na camada subodontoblástica viável puderam ser observadas, espalhadas no tecido, células PDGFR β / BrdU positivas perto de capilares e parede vascular (Fig. 13 B). Imediatamente sob esta área, feixes nervosos evidenciando células perineurais co-expressando ambos marcadores e em muitos casos axônios duplamente positivos sem que o DAPI co-localizasse foram observados. No centro, mais FVNs foram vistos longitudinalmente ou transversalmente sempre mostrando células perineurais co-expressando ambos marcadores (Fig. 13 D).

Grupo cultura exposição PDGFR β /BrdU

A expressão de ambos os marcadores foi consistente em todos os períodos (2, 5 e 14 dias). Sob à lesão, células BrdU (em maior quantidade) ou PDGFR β positivas espalhadas entre muitos capilares co-expressando ambos marcadores (Fig. 13 J). Muito próximo foram evidentes grandes feixes nervosos com células perineurais duplamente positivas (Fig. 13 K). No centro, FVNs claramente marcados co-expressando ambos marcadores em células perineurais, também foi possível observar em alguns casos células BrdU positivas no interior do vaso sanguíneo que acompanha o feixe assim como, células perivasculares na parede de vasos sanguíneos de médio calibre (Fig. 13 L). Foi comum observar o fato de ter não ter co-localização do DAPI em prolongamentos celulares (axônios) embora sejam duplamente positivos.

Figura 13 – Co-expressão de PDGFr β /BrdU em tecido pulpar de molares humanos. A-HE do grupo cultura controle. B- Camada odontoblástica permeada por muitos capilares positivos para PDGFr β /BrdU (seta branca) e células espalhadas no tecido BrdU positivas (seta amarela). C- Célula perineural co-expressando os marcadores PDGFr β /BrdU (seta branca) no feixe nervoso, próximo da camada subodontoblástica. D- Vista transversal do FVN mostrando estruturas duplamente positivas sem co-localização do DAPI (seta laranja), algumas células perineurais co-localizando PDGFr β /BrdU (seta branca) e células BrdU positivas perto do feixe (seta amarela). E, I, M - HE do grupo cultura exposição. F- Após 2 dias, sob à lesão, algumas células BrdU positivas (seta amarela), feixes nervosos mostrando células perineurais positivas (seta branca). G- Feixe nervoso mostrando suas fibras em contato com à lesão com células duplamente positivas (seta branca), algumas sem DAPI (seta laranja) e perto do feixe de células BrdU positivas. H- Vista transversal do FVN na polpa central, evidenciando células perineurais positivas (seta branca). J- Após 5 dias, sob à lesão, capilares duplamente positivos (seta branca). K- Perto da lesão, vista longitudinal do feixe nervoso evidenciando muitas células perineurais positivas (seta branca). L- FVN na polpa central, após 5 dias mostrando no interior do vaso sanguíneo células BrdU positivas (seta amarela), células perineurais duplamente positivas (seta branca) e células positivas sem DAPI (seta laranja). O- Após 14 dias, sob a lesão poucas células BrdU positivas (seta amarela), e algumas células duplamente positivas (seta branca) que parecem pertencer a um feixe em degeneração. P- Feixes nervosos próximos da lesão, evidenciando células perineurais duplamente positivas (seta branca) e células positivas sem DAPI (seta laranja). Q- Pequeno feixe no centro da polpa, também com células perineurais duplamente positivas (seta branca).

5.1.7.4 Desenho esquemático das marcações encontradas em molares humanos

5.2 Parte II: Modelo animal

O número de amostras apresentada no material e métodos reduziu devido a alguns acontecimentos. Alguns dentes foram excluídos devido à contaminação pulpar, por advento da queda do cimento obturador, inviabilizando o uso das amostras. Outros foram excluídos das análises devido a problemas técnicos no momento da inclusão na parafina e corte. A tabela 9 mostra o número real de amostras que foram analisadas na pesquisa.

Tabela 9 – Número final de amostras nos grupos experimentais de animais

Grupos	Procedimento	Períodos			Total
		2 dias	4 dias	8 dias	
GIVE	Exposição pulpar oclusal restaurado com coltosol	6 dentes	6 dentes	5 dentes	17 dentes
GIVC	Sem exposição pulpar, controle	4 dentes	5 dentes	7 dentes	16 dentes
Total de dentes	-	10	11	12	33
Total de animais	-	3	3	4	10

Legenda: GIVE, Grupo *in vivo* com exposição pulpar. GIVC, Grupo *in vivo* controle, sem exposição pulpar.

5.2.1 Análise morfológica dos cortes teciduais de ratos corados por HE.

Diferente das amostras humanas, nos animais foi possível obter peças anatômicas evidenciando, além dos molares, o cimento, o ligamento periodontal e estruturas de suporte como o processo e osso alveolar. Portanto, nos animais descreveremos em detalhes o tecido pulpar que é o foco do nosso estudo, e de forma geral as estruturas adjacentes.

5.2.1.1 Análise morfológica do grupo *in vivo* controle (GIVC) em ratos

Morfologicamente, foi observado primeiros molares com densa camada de dentina e fina pré-dentina, com maioria das cúspides exibindo formação constante de dentina terciária (Fig. 14 A), provavelmente, devido ao desgaste que sofrem pela atrição como forma de mastigação normal dos roedores.

Circundado pela dentina, encontra-se o tecido pulpar formado pela camada de odontoblastos constituída por células colunares altas arranjadas em paliçada que revestem a periferia da polpa, intercalada com a presença de finíssimos capilares, seguida de zona acelular composta de feixes de colágeno. Continuando, a zona rica em células mostra alta densidade celular onde foram observados fibroblastos com núcleos proeminentes (ativos) arranjados frouxamente entre fibras colágenas (Fig. 14 B). A região central da polpa foi caracterizada por vasos e feixes vâsculo-nervosos que atravessam a polpa inteira (Fig. 14 C).

Embora existir a presença esparsa de macrófagos e linfócitos, não houveram sinais de inflamação. Na polpa coronal, observou-se também a presença frequente de estruturas ovóides “semelhantes a osso”, com algumas células que revestindo a periferia e outras incluídas na estrutura. Essas estruturas diferem dos conhecidos cálculos pulpare humanos que se apresentam como estruturas concêntricas. Em nosso estudo, convencionamos chamá-las de osteodentina (Fig. 14 D).

Recobrando a dentina radicular observou-se cimento avascular exibindo feixes de fibras colágenas densas do ligamento periodontal aderidas ao cimento e simultaneamente ao osso alveolar (Fig. 14 E). No ligamento propriamente dito, notou-se fibroblastos, fibras colágenas, abundantes feixes nervosos e vasos de variados calibres (capilares e vênulas) (Fig. 14 F). O processo e osso alveolar mostrou-se com suas características normais como osteoblastos na periferia e osteócitos incluídos dentro da matriz, rodeados de capilares e feixes nervosos. No centro do osso foram observadas cavidades preenchidas com medula. Finalmente, áreas de epitélio gengival pavimentoso estratificado paraqueratinizado de aspecto normal fazendo parte do periodonto de proteção também foram observadas (Fig. 14 G).

Figura 14 – Características histológicas do tecido pulpar no grupo *in vivo* controle (GIVC). A- Primeiro molar de rato mostrando todas as estruturas, dentina (D), polpa (P), dentina terciária (DT) nas pontas das cúspides e, adjacente às raízes, cemento (C), ligamento periodontal (LP) e osso alveolar (OA). B- Em maior aumento, a dentina terciária (DT) comumente formada nas pontas das cúspides, abaixo a fina pré-dentina (PD) seguida da camada de odontoblastos (CO) intercalada com finíssimos capilares (cabeça de seta azul), a zona acelular (*) e a zona rica em células (ZRC). C- Polpa central mostrando seus principais componentes, feixes de fibras colágenas (círculo preto), fibroblastos (cabeça de seta preta), vasos sanguíneos (seta preta) e feixes nervosos (seta azul). D- Área central da polpa mostrando o provável início da formação de osteodentina e uma concentração de vasos sanguíneos com hiperemia ao redor que parecem estar aportando suprimento vascular para a formação desta estrutura (seta azul). E- Área radicular, evidenciando em menor aumento a polpa radicular (PR), ligamento periodontal (LP) e osso alveolar (OA). F- Em maior aumento, o ligamento periodontal mostrando suas fibras inseridas no cemento (C) e no osso alveolar (OA) (seta preta). G- Epitélio gengival paraqueratinizado semelhante ao epitélio humano, apresentando camada espinhosa e basal (seta preta) e lâmina própria constituída por tecido conjuntivo denso apresentando fibroblastos, vasos sanguíneos e raras células inflamatórias. PC = polpa central. Aumentos: A, E (50x); D (100x); B, C, F, G (400x).

5.2.1.2 Análise morfológica do grupo *in vivo* exposição (GIVE) em ratos

Grupo in vivo exposição (GIVE) com 2 dias

Decorrido 2 dias após a lesão pulpar, observou-se uma área de necrose sob a cavidade (Fig. 15 B) circundada por infiltrado inflamatório com predominância de neutrófilos (Fig. 15 C) restrito à cavidade pulpar, tudo isso, cercado por alterações no calibre vascular, vasodilatação de médios e pequenos vasos, hiperemia (Fig. 15 E), edema, pequenas áreas de hemorragia e também proliferação fibroblástica, caracterizando assim, uma inflamação aguda.

Por outro lado, nas vertentes das cúspides próximas à lesão, notou-se neoformação de células semelhantes à odontoblastos, com núcleos proeminentes e citoplasma eosinofílico (Fig. 15 F), sob ampla proliferação angioblástica num intento de reparo da lesão.

Grupo in vivo exposição (GIVE) com 4 dias

Transcorrido 4 dias após a lesão pulpar notou-se uma área de necrose sob a cavidade semelhante a encontrada no período de 2 dias (Fig. 15 G), com infiltrado inflamatório misto (mononucleares e polimorfonucleares), (Fig. 15 I) mostrando o início da transição da inflamação da fase aguda para crônica. Nesta fase observou-se a presença de macrófagos na área de lesão, assim como fenômenos vasculares como hiperemia e algumas áreas de hemorragia ao redor da lesão (Fig. 15 J). Concomitantemente, adjacente à lesão notou-se a presença de células odontoblastos-like, com núcleos proeminentes e citoplasma eosinofílico (Fig. 15 L). Números vasos sanguíneos semelhante ao observado no período de 2 dias completam o quadro. Em alguns casos, confirmou-se que o cimento restaurador foi perdido nos dias subsequentes à restauração.

Grupo in vivo exposição (GIVE) com 8 dias

Aos 8 dias, ainda notou-se infiltrado inflamatório misto composto de neutrófilos (polimorfonucleares), eosinófilos e plasmócitos, linfócitos e alguns macrófagos (mononucleares) (Fig. 15 N, O, Q). Foi observado também destruição tecidual sempre circunscrita à área da lesão além de vasos sanguíneos congestos, hiperêmicos e ectásicos (Fig. 15 P). Contudo, existem focos de reparo pulpar com formação de matriz dentinária pelos odontoblastos-like da mesma forma que nos períodos de 2 e 4 dias, como mostrado na Figura 15 R.

Figura 15 – Características histológicas do tecido pulpar no grupo *in vivo* exposição (GIVE). A- GIVE com 2 dias, observa-se um panorama geral da lesão no molar (seta preta). B- Em maior aumento à área de necrose, caracterizada pela destruição da arquitetura tecidual formada sob a lesão (N). C- Quadro preto em A, em maior aumento, apresentando infiltrado inflamatório polimorfonuclear (neutrófilos) (seta amarela) acompanhado de vasodilatação, hiperemia e congestão vascular (seta preta). D- Área adjacente à lesão, mostrando proliferação fibroblástica em detalhe (seta preta). E- Próximo à lesão, abundante proliferação vascular (seta preta). F- Perto da lesão, neoformação de odontoblastos-like (seta preta) e numerosos vasos sanguíneos (seta azul). G- GIVE com 4 dias, mostrando uma visão geral do molar com lesão (seta preta). H- Maior aumento do quadro preto em G, nota-se, além da área de infiltrado inflamatório (seta preta), a osteodentina com algumas células na periferia (seta azul) e outras como inclusões celulares (seta amarela). I- Em maior aumento, o infiltrado inflamatório com inúmeros neutrófilos (seta preta) e alguns macrófagos (seta azul). J- Área próxima da lesão, mostrando vasodilatação, hiperemia e congestão vascular (seta preta); dentro dos vasos é possível observar neutrófilos (cabeça de seta azul); entre os vasos observa-se um feixe nervoso (seta azul). K- Área adjacente à lesão mostrando o infiltrado inflamatório (seta preta) e a osteodentina (seta azul). L- Na vertente das cúspides, neoformação de odontoblastos-like (seta preta) agora mostrando uma pequena quantidade de matriz formada (seta amarela) sempre sob ampla proliferação vascular (seta azul). M- GIVE com 8 dias, evidenciando a lesão pulpar (seta preta). N- Em detalhe, a necrose do tecido (seta preta). O- Área da lesão evidenciando presença de infiltrado inflamatório misto, neutrófilos (seta azul), plasmócitos (seta vermelha) e macrófago (seta preta). P- Mostra os vasos ectásicos, congestos e hiperêmicos (seta preta). Q- Infiltrado inflamatório crônico mostrando eosinófilos (seta azul) e linfócitos (seta vermelha). R- Área de reparo tecidual, neoformação de odontoblastos-like (seta preta), formação de matriz dentinária (seta amarela) sempre sob proliferação vascular (seta azul). Aumentos: A, G, M (50x); P (100x); B, C, D, E, F, H, I, J, K, L, N, O, Q, R (400x).

5.2.2 Padrão da imunomarcação das proteínas alvo em molares de ratos

A metodologia utilizada permitiu que as mesmas proteínas fossem avaliadas em tecidos hígidos e lesionados nos mesmos animais. Assim, os tecidos hígidos serviram como controle positivo (padrão), incluindo a iododeoxiuridina (IdU) que foi incorporada nos animais através da água de beber. Por tanto, avaliamos as células positivas para os marcadores IdU, CD90 e NG2.

5.2.2.1 Grupo *in vivo* controle (GIVC) – IdU

A imunomarcação para a proteína IdU (nuclear) foi semelhante em todos os períodos analisados (2, 4 e 8 dias), ocupando diferentes localizações na polpa dental (Fig. 16 A). No corno pulpar foram observado alguns odontoblastos, células perivasculares, em capilares da camada subodontoblástica, parede de vasos de médio calibre na ZRC que expressavam IdU. No centro da polpa, feixes vâsculo-nervosos (núcleos de células de Schwann), (Fig. 16 D),

células perivasculares e endoteliais e, em alguns casos, células soltas no tecido muito próximas de vasos, dando impressão que acabaram de sair também foram encontradas com marcação positiva para IdU.

Além disso, como já mencionado na descrição histológica, observamos em diversos animais estruturas interpretadas como osteodentina. Frequentemente essas estruturas apresentavam-se rodeadas por células IdU positivas (Fig. 16 D). Alguns odontoblastos na base da câmara pulpar, também foram IdU positivos. Na raiz, também observou-se células IdU positivas na parede de vasos de médio calibre (Fig. 16 E). Outros locais de marcação foram células no ligamento periodontal, osso alveolar e medula óssea como mostrado na figura 16 F, H, I, J.

Figura 16 – Expressão da proteína Iododeoxiuridina (IdU) no grupo *in vivo* controle (GIVC). A- Visão geral expressão da proteína IdU no molar de rato. B- Corno pulpar, mostrando alguns odontoblastos IdU+ (seta preta), na camada subodontoblástica e células perivasculares (cabeça de seta azul). C- Na polpa central, observa-se feixe vâsculo-nervoso mostrando o núcleo de células de Schwann IdU+ (seta azul), células perivasculares IdU+s em volta da artéria (cabeça de seta verde) e uma célula positiva solta no tecido (cabeça de seta vermelha) muito próxima do vaso e odontoblastos na base da câmara pulpar também IdU+ (seta preta). D- Na polpa central, observa-se osteodentina exibindo células IdU+ na periferia (seta vermelha) e próximo, uma célula IdU+ solta no tecido (cabeça de seta vermelha) muito perto de vasos; o FVN apresenta células de Schwann positivas (seta azul) e adjacente notam-se células perivasculares também positivas (cabeça de seta verde e cabeça de seta azul). E- Na polpa radicular, inúmeras veias de médio calibre, com células IdU+ na parede (cabeça de seta amarela). F- Papila interdental e crista óssea alveolar evidenciando microcapilares IdU+ na camada basal (seta preta) e na lâmina própria (seta amarela), assim como, fibroblastos positivos para IdU no tecido conjuntivo (seta verde). G- Células IdU+s no ligamento periodontal (seta verde). H- Osso alveolar evidenciando marcações positivas nos osteócitos (seta preta), osteoblastos (seta roxa) e no capilar (seta laranja). I- Células IdU+s de morfologia alongada na medula óssea (seta azul). Aumentos: A (25x); B (100x); C, D, E, F, G, H, I (400x).

5.2.2.2 Grupo *in vivo* exposição (GIVE) – IdU

Os locais de marcação com IdU foram semelhantes em todos os períodos, a diferença principal esteve no número de células marcadas por período e na intensidade das mesmas. Assim, com 2 dias o número de células positivas foi aproximadamente duas vezes maior se comparado com o período de 4 dias e aproximadamente 4 vezes maior se comparado com o período de 8 dias. Quanto a intensidade, os períodos de 2 e 4 dias mostraram intensa marcação, enquanto o período de 8 dias mostrou uma marcação fraca. Quanto a localização, as células positivas estiveram sempre próximas da lesão pulpar (Fig. 17 B). Ao redor da lesão era comum observar vasos dilatados de diversos calibres com células positivas nas paredes (Fig. 17 D). Além disso, células soltas no tecido, sempre muito próximas a vasos, foram constantemente encontradas. Da mesma forma, embora com menor frequência, feixes vâsculo-nervosos apresentavam células de Schwann IdU⁺. Quando presente, a osteodentina mostrava células positivas na periferia.

Figura 17 – Expressão da proteína Iododeoxiuridina (IdU) no grupo in vivo exposição (GIVE). A- O GIVE com 2 dias evidenciando a lesão pulpar (seta preta). B- Área adjacente à lesão, onde observamos células perivasculares IdU+s em volta de pequenos capilares (cabeça de seta azul), da mesma forma, células espalhadas no tecido vinculadas à vasos (cabeça de seta vermelha) ou no meio do infiltrado inflamatório e na parede de vasos de maior calibre (cabeça de seta amarela). Quadro preto em detalhe ao lado, célula IdU+ em mitose (cabeça de seta verde). C- Área de destruição tecidual mostrando três feixes nervosos com células perineurais (células de Schwann) (seta azul) e células perivasculares (cabeça de seta verde) todas IdU+s. D- Cúspide distal, com infiltrado inflamatório e células perivasculares (cabeça de seta amarela e azul) IdU+s. Células IdU+se disseminadas no tecido, algumas próximas a vasos e outras contíguas ao infiltrado inflamatório (cabeça de seta vermelha). Distante na camada odontoblástica um único odontoblasto IdU+ (seta preta). E- GIVE com 4 dias, área adjacente à lesão mostrando o feixe nervoso com células perineurais (células de Schwann) IdU+s (seta azul), duas células soltas muito próximas de vasos (cabeça de seta vermelha) e uma célula perivascular IdU+ (cabeça de seta amarela). F- GIVE com 8 dias, campo próximo da lesão, exibindo somente duas células IdU+s espalhadas no tecido, ambas próximas de vasos ou capilares (cabeça de seta vermelha) e adjacente ao infiltrado inflamatório. Não foi encontrada marcação na osteodentina (seta preta). Aumentos: A (25x); B, C, D, E, F (400x).

5.2.2.3 Grupo in vivo controle (GIVC) – CD90

Para a proteína de membrana CD90, foi evidente a intensa marcação nas cúspides dos molares, mais precisamente na camada subodontoblástica, abrangendo a zona acelular (ZA) e parte da zona rica em células (ZRC) parecendo formar uma rede/plexos de microcapilares/nervos associados a fibroblastos e fibras colágenas (Fig. 17 B). Na polpa central, observou-se feixes vâsculo-nervosos em cortes transversais e longitudinais mostrando em seu interior células perineurais (células de Schwann/ axônios) CD90+ além disso, pericitos em volta de capilares mostraram-se positivos para CD90 (Fig. 17 C). Não houve célula marcada que não estivesse associada a estas estruturas. Da mesma forma que no marcador anterior, os períodos

de 2 e 4 dias exibiram maior intensidade de marcação, enquanto que com 8 dias todas as marcações ficaram fracas. Uma característica das células positivas achadas foi o reduzido tamanho que apresentavam se comparadas com as IdU+ por exemplo. Outros locais de marcação foram o epitélio gengival, ligamento periodontal e osso alveolar (Fig. 17 G, H, I).

Figura 17 – Expressão da proteína CD90 no grupo *in vivo* controle (GIVC). A- Em menor aumento, observam-se as marcações de CD90 nas cúspides dos molares hígidos (seta preta) e algumas estruturas no interior da polpa. B- Quadro preto em detalhe, mostrando a cúspide central apresentando uma rede formada por plexos capilares e fibras nervosas na camada subodontoblástica (cabeça de seta azul) positivos para CD90. Também é possível observar alguns prolongamentos odontoblásticos no interior dos túbulos CD90+ (seta preta). Quadro preto mostrando maior detalhe do plexo de capilares. C- Feixe neural visto longitudinalmente, mostrando células perineurais (célula de Schwann/ axônio) CD90+ (seta azul), não foi observada positividade para CD90 na osteodentina (seta preta). D- Na polpa central, feixes vâsculo-nervosos CD90+ (seta azul) e ao redor pericitos também positivos (cabeça de seta azul). E- Quadro preto em detalhe mostrando, provavelmente, células de Schwann CD90+ (seta preta), e pequeníssimos capilares entre os feixes, todos CD90+ (cabeça de seta azul). F- Epitélio gengival mostrando, na lâmina própria, células perivasculars CD90+ (cabeça de seta azul). G- Papila interdental evidenciando pericitos CD90+ na parede de capilares (cabeça de seta azul) entre as fibras colágenas do ligamento periodontal. H- Células perivasculars CD90+ (cabeça de seta amarela) na parede do vaso sanguíneo percorrendo entre as fibras colágenas do ligamento periodontal. I- Osso alveolar, mostrando células da parede vascular de vasos de diferentes calibres positivas para CD90 (seta azul). Aumentos: A (100x); B, C, D, F, G, H, I (400x).

5.2.2.4 Grupo in vivo exposição (GIVE) - CD90

Nos grupos com exposição pulpar (GIVE) os locais de marcação foram semelhantes em todos os períodos. Quanto ao número de células marcadas, o período de 2 dias teve quase 1,5x vezes mais células positivas se comparada com 4 dias. Os períodos de 4 e 8 dias tiveram números semelhantes. Como em todas as proteínas anteriores, a maior intensidade ficou nos períodos de 2 e 4 dias diminuindo consideravelmente com 8 dias. Os principais locais de marcação estiveram ao redor da lesão, em células perivasculares de vasos de diferentes calibres (capilares, veias e artérias) (Fig. 18 B, E), e menos frequente em feixes vâsculo-nervosos (Fig. 18 C). O tamanho reduzido das células positivas foi novamente uma característica presente.

Figura 18 – Expressão da proteína CD90 no grupo *in vivo* exposição (GIVE). A- Menor aumento mostrando a lesão tecidual na polpa (seta preta). B- Grupo GIVE com 2 dias, área adjacente à lesão, com infiltrado polimorfonuclear cercado por vasos congestionados e áreas de hemorragia (seta preta). Além disso, observamos células perivasculares em vasos de diferentes calibres (veia- cabeça de seta amarela), (capilares- cabeça de seta azul) CD90+ espalhados pelo tecido; quadro preto mostra em maior aumento o detalhe do quadro amarelo mostrando parede capilar com células CD90+ (linha pontilhada azul). C- Detalhe do quadro vermelho em B, evidenciando células perineurais CD90+ no feixe vículo-nervoso (célula de Schwann) (cabeça de seta verde) junto de capilares (cabeça de seta azul) também positivos. D- Grupo GIVE com 4 dias, campo adjacente à lesão apresentando dilatação e congestão vascular, dentre os vasos notam-se células perivasculares CD90+ (veias- cabeça de seta amarela) (capilares- cabeça de seta azul). Observamos também a presença de osteodentina que foi negativa para este marcador (seta preta). E- Região radicular mostrando a intensa marcação na parede vascular de vasos de variados calibres (veias- cabeça de seta amarela) (capilares- cabeça de seta azul). F- GIVE com 8 dias, área próxima à lesão exibindo a típica dilatação e congestão vascular onde se evidenciam pequenos capilares com células CD90+ (cabeça de seta azul) na camada subodontoblástica. G- Outra área adjacente à lesão onde observa-se um vaso muito dilatado e congesto (seta preta) e ao lado pequenos vasos com células perivasculares CD90+ (cabeça de seta amarela). H- Maior aumento do quadro amarelo em G, evidenciando células da parede vascular CD90+ (seta amarela). I- Maior aumento do Quadro vermelho em G mostrando, na parede do vaso, células perivasculares CD90+ (seta amarela). Aumentos: A (100x); B, D, E, F e G (400x).

5.2.2.5 Grupo *in vivo* controle (GIVC) - NG2

A proteína de membrana NG2, mostrou escassos locais de marcação. Algumas membranas de odontoblastos e seus prolongamentos entrando na pré-dentina foram positivos. Estes podiam foram localizados nas cúspides ou na base da câmara pulpar coincidentemente sempre na área se estava formando matriz dentinária. Na camada subodontoblástica, foram encontrados pericitos NG2+ em torno de pequenos capilares (pequeníssimas células semelhantes em tamanho às CD90+) (Fig. 19 B). No centro da polpa, o feixe vâsculo-nervoso exibiu células NG2+ na parede dos capilares que permeiavam o feixe (Fig. 19 D) da mesma forma, alguns dentes apresentaram osteodentina com células NG2+ na periferia (Fig. 19 G). Na porção radicular da polpa também foram visualizadas células NG2+ na parede de vasos de maior calibre (Fig. 19 F1-F2). Foi encontrada marcação positiva somente nos períodos de 2 e 4 dias. Outros locais de intensas marcações foram o epitélio e o ligamento periodontal, como mostrado na figura 19 H, I.

Figura 19 – Expressão da proteína NG2, no grupo *in vivo* controle (GIVC). A- Mostra áreas com odontoblastos NG2+ (seta preta). B- Em maior detalhe, a membrana de odontoblastos NG2+ e seus prolongamentos entrando nos túbulos (seta preta) são mais evidentes nas cúspides. Quadro preto em detalhe, mostra pequenos pericitos NG2+ (cabeça de seta amarela) na parede de microcapilares na ZRC. C- Odontoblastos na base da câmara pulpar com membrana e prolongamentos NG2+ (seta preta) nas áreas correspondentes a marcação aprecia-se a formação de matriz dentinária (circulo azul). Quadro preto em maior aumento, a membrana e o citoplasma dos odontoblastos positivos para NG2. D- Centro da polpa, mostrando pericitos NG2+ na parede vascular de capilares (cabeça de seta azul). Em detalhe quadro amarelo, no quadro preto, evidenciando pequeníssimos pericitos NG2+ nos capilares que permeiam o feixe nervoso (seta azul). E- Área radicular, mostrando também odontoblastos radiculares NG2+ (seta preta). F-1- Aumento do quadro amarelo em E, evidenciando pequenas células endoteliais NG2+ na parede do vaso (cabeça de seta amarela). F-2- Aumento do quadro vermelho em E, mostrando pequenos pericitos NG2+ no feixe nervoso (cabeça de seta azul). G- Osteodentina onde distinguimos dois tipos de células, umas com núcleo maior e membrana/citoplasma NG2+ na periferia e no centro da estrutura (seta vermelha) e as outras também com membrana/citoplasma NG2+ (seta verde) localizadas na periferia e com tamanho muito menor. H- Células da camada basal do epitélio gengival positivas para NG2 (seta preta). I- Osteoblastos (seta preta) e osteócitos (seta amarela) NG2+. LP = ligamento periodontal. OA = osso alveolar. Aumentos: A (100x); B, C, D, E, G e H (400x); I (1000x).

5.2.2.6 Grupo *in vivo* exposição (GIVE) - NG2

Grupos com exposição pulpar (GIVE) evidenciaram locais de marcação similares entre os períodos. Somente os períodos experimentais de 2 e 4 dias foram reativos para a proteína NG2. No que refere-se ao número de células, o período de 2 dias teve 3 vezes mais células positivas se comparada com o período de 4 dias. As áreas de marcação mais comuns estiveram ao redor da lesão, em células perivasculares (pericitos) em pequenos capilares, vasos de diferente calibre (vênulas, arteríolas) e feixes vículo-nervosos. Além disso, células da camada odontoblástica, foram positivas para NG2 em locais onde presumivelmente estavam formando matriz (Fig. 20 B, I). Distinguimos dois tipos de células positivas para NG2, as de tamanho similar às IdU+ e as de tamanho menor, similar às células CD90+ (Fig. 20 C, E). Estas células encontravam-se presentes tanto nos pequenos vasos como nos feixes vículo-nervosos. Quando presente na polpa, a osteodentina mostrava células pequenas positivas para NG2 na periferia (Fig. 20 I).

Figura 20 – Expressão da proteína NG2, no grupo *in vivo* exposição (GIVE). A- Visão geral da lesão pulpar oclusal (seta preta). B- GIVE com 2 dias, campo adjacente à lesão, que evidencia múltiplos microcapilares NG2+ na camada subodontoblástica (círculo pontilhado azul); ao lado, um capilar mostrando pericitos NG2+ em torno da parede (cabeça de seta amarela) e feixe vâsculo-nervoso mostrando pequeníssimos capilares NG2+ (seta azul); região com odontoblastos positivos para NG2 na base da câmara pulpar (seta preta). C- Quadro amarelo em B em maior aumento, exibindo parte de feixe com pequenos capilares (seta azul) e capilares de maior calibre (seta verde) todos NG2+. D- Área com congestão vascular, próxima da lesão que mostra células perivasculares NG2+, na parede interna de vênulas (cabeça de seta amarela), ao lado um feixe vâsculo-nervoso (corte transversal) mostrando duas pequenas células NG2+ na parede da arteríola (cabeça de seta verde). E- Quadro amarelo em D em detalhe, exibindo capilares NG2+ (seta verde) entre as fibras nervosas. F- área próxima à lesão com vasodilatação, mostrando duas células NG2 positivas na parede da vênula (células endoteliais) (cabeça de seta amarela), adjacente ao que parece ser o início da formação de osteodentina, células NG2+ com núcleo volumoso, arredondado e arranjadas em forma de racemo ou cacho de uva, formando matriz (seta vermelha). G- Polpa radicular, mostrando intensa marcação nos odontoblastos radiculares e seus prolongamentos entrando nos túbulos (seta preta), assim como nos feixes nervosos evidenciando células de Schwann com membrana NG2+ (seta azul). Células perivasculares NG2+ na parede de veias (cabeça de seta amarela). H- GIVE com 4 dias, polpa central adjacente à lesão, mostrando alguns odontoblastos NG2+ (seta preta) próximo às pequenas vênulas com células perivasculares NG2+ (cabeça de seta amarela). I- Outra área adjacente à lesão, mostrando vênulas com células perivasculares NG2+ (cabeça de seta amarela) ao lado osteodentina com células NG2+ na periferia (seta verde) e na base da câmara pulpar observamos intensa marcação na membrana e citoplasma de alguns odontoblastos (seta preta) precisamente formando matriz dentinária (círculo pontilhado azul). Aumentos: A (100x); B, D, F, G, H e I (400x).

5.2.2.7 Quadro resumo das marcações em molares animais

Quadro 2 - Resumo das marcações em molares animais

Grupo	BrdU (nuclear)			CD90 (membrana e citoplasma)			NG2 (membrana e citoplasma)	
	2d	4d	8d	2d	4d	8d	2d	4d
GIVC	<p>Corno pulpar: alguns odontoblastos na camada odontoblástica.</p> <p>Camada subodontoblástica: células perivasculares (capilares, veias, artérias) na ZRC.</p> <p>Polpa central: células perivasculares (capilares, veias, artérias); células perineurais (cél. de Schwann) em FVNs.</p> <p>Células soltas no tecido próximas de vasos/ osteodentina</p> <p>Base da câmara pulpar: odontoblastos</p> <p>Raiz: células endoteliais na parede de vasos sanguíneos.</p>			<p>Cúspides molares/ camada subodontoblástica: rede/plexos de microcapilares, fibroblastos.</p> <p>Polpa central: células perivasculares (capilares, veias, artérias), células perineurais (cél. de Schwann e axônio) em FVNs.</p> <p>Células de tamanho reduzido.</p>			<p>Algumas membranas/citoplasma de odontoblastos nas cúspides ou na base da câmara pulpar (área que formava matriz).</p> <p>Pericitos em torno de capilares na ZRC</p> <p>Polpa central: células perivasculares (microcapilares entre as fibras nervosas) em FVNs.</p> <p>Osteodentina (células + na periferia)</p> <p>Raiz: células endoteliais na parede de veias.</p> <p>Células de tamanho reduzido.</p>	
GIVE	<p>Ao redor da lesão: células perivasculares (capilares).</p> <p>Células soltas no tecido perto de vasos e do infiltrado inflamatório.</p> <p>Células perineurais (cél. de Schwann) nos FVNs ; células perivasculares (artéria, veia).</p>			<p>Ao redor da lesão: células perivasculares (capilares, artérias, veias).</p> <p>Células perineurais (cél. Schwann/ axônio) em FVNs.</p> <p>Raiz: células endoteliais na parede de veias.</p> <p>Células de tamanho reduzido.</p>			<p>Ao redor da lesão: camada odontoblástica</p> <p>base da câmara pulpar: membrana/citoplasma de odontoblastos, que formavam matriz.</p> <p>Células perivasculares (capilares, veias e artérias).</p> <p>Membrana da célula neural nos FVNs.</p> <p>Osteodentina (células + na periferia)</p> <p>Células de tamanho reduzido.</p>	

Legenda: GIVC, grupo in vivo controle, sem exposição pulpar. GIVE, grupo in vivo com exposição pulpar. ZRC, zona rica em células. FVNs, feixes vâsculo-nervosos.

5.2.2.8 Percentual de células imunomarcadas para cada proteína alvo em molares animais

Expressão de IdU em molares de ratos

Os dados numéricos e estatísticos (Tabela 10) obtidos para o marcador de proliferação celular IdU mostraram que não houveram diferenças significativas entre os períodos experimentais dentro de um mesmo grupo para GIVE ($p = 0.18$) e para o GIVC ($p = 0.12$). Também não houve diferenças estatísticas comparando os GIVE e GIVC nos diferentes períodos (2, 4 dias $p = 1.00$ e 8 dias $p = 0.40$).

Tabela 10 – Dados estatísticos obtidos para o percentual de células marcadas para IdU (%) para os grupos GIVE e GIVC nos diferentes períodos experimentais.

Percentual de células marcadas para IdU					
Grupo Experimental	Dados estatísticos	Períodos experimentais			Kruskal Wallis (p)
		2 dias	4 dias	8 dias	
GIVE	Média	8.36	4.74	2.83	$p = 0.18$
	DP	3.81	2.24	0.17	
	Mediana	9.66	4.89	2.82	
	Variação	2.78 – 11.33	2.29 – 6.92	2.66- 3.01	
GIVC	Média	8.80	4.25	4.35	$p = 0.12$
	DP	4.49	1.68	1.39	
	Mediana	7.62	3.65	4.45	
	Variação	5.25 – 14.73	2.96 – 6.72	2.59- 5.90	
	Mann Whitney (p)	$p = 1.00$	$p = 1.00$	$p = 0.40$	

Expressão de CD90 em molares de ratos

Os dados numéricos e estatísticos (Tabela 11) obtidos para o marcador de membrana CD90 mostraram que não houve diferenças significativas entre os períodos experimentais dentro de um mesmo grupo GIVE ($p = 0.39$) e GIVC ($p = 0.33$), ou comparando os grupos entre si em cada período (2 dias $p = 0.40$; 4 dias $p = 0.22$; 8 dias $p = 0.11$).

Tabela 11 – Dados estatísticos obtidos para o percentual de células marcadas para CD90 (%) para os grupos IVE e IVC nos diferentes períodos experimentais.

Percentual de células marcadas para CD90					
Grupo Experimental	Dados estatísticos	Períodos experimentais			Kruskal Wallis (p)
		2 dias	4 dias	8 dias	
GIVE	Média	6.49	4.32	3.52	$p = 0.39$
	DP	3.34	1.61	1.01	
	Mediana	6.32	3.80	3.25	
	Variação	3.23 - 9.92	3.04 - 6.14	2.67 - 4.64	
GIVC	Média	9.90	6.86	5.94	$p = 0.33$
	DP	4.85	3.07	1.65	
	Mediana	10.39	6.52	6.25	
	Variação	3.85 - 14.99	3.94 - 10.48	3.67 - 7.59	
	Mann Whitney (p)	$p = 0.40$	$p = 0.22$	$p = 0.11$	

Expressão de NG2 em molaes de ratos

Os dados numéricos e estatísticos (Tabela 12) obtidos para o marcador de membrana NG2 mostraram que houve diferenças significativas entre os períodos experimentais para grupo GIVC ($p = 0.02$). Comparando os grupos entre si, houve também diferença estatística entre GIVE e GIVC aos 2 dias ($p = 0.02$).

Tabela 12 – Dados estatísticos obtidos para o percentual de células marcadas para NG2 (%) para os grupos IVE e IVC nos diferentes períodos experimentais.

Percentual de células marcadas para NG2					
Grupo Experimental	Dados estatísticos	Períodos experimentais			Mann Whitney (p)
		2 dias	4 dias	8 dias	
GIVE	Média	10.46	3.22	-	$p = 0.05$
	DP	4.96	1.47		
	Mediana	9.24	2.71		
	Variação	6.02 - 17.34	2.06 - 4.87		
GIVC	Média	2.64	4.58	-	$p = 0.02$
	DP	0.42	0.78		
	Mediana	2.70	4.54		
	Variação	2.13 - 3.04	3.80 - 5.44		
	Mann Whitney (p)	$p = 0.02$	$p = 0.22$		

5.2.2.9 Gráficos estatísticos

Para compararmos os resultados de forma simples, realizamos gráficos dos dados numéricos obtidos para cada marcador, como mostrado nas figuras 6.8.4 e 6.8.5.

Gráfico 4 – Porcentagem da expressão das diferentes proteínas utilizadas em tecido pulpar animal nos grupos in vivo exposição (GIVE) e grupo in vivo controle (GIVC).

Gráfico 5 – Comparação das porcentagens expressas pelas diferentes proteínas utilizadas em tecido pulpar animal nos GIVC e GIVE.

5.2.2.10 Desenho esquemático das marcações encontradas em molares de ratos

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

As células-tronco adultas permanecem em estado quiescente, praticamente em repouso, ativadas apenas para manter a homeostase do tecido em condições normais, ao contrario, após à injúria ou estresse são mobilizadas e proliferam intensamente para reparar os efeitos da lesão (KURTH et al., 2011; ISHIKAWA et al., 2012). As células-tronco de polpa dental respondem à injúria estimulando a proliferação e diferenciação de odontoblastos (PANG et al., 2016). Embora alguns mecanismos do reparo tecidual já terem sido descobertos, ainda temos muitas dúvidas sobre a participação de células-tronco neste complexo processo. Conhecer os mecanismos que controlam o comportamento destas células para o reparo tecidual nos ajudarão a aprender a desenvolver melhores formas de induzir o processo de reparo e regeneração tecidual.

Nosso objetivo foi estudar a localização e composição de nichos das células-tronco da polpa dental frente à resposta à injúria através da exposição pulpar e cultivo de dentes humanos e por ensaios *in vivo* de dentes de ratos, através da técnica de incorporação de BrdU e IdU para localizar células de ciclagem celular lenta (supostas células-tronco) que co-expressavam marcadores também identificados em células-tronco mesenquimais (CD90, CD146, PDGFr β e NG2).

Para atingir nosso objetivo utilizamos duas metodologias, a cultura organotípica de molares humanos e a experimentação animal *in vivo*. A cultura de órgão, também chamada de cultura *ex vivo* ou *in situ*, consiste em cultivar órgãos inteiros (na maioria das vezes em estado embrionário) ou fragmentos de órgãos (órgãos adultos) conservando dessa forma, a arquitetura do tecido e sua atividade funcional (GANGAL, 2010). A cultura de órgão é bem estabelecida como metodologia de pesquisa na área médica, para estudar áreas de desenvolvimento, condições fisiológicas e patológicas. Exemplos de cultura de órgãos são: cultura de retina (MORITOH et al., 2010; ENGELSBERG; GHOSH, 2011) (THANGARAJ et al., 2011) de sistema nervoso central (ZHANG et al., 2011), de fígado (BAPTISTA et al., 2011), de tecido ósseo (PAPADIMITROPOULOS et al., 2011) entre outras.

Em relação a tecidos orofaciais, é possível realizar cultura de fatias de tecidos duros, moles ou ambos (MAGLOIRE et al., 1996), cultura de dentes inteiros (TECLES et al., 2005) (TECLES et al., 2008), de metades de dentes (IDA-YONEMOCHI et al., 2014), de germe

dentário (SUN et al., 2014), cultura de várias estruturas dentais juntas (fragmentos de dente, ligamento periodontal e osso) (CHOKECHANACHAISAKUL et al., 2012; MOORE et al., 2015), e cultura de esferoides organotípicos (3D) (SHIN et al., 2017). Esse tipo de cultivo tecidual é bastante útil para explorar mecanismos como a odontogênese, dentinogênese (MAGLOIRE et al., 1996), proliferação e diferenciação celular, mecanismos de reparo tecidual, engenharia tecidual, regeneração (SLOAN; LYNCH, 2012) assim como, biocompatibilidade e citotoxicidade de materiais dentais (MURRAY et al., 2000).

Pelo fato de reproduzir muitas das condições teciduais *in vivo*, a cultura organotípica permite melhor entendimento do microambiente onde células e tecidos dividem o mesmo arranjo espacial, sem alguma influência sistêmica proveniente da inflamação (SLOAN; LYNCH, 2012). Além disso, permite a análise do comportamento celular complexo, respostas celulares e moleculares (COLOMBO et al., 2015), estabelecendo assim, uma ponte entre a cultura de células padrão (2D) e modelos animais *in vivo* (GRIFFITH et al., 2006; YAMADA; CUKIERMAN, 2007). Um fato importante é que o desenvolvimento de modelos de cultura *ex vivo*, que reduz significativamente o uso de animais necessários para experimentação (CHOKECHANACHAISAKUL et al., 2012), seguindo a tendência atual de reduzir ao máximo o número de animais ou substituí-los por outros métodos de pesquisa NC3Rs ([2014?]).

Em nosso estudo, a cultura do órgão dentário permitiu manter, por certo período, integridade estrutural e parcialmente a integridade funcional do nicho ou nichos de células-tronco *in situ*, assim como, conservou a interação célula-célula e célula-matriz extracelular. Sabe-se que a matriz dentinária, preservada na cultura organotípica, possui uma reserva de moléculas bioativas (SMITH et al., 2012) funcionando como um disco rígido biológico (AUSTIN et al., 2013), capaz de direcionar o reparo tecidual. Assim, a manutenção do íntimo contato da matriz dentinária com os odontoblastos é essencial para a manutenção da morfologia fenotípica e atividade secretória dessas células (HEYWOOD; APPLETON, 1984). Essa manutenção morfológica e funcional permite a liberação de fatores de crescimento que sinalizam para a mobilização e proliferação celular simulando o que acontece *in vivo*.

Estudos anteriores realizados usando a mesma metodologia de cultura organotípica demonstraram que células progenitoras perivasculares BrdU positivas podem ser ativadas em resposta à lesão dos odontoblastos e podem migrar ao local da injúria após exposição pulpar, fato que não acontece em cavidades limitadas à dentina sem exposição pulpar (TECLES et al.,

2005). Mobilização e proliferação celular também foram observadas a partir de locais pericapilares em tecido conjuntivo de diversas origens em cultura 3D com hidrogel (CHOI et al., 2012).

Uma limitação do método de cultura organotípica é manter a viabilidade celular através do tempo. Os dentes humanos em cultura organotípica analisados em nosso estudo apresentaram degeneração tecidual a partir de 5 dias de cultivo. Em geral, em modelos de cultura de órgão, o tempo de cultivo tem que ser curto e vai depender do tipo de tecido e das condições de cultura. Via de regra de 0 até 14 dias (SLOAN et al., 1998; CHOKECHANACHAISAKUL et al., 2012; IDA-YONEMOCHI et al., 2014) embora, existem relatos de 21 dias (SMITH et al., 2010) e 28 dias (TECLES et al., 2005).

No caso específico do tecido pulpar que está envolvido entre paredes rígidas que dificultam a nutrição, a preservação da morfologia tecidual é ainda mais difícil (CHOKECHANACHAISAKUL et al., 2012). O órgão que foi removido do tecido natural tem a desvantagem de perder o suprimento de oxigênio, nutrientes e outros fatores necessários para atividade funcional promovida pelo suprimento sanguíneo (GANGAL, 2010). De forma similar, as células podem ser estressadas pelo baixo pH, fato que pode influenciar na resposta geral ao estímulo e à resposta inflamatória (TECLES et al., 2008). Em nosso estudo, conseguimos em parte manter a viabilidade celular gotejando meio de cultura pela cavidade realizada na superfície oclusal dos dentes, adicionalmente à nutrição do meio de cultivo pela porção radicular do dente; levando assim, nutrição ao tecido pulpar.

A difusão de nutrientes no meio de cultura não é eficiente na porção central do órgão em cultura culminando muitas vezes em necrose nessa área (GANGAL, 2010). Em culturas esferoidais (3D), células que proliferam são encontradas principalmente na zona periférica enquanto células apoptóticas e hipóxicas estão no centro (core zone). No entanto, sabe-se que em condições hipóxicas a manutenção do estado de indiferenciação (ou “stemness”) das células-tronco é facilitada (YAMAMOTO et al., 2014).

Nossos resultados mostraram que em cultura organotípica de dentes humanos hígidos, a expressão de BrdU foi escassa e a porcentagem de células positivas diminuiu de acordo com o tempo de cultivo. As estruturas marcadas corresponderam às células perivasculares e células de feixes vasculho-nervosos (FVNs) localizados na camada sub-odontoblástica e na polpa central. A baixa expressão está associada provavelmente a pouca atividade celular dessa região, que ocorre somente para manutenção da homeostase. Adicionalmente, com o passar

do tempo em cultura era possível observar autólise celular em consequência da falta de nutrição. Em humanos, sabe-se que a bromodeoxiuridina é um radiosensibilizante e por vezes pacientes que apresentam neoplasias e que necessitam de irradiação recebem aplicações.

Pesquisas com metodologia similar a nossa mostraram resultados semelhantes e marcação perivascular nas mesmas regiões (sub-odontoblástica e polpa central) de células BrdU positivas (MAGLOIRE et al., 1996). Há também estudos que mostraram nenhuma reatividade a proteína BrdU em dentes hígidos ou com cavidades somente em dentina (1 a 3 mm de EDR) (TECLES et al., 2005). Contudo, culturas de tecido conjuntivo frouxo (músculo esquelético, vasos sanguíneos, nervos periféricos e tecido adiposo) mostram também que as LRCs estão localizadas na região perivascular e essas mesmas células co-expressam marcadores de CTMs e de pericitos (CHOI et al., 2012).

Em nossas amostras de dentes com lesão submetidos à cultura organotípica, o número de células marcadas pelo BRdU foi significativamente maior em todos os períodos analisados, 2 dias ($p = 0.03$), 5 dias ($p = 0.01$) e 14 dias ($p = 0.02$). Esse resultado mostra como que a injúria provocou uma migração/mobilização celular no sentido da lesão, semelhante ao que acontece *in vivo*. Como anteriormente descrito, as estruturas reativas para a proteína BrdU foram células perivascular e células de feixes-vasculo nervosos (FVNs). A reatividade foi tornando-se mais intensa imediatamente sob a área de injúria conforme os períodos de cultura avançavam. Formou-se assim, sob a área de injúria, um gradiente positivo de marcação entre os dias 5 e 14. Na polpa central, houve o oposto e as mesmas estruturas foram perdendo intensidade com o tempo de cultura. A marcação por BRdU não é uma técnica quantitativa, mas esse resultado pode sinalizar que não existe somente um maior número de células, mas também pode existir uma maior atividade proteica nessa região sub-odontoblástica. Estudos subsequentes com metodologias específicas para quantificação proteica são necessários.

No entanto, o uso de BrdU para fins de pesquisa diretamente em humanos é proibido pois trata-se de uma substância que é teratogênica (RUFFOLO; FERM, 1965). Assim, o melhor modelo de estudo *in vivo* que dispomos é o uso de roedores. Inúmeras pesquisas utilizam a incorporação de BrdU em animais e em cultura de células com o intuito de marcar DNA sintetizado e rastrear células que retêm a marcação (LRCs, do inglês, label-retaining cells). Acredita-se que as células-tronco adultas se dividem raramente podendo ser visualizadas como LRCs (TUMBAR et al., 2004). *In vivo* as estratégias mais utilizadas para incorporação de BRdU são a injeção intraperitoneal pré e pós-natal em camundongos ou ratos

(ISHIKAWA et al., 2010; ISHIKAWA et al., 2012; SAITO et al., 2013) ou a incorporação dessa substância na água oferecida aos animais (KURTH et al., 2011). Nosso estudo se baseou na segunda estratégia e a Iododeoxiuridina foi fornecida aos animais via oral.

As análises *in vivo* de dentes hígidos mostraram que o número de LRCs é maior na fase imediata após a lesão (2 dias de análise) e que após esse período o número de células positivas se estabiliza (4,25% após 4 dias e 4,35% após 8 dias). Se compararmos esses resultados com a literatura pertinente veremos que em polpas humanas a porcentagem de células em fase S é de apenas 5% (CASASCO et al., 1997), o que sugere que os dentes hígidos quando extraídos e colocados em cultura estão de alguma forma respondendo ao estímulo causado pela extração, mas que eventualmente há a estabilização dessa resposta em torno do quarto dia em cultivo.

Além de células perivasculares e perineurais, as LRCs já foram descritas também em outros locais que incluem a camada odontoblástica (algumas células) e camada subodontoblástica incluindo a ZRC (SAITO et al., 2011). Assim, podemos supor que as LRCs podem ser populações heterogêneas que podem depender das funções e necessidades do tecido onde se encontram.

No nosso modelo de injúria *in vivo* houve exposição pulpar, para igualar as condições dos molares humanos. Nesse caso, as LRCs mostraram números semelhantes aos molares hígidos, com 2 (8,36%) e 4 dias (4,74%) diminuindo progressivamente até os 8 dias (2,83%) sem diferença estatística entre eles ($p = 0,18$). Em trabalhos semelhantes, modelos com injúria pulpar leve/moderada (cavidades com 200 - 300µm de dentina remanescente) também não mostraram diferença estatística no número de LRCs entre todos os períodos avaliados, 1 a 5 dias pós injúria (SAITO et al., 2013). A explicação para a baixa porcentagem de LRCs poderia estar no número de células que foram perdidas (morte celular) durante a exposição pulpar, parte da camada odontoblástica, junto com células que sofreram apoptose logo após o preparo (SAITO et al., 2013) e nos dias subsequentes. Além disso, o próprio processo inflamatório desencadeado provoca necrose em pequenas áreas. Todo este cenário faz com que algumas células que certamente responderiam a uma lesão não sejam contabilizadas.

Assim, de acordo a gravidade da lesão e a sobrevivência das LRCs haverá também diferenças nos tempos da diferenciação de odontoblastos e subsequente reparo do tecido. Após injúria leve as LRCs presentes na camada subodontoblástica primeiro migram e se diferenciam em novos odontoblastos-like sem proliferação para compensar a perda da camada

odontoblástica. Alguns trabalhos conseguem ver o início da diferenciação com 3 a 5 dias pós lesão (HARADA et al., 2008; SAITO et al., 2013). No nosso modelo, 2 dias após a lesão houve intensa marcação de LRCs adjacentes ao local da lesão coincidindo com outros trabalhos (HARADA et al., 2008; SAITO et al., 2013) além de indícios de formação de dentina terciária na camada odontoblástica que não foi afetada pelo preparo cavitário (Fig. 17 F) Nesse período, além de LRCs muito provavelmente havia também células de ciclagem rápida, células progenitoras ou células transientes amplificadas (TACs do inglês *transit amplifying cells*) fazendo parte da resposta rápida do tecido frente à lesão.

Os locais ocupados pelas LRCs adjacentes à lesão, foram principalmente feixes vâsculo-nervosos, mas foi comum observar células espalhadas no tecido muito próximo de vasos, dando a impressão de ter recém-saído dessas estruturas. A localização perivascular/perineural ocorre provavelmente devido aos fenômenos inflamatórios vasculares em resposta a agressão externa. Embora os números de LRCs (porcentagens) sejam semelhantes aos da homeostase o cenário histológico após a lesão era completamente diferente devido a presença de inflamação

Escassa informação é encontrada na literatura sobre a taxa de renovação celular do tecido pulpar. Em polpas humanas híginas (terceiros molares de adultos jovens com rizogênese incompleta) a média de células em fase G0-G1 é de 91%; fase S 5% e fase G2-M 4% mostrando que as células em fase G2-M representam uma porcentagem insignificante e são mais encontradas na polpa radicular onde ainda há desenvolvimento tecidual (CASASCO et al., 1997). Ainda nesse sentido, os odontoblastos são células terminalmente diferenciadas que não proliferam (COUVE; SCHMACHTENBERG, 2011). Em camundongos, que apresentam incisivos que crescem continuamente, odontoblastos e ameloblastos têm uma taxa de renovação de 30 dias (SMITH; WARSHAWSKY, 1975; HARADA et al., 1999). Os camundongos sobrevivem em média 1 ano e, portanto, análises de algumas semanas nesses animais significam proporcionalmente grandes períodos da vida do animal (HARADA et al., 1999)

A expressão individual de proteínas de superfície nos molares humanos em cultura *ex vivo* e nos dentes de animais analisados *in vivo* mostrou que populações de células BrdU/IdU+, CD90+, CD146+, PDGFr β + e NG2+ estão presentes no tecido pulpar hígido e após injúria. A diferença entre estas duas condições esteve primeiramente na localização e na quantidade de células positivas para cada proteína durante os períodos avaliados. Quanto a

intensidade, os períodos de 2 e 5 dias em humanos e, 2 e 4 dias em animais mostraram maior intensidade de marcação, de forma geral. As análises realizadas com esse grupo de marcadores perivasculares nos permitiram ter uma visão mais ampla do comportamento de células de LCRs no tecido pulpar na homeostase tecidual após injúria.

Os resultados da expressão das proteínas avaliadas em tecido pulpar humano mostraram de forma geral, que nos grupos com lesão houve um aumento de células positivas se comparadas com os grupos hígidos no mesmo período sendo esta diferença estatisticamente significativa para CD90 (lesão e centro) e PDGF-receptor β (lesão). Já os resultados dos mesmos marcadores de células perivasculares em tecido pulpar animal, mostraram apenas diferença estatística para o NG2. Nossos resultados não mostraram diferenciação odontoblástica nos tempos analisados. No entanto, alguns trabalhos mostram que essa diferenciação é possível somente em períodos de cultivo mais extensos Maglorie et al. (1986) mostrou que após 21 dias de cultura uma camada de células cuboides em contato com a dentina foi formada e após 30 dias células fusiformes estavam alinhadas com o tecido mineralizado. Já Sloan et al. (1998) sugere que o fenótipo odontoblástico e a viabilidade celular é mantida e demonstrada através da atividade secretória contínua durante os 14 dias de cultura. Da mesma forma, Ida-Yonemochi et al. (2014) mostrou a capacidade de diferenciação das LRCs no processo de reparo pulpar em cultura organotípica. O local onde odontoblastos tinham degenerado, devido a separação do corpo celular dos seus prolongamentos, apresentava-se 7 dias depois no início da cultura células similares à odontoblastos (“odontoblasto-like”) que expressavam também nestina. Os autores afirmam, portanto, que as LRCs localizadas no centro da polpa e associadas a vasos sanguíneos estavam comprometidas com linhagem de odontoblástica.

Nossos resultados tanto em animais quanto em dentes humanos mostraram que a expressão de CD90 ocorre em localização perivascular/perineural onde nichos de células tronco já foram descritos em animais (SHI; GRONTHOS, 2003; YOSHIBA et al., 2012). Alguns trabalhos em tecido pulpar humano mostram que além do CD90 marcadores de células-tronco como o ALDH-1 e STRO-1 também são encontrados em áreas perivasculares e ao longo de feixes nervosos (MACHADO et al., 2016) e ainda descrevem mais especificamente a presença do STRO-1 no perineuro, ao redor do feixe nervoso (SHI; GRONTHOS, 2003; YOSHIBA et al., 2012).

Até o momento o mecanismo pelo qual o CD90 é regulado é parcialmente desconhecido. Sabe-se que a injúria no nervo ciático em ratos jovens, causa um declínio inicial da expressão de CD90 seguido de um aumento nos neurônios ganglionares da raiz dorsal que coincide com a recuperação da função sensorial (CHEN et al., 2005), mesmo decline inicial e aumento posterior foi observado em nosso estudo e nos leva a supor que a maior quantidade de células positivas com o passar do tempo está provavelmente relacionada a diferenciação celular. Assim, o CD90 pode atuar também como um marcador de células já comprometidas com alguma linhagem progenitora (do inglês, *transit amplifying cells*).

Morfologicamente, um fato que chamou a nossa atenção, foi o pequeno tamanho das células que expressavam CD90. Além do tamanho reduzido, notamos também formações de pequeníssimas alças (loops) (que pareciam orelhinhas do Mickey) ao redor de capilares CD90+ próximos do local da injúria. A literatura mostra que em lesões cariosas crônicas existe uma resposta angiogênica caracterizada pela remodelação adaptativa de todos os elementos da barreira-sanguínea (do inglês *blood-barrier*) junto com mudanças perivasculares, como a formação de alças vasculares (loops) originados da microcirculação terminal em proximidade a odontoblastos adjacentes à dentina afetada. Em seguida forma-se uma anastomose entre o loop e vasos adjacentes guiados pela micróglia perivascular aumentando assim, a atividade de síntese dos odontoblastos (FARAHANI et al., 2011) para produzir dentina terciária. Esses loops vasculares pericíticos não estão presentes em polpas hígidas (FARAHANI et al., 2012). No nosso estudo, a formação dos loops não ocorreu adjacente a camada odontoblástica das cúspides pois muitas células foram destruídas durante a lesão, mas ocorreu perto da camada odontoblástica do piso pulpar, como mostrado na Fig. 18 B.

Ainda em relação ao CD90, acredita-se que a população de CTMs de origem dental derivadas de células de Schwann são CD90+ (KAUKUA et al., 2014). Camundongos modificados geneticamente mostram que células de ciclagem lenta CD90+ são responsáveis pelo crescimento do incisivo. Porém, essas células somente contribuem com uma proporção de odontoblastos e células pulpares (ao redor de 10 a 20%) mantendo a correlação com a proporção de células de ciclagem lenta que expressam CD90. Embora, a proteína CD90 seja muito utilizada como marcador de CTMs em cultura, sua expressão é muito mais ampla *in vivo* (SHARPE, 2016). Recentemente, tem-se mostrado que *in vitro* a proteína CD90 controla a diferenciação (osteogênica e adipogênica) das CTMs atuando como um obstáculo na via do

comprometimento para diferenciação (MORAES et al., 2016) reforçando ainda mais o CD90 como marcador de CTMs.

A análise de proteína CD146 mostrou diferenças significativas ($p = 0,01$) nos grupos grupo cultivo controle e dente hígido, sem cultivo, na área lesão em humanos em todos os períodos avaliados (2, 5 e 14 dias). Assim, os valores encontrados no grupo cultivo exposição pulpar (lesão) foram em média 3 a 6 vezes maiores com relação ao grupo HC (sem lesão) o que estaria mostrando uma possível migração de CsT em resposta à injúria produzida (UEDA et al., 2014).

Os resultados observados no estudo *ex vivo* em dentes humanos foi semelhante aos achados e *in vivo* em animais, e corroboram com achados da literatura. Em nossos resultados observamos um aumento na expressão de células CD146+ quando comparado com o grupo controle. A literatura mostra que mesmo com a ausência de componentes vasculares nos dentes humanos, o comportamento do tecido em cultivo pode se assemelhar com o que acontece com polpas inflamadas, sendo observada uma elevada expressão de CD146 quando comparada com polpas sadias (UEDA et al., 2014; LEE et al., 2016). Essa expressão está associada ao incremento da formação de vasos sanguíneos (COVAS et al., 2008).

Os locais de marcação para o CD146 foram semelhantes aos encontrados com a proteína CD90 nos dentes humanos, ou seja, ambos foram encontrados em células perivasculares, ao redor de pequenos capilares, vasos de pequeno calibre e na membrana e prolongamentos de axônios, da célula de Schwann, em FVNs todos presentes próximos à área lesionada. No centro da polpa, a marcação também foi encontrada nas mesmas estruturas, mas de forma aumentada na área próxima à lesão em todos os períodos analisados quando comparado ao grupo sem injúria. Células Gli1+ localizadas próximas de FVNs centradas principalmente em artérias que acompanham as fibras nervosas (ausentes em veias ou capilares), são consideradas CTMs quiescentes que mantêm a homeostase e participam do reparo pós-injúria formando a dentina reparadora. Algumas células CD44+ e CD146+ são Gli1/LRCs+, porém nem todas células Gli1/LRCs+ são positivas para CD44 e CD146, mostrando a diversidade das populações de células LRCs+. Células Gli1+ dão origem a todas as células perivasculares CD146+ e NG2+ em incisivos de camundongos *in vivo* (ZHAO et al., 2014). Outros marcadores como MAP1B (proteína associada a microtubulos 1B) identificada em fibras nervosas e alguns odontoblastos co-localizam com CD146 predominantemente em áreas perivasculares. Isso, associado a maior expressão do RNA

mensageiro de CD146, CD105 e CD166 na polpa coronal ($P < 0.05$) em comparação com outras regiões (polpa radicular, ligamento periodontal) sugere que a polpa coronal possui maior número de células-tronco em comparação com outras regiões (KANEKO et al., 2013). Assim como nosso estudo, muitas outras pesquisas mostram a associação do CD146 com a linhagem perivascular (MIURA et al., 2003). Um exemplo, *in vitro*, são pericitos CD146+/CD34- isolados, que são capazes de formar e manter vasculogênese no matrigel (Blocki et al., 2013).

A literatura referente a marcações de CD146 em células derivadas da glia como as células de Schwann e axônios em tecido pulpar é escassa, mas existem evidências da presença da proteína CD146 como neuroprotetor em outros tecidos e espécies. A superexpressão do CD146 ocorre após 14 dias da lesão do nervo ciático em galinhas (HIROI et al., 2003), e após 7 a 14 dias da injúria no nervo hipoglosso em ratos (LI et al., 1999) e, em zebrafish, após 6 a 11 dias de lesão da medula espinhal (LIU et al., 2016). De forma interessante nossos achados mostraram células perineurais positivas e com a expressão aumentada nas áreas próximas à lesão pulpar de dentes humanos em todos períodos analisados (2, 5 e 14 dias). A inibição de CD146 (MCAM) pode retardar o crescimento *de novo* e a recuperação locomotora na medula espinhal lesionada em zebrafish além de hipo-regular a expressão de fatores relacionados a angiogênese e a inflamação sugerindo que a proteína CD146 tem um papel benéfico na recuperação na lesão da medula espinhal através da promoção e regulação da neurogênese e da angiogênese em zebrafish (LIU et al., 2016), sugerindo a participação de células CD146+ presentes no processo de reparo da polpa como neuroprotetor.

Diferenças significativas de expressão repetiram-se para proteína PDGFR β nas áreas lesão e centro, mostrando mais uma vez a resposta celular no grupo lesado. Assim, nos grupos GCE e GCC (lesão) 2 e 5 dias houve diferenças significativas $p = 0.01$ e $p = 0.02$ respectivamente. Já aos 14 dias, o grupo EPC (lesão) mostrou valores semelhantes a 5 dias, diferente do grupo HC (lesão) que apresentou quase o dobro do valor apresentado com 5 dias. Na área centro, ambos os grupos apresentaram valores semelhantes, exceto o grupo EPC, 14 dias que mostrou 21,9% de células positivas bem mais do que aos 5 dias (13,94%) e mais também do que o grupo HC aos 14 dias (14,93%) mostrando que poderia haver um nicho seja perivascular ou neurovascular no centro da polpa que envia as células para a periferia com o intuito de reparar o tecido lesado, como já relatado em outros trabalhos.

Entre as estruturas positivas para PDGFR β encontramos novamente células

perivasculares (pericitos) em volta de capilares e células de Schwann formando parte dos FVNs na camada subodontoblástica. Sabe-se que o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) é um poderoso fator regulador que inicia quase todos os eventos de cicatrização de feridas. Sendo sua principal função a de estimular a replicação de células-tronco capazes de cicatrização (HELDIN; WESTERMARK, 1999) dessa forma, PDGF parece ter um papel importante na cicatrização e promoção da regeneração de tecidos. Na polpa dental, tem sido sugerida a estreita relação entre PDGF e a diferenciação de odontoblastos durante o processo de reparo e desenvolvimento (NAKASHIMA, 1992; DENHOLM et al., 1998). Mais especificamente a via PDGF-BB/PDGFR β parece ter um papel importante durante a diferenciação terminal de odontoblastos (YOKOSE et al., 2004). *In vivo*, células-tronco de polpa dental humana transduzidas com PDGF-BB incrementam a regulação de marcadores como DMP1, DSPP, ALP e OCN confirmando que o PDGF-BB pode promover a diferenciação odontoblástica (ZHANG et al., 2017). De fato, nosso estudo encontrou expressão do PDGFR β em membranas dos odontoblastos no grupo controle (GC) em humanos.

PDGF-BB também é conhecido como um agente quimiotático (HELDIN; WESTERMARK, 1999; OZAKI et al., 2007) assim, células transfectadas com PDGF-BB secretaram no meio de cultura a proteína PDGF-BB, a qual atuava como fator quimiotático estimulando a migração de hDPSCs através da ativação da via de sinalização PI3K/Akt. A quimiotaxia também foi demonstrada *in vivo*, hDPSCs foram recrutadas nos locais onde estavam as células hDPSC modificadas por PDGF-BB promovendo regeneração do complexo dentino pulpar, *in situ*, em parte devido a indução endógena do homing das células-tronco/progenitoras (ZHANG et al., 2017). É possível que possamos ter observado o efeito quimiotático desta proteína, pois nos grupos EPC, 5 e 14 dias notamos a presença de células fusiformes PDGFR β positivas sob a lesão (Fig. 10 M e P) indicando que migraram para o local após algum tipo de sinalização. A respeito, observamos que justamente houve intensa positividade de PDGFR β na matriz extracelular dos grupos lesados (Fig. 10 L) a qual ia se perdendo conforme se aprofundava no tecido pulpar, mesmo assim, a marcação não foi uniforme para todos os dentes do grupo.

PDGF-BB é reconhecido por promover angiogênese, aumentando a expressão de fatores angiogênicos como VEGF em alguns tipos de células como fibroblastos, células endoteliais vasculares (NAUCK et al., 1997; WANG et al., 1999; GUO et al., 2003) e células pulpares transfectadas com PDGF-BB (ZHANG et al., 2017) sendo assim, a sinalização de

PDGF-B/PDGFR β é necessária para o recrutamento de pericitos durante a angiogênese em diversos órgãos (ENGE et al., 2002; BJARNEGARD et al., 2004). Nosso estudo observou que além de células perivasculares adjacentes à lesão houve muitas células PDGFR β + formando parte de feixes vasculo-nervosos localizadas ao redor da lesão e em áreas mais distantes, como no centro da polpa, que permaneceram intensamente marcadas após 14 dias. Recentemente, tem se descoberto, no incisivo de camundongos, que células localizadas ao redor de arteríolas (células periarteriais) são CTMs que expressam o marcador Glile que são reguladas pelo nicho neurovascular no feixe nervoso (ZHAO et al., 2014).

Sabe-se da importância do papel dos PDGFRs na regeneração de nervos periféricos lesados porém, os mecanismos e vias de sinalização ainda não tem sido bem caracterizados (YAMAZAKI et al., 2009). Experimentos em ratos, provocando lesão de nervos periféricos (ciático) mostraram que PDGFR α e PDGFR β foram ativados nos períodos iniciais da injúria, porém, PDGFR β esteve também abundantemente expresso durante a fase final da injúria (YAMAZAKI et al., 2009). Nosso experimento mostrou resultados semelhantes no que se refere ao grande aumento de células PDGFR β (21,9%) aos 14 dias no grupo lesado localizadas principalmente em células perivasculares e células perineurais ambas nos FVNs.

Não foi possível realizar as marcações com a proteína NG2 em tecido pulpar humano (*ex vivo*). Nos experimentos *in vivo*, numericamente os resultados evidenciaram que houve diferença estatística entre os grupos GIVE e GIVC com 2 dias ($p = 0.02$) demonstrando como na maioria dos marcadores uma rápida resposta à lesão provocada, comparada com o controle. Respeito ao grupo GIVE não houve diferença estatística entre os dias 2 e 4 mas esteve muito perto ($p = 0.05$) pois os valores foram bem diferentes (10,46 vs 3,22%) evidenciando uma queda deste marcador com 4 dias. Suspeitamos que essa diminuição no número pode refletir a parada no ciclo celular em favor da diferenciação necessária nesse momento.

Usualmente a proteína NG2 é utilizada como marcador de pericitos, associada a vasos de pequeno calibre em tecido humano e animal (camundongos e ratos). Sua localização pode mudar conforme o tecido (MURFEE et al., 2005) e os anticorpos anti-NG2 também marcam pericitos *vasa nervorum* (dentro dos feixes nervosos periféricos) (RICHARD et al., 2014).

Assim como observado nos resultados dos outros marcadores, células NG2 positivas foram observadas próximas a lesão sempre em células perivasculares e perineurais. Nossos achados coincidem com os de Zhao et al. (2014) que mostraram que tanto em incisivos como em molares de camundongos células NG2+ foram detectadas ao redor de arteríolas, veias e

capilares na forma de pericitos Após à injúria células NG2+ (pericitos) estiveram ativamente envolvidas na formação de dentina reparadora embora, elas não representam toda a população de odontoblastos-*like* evidenciando que existe uma outra fonte de CTMs de origem não pericítica (FENG et al., 2011).

No grupo hígido, notamos que poucas membranas de odontoblastos e seus prolongamentos foram NG2+ alguns localizados nas pontas das cúspides e outros na base da câmara pulpar. Coincidentemente as mesmas áreas mostravam formação de matriz dentinária (Fig. 19 C). Além disso, observamos a presença de “osteodentina” na região central da polpa (Fig. 19 G) com células de tamanhos diferentes na periferia e no centro todas NG2+. A literatura mostra que são células odontoblastos-*like* secundárias derivadas de pericitos NG2/Nestin (camundongos NG2^{ERT2}Cre/Nestin Cre) que produzem um tipo de dentina restauradora, na ponta do incisivo de camundongo que sofre desgaste contínuo, como mecanismo de regeneração tecidual contínua (PANG et al., 2016).

A literatura também mostra que durante o desenvolvimento de incisivos somente 12% dos odontoblastos são formados a partir de pericitos NG2+ (FENG et al., 2011) e na homeostase células NG2 contribuem principalmente com a vascularização de molares e tem pouca influencia nos odontoblastos e no mesênquima pulpar em camundongos (NG2-Cre;ZsGreen) (ZHAO et al., 2014). Dessa forma explica-se porque nem todos os odontoblastos que observamos foram NG2+.

Durante o embriogenese, células da crista neural (CCN), contribuem para a formação de estruturas das três camadas germinativas, ectoderme, mesoderme e endoderme (DUPIN et al., 2006; PIERRET et al., 2006). Além das CCN uma outra fonte celular tem surgido recentemente como fator chave para a formação de um tecido craniofacial. São as células derivadas da crista neural associadas a nervos ou células gliais associadas a nervos periféricos, também chamadas de células precursoras das células de Schwann (CPCS). Essas células, que residem nos nervos, podem produzir outros tipos celulares e através deste mecanismo participar no desenvolvimento que modela e integra as cavidades cranianas (ADAMEYKO; FRIED, 2016). Na odontogênese, células derivadas das CPCS contribuem com células pulpares e odontoblastos em incisivos de camundongos, com padrão clonal, continuando assim na vida (KAUKUA et al., 2014). Observou-se que a denervação da hemimandíbula seguida da extração de dentes em ciclídeos (peixes que apresentam substituição contínua dos dentes) provocou a falta de regeneração do dente perdido, diferente do que

aconteceu no lado controle, com o nervo intacto (TUISKU; HILDEBRAND, 1994), mostrando assim a ligação que existe entre a inervação periférica e a formação/regeneração de tecidos ou órgãos dentais. Em incisivos de camundongos, uma semana após a denervação a expressão de Sonic hedgehog (Shh) e a atividade de Gli1 diminuíram significativamente no mesênquima. Após um mês o número de LRCs diminuíram significativamente reduzindo assim o número de células que proliferavam. O perfil de transcrição também foi alterado mostrando baixa regulação de Amelogenin (Amg), Enamelin (Enam), Dspp e Dmp envolvidos na diferenciação terminal do esmalte e a dentina, consequentemente, houve também redução na formação de esmalte e dentina (ZHAO et al., 2014).

Assim as CPCS, podem ser componentes importantes do nervo responsáveis pela comunicação entre, o nervo e o tecido innervado durante o reparo e a regeneração (ADAMEYKO; FRIED, 2016). Além disso, estrategicamente as CPCS acompanham os nervos por todo o corpo, podendo servir como fonte de células embrionárias para células gliais e não gliais (KAUCKA et al., 2016) (KAUCKA; ADAMEYKO, 2016). Zhao et al. (2014) demonstrou em modelo de incisivo de camundongo que CTMs estão localizadas ao redor de arteríolas e são sustentadas pelo feixe vâsculo-nervoso que atua como nicho. Os nervos sensitivos do feixe secretam a proteína Shh que ativa a expressão de Gli1 nas células periarteriais que contribuem com todos os derivados do mesênquima. Essas CTMs periarteriais participam tanto na homeostase e no reparo pós-injúria do mesênquima do incisivo *in vivo* e dão origem a toda a população de CTMs *in vitro* (ZHAO et al., 2014).

Em nosso estudo observamos que todas as proteínas que usamos em tecido pulpar humano e animal (CD90, CD146 PDGFR β , e BrdU) estavam expressas ao redor de vasos sanguíneos de diferentes calibres, o que era esperado pois tínhamos focado em marcadores perivasculares (CD90, CD146 e PDGFR β). Inesperadamente observamos expressão também em células do FVN, assim como Zhao et al. (2014) observaram em incisivos de camundongos. Além disso, fomos notando com o avanço dos experimentos que os mesmos marcadores também estavam expressos em diferentes partes do feixe vâsculo-nervoso permanecendo até os 14 dias do experimento com diferentes intensidades.

A marcação descrita em ambos tipos celulares e estruturas poderiam revelar uma origem comum de ambos nichos perivascular e glial. Para ilustrar este fato fizemos um desenho da genealogia/ascendência de pericitos baseado na literatura atual (Figura 21).

Figura 21 - Esquema baseado nos artigos de Blocki et al. (2013); Loibl et al. (2014); Petersen e Adameyko, (2017).

Da mesma forma como acredita-se que os nichos perivasculares apresentem esta localização pela distribuição massiva dos vasos por todo o organismo facilitando a migração de células-tronco para áreas que as necessitam, assim também os nervos periféricos podem ser vistos como estruturas presentes virtualmente em todo o organismo que podem funcionar como nichos. Identificamos em tecido pulpar humano, nichos perivasculares que abrigam CTMs constituídos por células perivasculares. Observamos também nichos gliais, formados pelo tecido conjuntivo frouxo que envolve os feixes e artérias formando o feixe vâsculo-nervoso (FVN) que atua tanto na homeostase e na injúria. Ambos nichos podem funcionar harmonicamente, concordando com os artigos supracitados de Zhao et al. (2014) e Kaukua et al. (2014). Sabendo que a vascularização craniofacial e da polpa dental percorre os mesmos caminhos que os nervos; que vasos e nervos exibem um mecanismo sofisticado de comunicação (LI et al., 2013) e; que no desenvolvimento e na regeneração o sistema que recruta pericitos dos vasos se assemelha ao mecanismo pelo qual células gliais periféricas são mobilizadas a partir de nervos nas mesmas situações (ADAMEYKO; FRIED, 2016) é lógico pensar que este sistema poderia funcionar junto no desenvolvimento e pós-injúria.

Até o presente momento não há estudos mostrando a localização de nichos gliais em tecido pulpar humano, portanto, mostramos aqui a primeira evidência da existência deste nicho, de forma semelhante ao que já existe na literatura em incisivos de camundongos com crescimento contínuo e em ligamento periodontal humano (COURA et al., 2008).

7 Conclusões

7 CONCLUSÕES

- a) O cultivo de dentes humanos demonstra ser uma técnica viável de modelo de estudo 3D da estrutura pulpar, porém sugerimos um tempo de cultivo do órgão menor que 14 dias, devido à degeneração tecidual observada com o decorrer dos períodos analisados.
 - b) Populações de células CD90+, CD146+, PDGFR β +, NG2+ coexistem no tecido pulpar humano e de ratos e constituem populações heterogêneas de células que compõem o nicho perivascular e perineural.
 - c) Todas as proteínas analisadas estavam presentes de forma aumentada nas estruturas perivasculares e perineurais, principalmente na área próxima a área de lesão pulpar.
 - d) A presença de células positivas para cada marcador foi espaço-temporal dependente nos ensaios *in vitro* e *in vivo*, tal e como é esperado nos processos de desenvolvimento e reparo tecidual.
 - e) Foi possível identificar nichos perivasculares e perineurais que participam ativamente da homeostase pulpar e funcionam em conjunto e harmonicamente em resposta a injúria.
-
-

Referências

REFERENCIAS

Abdullah MF, Abdullah SF, Omar NS, Mahmood Z, Fazliah Mohd Noor SN, Kannan TP et al. Proliferation rate of stem cells derived from human dental pulp and identification of differentially expressed genes. *Cell Biol Int* 2014 May;38(5):582-90.

Abe S, Hamada K, Miura M, Yamaguchi S. Neural crest stem cell property of apical pulp cells derived from human developing tooth. *Cell Biol Int* 2012 Oct 1;36(10):927-36.

Adameyko I, Fried K. The Nervous System Orchestrates and Integrates Craniofacial Development: A Review. *Front Physiol* 2016;7:49.

Akpinar G, Kasap M, Aksoy A, Duruksu G, Gacar G, Karaoz E. Phenotypic and proteomic characteristics of human dental pulp derived mesenchymal stem cells from a natal, an exfoliated deciduous, and an impacted third molar tooth. *Stem Cells Int* 2014;2014:457059.

Al-Habib M, Yu Z, Huang GT. Small molecules affect human dental pulp stem cell properties via multiple signaling pathways. *Stem Cells Dev* 2013 Sep 1;22(17):2402-13.

Alongi DJ, Yamaza T, Song Y, Fouad AF, Romberg EE, Shi S *et al.* Stem/progenitor cells from inflamed human dental pulp retain tissue regeneration potential. *Regen Med* 2010 Jul;5(4):617-31.

Alt E, Yan Y, Gehmert S, Song YH, Altman A, Gehmert S *et al.* Fibroblasts share mesenchymal phenotypes with stem cells, but lack their differentiation and colony-forming potential. *Biol Cell* 2011 Apr;103(4):197-208.

Altman J, Das GD. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 1965 Jun;124(3):319-35.

An Z, Sabalic M, Bloomquist RF, Fowler TE, Streelman T, Sharpe PT. A quiescent cell population replenishes mesenchymal stem cells to drive accelerated growth in mouse incisors. *Nat Commun* 2018 Jan 25;9(1):378.

Arminan A, Gandia C, Bartual M, Garcia-Verdugo JM, Lledo E, Mirabet V *et al.* Cardiac differentiation is driven by NKX2.5 and GATA4 nuclear translocation in tissue-specific mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 2009 Jul-Aug;18(6):907-18.

Arthur A, Koblar S, Shi S, Gronthos S. Eph/ephrinB mediate dental pulp stem cell mobilization and function. *J Dent Res* 2009 Sep;88(9):829-34.

Arthur A, Rychkov G, Shi S, Koblar SA, Gronthos S. Adult human dental pulp stem cells differentiate toward functionally active neurons under appropriate environmental cues. *Stem Cells* 2008 Jul;26(7):1787-95.

Austin C, Smith TM, Bradman A, Hinde K, Joannes-Boyau R, Bishop D *et al.* Barium distributions in teeth reveal early-life dietary transitions in primates. *Nature* 2013 Jun 13;498(7453):216-9.

Bakopoulou A, About I. Stem Cells of Dental Origin: Current Research Trends and Key Milestones towards Clinical Application. *Stem Cells Int* 2016;2016:4209891.

Balic A, Aguila HL, Caimano MJ, Francone VP, Mina M. Characterization of stem and progenitor cells in the dental pulp of erupted and unerupted murine molars. *Bone* 2010 Jun;46(6):1639-51.

Balic A, Mina M. Characterization of progenitor cells in pulps of murine incisors. *J Dent Res* 2010 Nov;89(11):1287-92.

Baptista PM, Siddiqui MM, Lozier G, Rodriguez SR, Atala A, Soker S. The use of whole organ decellularization for the generation of a vascularized liver organoid. *Hepatology* 2011 Feb;53(2):604-17.

Bardin N, Anfosso F, Masse JM, Cramer E, Sabatier F, Le Bivic A *et al.* Identification of CD146 as a component of the endothelial junction involved in the control of cell-cell cohesion. *Blood* 2001 Dec 15;98(13):3677-84.

Basciani S, Mariani S, Arizzi M, Ulisse S, Rucci N, Jannini EA *et al.* Expression of platelet-derived growth factor-A (PDGF-A), PDGF-B, and PDGF receptor-alpha and -beta during human testicular development and disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2002 May;87(5):2310-9.

Bjarnegard M, Enge M, Norlin J, Gustafsdottir S, Fredriksson S, Abramsson A *et al.* Endothelium-specific ablation of PDGFB leads to pericyte loss and glomerular, cardiac and placental abnormalities. *Development* 2004 Apr;131(8):1847-57.

Blocki A, Wang Y, Koch M, Peh P, Beyer S, Law P *et al.* Not all MSCs can act as pericytes: functional in vitro assays to distinguish pericytes from other mesenchymal stem cells in angiogenesis. *Stem Cells Dev* 2013 Sep 1;22(17):2347-55.

Boneberg EM, Illges H, Legler DF, Furstenberger G. Soluble CD146 is generated by ectodomain shedding of membrane CD146 in a calcium-induced, matrix metalloprotease-dependent process. *Microvasc Res* 2009 Dec;78(3):325-31.

Bradley JE, Ramirez G, Hagood JS. Roles and regulation of Thy-1, a context-dependent modulator of cell phenotype. *Biofactors* 2009 May-Jun;35(3):258-65.

Braun KM, Niemann C, Jensen UB, Sundberg JP, Silva-Vargas V, Watt FM. Manipulation of stem cell proliferation and lineage commitment: visualisation of label-retaining cells in wholemounts of mouse epidermis. *Development* 2003 Nov;130(21):5241-55.

Braun KM, Watt FM. Epidermal label-retaining cells: background and recent applications. *J Investig Dermatol Symp Proc* 2004 Sep;9(3):196-201.

Brizzi MF, Tarone G, Defilippi P. Extracellular matrix, integrins, and growth factors as tailors of the stem cell niche. *Curr Opin Cell Biol* 2012 Oct;24(5):645-51.

Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 1991 Sep;9(5):641-50.

Casasco A, Casasco M, Calligaro A, Ferrieri G, Brambilla E, Strohmer L *et al.* Cell proliferation in developing human dental pulp. A combined flow cytometric and immunohistochemical study. *Eur J Oral Sci* 1997 Dec;105(6):609-13.

Cavanagh BL, Walker T, Norazit A, Meedeniya AC. Thymidine analogues for tracking DNA synthesis. *Molecules* 2011 Sep 15;16(9):7980-93.

Chen CH, Wang SM, Yang SH, Jeng CJ. Role of Thy-1 in in vivo and in vitro neural development and regeneration of dorsal root ganglionic neurons. *J Cell Biochem* 2005 Mar 1;94(4):684-94.

Choi MY, Kim HI, Yang YI, Kim JT, Jang SH, Park CM *et al.* The isolation and in situ identification of MSCs residing in loose connective tissues using a niche-preserving organ culture system. *Biomaterials* 2012 Jun;33(18):4469-79.

Chokechanachaisakul U, Kaneko T, Yamanaka Y, Okiji T, Suda H. A novel whole tooth-in-jaw-bone culture of rat molars: morphological, immunohistochemical, and laser capture microdissection analysis. *Microsc Res Tech* 2012 Oct;75(10):1341-7.

Coller HA, Sang L, Roberts JM. A new description of cellular quiescence. *PLoS Biol* 2006 Mar;4(3):e83.

Colombo JS, Howard-Jones RA, Young FI, Waddington RJ, Errington RJ, Sloan AJ. A 3D ex vivo mandible slice system for longitudinal culturing of transplanted dental pulp progenitor cells. *Cytometry A* 2015 Oct;87(10):921-8.

Coura GS, Garcez RC, de Aguiar CB, Alvarez-Silva M, Magini RS, Trentin AG. Human periodontal ligament: a niche of neural crest stem cells. *J Periodontol Res* 2008 Oct;43(5):531-6.

Couve E, Schmachtenberg O. Autophagic activity and aging in human odontoblasts. *J Dent Res* 2011 Apr;90(4):523-8.

Covas DT, Panepucci RA, Fontes AM, Silva WA, Jr., Orellana MD, Freitas MC *et al.* Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146⁺ perivascular cells and fibroblasts. *Exp Hematol* 2008 May;36(5):642-54.

d'Aquino R, Graziano A, Sampaolesi M, Laino G, Pirozzi G, De Rosa A *et al.* 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.

Denholm IA, Moule AJ, Bartold PM. The behaviour and proliferation of human dental pulp cell strains in vitro, and their response to the application of platelet-derived growth factor-BB and insulin-like growth factor-1. *Int Endod J* 1998 Jul;31(4):251-8.

Dennis JE, Esterly K, Awadallah A, Parrish CR, Poynter GM, Goltry KL. Clinical-scale expansion of a mixed population of bone-marrow-derived stem and progenitor cells for potential use in bone-tissue regeneration. *Stem Cells* 2007 Oct;25(10):2575-82.

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.

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.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8(4):315-7.

Ducret M, Fabre H, Degoul O, Atzeni G, McGuckin C, Forraz N *et al.* Immunophenotyping Reveals the Diversity of Human Dental Pulp Mesenchymal Stromal Cells In vivo and Their Evolution upon In vitro Amplification. *Front Physiol* 2016;7:512.

Dupin E, Creuzet S, Le Douarin NM. The contribution of the neural crest to the vertebrate body. *Adv Exp Med Biol* 2006;589:96-119.

Eaves CJ, Cashman JD, Sutherland HJ, Otsuka T, Humphries RK, Hogge DE *et al.* Molecular analysis of primitive hematopoietic cell proliferation control mechanisms. *Ann N Y Acad Sci* 1991;628:298-306.

Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I, Akiyama K. Stem cells in dentistry--part I: stem cell sources. *J Prosthodont Res* 2012 Jul;56(3):151-65.

Enge M, Bjarnegard M, Gerhardt H, Gustafsson E, Kalen M, Asker N *et al.* Endothelium-specific platelet-derived growth factor-B ablation mimics diabetic retinopathy. *EMBO J* 2002 Aug 15;21(16):4307-16.

Engelsberg K, Ghosh F. Human retinal development in an in situ whole eye culture system. *Dev Neurosci* 2011;33(2):110-7.

Farahani RM, Sarrafpour B, Simonian M, Li Q, Hunter N. Directed glia-assisted angiogenesis in a mature neurosensory structure: pericytes mediate an adaptive response in human dental pulp that maintains blood-barrier function. *J Comp Neurol* 2012 Dec 1;520(17):3803-26.

Farahani RM, Simonian M, Hunter N. Blueprint of an ancestral neurosensory organ revealed in glial networks in human dental pulp. *J Comp Neurol* 2011 Nov 1;519(16):3306-26.

Feng J, Mantesso A, De Bari C, Nishiyama A, Sharpe PT. Dual origin of mesenchymal stem cells contributing to organ growth and repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011 Apr 19;108(16):6503-8.

Ferraro F, Celso CL, Scadden D. Adult stem cells and their niches. *Adv Exp Med Biol* 2010;695:155-68.

Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation* 1974a Apr;17(4):331-40.

Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakova SF, Luria EA *et al.* Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol* 1974b;2(2):83-92.

Funa K, Uramoto H. Regulatory mechanisms for the expression and activity of platelet-derived growth factor receptor. *Acta Biochim Pol* 2003;50(3):647-58.

Gandia C, Arminan A, Garcia-Verdugo JM, Lledo E, Ruiz A, Minana MD *et al.* Human dental pulp stem cells improve left ventricular function, induce angiogenesis, and reduce infarct size in rats with acute myocardial infarction. *Stem Cells* 2008 Mar;26(3):638-45.

Gangal S. Principles and practice of animal tissue culture. 2.ed. ed. India: Orient Black Swan,; 2010.

Ghaemi SR, Harding FJ, Delalat B, Gronthos S, Voelcker NH. Exploring the mesenchymal stem cell niche using high throughput screening. *Biomaterials* 2013 Oct;34(31):7601-15.

Giuliani A, Manescu A, Langer M, Rustichelli F, Desiderio V, Paino F *et al.* Three years after transplants in human mandibles, histological and in-line holotomography revealed that stem cells regenerated a compact rather than a spongy bone: biological and clinical implications. *Stem Cells Transl Med* 2013 Apr;2(4):316-24.

Gnecchi M, He H, Liang OD, Melo LG, Morello F, Mu H *et al.* Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. *Nat Med* 2005 Apr;11(4):367-8.

Govindasamy V, Ronald VS, Abdullah AN, Nathan KR, Ab Aziz ZA, Abdullah M *et al.* Differentiation of dental pulp stem cells into islet-like aggregates. *J Dent Res* 2011 May;90(5):646-52.

Griffith L, Swartz M, Tranquillo R. Education for careers in tissue engineering and regenerative medicine. *Ann Biomed Eng* 2006 Feb;34(2):265-9.

Gronthos S, Arthur A, Bartold PM, Shi S. A method to isolate and culture expand human dental pulp stem cells. *Methods Mol Biol* 2011;698:107-121.

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

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 5;97(25):13625-30.

Guo P, Hu B, Gu W, Xu L, Wang D, Huang HJ *et al.* Platelet-derived growth factor-B enhances glioma angiogenesis by stimulating vascular endothelial growth factor expression in tumor endothelia and by promoting pericyte recruitment. *Am J Pathol* 2003 Apr;162(4):1083-93.

Haeryfar SM, Hoskin DW. Thy-1: more than a mouse pan-T cell marker. *J Immunol* 2004 Sep 15;173(6):3581-8.

Hagood JS, Prabhakaran P, Kumbla P, Salazar L, MacEwen MW, Barker TH *et al.* Loss of fibroblast Thy-1 expression correlates with lung fibrogenesis. *Am J Pathol* 2005 Aug;167(2):365-79.

Hall PA, Watt FM. Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity. *Development* 1989 Aug;106(4):619-33.

Han J, Okada H, Takai H, Nakayama Y, Maeda T, Ogata Y. Collection and culture of alveolar bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells from older individuals. *J Cell Biochem* 2009 Aug 15;107(6):1198-204.

Harada H, Kettunen P, Jung HS, Mustonen T, Wang YA, Thesleff I. Localization of putative stem cells in dental epithelium and their association with Notch and FGF signaling. *J Cell Biol* 1999 Oct 4;147(1):105-20.

Harada M, Kenmotsu S, Nakasone N, Nakakura-Ohshima K, Ohshima H. Cell dynamics in the pulpal healing process following cavity preparation in rat molars. *Histochem Cell Biol* 2008 Oct;130(4):773-83.

Heldin CH, Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev* 1999 Oct;79(4):1283-316.

Heywood BR, Appleton J. The ultrastructure of the rat incisor odontoblast in organ culture. *Arch Oral Biol* 1984;29(4):327-9.

Hiroi S, Tsukamoto Y, Sasaki F, Miki N, Taira E. Involvement of gicerin, a cell adhesion molecule, in development and regeneration of chick sciatic nerve. *FEBS Lett* 2003 Nov 20;554(3):311-4.

Hosoya A, Hiraga T, Ninomiya T, Yukita A, Yoshiba K, Yoshiba N *et al.* Thy-1-positive cells in the subodontoblastic layer possess high potential to differentiate into hard tissue-forming cells. *Histochem Cell Biol* 2012 Jun;137(6):733-42.

Hsu YC, Fuchs E. A family business: stem cell progeny join the niche to regulate homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012 Jan 23;13(2):103-14.

Huang GT, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res* 2009 Sep;88(9):792-806.

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

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* 2006b May;324(2):225-36.

Ida-Yonemochi H, Nakatomi M, Ohshima H. Establishment of in vitro culture system for evaluating dentin-pulp complex regeneration with special reference to the differentiation capacity of BrdU label-retaining dental pulp cells. *Histochem Cell Biol* 2014 Sep;142(3):323-33.

Ishikawa Y, Ida-Yonemochi H, Nakakura-Ohshima K, Ohshima H. The relationship between cell proliferation and differentiation and mapping of putative dental pulp stem/progenitor cells during mouse molar development by chasing BrdU-labeling. *Cell Tissue Res* 2012 Apr;348(1):95-107.

Ishikawa Y, Ida-Yonemochi H, Suzuki H, Nakakura-Ohshima K, Jung HS, Honda MJ *et al.* Mapping of BrdU label-retaining dental pulp cells in growing teeth and their regenerative capacity after injuries. *Histochem Cell Biol* 2010 Sep;134(3):227-41.

Izumi K, Tobita T, Feinberg SE. Isolation of human oral keratinocyte progenitor/stem cells. *J Dent Res* 2007 Apr;86(4):341-6.

Kaneko T, Arayatrakoollikit U, Yamanaka Y, Ito T, Okiji T. Immunohistochemical and gene expression analysis of stem-cell-associated markers in rat dental pulp. *Cell Tissue Res* 2013 Mar;351(3):425-32.

Kang CM, Kim H, Song JS, Choi BJ, Kim SO, Jung HS *et al.* Genetic Comparison of Stemness of Human Umbilical Cord and Dental Pulp. *Stem Cells Int* 2016;2016:3453890.

Karbanova J, Soukup T, Suchanek J, Pytlik R, Corbeil D, Mokry J. Characterization of dental pulp stem cells from impacted third molars cultured in low serum-containing medium. *Cells Tissues Organs* 2011;193(6):344-65.

Kaucka M, Ivashkin E, Gyllborg D, Zikmund T, Tesarova M, Kaiser J *et al.* Analysis of neural crest-derived clones reveals novel aspects of facial development. *Sci Adv* 2016 Aug;2(8):e1600060.

Kaukua N, Shahidi MK, Konstantinidou C, Dyachuk V, Kaucka M, Furlan A *et al.* Glial origin of mesenchymal stem cells in a tooth model system. *Nature* 2014 Sep 25;513(7519):551-4.

Kemshead JT, Ritter MA, Cotmore SF, Greaves MF. Human Thy-1: expression on the cell surface of neuronal and glial cells. *Brain Res* 1982 Mar 25;236(2):451-61.

Knoblich JA. Mechanisms of asymmetric stem cell division. *Cell* 2008 Feb 22;132(4):583-97.

Kuo TF, Lee SY, Wu HD, Poma M, Wu YW, Yang JC. An in vivo swine study for xenografts of calcium sulfate-based bone grafts with human dental pulp stem cells (hDPSCs). *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2015 May;50:19-23.

Kurth TB, Dell'accio F, Crouch V, Augello A, Sharpe PT, De Bari C. Functional mesenchymal stem cell niches in adult mouse knee joint synovium in vivo. *Arthritis Rheum* 2011 May;63(5):1289-300.

Kwon DY, Kwon JS, Park SH, Park JH, Jang SH, Yin XY *et al.* A computer-designed scaffold for bone regeneration within cranial defect using human dental pulp stem cells. *Sci Rep* 2015 Aug 3;5:12721.

Laino G, d'Aquino R, Graziano A, Lanza V, Carinci F, Naro F *et al.* A new population of human adult dental pulp stem cells: a useful source of living autologous fibrous bone tissue (LAB). *J Bone Miner Res* 2005 Aug;20(8):1394-402.

Lane SW, Williams DA, Watt FM. Modulating the stem cell niche for tissue regeneration. *Nat Biotechnol* 2014 Aug;32(8):795-803.

Lee BK, Choi SJ, Mack D, Oh SH. Isolation of mesenchymal stem cells from the mandibular marrow aspirates. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2011 Dec;112(6):e86-93.

Lee S, Zhang QZ, Karabucak B, Le AD. DPSCs from Inflamed Pulp Modulate Macrophage Function via the TNF-alpha/IDO Axis. *J Dent Res* 2016 Oct;95(11):1274-81.

Lehmann JM, Riethmuller G, Johnson JP. MUC18, a marker of tumor progression in human melanoma, shows sequence similarity to the neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989 Dec;86(24):9891-5.

Li BS, Su QN, Kiyama H, Miki N, Robinow DR, Zhang L. Expression of gicerin, a novel cell adhesion molecule, is upregulated in the astrocytes after hypoglossal nerve injury in rats. *Neurosci Lett* 1999 Feb 5;260(3):149-52.

Li W, Kohara H, Uchida Y, James JM, Soneji K, Cronshaw DG *et al.* Peripheral nerve-derived CXCL12 and VEGF-A regulate the patterning of arterial vessel branching in developing limb skin. *Dev Cell* 2013 Feb 25;24(4):359-71.

Liu CJ, Xie L, Cui C, Chu M, Zhao HD, Yao L *et al.* Beneficial roles of melanoma cell adhesion molecule in spinal cord transection recovery in adult zebrafish. *J Neurochem* 2016 Oct;139(2):187-96.

Loibl M, Binder A, Herrmann M, Duttenehofer F, Richards RG, Nerlich M *et al.* Direct cell-cell contact between mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells induces a pericyte-like phenotype in vitro. *Biomed Res Int* 2014;2014:395781.

Lung HL, Bangarusamy DK, Xie D, Cheung AK, Cheng Y, Kumaran MK *et al.* THY1 is a candidate tumour suppressor gene with decreased expression in metastatic nasopharyngeal carcinoma. *Oncogene* 2005 Sep 29;24(43):6525-32.

Lv FJ, Tuan RS, Cheung KM, Leung VY. Concise review: the surface markers and identity of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2014 Jun;32(6):1408-19.

Machado CV, Passos ST, Campos TM, Bernardi L, Vilas-Boas DS, Nor JE *et al.* The dental pulp stem cell niche based on aldehyde dehydrogenase 1 expression. *Int Endod J* 2016 Aug;49(8):755-63.

Magavi SS, Macklis JD. Identification of newborn cells by BrdU labeling and immunocytochemistry in vivo. *Methods Mol Biol* 2008;438:335-43.

Magloire H, Joffre A, Bleicher F. An in vitro model of human dental pulp repair. *J Dent Res* 1996 Dec;75(12):1971-8.

Malekfar A, Valli KS, Kanafi MM, Bhonde RR. Isolation and Characterization of Human Dental Pulp Stem Cells from Cryopreserved Pulp Tissues Obtained from Teeth with Irreversible Pulpitis. *J Endod* 2016 Jan;42(1):76-81.

Marrelli M, Paduano F, Tatullo M. Cells isolated from human periapical cysts express mesenchymal stem cell-like properties. *Int J Biol Sci* 2013;9(10):1070-8.

Mathieu S, Jeanneau C, Sheibat-Othman N, Kalaji N, Fessi H, About I. Usefulness of controlled release of growth factors in investigating the early events of dentin-pulp regeneration. *J Endod* 2013 Feb;39(2):228-35.

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 13;100(10):5807-12.

Mohyeldin A, Garzon-Muvdi T, Quinones-Hinojosa A. Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche. *Cell Stem Cell* 2010 Aug 6;7(2):150-61.

Moore AN, Perez SC, Hartgerink JD, D'Souza RN, Colombo JS. Ex Vivo Modeling of Multidomain Peptide Hydrogels with Intact Dental Pulp. *J Dent Res* 2015 Dec;94(12):1773-81.

Moraes DA, Sibov TT, Pavon LF, Alvim PQ, Bonadio RS, Da Silva JR *et al.* A reduction in CD90 (THY-1) expression results in increased differentiation of mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Res Ther* 2016 Jul 28;7(1):97.

Moreira MS, Diniz IM, Rodrigues MF, de Carvalho RA, de Almeida Carrer FC, Neves, II *et al.* In vivo experimental model of orthotopic dental pulp regeneration under the influence of photobiomodulation therapy. *J Photochem Photobiol B* 2017 Jan;166:180-6.

Moritoh S, Tanaka KF, Jouhou H, Ikenaka K, Koizumi A. Organotypic tissue culture of adult rodent retina followed by particle-mediated acute gene transfer in vitro. *PLoS One* 2010 Sep 23;5(9):e12917.

Morsczeck C, Gotz W, Schierholz J, Zeilhofer F, Kuhn U, Mohl C *et al.* Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol* 2005 Apr;24(2):155-65.

Murfee WL, Skalak TC, Peirce SM. Differential arterial/venous expression of NG2 proteoglycan in perivascular cells along microvessels: identifying a venule-specific phenotype. *Microcirculation* 2005 Mar;12(2):151-60.

Murray PE, Lumley PJ, Ross HF, Smith AJ. Tooth slice organ culture for cytotoxicity assessment of dental materials. *Biomaterials* 2000 Aug;21(16):1711-21.

Nakashima M. The effects of growth factors on DNA synthesis, proteoglycan synthesis and alkaline phosphatase activity in bovine dental pulp cells. *Arch Oral Biol* 1992 Mar;37(3):231-6.

Nauck M, Roth M, Tamm M, Eickelberg O, Wieland H, Stulz P *et al.* Induction of vascular endothelial growth factor by platelet-activating factor and platelet-derived growth factor is downregulated by corticosteroids. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997 Apr;16(4):398-406.

NC3Rs - National Center for the Replacement, Refinement & Reduction of Animals in Research. The 3Rs. London: NC3Rs, [2014?]. Disponível em <<https://www.nc3rs.org.uk/the-3rs>>. Acesso em 06 ago. 2018.

Neves VC, Babb R, Chandrasekaran D, Sharpe PT. Promotion of natural tooth repair by small molecule GSK3 antagonists. *Sci Rep* 2017 Jan 9;7:39654.

NIH - National Institutes of Health. Stem cell information. Bethesda: NIH, 2016. Disponível em: <<http://stemcells.nih.gov/>>. Acesso em 06 ago. 2018.

Nombela-Arrieta C, Ritz J, Silberstein LE. The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011 Feb;12(2):126-31.

Nuti N, Corallo C, Chan BM, Ferrari M, Gerami-Naini B. Multipotent Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells: a Literature Review. *Stem Cell Rev* 2016 Oct;12(5):511-23.

Osathanon T, Sawangmake C, Nowwarote N, Pavasant P. Neurogenic differentiation of human dental pulp stem cells using different induction protocols. *Oral Dis* 2014 May;20(4):352-8.

Ouhtit A, Gaur RL, Abd Elmageed ZY, Fernando A, Thouta R, Trappey AK *et al.* Towards understanding the mode of action of the multifaceted cell adhesion receptor CD146. *Biochim Biophys Acta* 2009 Apr;1795(2):130-6.

Ozaki Y, Nishimura M, Sekiya K, Suehiro F, Kanawa M, Nikawa H *et al.* Comprehensive analysis of chemotactic factors for bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 2007 Feb;16(1):119-29.

Pang YW, Feng J, Daltoe F, Fatscher R, Gentleman E, Gentleman MM *et al.* Perivascular Stem Cells at the Tip of Mouse Incisors Regulate Tissue Regeneration. *J Bone Miner Res* 2016 Mar;31(3):514-23.

Papadimitropoulos A, Scherberich A, Guven S, Theilgaard N, Crooijmans HJ, Santini F *et al.* A 3D in vitro bone organ model using human progenitor cells. *Eur Cell Mater* 2011 May 15;21:445-58; discussion 58.

Pardee AB. A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1974 Apr;71(4):1286-90.

Patil R, Kumar BM, Lee WJ, Jeon RH, Jang SJ, Lee YM *et al.* Multilineage potential and proteomic profiling of human dental stem cells derived from a single donor. *Exp Cell Res* 2014 Jan 1;320(1):92-107.

Petersen J, Adameyko I. Nerve-associated neural crest: peripheral glial cells generate multiple fates in the body. *Curr Opin Genet Dev* 2017 Aug;45:10-4.

Pierret C, Spears K, Maruniak JA, Kirk MD. Neural crest as the source of adult stem cells. *Stem Cells Dev* 2006 Apr;15(2):286-91.

Rege TA, Hagood JS. Thy-1 as a regulator of cell-cell and cell-matrix interactions in axon regeneration, apoptosis, adhesion, migration, cancer, and fibrosis. *FASEB J* 2006 Jun;20(8):1045-54.

Richard L, Vedrenne N, Vallat JM, Funalot B. Characterization of Endoneurial Fibroblast-like Cells from Human and Rat Peripheral Nerves. *J Histochem Cytochem* 2014 Jun;62(6):424-35.

Rodgers JT, King KY, Brett JO, Cromie MJ, Charville GW, Maguire KK *et al.* mTORC1 controls the adaptive transition of quiescent stem cells from G0 to G(Alert). *Nature* 2014 Jun 19;510(7505):393-6.

Ruffolo PR, Ferm VH. The embryocidal and teratogenic effects of 5-bromodeoxyuridine in the pregnant hamster. *Lab Invest* 1965 Aug;14(8):1547-53.

Saito K, Ishikawa Y, Nakakura-Ohshima K, Ida-Yonemochi H, Nakatomi M, Kenmotsu S *et al.* Differentiation capacity of BrdU label-retaining dental pulp cells during pulpal healing following allogenic transplantation in mice. *Biomed Res* 2011 Aug;32(4):247-57.

Saito K, Nakatomi M, Ohshima H. Dynamics of bromodeoxyuridine label-retaining dental pulp cells during pulpal healing after cavity preparation in mice. *J Endod* 2013 Oct;39(10):1250-5.

Sakai K, Yamamoto A, Matsubara K, Nakamura S, Naruse M, Yamagata M *et al.* Human dental pulp-derived stem cells promote locomotor recovery after complete transection of the rat spinal cord by multiple neuro-regenerative mechanisms. *J Clin Invest* 2012 Jan;122(1):80-90.

Salgado AJ, Oliveira JT, Pedro AJ, Reis RL. Adult stem cells in bone and cartilage tissue engineering. *Curr Stem Cell Res Ther* 2006 Sep;1(3):345-64.

Scadden DT. Nice neighborhood: emerging concepts of the stem cell niche. *Cell* 2014 Mar 27;157(1):41-50.

Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* 1978;4(1-2):7-25.

Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahimi J *et al.* Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 2004 Jul 10-16;364(9429):149-55.

Sers C, Kirsch K, Rothbacher U, Riethmüller G, Johnson JP. Genomic organization of the melanoma-associated glycoprotein MUC18: implications for the evolution of the immunoglobulin domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993 Sep 15;90(18):8514-8.

Sharpe PT. Dental mesenchymal stem cells. *Development* 2016 Jul 1;143(13):2273-80.

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.

Shih IM. The role of CD146 (Mel-CAM) in biology and pathology. *J Pathol* 1999 Sep;189(1):4-11.

Shih IM, Nesbit M, Herlyn M, Kurman RJ. A new Mel-CAM (CD146)-specific monoclonal antibody, MN-4, on paraffin-embedded tissue. *Mod Pathol* 1998 Nov;11(11):1098-106.

Shin HS, An HY, Choi JS, Kim HJ, Lim JY. Organotypic Spheroid Culture to Mimic Radiation-Induced Salivary Hypofunction. *J Dent Res* 2017 Apr;96(4):396-405.

Sloan AJ, Lynch CD. Dental tissue repair: novel models for tissue regeneration strategies. *Open Dent J* 2012;6:214-9.

Sloan AJ, Shelton RM, Hann AC, Moxham BJ, Smith AJ. An in vitro approach for the study of dentinogenesis by organ culture of the dentine-pulp complex from rat incisor teeth. *Arch Oral Biol* 1998 Jun;43(6):421-30.

Smith AJ, Scheven BA, Takahashi Y, Ferracane JL, Shelton RM, Cooper PR. Dentine as a bioactive extracellular matrix. *Arch Oral Biol* 2012 Feb;57(2):109-21.

Smith CE, Warshawsky H. Cellular renewal in the enamel organ and the odontoblast layer of the rat incisor as followed by radioautography using ³H-thymidine. *Anat Rec* 1975 Dec;183(4):523-61.

Smith EL, Locke M, Waddington RJ, Sloan AJ. An ex vivo rodent mandible culture model for bone repair. *Tissue Eng Part C Methods* 2010 Dec;16(6):1287-96.

So WK, Cheung TH. Molecular Regulation of Cellular Quiescence: A Perspective from Adult Stem Cells and Its Niches. *Methods Mol Biol* 2018;1686:1-25.

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.

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.

Stevens A, Zuliani T, Olejnik C, LeRoy H, Obriot H, Kerr-Conte J *et al.* Human dental pulp stem cells differentiate into neural crest-derived melanocytes and have label-retaining and sphere-forming abilities. *Stem Cells Dev* 2008 Dec;17(6):1175-84.

Suchanek J, Soukup T, Visek B, Ivancakova R, Kucerova L, Mokry J. Dental pulp stem cells and their characterization. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2009 Mar;153(1):31-5.

Sun L, Yang C, Ge Y, Yu M, Chen G, Guo W *et al.* In vitro three-dimensional development of mouse molar tooth germs in a rotary cell culture system. *Int J Paediatr Dent* 2014 May;24(3):175-83.

Takeda T, Tezuka Y, Horiuchi M, Hosono K, Iida K, Hatakeyama D *et al.* Characterization of dental pulp stem cells of human tooth germs. *J Dent Res* 2008 Jul;87(7):676-81.

Taupin P. BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: paradigms, pitfalls, limitations, and validation. *Brain Res Rev* 2007 Jan;53(1):198-214.

Tecles O, Laurent P, Aubut V, About I. Human tooth culture: a study model for reparative dentinogenesis and direct pulp capping materials biocompatibility. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2008 Apr;85(1):180-7.

Tecles O, Laurent P, Zygouritsas S, Burger AS, Camps J, Dejou J *et al.* Activation of human dental pulp progenitor/stem cells in response to odontoblast injury. *Arch Oral Biol* 2005 Feb;50(2):103-8.

Teixeira FG, Carvalho MM, Neves-Carvalho A, Panchalingam KM, Behie LA, Pinto L *et al.* Secretome of mesenchymal progenitors from the umbilical cord acts as modulator of neural/glial proliferation and differentiation. *Stem Cell Rev* 2015 Apr;11(2):288-97.

Teixeira FG, Carvalho MM, Sousa N, Salgado AJ. Mesenchymal stem cells secretome: a new paradigm for central nervous system regeneration? *Cell Mol Life Sci* 2013 Oct;70(20):3871-82.

Thangaraj G, Greif A, Layer PG. Simple explant culture of the embryonic chicken retina with long-term preservation of photoreceptors. *Exp Eye Res* 2011 Oct;93(4):556-64.

Tuisku F, Hildebrand C. Evidence for a neural influence on tooth germ generation in a polyphyodont species. *Dev Biol* 1994 Sep;165(1):1-9.

Tumbar T, Guasch G, Greco V, Blanpain C, Lowry WE, Rendl M *et al.* Defining the epithelial stem cell niche in skin. *Science* 2004 Jan 16;303(5656):359-63.

Ueda M, Fujisawa T, Ono M, Hara ES, Pham HT, Nakajima R *et al.* A short-term treatment with tumor necrosis factor- α enhances stem cell phenotype of human dental pulp cells. *Stem Cell Res Ther* 2014 Feb 28;5(1):31.

Ullah I, Subbarao RB, Kim EJ, Bharti D, Jang SJ, Park JS *et al.* In vitro comparative analysis of human dental stem cells from a single donor and its neuronal differentiation potential evaluated by electrophysiology. *Life Sci* 2016 Jun 1;154:39-51.

Valentin M, Yang E. Autophagy is activated, but is not required for the G0 function of BCL-2 or BCL-xL. *Cell Cycle* 2008 Sep 1;7(17):2762-8.

Wang D, Huang HJ, Kazlauskas A, Caveness WK. Induction of vascular endothelial growth factor expression in endothelial cells by platelet-derived growth factor through the activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *Cancer Res* 1999 Apr 1;59(7):1464-72.

Wang X, Sha XJ, Li GH, Yang FS, Ji K, Wen LY *et al.* Comparative characterization of stem cells from human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells. *Arch Oral Biol* 2012 Sep;57(9):1231-40.

Wang Z, Yan X. CD146, a multi-functional molecule beyond adhesion. *Cancer Lett* 2013 Apr 28;330(2):150-62.

Wen HC, Kao C, Hsu RC, Huo YN, Ting PC, Chen LC *et al.* Thy-1-induced migration inhibition in vascular endothelial cells through reducing the RhoA activity. *PLoS One* 2013;8(4):e61506.

Yamada KM, Cukierman E. Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D. *Cell* 2007 Aug 24;130(4):601-10.

Yamamoto M, Kawashima N, Takashino N, Koizumi Y, Takimoto K, Suzuki N *et al.* Three-dimensional spheroid culture promotes odonto/osteoblastic differentiation of dental pulp cells. *Arch Oral Biol* 2014 Mar;59(3):310-7.

Yamazaki T, Sabit H, Oya T, Ishii Y, Hamashima T, Tokunaga A *et al.* Activation of MAP kinases, Akt and PDGF receptors in injured peripheral nerves. *J Peripher Nerv Syst* 2009 Sep;14(3):165-76.

Yang H, Wang S, Liu Z, Wu MH, McAlpine B, Ansel J *et al.* Isolation and characterization of mouse MUC18 cDNA gene, and correlation of MUC18 expression in mouse melanoma cell lines with metastatic ability. *Gene* 2001 Mar 7;265(1-2):133-45.

Yao G. Modelling mammalian cellular quiescence. *Interface Focus* 2014 Jun 6;4(3):20130074.

Yasui T, Mabuchi Y, Morikawa S, Onizawa K, Akazawa C, Nakagawa T *et al.* Isolation of dental pulp stem cells with high osteogenic potential. *Inflamm Regen* 2017;37:8.

Yokose S, Kadokura H, Tajima N, Hasegawa A, Sakagami H, Fujieda K *et al.* Platelet-derived growth factor exerts disparate effects on odontoblast differentiation depending on the dimers in rat dental pulp cells. *Cell Tissue Res* 2004 Mar;315(3):375-84.

Yoshida N, Yoshida K, Ohkura N, Shigetani Y, Takei E, Hosoya A *et al.* Immunohistochemical analysis of two stem cell markers of alpha-smooth muscle actin and STRO-1 during wound healing of human dental pulp. *Histochem Cell Biol* 2012 Oct;138(4):583-92.

Zhang H, Jarjour AA, Boyd A, Williams A. Central nervous system remyelination in culture--a tool for multiple sclerosis research. *Exp Neurol* 2011 Jul;230(1):138-48.

Zhang M, Jiang F, Zhang X, Wang S, Jin Y, Zhang W *et al.* The Effects of Platelet-Derived Growth Factor-BB on Human Dental Pulp Stem Cells Mediated Dentin-Pulp Complex Regeneration. *Stem Cells Transl Med* 2017 Dec;6(12):2126-34.

Zhang Q, Shi S, Liu Y, Uyanne J, Shi Y, Shi S *et al.* Mesenchymal stem cells derived from human gingiva are capable of immunomodulatory functions and ameliorate inflammation-related tissue destruction in experimental colitis. *J Immunol* 2009 Dec 15;183(12):7787-98.

Zhao H, Feng J, Seidel K, Shi S, Klein O, Sharpe P *et al.* Secretion of shh by a neurovascular bundle niche supports mesenchymal stem cell homeostasis in the adult mouse incisor. *Cell Stem Cell* 2014 Feb 6;14(2):160-73.

Anexos

ANEXOS

Plataforma Brasil - Ministério da Saúde

Faculdade de Odontologia de Bauru-USP

PROJETO DE PESQUISA

Título: "ESTUDO DA LOCALIZAÇÃO E COMPOSIÇÃO DE NICHOS DE CÉLULAS-TRONCO DENTAIS FRENTE À RESPOSTA A INJÚRIA"

Área Temática:

Pesquisador: Lourdes Rosa Chiok Ocana

Versão: 2

Instituição: Faculdade de Odontologia de Bauru-USP

CAAE: 01331212.4.0000.5417

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 48500

Data da Relatoria: 27/06/2012

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto realizado em conjunto pela FOB e FOUUSP, que procura estudar a localização e composição de nichos das células-tronco da polpa e da papila dentária humanas através da expressão de marcadores variados, previamente associados a células-tronco, em resposta a injúria em ambiente controlado. Para isso, serão utilizados 36 dentes terceiros molares humanos, com rizogênese incompleta, extraídos de sujeitos da pesquisa entre 13 e 18 anos por motivos ortodônticos. Imediatamente após a extração, os dentes serão divididos em três grupos, sendo:

a) Grupo O: sofrerá preparo oclusal com broca para exposição de corno pulpar (n=12)

b) Grupo V: sofrerá preparo por vestibular para exposição de corno pulpar (n=12)

c) Grupo C: servirá de controle e não haverá exposição de corno pulpar (n=12)

Logo em seguida, a parte apical ainda incompleta destes dentes será colocada em meio de cultura e exposta, nas primeiras 24 horas a um marcador da proliferação celular (BrdU). As células que proliferarem em resposta ao preparo cavitário incorporarão o marcador. Todos os dentes permanecerão em cultura por 1, 5, 14 ou 28 dias (3 dentes para cada período). Ao final dos períodos indicados os dentes serão fixados, descalcificados e desidratados e serão obtidos cortes seriados de 5 mm tanto para análise histológica como para uso para técnica de imunofluorescência. Para esta análise de imunofluorescência serão utilizados anticorpos previamente relacionados a células-tronco mesenquimais. O Projeto foi novamente apresentado ao CEP em função de modificação do texto da carta de doação de dentes. Este novo documento também é bastante claro e informa de forma adequada aos sujeitos da pesquisa sobre todos os procedimentos que serão realizados, dando ao participante perfeita noção da pesquisa e de seus objetivos.

Objetivo da Pesquisa:

Estudar a localização e composição de nichos das células-tronco da polpa e da papila dentária humanas através da expressão de marcadores variados, previamente associados a células-tronco, em resposta a injúria, em ambiente controlado.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Trata-se de estudo "ex vivo" utilizando dentes humanos extraídos por motivos ortodônticos. Normalmente estes espécimes são descartados e a pesquisa, em si, não oferece nenhum risco ao sujeito. Não há também, nenhum benefício imediato para o sujeito da pesquisa, mas para o futuro das técnicas de reparo das estruturas dentais, o benefício é imenso.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Considero ser um interessante trabalho para identificação e determinação da composição dos nichos de células tronco da polpa dentária humana. Conhecida a localização destes nichos, é possível imaginar estratégias clínicas para serem utilizadas futuramente no reparo do tecido "in vivo" além de, fornecer subsídios para a reprodução de nichos "in vitro".

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram anexados ao projeto os seguintes documentos:

- a) carta de encaminhamento por parte do orientador e do Chefe do Departamento de Dentística, Endodontia e Materiais Odontológicos da FOB - USP.
- b) folha de rosto devidamente assinada
- c) carta de autorização da FOU SP para que as pesquisas possam ser realizadas nesta instituição, assinada pela Co-orientadora e pelo Diretor da Unidade.
- d) carta de autorização da Disciplina de Cirurgia da FOU SP, autorizando a coleta de dentes nas suas dependências
- e) autorização do supervisor da Seção Técnico-Científica da Clínica Odontológica da FOU SP para realização da pesquisa.
- f) autorização para utilização das dependências do laboratório de Patologia Bucal da FOU SP para realização do estudo.
- g) nova carta de doação dos dentes que deverão ser assinadas pelos sujeitos da pesquisa
- h) critérios para suspender ou encerrar as pesquisas
- i) autorização para publicação incondicional dos resultados
- j) orçamento financeiro no valor total de R\$ 43.339,86, solicitados à FAPESP. Havendo recusa por parte da agência de fomento, a pesquisa não será realizada ou poderá ser reavaliada pelos autores.

Recomendações:

Sem recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Em função do exposto nos itens anteriores, considero que a presente solicitação, da inclusão de nova carta de doação de dentes seja APROVADA por este CEP

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O CEP acata o parecer do relator e considera o presente projeto APROVADO.

BAURU, 02 de Julho de 2012

Assinado por:
Flávio Augusto Cardoso de Faria

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
Comitê de Ética em Pesquisa

167-MTW

São Paulo, 25 de maio de 2012.

DECLARAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo recebeu e **aprovou** o projeto de pesquisa **“Estudo da localização e composição de nichos de células-tronco dentais frente à resposta a injúria”** dos pesquisadores Lourdes Chiok Ocanã, Prof. Jose Carlos Pereira e Profa. André Mantesso Pobocik, como instituição co-participante a Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia de Bauru-USP pelo sistema plataforma Brasil, CAAE 01331212.4.0000.5417, em 28 de março de 2012, e devido a problemas operacionais do sistema não foi possível ser enviado ao CEP-FOUSP para avaliação.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação através do sistema Plataforma Brasil.

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

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU-
USP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: "ESTUDO DA LOCALIZAÇÃO E COMPOSIÇÃO DE NICHOS DE CÉLULAS-TRONCO DENTAIS FRENTE À RESPOSTA A INJÚRIA"

Pesquisador: Lourdes Rosa Chiok Ocana

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 01331212.4.0000.5417

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: CONS NAC DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E TECNOLÓGICO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.292.528

Apresentação do Projeto:

Emenda pedindo alteração no número das amostras para mais, devido a metodologia e perda de dentes durante o estudo com as devidas explicações.

Foi anexado um novo cronograma com atualização das etapas da pesquisa.

A pesquisadora pergunta:

"Esses novos dentes podem ser coletados com o TCLE vigente já que trata-se da mesma pesquisa ou preciso fazer um novo Termo de Cessão e Termo de Assentimento já que a maioria dos doadores são menores de idade?" O CEP considera que a pesquisa deva manter os mesmos documentos aprovados anteriormente.

As demais informações como os pareceres anteriores.

Objetivo da Pesquisa:

Idem aos pareceres anteriores.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Idem aos pareceres anteriores.

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9
Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA **CEP:** 17.012-901
UF: SP **Município:** BAURU
Telefone: (14)3235-8356 **Fax:** (14)3235-8356 **E-mail:** cep@fob.usp.br

**FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU-
USP**

Continuação do Parecer: 1.292.528

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Idem aos pareceres anteriores.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Idem aos pareceres anteriores.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovada a emenda e o aumento no número de dentes para a amostra bem como manter os documentos aprovados anteriormente para esses novos dentes coletados.

Considerações Finais a critério do CEP:

As alterações solicitadas pelos pesquisadores, por meio de EMENDA, foram analisadas por um relator e consideradas APROVADAS na reunião ordinária do CEP de 21.10.2015. Ao término da pesquisa o CEP-FOB/USP exige a apresentação de relatório final. Os relatórios parciais deverão estar de acordo com o cronograma e/ou parecer emitido pelo CEP. Alterações na metodologia, título, inclusão ou exclusão de autores, cronograma e quaisquer outras mudanças que sejam significativas deverão ser previamente comunicadas a este CEP sob risco de não aprovação do relatório final. Quando da apresentação deste, deverão ser incluídos todos os TCLEs e/ou termos de doação assinados e rubricados, se pertinentes.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_368396_E2.pdf	13/09/2015 23:21:45		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto.docx	13/09/2015 23:13:29	Lourdes Rosa Chiok Ocana	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	carta_para_emenda.docx	13/09/2015 23:12:21	Lourdes Rosa Chiok Ocana	Aceito
Cronograma	NOVO_CRONOGRAMA.docx	13/09/2015 23:11:33	Lourdes Rosa Chiok Ocana	Aceito
Folha de Rosto	FOLHA_DE_ROSTO.pdf	11/09/2015 12:45:12	Lourdes Rosa Chiok Ocana	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CARTA DA FUNDECTO .PDF	23/07/2015 12:31:06		Aceito
Declaração de	CIENCIA DA FOU SP .PDF	14/07/2015		Aceito

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9
Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA **CEP:** 17.012-901
UF: SP **Município:** BAURU
Telefone: (14)3235-8356 **Fax:** (14)3235-8356 **E-mail:** cep@fob.usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU-
USP

Continuação do Parecer: 1.292.528

Instituição e Infraestrutura	CIENCIA DA FOU SP .PDF	17:22:49		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_29581_E1.pdf	31/05/2012 17:18:03		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_13312.pdf	09/03/2012 17:23:01		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BAURU, 22 de Outubro de 2015

Assinado por:**Izabel Regina Fischer Rubira Bullen**
(Coordenador)

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9
Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA **CEP:** 17.012-901
UF: SP **Município:** BAURU
Telefone: (14)3235-8356 **Fax:** (14)3235-8356 **E-mail:** cep@fob.usp.br

Universidade de São Paulo Faculdade de Odontologia de Bauru

Departamento de Dentística, Endodontia e
Materiais Odontológicos

DECLARAÇÃO de DOAÇÃO de DENTES

Título do estudo: “Localização e composição de nichos de células- tronco dentais frente à resposta a injúria”.

Pesquisadora responsável: Lourdes Chiok Ocana

Instituição/Departamento: FOB-USP/Departamento de Dentística, Endodontia e Materiais Odontológicos e FOUSP/ Departamento de Estomatologia.

Objetivo e Procedimentos do estudo: O presente trabalho tem como objetivo estudar a localização (procurar onde) e composição dos nichos das células-tronco (casinha onde moram as células) da polpa e da papila dentária humanas (tecidos que estão por dentro e por fora do dente) após injúria (após a confecção de um burquinho com o motorzinho). Após a coleta dos dentes, os mesmos passarão por um tratamento específico no laboratório com substâncias fluorescentes (que brilham no escuro) e assim conseguiremos observar o local das células-tronco nos tecidos dentários.

Benefícios: Esta pesquisa trará maior conhecimento sobre os nichos de células-tronco dentais, um assunto ainda pouco divulgado na literatura, sem benefício direto para você.

Riscos: A sua participação como doador no presente projeto de pesquisa não representará qualquer risco de ordem física ou psicológica. Após a extração do(s) seu(s) dente(s) pelo seu dentista, a pesquisadora fará a coleta dos tecidos utilizando luvas estéreis e esses em seguida, serão transportados para o laboratório onde será processado.

Sigilo: As informações fornecidas por você serão confidenciais e de conhecimento apenas dos pesquisadores responsáveis. Os sujeitos da pesquisa não serão identificados em nenhum momento, mesmo quando os resultados desta pesquisa forem divulgados em qualquer forma.

Compensação: Nenhum auxílio financeiro será dado pela pesquisadora responsável, nem pela faculdade.

Documentação: Uma cópia desta Declaração de Doação de Dentes será guardada junto com os documentos da pesquisa pela pesquisadora responsável e você receberá outra cópia.

Senhor(a) doador(a) ou seu representante legal,

A Faculdade de Odontologia de Bauru em cooperação com a Faculdade de Odontologia de São Paulo ambas pertencentes à Universidade de São Paulo desenvolvem pesquisas que precisam de dentes 3º molares humanos. Desta forma, quando ocorrer a necessidade de extrair (arrancar) um ou mais dentes, solicitamos que o senhor(a) faça a doação do(s) seu(s) dente(s) ou dos dentes do paciente de quem é representante legal. Esta doação é voluntária. Seu consentimento poderá ser retirado a qualquer momento sem prejuízos à continuidade do seu tratamento. Também, a doação não dará ao doador(a) qualquer prioridade em tratamentos futuros, em nenhuma das duas Faculdades de Odontologia (USP).

Universidade de São Paulo Faculdade de Odontologia de Bauru

Departamento de Dentística, Endodontia e
Materiais Odontológicos

Declaro, portanto, ter sido esclarecido sobre quais os motivos que levaram a necessidade de remoção do(s) dente(s) _____ e concordo que os mesmos sejam utilizados na pesquisa de título “Estudo da localização e composição de nichos de células-tronco dentais frente à resposta a injúria”.

Identificação do doador:

Nome (legível): _____

Data de nascimento: ____/____/____ Local de nascimento: _____ UF: _____

RG nº: _____ CPF nº: _____

Endereço (Rua ou Avenida, nº, Bairro e Complemento): _____

Cidade: _____ UF: _____ CEP: _____

Telefones para contato: (____) _____; (____) _____; (____) _____

e-mail: _____

Caso seja necessário, o contato com o pesquisador responsável: Lourdes Chiok Ocana (aluna de doutorado da FOB-USP) poderá ser feito pelos telefones: (0XX14) 8155-5771 ou pelo e-mail lourdeschiok@usp.br. Se houver dúvidas sobre a ética da pesquisa entre em contato com a Sra. Maristela Petenucci Ferrari no Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Bauru Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisola 9-75 CEP 17012-901 Bauru ou através do telefone (0XX14) 3235-8356 ou ainda pelo e-mail cep@fob.usp.br

Eu li e entendi todas as informações citadas acima. A pesquisadora se ofereceu para responder qualquer pergunta em relação ao estudo.

São Paulo, ____ de _____ de _____.

Assinatura do doador

Pesquisadora Responsável

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-101 – C.P. 73

e-mail: dentistica@fob.usp.br – Fone (0xx14) 3235-8323 – FAX (14)3223-4679

<http://www.fob.usp.br>

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Certificado

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **011/2013** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a). **Andréa Mantesso Pobocik** Coordenador(a) da Linha de Pesquisa "**Estudo da localização e composição de nichos de células-tronco dentais frente à resposta a injúria**" do qual participam o(s) pesquisador(es) **Lourdes Rosa Chiok Ocana e Cibele Pelissari dos Santos**, 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 **24/06/2013**, com validade de **03 (três)** anos.

São Paulo, 24 de junho de 2013

Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz
Presidente do CEUA-FOUSP