

RANI DA CUNHA MORETTI

**MEDICAÇÃO PRÉ-OPERATÓRIA DEXAMETASONA- OS
EFEITOS NA CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS DE
POLPA DENTAL HUMANA.**

**Dissertação apresentada à Universidade Federal de São
Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.**

SÃO PAULO

2015

RANI DA CUNHA MORETTI

**MEDICAÇÃO PRÉ-OPERATÓRIA DEXAMETASONA- OS
EFEITOS NA CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS DE
POLPA DENTAL HUMANA.**

**Dissertação apresentada à Universidade Federal de São
Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.**

ORIENTADOR: Prof. Dr. SILVIO EDUARDO DUAILIBI

COORIENTADOR: Prof^ª. Dr^ª. MONICA TALARICO DUAILIBI

SÃO PAULO

2015

Moretti, Rani da Cunha

Medicação pré-operatória dexametasona – os efeitos na cultura primária de células de polpa dental humana. /Rani da Cunha Moretti – São Paulo, 2015.
xix, 111f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Translacional.

Título em inglês: Dexamethazone preoperative medication - the effects into primary culture of human dental pulp cells.

1.Dexametasona. 2. Engenharia Tecidual. 3. Terceiro Molar.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA
TRANSLACIONAL**

COORDENADOR: Prof. Dr. Miguel Sabino Neto

Aos meus pais, Simone da Cunha Rosa Moretti e Sergio Moretti pelo amor, incentivo e educação dispensados a mim e por seus exemplos de força e determinação.

Ao meu irmão Rubens da Cunha Moretti por compartilhar comigo todos os momentos de dificuldades e conquistas.

À minha avó Luiza Thomazini da Cunha Rosa pelo apoio em meus estudos e exemplo de ser humano.

Ao meu namorado Tarso de Souza Ramalho pelo amor, paciência, incentivo, auxílio e companheirismo.

À toda minha família e amigos por acreditarem em mim e na pesquisa.

Ao meu orientador **SILVIO EDUARDO DUAILIBI** e minha co-orientadora **MONICA TALARICO DUAILIBI**, pela oportunidade, confiança, acolhimento e ensinamentos.

Meus mais sinceros agradecimentos

Primeiramente agradeço a **DEUS** por minha existência, pelas oportunidades, por permitir que eu fizesse parte de uma família maravilhosa e por permitir que mais um sonho se realizasse.

À minha mãe **SIMONE DA CUNHA ROSA MORETTI**, meu exemplo de garra e determinação, pelo amor, proteção, incentivo, cobrança, por acreditar em meu potencial e por estar ao meu lado.

Ao meu pai **SERGIO MORETTI**, pelo amor, apoio, proteção e pela forma de “encarar” a vida.

Ao meu irmão **RUBENS DA CUNHA MORETTI**, pela confiança, cumplicidade, amizade, amor, broncas, cócegas e por estar presente em todos os momentos de minha vida chorando ou vibrando junto a mim e que me permitiu, junto à minha doce cunhada **GISELLE DI GENARO GADA MORETTI**, ser tia de três lindas e adoráveis “criONÇAS”.

Ao meu avô **ORLANDO DA CUNHA ROSA** (*in memoria*) por seu amor, cuidado, pelo exemplo de sabedoria, humildade, esforço e vontade de vencer.

À minha avó **LUIZA THOMAZINI DA CUNHA ROSA** pelo exemplo de bondade, humildade, por cuidar de mim, pela companhia, por sua presença em todas as apresentações e festinhas de escola, pelos bolos e chás oferecidos enquanto estudava, pela paciência, carinho e por sua incessante alegria e vontade de viver.

Ao meu amado **TARSO DE SOUZA RAMALHO** por seu amor, paciência, companheirismo, amizade, incentivo, por me ajudar com as contas e “regrinhas de três”, pelo auxílio com as fotos e por estar comigo em meus momentos de sanidade e loucura. Espero poder desfrutar de muitos outros momentos ao seu lado.

À minha tia **SILVIA REGINA DA CUNHA ROSA XAVIER** por seu carinho, compreensão, “ombro amigo” e por todas as vezes que me “emprestou” seu consultório para que eu pudesse estudar.

À Professora **LYDIA MASAHO FERREIRA**, Titular da Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP, pela luta em manter a disciplina em alto padrão e pela oportunidade de aprendizado junto a profissionais, acadêmicos e docentes de grande valor e respeito.

Ao Professor **MIGUEL SABINO NETO**, coordenador do Programa de Pós-graduação em Cirurgia Translacional, pelo apoio e incentivo aos docentes, alunos e todos os participantes das atividades ligadas ao programa.

Às minhas queridas amigas de longa data ao qual passei anos ao lado e que me estimularam a buscar concretizar meu sonho de ser mestre: **CAMILA CASSEMIRO PACHECO, JULIANA FURUTANI NAKAZATO E PATRÍCIA OLIVEIRA RIBEIRO MILANI**. Em especial agradeço a minha grande amiga **RACHEL VIEIRA DE SOUZA** por seu apoio, troca de informações, por guardar meus segredos e por me ajudar em diversos momentos de minha vida.

Às amigas de laboratório, que participaram todos os momentos deste projeto: **NATASHA MENDONÇA MACHADO E JENNIFER ADRIANE DOS SANTOS**, agradeço muito à vocês tudo o que aprendi, os caminhos que foram abertos à mim por meio de vocês, pela companhia, por pensarmos juntas durante os experimentos, pela força, incentivo e pela amizade sincera.

Aos amigos de mestrado: **VANESSA PENNA**, pelas palavras de auxílio, exemplo de objetividade e determinação e pelo grande auxílio no laboratório, **PAULO OLIVEIRA MARTINS** por sua grande contribuição com

o fornecimento de tecidos de descarte cirúrgico utilizados nas pesquisas, pelas broncas, elogios, amizade, ensinamentos e risadas e à **LUCIANA APARECIDA DE SOUSA IWAMOTO** por sua calma, companhia em sala de aula, dedicação, amizade e exemplo de bondade.

Aos mais recentes amigos de laboratório: **ALINE SIMPRINI, ERIC PEÇANHA, RENATO DALCIN, LUCIANA LOPES, PAULO SIMÕES, CELMA MARTINS E FERNANDA** agradeço pela amizade, auxílio e interesse demonstrado em conhecer este projeto e a **KELLY** por suas explicações.

Ao **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA TRANSLACIONAL**, pela oportunidade e contribuição em meu aprendizado, permitindo a criação de um senso crítico e por possibilitar a ampliação do conhecimento por meio das diversas linhas de pesquisa.

E por fim, porém não menos importante, agradeço a todos que participaram dos meus dias de laboratório durante o desenvolvimento deste projeto: Sr. **GERÔNIMO**, Sr. **SÉRGIO** e, **IVANETE, MARCINHA, MAGALI e SANDRA**.

Meus mais sinceros agradecimentos

“Nunca, jamais desanimeis, embora venham ventos contrários.”

Santa Paulina

“ A mente que se abre a uma nova idéia, jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

DEDICATÓRIA.....	iv
AGRADECIMENTOS ESPECIAIS.....	v
EPÍGRAFE.....	x
LISTAS.....	xiii
RESUMO.....	xix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO.....	5
3. LITERATURA.....	7
3.1. ENGENHARIA TECIDUAL.....	8
3.2. ENGENHARIA TECIDUAL E ODONTOLOGIA.....	11
3.3. FARMACOCINÉTICA DA DEXAMETASONA.....	16
3.4. CULTURA CELULAR E DEXAMETASONA.....	18
3.5. DEXAMETASONA E A ODONTOLOGIA.....	20
4. MÉTODOS.....	24
4.1. CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO.....	25
4.2. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	25
4.3. CRITÉRIOS DE NÃO INCLUSÃO.....	26
4.4. AMOSTRAS.....	26
4.5. OBTENÇÃO DE CÉLULAS.....	28
4.6. PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	28
4.7. OBTENÇÃO DE IMAGENS	30

4.8. TESTE DE VIABILIDADE CELULAR.....	30
4.9. ANÁLISE DE VON KOSSA.....	34
4.10. ANÁLISE COM <i>ALIZARIN RED</i>	35
4.11. ASPECTOS ÉTICOS.....	36
4.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
5. RESULTADOS	38
5.1. ANÁLISE CELULAR.....	39
5.2. ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	40
5.2.1. TESTE DE VARIÂNCIA DE FRIEDMAN.....	42
5.3. ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR.....	44
5.4. ANÁLISE DE VON KOSSA E <i>ALIZARIN RED</i>	46
6. DISCUSSÃO.....	71
7. PERSPECTIVAS	77
8. CONCLUSÃO	79
9. REFERÊNCIAS.....	81
NORMAS ADOTADAS.....	88
ABSTRACT.....	90
APÊNDICES.....	92
ANEXOS.....	98
FINANCIAMENTO.....	108
FONTES CONSULTADAS.....	110

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Foto: etapa de Proliferação- contador automático (A), imagem das células contidas na *chamber slide* (B), imagem das células com aumento do zoom (C), gráfico final demonstrando a quantidade de células vivas e células mortas..... 29
- Figura 2.** Gráficos analisados em triplicatas nos intervalos de tempo fixados, Protocolo A (sem dexta), células da amostra 1..... 31
- Figura 3.** Gráficos analisados em triplicatas nos intervalos de tempo fixados, Protocolo A (sem dexta), células da amostra 2..... 31
- Figura 4.** Gráficos analisados em triplicatas nos intervalos de tempo fixados, Protocolo A (sem dexta), células da amostra 3..... 32
- Figura 5.** Gráficos analisados em triplicatas nos intervalos de tempo fixados, Protocolo B (com dexta), células da amostra 1..... 32
- Figura 6.** Gráficos analisados em triplicatas nos intervalos de tempo fixados, Protocolo B (com dexta), células da amostra 2..... 33
- Figura 7.** Gráficos analisados em triplicatas nos intervalos de tempo fixados, Protocolo B (com dexta), células da amostra 3..... 33
- Figura 8.** Foto: espectrofotômetro de Elisa utilizado na leitura das amostras (A), *well plate*-96, poços contendo células, MTT (em sua forma reduzida) e DMSO- análise em triplicata (B)..... 34
- Figura 9.** Foto: análise de Von Kossa realizada em triplicata (A), análise de *Alizarin Red* em triplicata (B)..... 36
- Figura 10.** Fotos: confluência de células MTJ- Células despreendendo do explante, com aumento de 5x (A) e 10x (B), células em confluência desejada, cultivadas até a 2ª passagem, análise em microscopia óptica com aumento de 5x (C) e 10x (D)..... 39
- Figura 11.** Proliferação- descrição da proliferação de todas as amostras utilizados no estudo..... 41
- Figura 12.** Comparação protocolo A(sem dexta) e protocolo B (com dexta)- gráfico demonstrando o pico de proliferação em 21 dias no protocolo A e 14 dias no protocolo B..... 43

Figura 13. Gráfico com análise por meio de <i>T test</i> - comparação entre protocolo A e protocolo B.....	45
Figura 14. Foto: Análise Von Kossa e <i>Alizarin Red</i> Amostra 1- 7 dias protocolo A	47
Figura 15. Foto: Análise Von Kossa e <i>Alizarin Red</i> Amostra 1- 14 dias protocolo A.....	48
Figura 16. Foto: Análise Von Kossa e <i>Alizarin Red</i> Amostra 1- 21 dias protocolo A.....	49
Figura 17. Foto: Análise Von Kossa e <i>Alizarin Red</i> Amostra 1- 28 dias protocolo A.....	50
Figura 18. Foto: Análise Von Kossa e <i>Alizarin Red</i> Amostra 2 -7 dias protocolo A.....	51
Figura 19. Foto: Análise Von Kossa e <i>Alizarin Red</i> Amostra 2- 14 dias protocolo A.....	52
Figura 20. Foto: Análise Von Kossa e <i>Alizarin Red</i> Amostra 2- 21 dias protocolo A.....	53
Figura 21. Foto: Análise Von Kossa e <i>Alizarin Red</i> Amostra 2- 28 dias protocolo A.....	54
Figura 22. Foto: Análise Von Kossa e <i>Alizarin Red</i> Amostra 3- 7 dias protocolo A.....	55
Figura 23. Foto: Análise Von Kossa e <i>Alizarin Red</i> Amostra 3- 14 dias protocolo A.....	56
Figura 24. Foto: Análise Von Kossa e <i>Alizarin Red</i> Amostra 3- 21 dias protocolo A.....	57
Figura 25. Foto: Análise Von Kossa e <i>Alizarin Red</i> Amostra 3- 28 dias protocolo A.....	58
Figura 26. Foto: Análise Von Kossa e <i>Alizarin Red</i> Amostra 1- 7 dias protocolo B.....	59
Figura 27. Foto: Análise Von Kossa e <i>Alizarin Red</i> Amostra 1- 14 dias protocolo B.....	60
Figura 28. Foto: Análise Von Kossa e <i>Alizarin Red</i> Amostra 1- 21 dias protocolo B.....	61
Figura 29. Foto: Análise Von Kossa e <i>Alizarin Red</i> Amostra 1- 28 dias protocolo B.....	62

Figura 30. Foto: Análise Von Kossa e <i>Alizarin Red</i> Amostra 2- 7 dias protocolo B.....	63
Figura 31. Foto: Análise Von Kossa e <i>Alizarin Red</i> Amostra 2- 14 dias protocolo B.....	64
Figura 32. Foto: Análise Von Kossa e <i>Alizarin Red</i> Amostra 2- 21 dias protocolo B.....	65
Figura 33. Foto: Análise Von Kossa e <i>Alizarin Red</i> Amostra 2- 28 dias protocolo B.....	66
Figura 34. Foto: Análise Von Kossa e <i>Alizarin Red</i> Amostra 3- 7 dias protocolo B.....	67
Figura 35. Foto: Análise Von Kossa e <i>Alizarin Red</i> Amostra 3- 14 dias protocolo B.....	68
Figura 36. Foto: Análise Von Kossa e <i>Alizarin Red</i> Amostra 3- 21 dias protocolo B.....	69
Figura 37. Foto: Análise Von Kossa e <i>Alizarin Red</i> Amostra 3- 28 dias protocolo B.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição da proliferação de células da amostra 1, nos diferentes intervalos de tempo.....	40
Tabela 2. Descrição da proliferação de células da amostra 2, nos diferentes intervalos de tempo.....	40
Tabela 3. Descrição da proliferação de células da amostra 3, nos diferentes intervalos de tempo.....	40
Tabela 4. Teste de Variância de Friedman para o protocolo A, sem dexametasona, demonstrando significância aos 21 dias	42
Tabela 5. Teste de Variância de Friedman para o protocolo B, com dexametasona, demonstrando significância aos 14 dias	43

LISTA DE ABREVIATURAS

BMSCs- células- tronco de medula óssea
CEP – Comitê de Ética e Pesquisa
CFU- Unidade Formadora de Colônia
CO₂ - Dióxido de Carbono
CTCMol - Centro de Terapia Celular e Molecular
DEX- Dexametasona
DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
DMSO- Dimetilsulfóxido
DSC- Células-Tronco Dentais
EMC- matriz extra celular
ET - Engenharia Tecidual
et al.- e colaboradores
FBS - Soro Fetal Bovino
HBSS – *Hanks Balanced Salt Solution*
MR- Medicina Regenerativa
MSCs- Células- Tronco Mesenquimais
MSCGM- *Mesenchymal Stem Cell Growth Medium*
MTT - *Methylthiazol Tetrazolium*
nm - nanômetros
PBS – *Phosphate Buffered Saline*
TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UCB- MSCs - células-tronco mesenquimais de cordão umbilical
iPS – Células pluripotente induzida

TERMOS SEM TRADUÇÃO PARA O PORTUGUÊS

Scaffold - arcabouço 3D no qual as células podem ser semeadas.

Well-plates - placa com múltiplos poços para cultura celular

Chamber slide- câmara utilizada para contagem de células em contador automático.

Pellet- precipitado de células formado no fundo do frasco após a realização da centrifugação.

Eppendorf- pequeno tubo de plástico com formato cilíndrico e fundo cônico, com tampa acoplada. Conhecido também como tubo de microcentrífuga.

RESUMO

Introdução: A aplicação de dexametasona em cultura de células mesenquimais induz diferenciação osteoblástica, conseqüentemente formação de tecidos mineralizados. A Engenharia Tecidual propõe o desenvolvimento de estratégias terapêuticas direcionadas à regeneração funcional e estrutural de tecidos biológicos. Nesse sentido, a caracterização celular *in vitro* é fundamental para garantir o desenvolvimento destas técnicas. **Objetivo:** Avaliar o efeito da dexametasona administrada como medicação pré-operatória na cultura de células primárias de polpa dental humana. **Métodos:** Foram utilizadas células provenientes da polpa de terceiros molares. Essas foram distribuídas em dois grupos experimentais com dois protocolos de medicação pré-operatória utilizados em rotina odontológica, onde no protocolo B, o paciente ingeria 1 comprimido de dexametasona 1 hora antes à cirurgia e no A não. A avaliação da proliferação, viabilidade e diferenciação, foram pelos testes *Trypan Blue*, MTT, Von Kossa e *Alizarin Red* respectivamente, e realizadas em intervalos fixados. Análise de variância de Friedman e *t test* foram aplicados, fixando em 95% de confiança. **Resultados:** As células pertencentes ao protocolo A atingiram pico de proliferação aos 21 dias de cultura enquanto as células do protocolo B em 14. Células do protocolo A foram estatisticamente mais viáveis aos 7 e 21 dias enquanto as do protocolo B, aos 14. Na análise de Von Kossa e *Alizarin Red* observou-se que as células pertencentes ao protocolo B formaram nódulos de calcificação desde 7 dias de cultura enquanto no A aos 14. **Conclusão:** A utilização da dexametasona como medicação pré-operatória em cirurgia de terceiros molares promove diferenciação celular precocemente, quando observada *in vitro*.

Palavras chave: dexametasona, Engenharia Tecidual, terceiro molar.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento da Medicina Regenerativa (MR) estabelece uma alternativa viável para o tratamento de perdas teciduais provocadas por lesões traumáticas congênitas ou degenerativas. A Engenharia Tecidual (ET) é um campo interdisciplinar que busca a regeneração de tecidos biológicos a partir de estudos conduzidos no campo das Ciências Biológicas e Engenharia (LANGER & VACANTI, 1993; KHADEMHOSEINI *et al.*, 2006). A ET oferece a solução definitiva para a falência dos órgãos (LANGER 2000; KHADEMHOSEINI *et al.*, 2006), uma vez que doador e receptor são o mesmo indivíduo, minimizando a rejeição.

A utilização de células isoladas, biomateriais e sua associação constituem as principais estratégias terapêuticas na ET, sendo indispensável à interação precisa entre eles (LANGER & VACANTI, 1993).

A capacidade regenerativa e o potencial múltiplo de células provenientes de dentes terceiros molares impulsionam o uso destas células na Medicina Regenerativa (BATOULI *et al.*, 2003). Além disso, estudos provam ser possível o desenvolvimento de tecidos biológicos a partir deste material sendo capaz de sustentar todos os eventos associados ao processo (DUAILIBI *et al.*, 2004, DUAILIBI ET *al.* 2006, DUAILIBI *et al.*, 2008).

A aplicação da técnica de cultura das células de terceiros molares se inicia imediatamente à extração do dente do indivíduo, sendo alguns estágios de desenvolvimento do dente mais favoráveis para a cultura (DUAILIBI *et al.*, 2011). O uso de medicações pré-operatórias com objetivo de reduzir o trauma local e dor pós-operatória constitui uma rotina na prática odontológica, uma vez sabido que quando o paciente é submetido ao procedimento mais invasivo, haverá um aumento na quantidade de trauma ao sítio cirúrgico e aos tecidos circundantes (KIM *et al.*, 2009).

Em relação aos medicamentos pré-operatórios, foi observado que a amoxicilina, um antibiótico eficaz, administrada por via oral reduz a incidência de alveolite, proporciona resultados melhores na abertura de boca após a cirurgia (BEZERRA *et al.*, 2011) e previne a infecção da ferida pós-operatória (KLONGNOI *et al.*, 2012). A dexametasona (DEXA) é um glicocorticóide sintético (LOEW, SHUSTER, GRAUL, 1986; PORTER, HUCKLE, GOLDSTEIN, 2003; QUECKENBERG *et al.*, 2011), usado como um anti-inflamatório (KOROLKOVAS, 1999) considerado um esteróide de longa ação e sua síntese ocorre no córtex da glândula adrenal. Existem receptores de glicocorticóides praticamente em todas as células do corpo, que exercem amplas ações fisiológicas afetando quase todos os órgãos. O processo inflamatório é composto de algumas fases, e os glicocorticóides exercem sua ação em praticamente todas essas etapas: induzindo a diminuição da dilatação capilar, diminuindo linfócitos circulantes, inibindo a proliferação de fibroblastos, e inibindo as prostaglandinas e leucotrienos, produzindo efeito sobre a inflamação do tecido. Ao ser administrada DEXA, a redução da dor ocorre pela inibição da liberação de mediadores como linfocinas, prostaglandinas, serotonina e bradicinina existentes no tecido lesionado (KLONGNOI *et al.*, 2012). Além disso, os glicocorticóides são agentes eficazes na redução de sequelas pós-operatórias como dor, edema e trismo, após a cirurgia (KIM *et al.*, 2009; KLONGNOI *et al.*, 2012). No presente momento, sabe-se que o efeito da dexametasona entra em ação imediatamente após o efeito traumático da cirurgia, sendo necessária sua utilização 1 hora antecedente à cirurgia (KLONGNOI *et al.*, 2012). Além de suas propriedades anti-inflamatórias, a DEXA também é utilizada agregada a meios de cultura, devido ao seu baixo custo e por seus bons resultados no sentido de induzir a diferenciação osteoblástica de células-tronco mesenquimais (PORTER, HUCKLE, GOLDSTEIN, 2003) e o desenvolvimento

osteogênico (HILDEBRANDT *et al.*, 2009). Este glicocorticóide age tanto em fases precoces quanto tardias da diferenciação osteogênica bem como acelera a maturação osteoblástica, porém, os mecanismos ainda são pouco claros (PORTER PORTER, HUCKLE, GOLDSTEIN, 2003).

Efeitos indesejados produzidos pela DEXA quando adicionada a meios de cultura são: diminuir expressão de colágeno do tipo I e aumentar a maturação dos adipócitos em cultura (BERESFORD *et al.*, 1992). Estudos demonstram que, quando administrado em longos períodos por via sistêmica, os glicocorticoides produzem efeitos secundários metabólicos como: resistência à insulina, hipertensão, glaucoma e osteoporose (UYL, BULTINK, LEMS, 2011).

Considerando que a DEXA age positivamente sobre a dor e as demais fases da inflamação quando administrada via oral e sabendo que quando adicionada diretamente a meios de cultura produz um efeito osteoindutor, é necessário conhecer o comportamento celular *in vitro* após a exposição à medicação.

OBJETIVO

2. OBJETIVO

Avaliar o efeito da dexametasona administrada como medicação pré-operatória na cultura de células primárias de polpa dental.

LITERATURA

3. LITERATURA

3.1. ENGENHARIA TECIDUAL (ET)

BISCEGLIE (1933) demonstrou que a Engenharia Tecidual era possível por meio de um experimento em que foram utilizadas células de tumor de rato envoltas por uma membrana de polímero e estas foram inseridas no interior da cavidade abdominal de um porco. O resultado obtido demonstrou que as células sobreviveram, ou seja, elas não foram destruídas pelo sistema imunológico, pois os nutrientes e resíduos podiam se difundir através das membranas, porém as células imunitárias ou de moléculas grandes, tais como anticorpos (que podem destruir as células encapsuladas) foram impedidas de entrar.

CARREL & LINDBERGH (1935) descreveram um método que consistia em manter vivos órgãos de animais, geralmente aves ou gatos, fora do organismo de origem. O experimento foi realizado com animais recém mortos, onde estes tinham o órgão escolhido extirpado juntamente com os tecidos circundantes, artérias, veias, nervos e vasos linfáticos. O órgão manteve-se nutrido por meio de perfusão de substâncias realizada por uma bomba peristáltica perfusora. Essas substâncias eram compostas de produtos protéicos, hemina, cisteína, insulina, tiroxina, glucose, vitamina A, ácido ascórbico, soro do sangue, etc. Em alguns experimentos, a hemoglobina era adicionada ao fenol vermelho funcionando como indicador da atividade metabólica do órgão e da ocorrência da infecção bacteriana. Os autores obtiveram sucesso com este estudo e concluíram que seria possível manter um órgão vivo, tal como o ovário, *in vitro*, sugerindo expansão das idéias à outras áreas da biologia.

VACANTI *et al.* (1988) utilizaram células de fígado para desenvolver estruturas tridimensionais, onde observaram que essas estruturas permitiram que grande número de células fossem alojadas, condição necessária para a criação de tecidos em três dimensões.

Na década de 90, observando dados estatísticos sobre americanos que vão a óbito devido a perda de órgãos, falência dos mesmos, assim como a rejeição de órgãos transplantados, LANGER & VACANTI (1993) propõe em seu artigo a aplicação das técnicas da ET com o objetivo de desenvolver substitutos biológicos que restauram, melhoram ou mantêm a função do tecido. Classificaram a ET como um campo interdisciplinar que aplica os princípios da biologia e da Engenharia para o desenvolvimento de substitutos funcionais. Descreveram três estratégias para que um novo tecido pudesse ser criado: 1) células isoladas ou substitutos celulares. Promove a substituição de apenas as células que fornecem a função necessária, sendo realizado um procedimento cirúrgico para implantação de um biomaterial que estimulará as células do receptor a promover a regeneração tecidual; 2) utilização de fatores de crescimento que irão estimular a diferenciação e a migração celular para o local alvo da regeneração; 3) Utilização de células agregadas a um *scaffold*, podendo ser composto por materiais naturais, como colágeno ou de polímeros sintéticos. Os autores relatam dois tipos de sistema: fechados, onde as células são isoladas a partir do corpo por uma membrana que permite a permeação de nutrientes e resíduos, evitando que anticorpos ou células imunitárias levem a destruição do transplante, podendo ser implantados ou utilizados como dispositivos extracorpóreos. E sistemas abertos, células associadas a um *scaffold* são implantadas e incorporadas ao corpo. A rejeição imunológica pode ser impedida

pelo uso de drogas imunossupressoras ou utilizando células autólogas. Neste mesmo estudo os autores discutem perspectivas para a técnica e o futuro promissor da ET.

De acordo com LANGER (2000), a ET apresenta vantagens particulares sobre outras terapias, como drogas, no sentido de fornecer solução definitiva ao problema de falência de órgãos.

KHADEMHOSEINI *et al.* (2006) definiram ET como um campo interdisciplinar que aplica os princípios da Engenharia e ciências da vida para o desenvolvimento de substitutos biológicos que restauram, mantêm ou melhoram a função do tecido.

Segundo TATULLO *et al.* (2015), células-tronco são células imaturas e não especializadas, com a capacidade de se renovar e dividir-se indefinidamente por meio de “auto-renovação” e ainda de se diferenciar em diversas linhagens celulares. Afirmam que as células-tronco exercem um papel importante na Medicina Regenerativa, como a reparação de órgão e tecidos e são divididas em três tipos principais que podem ser utilizadas para a reparação e regeneração do tecido: a) as células-tronco embrionárias, derivadas de embriões; b) as células-tronco adultas, derivadas do tecido adulto; e c) células-tronco pluripotente induzidas (iPS), produzidas artificialmente através de manipulação genética de células somáticas.

3.2. ENGENHARIA TECIDUAL E ODONTOLOGIA

DUAILIBI *et al.* (2004) realizaram um estudo a partir da extração de germes dentários de ratos Lewis para obtenção de células-tronco. As células foram cultivadas, expandidas, semeadas em *scaffolds* e posteriormente implantadas no omento dos ratos. O trabalho teve como doador e receptor o mesmo indivíduo e demonstrou o uso bem sucedido de abordagens de ET para gerar tecidos dentários.

DUAILIBI *et al.* (2006) informaram que a ET oferece oportunidades para estudos inovadores de pesquisa colaborativa, integrando as áreas de medicina, biologia do desenvolvimento, e as ciências físicas. Neste sentido, acreditam que os recentes avanços nos campos da Engenharia de tecidos dentários, ciência de materiais e biologia das células estaminais, tornarão possível a regeneração do dente em um futuro previsível. Os autores afirmaram que apesar de os dentes humanos: incisivos, caninos, pré-molares e molares apresentarem morfologias distintas, estes se desenvolvem praticamente do mesmo modo, sendo provenientes de interações recíprocas entre o epitélio dental e a crista neural de células derivadas de ectomesênquima, onde esta é iniciada pelo epitélio dental e segue através de cinco estágios morfológicos distintos: botão, capuz, campânula, coroa e raiz.

Após desenvolverem estudos bem sucedidos com implante de células de germes dentais em omento de ratos, DUAILIBI *et al.* (2008), realizaram um estudo, onde cultivaram células de germes dentais em *scaffolds* biodegradáveis que posteriormente foram implantadas em mandíbula de ratos. Novamente resul-

tados significativos foram obtidos, sendo observadas pequenas e organizadas coroas de dentes, formadas por bioengenharia. A estrutura continha dentina, esmalte, polpa e tecidos do ligamento periodontal. Contudo, concluíram que os tecidos dos dentes formados a partir de bioengenharia podem ser regenerados no próprio local de formação natural.

DUAILIBI *et al.* (2011), desenvolveram um método de classificação a partir da correlação entre o estágio de desenvolvimento do dente humano e a cultura de células –tronco dentais. O método consistiu em avaliar os estágios de dentes terceiros molares tanto radiograficamente quanto em relação as Unidades formadoras de colônia (CFU) com a finalidade de definir o estágio de desenvolvimento onde será possível obter melhor qualidade e quantidade de células- tronco dentais (DSC) e com isto tornar precisa a utilização de DSC em futuras aplicações de ET.

ESTRELA *et al.* (2011) afirmaram que as pesquisas com células-tronco têm aumentado exponencialmente pelo fato de melhorar a qualidade de vida de pessoas com diversas doenças e por apresentar resultados em pesquisas na área de MR, visando possível substituição de órgãos perdidos. Os autores realizaram uma revisão descrevendo novos achados no campo da pesquisa com células-tronco dentais e seu potencial uso na regeneração tecidual. Relataram também que os tecidos dentais são uma fonte rica de células-tronco mesenquimais e adequado para aplicações em engenharia tecidual, pois estas células têm o potencial de diferenciarem-se em diversos tipos celulares, incluindo osteoblastos, células progenitoras de neurônios, condrócitos e adipócitos.

SUJESH *et al.* (2012) registraram em um artigo, as diversas fontes de obtenção de células-tronco. Afirmaram que na área odontológica a regeneração do dente tem sido um dos principais objetivos da Engenharia Tecidual, nesse sentido para gerar dentes e estruturas dentais é necessária manipulação de células-tronco, bem como sinergia entre todos os eventos celulares e moleculares que conduzem à formação de tecidos específicos do dente. Esta avaliação incide sobre as diferentes fontes de células-tronco que foram usados para fazer dentes *in vitro* e sua eficiência relativa. Os autores relataram que as células-tronco embrionárias, células-tronco pós-natais e adultas comprovaram possuir grande potencial regenerativo, porém sua aplicação na prática odontológica é ainda limitada devido a diversos parâmetros não estarem bem definidos, como o alto risco de rejeição, o comportamento das células, período de erupção do dente, morfologia da coroa e cor adequada. Afirmam ainda que, o uso de células-tronco na odontologia é promissor apesar de existirem alguns desafios.

De acordo com OSHIMA & TSUJI (2014), a Terapia Regenerativa para o reparo do tecido dentário e substituição do dente é considerada um conceito terapêutico novo com o potencial para a recuperação da função do dente. Diversos tipos de células-tronco e de células ativadoras de citocinas foram identificadas em tecidos orais, sendo consideradas fontes para terapias de regeneração tecidual do dente, devido a sua capacidade de se diferenciar em tecido dentário *in vitro* e *in vivo*. Após realizarem um estudo prévio, onde descreveram um método tridimensional de manipulação de células, nomeado “método de germe de órgãos”, com a finalidade de utilizar os princípios da organogênese, realizando a agregação de células epiteliais e mesenquimais, os autores tiveram como objetivo verificar se os dentes desenvolvidos por meio

desta técnica possuíam contato oclusal bem como inervação. Concluíram que tanto a técnica de regeneração realizada por meio de transplante de um germe dental quanto a técnica realizada por meio de transplante de um dente formado atingiam o plano oclusal bem como demonstraram que as fibras nervosas sensoriais e simpáticas inervaram tanto a região pulpar como a região de ligamento periodontal. Notaram que estes dentes possuíam potencial para percepção de estímulos nociceptivos incluindo lesões pulpares e tratamento ortodôntico. Apesar de encontrarem resultados promissores, os autores afirmam serem necessários outros estudos a fim de estabelecer uma técnica que controle a morfologia do dente, incluindo o uso de *scaffolds* e a identificação de genes e citocinas relacionados com a morfogênese.

MITSIADIS & HARADA (2015) publicaram um artigo com o objetivo de atualizar informações sobre a regeneração de um órgão dentário. Os autores descreveram as fontes de células-tronco voltadas à odontologia, o desenvolvimento de dentes íntegros e a importância das iPS, onde afirmaram que esta tem a capacidade de se diferenciar em diversas linhagens de células, como exemplo em células mesenquimais odontogênicas. Ressaltaram que embora a utilização dessas células seja promissora, é necessário melhor conhecimento da técnica quanto à diferenciação. Relataram que o processo de formação completo dos dentes dura mais de dez anos, sendo necessário que questões relativas ao tempo de desenvolvimento e erupção dos dentes, estética dental e dimensão sejam claramente definidas antes do transplante em pacientes. Concluíram que apesar da nanotecnologia oferecer diversas perspectivas positivas para a odontologia regenerativa, ainda são necessários estudos em animais, seguido de seres humanos, para que possa ser aplicada a clínica.

TATULLO *et al.* (2015), realizaram um estudo onde abordaram assuntos referentes a diversos aspectos de *MSCs* (células-tronco mesenquimais), tanto aspectos éticos, pois podem ser extraídas de pacientes adultos quanto a fonte celular. Os autores afirmam que a cavidade oral passou a ser uma importante fonte de *MSCs* por ser de fácil acesso para o cirurgião, evitando, assim, o aumento da morbidade do paciente. Exemplos de células-tronco da cavidade oral: *DPSCs Dental Pulp*, *SHED human Exfoliated Deciduous Teeth*, *PDLSCs Periodontal*, *SCAP Apical Papilla*, *DFSCs Dental Follicle hPCy-*MSCs* human and Periapical cyst*. Relatam que atualmente os tecidos dentais e orofaciais adquiriram interesse como uma fonte mais acessível de *MSCs*, devido ao fato de a área oral ser rica em *MSCs*. Hoje em dia, cada população de células que possui as seguintes características independentemente da sua fonte de tecido, são geralmente referidas como *MSCs*: i) que aderem ao plástico e têm uma morfologia tipo fibroblasto; ii) têm a capacidade de auto-renovação e podem se diferenciar em células da linhagem mesenquimal, como osteócitos, condrócitos e adipócitos. Além disso, as *MSCs* também podem diferenciar-se, sob condições adequadas, em células de linhagens endodérmica e ectodérmica, tais como os neurônios e hepatócitos.

3.3. FARMACOCINÉTICA DA DEXAMETASONA

LOEW, SHUSTER, GRAUL (1986), afirmaram que a dexametasona é um dos glicocorticóides sintéticos mais potentes, utilizados como terapia adicional em muitas doenças por possuírem bons efeitos inflamatórios, imunossupressores e antiexudativo. Os autores realizaram um estudo com objetivo de investigarem a dose-dependência da farmacocinética da dexametasona e sua influência sobre a supressão do cortisol endógeno. Selecionaram dez mulheres saudáveis, com idades entre 21-60 anos e peso entre 60-74kg, onde inicialmente, no intervalo de quatro meses, cada uma das voluntárias recebiam diferentes doses de dexametasona (0,5mg v.o., 1,5mg v.o. e 3mg i.m.). Previamente ao início do estudo, o nível de cortisol do plasma foi medido em diferentes intervalos de tempo. Após isso, as voluntárias receberam as doses apropriadas de dexametasona de 8/8hs e amostras de sangue foram colhidas em intervalos de 20', 40', 60' e 90' e 2h, 4h, 7h, 12h e 24h. O perfil 24 h de cortisol foi determinado a 10:00, 24:00, 15:00 e 18:00 e no dia seguinte as 8am. Imediatamente após a colheita das amostras, o plasma foi separado e congelado a - 20 °C até a análise. A dexametasona foi determinada por radioimunoensaio. O cortisol foi determinado por um kit de ¹²⁵I-cortisol do CIS (Service Isotop Oeste, Dreieich FRG). A avaliação dos dados de farmacocinética foram realizadas com o auxílio de um modelo de dois compartimentos com um compartimento periférico e utilizando o programa padronizado TopFit iteração. Concluíram que o nível plasmático máximo ocorreu entre 1,6 e 2,0 h após uma dose de 0,5-3,0 mg, independente do tipo de administração.

Segundo KOROLKOVAS (1999), a dexametasona possui farmacodinâmica adrenocorticóide, antiasmático, antialérgico, antiinflamatório, imunossupressor, antiemético (na quimioterapia do câncer), agente de diagnóstico (da síndrome de Cushing) e auxiliar de diagnóstico (da depressão endógena). Em relação a farmacocinética, é rapidamente absorvida do trato gastrointestinal, mucosa nasal, pulmões e olho, dependendo da via de administração utilizada. O efeito máximo é atingido em 1 a 2 horas (via oral) ou 8 horas (acetato de dexametasona, via intramuscular) e possui meia vida plasmática entre 3 a 4,5 horas.

QUECKENBERG *et al.* (2011) definiram a dexametasona como um glicocorticóide com atividade imunossupressora utilizado no tratamento de alergias, bronquiolite, entre outras. Realizaram um estudo randomizado com 24 voluntários, adultos e saudáveis, onde 9 eram do sexo masculino e 15 do sexo feminino com o objetivo de avaliar e comparar a farmacocinética, farmacodinâmica e biodisponibilidade de uma formulação líquida dexametasona, de uso pediátrico, com comprimidos ministrados via oral. Doses únicas, contendo 2 mg cada, foram administradas e amostras de sangue foram colhidas até 24 horas após a dose. Parâmetros farmacocinéticos foram comparados entre os tratamentos de acordo com a Agência Europeia de Medicamentos (EMA). Como uma variável farmacodinâmica, foi mensurada supressão de cortisol endógeno (pré-dose e após a administração). Os autores obtiveram como resultados que a farmacocinética das duas formulações (líquida e comprimido) foram semelhantes, farmacodinâmica mais alta entre variabilidade dos fármacos e todos os voluntários apresentaram supressão da secreção de cortisol endógeno. Em relação ao tempo de efeito máximo obtiveram

53'24'' para formulação líquida e 58'12'' para o comprimido.

De acordo com DRUG INFORMATION HAND BOOK (2015) o efeito de duração metabólica da dexametasona é de 72 horas, sendo metabolizada no fígado. O pico de ação é atingido em 1-2 horas quando administrada via oral e aproximadamente 8 horas quando em via intra-muscular e é excretada pela urina e fezes.

3.4. CULTURA CELULAR E DEXAMETASONA

NAIR *et al.* (2011) realizaram um estudo com micro esferas de Hidroxipropilcelulose imersas em DEXA (1 mg ml^{-1}) ou solução salina (controle) e estas foram implantadas no espaço subcutâneo dorsal de camundongos por 1 semana, com a finalidade de observar a influência de implantes alocados, associados à resposta inflamatória sobre o recrutamento de células-tronco. Após a análise, os autores verificaram que a administração de DEXA provocou a redução da resposta inflamatória e em quase 60% na densidade de células ao redor do implante revestido por DEXA em comparação com o grupo controle. Neste sentido, concluíram a partir dos resultados obtidos, que a liberação de quimiocinas inflamatórias e fatores de crescimento desempenham um papel importante no recrutamento autólogo de células-tronco, tendo papel de grande importância nas estratégias de regeneração dos tecidos.

WANG *et al.* (2012) definiram dexametasona como um membro sintético

de drogas esteróides potentes, da classe glicocorticóide que age como um anti-inflamatório e imunossupressor. Realizaram um estudo com células-tronco derivadas do cordão umbilical (*UC-MSC*) de doadoras grávidas saudáveis. As células foram isoladas e expandidas em meio essencial DMEM (Dulbecco) / F12 (1:1) (Gibco, Grand Island, NY, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS; Hyclone, Logan, UT, EUA), 100U/mL de penicilina estreptomicina (Sigma; St. Louis, MO, EUA), 1% de glutamina (Sigma) e 10 ng/mL de fator de crescimento epidérmico (EGF; Sigma). As culturas *UC-MSC* foram incubadas a 37° C em atmosfera umidificada com 5% de CO₂, e as células na passagem 4-6 foram utilizadas para os experimentos. Para o ensaio de proliferação, os autores utilizaram imunensaio colorimétrico ligado a enzima kit BrdU (ELISA) (Roche, Mannheim, Alemanha); 1x10⁴ de células de *UC-MSC*/poço foram cultivadas em placas de 96 poços (Corning; Steuben, New York, EUA) em meio de cultura descrito anteriormente, com diferentes concentrações de DEXA (10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸, 10⁻⁹ e 10⁻¹⁰ mol/L) (Sigma); O meio que não possuía DEXA foi utilizado como controle. Após 2 dias de incubação foi adicionada BrdU ao meio que continha as células e novamente foram incubadas durante mais 4 horas. Obtiveram como resultados que doses baixas de DEXA são aplicadas para promover a proliferação do *MSC*. Dados obtidos no estudo demonstraram que 10⁻⁹ mol/L de DEXA (em conjunto com EGF) aumentou significativamente a proliferação *UC-MSC* (P < 0,01) em comparação com o grupo de controle sem DEXA, e foi superior a outras dosagens. Demonstraram ainda, que uma alta dose de DEXA (10⁻⁸, 10⁻⁷ e 10⁻⁶ mol / L) sem soro produz apoptose induzida de *UC-MSC*, enquanto baixas doses de DEXA (10⁻¹⁰ e 10⁻⁹ mol / L), protegem contra a apoptose. Finalmente, concluíram que doses baixas de DEXA favorecem a expansão de *MSC in vitro*.

3.5. DEXAMETASONA E A ODONTOLOGIA

PORTER, HUCKLE, GOLDSTEIN (2003), realizaram um estudo para avaliar os efeitos do tratamento com DEXA sobre a proliferação e diferenciação de células-tronco de medula óssea (BMSCs) de ratos machos. Após as culturas realizadas, concluíram que presença contínua de DEXA (31 dias) resultava em muitos nódulos mineralizados, e em contra partida, a DEXA utilizada em menor tempo, resultava no aparecimento de poucos nódulos. Contudo, notou-se que a dexametasona age em vários pontos do processo de diferenciação para estimular a maturação osteoblástica.

Em um artigo de revisão sistemática, MARKIEWICZ *et al.* (2008) selecionaram 12 artigos, utilizando como critério os seguintes itens: publicação em inglês; ensaio clínico prospectivo; análise estatística descritiva (tamanho da amostra, média, desvio-padrão) sobre os resultados do estudo de edema, trismo e dor pré-operatória, no início (1-3 dias), e pós-remoção de terceiros molares, final (3 dias), ou a modificação de resultados de interesse em relação a corticóides e análise estatística foram extraídas de gráficos. Para estudos que relataram dor, foram selecionados os que utilizaram uma escala visual analógica (VAS), os elementos de dados necessários para ser relatado de modo que o desvio padrão pudesse ser computado. Os autores excluíram estudos retrospectivos e estudos onde os dados citados não eram adequados para obter o número de indivíduos, diferença na média ou diferença na média de desvio

padrão, diferença nos resultados no pré e pós-operatório, resultados variáveis tanto no grupo esteróide quanto no grupo controle. Os autores obtiveram como resultado da meta-análise, que a administração de corticóide (incluindo a dexametasona) no pré-operatório de cirurgias de terceiros molares, produziu uma redução de sintomas inflamatórios até sete dias após a cirurgia; sugeriram que a administração pré-operatória de corticóide reduz edema precoce e tardio e trismo comparados com os controles.

HILDEBRANDT, BÜTH, THIELECKE (2009) investigaram a influência de três diferentes meios de cultura: (1) alfa MEM, 15% FBS, (2) DMEM, 15% FBS e (3) MSCGM, suplementado com fator de crescimento de Single Quot 10%, na diferenciação osteogênica das células-tronco mesenquimais de cordão umbilical (UCB-MSCs), bem como realizaram uma análise sistemática das duas concentrações da dexametasona (10^{-8} M/ 10^{-7} M) em combinação ou não com BMP. Os autores observaram que o meio MSCGM suplementado com Single Quot 10% apresentou efeito favorável sobre a diferenciação osteogênica de UCB-MSCs e que a amostra que continha dexametasona 10^{-8} M, exibiu mineralização apenas quando associada a BMP-2, enquanto que a DEXA na concentração de 10^{-7} M dexametasona levou a um aumento da quantidade de matriz extra celular (EMC) mineralizada e a expressão de colágeno-1, independente da adição BMP-2.

De acordo com KIM *et al.* (2009) os sinais clássicos da inflamação são: dor, edema, eritema e perda de função e, comumente, ocorrem procedimentos cirúrgicos. Nesse estudo, os autores informaram que os glicocorticoides são cor-

ticosteróides, sintetizados no córtex da glândula adrenal e possuem efeito relativamente maior sobre o metabolismo de carboidratos do que na água e regulação de eletrólitos. Afirmaram que os glicocorticóides ativam receptores intracelulares específicos após difundir através das membranas da célula-alvo através de um complexo esteróide-receptor que é translocado até o núcleo da célula e age como um fator de transcrição de genes específicos para estimular ou inibir sua expressão, portanto, por conta deste procedimento de transcrição seu efeito não ocorre de imediato. No mesmo estudo, afirmaram que a supressão de cada fase da resposta inflamatória parecia estar relacionada com ação dos glicocorticóides, sendo essas: diminuição no número total de linfócitos circulantes, basófilos, eosinófilos e monócitos, diminuição da dilatação capilar, migração de leucócitos e fagocitose e inibição da formação de tecido de granulação por retardar a proliferação de fibroblastos e a síntese de colágeno.

MAJID & MAHMOOD (2011), compararam os efeitos entre a DEXA 4mg administrada via submucosa e via intramuscular como medicação pré-operatória em cirurgias de remoção de terceiro molar, obtendo resultados de redução de inchaço e dor significativos em comparação com o grupo controle. Observaram ainda que a DEXA administrada via submucosa minimizou significativamente o trismo, comparada ao controle. Em resumo, concluíram que a DEXA 4mg ministrada por via submucosa foi eficaz para reduzir edema, trismo e dor após a remoção de terceiros molares inferiores impactados, sendo comparável com a via intramuscular.

SPOORENBERG *et al.* (2013) selecionaram, em um estudo, 54 pacientes com indicação previa de extração de terceiros molares e realizaram a randomização destes. A divisão foi realizada na proporção de (1:1:1) e um grupo foi medicado 1 hora antes ao ato cirúrgico com dexametasona 8mg, outro com diclofenaco de sódio 50mg e outro com placebo. A intensidade da dor foi mensurada com uma Escala Visual Analógica (VAS) em diferentes intervalos do pós operatório. Os autores compararam os efeitos analgésicos dos medicamentos administrados e concluíram que a dexametasona 8mg administrada via oral foi mais efetiva no controle da dor pós-operatória a que o diclofenaco de sódio 50mg e placebo.

Em um estudo randomizado NOBOA *et al.* (2014) avaliaram a dor, edema e trismo no pós-operatório de pacientes submetidos a cirurgia de terceiros molares inclusos após a administração de dexametasona, por via oral ou por injeção local submucosa. Foram selecionados pacientes que possuíam indicação cirúrgica de extração de terceiros molares inferiores e estes foram divididos em grupo A (injeção local submucosa de dexametasona (4mg/1mL) após a anestesia local e grupo B (1 comprimido de dexametasona (4mg), por via oral, uma hora antes do procedimento). Sinais de edema e trismo foram avaliados clinicamente no pré-operatório e nos 1º, 2º, 3º e 7º dias de pós-operatório. Os autores analisaram os resultados e não observaram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, porém concluíram que as duas vias de administração da dexametasona foram eficazes no controle da dor, edema e trismo após cirurgias de terceiros molares inferiores.

4. MÉTODOS

4.1. CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO

O presente estudo apresenta caráter primário, intervencional, experimental, longitudinal, prospectivo, analítico, controlado, realizado em centro único.

4.2. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram incluídos neste estudo, dentes terceiros molares intra-ósseo, de pacientes com indicação clínica de remoção do mesmo, de ambos os gêneros, com idade entre 14 e 20 anos. Os pacientes em questão não faziam uso crônico de medicamentos, não apresentavam doenças sistêmicas, não possuíam hipersensibilidade aos fármacos utilizados (amoxicilina e dexametasona) e os terceiros molares estavam em estágios 2-3 segundo a classificação de DUAİLBI *et al.* (2011). A concordância na participação voluntária foi manifestada por meio de assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO I) e em caso de menores de 18 (dezoito) anos de idade a assinatura do Termo de Assentimento (TA) (ANEXO II) do sujeito e seu responsável legal.

4.3. CRITÉRIOS DE NÃO INCLUSÃO

Não foram incluídos pacientes que possuíam terceiros molares com necessidade de odontosseção ou desgaste coronário, portadores de doenças infecto-contagiosas ou sistêmicas, pacientes com anomalia dentária de qualquer natureza, pacientes com o dente terceiro molar com exposição coronária ao meio bucal, contaminados ou próximos a regiões contaminadas.

4.4. AMOSTRAS

As amostras contendo células humanas foram obtidas de doadores voluntários que possuíam indicação clínica e radiográfica de extração de terceiros molares superiores, realizadas por único cirurgião-dentista. Os pacientes foram selecionados a partir do encaminhamento para extração dos terceiros molares. Previamente a cirurgia, e seguindo a rotina na prática odontológica, foram utilizados dois protocolos de medicação pré-operatória.

Os pacientes foram submetidos a duas cirurgias para a obtenção de duas amostras, portanto, foram realizados dois tempos cirúrgicos, sendo extraído no primeiro tempo cirúrgico terceiro molar superior do lado direito e em outro tempo cirúrgico o terceiro molar superior esquerdo para que não comprometesse a função mastigatória e de deglutição, além de não comprometer a recuperação pós-operatória. Neste sentido, quando o dente de um lado foi extraído, o paciente permaneceu com o lado oposto livre para cumprir suas funções e diminuir o contato de resíduos no local da extração. No primeiro tempo cirúrgico foi aplicado o protocolo A e no segundo tempo cirúrgico protocolo B. No protocolo

A, a medicação era composta de 4 comprimidos de amoxicilina 500mg (antibiótico) e no protocolo B, de 4 comprimidos de amoxicilina 500mg (antibiótico) + 2 comprimidos de dexametasona 4mg (anti-inflamatório hormonal) por via oral uma hora antes ao ato cirúrgico. Os dois protocolos em questão são utilizados em universidades e por profissionais cirurgiões-dentistas na prática odontológica há muitos anos e obedecem os mesmos princípios, que são o de reduzir os efeitos pós-operatórios como por exemplo: edema, trismo, limitação na abertura de boca, entre outros, de modo que não houve distinção entre os benefícios promovidos ao paciente.

As etapas cirúrgicas consistiram em: 1) Antissepsia intra e extra-oral com clorexidina 2%, 2) Instalação de campos operatórios esterilizados, 3) Anestesia local com Mepivacaína 2% c/ Epinefrina 1:100.000, 4) Remoção do terceiro molar e 5) Sutura com fio de sutura agulhado, seda preta trançada 000. Após a cirurgia o dente foi colocado em um tubo falcon com meio de preservação (HBSS- *Hanks Balanced Salt Solution*) e transportado sob temperatura de 37°C até o Laboratório de Engenharia Tecidual e Biofabricação do Centro de Terapia Celular e Molecular (CTCmol) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) onde foram iniciadas as etapas laboratoriais. Foram obtidas três amostras, onde cada uma possuía dois dentes incluídos. Um panorama geral dos métodos pode ser observado nos Apêndices 1 e 2.

4.5. OBTENÇÃO DE CÉLULAS

Os dentes terceiros molares foram pesados em uma balança de precisão, modelo AY220, SHIMADZU e, em seguida, foi realizada a separação dos tecidos mineralizado e do não mineralizado para a obtenção dos explantes. Os procedimentos ocorreram de acordo com a técnica descrita por DUAIBI *et al.* (2004). A polpa dental foi fragmentada com auxílio de lâminas de bisturi nº 13, alocada em placa Petri, nas dimensões de 1 mm. Os explantes foram posicionados em *well-plates* de 6 para obtenção de células. O cultivo ocorreu até a migração e confluência total. O meio de cultura era trocado a cada três dias, utilizando o meio DMEM/HAM'S F12 1:1 (Dulbecco's Modified Eagle's médium/ Ham's F-12 nutrient mixture), suplementado com 5% de FBS e 0,5% dos antibióticos penicilina (LGC Biotecnologia, Brasil) e streptomicina (LGC Biotecnologia, Brasil). As células foram mantidas em incubadora com umidade relativa de 95% de oxigênio e 5% de dióxido de carbono, em temperatura de 37° C, onde foram cultivadas até a segunda passagem, atingindo a confluência necessária com um total de $41,6 \times 10^6$ de células.

4.6. PROLIFERAÇÃO CELULAR

As células em cultura foram tripsinizadas conforme o protocolo do Laboratório de Engenharia Tecidual e Biofabricação (Apêndice 3). Em seguida foi realizada a homogeneização do *pellet* formado em meio de cultura, por meio de aspirações e ejeções sucessivas, com auxílio de uma pipeta e pipetador eletrônico. O conteúdo do concentrado celular homogeneizado foi retirado, no volume de 10 microlitros, utilizando uma micropipeta e ponteira descartável, posteriormente transferido para um *ependorf*, sendo misturado com o mesmo

volume do corante *trypan blue* a 0,4% e novamente homogeneizado. Após esta etapa, pipetou-se 10 microlitros da solução corada, sendo transferida para o espaço destinado na *chamber slide* para a avaliação da proliferação. A amostra foi introduzida no contador de células automático (Countess®– Invitrogen) que calculou a quantidade de células totais, vivas e mortas (Figura 1). Este procedimento foi realizado após a expansão celular e ao final de todas as tripsinizações. Todas as garrafas T75 iniciavam com 2×10^6 antes das etapas experimentais.

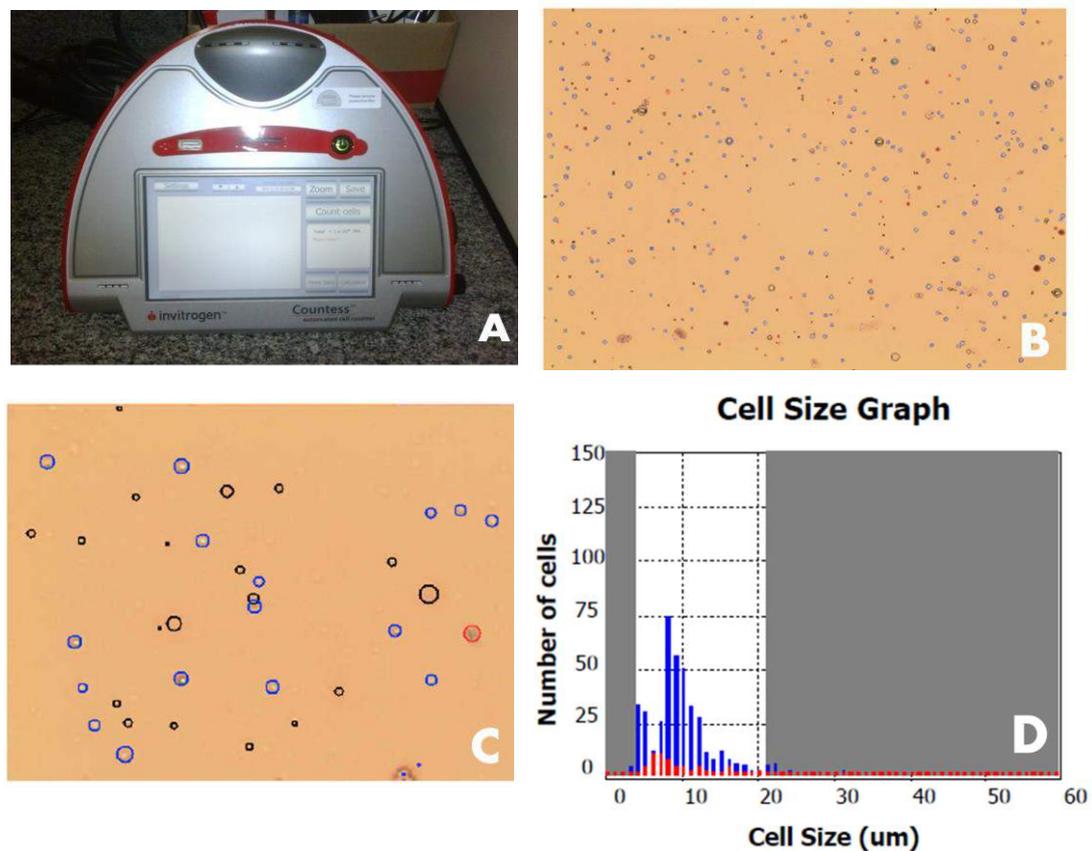


Figura 1: Etapa de Proliferação- contador automático (A), imagem das células contidas na *chamber slide* (B), imagem das células com aumento do zoom (C), gráfico final demonstrando a quantidade de células vivas e células mortas.

4.7. OBTENÇÃO DE IMAGENS

As células foram fotografadas em seu local de incubação sob microscopia óptica invertida AXIOVERT 40C (*Carl Zeiss*[®]) por meio do *Software AxioVision*[®]4.1- Germany.

4.8. TESTE DE VIABILIDADE CELULAR

O teste do *methylthiazol tetrazolium* (MTT) baseia-se na redução dos sais amarelos de tetrazólio por redutases mitocondriais de células metabolicamente ativas. Formam-se, intracelularmente, cristais azuis que são solubilizados e posteriormente analisados por espectrofotometria Ultra Violeta (UV) visível. Deste modo, quanto menor a viabilidade celular, menor a redução do MTT e menor o sinal espectrofotométrico (MOSMANN, 1983).

As células tripsinizadas foram previamente plaqueadas em *well-plates* de 96 em uma quantidade padronizada de 1×10^5 células por poço, em triplicatas. Inicialmente foram avaliadas as amostras individualmente para retirar possibilidades de viés (Figuras 2,3,4,5,6,7). Em seguida, foi adicionado 195µL de meio de cultura pré-aquecido a 37°C com 5µL de MTT por poço. As células foram incubadas durante 2 horas ao abrigo da luz. O sobrenadante foi removido com a inversão da microplaca. Posteriormente, foi adicionado 200µL de *Dimethyl Sulfoxide* (DMSO), para dissolução dos cristais e as placas foram agitadas em vórtex orbital. Finalmente, foi realizada a leitura da absorbância com o comprimento de onda 570 nanômetros (nm) com auxílio de um leitor de Espectrofotometria – Elisa (Figura 8). O procedimento foi igual em todos os intervalos fixados em 7, 14, 21 e 28 dias.

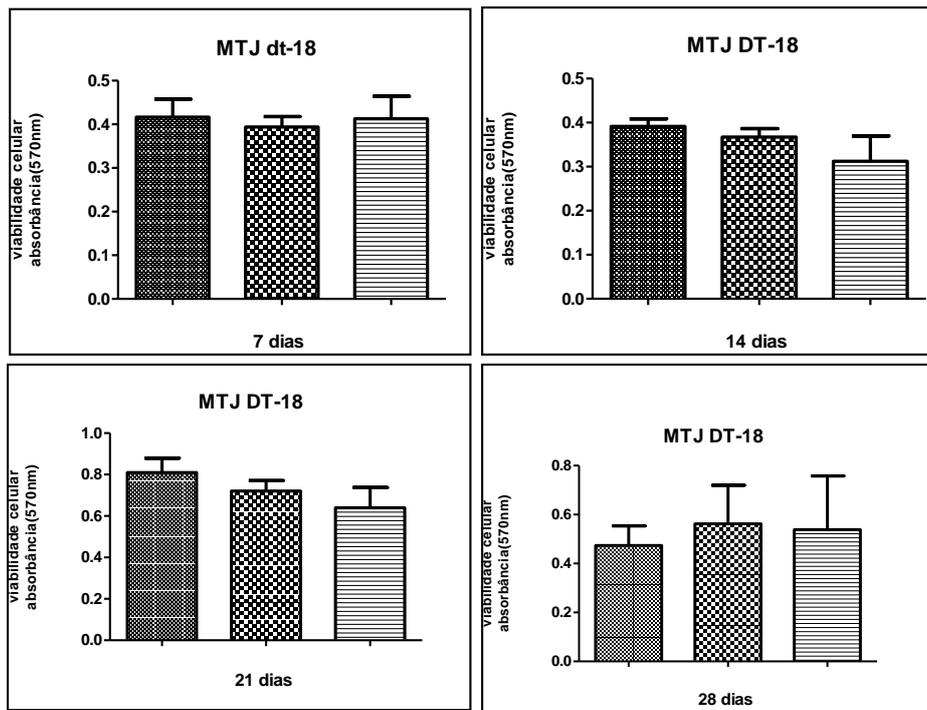


Figura 2: gráficos analisados em triplicatas nos intervalos de tempo fixados, Protocolo A (sem dexta), células da amostra 1.

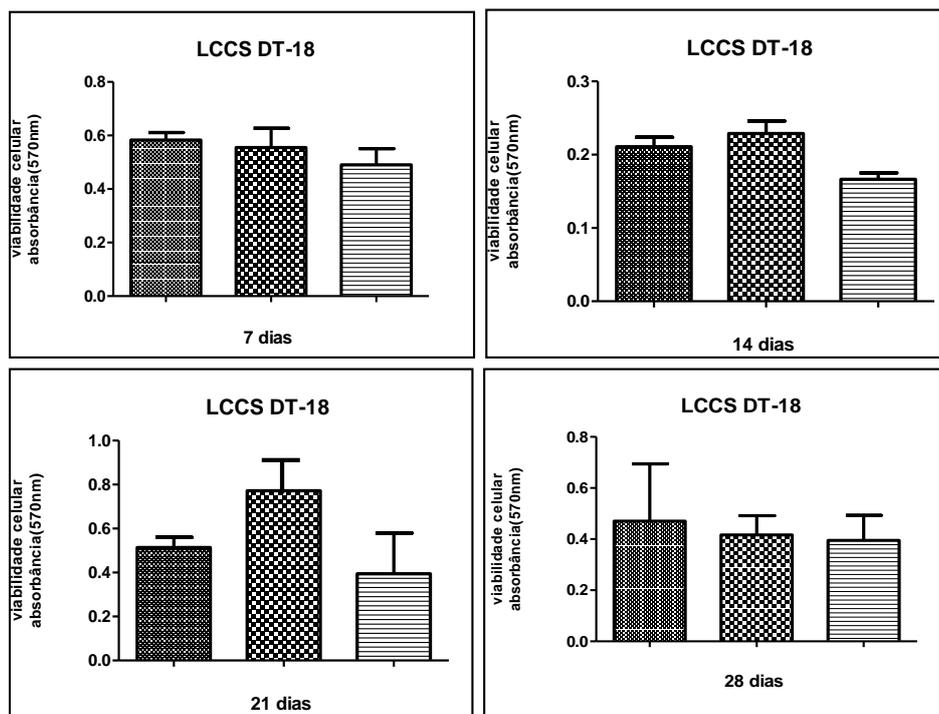


Figura 3: gráficos analisados em triplicatas nos intervalos de tempo fixados, Protocolo A (sem dexta), células da amostra 2.

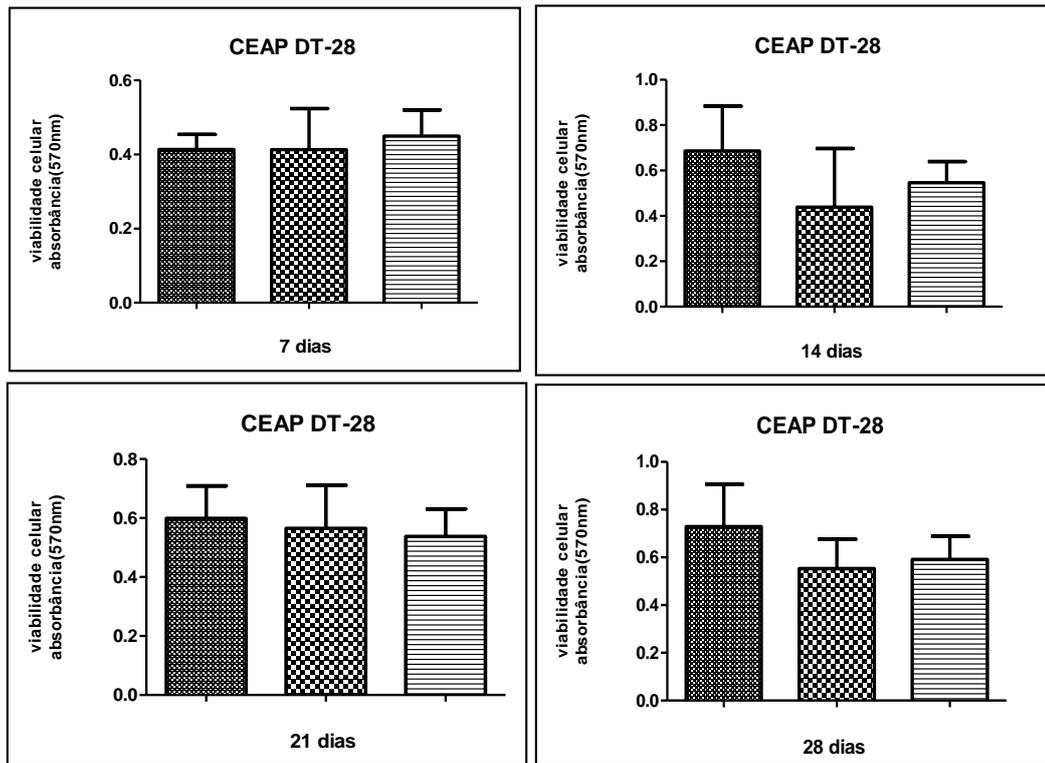


Figura 4: gráficos analisados em triplicatas nos intervalos de tempo fixados, Protocolo A (sem dexta), células da amostra 3.

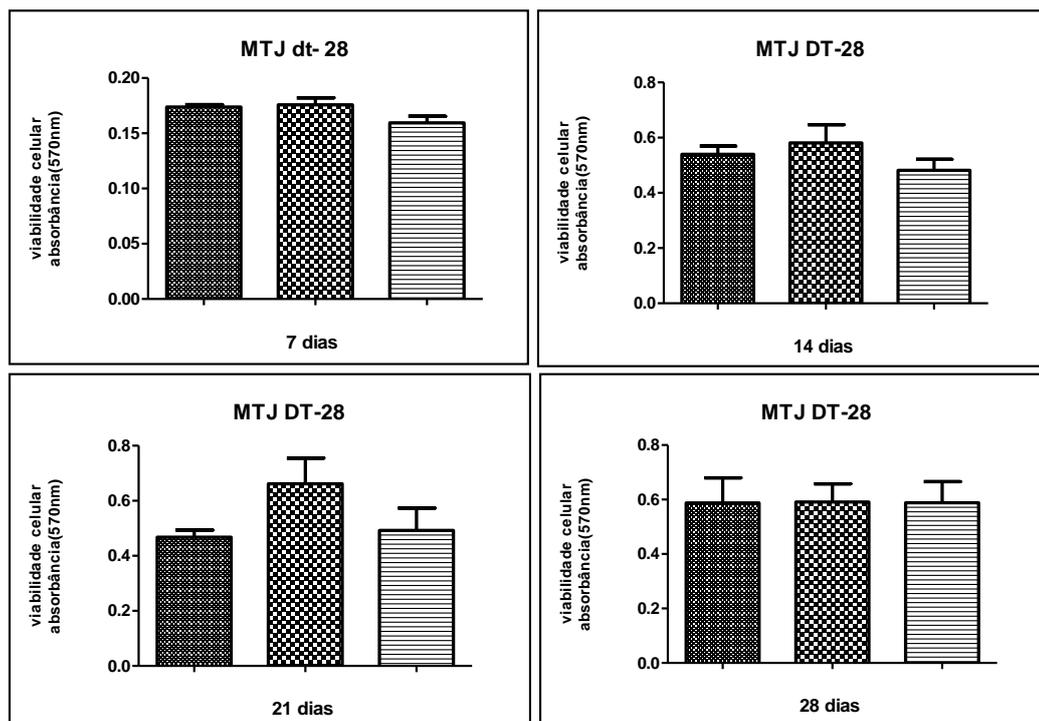


Figura 5: gráficos analisados em triplicatas nos intervalos de tempo fixados, Protocolo B (com dexta), células da amostra 1.

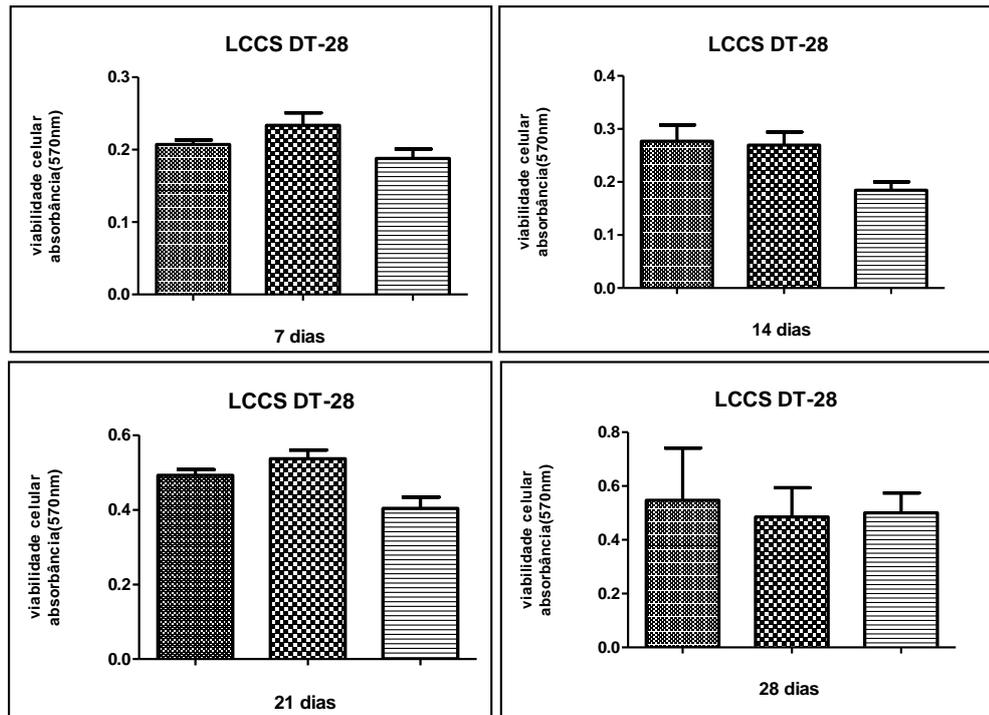


Figura 6: gráficos analisados em triplicatas nos intervalos de tempo fixados, Protocolo B (com dexta), células da amostra 2.

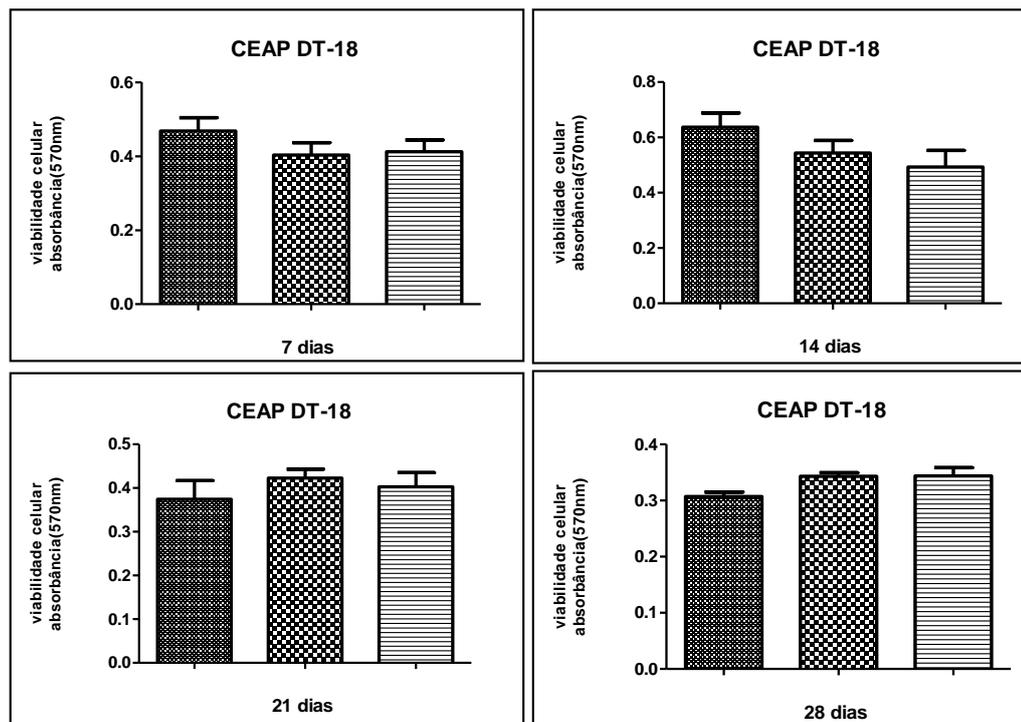


Figura 7: gráficos analisados em triplicatas nos intervalos de tempo fixados, Protocolo B (com dexta), células da amostra 3.

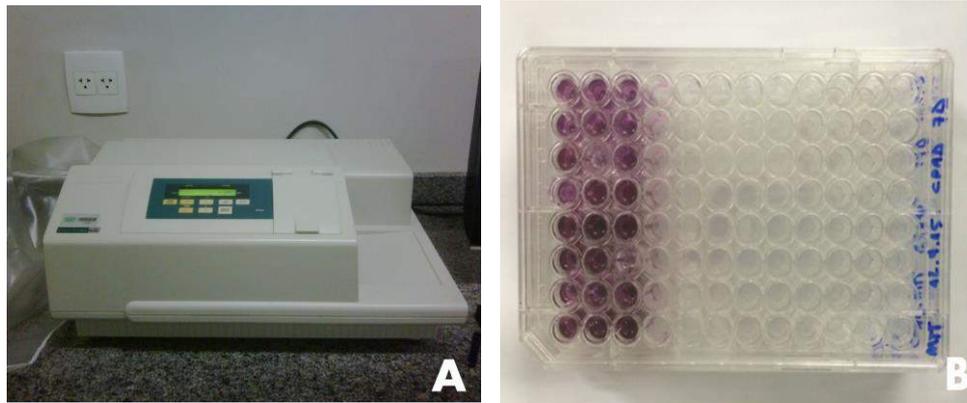


Figura 8: Teste de viabilidade- Espectrofotômetro de Elisa utilizado na leitura das amostras (A), *well plate*-96, poços contendo células, MTT (em sua forma reduzida) e DMSO- análise em triplicata (B).

4.9. ANÁLISE DE VON KOSSA

O método Von Kossa (Apêndice 4) fundamenta-se na ligação do cátion prata (Ag^2) (PUCHTLER, MELOAN, TERRY, 1969), com os íons que se ligam ao cálcio. É uma coloração que dá idéia indireta da quantidade de cálcio existente na amostra. A eosina é um contra-corante que dá destaque ao nódulo.

Inicialmente, foram plaqueadas em quatro *well plates*-6, identificadas em 7, 14, 21 e 28 dias, 1×10^6 células por poço. Nos diferentes intervalos de tempo fixados, os três poços da parte superior de cada *well plate* (Figura 9A) foram lavados por duas vezes com 1ml de água destilada e em seguida, foi adicionado 1ml de paraformaldeído 4%, em cada poço, por 15 minutos. Posteriormente, o paraformaldeído foi desprezado e os poços da *well plate*-6, lavados com 1ml de água destilada por três vezes. Foi adicionado 1ml de nitrato de prata 5%, por

poço, por 20 minutos sob luz ultra-violeta. A *well plate-6* foi lavada de 3 a 5 vezes com água destilada e foi adicionado tiosulfato 5%, deixando por 2 min. Novamente a *well plate-6* foi lavada de 3 a 5 vezes com água destilada e foi adicionado 1ml de eosina 0,1% por 3 minutos. A *well plate-6* foi lavada por mais uma vez com água destilada e finalmente realizada a análise em microscópio.

4.10. ANÁLISE COM ALIZARIN RED

Alizarin Red (Apêndice 5) reage com o cálcio e outros cátions (PUCHTLER, MELOAN, TERRY, 1969). O método *Alizarin Red* fundamenta-se na ligação do cátion prata (Ag^{2+}) com o cálcio ionizado (Ca^{2+}). É uma coloração que dá idéia direta da quantidade de cálcio existente na amostra. Para a preparação do corante, o *Alizarin Red* foi diluído na proporção de 2 gramas para 100ml em água destilada.

Inicialmente, foram plaqueadas em quatro *well plates-6*, identificadas em 7, 14, 21 e 28 dias, 1×10^6 células por poço. Nos diferentes intervalos de tempo fixados, os três poços inferiores de cada *well plate* (Figura 9B) foram lavados por três vezes com *PBS*. Após isso, foi adicionado 1ml de formaldeído 10% em cada poço durante 30 minutos, e em seguida, cada poço foi lavado com 1ml de água destilada. O corante *Alizarin Red* foi adicionado aos poços e a placa foi mantida em *shaker* orbital durante 10 minutos, sendo posteriormente lavada com água destilada. Os nódulos de calcificação foram analisados macro e microscopicamente, sendo verificado o tamanho mesmos com auxílio de microscopia óptica invertida AXIOVERT 40C (*Carl Zeiss*®) por meio do

Software AxioVision®4.1- Germany. Todas as análises foram realizadas em intervalos fixados de 7, 14, 21 e 28 dias.

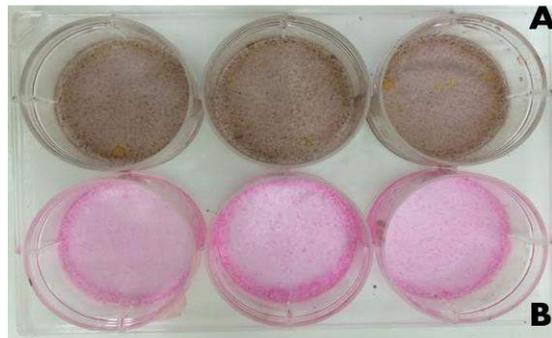


Figura 9: Von Kossa e *Alizarin Red*- análise das células da amostra 1 por teste Von Kossa realizada em triplicata (A), análise de *Alizarin Red* em triplicata (B). O mesmo procedimento foi realizado para todas as amostras de ambos protocolos.

4.11. ASPECTOS ÉTICOS

Contemplando os aspectos éticos da pesquisa científica com seres humanos, o presente projeto foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade de Federal de São Paulo- CEP/UNIFESP, com parecer registrado com protocolo nº72518 de 13/08/2012 (ANEXO III), obedecendo a Resolução 196/96.

A concordância da participação no estudo foi previamente concedida pelo sujeito por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre Esclarecido e em casos de menores de 18 (dezoito) anos de idade a concordância da participação no estudo foi realizada pelo sujeito e por seu responsável legal por meio do Termo de Assentimento.

4.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados por meio de Análise de variância de Friedman (SIEGEL & CASTELLAN, 2006) por meio do software BioStat, onde foram comparadas as variáveis estudadas no decorrer do tempo, sendo realizada separadamente para cada grupo. Os valores médios obtidos foram analisados pelo programa estatístico Prisma5® por meio da análise de *t test*, sendo fixado em 0,05 ou 5% o nível de rejeição da hipótese de nulidade.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. ANÁLISE CELULAR

As células obtidas nas amostras, do presente estudo, foram cultivadas até a segunda passagem, atingindo a confluência esperada de 100% (Figura 10A, B, C e D). Após o cultivo as células foram divididas em três grupos: proliferação, viabilidade e Von Kossa e *Alizarin Red*.

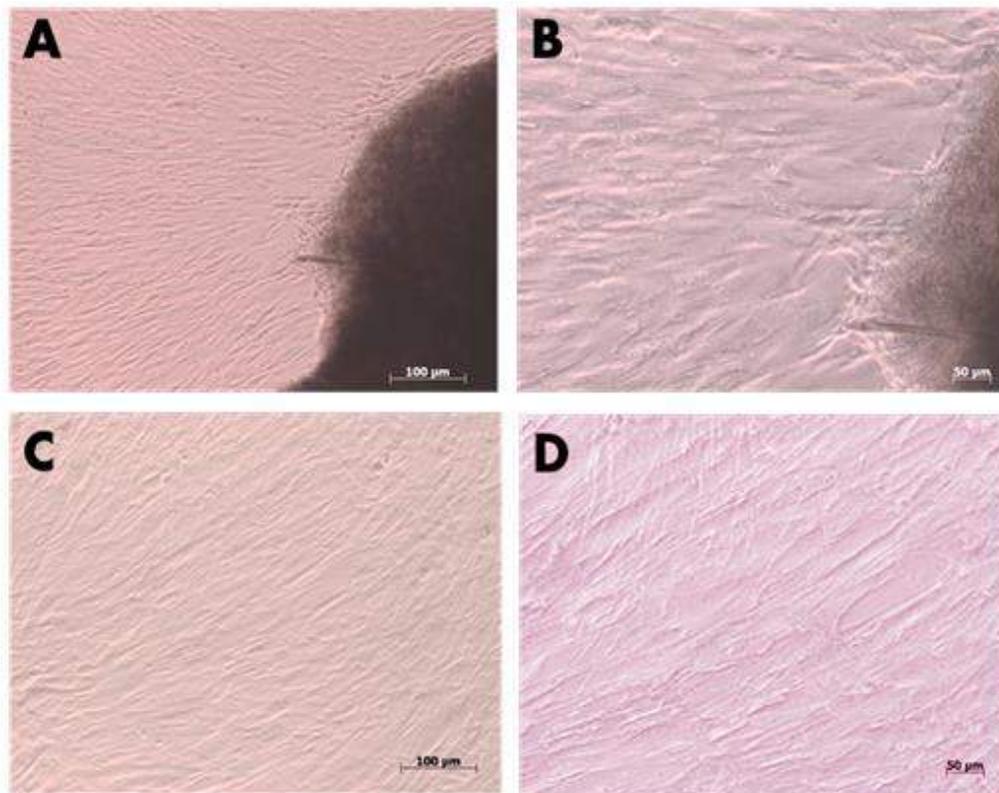


Figura 10: Confluência de células MTJ- Células desprendendo do explante, com aumento de 5x (A) e 10x (B), células em confluência total, cultivadas até a 2ª passagem, análise em microscopia óptica com aumento de 5x (C) e 10x (D).

5.2. ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO CELULAR

A proliferação foi avaliada com a utilização do corante *Trypan Blue*, nos intervalos de 7, 14, 21 e 28 dias.

Tabela 1: Descrição da proliferação de células da amostra 1, nos diferentes intervalos de tempo.

	Nº de células- Amostra 1			
	7	14	21	28
PROTOCOLO A	4,0x10 ⁶	9,5x10 ⁶	10x10 ⁶	5,5x10 ⁶
PROTOCOLO B	5,5x10 ⁶	7,5x10 ⁶	6,5x10 ⁶	5,0x10 ⁶

Tabela 2: Descrição da proliferação de células da amostra 2, nos diferentes intervalos de tempo.

	Nº de células- Amostra 2			
	7	14	21	28
PROTOCOLO A	4,8x10 ⁶	15x10 ⁶	16x10 ⁶	6,5x10 ⁶
PROTOCOLO B	4,0x10 ⁶	9,5x10 ⁶	5,5x10 ⁶	4,6x10 ⁶

Tabela 3: Descrição da proliferação de células da amostra 3, nos diferentes intervalos de tempo.

	Nº de células- Amostra 3			
	7	14	21	28
PROTOCOLO A	9,5x10 ⁶	18x10 ⁶	34x10 ⁶	21x10 ⁶
PROTOCOLO B	6,1x10 ⁶	15x10 ⁶	14x10 ⁶	13x10 ⁶

Resultados

Foi possível observar que as células dos três dentes cujos pacientes ingeriram 4mg de dexametasona (Protocolo B) previamente ao ato cirúrgico, obtiveram seu pico de proliferação aos 14 dias, seguindo para um declínio. Os dentes extraídos, cujos pacientes não ingeriram dexametasona (Protocolo A), o pico de proliferação foi aos 21 dias, seguindo para um declínio (Figuras 11 e 12).

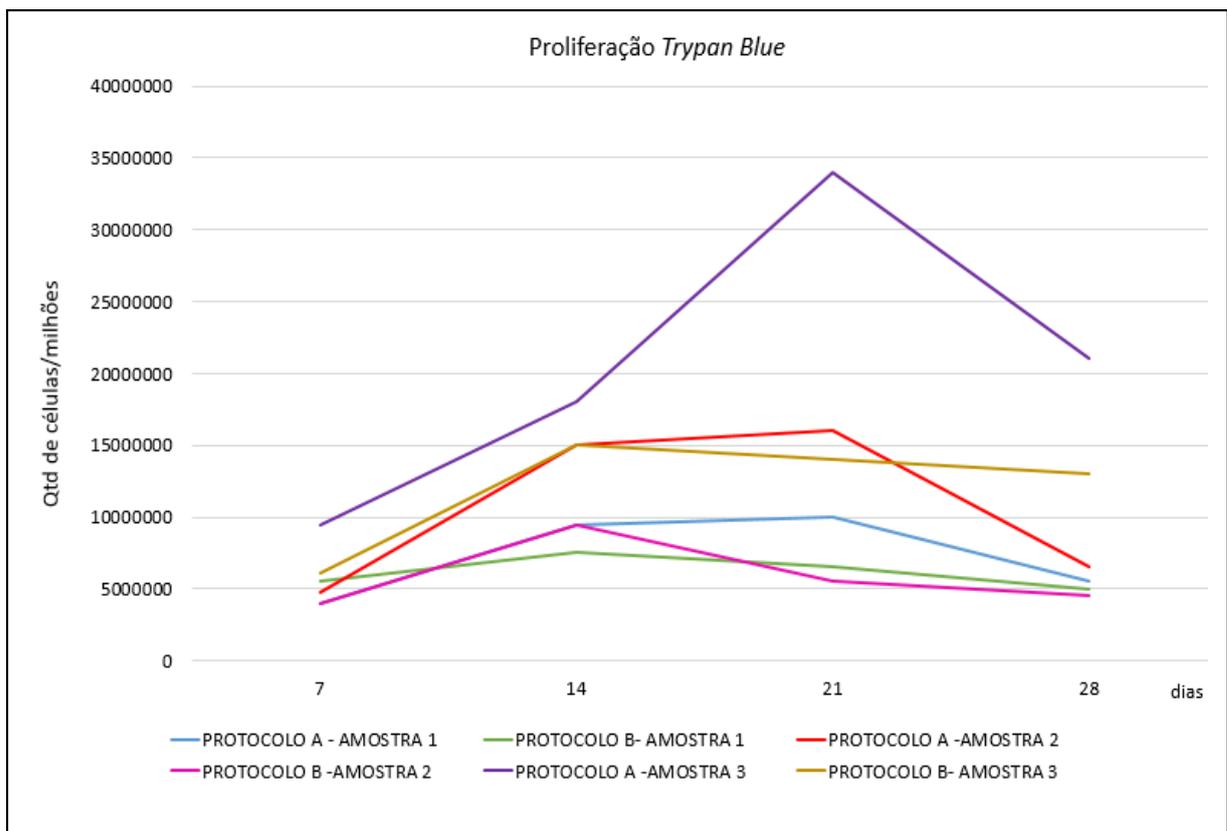


Figura 11: Proliferação- descrição da proliferação das três amostras utilizadas no estudo, em intervalos de tempo pré-fixados demonstrando os picos de proliferação dos dois protocolos.

5.2.1. TESTE DE VARIÂNCIA DE FRIEDMAN

Foi utilizado para avaliação estatística da proliferação por *trypan blue* o teste de Friedman (SIEGEL & CASTELLAN, 2006), por meio do software BioStat, sendo uma avaliação não paramétrica, para a comparação das variáveis no decorrer do tempo. Foi possível verificar que as análises foram estatisticamente significantes, onde no protocolo A $p=0,0421$ demonstrando que a proliferação foi maior aos 21 dias de cultura e no protocolo B $p=0,421$ demonstrando que a proliferação foi maior aos 14 dias de cultura.

Tabela 4: Teste de Variância de Friedman para o protocolo A, sem dexametasona, demonstrando significância aos 21 dias.

SEM DEXAMETASONA (PROTOCOLO A)

AMOSTRAS	7	14	21	28	
AMOSTRA 1	4,0	9,5	10	5,5	
AMOSTRA 2	4,8	15	16	6,5	
AMOSREA 3	9,5	18	34*	21	
	\bar{x}	6,1	14,17	20,0	11,0
	$\chi^2 = 8,20$		* $p= 0,0421$		21dias > 7 dias

Tabela 5: Teste de Variância de Friedman para o protocolo B, com dexametasona, demonstrando significância aos 14 dias em relação ao outro.

COM DEXAMETASONA (PROTOCOLO B)

AMOSTRAS	7	14	21	28
AMOSTRA 1	5,5	7,5	6,5	5,0
AMOSTRA 2	4,0	9,5	5,5	4,6
AMOSTRA 3	6,1	15*	14	13
\bar{x}	5,2	10,7	8,7	7,5
$\chi^2 = 8,20$		*p= 0,0421		14dias > 7 dias

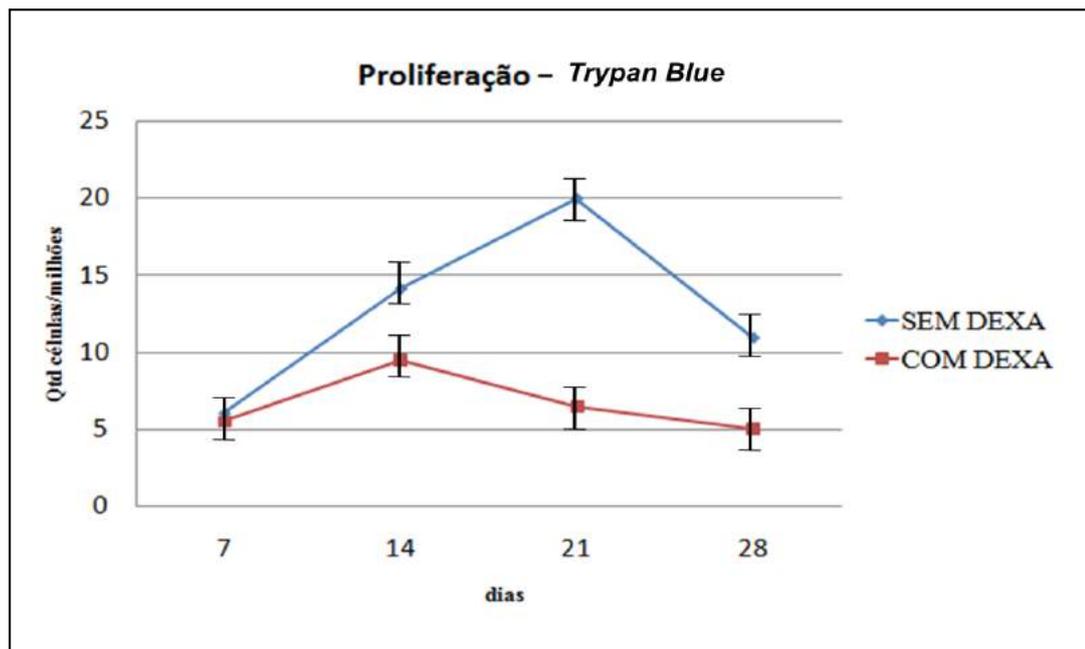


Figura 12: comparação entre protocolo A (sem dexa) e protocolo B (com dexa)- gráfico demonstrando o pico de proliferação atingido em 21 dias no protocolo A e em 14 dias no protocolo B.

5.3. ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR

Após o plaqueamento (em triplicata) em wells de 96, foi realizada leitura em espectrofotômetro de Elisa e foram realizadas análises e confeccionados gráficos, com comparações entre os grupos e intervalos, bem como análise estatística utilizando o programa estatístico Prisma5®, onde foram realizadas análises paramétricas por meio *t test*, sendo fixado em $p=0,05$ ou 5% o nível de rejeição da hipótese de nulidade. Foi possível verificar que as células pertencentes ao protocolo A foram estatisticamente mais viáveis aos 7 e 21 dias, enquanto as células pertencentes ao protocolo B foram estatisticamente mais viáveis aos 14 dias de cultura (Figura 13 A, B, C e D).

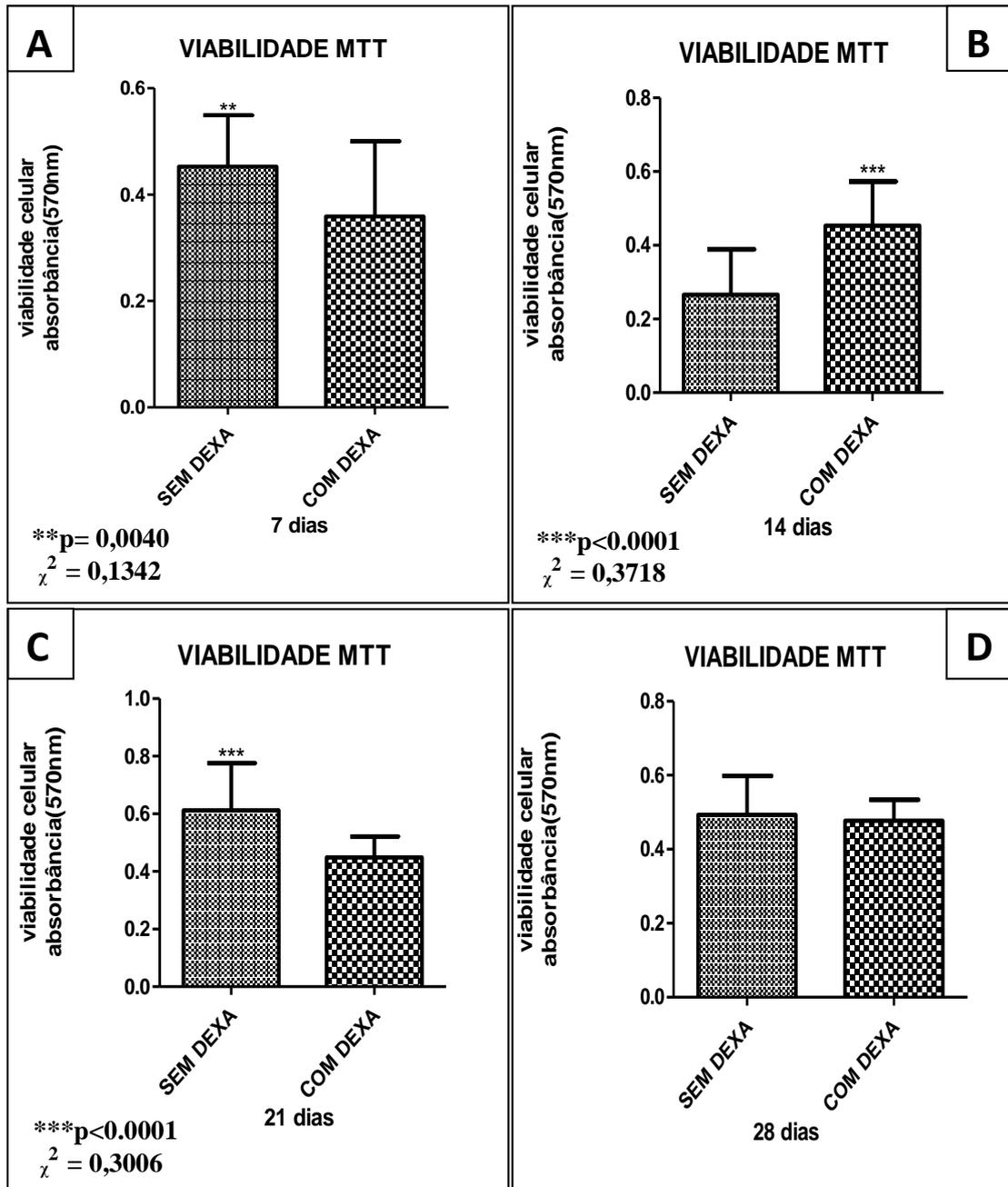


Figura 13: Análise por meio de *T test*- comparação entre protocolo A (sem dexta) e protocolo B (com dexta) nos diferentes intervalos de tempo. No intervalo de 7 dias, observou-se que no grupo pertencente ao protocolo A, a viabilidade

celular foi estatisticamente significativa em relação ao grupo pertencente ao protocolo B (A). No intervalo de 14 dias, observou-se que no grupo pertencente ao protocolo B, a viabilidade celular foi estatisticamente significativa em relação ao grupo pertencente ao protocolo A(B). No intervalo de 21 dias, observou-se que no grupo pertencente ao protocolo A, a viabilidade celular foi estatisticamente significativa em relação ao grupo pertencente ao protocolo B (C). No intervalo de 21 dias observou-se que não houve diferença estatisticamente significativa em relação à viabilidade celular. Foi fixado o intervalo de confiança de 95%, ou seja $p < 0,05$.

5.4. ANÁLISE DE VON KOSSA E ALIZARIN RED

Foram realizados teste de Von Kossa e *Alizarin Red* com o objetivo de observar a formação de nódulos calcificados em cada *well plate-6*, nos intervalos de 7, 14, 21 e 28 dias, sendo avaliados em triplicatas. Foi possível observar que as células dos dentes extraídos de pacientes que não ingeriram a dexametasona previamente a cirurgia (protocolo A) iniciaram a formação de nódulos de calcificação apenas aos 14 dias de cultura, enquanto que as células de dentes de pacientes que ingeriram dexametasona previamente a cirurgia (protocolo B) iniciaram a formação de nódulos de calcificação aos 7 dias de cultura. Em relação aos demais intervalos de cultura, 21 e 28 dias, as células dos dois protocolos demonstraram a formação de nódulos de calcificação em maior quantidade e melhor delimitação (Figuras 14 à 37).

- Amostra 1 (sem dexta)- 7 dias

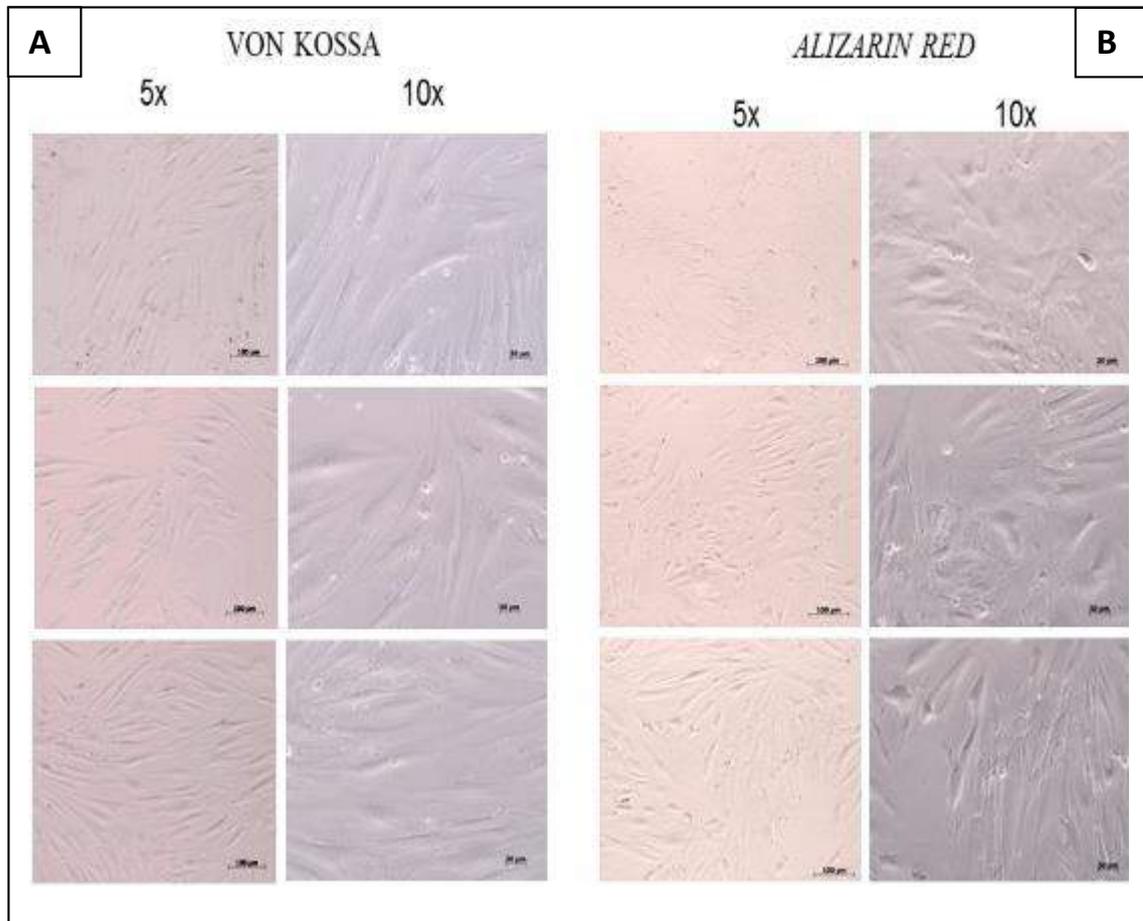


Figura 14: Análise Von Kossa e Alizarin Red MTJ 7 dias- observou-se que não houveram formações de nódulos de calcificação tanto no teste de Von Kossa (A) quanto no de *Alizarin Red* (B). Amostra com cultivo de 7 dias (protocolo A).

- Amostra 1 (sem dexta)- 14 dias



Figura 15: Análise Von Kossa e Alizarin Red- as setas nas imagens acima demonstram a formação de tecido mineralizado organizando-se em formato de nódulos, tanto no teste de Von Kossa (A) quanto no de *Alizarin Red* (B). Amostra com cultivo de 14 dias (protocolo A).

- Amostra 1 (sem dexta)- 21 dias

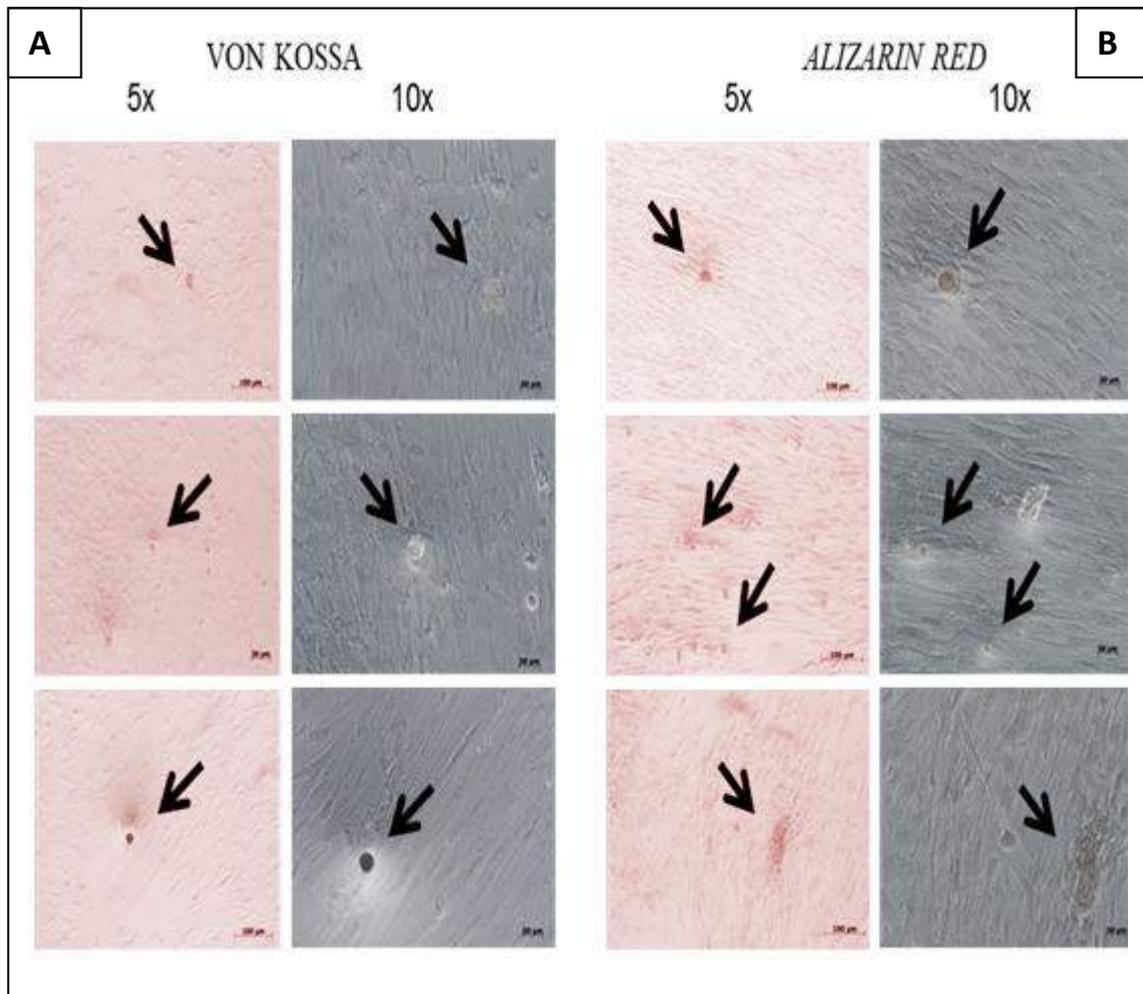


Figura 16: Análise Von Kossa e *Alizarin Red*- as setas nas imagens acima demonstram a formação de poucos nódulos de calcificação, tanto no teste de Von Kossa (A) quanto no de *Alizarin Red* (B). Amostra com cultivo de 21 dias (protocolo A).

- Amostra 1 (sem dexta)- 28 dias

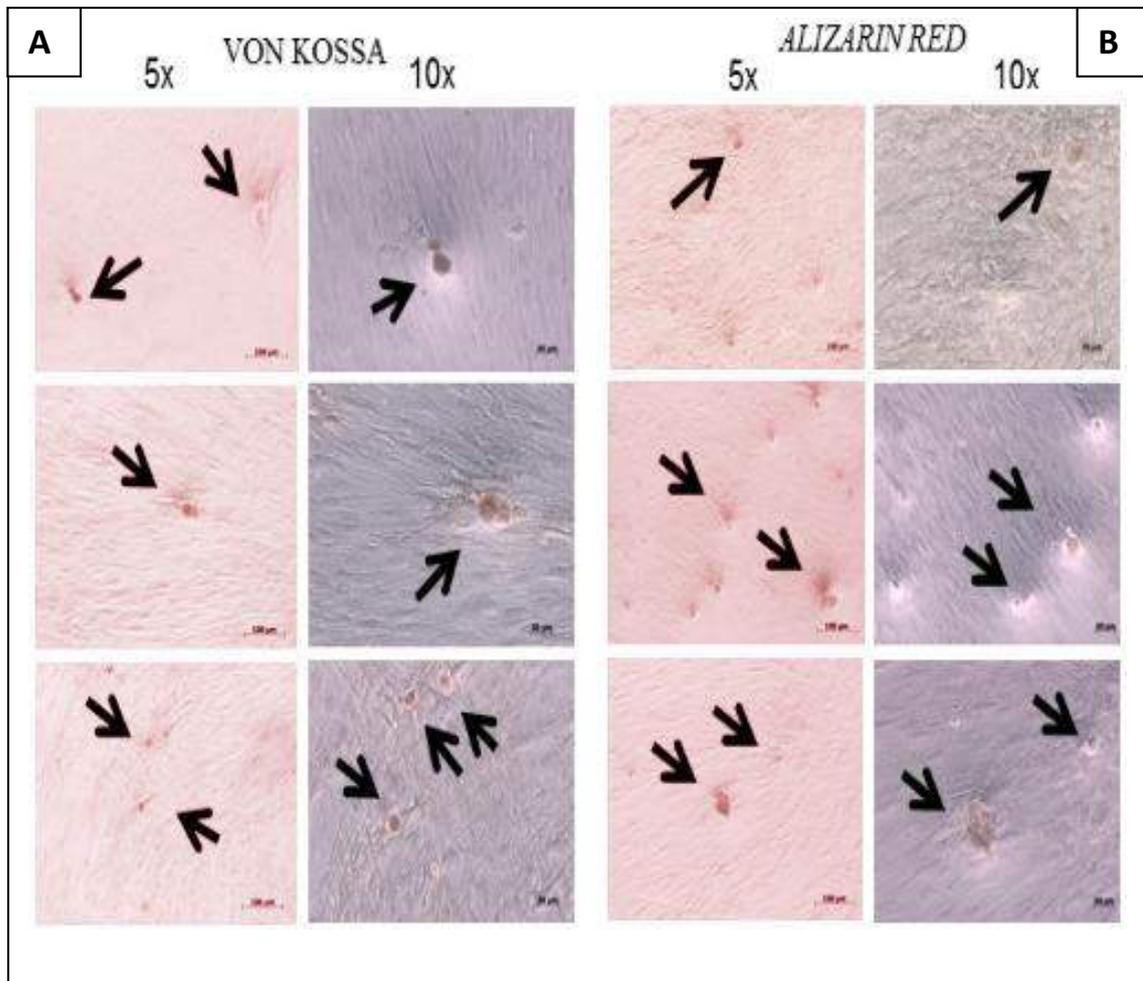


Figura 17: Análise Von Kossa e Alizarin Red- as setas nas imagens acima demonstram a formação de nódulos de calcificação bem definidos tanto no teste de Von Kossa (A) quanto no de Alizarin Red (B). Amostra com cultivo de 28 dias (protocolo A).

- Amostra 2 (sem dextra)- 7 dias

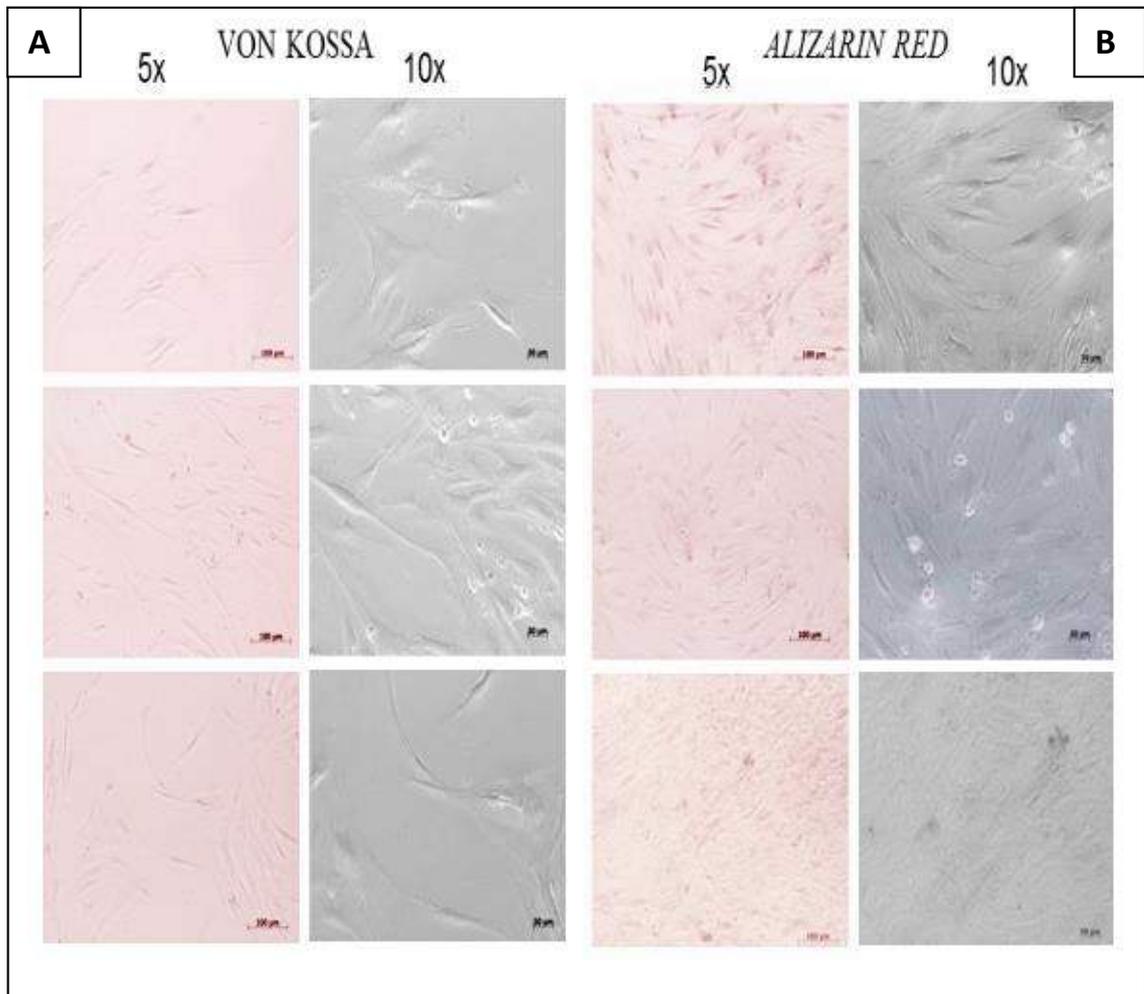


Figura 18: Análise Von Kossa e Alizarin Red- observou-se que não houveram formações de nódulos de calcificação tanto no teste de Von Kossa (A) quanto no de Alizarin Red (B). Amostra com cultivo de 7 dias (protocolo A).

- Amostra 2 (sem dexta)- 14 dias

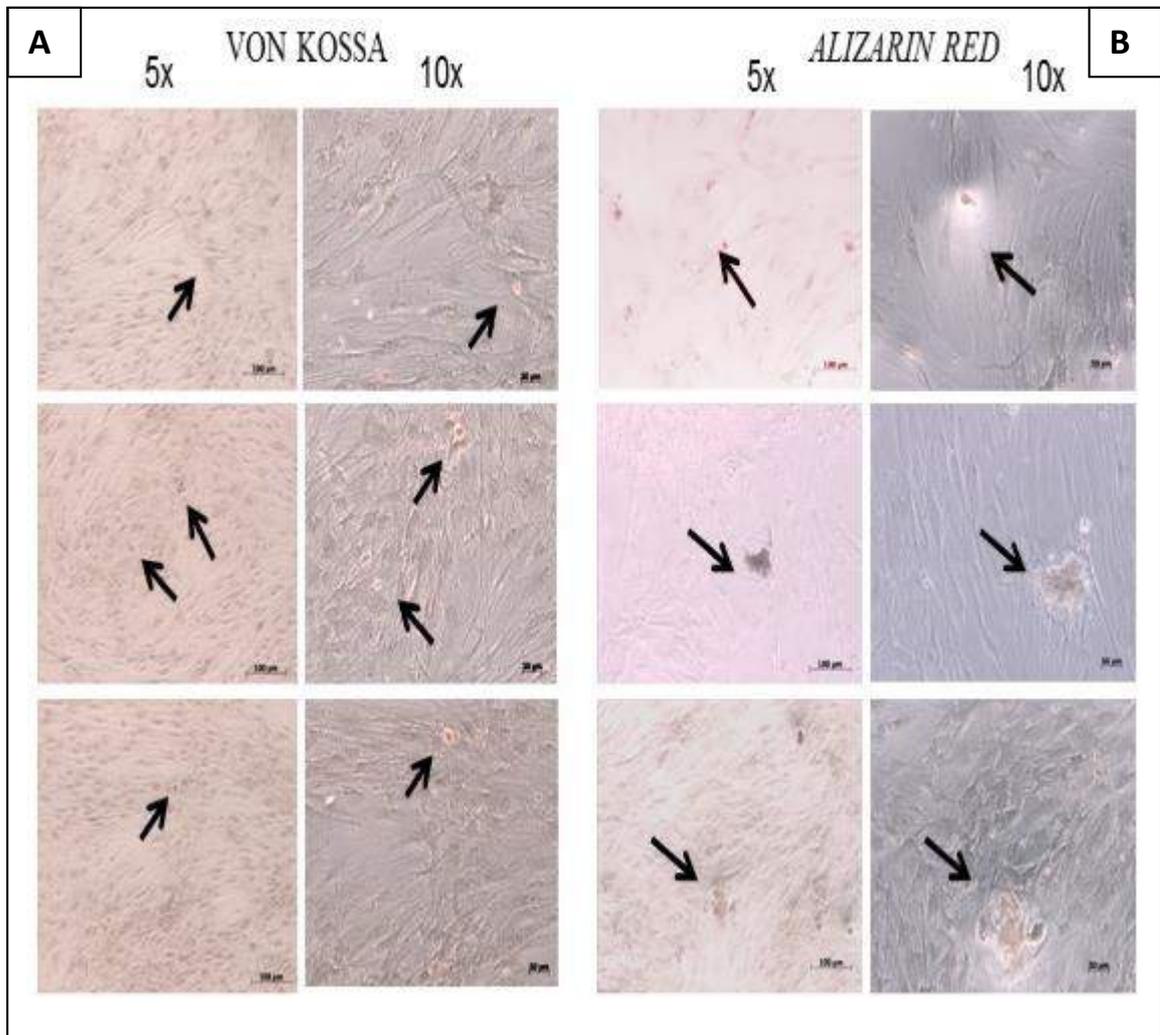


Figura 19: Análise Von Kossa e Alizarin Red- as setas nas imagens acima demonstram a formação de tecido mineralizado organizando-se em formato de nódulos, tanto no teste de Von Kossa (A) quanto no de Alizarin Red (B). Amostra com cultivo de 14 dias (protocolo A).

- Amostra 2 (sem dexta)- 21 dias

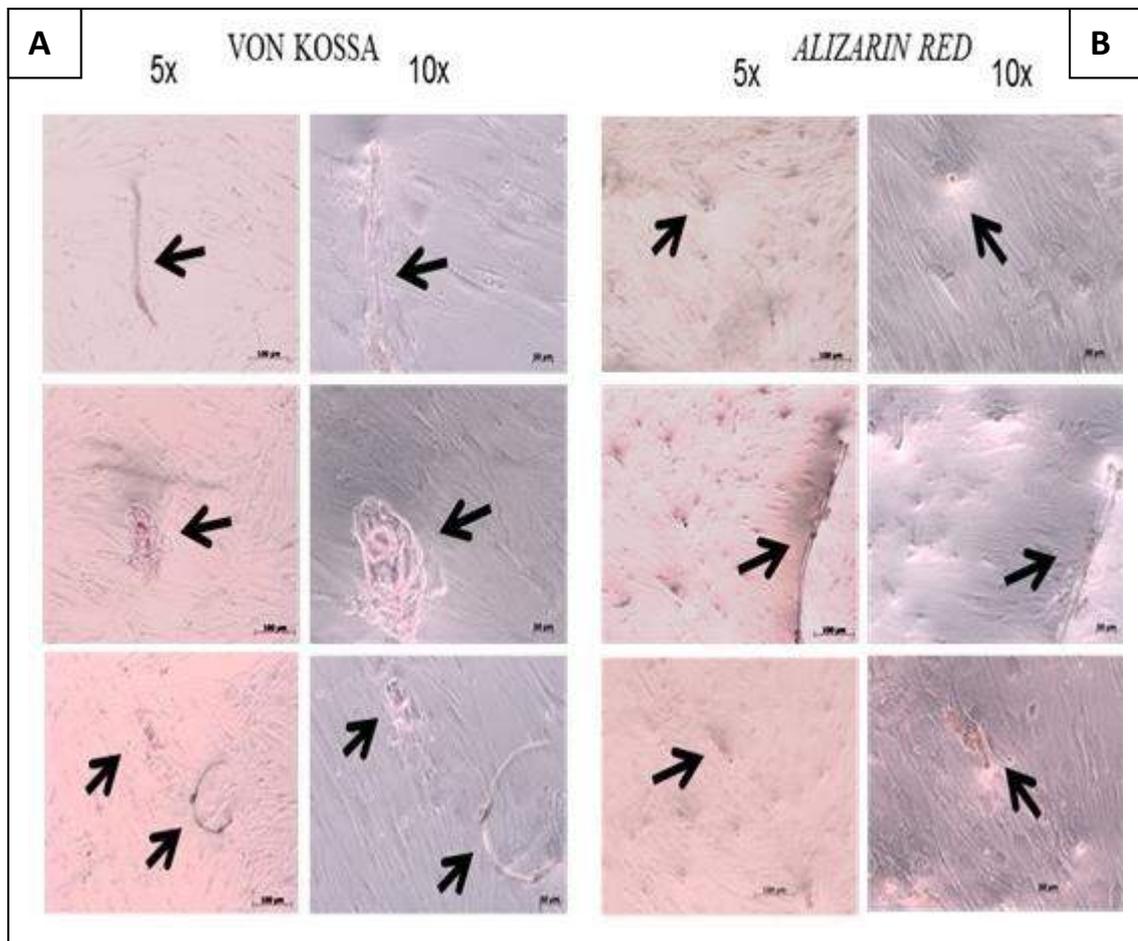


Figura 20: Análise Von Kossa e Alizarin Red- as setas nas imagens acima demonstram a formação de poucos nódulos de calcificação, tanto no teste de Von Kossa (A) quanto no de *Alizarin Red* (B). Amostra com cultivo de 21 dias (protocolo A).

- Amostra 2 (sem dexta)- 28 dias

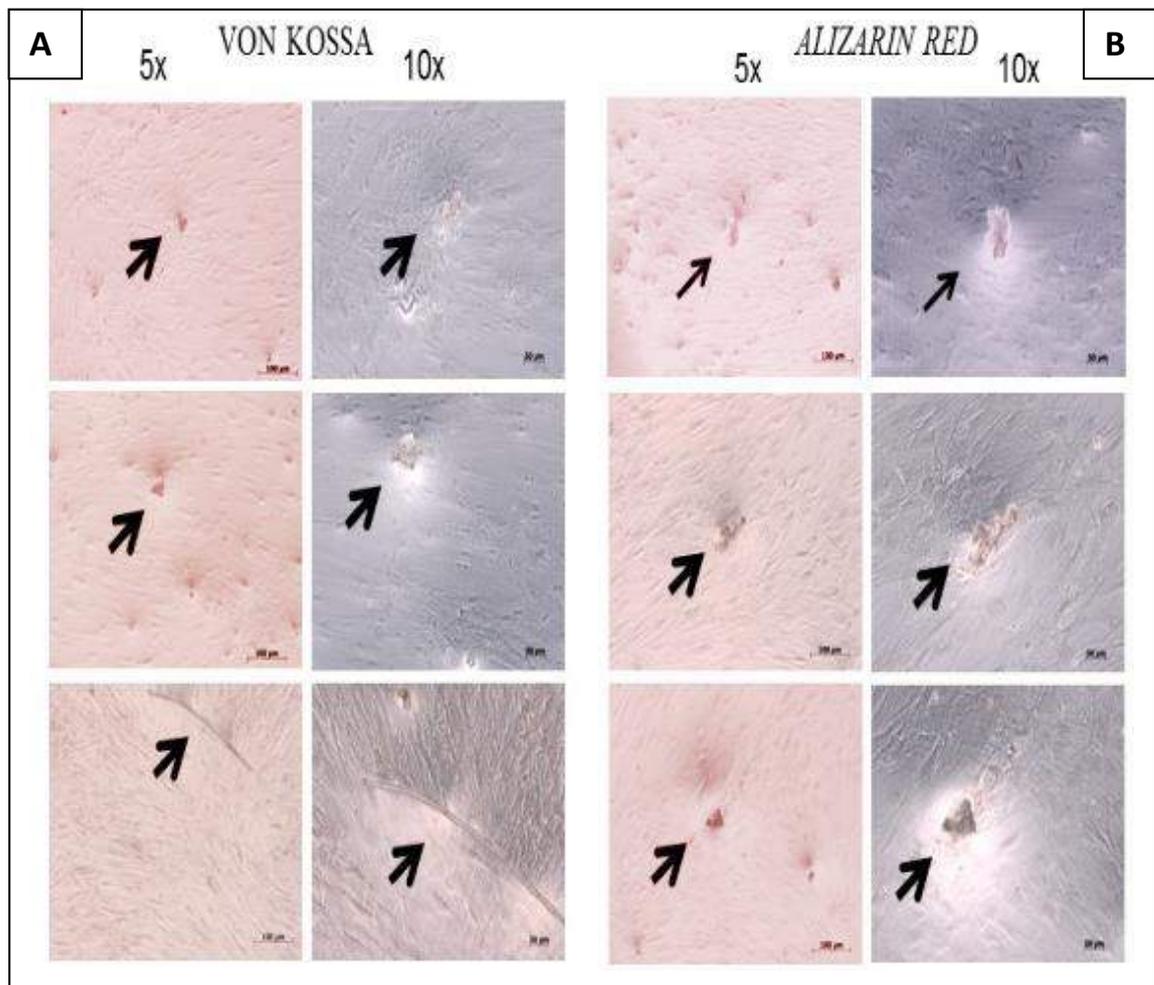


Figura 21: Análise Von Kossa e Alizarin Red- as setas nas imagens acima demonstram a formação de tecido mineralizado com formação de nódulos de calcificação bem definidos tanto no teste de Von Kossa (A) quanto no de Alizarin Red (B). Amostra com cultivo de 28 dias (protocolo A).

- Amostra 3 (sem dextra)- 7 dias

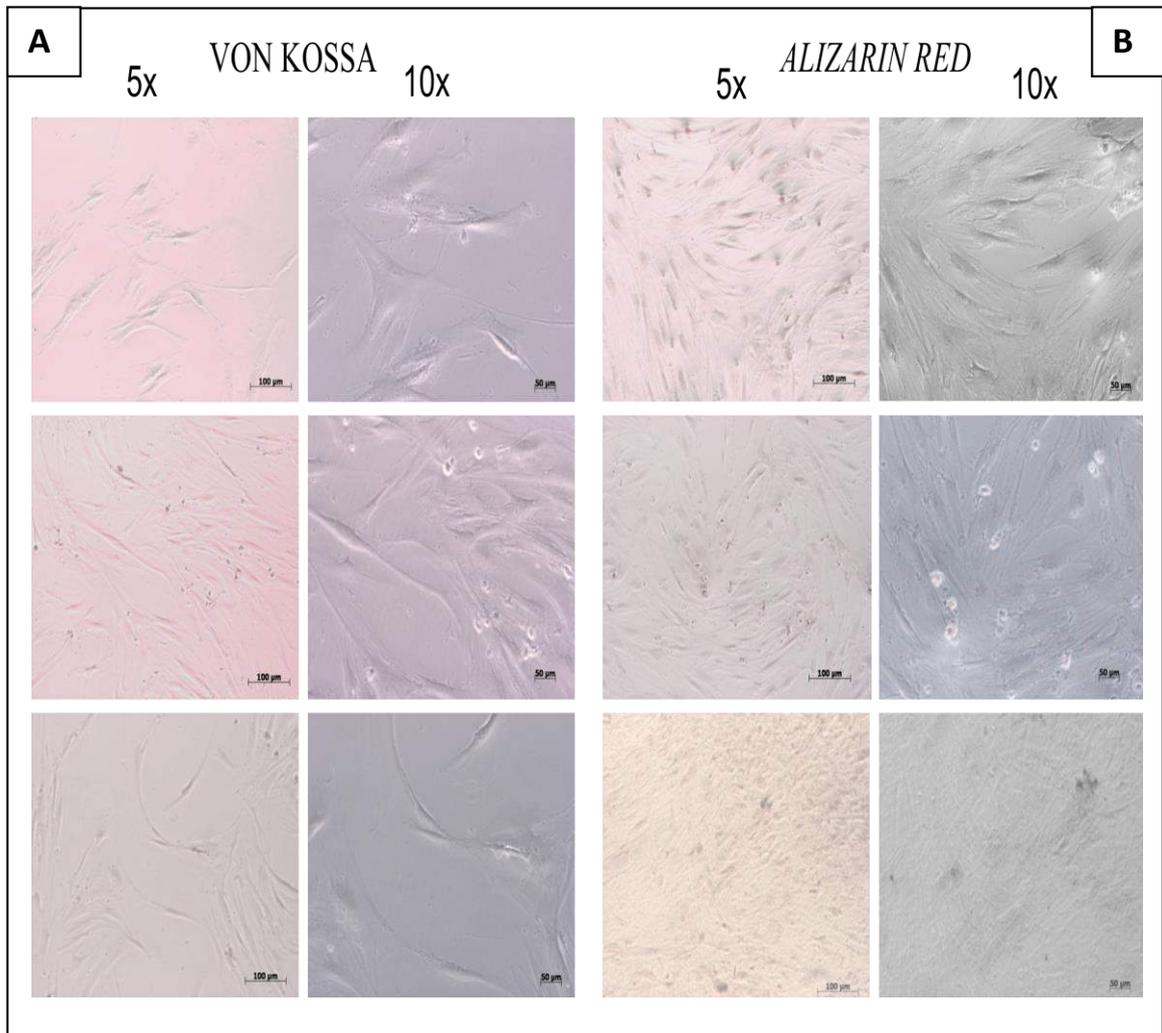


Figura 22: Análise Von Kossa e Alizarin Red- observou-se que não houveram formações de nódulos de calcificação tanto no teste de Von Kossa (A) quanto no de Alizarin Red (B). Amostra com cultivo de 7 dias (protocolo A).

- Amostra 3 (sem dexta)- 14 dias

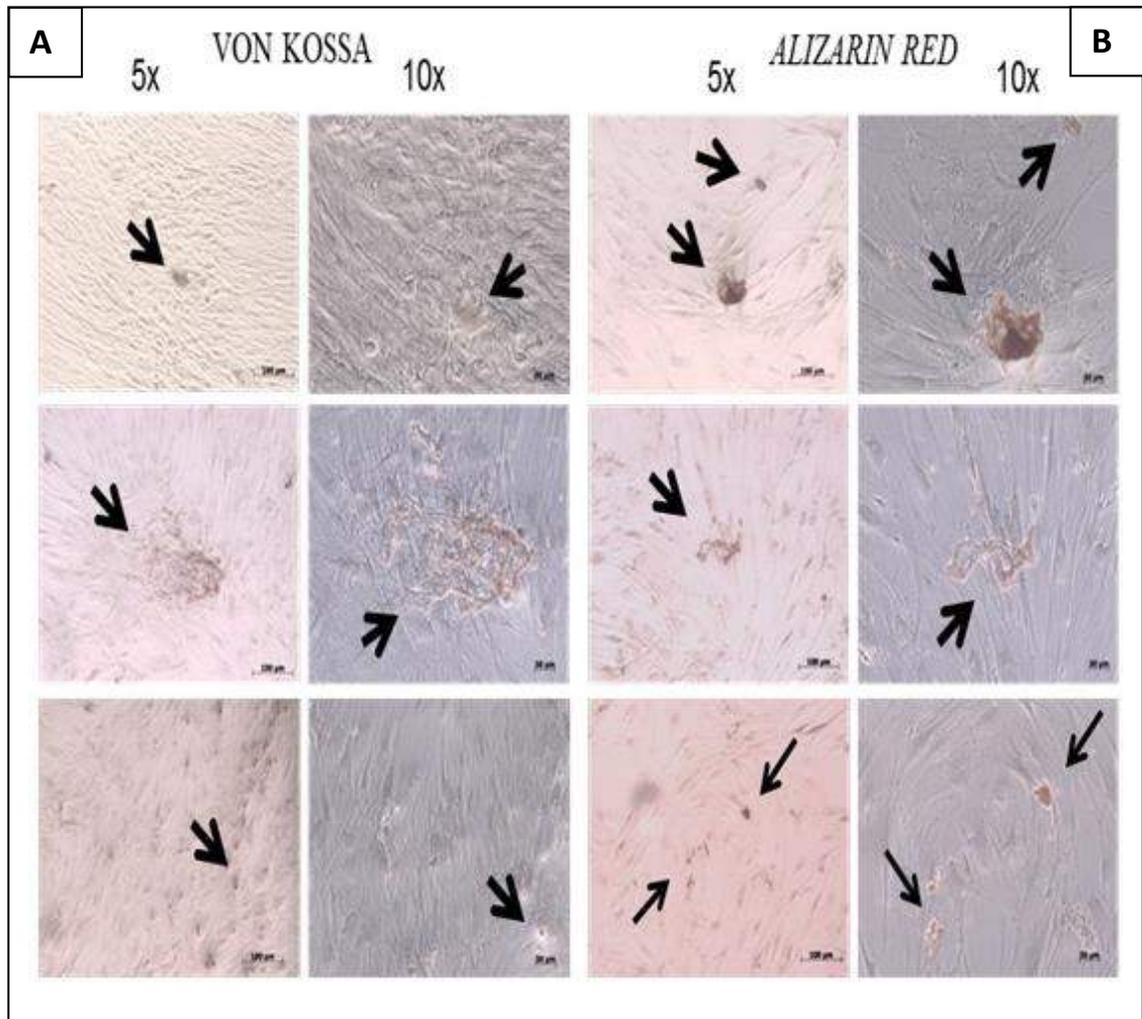


Figura 23: Análise Von Kossa e Alizarin Red- as setas nas imagens acima demonstram a formação de tecido mineralizado organizando-se em formato de nódulos, tanto no teste de Von Kossa (A) quanto no de *Alizarin Red* (B). Amostra com cultivo de 14 dias (protocolo A).

- Amostra 3 (sem dextra)- 21 dias

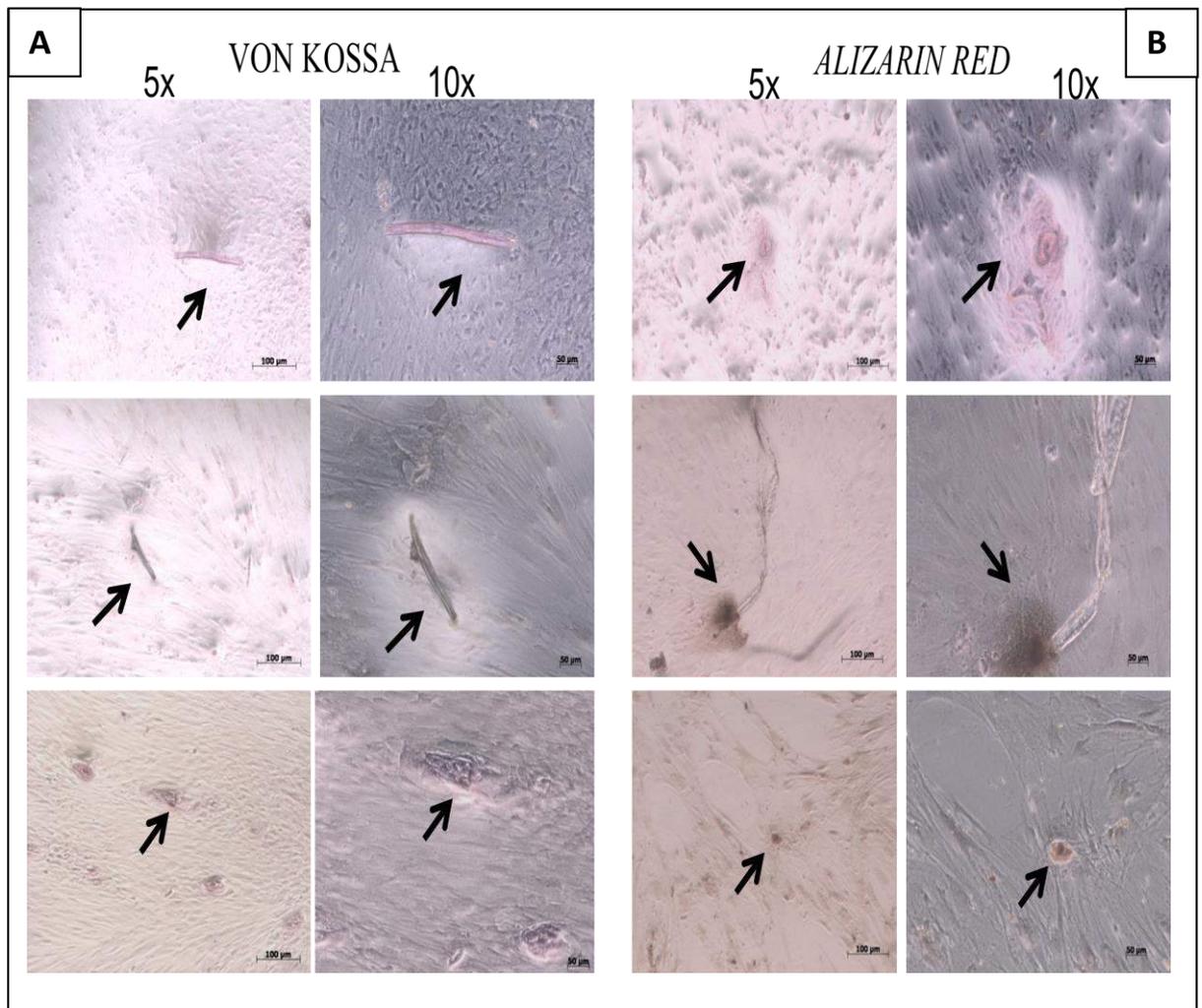


Figura 24: Análise Von Kossa e *Alizarin Red*- as setas nas imagens acima demonstram a formação de poucos nódulos de calcificação, tanto no teste de Von Kossa (A) quanto no de *Alizarin Red* (B). Amostra com cultivo de 21 dias (protocolo A).

- Amostra 3 (sem dexta)- 28 dias

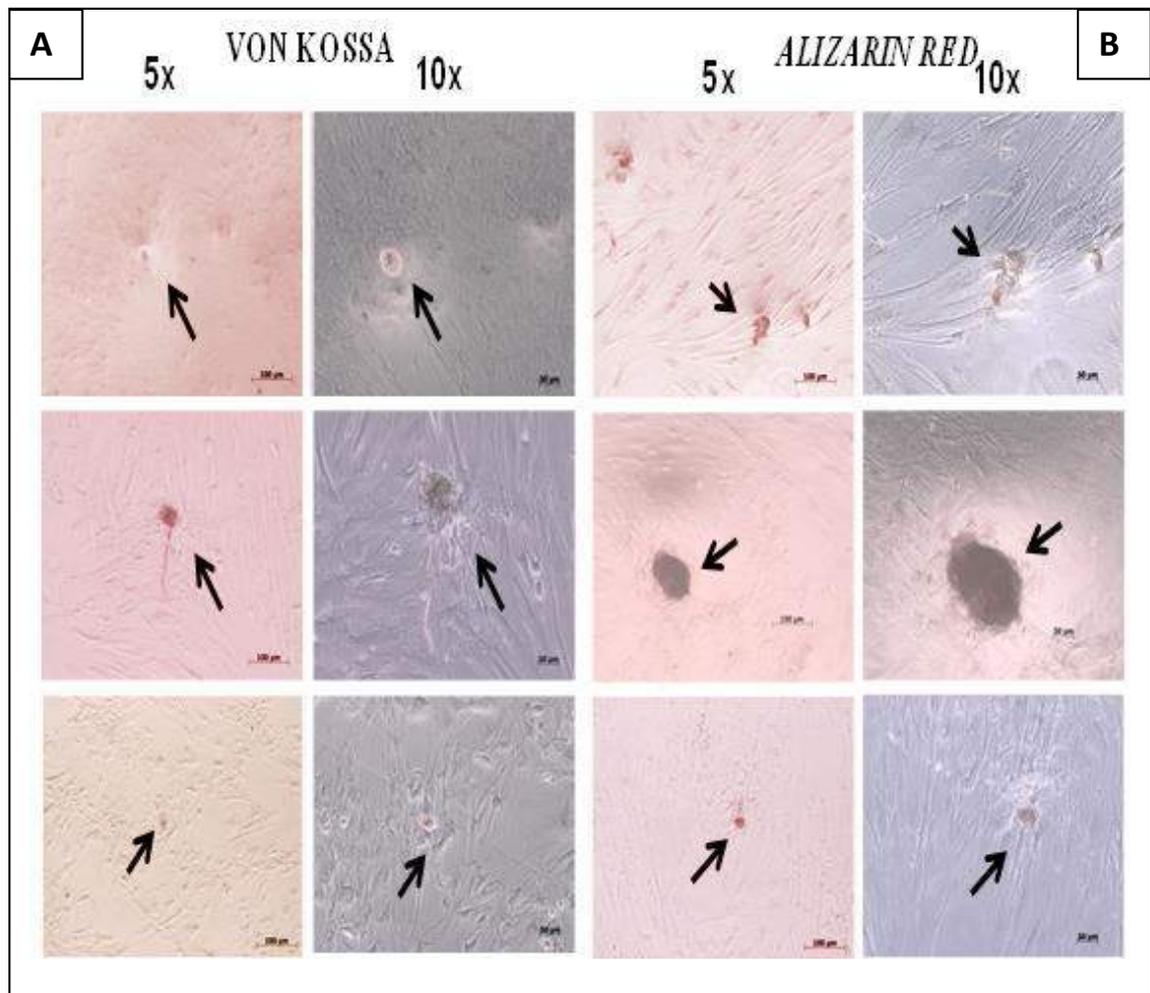


Figura 25: Análise Von Kossa e Alizarin Red- as setas nas imagens acima demonstram a formação de nódulos de calcificação bem definidos tanto no teste de Von Kossa (A) quanto no de *Alizarin Red* (B). Amostra com cultivo de 28 dias (protocolo A).

- Amostra 1 (com dexta)- 7 dias

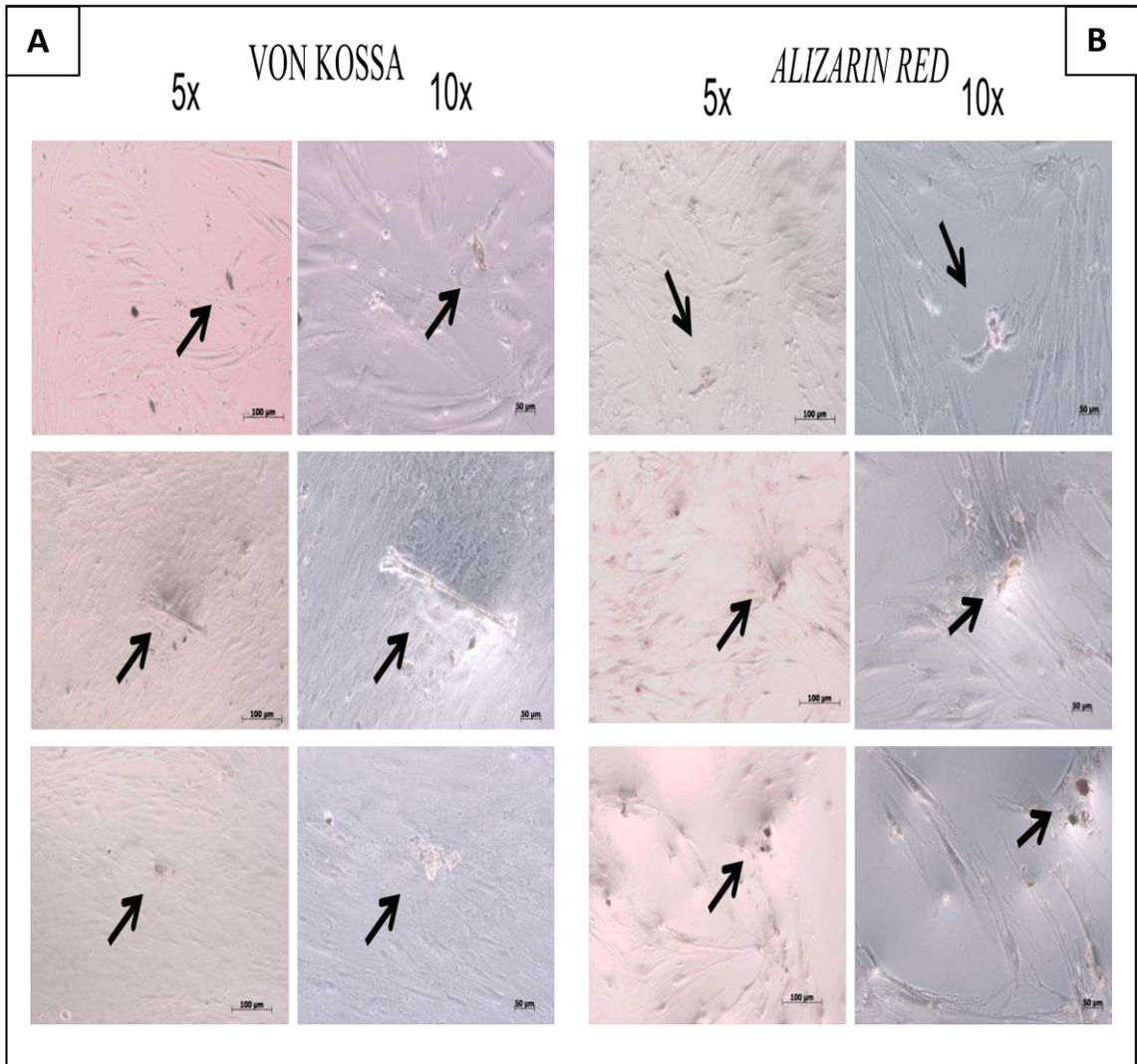


Figura 26: Análise Von Kossa e *Alizarin Red*- as setas nas imagens acima demonstram a formação pequenos nódulos de calcificação tanto no teste de Von Kossa (A) quanto no de *Alizarin Red* (B). Amostra com cultivo de 7 dias (protocolo B).

- Amostra 1 (com dexta)- 14 dias

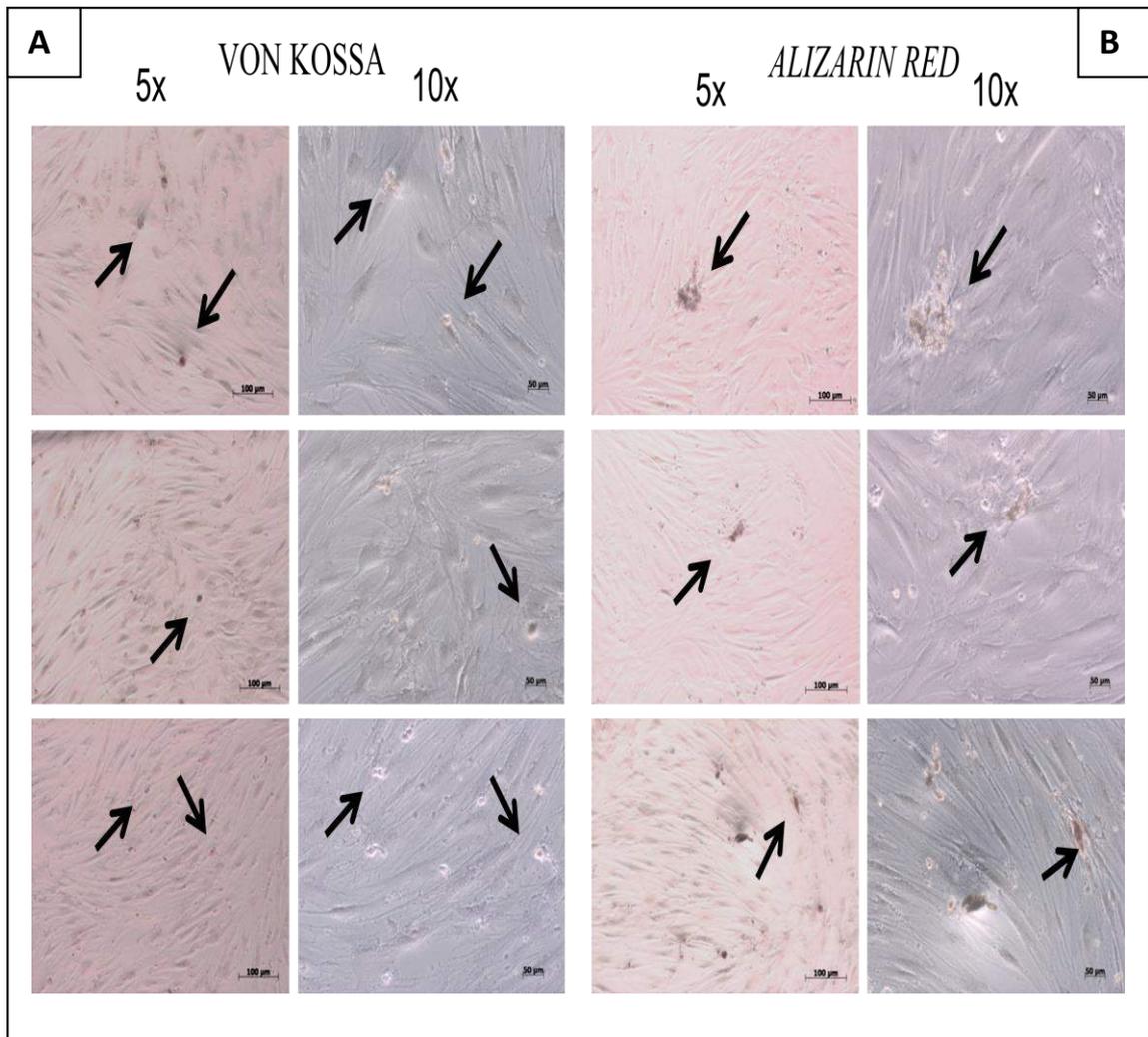


Figura 27: Análise Von Kossa e *Alizarin Red*- as setas nas imagens acima demonstram a formação de diversos nódulos de calcificação tanto no teste de Von Kossa (A) quanto no de *Alizarin Red* (B). Amostra com cultivo de 14 dias (protocolo B).

- Amostra 1 (com dexta)- 21 dias

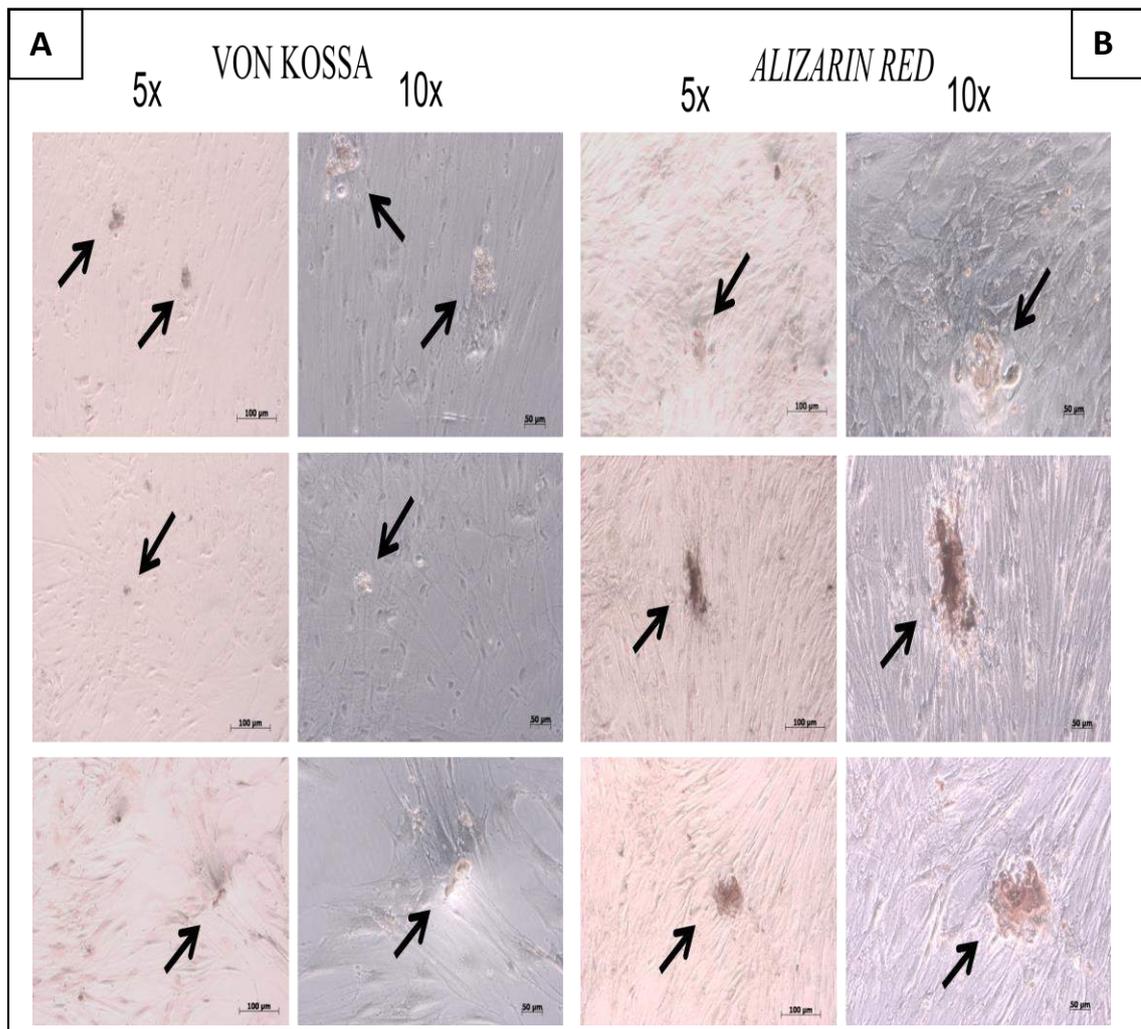


Figura 28: Análise Von Kossa e *Alizarin Red*- as setas nas imagens acima demonstram a formação de nódulos de calcificação de maior tamanho tanto no teste de Von Kossa (A) quanto no de *Alizarin Red* (B). Amostra com cultivo de 21 dias (protocolo B).

- Amostra 1 (com dexta)- 28 dias

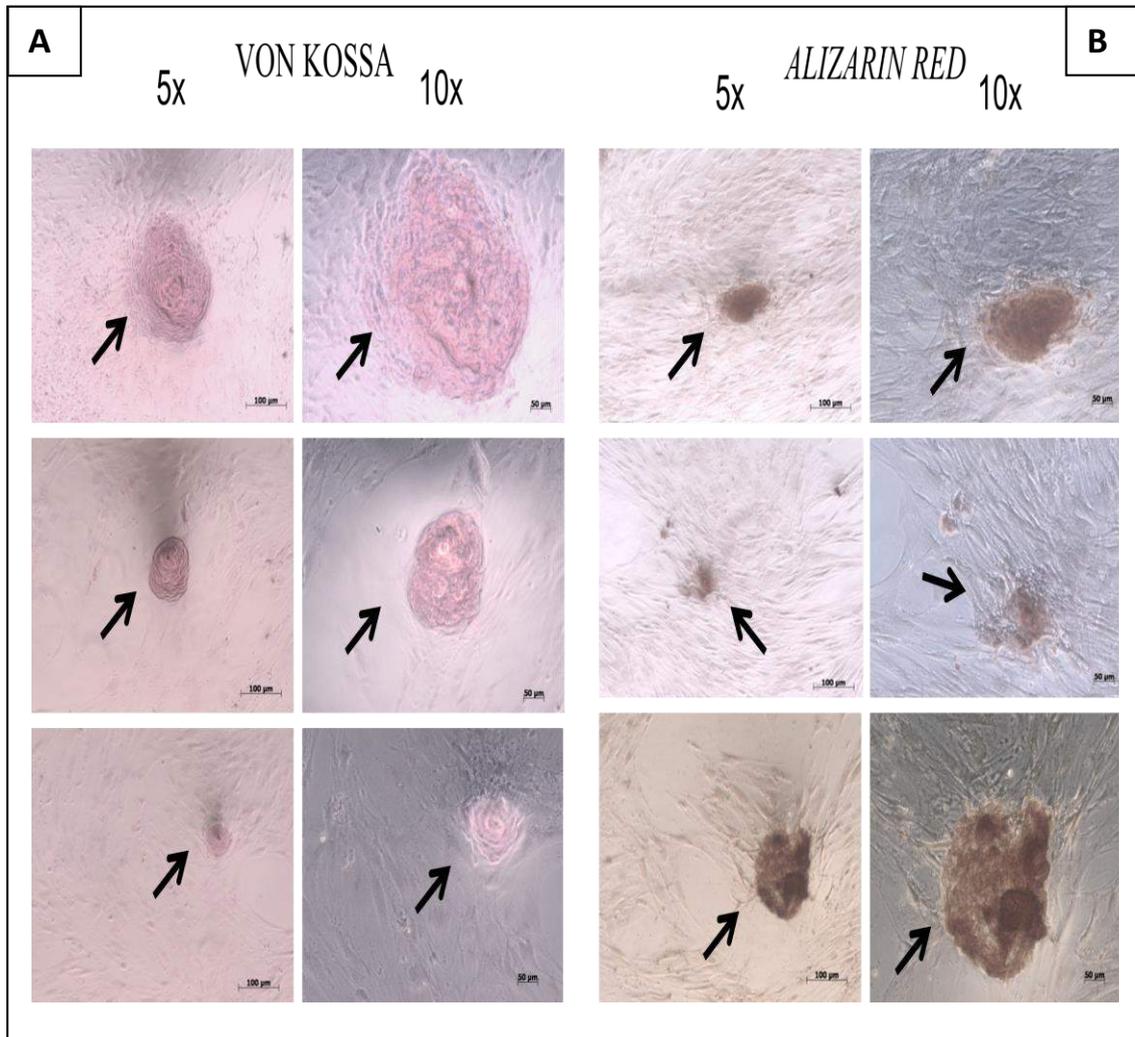


Figura 29: Análise Von Kossa e Alizarin Red- as setas nas imagens acima demonstram a formação de nódulos de calcificação de maior tamanho e melhor delimitação tanto no teste de Von Kossa (A) quanto no de *Alizarin Red* (B). Amostra com cultivo de 28 dias (protocolo B).

- Amostra 2 (com dexta)- 7 dias

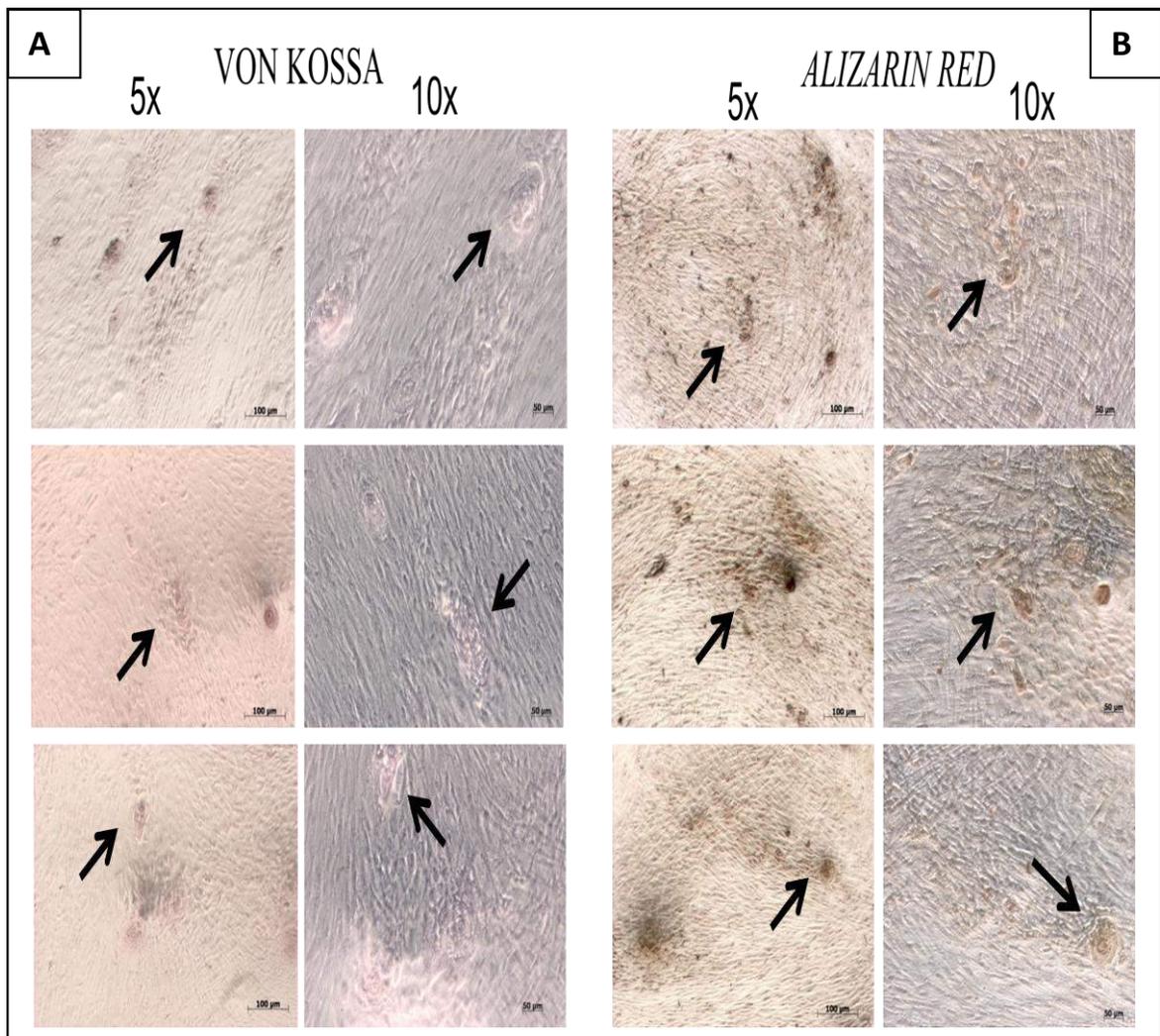


Figura 30: Análise Von Kossa e Alizarin Red- s setas nas imagens acima demonstram a formação de pequenos nódulos de calcificação tanto no teste de Von Kossa (A) quanto no de *Alizarin Red* (B). Amostra com cultivo de 7 dias (protocolo B).

- Amostra 2 (com dexta)- 14 dias

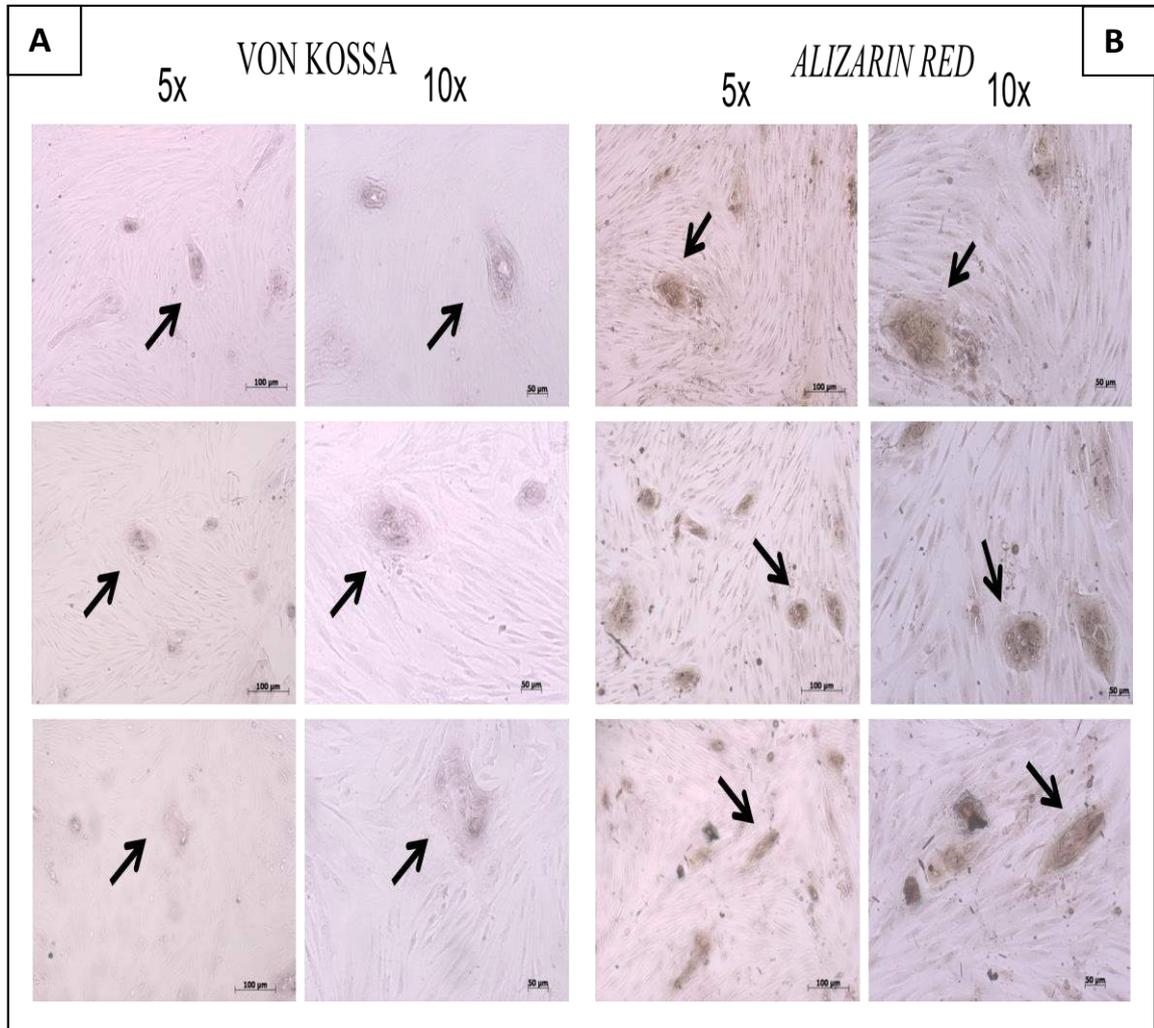


Figura 31: Análise Von Kossa e Alizarin Red- as setas nas imagens acima demonstram a formação de diversos nódulos de calcificação tanto no teste de Von Kossa (A) quanto no de Alizarin Red (B). Amostra com cultivo de 14 dias (protocolo B).

- Amostra 2 (com dexta)- 21 dias

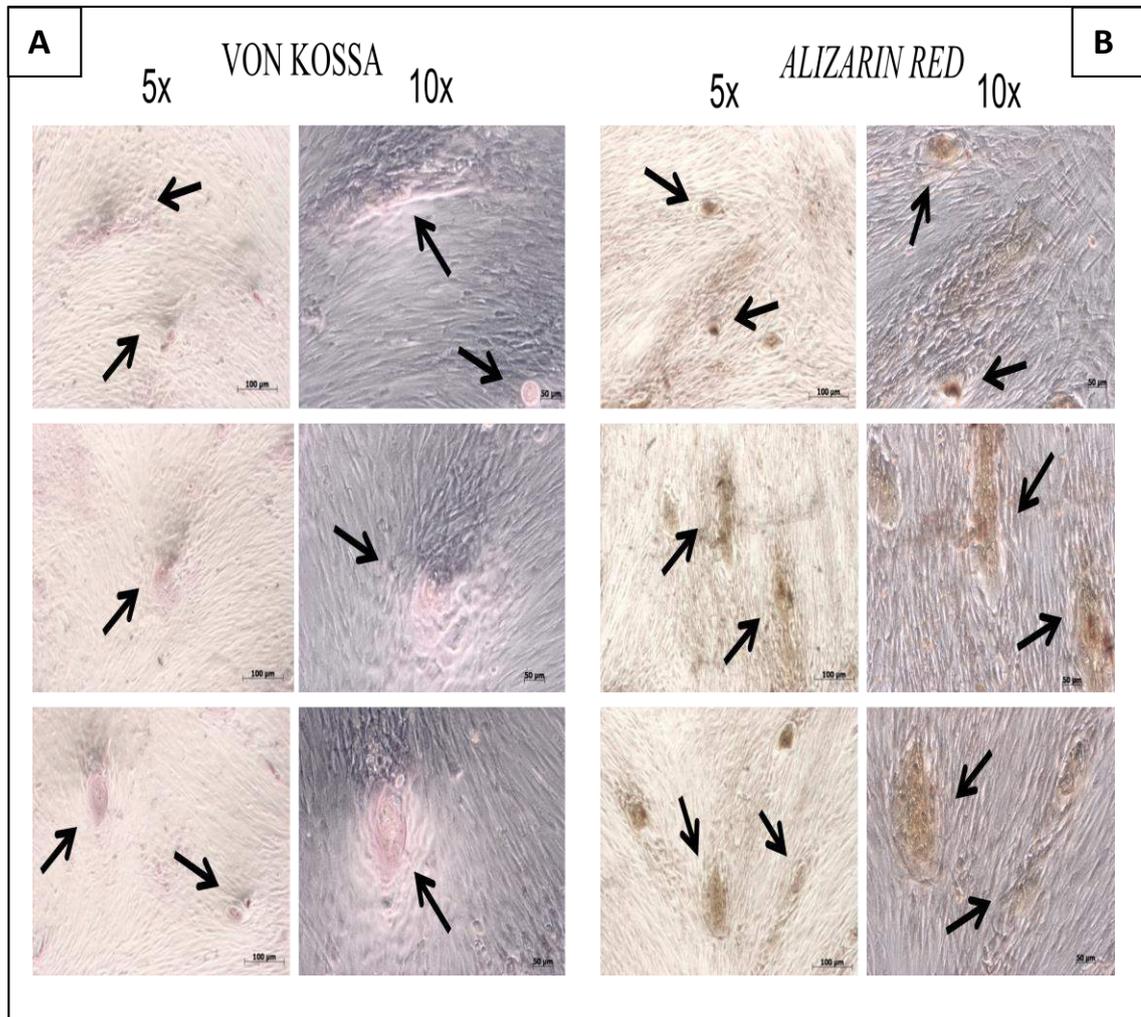


Figura 32: Análise Von Kossa e Alizarin Red- as setas nas imagens acima demonstram a formação de nódulos de calcificação de maior tamanho tanto no teste de Von Kossa (A) quanto no de Alizarin Red (B). Amostra com cultivo de 21 dias (protocolo B).

- Amostra 2 (com dexta)- 28 dias

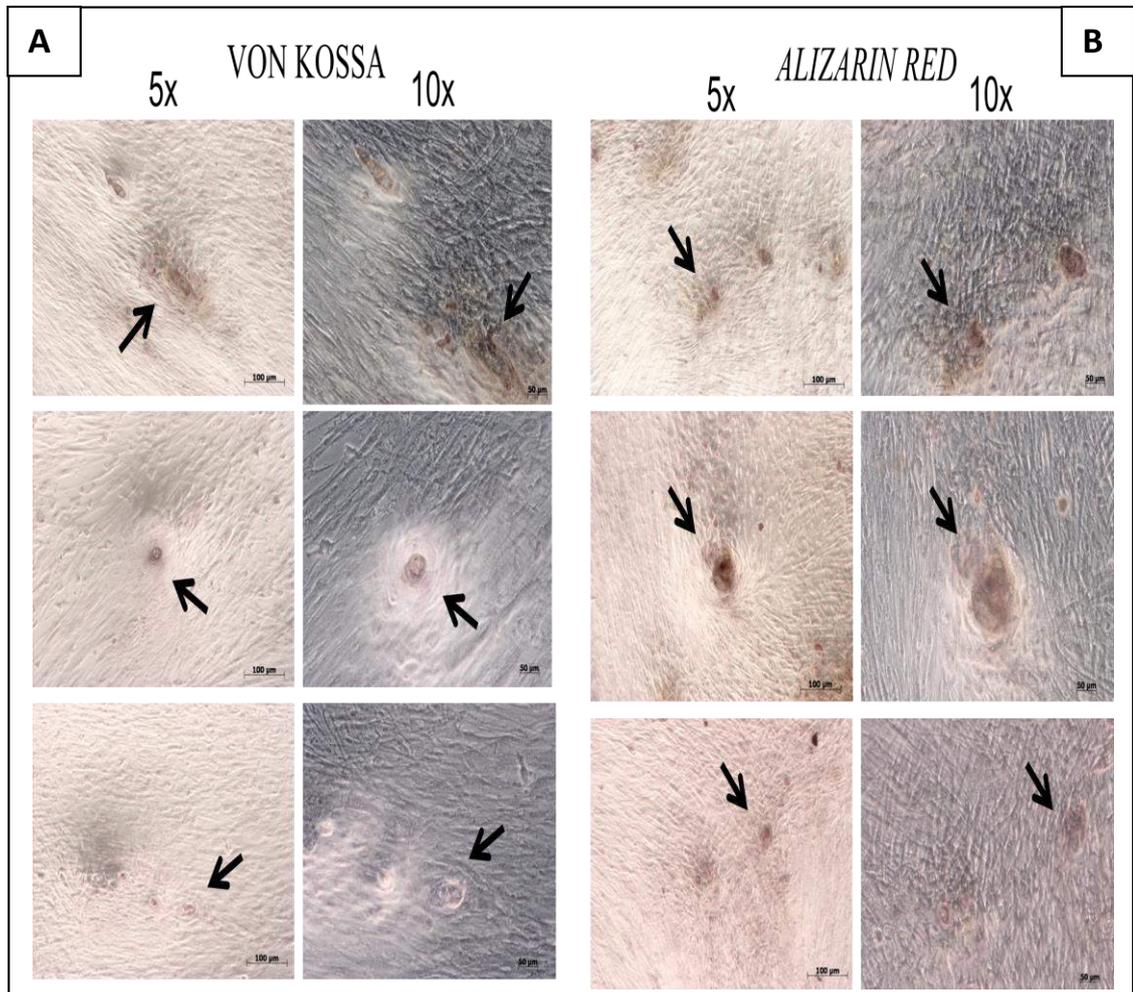


Figura 33: Análise Von Kossa e Alizarin Red- as setas nas imagens acima demonstram a formação de nódulos de calcificação de maior tamanho e melhor delimitação tanto no teste de Von Kossa (A) quanto no de *Alizarin Red* (B). Amostra com cultivo de 28 dias (protocolo B).

- Amostra 3 (com dexta)- 7 dias

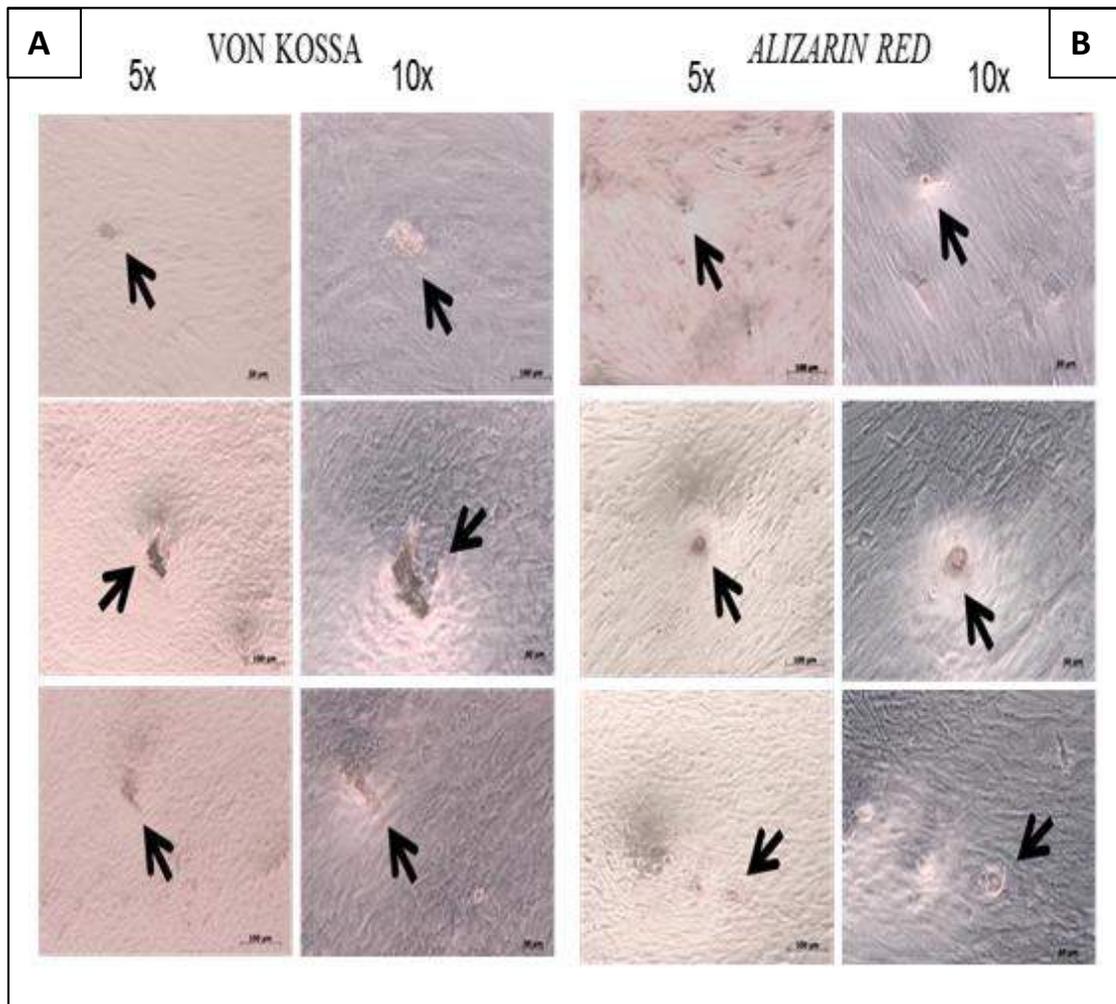


Figura 34: Análise Von Kossa e *Alizarin Red*- as setas nas imagens acima demonstram a formação de pequenos nódulos de calcificação tanto no teste de Von Kossa (A) quanto no de *Alizarin Red*(B). Amostra com cultivo de 7 dias (protocolo B).

- Amostra 3 (com dexta)- 14 dias

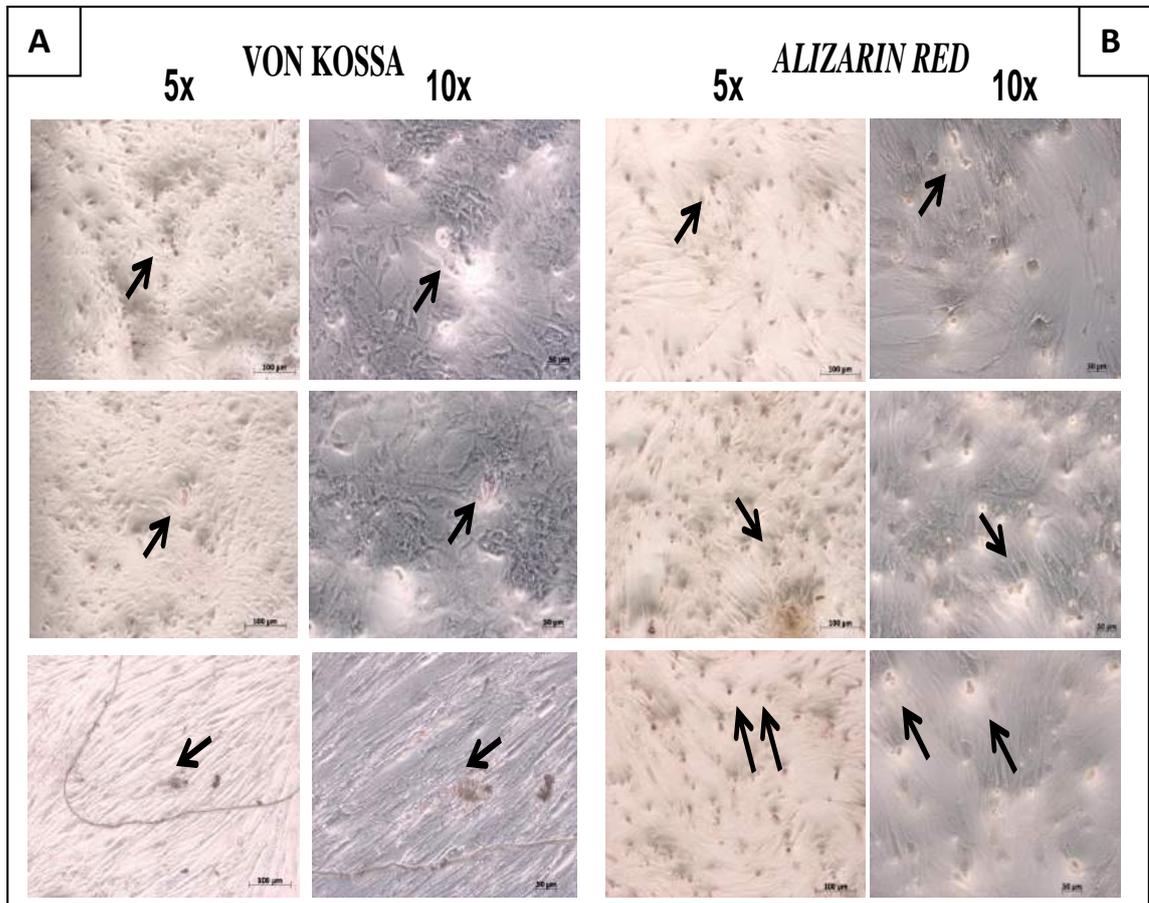


Figura 35: Análise Von Kossa e Alizarin Red- as setas nas imagens acima demonstram a formação de diversos nódulos de calcificação tanto no teste de Von Kossa (A) quanto no de Alizarin Red (B). Amostra com cultivo de 14 dias (protocolo B).

- Amostra 3 (com dexta)- 21 dias

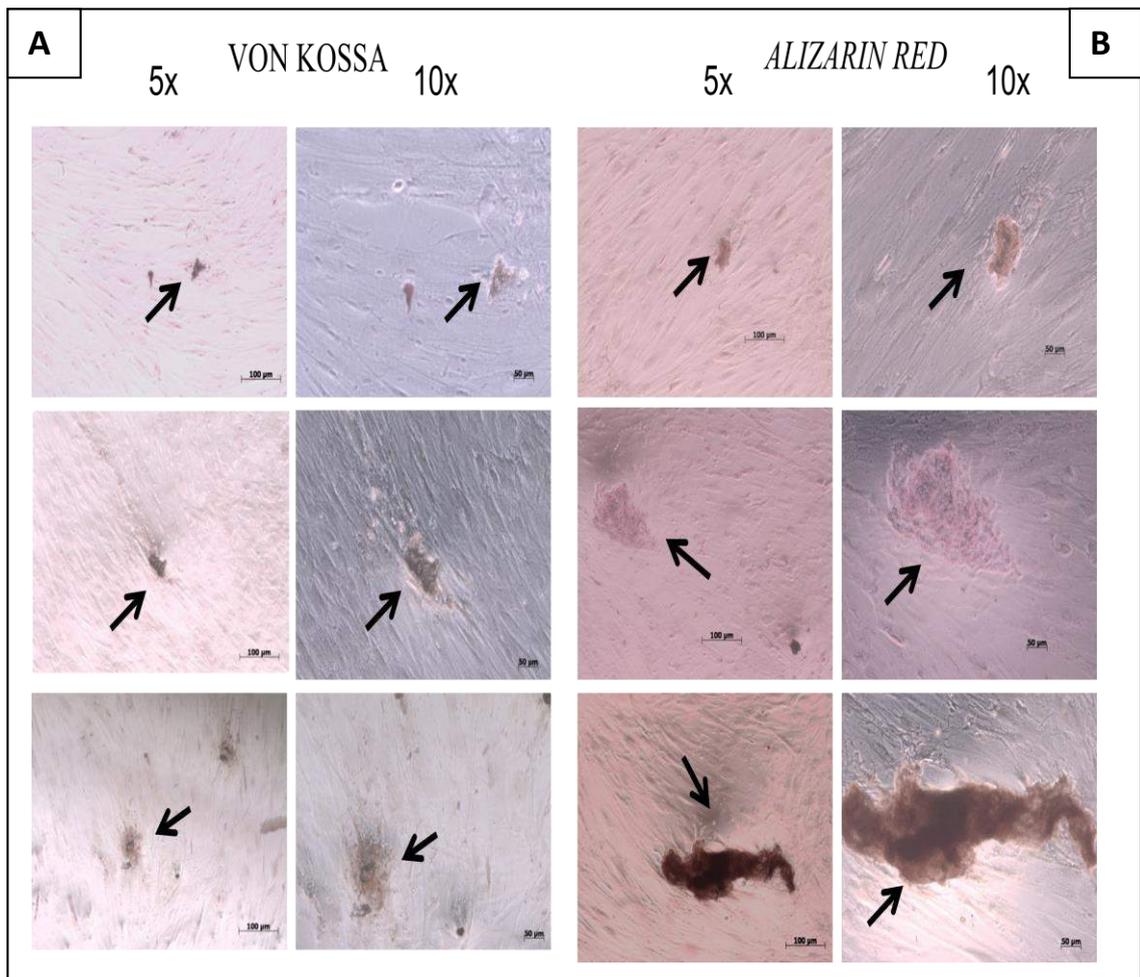


Figura 36: Análise Von Kossa e *Alizarin Red*- as setas nas imagens acima demonstram a formação de nódulos de calcificação de maior tamanho tanto no teste de Von Kossa (A) quanto no de *Alizarin Red* (B). Amostra com cultivo de 21 dias (protocolo B).

- Amostra 3 (com dexta)- 28 dias

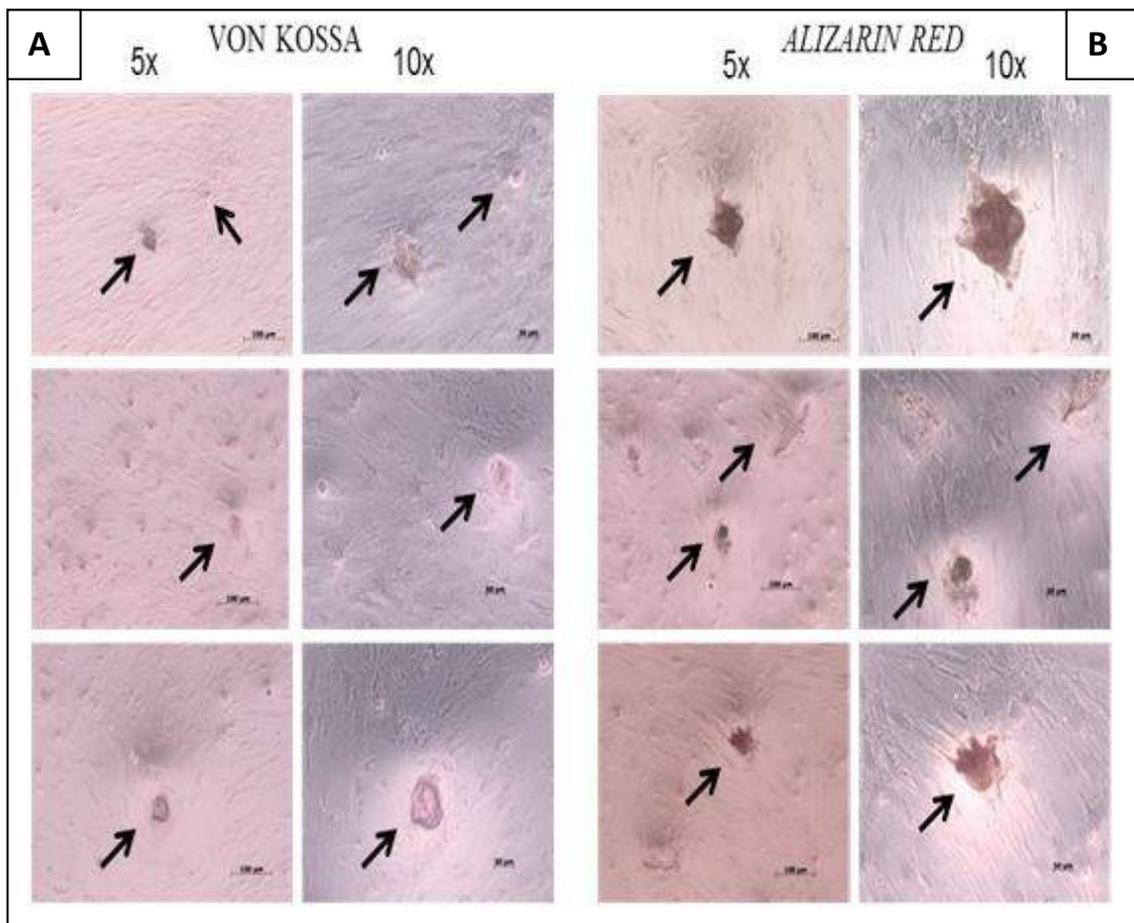


Figura 37: Análise Von Kossa e *Alizarin Red*- as setas nas imagens acima demonstram a formação de nódulos de calcificação de maior tamanho e melhor delimitação tanto no teste de Von Kossa (A) quanto no de *Alizarin Red* (B). Amostra com cultivo de 28 dias (protocolo B).

6. DISCUSSÃO

A Engenharia Tecidual é um campo interdisciplinar que busca a regeneração de tecidos biológicos a partir de estudos conduzidos no campo das ciências biológicas e Engenharia (LANGER & VACANTI, 1993; KHADEMHOSEINI *et al.*, 2006) com o objetivo de desenvolver substitutos que restauram, mantêm ou melhoram a função tecidual (LANGER & VACANTI, 1993; KHADEMHOSEINI *et al.*, 2006). Estudos sobre este assunto são descritos na literatura desde a década de 30, com um estudo de BISCEGLIE (1933) utilizando células tumorais de rato transplantadas na cavidade abdominal de um porco e de modo que estas não foram rejeitadas, bem como um estudo de CARREL & LINDBERGH (1935) quando mantiveram vivos órgãos de animais fora de seus corpos. Com os avanços relacionados à ET, estruturas tridimensionais chamadas de *scaffolds* passam a ser utilizadas em diversos estudos com a finalidade de serem criados tecidos em três dimensões (VACANTI *et al.*, 1988; LANGER & VACANTI, 1993). Uma vez que doador e receptor são o mesmo indivíduo, técnicas desenvolvidas por meio da ET apresentam vantagens sobre outras terapias, como drogas, no sentido de favorecer uma solução definitiva ao problema de falência dos órgãos, como também de evitar a rejeição do órgão transplantado, além do fato de diminuir o tempo de espera por um doador (LANGER & VACANTI, 1993; LANGER 2000; KHADEMHOSEINI *et al.*, 2006). Atualmente tem sido estudadas as células iPS, onde essas são produzidas artificialmente por meio de manipulação genética de células somáticas com capacidade de se diferenciarem em diversas linhagens com o objetivo de reparar ou regenerar um órgão ou tecido (TATULLO *et al.*, 2015; MITSIADIS & HARADA 2015).

A ET tem sido empregada em diversos campos da medicina e odontologia pelo fato de poder melhorar a qualidade de vida das pessoas (ESTRELA *et al.* 2011). Estudos utilizando germes dentários de ratos Lewis semeados em *scaffolds* e transplantados no omento e posteriormente em mandíbula de ratos, evidenciaram sucesso gerando tecidos dentários, demonstrando a possibilidade de regeneração do órgão dental em futuro previsível (DUAILIBI *et al.* 2004; DUAILIBI *et al.* 2006; DUAILIBI *et al.* 2008). Entretanto, questões relativas ao comportamento das células, morfologia, cor adequada e erupção do dente ainda necessitam de melhor definição para aplicação clínica (SUJESH *et al.* 2012; OSHIMA & TSUJI 2014).

Uma fonte rica em células utilizadas em experimentos na odontologia é encontrada em tecidos não mineralizados, do dente terceiro molar, como o capuz e a polpa do dente. Por meio de pesquisas, sabe-se que os dentes terceiros molares que possuem melhor quantidade e qualidade de células-tronco são os que estão em estágio de desenvolvimento 2-3 (DUAILIBI *et al.* 2011). Entretanto, existem dificuldades quanto a técnica de extração dos dentes nesse estágio de desenvolvimento, o que muitas vezes restringe o número da amostra e torna a cirurgia mais traumática. Neste sentido, existem medicações utilizadas como protocolo na rotina odontológica que minimizam efeitos produzidos pelo trauma cirúrgico. Essas medicações utilizadas são amoxicilina e dexametasona. A amoxicilina é um antibiótico eficaz que reduz a incidência de alveolite e proporciona resultados melhores na abertura de boca após a cirurgia (BEZERRA *et al.*, 2011) e previne a infecção da ferida pós-operatória. A dexametasona é um glicocorticóide sintético (LOEW,SHUSTER,GRAUL, 1986; QUECKENBERG *et al.*2011) com bons efeitos antiinflamatórios (LOEW,SHUSTER,GRAUL, 1986; KOROLKOVAS 1999; WANG *et al.* 2012) tanto em animais (NAIR *et*

al. 2011), quanto em seres humanos, reduzindo os efeitos de sequelas pós-operatórias como dor, edema e trismo (MARKIEWICZ *et al.* 2008; KIM *et al.* 2009; MAJID & MAHMOOD 2011; KLONGNOI *et al.* 2012; NOBOA *et al.*, 2014), sendo mais eficiente a que outros anti-inflamatórios, como por exemplo o diclofenaco de sódio (SPOORENBERG *et al.* 2013). Diversos estudos em relação à farmacocinética da dexametasona, ou seja, o tempo em que a medicação demora a atingir o nível plasmático máximo, demonstram que após a sua ingestão o pico é atingido entre 1 e 2 horas (LOEW, SHUSTER, GRAUL, 1986, KOROLKOVAS 1999; QUECKENBERG *et al.* 2011; DRUG INFORMATION HAND BOOK, 2015). Além das propriedades anti-inflamatórias da DEXA, esta também é muito utilizada em adição a meios de cultura, devido ao seu baixo custo e por sua propriedade em induzir o desenvolvimento osteogênico (PORTER, HUCKLE, GOLDSTEIN, 2003; HILDEBRANDT *et al.* 2009). Entretanto, alguns efeitos indesejados são produzidos pela DEXA quando adicionada a meios de cultura como por exemplo, diminuir a expressão de colágeno tipo I e aumentar a maturação dos adipócitos em cultura (BERESFORD *et al.* 1992). Em relação ao uso sistêmico, a DEXA utilizada em longos períodos produz efeito secundário metabólico como resistência à insulina, hipertensão, glaucoma e osteoporose (UYL, BULTINK, LEMS, 2011). Considerando que a DEXA possui diversos efeitos benéficos sobre as sequelas pós-operatórias em cirurgias de terceiros molares, sendo utilizada em protocolo odontológico, e sabendo que quando adicionada a meios de cultura na concentração de 10^{-9} mol produz um efeito osteoindutor, foi necessário conhecer o comportamento das células, *in vitro*, dos terceiros molares utilizados nesse estudo quando a DEXA foi administrada por via sistêmica.

No presente estudo, foram utilizadas células da polpa de dentes terceiros molares com indicação prévia de cirurgia. Os pacientes concordaram por meio do TCLE ou TA em participar do estudo, sendo utilizados dois protocolos de medicação pré-operatória, sendo a dexametasona o fator que os diferenciava. Os terceiros molares foram extraídos e levados ao laboratório CTCMol, onde a polpa dos dentes foram fragmentadas, explantadas e permaneceram em cultura até atingirem confluência celular desejada para análise do comportamento das células *in vitro*. Para todas as etapas experimentais foram fixados intervalos de 7, 14, 21 e 28 dias. Foi obtido como resultado, que as células provenientes do dente cujos pacientes ingeriram dexametasona 4 mg 1 hora antes ao ato cirúrgico, se diferenciaram mais precocemente, em 7 dias de cultura, que as células provenientes dos dentes cujos pacientes não ingeriram a droga, inferindo assim que esta ainda estava em ação no plasma sanguíneo (LOEW, SHUSTER, GRAUL, 1986; KOROLKOVAS 1999; QUECKENBERG *et al.* 2011; DRUG INFORMATION HAND BOOK 2015) e foi capaz de chegar a região de terceiro molar, bem como foi possível relacionar o efeito osteoindutor da dexametasona quando adicionada diretamente a meios de cultura (PORTER, HUCKLE, GOLDSTEIN, 2003; HILDEBRANDT *et al.* 2009) com a aplicação sistêmica da droga.

As análises utilizadas para a observação da diferenciação das células em tecido mineralizado foi de Von Kossa e *Alizarin Red*, descrita por (PUCHTLER, MELOAN, TERRY, 1969).

A avaliação da proliferação celular foi realizada por meio do corante *Trypan Blue* (STROBER 2001) e as células foram contadas em contador automático para que não houvesse viés do observador. O resultado obtido foi que as células do protocolo A atingiram seu pico de proliferação em 21 dias,

enquanto que as células pertencentes ao protocolo B atingiram seu pico de proliferação aos 14 dias de cultura. Foi realizada análise de variância de Friedman, verificando que os resultados foram estatisticamente significantes no protocolo A sendo $p=0,0421$ e 21 dias > 7 dias e no protocolo B sendo $p=0,0421$ e 14 dias > 7 dias. Após o pico de proliferação, as células pertencentes a ambos protocolos, caíram em declínio, ou seja, após diferenciarem-se ocorre a morte celular como já descrito em relação as fases do comportamento celular (FRESHNEY 2005).

Para a viabilidade celular utilizou-se o *t test* por meio do programa Prisma5®, e verificou-se que houve diferença estatisticamente significativa na viabilidade das células pertencentes ao protocolo A (sem DEXA) em 7 e 21 dias, sendo $p=0,0040$ e $p<0,0001$ respectivamente, em relação ao protocolo B (com DEXA) e este último, demonstrou diferença estatisticamente significativa aos 14 dias de cultura, sendo $p<0,0001$.

Em ambos os protocolos houve diferenciação das células em tecido mineralizado, porém as que pertencentes ao protocolo que continha dexametasona como medicação pré-operatória, a diferenciação celular ocorreu mais precocemente.

Baseando-se nos resultados do presente estudo, acredita-se que a dexametasona possui efeito osteoindutor não apenas quando adicionada diretamente a meios de cultura, mas também quando administrada via sistêmica como medicação pré-operatória em cirurgias de terceiros molares e observadas *in vitro*.

7. PERSPECTIVAS

- Investigar em qual tipo de tecido mineralizado as células expressaram.
Ex.: dentina, esmalte, cimento, osso.
- Observar as células, em cultura, por um período mais prolongado.
- Investigar a forma pela qual a dexametasona conseguiu atingir as células da polpa dental.

CONCLUSÃO

8.CONCLUSÃO

A utilização da dexametasona como medicação pré-operatória em cirurgia de terceiros molares promove diferenciação celular mais precocemente, quando observada *in vitro*. Neste sentido, quando houver o emprego do protocolo contendo a dexametasona como medicação pré-operatória, as células deverão ser utilizadas em futura aplicação clínica previamente aos 14 dias de cultura.

REFERÊNCIAS

9. Referências

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

Beresford JN, Bennett JH, Devlin C, Leboy PS, Owen ME. Evidence for an inverse relationship between the differentiation of adipocytic and osteogenic cells in rat marrow stromal cell cultures. *J Cell Sci.*1992 Jun;102(Pt 2):341-51.

Bezerra TP, Studart-Soares EC, Scaparo HC, Pita-Neto IC, Batista SHB, Fonteles CSR. Prophylaxis Versus Placebo Treatment for Infective and Inflammatory Complications of Surgical Third Molar Removal: A Split-Mouth, Double-Blind, Controlled, Clinical Trial With Amoxicillin (500 mg). *J Oral Maxillofac Surg.* 2011; 28:1-7.

Bisceglie V. Uber die antineoplastische immunitat. heterologe Einpflanzung von Tumoren in Hühner-embryonen. *Ztschr f Krebsforsch.*1933; 40: 122-140.

Carrel A, Lindbergh CA. The culture of whole organs. *Science,* 1935; 1(2112): 621-3.

Drug information handbook. A Clinically Relevant Resource for All Healthcare Professionals. 23 ed. Hudson: Lexicomp.2014-2015.580-3.

Duailibi MT, Duailibi SE, Young C, Bartett JD, Vacanti JP, Yelick PC. Bioengineered teeth from cultured rat tooth bud cells. *J Dental Research.*2004;83(7): 523-38.

Referências

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

Duailibi SE, Duailibi MT, Zhang W, Ariscan R, Vacanti JP, Yelick PC. Bioengineered dental tissues grown in the rat jaw. *J Dental Research*. 2008;87:745-50.

Duailibi MT, Duailibi SE, Duailibi Neto EF, Negreiros RM, Jorge WA, Ferreira LM, Vacanti JP, Yelick PC. Tooth Tissue Engineering: Optimal Dental Stem Cell Harvest Based on Tooth Development. *Artif Organs*. 2011;2(2):1-7.

Estrela C, Alencar AH, Kitten GT, Vencio EF, Gava E. Mesenchymal Stem Cells in the Dental Tissues: Perspectives for Tissue Regeneration. *Braz Dent J*. 2011;22(2):91-8.

Freshney RI. *Culture of animal cells: a manual of basic technique*. 5 ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2005.

Hildebrandt C, Büth H, Thielecke H. Influence of cell culture media conditions on the osteogenic differentiation of cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Ann Anat*. 2009; 191:23-32.

Khademhosseini A, Langer R, Borenstein J, Vacanti JP. Microscale technologies for tissue engineering and biology. *PNAS*. 2006,103(8): 2480–87.

Referências

Kim K, Brar P, Jakubowski J, Kaltman S, Lopez E. The use of corticosteroids and nonsteroidal anti-inflammatory medication for the management of pain and inflammation after third molar surgery: A review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009;107:630-40.

Klongnoi B, Kaewpradub P, Boonsiriseth K, Wongsirichat N. Effect of single dose preoperative intramuscular dexamethasone injection on lower impacted third molar surgery. *Int. J Oral Maxillofac.* 2012; 41: 376–79.

Korolkovas A. *Dicionário Terapêutico Guanabara.* Ed. 1999/2000. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,1999.

Langer R, Vacanti JP. *Tissue Engineering.Science,* 1993; 260:920- 26.

Langer R. *Tissue Engineering. Molecular Therapy.* 2000; 1(1).

Loew D, Shuster O, Graul EH. Dose-Dependent Pharmacokinetics of Dexamethasone. *Eur J Clin Pharmacol .*1986; 30:225-230.

Majid OW, Mahmood WK. Effect of submucosal and intramuscular dexamethasone on postoperative sequelae after third molar surgery: comparative study. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2011;49(8):647-52.

Markiewicz MR, Brady M F, Ding EL, Dodson TB. Corticosteroids Reduce Postoperative Morbidity After Third Molar Surgery:A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Oral Maxillofac Surg.* 2008; 66:1881-94.

Mitsiadis TA, Harada H. Regenerated teeth: the future of tooth replacement. An update. *Regen Med.* 2015; 10(1): 5–8.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for growth and survival- application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65:55-63.

Nair A, Shen J, Lotfi P, Ko C-Y, Zhang CC, Tang L. Biomaterial implants mediate autologous stem cell recruitment in mice. *Acta Biomaterialia.* 2011; 7: 3887–95.

Noboa MM, Ramacciato JC, Teixeira RG, Vicentini CB, Groppo FC, Motta RHL. Evaluation of effects of two dexamethasone formulations in impacted third molar surgeries. *Rev Dor.* 2014;15(3):163-8.

Oshima M , Tsuji T. Functional tooth regenerative therapy: tooth tissue regeneration and whole-tooth replacement. *Odontology.*2014; 102:123–36.

Porter RM, Huckle WR, Goldstein AS. Effect of Dexamethasone Withdrawal on Osteoblastic Differentiation of Bone Marrow Stromal Cells. *J Cel Biochem.* 2003; 90:13-22.

Puchtler H, Meloan SN, Terry MS. On the history and mechanism of alizarin and alizarin red S stains for calcium. *J Histochem Cytochem.* 1969 ;17(2):110-24.

Referências

Queckenberg C, Wachall B, Erlinghagen V, Di Gion P, Tomalik-Scharte D, Tawab M, Gerbeth K, Fuhr U. Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Comparative Bioavailability of Single, Oral 2-mg Doses of Dexamethasone Liquid and Tablet Formulations: A Randomized, Controlled, Crossover Study in Healthy Adult Volunteers. *Clinical Therapeutics*. 2011; 33(11): 1831-41.

Siegel S, Castellan JR. *Estatística não paramétrica para ciências do comportamento*. 2ed. 2006. Porto Alegre: Artmed. p.48.

Spoorenberg SMC, Deneer VHM, Grutters JC, Astrid E, Pulles AE, Voorn GP, Rijkers GT, Bos WJW, Van de Garde EMW. Pharmacokinetics of oral vs. intravenous dexamethasone in patients hospitalized with community-acquired pneumonia. *Br J Clin Pharmacol*. 2013; 78(1): 78–83.

Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol*. 2001.

Sujesh M, Rangarajan V, Kumar CR, *et al.* Stem cell mediated tooth regeneration: new vistas in dentistry. *J Indian Prosthodont Soc*. 2012;12(1):1-7.

Tatullo M, Marrelli M, Paduano F. The Regenerative Medicine in Oral and Maxillofacial Surgery: The Most Important Innovations in the Clinical Application of Mesenchymal Stem Cells. *Int J Med Sci*. 2015; 12:72-77.

Uyl DD, Bultink IEM, Lems WF. Advances in Glucocorticoid-Induced Osteoporosis. *Curr Rheumatol Rep*. 2011; 13:233–40.

Referências

Vacanti JP, Morse MA, Saltzman WM, Domb AJ, Perez-Atayde A, Langer R. Selective cell transplantation using bioabsorbable artificial polymers as matrices. *J Pediatr Surg.* 1988;23:3–9.

Wang H, Bo P, Li Y, ZHU D, PANG T, LIU Y. Dexamethasone has variable effects on mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy.* 2012; 14: 423–30.

.

NORMAS ADOTADAS

- ICMJE – *International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journal*. Disponível no endereço eletrônico: <http://www.icmje.org>.
- Ministério da Saúde – Conselho Nacional de Saúde – Resolução 196/96 sobre pesquisa envolvendo seres humanos. Brasília-DF;1996. 24p.
- Consulta DeCS – Descritores em Ciências da Saúde. [http://decs.bvs.br/-terminologia em saúde](http://decs.bvs.br/-terminologia-em-saude).
- Ferreira L M, Goldenberg S, Nahas F X, Barbosa M V J, Ely P B, Blanes L, Bretos J L G. *Orientação Normativa para a Elaboração e Apresentação de Teses*. São Paulo: Editora LMP, 2008. 84p.

ABSTRACT

ABSTRACT

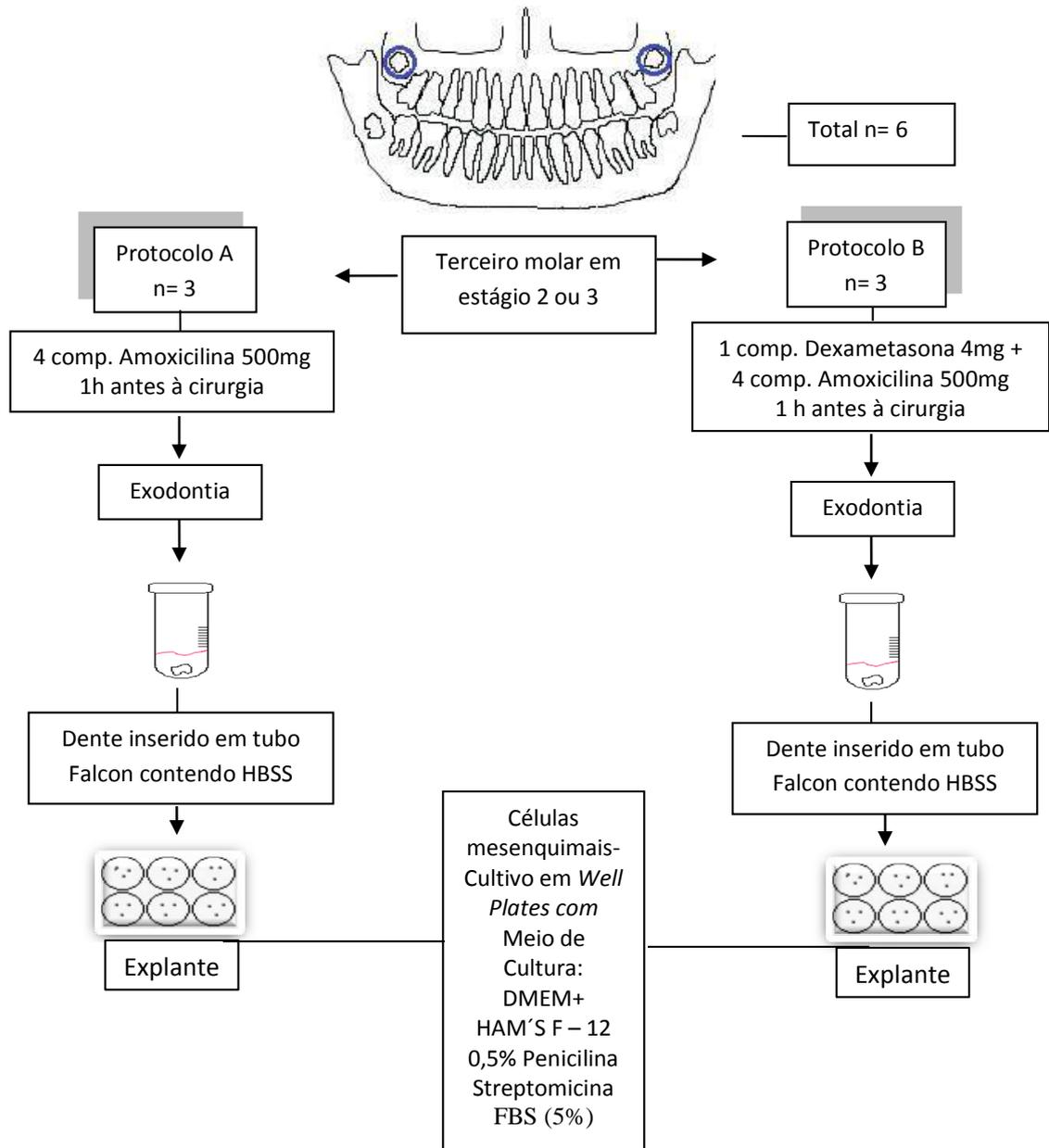
Introduction: The use of dexamethasone in mesenchymal cell culture induces osteoblastic differentiation and, consequently, formation of mineralized tissues. Tissue Engineering proposes the development of therapeutic strategies aiming at structural and functional regeneration of biological tissues. In this sense, cell characterization *in vitro* is critical to ensure the development of such techniques.

Objective: To evaluate the effect of dexamethasone administered as preoperative medication in primary cell culture of human dental pulp. **Methods:** We used cells from the third molar pulp. These cells were divided into two experimental groups, each with two preoperative medication protocols used in dental routine and differentiated by the intake of dexamethasone in one of them. The assessment of proliferation, differentiation, and viability through Trypan Blue, MTT and von Kossa, and Alizarin Red tests, respectively, were held in fixed intervals. Friedman analysis of variance and *t* test were applied, and confidence interval was set at 95%. **Results:** Protocol A cells proliferation reached its peak on day 21 while protocol B cells proliferation reached its peak on day 14. Protocol A cells were statistically more viable between days 7 and 21 whereas protocol B cells viability was higher on day 14. Von Kossa and Alizarin Red analyses showed that calcified nodules formation occurred from the seventh day of cell culture in protocol B cells and on day 14 in protocol A cells. **Conclusion:** The use of dexamethasone as preoperative medication in third molar surgery promotes cell differentiation earlier, when observed *in vitro*.

Key-words: dexamethasone, Tissue Engineering, third molar.

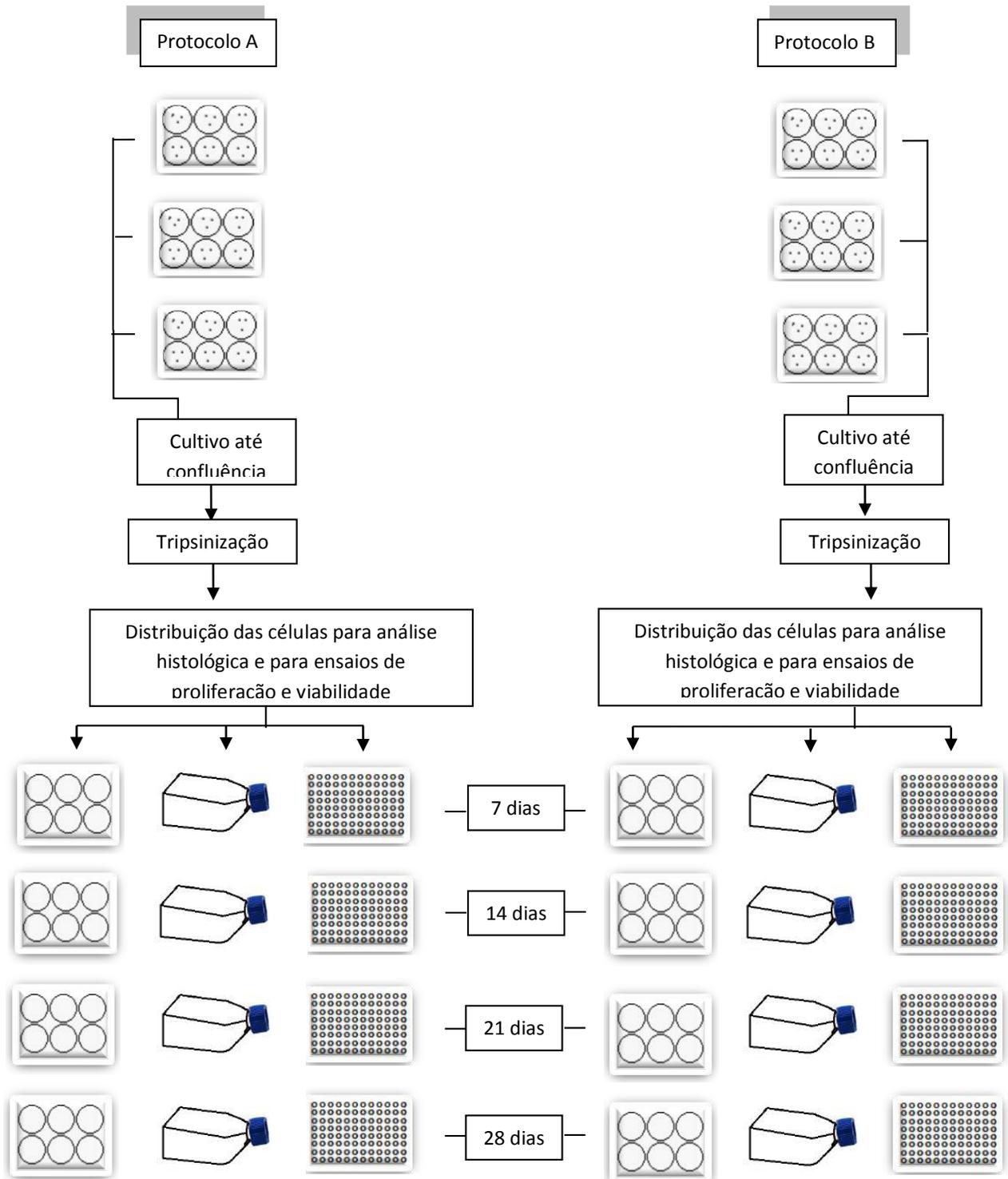
APÊNDICE 1- FLUXOGRAMA

1ª ETAPA- Obtenção de células



APÊNDICE 2-FLUXOGRAMA

2ª ETAPA- Expansão da população celular



APÊNDICE 3 - PROTOCOLO TRIPSINIZAÇÃO DE CÉLULAS

Etapas do procedimento

1. Retirar as células da incubadora (37°C).
2. Com uma pipeta, retirar o meio de cultura da garrafa T 75.
3. Adicionar 2 ml de PBS para remover resíduos localizados na superfície das culturas, movimentando a garrafa para que a solução cubra toda a superfície. Repetir o procedimento.
4. Adicionar 1ml de tripsina e movimentar a garrafa para cobrir toda a superfície da cultura. Incubar a 37°C por 15 minutos.
5. Após 15 minutos, retirar a garrafa da incubadora e adicionar 5ml de meio de cultura e re-suspender a solução para homogeneizar a amostra. Levar a solução homogeneizada para um tubo falcon e repetir o procedimento.
6. Centrifugar as amostras a 1.500 RPM durante 10 minutos.
7. Retirar a amostra da centrífuga e desprezar o meio de cultura sobrenadante em Becker com hipoclorito, mantendo o pellet.
8. Adicionar 10ml de meio de cultura e re-suspender o *pellet* para homogeneizar a amostra.

APÊNDICE 4 - PROTOCOLO VON KOSSA

Etapas do procedimento

1. Lavar os poços das *well-6* com 1ml de água destilada
2. Adicionar 1ml de paraformaldeído 4% em cada poço e deixar por 15 minutos
3. Desprezar o paraformaldeído
4. Lavar os poços com 1ml de água destilada por 3 vezes
5. Remover a água destilada dos poços
6. Adicionar nitrato de prata 5% e deixar por 20 minutos em luz UV
7. Remover o nitrato de prata dos poços
8. Lavar de 3 a 5 vezes cada poço com 1ml de água destilada
9. Remover a água destilada dos poços
10. Adicionar 1ml de tiosulfato 5% em cada poço, deixando por 2 minutos
11. Lavar os poços por 3 vezes com água destilada
12. Adicionar 1ml de eosina 0,1% e deixar por 3 minutos
13. Lavar os poços com água destilada
14. Analisar em microscópio

APÊNDICE 5 - PROTOCOLO *ALIZARIN RED*

Etapas do procedimento

1. Lavar os poços das *well-6* com 1ml de *PBS*
2. Remover o *PBS*
3. Adicionar 1ml de formol 10% em cada poço
4. Remover o formol dos poços
5. Lavar repetidas vezes com água destilada
6. Remover a água destilada dos poços
7. Adicionar 1ml de *alizarin red* em cada poço
8. Manter a *well* em *skaker* por 10 minutos
9. Remover o *alizarin red* dos poços
10. Lavar os poços com água destilada até atingir coloração mais clara
11. Analisar em microscópio

**ANEXO I- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE
EESCLARECIDO(TCLE)**

1 – TÍTULO DA PESQUISA – EFEITOS DA MEDICAÇÃO PRÉ-OPERATÓRIA NA CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS DE POLPA DENTAL HUMANA.

2 – PROPOSTA DE ESTUDO

Você está sendo convidado a participar de um Estudo de Pesquisa. Antes de decidir se quer participar ou não, é importante que entenda porque o Estudo está sendo realizado e o que ele vai envolver. Por favor, leia com atenção as informações ou peça que as mesmas sejam lidas a você pelo profissional que está apresentando. Sinta-se à vontade para fazer quaisquer questionamentos visando responder as suas dúvidas.

O objetivo desta pesquisa é de avaliar o efeito que a medicação pré-operatória, utilizada como protocolo em Odontologia, exerce nas células de dentes humanos *in vitro* (em laboratório), na tentativa de beneficiar a pesquisa com estas células. Para este estudo serão utilizados dentes com indicação de extração, avaliados por meio de exame clínico e radiográfico, os quais em condições normais seriam desprezados após a cirurgia. A sua participação será somente como doador do órgão dental. A obtenção das células dentais será executada em laboratório. As células serão alimentadas com nutrientes específicos para cultura e posteriormente avaliadas com testes pertinentes.

3 – DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS

Os pacientes incluídos neste estudo deverão concordar com o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido** assinando o protocolo clínico anexado. Após os exames clínico e radiográfico e constatada a indicação de extração dental como único tratamento, você será submetido ao procedimento cirúrgico. Este procedimento é exatamente igual ao praticado na rotina Odontológica e também seria realizado independente deste estudo.

4 – RELAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS ROTINEIROS

O procedimento cirúrgico consistirá na extração dentária e você será medicado seguindo dois protocolos de medicação pré-operatória utilizados na rotina odontológica. Na primeira extração de seu dente você será medicado de acordo com um tipo de protocolo e em sua segunda extração de dente, você será medicado seguindo outro protocolo, sendo que qualquer um dos dois protocolos de medicação pré-operatória trarão os mesmos benefícios a você, sendo estes a diminuição de traumas e dor após a cirurgia.

5 - RISCOS E DESCONFORTO

Os riscos e desconfortos diretos ou indiretos nos procedimentos de extração dentária ocorrerão independentemente da sua participação nesta pesquisa. Os riscos e desconfortos poderão ser:

Anestesia local durante a cirurgia: dor da punção na anestesia; sensação de amortecimento na região; pressão, vibração.

No pós operatório: inchaço; dor; limitação de movimento; dor na articulação da boca; mal gosto e febre.

Todos os itens descritos são os mesmos observados em procedimentos semelhantes à extração dental de dentes inclusos. Você não deverá deixar de informar ao profissional a respeito de quaisquer dúvida ou sintomas que observar

telefonando imediatamente ao profissional responsável pelo estudo, o qual estará disponível para ouvi-lo e esclarecer suas dúvidas e perguntas.

6 - BENEFÍCIOS

Esta é uma pesquisa experimental com a finalidade de verificar o comportamento *in vitro* (em laboratório) das células dentais quando submetidas aos diferentes protocolos de medicação pré-operatória utilizados na rotina Odontológica. Este protocolo de estudo não lhe trará benefícios diretos mas, ajudará a reunir informações importantes e valiosas que poderão nortear novas pesquisas e no futuro ajudar outras pessoas. Somente no final deste estudo poderemos concluir a presença de benefícios e o quanto úteis eles poderão ser.

7 - ALTERNATIVAS DE PROCEDIMENTO

Caso você opte por não participar deste Protocolo de Pesquisa não doando o dente, o profissional responsável dispensará o mesmo jogando-o no lixo contaminado.

8 - GARANTIA DE ACESSO

Você terá acesso a todo e qualquer destino dado às células utilizadas e/ou estocadas, além dos resultados obtidos com este estudo, garantimos que em qualquer etapa, você poderá esclarecer suas eventuais dúvidas com os profissionais responsáveis pela pesquisa. Os principais investigadores são Profs. Drs. Silvio Eduardo Duailibi e Monica Talarico Duailibi que podem ser encontrados no seguinte endereço: Av. Chibará, 452 e no telefone 011- 5051 1898. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Botucatu, 572 – 1º andar – cj 14, 5571-1062, FAX: 5539-7162 – E-mail: cepunifesp@unifesp.br

9 – PARTICIPAÇÃO

É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição. Sua participação no estudo é voluntária. Se preferir não participar, não há necessidade de nenhuma justificativa.

10 - CONFIDENCIALIDADE

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com as de outros voluntários. Tanto o profissional responsável quanto a equipe envolvida, manterão em sigilo absoluto sua identidade e as informações que você vier a apresentar. Você não será identificado em nenhuma publicação onde o conteúdo do trabalho seja apresentado, garantindo o segredo profissional.

11 – ATUALIZAÇÃO DOS RESULTADOS

É garantido o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

12 – DESPESAS E COMPENSAÇÕES

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, após a sua extração. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional no estudo, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

13 – COMPROMISSO

Os pesquisadores assumem o compromisso de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “*EFEITOS DA MEDICAÇÃO PRÉ-OPERATÓRIA NA CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS DE POLPA DENTAL HUMANA*”. Eu discuti com o Dr. Silvio Eduardo Duailibi sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do Paciente

Data: ___/___/_____

Assinatura da Testemunha

Data: ___/___/_____

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo Estudo

Data: ___/___/_____

ANEXO II- TERMO DE ASSENTIMENTO PARA MENORES DE DEZOITO ANOS

Meu nome é Rani Moretti e o meu trabalho é pesquisar os efeitos que a medicação pré-operatória, utilizada em protocolos de rotina odontológica, exerce nas células de dente quando são cultivadas em laboratório. Queremos melhorar o tratamento de doenças causadas por acidentes e achamos que esta pesquisa pode ajudar nisso. Eu vou informar você e convidá-lo a participar desta pesquisa. Você pode escolher se quer participar ou não, é você quem decide. Discutimos esta pesquisa com seus pais ou responsáveis e eles sabem que também estamos pedindo seu acordo. Se você vai participar na pesquisa, seus pais ou responsáveis também terão que concordar. Mas se você não desejar fazer parte na pesquisa, não é obrigado, até mesmo se seus pais concordarem. Você pode discutir qualquer coisa deste formulário com seus pais, amigos ou qualquer um com quem você se sentir a vontade de conversar. Pode haver algumas palavras que não entenda ou coisas que você quer que eu explique mais detalhadamente porque você ficou mais interessado ou preocupado. Por favor, peça que pare a qualquer momento e eu explicarei.

Queremos achar melhores maneiras para tratar doenças causadas por acidentes ou por fatores genéticos e precisamos avaliar os efeitos que as medicações utilizadas antes de tirar o dente exercem sobre as células para que possamos saber se essas células de dente irão se manter vivas e saudáveis. Estamos testando células de adolescentes que são da sua idade porque as suas células estão mais novas e mais adequadas para esta pesquisa.

Você não precisa participar desta pesquisa se não quiser. Se decidir não participar da pesquisa, nada mudará no seu tratamento de saúde. Mesmo assim, este serviço de saúde estará disponível para você. Até mesmo se disser "sim" agora, poderá mudar de idéia depois, sem nenhum problema.

A sua saúde é muito importante e você veio ao dentista para tratá-la. O seu dente precisa ser arrancado mesmo que você decida não participar desta

pesquisa. Para participar desta pesquisa você deve doar o seu dente que seria jogado no lixo para utilizarmos em laboratório.

O uso do dente em laboratório é seguro e já foi testado em outros adolescentes. Não houve nada que nos preocupasse. Porém, se qualquer coisa incomum acontecer a você, você deverá se sentir à vontade de nos chamar a qualquer momento para falar sobre suas preocupações ou perguntas. Há algumas outras coisas que eu gostaria que você soubesse. Talvez você sinta um pouco dor ou desconforto depois que o seu dente for arrancado, porém isto será minimizado devido ao uso das medicações que você irá tomar antes da cirurgia e além disso, esses sintomas são passageiros e não tem nada a ver com este estudo. A sua participação nesta pesquisa é muito importante para melhorar o tratamento de doenças causadas por acidentes e fatores genéticos. Isto irá ajudar muitas pessoas agora ou mais tarde. Não falaremos para outras pessoas que você está nesta pesquisa e também não comunicaremos informação sobre você para qualquer um que não trabalha na pesquisa.

Eu entendi que a pesquisa é sobre a avaliação do efeito da medicação pré-operatória, utilizada na rotina odontológica, em células de dente e que este estudo será feito em laboratório. Eu entendi que o meu dente precisa ser arrancado mesmo que eu não queira participar desta pesquisa.

Assinatura do Paciente

Data: ___/___/_____

Assinatura dos Pais ou Responsável

Data: ___/___/_____

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Assentimento deste paciente e de seu representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo Estudo

Data: ___/___/_____

ANEXO III- PARECER DA ÉTICA CONSUBSTANCIADO

Plataforma Brasil - Ministério da Saúde

Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP/ Hospital São Paulo

PROJETO DE PESQUISA

Título: EFEITOS DA MEDICAÇÃO PRÉ-OPERATÓRIA NA CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS DE POLPA DENTAL HUMANA

Área Temática:

Pesquisador: RANI DA CUNHA MORETTI

Versão: 1

Instituição: Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP/EPM

CAAE: 05984512.3.0000.5505

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 72518

Data da Relatoria: 13/08/2012

Apresentação do Projeto:

A aplicação de dexametasona em cultura de células mesenquimais induz a diferenciação osteoblástica com consequente formação de tecidos mineralizados. A Engenharia tecidual na odontologia propõe o desenvolvimento de estratégias terapêuticas direcionadas para a regeneração funcional e estrutural de tecidos biológicos. Nesse sentido, a caracterização do comportamento celular in vitro é fundamental para garantir o desenvolvimento destas técnicas. Este estudo visa avaliar os efeitos da ingestão de dexametasona como medicação pré-operatória na cultura de células primárias de polpa dental.

Serão analisadas células da polpa de terceiros molares de descarte cirúrgico.

As amostras serão obtidas de doadores voluntários com indicação clínica e radiográfica de extração de terceiros molares superiores, realizadas por cirurgiões-dentistas. Os pacientes serão selecionados no ambulatório de odontologia da USP no curso de cirurgia buco-maxilo-facial da Fundect e outros órgãos de saúde públicos. Previamente a cirurgia, e seguindo a rotina na prática odontológica, serão utilizados dois protocolos de medicação pré-operatória. Os pacientes serão submetidos a duas cirurgias para a obtenção de duas amostras, ou seja, haverá dois tempos cirúrgicos, sendo extraído no primeiro tempo cirúrgico o terceiro molar superior do lado direito e em outro tempo cirúrgico o terceiro molar superior esquerdo, afim de não comprometer a função mastigatória e deglutição, bem como não comprometer a recuperação pós operatória, ou seja, quando

for extraído o dente de um lado, o paciente terá o outro lado livre para cumprir suas funções, bem como diminuir o contato de resíduos no local da extração. No primeiro tempo cirúrgico será aplicado o protocolo A e no segundo tempo cirúrgico será aplicado o protocolo B. No protocolo A a medicação será composta de 4 comprimidos de amoxicilina 500mg (antibiótico) e no protocolo B será de 4 comprimidos de amoxicilina 500mg (antibiótico) + 1 comprimido de dexametasona 4mg (anti-inflamatório hormonal) por via oral uma hora antes ao ato cirúrgico.

As amostras serão distribuídas em dois grupos experimentais de acordo com dois protocolos de medicação pré-operatória utilizados em rotina odontológica, sendo diferenciados pela ingestão da medicação dexametasona em apenas um dos protocolos. Após o cultivo, as células serão avaliadas em relação a proliferação, viabilidade e diferenciação, com os testes de Trypan Blue, Metiltetrazolium, Alizarin Red e Von Kossa respectivamente.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar o efeito osteoindutor da dexametasona administrada como medicação pré-operatória na cultura de células primárias

Objetivo Secundário:

Desenvolver o Substituto Biológico dental por meio de Engenharia Tecidual.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Sem risco adicional aos procedimentos de rotina para extração dental de dentes inclusos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Esta é uma pesquisa experimental com a finalidade de verificar o comportamento in vitro (em laboratório) das células dentais quando submetidas aos diferentes protocolos de medicação pré-operatória utilizados na rotina Odontológica. Este protocolo de estudo ajudará a reunir informações importantes e valiosas que poderão nortear novas pesquisas direcionadas a obtenção do Substituto Biológico Dental.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A folha de rosto encontra-se adequada. Apresenta TCLE, contemplando a resolução 196/96, descrevendo os procedimentos do estudo, informando que o material coletado será utilizado somente para esta pesquisa.

Recomendações:

nada consta

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há impedimento ético para condução do estudo

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 13 de Agosto de 2012

Assinado por:
José Osmar Medina Pestana

FINANCIAMENTO

Configuram como parceiros deste estudo a Faculdade de Engenharia de Materiais, Química e Mecânica da UNICAMP, a FAPESP vinculada ao Projeto JP 07/51227-4, o CNPq vinculado ao projeto n° 573661/2008-1 do INCT Biofabris (Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia em Biofabricação) e FAPESP 08/57860-3, além do apoio da Rede Ibero-Americana de Biofabricação – Cytel.

FONTES CONSULTADAS

Fontes Consultadas

- Medicina Net [homepage na internet]. Bula da dexametasona [acesso em 09 de fevereiro 2015]. Disponível em:
<http://www.medicinanet.com.br/bula/1849/dexametasona.htm>.
- Medicina Net [homepage na internet]. Bula da amoxicilina [acesso em 09 de fevereiro 2015]. Disponível em:
<http://www.medicinanet.com.br/bula/492/amoxicilina.htm>.