

RICARDO LUIZ PISCIOLARO

**HEMODERIVADOS COMO SUPLEMENTO NO
MEIO DE CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO
DENTÁRIAS HUMANAS**

**Tese apresentada à Universidade Federal
de São Paulo, para obtenção do Título de
Doutor em Ciências**

SÃO PAULO

2011

RICARDO LUIZ PISCIOLARO

**HEMODERIVADOS COMO SUPLEMENTO NO
MEIO DE CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO
DENTÁRIAS HUMANAS”**

**Tese apresentada à Universidade Federal
de São Paulo, para obtenção do Título de
Doutor em Ciências**

ORIENTADOR: Prof. SILVIO EDUARDO DUAILIBI

CO-ORIENTADOR: Prof^ª. MONICA TALARICO DUAILIBI

SÃO PAULO

2011

Pisciolaro, Ricardo Luiz.

Hemoderivados como suplemento no meio de cultivo para células-tronco dentárias humanas.- Ricardo Luiz Pisciolaro.-- São Paulo, 2011.
xxii, 164f .

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo. Programa de Pós-graduação em Cirurgia Plástica.

Título em inglês: Blood derivatives used to supply the culture medium of human dental stem cells.

1. Engenharia Tecidual. 2. Células-tronco adultas. 3. Técnicas de cultura de células. 4. Meios de cultura. 5. Proliferação de células.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

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

COORDENADOR: Prof. Dr. Miguel Sabino Neto

Aos meus pais, Paschoal Pisciolaro (*in memoriam*) e Maria Menegon Pisciolaro, pessoas simples desprovidas de letras, que se empenharam nos estudos de seus filhos como seus mais nobres legados.

A Margarete, companheira, cúmplice, amiga, mulher. Sem sua presença nada na minha vida seria possível, força espiritual, meu porto seguro quando do retorno após as tempestades.

Aos meus filhos Rafael e Guilherme,
motivos da minha vida.

À Professora Doutora e Livre Docente **LYDIA MASA KO FERREIRA**, Chefe do Departamento de Cirurgia, Titular da Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP, exemplo inigualável de capacidade de liderança, competência, meus sinceros agradecimentos por ter proporcionado minha admissão neste seleto grupo de pós-graduandos, recebendo-me com carinho no Programa de Pós-Graduação da Disciplina em Cirurgia Plástica.

Ao Professor Doutor **SILVIO EDUARDO DUAILIBI**, meu orientador, meu tutor, meu mestre, amigo de longa data, há bem mais do que dois anos, como ele gosta de se referir, um conhecedor incontestado no cenário nacional da Engenharia Tecidual, um incansável pesquisador, que tanto orgulho traz à Odontologia Brasileira.

À Professora Doutora **MONICA TALARICO DUAILIBI**, minha co-orientadora, não menos importante que meu orientador, pessoa que, no convívio desses anos, despertou em mim a curiosidade científica, a responsabilidade técnica, demonstrando seu carinho e comprometimento com a ciência, pessoa que aprendi a respeitar como pesquisadora.

Meus mais profundos agradecimentos.

Ao Professor Doutor **MIGUEL SABINO NETO**, coordenador do programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica da UNIFESP, pela atenção dispensada indistintamente a todos participantes das atividades regidas pela Disciplina de Cirurgia Plástica e acima de tudo por ter depositado sua confiança neste estudo.

Ao *Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica da UNIFESP*, pela oportunidade de desenvolver-me no campo da pesquisa científica.

A todos os *Professores e Doutores* do Curso de Pós-Graduação e da Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP, pela transmissão de suas experiências, conhecimentos e críticas científicas, tão essenciais à conclusão deste estudo.

Ao Professor Doutor e Livre Docente **WALDYR ANTONIO JORGE**, Titular da Disciplina de Clínica Odontológica Integrada da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo – FOU SP, Cirurgião Buco-Maxilo-Facial, pela inestimável ajuda na coleta e obtenção de parte da amostra deste estudo, nos cursos de especialização em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial que ministra na FUNDECTO e APCD-Central.

Aos Professores **NEIL FERREIRA NOVO** e **IARA JULIANO**, professores da Faculdade de Medicina da Universidade de Santo Amaro (UNISA), pela presteza, auxílio e ensinamentos de bioestatística.

A **todos os colegas** do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica da UNIFESP, pelos laços de amizades construídos neste período de conquistas, pelas atitudes de apoio e crescimento contínuo, pelo auxílio mútuo, pela presença forte humilde e constante.

Às secretárias do departamento de Cirurgia Plástica, **MARTA REJANE DOS REIS SILVA**, **SANDRA DA SILVA** e **SILVANA APARECIDA COSTA DE ASSIS**, pelo cuidado e profissionalismo em tratar os assuntos dos pós-graduandos, prestativas e atenciosas, sempre prontas a atender nossas solicitações e proporcionar o bom andamento do curso.

A **IVONE DE PAULO**, técnica de histologia do laboratório de Neurofisiologia do Centro de Terapia Celular e Molecular da UNIFESP-CTCMol, pela disponibilidade em ajudar, atenção dispensada e orientação nas formulações deste estudo.

À amiga e colega **EVELY DOMINICHEL MACHADO DE OLIVEIRA**, Cirurgiã Dentista, ortodontista, pelo companheirismo e ajuda durante as coletas das doações para os experimentos deste estudo.

À colega **RENATA M. NEGREIROS**, Cirurgiã Buco-Maxilo-Facial, professora assistente dos cursos de especialização em cirurgia, pelo auxílio e organização das agendas cirúrgicas que originaram as doações do presente estudo.

A **MÁRCIA HAGE**, biomédica, responsável técnica pelo Laboratório de Poluição Atmosférica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP, pela inestimável cooperação para a realização deste estudo.

A todos *os pacientes* que participaram deste estudo e que foram sem sombra de dúvidas os grandes realizadores deste sonho, pois sem seus inestimáveis apoios nada teria sido possível.

A *todos os demais colegas, funcionários, acadêmicos, pós-graduandos*, com os quais convivi durante estes anos, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste sonho.

À *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)*, pela bolsa recebida para a realização deste doutorado.

À *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)*, pelo auxílio recebido para a realização deste estudo.

Meus sinceros agradecimentos.

*“...que vosso amor cresça cada vez mais
no pleno conhecimento e em todo
o discernimento. “*

Paulo (Filipenses, 1:9)

*“ Instruamo-nos, pois, para conhecer.
Eduquemo-nos para discernir.
Cultura intelectual e aprimoramento moral são
imperativos da vida, possibilitando-nos a
manifestação do amor, no império da sublimação
que nos aproxima de Deus.”*

**Francisco Cândido Xavier
pelo espírito Emmanuel**

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	iv
AGRADECIMENTOS.....	v
LISTAS.....	xi
RESUMO.....	xxi
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVO.....	06
3. LITERATURA.....	08
4. MÉTODOS.....	40
5. RESULTADOS.....	80
6. DISCUSSÃO.....	116
7. CONCLUSÃO.....	138
8. REFERÊNCIAS.....	140
NORMAS ADOTADAS.....	148
ABSTRACT.....	150
APÊNDICE	152
ANEXO.....	154
FONTES CONSULTADAS.....	163

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Em 1- Câmara de Neubauer, 2- o destaque dos nove quadrantes para contagem celular – células e a identificação da viabilidade celular. célula viável ■, célula inviável ■51
- FIGURA 2.** Esquema demonstra a divisão da placa com seis poços: superior, números 1-3; triplicatas para proliferação da cultura celular e inferior, letras A;B;C, para cultura celular, coloração com marcadores para tecidos mineralizados (A e C). Teste do Cometa – “B”. Densidade de $6,50 \times 10^3$ células/cm² por poço.....52
- FIGURA 3.** Fluxograma da preparação dos soros humanos, autólogo e homólogo, que foram utilizados nos processos de produção dos meios de cultivo III e IV.....56
- FIGURA 4.** Esquema reproduzindo o *modus operandis* da preparação de todos os meios de cultivo suplementados utilizados no estudo.....59
- FIGURA 5.** Fluxograma resumido da distribuição a partir da digestão tecidual, para cada experimento. Divisão das $10,00 \times 10^6$ células-tronco de origem dentária: $6,00 \times 10^6$ células para as placas de cultura e $4,00 \times 10^6$ células para as garrafas de cultura modelo T-25/UFCs.....63
- FIGURA 6.** Fluxograma do estudo distribuição das células-tronco, sistema adotado para todos os experimentos.....65
- FIGURA 7.** Organograma da agenda de trabalho de cada experimento do dia zero ao 28º dia, adotado para cada Meio de cultivo celular empregado no estudo.....66

FIGURA 8.	Fluxograma do Teste do Cometa; preparação das lâminas, eletroforese, fixador e descanso, re-hidratação e colorização para visualização em MOI (microscopia óptica invertida).....	78
FIGURA 9.	Microfotografias das proliferações celulares nos quatro meios de cultivo do estudo durante as 4 semanas de cultura, mostrando a ocorrência de nódulos no meio IV (setas).- notar a menor proliferação generalizada no meio I (IS). Proliferação celular no meio IV significativa em relação ao meio I.....	85
FIGURA 10.	Curvas de proliferação das culturas nos meios I, II, III e IV no 7º dia.....	94
FIGURA 11.	Curvas de proliferação das culturas nos meios I, II, III e IV no 14º dia.....	94
FIGURA 12.	Curvas de proliferação das culturas nos meios I, II, III e IV no 21º dia.....	95
FIGURA 13.	Curvas de proliferação das culturas nos meios I, II, III e IV no 28º dia.....	95
FIGURA 14.	Curvas das médias das proliferações, dos 5 experimentos, nos meios I, II, III e IV.....	96
FIGURA 15.	Fotografias das superfícies cultivadas nas garrafas T-75 com 25 cm ² , notar a grande diferença entre as frequências de UFCs, principalmente entre o meio SHAu e o meio IS. As frequências de UFCs entre SHE (heterólogo) e SHHo (homólogo) são muito semelhantes.....	107

- FIGURA 16.** Fotografias das CFUs dos quatro meios do estudo. Meio IV (SHAu), colônias mais densas e volumosas. Meio II e III, SFB e SHHo, respectivamente, muito semelhantes. Meio I (IS), quase não aparecem colônias.....108
- FIGURA 17.** Microfotografias do 28º dia, mostrando a ocorrência de Cometas nos 4 meios de cultivo. Em A, meio I, em B meio II, em C meio III e em D meio IV. Referente ao 2º Experimento do estudo.....112
- FIGURA 18.** Microfotografias do 28º dia, mostrando a ocorrência de Cometas nos 4 meios de cultivo. Em A, meio I, em B meio II, em C meio III e em D meio IV. Referente ao 5º Experimento do estudo.....113
- FIGURA 19.** Microfotografias do 28º dia, mostrando a ocorrência de *clusters*, nódulos de mineralizações nos 4 meios (setas), evidenciados pelo corante Von Kossa (VK) - notar a ausência de células no meio I (IS), utilizado como confirmação do (AV).114
- FIGURA 20.** Microfotografias do 28º dia, mostrando a ocorrência de *clusters*, nódulos de mineralizações nos 4 meios (setas), evidenciados pelo corante Alizarina Vermelha (AV) - notar a ausência de células no meio I (IS), utilizado como confirmação do (VK).....115

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1.** Triplicatas da proliferação celular no meio de cultivo - I (Isento de Suplemento – IS) na potência de 10^3 células, durante as quatro semanas (7º, 14º, 21º e 28º dias) do desenvolvimento de cada um dos cinco experimentos (1º, 2º, 3º, 4º e 5º).....81
- TABELA 2.** Triplicatas da proliferação celular no meio de cultivo - II (Suplementado com – SHe¹/SFB²), na potência de 10^3 células, durante as quatro semanas (7º, 14º, 21º e 28º dias) do desenvolvimento de cada um dos cinco experimentos (1º, 2º, 3º, 4º e 5º).....82
- TABELA 3.** Triplicatas da proliferação celular no meio de cultivo – III (Suplementado com – SHHo¹), na potência de 10^3 células, durante as quatro semanas (7º, 14º, 21º e 28º dias) do desenvolvimento de cada um dos cinco experimentos (1º, 2º, 3º, 4º e 5º).....83
- TABELA 4.** Triplicatas da proliferação celular no meio de cultivo – IV (Suplementado com SHAu¹), na potência de 10^3 células, durante as quatro semanas do (7º, 14º, 21º e 28º dias) desenvolvimento de cada um dos cinco experimentos (1º, 2º, 3º, 4º, 5º).....84
- TABELA 5.** Médias das triplicatas das culturas primárias de células-tronco humanas de origem dentária em cultivo no meio I (IS)¹ aos 7º, 14º, 21º e 28º dias do experimento.....86
- TABELA 6.** Médias das triplicatas das culturas primárias de células-tronco humanas de origem dentária, em cultivo no meio II (SHe¹/SFB²) aos 7º, 14º, 21º e 28º dias de experimento.....87
- TABELA 7.** Médias das triplicatas das culturas primárias de células-tronco de humanas origem dentária, em cultivo no meio III (SHHo¹) aos 7º, 14º, 21º e 28º dias do experimento.....88

TABELA 8.	Médias das triplicatas das culturas primárias de células-tronco humanas de origem dentária, em cultivo no meio IV (SHAu ¹) aos 7º, 14º, 21º e 28º dias do experimento.	89
TABELA 9.	Comparação entre as médias da proliferação celular das triplicatas em cultura primária de células-tronco humanas de origem dentária, em cultivo nos meios empregados no estudo no 7º dia.....	90
TABELA 10.	Comparação entre as médias da proliferação celular das triplicatas em cultura primária de células-tronco humanas de origem dentárias em cultivo nos meios empregados no estudo no 14º dia.	91
TABELA 11.	Comparação entre as médias da proliferação celular das triplicatas em cultura primária de células-tronco humanas de origem dentária em cultivo nos meios empregados no estudo no 21º dia.	92
TABELA 12.	Comparação entre as médias da proliferação celular das triplicatas em cultura primária de células-tronco humanas de origem dentária em cultivo nos meios empregados no estudo no 28º dia.	93
TABELA 13.	Triplicatas das leituras de pH ¹ do meio de cultivo – I (IS ²) de cultura primária de células-tronco humanas de origem dentária.....	97
TABELA 14.	Triplicatas das leituras de pH ¹ do meio de cultivo – II (SHe ² /SFB ³) de cultura primária de células-tronco humanas de origem dentária.....	98
TABELA 15.	Triplicatas das leituras de pH ¹ do meio de cultivo – III (SHHo ²) de cultura primária de células-tronco humanas de origem dentária.....	99
TABELA 16.	Triplicatas das leituras de pH ¹ do meio de cultivo – IV (SHAu ²) de cultura primária de células-tronco humanas de origem dentária.....	100

TABELA 17.	Médias das leituras em triplicatas dos pHs ¹ do meio de cultivo – I (IS ²) de cultura primária de células-tronco humanas de origem dentária.....	101
TABELA 18.	Médias das leituras em triplicatas dos pHs ¹ do meio de cultivo – II (SHe ² /SFB ³) de cultura primária de células-tronco humanas de origem dentária.....	102
TABELA 19.	Médias das leituras em triplicatas dos pHs ¹ do meio de cultivo – II (SHHo ²) de cultura primária de células-tronco humanas de origem dentária.....	103
TABELA 20.	Médias das leituras em triplicatas dos pHs ¹ do meio de cultivo – I V (SHAu ²) de cultura primária de células-tronco humanas de origem dentária.....	104
TABELA 21.	Porcentual de Unidade Formadoras de Colônias (UFCs ¹) efetivamente encontradas nos quatro meios do estudo no 14º dia de cultivo.....	105
TABELA 22.	Porcentual de Unidade Formadoras de Colônias (UFCs ¹) efetivamente encontradas nos quatro meios do estudo no 21º dia de cultivo.....	106
TABELA 23.	Presença de Cometas no 28º dia, em cada um dos 5 experimentos nos 4 diferentes tipos de meios de cultivo.....	109
TABELA 24.	Presença de Cometas com classificação “0” no 28º dia, em cada um dos 5 experimentos, nos 4 tipos diferentes de meios de cultivo.....	109
TABELA 25.	Presença de Cometas com classificação “1” no 28º dia, em cada um dos 5 experimentos, nos 4 tipos diferentes de meios de cultivo.....	110

TABELA 26.	Presença de Cometas com classificação “2” no 28º dia, em cada um dos 5 experimentos, nos 4 tipos diferentes de meios de cultivo.....	110
TABELA 27.	Presença de Cometas com classificação “3” no 28º dia, em cada um dos 5 experimentos, nos 4 tipos diferentes de meios de cultivo.....	111
TABELA 28.	Presença de Cometas com classificação “4” no 28º dia, em cada um dos 5 experimentos, nos 4 tipos diferentes de meios de cultivo.....	111

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AV =	<i>Alizarina Vermelha</i>
cels. =	células
CEP =	Comitê de Ética em Pesquisa
CFUs =	<i>Colonies Forming Units</i>
cm =	centímetro
cm ² =	centímetro ao quadrado
CO =	meio condicionado
CO ₂ =	dióxido de Carbono
CONEP =	Comissão Nacional de Pesquisa
DMEM =	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA =	<i>Desoxiribonucleic acid</i>
DSCs =	<i>Dental Stem Cells</i>
et al =	e colaboradores
epSCS =	<i>Epthelial Stem Cell</i>
ET =	Engenharia Tecidual
FBS =	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FCS =	<i>Fetal Calf Serum</i>
° =	Grau
°C =	Grau Celsius
h =	hora (s)
hESC =	<i>human Embryonary Stem cell</i>
hDPCS =	<i>human Deciduous Pulpar Cells</i>
HBSS =	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HF-12 =	<i>Han's F-12</i>
HG =	<i>High Glicose</i>
IS =	Isento de Suplemento
LM =	<i>Low Melting</i>

μ =	micron
μ l =	microlitro
μ m =	micrômetro
mm =	milímetro
mg =	miligrama
MEM =	<i>Modified Essential Medium</i>
α MEM =	<i>alpha Modified Essential Medium</i>
MSCs =	<i>Medular Stem Cells / Mesenchymal Stem Cells</i>
ml =	mililitros
NIS =	Não Imunossuprimidos
% =	Por cento
π =	letra grega “Pi”
PBS =	<i>Phosphate Bufered Salt Solution</i>
pH =	Ponto Hidrogeniônico
PRP =	Plasma Rico em Plaquetas
r =	raio
r^2 =	raio ao quadrado
rpm =	rotações por minuto
SF =	Serum Free
SHAu =	Soro Humano Autólogo
SHe =	Soro Heterólogo
SHHo =	Soro Humano Homólogo
T-25 =	modelo de garrafa com 25 centímetros de área útil
TCLEs =	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF- β =	<i>Transforming Growth Factor - Beta</i>
UI =	Unidades Internacionais
UNIFESP =	Universidade Federal de São Paulo
UV =	Ultravioleta
VK =	Von Kossa

LISTA DE TERMOS USUAIS NA ENGENHARIA TECIDUAL SEM TRADUÇÃO PARA O IDIOMA PORTUGUÊS

AR	=	Alizarin Red
CFUs	=	Colonies Forming Unitis
<i>CONSTRUCT</i>	=	Arcabouço semeado
<i>CLUSTERS</i>	=	Colônias celulares
DMEM	=	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DSCs	=	Dental Stem Cells
epSCS	=	Epthelial Stem Cell
FBS	=	Fetal Bovine Serum
FCS	=	Fetal Calf Serum
hESC	=	human Embrionary Stem cell
hDPCS	=	human Deciduous Pulpar Cells
HBSS	=	Hank's Balanced Salt Solution
HF-12	=	Meio Han's F-12
HG	=	High Glicose
LM	=	Low Melting
MEM	=	Modified Essential Medium
α MEM	=	alpha Modified Essential Medium
MSCs	=	Medular Stem Cells / Mesenchymal Stem Cells
<i>OVERNIGHT</i>	=	Ciclo noturno de 12 horas
PBS	=	Phosphate Bufered Salt Solution
<i>SCAFFOLD</i>	=	Arcabouço, estrutura tridimensional.
SF	=	Serum Free
TGF- β	=	Fator de crescimento transformador – beta

RESUMO

Introdução: Um dos objetivos da Medicina é superar os danos causados ao organismo por doenças, senilidade e traumas, restabelecendo um equilíbrio normo-funcional. Nas perdas teciduais, inúmeros autores afirmam que o substituto “ideal” é o próprio tecido saudável, de mesma origem ou o tecido produzido por Engenharia Tecidual (ET). Porém, ainda são necessárias muitas pesquisas para a utilização *in vivo*. **Objetivo:** Avaliar três suplementos hemoderivados, empregados em meios de cultivo, quanto à proliferação celular e o dano celular de células-tronco de origem dentária. **Métodos:** Foram realizados cinco experimentos a partir de dentes terceiros molares em desenvolvimento. Após a digestão enzimática, as células-tronco adultas foram cultivadas em quatro diferentes meios de cultivo. Meio I, isento de suplemento hemoderivado; meio II, suplementado com FBS (heterólogo); meio III, suplementado com soro humano homólogo; meio IV, suplementado com soro humano autólogo. Essas culturas foram analisadas comparativamente quanto à proliferação celular, submetidas a testes com marcadores Von Kossa e Alizarina Vermelha durante quatro semanas (avaliadas semanalmente) e a cada duas semanas quanto às unidades formadoras de colônias (UFCs). No 28º dia as quatro culturas foram submetidas ao teste do “cometa”, analisando-se possível dano no DNA celular. Os resultados foram submetidos à análise estatística de Variância de Friedman, estabelecendo-se significância para $(p) \leq 5\%$. **Resultados:** O meio de cultivo IV atingiu uma proliferação celular superior ao Meio I, demonstrando um resultado significativo ($p^*=0,0074$). O meio de cultivo II, mostrou proliferação superior ao meio I e desenvolvimento semelhante ao meio III, porém nenhum demonstrou significância em relação ao meio IV. Os resultados do teste do cometa evidenciaram um menor dano celular nas culturas do meio IV em relação ao meio II e meio III. As UFCs foram numerosas nos meios IV e III respectivamente, havendo maior índice de mineralização no meio IV do que nos meios II e III. **Conclusão:** O meio de cultivo suplementado com hemoderivado autólogo favoreceu significativamente a proliferação celular. O hemoderivado humano mostrou-se viável como suplemento nas culturas de células-tronco dentárias humanas.

1. INTRODUÇÃO

Um dos objetivos da Medicina é superar os danos causados ao organismo por doenças, senilidade e traumas que geram perdas parciais ou totais de órgãos, restabelecendo um equilíbrio normo-funcional, devolvendo ao indivíduo a saúde e promovendo a melhora na qualidade de vida.

Ao longo do tempo, a qualidade de vida e longevidade do ser humano tem melhorado . Isso se deve, entre outros fatores, a uma melhor compreensão da fisiologia e da fisiopatologia humana, além do desenvolvimento de novos medicamentos, técnicas cirúrgicas e métodos terapêuticos.

As técnicas de transplante de órgãos evoluíram e com elas as medicações para suporte e manutenção do órgão transplantado. Porém, a maior dificuldade nesse processo tem sido encontrar doadores compatíveis com o indivíduo receptor e em tempo hábil. No entanto, o acesso a essas inovações ainda representa um ônus considerável ao erário público e ao indivíduo (VATS *et al.*2005).

Assim sendo, em determinadas especialidades da saúde, como na Ortopedia ou na Odontologia, o desenvolvimento e emprego de biomateriais como substitutos ou indutores de formação tecidual representam uma alternativa ao restabelecimento da função. Porém, esses biomateriais têm limitações quanto às indicações de emprego, adequando-se a casos específicos, particularmente aos que envolvem tecidos mineralizados.

Nas perdas teciduais, autores tais como LANGER & VACANTI (1993), KIM & VACANTI (1999), STOCK & VACANTI (2001), KAIGLER & MOONEY (2001) foram unânimes em afirmar que o

substituto “ideal” é o próprio tecido saudável de mesma origem ou o tecido produzido por meio da Engenharia Tecidual (ET), partindo de uma amostra de tecido obtido previamente.

As células-tronco, tanto embrionárias quanto adultas, têm um grande potencial terapêutico e certamente representam uma fonte inesgotável para modelos de estudo. Porém, muitas pesquisas ainda são necessárias até que se possam empregar clinicamente estas populações com segurança.

A partir dos modelos experimentais aprimoraram-se técnicas de isolamento celular tornando possível a melhor compreensão das interações moleculares intercelulares, proporcionando um avanço significativo às Ciências da Saúde.

A ET é uma área inovadora. Define-se por sua característica multidisciplinar, que aplica as técnicas de Engenharia e os princípios das Ciências Biológicas embasados nos conhecimentos de embriologia, formação e regeneração tecidual. Seu objetivo é a substituição e regeneração tecidual clínica, atingindo os controles motor e sensorial e o restabelecimento da estabilidade funcional e mecânica (LANGER & VACANTI, 1993; KIM & VACANTI, 1999; STOCK & VACANTI, 2001; KAIGLER & MOONEY, 2001; KNESER, 2006).

Durante a existência de um indivíduo, muitos tecidos constituídos têm a capacidade de se renovar e autorreparar, o que lhe garante a sobrevivência. A observação desta condição permitiu aos pesquisadores concluir que nestes tecidos há a presença de um tipo celular especial, as células-tronco progenitoras. O uso terapêutico de células-tronco adultas autógenas ou alógenas pode promover uma via mais rápida para regeneração celular. (Medular Stem Cell ou Mesenchymal Stem Cell - MSC) (LANGER & VACANTI, 1993; KIM & VACANTI, 1999; STOCK & VACANTI, 2001; KAIGLER & MOONEY, 2001; PRESTON *et al.* 2003).

No entanto, para que se consiga produzir um órgão completo por meio de ET, além do domínio completo das técnicas de obtenção e cultivo celular, há necessidade de se desenvolverem estruturas tridimensionais por meio da nanotecnologia, atendo-se à fabricação de biomateriais para confecção de *scaffolds* de modo que, no futuro, seja possível promover a implantação de um *construct* de forma segura.

Em relação às culturas celulares, estas células têm que manter suas características teciduais originais, tais como viabilidade celular e preservação da função, não induzindo fenômenos imunogênicos, doenças ou desenvolvimento tumoral ao futuro hospedeiro. Para tanto, é necessário eliminar os riscos de infecção transmitida por agentes patogênicos oriundos do doador, assim como reações imunológicas causadas por antígenos animais (proteínas, genes, enzimas específicas) os quais podem estar presentes nas culturas celulares advindos de um suplemento nutritivo de origem animal. (MARTIN *et al.* 2005).

PITTENGER *et al.* (1999) demonstraram que células-tronco mesenquimais (MSCs) ou células do estroma medular (MSCs) e epiteliais (epSCs) podem ser purificadas e proliferar tanto *in vitro* quanto *in vivo*, sendo potencialmente capazes de se diferenciar em múltiplos tecidos, por exemplo: osso, cartilagem, músculo cardíaco e esquelético, células nervosas, tendões, tecido adiposo e conectivo, na dependência dos fatores utilizados para estimulá-las. A possibilidade de se utilizar MSCs autólogas como terapêutica regenerativa, minimizando a ocorrência de rejeição, a partir de então tem sido alvo de incansáveis pesquisas.

Para tanto, as culturas celulares *in vitro* necessitam da simulação de um microambiente, semelhante ao microambiente original. Um dos fatores coadjuvantes são os meios nutritivos que tentam mimetizar algumas condições desse microambiente.

É consenso entre os pesquisadores a necessidade de suplementos nutritivos nos meios de cultivo e de forma que garantam recursos de energia tais como sais minerais, íons, proteínas, fatores de crescimento, indutores de diferenciação celular, substratos que garantam isenção de contaminações, etc. (MARTIN *et al.* 2005).

Com freqüência, os meios de cultivo industrializados utilizados nos cultivos de células-tronco humanas embrionárias ou adultas, são suplementados com hemoderivados, como o soro fetal bovino, soro equino, suíno, caprino, e outros. São comuns estudos em que esses suplementos são de uma espécie animal diferente da origem da cultura celular, ou ainda mesmo, diferente da espécie do futuro organismo receptor (heterólogo).

Está claro que os suplementos de origem animal representam uma excelente fonte de nutrientes, porém será sempre uma mistura complexa de nutrientes e nem sempre bem definida, podendo inclusive introduzir patógenos no futuro hospedeiro, como o retrovírus suíno, reações imunológicas e infecções (MARTIN *et al.* 2005).

Desse modo, suplementos hemoderivados homólogos e autólogos, podem representar um microambiente mais próximo da natureza da cultura celular, além de minimizar os efeitos de reações imunológicas e a ausência de introdução de vírus interespecies, num futuro implante orgânico.

OBJETIVO

2. OBJETIVO

Avaliar três suplementos hemoderivados empregados em meios de cultivo, quanto à proliferação e ao dano celular de células-tronco adultas de origem dentária.

LITERATURA

3. LITERATURA

3.1 ENGENHARIA TECIDUAL (ET)

No início do século XX, muito antes da definição do que seria hoje a Engenharia Tecidual (ET), BISCEGLIE (1933) removeu e semeou células tumorais de rato encerrando-as numa membrana de polímero, implantando todo este conjunto no abdome de embrião de ave. Estas células viveram tempo suficiente para demonstrar que não foram mortas pelo sistema imunológico do receptor, denotando a possibilidade de transplantação celular.

Da mesma forma, CHICK *et al.* (1975) reportaram resultados do implante de ilhotas pancreáticas em membranas semipermeáveis, com o objetivo de controlar a glicose em pacientes com diabetes Mellitus.

No início dos anos 80, BELL *et al.* (1981), BURKE *et al.* (1981) promoveram substituições de pele por células em gel de colágenos ou compostos de colágeno-glicosaminoglicano que foram empregados como um orientador regenerativo (regeneração guiada), sendo essas técnicas muito empregadas, inclusive na atualidade, de forma clinicamente viável.

LANGER & VACANTI (1993), KIM & VACANTI (1999), STOCK & VACANTI (2001), KAIGLER & MOONEY (2001) relataram que em

meados da década de 80 a Engenharia Tecidual (ET) foi definida como hoje a conhecemos: uma área de conhecimento interdisciplinar que aplica fundamentos de engenharia e ciências da vida para o desenvolvimento de substitutos biológicos que reparem, mantenham ou melhorem funções teciduais.

LANGER & VACANTI (1999), em seus estudos relacionados à ET, relataram que todo método para reparar tecidos perdidos em pacientes requer algum tipo de estrutura de reposição que seja readaptada à área afetada pela injúria. Uma reabilitação do organismo, que exige de alguma forma substituição da parte injuriada por próteses ou enxertos teciduais onera o tratamento. Geralmente estes procedimentos têm sido feitos por meio de substitutos artificiais (articulações), tecidos *pós mortem* processados (valvas cardíacas), transplantes de sítios doadores sadios do próprio paciente ou ainda de outros pacientes e acabam onerando cada vez mais os sistemas de saúde governamentais.

Segundo VACANTI & LANGER (1999), a ET surgiu como uma alternativa a essas supostas dificuldades financeiras e ou cirúrgicas, resolvendo-as total ou parcialmente. O conceito de ET originou-se a partir da necessidade de desenvolver um método alternativo ao tratamento aplicado aos pacientes com perdas teciduais ou falência de órgãos. Os autores salientaram que a ET está se tornando viável aos clínicos com a substituição de tecido vivo por tecido vivo, desenvolvido e construído especialmente para as necessidades de cada paciente.

HUTMACHER *et al.* (2001), em revisão sobre o tema ET, relataram que as terapias atuais em uso hoje não são somente onerosas, mas frequentemente não satisfazem adequadamente sua pretensa proposta. No modelo de transplante de órgão, uma combinação imperfeita de tipos de tecidos necessita de medicamentos imunossupressores durante toda a vida, com ocorrências de rejeições de enxertos, custos altos com uma terapia medicamentosa e o potencial para desenvolvimento de câncer. Em certas circunstâncias a cirurgia no sítio doador tecidual, em outra parte do corpo, pode deixar o paciente com dores e ou sob risco de perda de função na área doadora. Os autores mencionaram que estes problemas se resolverão somente quando tecidos humanos, específicos para estes pacientes, puderem ser desenvolvidos de modo que cresçam e se adaptem funcionalmente.

STOCK & VACANTI (2001) salientaram que, em alternativa aos enxertos teciduais do próprio paciente, os enxertos oriundos de outras espécies (ex: porco) referidos como xenotransplante ou enxerto heterólogo podem, teoricamente, tornar-se apropriados porém mantendo vestígios do indivíduo original. Mencionaram que adicionalmente às barreiras imunológicas, há o problema em potencial de risco microbiológico, semelhante ao retrovírus endógeno de porco (PERV).

Os autores consideraram que a ET tem a probabilidade de evitar completamente tais riscos, incluindo rejeições, pelo simples fato de poder utilizar células autólogas.

DUAILIBI *et al.* (2006), em estudo de revisão sobre as perspectivas para o desenvolvimento dental na ET, relataram que os recentes avanços no campo da engenharia tecidual dental nas ciências de materiais e biológicas com as células-tronco, sugerem que num futuro próximo será possível se desenvolver um dente completamente estruturado. Estudos anteriores têm demonstrado a presença de células-tronco progenitoras no tecido pulpar de dentes decíduos e permanentes em estágios iniciais de desenvolvimento e por meio de técnicas apropriadas de ET, podem ser utilizadas na geração de dentina, esmalte, osso alveolar, cimento, Mencionaram nessa revisão que a interação tecidual necessária para o desenvolvimento dental que ocorre naturalmente no organismo pode servir como orientador e facilitador em ET, até atingir com sucesso a formação de um dente completo. Relataram também que a geração natural de dentes molares, caninos e incisivos é realizada basicamente da mesma maneira e esta diferença morfológica é conseguida por meio de interações teciduais recíprocas entre os tecidos do epitélio dental e células da crista neural, que em seguida evoluem para cinco estágios histológicos (botão, capuz, campânula, coroa e raiz) estimulando o aparecimento dos ligamentos periodontais e o osso alveolar de suporte. Nesta revisão identificaram essas estruturas e relataram a presença das mesmas por meio de marcadores celulares específicos (amelogenina, detinsialoproteína, vimentin) de células-tronco dentárias, a diferenciação celular destas em estudos anteriores (DUAILIBI *et al.* 2004) e sua confirmação em estudo realizado posteriormente (DUAILIBI *et al.* 2008).

3.2 CÉLULAS-TRONCO NA ENGENHARIA TECIDUAL

PITTENGER *et al.* (1999), PRESTON *et al.* (2003) relataram em seus trabalhos que alguns tecidos adultos tais como pele, ossos e sistema hematopoiético têm a capacidade de se autorreparar e renovar, o que indica a presença de células-tronco progenitoras. Células-tronco mesenquimais (MSCs) e epiteliais (epSCS) ou células do estroma medular (MSCs) são aderentes ao vidro e também ao plástico apropriado para cultura tecidual, podendo ser purificadas e proliferar tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Estas células são potencialmente capazes de se diferenciar em múltiplos tecidos incluindo osso, cartilagem, músculo cardíaco e esquelético, células nervosas, tendões, tecido adiposo e conectivo, na dependência dos fatores utilizados para estimulá-las, demonstrando o potencial das MSCs autólogas como uma terapêutica regenerativa, minimizando a ocorrência de rejeição.

STOCK & VACANTI (2001), KAIGLER & MOONEY (2001) relataram em seus trabalhos prováveis fontes celulares para a ET e salientaram que existem duas maneiras básicas para obtenção de células.

Uma das maneiras para se obter células de um órgão específico é a biópsia direta no próprio órgão, com a coleta de um fragmento. Esta é a técnica aplicada à maioria das estruturas e órgãos como pele, fígado, rins, vasos sanguíneos, osso, medula óssea e cartilagem. No entanto, para alguns órgãos ou tecidos como valvas cardíacas, biópsias diretas não são factíveis e coletas em sítios doadores correlatos são consideradas. Para valvas

cardíacas, o segmento de veias periféricas é uma fonte celular mais apropriada, caracterizando uma segunda maneira de obtenção celular. Da mesma forma, para os tecidos neurais como a medula nervosa ou nervos periféricos, nem a biópsia direta nem a indireta são aplicáveis. Uma das maneiras para resolver esta dificuldade de fonte celular é o isolamento de células-tronco. Os autores salientaram também que, de fato, para qualquer célula usada em ET torna-se crítica a compreensão dos mecanismos de indução, controle de diferenciação e proliferação celular para a obtenção de células normo-funcionais. Esse é um problema constante e importante no emprego das células-tronco ou células progenitoras. Comentaram ainda que a ET pesquisa com afinco a biologia celular, enfrentando uma variedade de desafios técnicos para o isolamento, purificação e preparações celulares.

PRESTON *et al.* (2003) relataram que o uso terapêutico de células-tronco autógenas ou alógenas de adultos pode promover uma via mais rápida para a regeneração celular. Alguns pacientes com desordens hematológicas, que se submeteram a quimioterapia ou radioterapia, já puderam se beneficiar dos efeitos terapêuticos de um transplante de células de medula óssea. Comentaram também que os autores são unânimes em afirmar que o substituto “ideal” nas perdas teciduais é o próprio tecido saudável de mesma origem ou o tecido “produzido por meio da ET”, partindo de uma amostra de tecido obtido previamente

MIURA *et al.* (2003) isolaram células-tronco de dentes incisivos decíduos de crianças entre sete e oito anos de idade (SHED – *Stem cell from human exfoliated deciduous teeth*). Promoveram digestão tecidual

por meio da ação de colagenase tipo I e dispase durante uma hora a 37°C, cultivando as células em meio regular conforme o protocolo de GRONTHOS *et al.* (2000). Concluíram que o material pulpar remanescente de dentes decíduos exfoliados abriga uma população celular comprometida com a formação pulpar normal, incluindo tecidos conectivos, vasos sanguíneos e odontoblastos. Comparativamente às células-tronco da medula óssea e às células-tronco adultas da polpa dental humana (hDSCs), as SHED mostraram-se com maiores níveis de proliferação celular, apresentando uma população multiplicada em varias vezes a população das culturas de hDSCs. Para evidenciar a diferenciação em tecidos mineralizados, utilizaram o método de colorização de alizarina vermelha, demonstrando formações nodulares de tecidos mineralizados nas culturas de SHED.

HARADA *et al.* (1999), BIANCO *et al.* (2001), GRONTHOS *et al.* (2002), GRONTHOS *et al.* (2006) relataram em seus estudos que células da polpa dentária também são fonte de tecido mesenquimal, e que toda esta linhagem de células tronco-adultas apresenta potencial para se diferenciar em condrócitos, osteoblastos, adipócitos, fibroblastos, além dos demais tecidos de origem mesenquimal. Salientaram que à semelhança de tecidos adultos capazes de fornecer células-tronco adultas, o germe dental também se mostra capaz de fornecer células tronco adultas, conhecidas como células-tronco de polpa dental humanas (hDPSCs) ou simplesmente células-tronco dentais humanas (hDSCs)

JO *et al.* (2007) relataram em seus estudos que, pelo fato de existirem algumas dificuldades e desvantagens em se obter e fazer a coleta de células-tronco adultas de qualquer órgão ou tecido, naquilo que se refere ao dano adicional e à quantidade de células obtidas, o tecido de origem dentária se mostra como uma nova e muito promissora fonte de células-tronco adultas. Justificam esta afirmativa embasados na forma de obtenção do elemento dentário que se dá sem risco adicional de injúria ao paciente pois se trata, na maioria das vezes, de dentes com indicação para extração por motivos ortodônticos, muitas vezes em estágios iniciais de desenvolvimento, ou que estejam nas regiões de seguimentos de cirurgias ortognáticas.

DUAILIBI *et al.* (2008) estudando ET, destacaram a necessidade de procedimentos terapêuticos alternativos nas perdas teciduais e relataram que os recentes avanços científicos no desenvolvimento de materiais sintéticos e da ET têm criado oportunidades para se desenvolver métodos para a bioengenharia tecidual e a substituição de órgãos, abrangendo inclusive tecidos altamente mineralizados como craniofaciais e dentais. Embasados nos seus estudos anteriores, sugerem que as populações de DSC obtidas por técnicas de ET podem ser empregadas na regeneração tecidual de uma variedade de tecidos dentais e até resultar na formação de um dente completo (YOUNG *et al.* 2002, DUAILIBI *et al.* 2004, DUAILIBI *et al.* 2006), uma vez que o tecido pulpar dental humano de adultos e jovens pode formar dentina, cemento, osso, nervo e endotélio vascular (MIURA *et al.* 2003, GRONTHOS *et al.* 2006). Nesse estudo, os autores trabalharam com germe de dentes de ratos Lewis com quatro dias

pós-natal, coletando seus germes dentários, digerindo-os e expandindo-os em cultura com subsequente semeadura em *scallfods* poliméricos. Durante o processo de digestão tecidual otimizaram essa metodologia, conseguindo uma cultura celular primária com capacidade de produzir um maior número de células viáveis. Esses *constructs* foram implantados em ratos Lewis adultos e cresceram por doze semanas. Como resultados, observaram a formação de células diferenciadas com características de mineralização, que foram identificadas histologicamente como estruturas mineralizadas de tecido dental como dentina, cemento, esmalte e ligamento periodontal.

BLUTEAU *et al.* (2008), em estudo sobre o uso de células-tronco de origem dentária na ET, afirmaram que o desenvolvimento dental resulta de uma interação sequencial e recíproca entre o epitélio oral e o tecido uma lâmina de células mesenquimais subjacentes. Comentaram a respeito das dificuldades em se conseguir por meio de ET um dente totalmente formado em laboratório e que, acima de tudo, a manipulação das células-tronco está na dependência de uma sinergia de todos os eventos celulares e moleculares que finalizam com a formação de tecidos dentais mineralizados específicos, como dentina e esmalte. Os autores afirmaram que a capacidade de expandir as células-tronco em cultura é um passo importante para a medicina regenerativa e um considerável esforço tem sido feito para avaliar as consequências desse cultivo no comportamento das células-tronco. Afirmaram ainda que o uso de células de origem animal para terapêutica de doenças em humanos é de uso restrito, devido aos riscos de imunorrejeição e que, por outro lado, o isolamento e emprego de células-tronco autólogas requerem uma fonte que seja facilmente acessível.

AUGELLO *et al.* (2010) em sua breve revisão das MSC e das perspectivas da cultura *in vitro* para uma migração *in vivo*, mencionaram a possibilidade de alterações fenotípicas variarem entre *in vivo* e *in vitro* em função da remoção das MSCs, do seu ambiente natural, do uso de substâncias químicas e das condições físicas de crescimento. Citaram generalizadamente diversos autores que caracterizaram MSC e suas diferenciações em tecidos de múltiplas linhagens na dependência do uso de algumas substâncias. Salientaram que os registros quanto à proliferação e diferenciação das MSCs, bem como a definição de marcadores, são todos para sistemas de culturas *in vitro*, os quais provavelmente podem alterar as características naturais destas células *in vivo*. Relataram que muitos autores propuseram alternativas para uso terapêutico das MSC, sem a necessidade de removê-las de seu ambiente natural, sem fazer expansão *in vitro* para serem reimplantadas em seguida no paciente, minimizando os riscos que poderiam levar a alterações celulares teratogênicas, riscos de imunorrejeições relativas ao suplemento com SFB. No caso de pequenas lesões de tecido cartilaginoso, relataram que alguns pesquisadores, propõem a ativação de sinalizadores endógenos específicos (quimiocinas e seus receptores) como alvos farmacológicos. Relataram também a possibilidade de purificação de MSCs de uma fonte tecidual conhecida e o consecutivo reimplante, num único procedimento intra-operatório, tornando satisfatória a reparação tecidual, uma vez que numa expansão *ex vivo* a mistura da população e possíveis contaminações podem tornar a reparação tecidual inadequada. No entanto, os autores afirmam que há necessidade de se aprofundar os conhecimentos sobre a rede de habilidades

das MSCs *in vivo*, para desvendar o que regula a ativação de um estado quiescente dessas, tornando-as ativas tanto nos estados fisiológicos quanto patológicos.

3.3 MEIOS DE CULTIVO NA CULTURA CELULAR

Segundo ZVAIFLER *et al.* (2000), células mesenquimais precursoras adultas provenientes de medula óssea (BM) denominadas de BMPCs (*Bone Mesenchymal Precursors Cells*) de indivíduos normais aderem ao plástico e ao vidro, proliferando logaritmicamente em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) 20% suplementado com *Fetal Calf Serum* (FCS) sem fatores de crescimento. Células morfológicamente trabeculadas, semelhantes a fibroblastos (*fibroblastos-like*) desenvolvem-se muito bem neste meio de cultivo.

Suplementando-se este meio de cultivo com substâncias indutoras da osteogênese (como dexametasona, ácido ascórbico e β -glicerofosfato) a formação de células semelhante a fibroblastos (*fibroblastos-like*) será inibida para, em seguida, modificarem sua morfologia aproximando-se de um formato cuboidal, semelhante a osteoblastos (*osteoblastos-like*), sugerindo a formação de um tecido osteogênico.

RICHARDS *et al.* (2002), em suas revisões sobre pesquisas na ET com células-tronco humanas (hESC), reportaram a substituição do nutriente

Soro Fetal Bovino (SFB), utilizado como suplemento no meio de cultivo básico, por suplementos sintéticos e meios de cultivo isentos de soro.

TUAN *et al.* (2002) em seus estudos salientaram que, apesar da pluripotência das células-tronco embrionárias (ESC), as controvérsias éticas e legais acerca de seu uso fizeram com que as pesquisas fossem dirigidas aos reservatórios teciduais de células-tronco no indivíduo adulto. Assim sendo, os estudos se voltaram para as pesquisas das células-tronco adultas, descobrindo-se novas fontes e maneiras apropriadas de cultivá-las. Relataram que as células-tronco adultas são capazes de ser induzidas à transdiferenciação, não gerando exclusivamente células filhas de mesma linhagem que a célula mãe. Comentaram a capacidade das células-tronco hematopoiéticas da medula óssea de se tornarem células hepáticas ovas e das células satélites musculares exibirem potencial hematopoiético, sendo que estas habilidades estão relacionadas à influência do seu microambiente. Dentre as células-tronco mais estudadas está a célula-tronco mesenquimal (MSC), a qual tem promovido interessantes perspectivas para o emprego clínico da Engenharia Tecidual (ET) e regeneração. Relataram inclusive, como fontes de células-tronco adultas de origem mesenquimal, a medula óssea, o tecido muscular, a derme, o tecido adiposo e o sangue.

DUAILIBI *et al.* (2004), empregando as técnicas de ET, cultivaram células de população mista de origem dentária (polpa dentária) em 50% DMEM contendo 10% de SFB, 5ml de Glutamax, 50UI/ml de penicilina, 50 mg/ml de estreptomicina, 2,5 mg/ml de ácido ascórbico e 50% de Ham's-F12 (H-F12). Os resultados deste estudo mostraram que, de

maneira análoga a estudos anteriores que realizaram cultura tecidual obtidas a partir de germes dentários de porcos (YOUNG *et al.* 2002), as células de germes dentários de ratos também podem ser utilizadas na ET, sugerindo uma aplicação comum para ET a partir de dentes em mamíferos.

STUTE *et al.* (2004), estudando hMSCs obtidas da medula óssea de indivíduos adultos, relataram que tais células são muito atraentes para se estudar pois, dependendo do estímulo adequado e do microambiente local, elas podem se desenvolver em vários tipos celulares *in vitro* e regenerar tecidos *in vivo*. Salientaram que geralmente são isoladas e cultivadas segundo o protocolo de vários autores, porém geralmente é utilizado o FCS em concentrações que variam entre 10% e 20% como suplemento no meio de cultivo, com o propósito de se conseguir aumentar o número de MSCs *in vitro*. Por outro lado, demonstraram preocupação com o emprego do suplemento hemoderivado bovino (FCS), uma vez que há a possibilidade de incluir uma infecção viral ou bacteriana e príons relacionados às encefalopatias espongiformes bovinas, as quais podem causar uma variante da doença de Creutzfeldt-Jakob. Relataram ainda outro problema em potencial relacionado às reações imunológicas ou inflamatórias locais devido à contaminação por proteínas bovinas, que não podem ser excluídas mesmo com lavagens sucessivas após a expansão celular, podendo ocorrer a formação de anticorpos não favorecendo o enxerto e favorecendo a rejeição das células transplantadas. Os autores avaliaram a utilização de meios de cultivo isentos de FCS como alternativas futuras para o uso clínico de hMSC. Estudaram, comparativamente, o isolamento e a expansão de MSC obtidas por aspirações de crista ilíaca de nove doadores

saudáveis, em quatro meios de cultivos distintos. As MSC foram cultivadas em meio DMEM suplementos de soro autólogo a 1%, 3% e 10% (meios A, B e C) e cultivadas em DMEM suplementado com 10 % de FCS (meio D). Concluíram que o meio de cultivo C se mostrou tão eficiente na proliferação quanto o meio de cultivo D, sendo que ambos mostraram-se superior aos meios de cultivos A e B. No entanto, o meio de cultivo C mostrou-se mais osteogênico que o meio de cultivo D. Verificaram a possibilidade de se expandir hMSC na ausência de FCS e na ausência de fator de crescimento exógeno, confirmando a possibilidade de se utilizar soro autólogo na expansão de hMSC para futuras terapêuticas clínicas e com menos riscos.

Segundo MARTIN *et al.* (2005), é consenso entre os pesquisadores a necessidade de suplementos nutritivos nos meios de cultivo e de forma que garantam recursos de energia tais como sais minerais, íons, proteínas, fatores de crescimento, indutores à diferenciação celular, substratos que garantam isenções ou diminuam as chances de contaminação e façam defesa das células no processo de crescimento. Relataram que a maioria dos estudos fazem referência aos meios de cultivo industrializados utilizados nos cultivos de células-tronco humanas embrionárias ou adultas, sendo suplementados com hemoderivados industrializados, tais como soro fetal bovino, equino, suíno, caprino e outros. Afirmam ser muito comum encontrar na literatura estudos nos quais esses suplementos são de uma espécie animal diferente daquela que originou a cultura celular, ou mesmo diferente da espécie do futuro organismo receptor (heterólogo). Complementam ainda os autores que lhes parece claro que os suplementos

de origem animal representam uma excelente fonte de nutrientes, porém será sempre uma mistura complexa de nutrientes e nem sempre bem definida, podendo inclusive introduzir patógenos no futuro hospedeiro, como o retrovírus suíno, reações imunológicas e infecções.

VATS *et al.* (2005) comentaram em seus trabalhos a respeito da plasticidade das células-tronco adultas, indicando a presença de células-tronco progenitoras e a habilidade dessas células de se diferenciarem em tecidos diferentes das células originárias. Relatam que combinações de fatores de crescimento e formulações específicas de meios de cultura para vários e específicos tipos de culturas celulares são amplamente utilizados e que o controle da diferenciação celular *in vitro* tem causado um grande impacto no conhecimento, assim como o desenvolvimento das pesquisas dos mecanismos de especialização e diferenciação das células-tronco também. Salientaram que o isolamento de células mineralizadas, a partir de ossos de mamíferos, foi conquistado há aproximadamente 30 anos atrás em relação aos seus estudos e somente mais tarde é que foram descobertas as condições necessárias para que os osteoblastos fossem induzidos à sua diferenciação normal. Enfatizaram que o emprego de uma combinação de ácido ascórbico e uma fonte de fosfato inorgânico são os requisitos mínimos para a diferenciação *in vitro*. Da mesma forma, também ocorre a utilização do hormônio glicocorticóide dexametasona e vitamina D-3 (que são comumente adicionados às culturas de osteoblastos) e outros estimulantes como o fator de crescimento e a proteína óssea morfogenética (BMP), justificando dessa maneira a necessidade de suplementação nos meios de cultivo.

JAQUIÉRY *et al.* (2005) comentaram a necessidade de se reconstruir defeitos ósseos na cabeça e pescoço, referindo-se às dificuldades de se conseguir elementos substitutos. Se os defeitos forem pequenos e circundados por tecido ósseo normal, pode-se utilizar bio-materiais como cerâmicas inorgânicas, polímeros orgânicos ou enxertos alogênicos. Já nos grandes defeitos ósseos, os enxertos livres de osso autólogo ou um enxerto ósseo microvascularizado, coletado a partir de diferentes sítios doadores, são as melhores opções. Para vencer estas limitações, os autores estudaram a possibilidade do uso de células progenitoras osteogênicas em combinação com materiais osteocondutivos para construir enxertos osteocondutivos. Os autores coletaram amostras de células-tronco mesenquimais ósseas (BMSCs) e células do periósteo de mandíbula (JPCs) de nove doadores e, expandindo estas culturas, chegaram até duas passagens. As amostras foram obtidas por biópsias de intervenções de rotina, durante cirurgia maxilo-facial por exposição do periósteo e consecutiva biópsia e aspiração da medula óssea da crista ilíaca. As amostras de BMSCs foram isoladas e expandidas em meio completo (MC), cuja mistura foi de Meio Essencial Modificado alpha (α MEM) com suplementação de 10% de SFB, mais 4,5 mg/ml de D-glicose, 0,1 mmol/L de aminoácido não essencial, 1 mmol/L de piruvato de sódio, 100 mmol/L de HEPES tamponado, mais 100 UI/L de penicilina e 100 μ g/ml de estreptomicina e 0,29 μ g/ml de L-glutamina. As amostras de JPCs foram cortadas em pedaços pequenos e digeridas por ação de 0,5% de colagenase tipo II durante 4 horas e a 37°C. O isolamento celular foi centrifugado e ressuspensão em meio completo (CM), suplementado com FGF- β /dexametasona, incubadas a 37°C em umidade

relativa de 95% e 5% de CO₂. As culturas foram semeadas conforme três modelos do estudo: um modelo de cultura e diferenciação osteogênica em 2D, com as células analisadas no 1º, 7º, 14º e 21º dias; um segundo modelo de cultura e diferenciação osteogênica em 3D, semeadas estaticamente dentro dos poros de cubos de fosfato tricálcio ou grânulos derivados de osso bovino (Bio-Oss®); o terceiro modelo que consistiu em *constructs* semelhantes ao segundo modelo, implantados subcutaneamente em ratos nude. Concluíram, conforme seus modelos de estudo, que as JPCs não são tão indicadas quanto as BMSCs como células básicas empregadas nas técnicas de ET para tecido ósseo.

FERREIRA *et al.* (2005), em estudos com osteoblastos humanos (hFOB1.19), provenientes da *American Type Culture Collection*, em cultura e após a quinta e sexta passagens, recultivaram estas células em DMEM (Gibco Invitrogen Co. CA USA) e H-F12 (Cultilab, Campinas, São Paulo – Brasil) suplementado com SFB (Cultilab, Campinas, São Paulo, Brasil) a 10% e antimicrobianos, sendo esses os antibióticos penicilina e estreptomicina e o antimicótico anfotericina B. As células foram mantidas a 5% de CO₂ em atmosfera úmida e a 37°C, até atingirem a confluência. Em seguida, foram destacadas com tripsina a 1% e novamente cultivadas em placas *well-plate* de 96 poços. Essas culturas, após 24h de incubação, tiveram seus meios substituídos por meio MEM/H-F12 contendo SFB a 10% suplementado com plasma rico em plaquetas (PRP) nas proporções de 50%, 25%, 12,5% e 6,125% e por meio MEM/H-F12 sem SFB nas mesmas proporções de suplementação com PRP. Os resultados foram avaliados estatisticamente pela análise de variância e teste de Tukey.

Os registros comparativos entre a proliferação de osteoblastos com PRP/SFB e PRP/sem SFB mostraram um aumento de crescimento celular em função das concentrações de PRP, sugerindo perspectivas para se estudar novas concentrações de PRP como suplemento.

HOVATTA (2006), em estudo de revisão sobre células-tronco embrionárias (ESC) humanas, relata que essas células oferecem uma excelente fonte para transplantação e tratamento de doenças severas. Refere-se também às condições de cultura celular, referindo-se às boas práticas de manufatura e, neste sentido, mencionam que as proteínas animais são imunogênicas e podem conter microorganismos, não devendo ser empregadas no estabelecimento e propagação de culturas de células-tronco embrionárias. Comenta que o SFB foi empregado no cultivo de ESC como suplemento do meio de cultura citando, dentre vários autores, seus próprios estudos em 2003 e alguns autores que empregaram SR (Serum Replacement Invitrogen[®]) que contém proteínas animais não reveladas pelo fabricante, permitindo culturas sem a adição de soro. Salaria que aprimorar a metodologia para obtenção de células transplantáveis é o melhor a se fazer para exclusão do risco de contaminação, o que se inicia pelo controle das condições de cultivo.

SKOTTMAN & HOVATTA (2006), em estudos relacionando SFB e soro humano (SH), salientaram que tanto o SFB como o SH são de fato uma mistura complexa que contém compostos desconhecidos. Os soros variam enormemente na capacidade de manter a hESC num estágio de indiferenciação e ou podem conter fatores que, ao contrário, podem induzir

a diferenciação. Relataram que, na tentativa de se evitar esse tipo de problema, muitos pesquisadores têm otimizado o meio de cultivo com a ausência de soro (*Serum-free/SF*). Os autores comentaram em seus estudos que, desta forma, são criadas condições especiais para linhagens de hESC utilizando o fator de crescimento básico de fibroblasto (FGF- β) e um soro definido como soro substituto SR (*KnockOut Serum Replacment, Invitrogen*[®]) muito embora o SR ainda contenha um mínimo de proteínas de origem animal, as quais não foram totalmente definidas. Uma das conclusões dos autores foi que, durante a utilização de meio otimizado com SR, houve uma proliferação celular de hESC mais rápida quando comparada à proliferação celular onde o SFB fazia parte do meio de cultivo como suplemento.

SOTIROPOULOU *et al.* (2006), em estudos com células-tronco mesenquimais (MSCs), compararam várias condições de culturas na tentativa de identificar um protocolo de cultivo ideal. Os autores testaram sete condições como meio de cultivo para MSCs: 1- DMEM com baixa concentração de glicose e L-glutamina identificados pela sigla DMEM/LG/L-G; 2- DMEM com alta concentração de glicose e L-glutamina, identificado como DMEM/HG/L-G; 3- DMEM com baixa concentração de glicose e Glutamax (DMEM/LG/GL); 4- DMEM com alta concentração de glicose e Glutamax (DMEM/HG/GL); 5- *Iscove's Modified Dulbecco's Medium* (IMDM) com L-glutamina; 6- *Modified Essential Medium* (MEM) alpha com L-glutamina identificado como (α MEM/L-G); 7- α MEM com Glutamax (α MEM/GL). Todos os meios foram suplementados com 10% de SFB e com 50 μ g/ml de gentamicina.

Os resultados foram comparados com os do cultivo em que se utilizou *Mesenchymal Stem Cell Medium* (MSCGM), um meio cultivo desenvolvido especialmente para otimizar o crescimento de MSCs para uso restrito *in vitro*. Concluíram com seus resultados que, independentemente da qualidade do soro bovino empregado, outros parâmetros influenciaram o cultivo das MSCs incluindo o meio basal, a concentração de glicose, estabilidade da glutamina, densidade celular na cultura, a qualidade da superfície do plástico do *well-plate*, bem como o uso de β -FGF, favorecendo a diferenciação celular.

KAMIL *et al.* (2007) relataram a utilização de meios de cultura suplementados com soro autólogo e meio de cultura isento de soro (SF) no cultivo de condrócitos, em três condições diferentes. Coletaram, sob anestesia geral, amostras de cartilagem auricular de dois porcos. A cartilagem foi fragmentada em pequenos pedaços, os quais foram lavados em PBS contendo 100 UI/L de penicilina, 100 mg/L de estreptomicina e 0,25 mg/L de anfotericina B. Em seguida, esse tecido foi digerido pela ação de 0,3% de colagenase tipo II durante 8 a 12 h. As células foram filtradas e o filtrado centrifugado. As células viáveis foram contadas por meio do hematocitômetro e coradas por *trypan-blue*. Para produzir soro autólogo, uma coleta de sangue total foi realizada e esse sangue foi mantido a temperatura ambiente por 30 minutos para formação do coágulo, produzindo 50 ml de soro do sangue autólogo após centrifugação. Os condrócitos foram cultivados em três meios de cultivo diferentes denominados grupos A, B e C. O grupo (A), meio tradicional, continha Ham's F 12 com L Glutamina, 50 mg/L de ácido ascórbico, 100 UI/L de

penicilina, 100 mg/L de estreptomicina, 0,25 mg/L de anfotericina B, suplementado com 10 % de SFB. O grupo (B), apresentava a mesma fórmula, com a substituição do SFB por 10% do soro autólogo. O grupo (C), também com a mesma formulação do grupo (A), teve o SFB substituído por FGF- β . As culturas de condrócitos foram incubadas a 37°C em 5% de CO₂. Os meios de cultivo foram trocados duas vezes por semana. Os autores demonstraram que tanto o meio enriquecido com soro autólogo quanto o enriquecido com fatores de crescimento FGF- β , podem ser utilizados com sucesso na proliferação de células de cartilagens na ET. Enfatizaram que, teoricamente, a ET de cartilagem sem suplemento bovino pode ter menos risco de uma reação imunológica ou infecção por vetor bovino.

KOCAOEMER *et al.* (2007), estudando um substituto viável ao FCS que está freqüentemente relacionado como suplemento nos meios de cultivo tradicionalmente empregados nas culturas de MSCs e ET, investigaram o soro humano AB (AB-HS) como provável substituto ao FCS devido ao risco de transmissão infecciosa, bem como a ocorrência de reações imunológicas potencialmente relacionadas ao uso de FCS. Estudaram a expansão de MSC de tecido adiposo sob a influência dos meios DMEM-LG suplementados com tPRP (trombina ativada-PRP), AB-HS e FCS, todos em concentrações de 10%. Demonstraram que o tPRP e AB-SH nas concentrações de 10% como suplemento promoveram um significativo aumento no efeito de proliferação celular, sendo maior do que o meio de cultivo que foi suplementado com FCS. Também avaliaram as Unidades de Formação de Colônias (UFCs) dos três tipos de cultura no 10°

dia. As culturas foram interrompidas no 10º dia, fixadas em metanol e coradas com uma solução de Giemsa. A frequência de formação de colônias foi calculada na razão de cada 1000 células semeadas. Os resultados das UFC-F mostraram que a frequência das colônias desenvolvidas nas culturas com tPRP e AB-SH não diferiram significativamente daquelas cultivadas com FCS, porém diferiram em tamanho e densidade celular, aparentando células maiores e em maior número de células em cada colônia tanto no tPRP quanto AB-SH.

MENDONÇA COSTA *et al.* (2008), estudando células-tronco adultas dentárias originárias do tecido pulpar de dentes decíduos humanos (hDPCS), observaram a capacidade de promover a regeneração tecidual em grandes defeitos ósseos craniais de ratos não imunossuprimidos (NIS). O crescimento celular foi mantido em DMEM e HAM'S F-12 na proporção 1:1, suplementado com 15% de SFB, 100 UI/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomicina, 2 mmol de L-glutamina e 2 mmol de aminoácido não essencial. As hDPCS foram caracterizadas positivamente como mesenquimais, pois mostraram-se teste positivo para aplicação de 4 marcadores mesenquimais diferentes com diferenciação *in vitro* para células osteogênicas, adipogênicas e miogênicas.

Os achados histológicos realizados nas amostras obtidas da região craniana revelaram a presença de células humanas no osso recém mineralizado. A presença de DNA humano foi confirmada por meio de análise de PCRa (Reação de cadeia polimerase amplificada).

Os autores observaram a possibilidade e viabilidade da aplicação deste modelo de estudo em animal nas futuras terapêuticas cirúrgicas dos grandes defeitos ósseos cranianos em humanos envolvendo ET.

BEAUMONT *et al.* (2008), por meio de ET, produziram células osteogênicas a partir de amostras de tecido periosteal coletado da face lateral do osso mandibular humano. A amostra colhida foi transportada até o laboratório imersa em meio DMEM e HAM'S F-12 suplementado com L-glutamina, para que fosse processada conforme protocolo de ET estabelecida na linha de pesquisa dos autores. Após expansão celular, as mesmas foram semeadas em discos de polímeros tridimensionais. Os discos semeados, agora denominados *constructs*, foram cultivados em meio capaz de induzir diferenciação osteogênica, durante três semanas. Os *constructs* foram reimplantados no próprio indivíduo doador após sete semanas, durante cirurgia de enxerto sinusal maxilar, para se conseguir massa óssea suficiente para suportar implantes metálicos a fim de realizar a reabilitação oral do indivíduo. Concluíram que a técnica se mostrou viável.

KURITA *et al.* (2008), motivados pelos riscos em potencial advindos de uma transmissão viral e reações imunológicas por uso de produtos derivados de origem animal, estudaram o diferencial entre três preparações de soro humano na expansão de vários tipos de células humanas, tais como células-tronco do tecido adiposo, fibroblastos da derme e células endoteliais. Os autores empregaram três condições de soro humano (soro de sangue total, PRP e PPP) como suplementos de cultivo em meio DMEM após o estabelecimento das respectivas culturas com soro de origem animal

SFB. Seus resultados mostraram que o número de plaquetas diferiu entre o soro de sangue total (100%) e o PRP (75%) e PPP (12,6%). Concluíram que o PRP e o soro de sangue total foram superiores em relação ao PPP como substituto de soro derivado animal na expansão de cultura de fibroblastos da derme e que, tanto o soro de sangue total quanto o PRP, exibiram alta eficácia proliferativa sendo quase idêntica aos resultados de proliferações com SFB. No entanto, afirmam os autores que preparações com soro autólogo ou de soro humano talvez sejam de grande utilidade nas futuras terapias baseadas em células-tronco.

PARK *et al.* (2009) cultivaram células de polpa dental de germes de terceiros molares utilizando meio de cultivo considerado tradicional, o DMEM suplementado com 10% de SFB acrescido de 100 UI/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina. Após sucessivas passagens, as células foram submetidas à indução osteogênica com meio de cultivo DMEM suplementado com 10% de SFB, 50 µg/ml de L-ácido ascórbico 2-fosfato, 10 nmol de dexametasona e 10 mmol de β-glicerolfosfato. Como resultado, obtiveram uma forte expressão da fosfatase alcalina (ALP) em estágios iniciais de osteoblastos, considerando-se a presença de osteocalcina (*osteocalcin*) no meio de cultivo tardiamente. Nódulos de mineralização foram confirmados por meio do corante Von-Kossa (Von-Kossa positivo). Com esses resultados, os autores sugeriram que células oriundas da papila dental, cultivadas por meio de técnicas de ET, são fontes em potencial de tecidos osteogênicos. Nesse estudo, as células da papila dental se mostraram positivas para os marcadores de superfície celular mesenquimais CD44, CD90 e CD166, sugerindo que os fenótipos das

células derivadas da papila dental humana são semelhantes ao fenótipo das células-tronco mesenquimais (MSC).

LECHGUER *et al.* (2009), estudando a formação da coroa dental no processo de desenvolvimento do dente em ET, colheram dentes incisivos e dentes molares da mandíbula de embriões de ratos. O epitélio e mesênquima dental foram dissociados por meio de tripsina a 1% em solução tamponada de Hank's (HBSS) a 4°C por 30 minutos. O meio de cultivo empregado no estudo consistiu em DMEM/H-F12 suplementado com ácido ascórbico, l-Glutamina, SFB a 20% e uma associação dos antimicrobianos penicilina/estreptomicina, mais agar. As células foram incubadas e proliferaram a 37°C em atmosfera úmida e a 5% de dióxido de carbono, com trocas efetuadas a cada dois dias. No experimento também foram colhidas células-tronco da medula óssea de tíbia e fêmur de ratos adultos da mesma espécie, cultivando-as após dissociação em meio MEM suplementado a 20% com SFB mais penicilina e estreptomicina durante 10 dias. Estas células, após 10 dias, foram destacadas e coletadas por centrifugação para serem associadas à cultura das células dentais. Concluíram, dentre outras coisas, que a formação das coroas dentárias multicúspides ou incisivos são dependentes do controle e da origem das células mesenquimais,

AUGELLO *et al.* (2010) fizeram uma breve revisão das MSC e das perspectivas de sua cultura *in vitro* para uma migração *in vivo*. Mencionaram a possibilidade de alterações fenotípicas variarem entre *in vivo* e *in vitro* em função da remoção do seu ambiente natural, do uso de

substâncias químicas e das condições físicas de crescimento. Generalizadamente, citaram diversos autores que caracterizaram MSC e suas diferenciações em tecidos de múltiplas linhagens, na dependência do uso de determinadas substâncias como β -glicerofosfato, ácido ascórbico e dexametasona adicionados aos meios de cultura contendo FBS, resultando no aumento da ALP e deposição de cálcio (mineralização). Já para a diferenciação em cartilagens, requer-se alta densidade celular com o uso de TGF- β , num meio definido quimicamente como *serum free* (SF). A diferenciação adipogênica necessita de insulina, isobutil-1-metil-xantina, indometacina, e meio contendo SFB, evidenciado por meio de formação de vacúolos detectados por meio de com corante *Oil-red*. Concluíram que, apesar dos avanços científicos e terapêuticos com emprego das MSC, os registros carecem de perspectivas *in vivo*. Salientaram que os registros quanto à proliferação e diferenciação, bem como a definição de marcadores, são todos para sistemas de culturas *in vitro*, os quais provavelmente podem alterar as características naturais destas células *in vivo*.

DOLATSHAHI-PIROUZ *et al.* (2011), em estudo para identificar o mecanismo de biocompatibilidade dos implantes de hidroxiapatita, relataram a interação entre células mesenquimais humanas (hMSC) com fibronectina coberta com ouro (Au) e a superfície de hidroxiapatita (HA). Cultivaram hMSCs, as quais exibiram todos os critérios de MSC, como capacidade de diferenciação em osteoblastos, adipócitos e condrócitos. As células foram cultivadas em Meio Essencial Modificado (MEM), contendo 10% de SFB, em atmosférica úmida 95% e 5% CO₂ a 37°C. Após uma

semana as células foram lavadas com solução de Fosfato Tamponado (PBS) em pH 7,4 e a 37°C, destacadas com uso de tripsina a 1,25% e 5mmol de EDTA, semeadas a 4000 cels/cm² em garrafas de 150 cm² e cultivadas por mais uma semana. As interações entre as superfícies de biomateriais, células e matriz proteica influenciam na extensão, no citoesqueleto, no comportamento e morfologia das células. Esses são considerados parâmetros importantes para a proliferação e diferenciação celular. Relataram que é amplamente aceito que a morfologia celular revela importante informação sobre as células aderidas. Contorno celular irregular caracteriza as células que não estão proliferando, provavelmente entrando em apoptosi, assim como contorno extenso e de forma poligonal são indicativos de células saudáveis. Por outro lado, uma morfologia estrelada pode significar um problema de atividade celular.

BAKOPOULOU *et al.* (2011) estudaram comparativamente o potencial de diferenciação osteo/odontogênico *in vitro* das MSCs derivadas de polpa dental (DPSCs) ou das células-tronco da papila apical dental (SCAP). As células foram coletadas a partir de dentes terceiros molares de adolescentes sadios cujos elementos dentários estavam em estágio intermediário de desenvolvimento, aproximadamente 2/3 de raiz. As culturas foram induzidas à diferenciação osteo/odontogênica por adição de dexametasona, fosfato inorgânico e β-glicerofosfato no seu meio de cultivo. Dentre as análises executadas utilizaram a morfológica microscópica, as características de crescimento, o potencial de mineralização com o método de alizarina vermelha (*Alizarin red* - AR) e marcadores celulares para diferenciação. Como resultados, observaram que as culturas foram

positivas para alguns marcadores de diferenciação celular (STRO-1, CD 146 e CD 34) variando na proporção de acordo com o tipo celular e doador. Concluíram que o estudo indicou evidências de que diferentes tipos de MSCs podem ser utilizadas em ET e protocolos de regeneração, bem como revelou uma fonte acessível de células-tronco para diferenciação odontogênica e biomineralização e que no futuro poderão ser aplicadas às terapêuticas clínicas. Os tecidos derivados de MSCs são caracterizados por sua multipotencialidade e habilidade para diferenciarem-se em linhagens restritas como osteogênicas, odontogênicas, adipogênicas, neurogênicas, condrogênicas e miogênicas, quando sob condições de culturas determinadas. Uma das mais notáveis características para a aplicação na ET dental é o seu potencial para diferenciação odontogênica. Estudos anteriores demonstraram que MSCs, incluindo células-tronco dentárias, SHED e SCAP são capazes de se diferenciarem em linhagens odontoblásticas *in vitro* e formar tecido semelhante ao complexo dentino-pulpar quando transplantado subcutaneamente em ratos imunossuprimidos. Utilizaram neste estudo MSCs derivadas de DPSCS e SCAP de seis dentes terceiros molares de três doadores adolescentes saudáveis entre 16 e 18 anos. Os tecidos, após coletados, foram submetidos à digestão enzimática por colagenase tipo I e dispase a 37°C e durante 1 hora. As células foram semeadas numa densidade de 10^4 cels/ cm^2 , usando α -MEM suplementado com 15% de SFB, 100 μmoles de l-ácido ascórbico, 2 mmol de glutamina, 100 UI de penicilina, 100 mg/ml de estreptomicina e 0,25 mg/ml de anfotericina B, incubadas a 37°C em atmosfera úmida e 5% de CO_2 . A análise do crescimento celular foi realizada a cada 24 h com um hemacitômetro. Todo o experimento foi replicado de quatro a seis vezes e

na forma de triplicatas. Observaram que foram significantes as diferenças na morfologia e crescimento de DPSCs e SCAP. No primeiro dia, células isoladas podem ser notadas em toda cultura, com considerável número de células destruídas devido ao processo de digestão. No segundo ou terceiro dia, grande número de colônias podem ser visíveis na cultura de SCAP e, somente após o sexto dia, pequenas colônias nas culturas de DPSCs. Do ponto de vista morfológico, DPSCs foram mais heterogêneas, circundadas de grandes células de formato poligonal, espiraladas e em culturas subconfluentes de formato cuboidal. Já as SCAP, menores em tamanho, semelhantes a fibroblastos ou formatos estrelados, exibindo muitos processos filamentosos, as quais proliferaram mais rapidamente formando uma densa e fina camada.

DUAILIBI *et al.* (2011), estudando o estágio de desenvolvimento dentário relacionando à capacidade de obtenção de DSCs, estudaram 52 pacientes saudáveis, 36 do gênero feminino e 16 do gênero masculino, totalizando 67 dentes terceiros molares em diferentes estágios de desenvolvimento. O tecido pulpar foi removido e, após digestão tecidual, foi cultivado em meio DMEM e H-F12, suplementado com 10% de SFB e antibióticos penicilina e estreptomicina, mantido em incubadora com umidade relativa a 95%, 5% CO₂, a 37° C até confluírem e com trocas do meio de cultivo em média duas vezes por semana. Determinaram seis diferentes estágios de desenvolvimento dentário, baseados no grau de mineralização e a proporção de formação entre coroa e raiz dentária. Estabeleceu-se assim: estágio 1, somente coroa formada; estágio 2 com 1-2 mm de formação radicular; estágio 3 com 3- 4 mm de formação radicular;

estágio 4 com 5-6 mm de formação radicular; estágio 5 com 7-8 mm de formação radicular e o sexto e último estágio se referindo ao dente com coroa formada e 9 mm de formação radicular, com o forame apical aberto. Como resultados, puderam notar que a produção de DSCs foi maior nos estágios iniciais de desenvolvimento dentário (1 e 2) e menor nos estágios dentários mais desenvolvidos (3,4 e 5). As maiores produções celulares e Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) ocorreram nos estágios 2 e 3 de desenvolvimento coroa e raiz. Concluíram que o estágio de desenvolvimento dentário analisado por meio de radiografias pode ser útil, um fator orientador na coleta de dentes para futuros empregos na ET de células-tronco dentárias.

XIA *et al.* (2011) fizeram uma revisão acerca de suplementos empregados nos meios de cultura de MSCs. Salientaram que FCS é largamente utilizado como suplemento em grande número de ensaios, porém também é uma fonte indesejável de antígenos xenogênicos (heterógenos), gerando riscos de transmissão viral animal, príon e contaminações por zoonose. Relataram uma gama de alternativas ao suplemento FCS, especialmente fatores de crescimento, incluindo soro humano, plasma e derivados lisados de plaquetas (*human platelet lysate* – HPL) e fatores plaquetários. Dentre esses suplementos, os autores utilizaram HPL comparativamente a FCS na cultura de MSCs. HPL contém moléculas bioativas em distintas organelas plaquetárias, incluindo proteínas adesivas, fatores de coagulação, fatores mitogênicos, inibidores de proteases e proteoglicanos. Comumente utilizados em centros hospitalares, HPL mostram-se como um substituto seguro ao FCS. No estudo, as MSCs

foram isoladas a partir de aspirados de crista ilíaca de doadores saudáveis e cultivadas com meio DMEM, com baixa concentração de glicose, suplementado com 10% de FCS e meio DMEM com baixa concentração de glicose, suplementado com 7,5% de HPL. Para comparar a proliferação nas duas condições de meios de cultivo, as MCSs foram analisadas após a 5ª passagem, durante uma semana com análises diárias. Os resultados foram submetidos à análise estatística com o teste ANOVA (Análise de Variância). Foram considerados significantes os resultados com variações menores que 5%. Em resumo, demonstraram que a expansão de MSCs com HPL é praticável e tem muitas vantagens. Concluíram também que as células expandidas em HPL proliferam bem em menos de 10 passagens e evidenciam *in vitro* diferenciação osteogênica. Desse modo estabeleceram uma proposta de protocolo para suplementação de meios de cultura para MSCs com HPL a 7,5%.

MÉTODOS

4. MÉTODOS

O presente estudo caracteriza-se por ser experimental, primário, longitudinal, sequencial, prospectivo, analítico, de controle comparativo e de casuística igual a cinco.

Os doadores foram convidados a participar do estudo e aceitos após terem lido e concordado com o descrito no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), inscritos no Comitê de Ética em Pesquisa Médica da Unifesp (CEP-UNIFESP) sob número 0968/09 e na Comissão Nacional de Pesquisa (CONEP) sob número 1039/06 (ANEXO I).

Nos casos em que o doador era incapaz judicialmente, o responsável legal autorizou a doação.

As coletas sanguíneas foram realizadas em ambulatório por pessoal treinado e capacitado, de modo asséptico e em volume aproximado de 80 mililitros (ml). Tal procedimento foi executado com antecedência média de cinco dias em relação à data da cirurgia odontológica, com a finalidade de produção de suplemento hemoderivado para cultivo das células humanas de origem dentária.

O capítulo de métodos deste estudo, por envolver várias etapas foi subdividido em sub-capítulos com a finalidade de tornar a compreensão facilitada, a saber:

4.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.

4.2 CRITÉRIOS DE NÃO INCLUSÃO.

4.3 COLETA DAS DOAÇÕES DE GERME DENTÁRIO HUMANOS.

4.4 ISOLAMENTO CELULAR.

4.5 MÉTODO EMPREGADO NA CONTAGEM CELULAR.

4.6 COLETA DE SANGUE HUMANO.

4.7 OBTENÇÃO DO SUPLEMENTO HEMODERIVADO HUMANO.

4.8 PREPARO DOS MEIOS DE CULTIVO.

4.9 DISTRIBUIÇÃO CELULAR EM CADA EXPERIMENTO.

4.10 EVOLUÇÃO DE CADA EXPERIMENTO.

4.10.1 Registros do potencial hidrogeniônico (pH) das triplicata do meio de cultivo.

4.10.2 Contagem das triplicatas.

4.10.3 Análise dos evidenciadores para tecidos mineralizados.

4.10.4 Análise das Unidades Formadoras de Colônias (UFCs).

4.10.5 Testes do Cometa.

4.11 MÉTODO E ANÁLISE ESTATÍSTICA.

4.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.

- Doadores de ambos os gêneros com idade entre 14 anos e 20 anos.
- Doadores saudáveis
- Doadores que não estivessem em tratamento médico ou tomando algum tipo de medicamento de uso crônico.
- Doadores que possuíssem dentes terceiros molares com indicação clínica para remoção.
- Dentes terceiros molares em estágios iniciais de formação (coroa/raiz).
- Dentes de doadores autorizados à cirurgia após exames complementares, necessários e em conformidade com a anamnese pré-operatória.
- Dentes em estágios de desenvolvimento 2 e 3 conforme DUAILIBI *et al.*(2011)
- Concordância em participar do estudo após ter lido o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

4.2 CRITÉRIOS DE NÃO INCLUSÃO.

- Utilização de medicação pré-operatória contendo drogas corticosteróides.

- Cirurgias com indicação de técnica cirúrgica de odontosseção ou desgaste coronário.
- Portadores de doença infecto-contagiosa (anamnese).
- Culturas celulares que foram contaminadas.
- Dentes terceiros molares com exposição coronária, contaminados ou próximos de regiões contaminadas.
- Nos casos em que o número total de células obtidas foi inferior a $10,00 \times 10^6$ após a digestão enzimática.
- Portadores de anomalias dentárias.
- Portadores de alterações hormonais (anamnese).
- Portadores de discrasias sangüíneas.
- Portadores de alergias medicamentosas.

4.3 COLETA DAS DOAÇÕES DE GERME DENTÁRIO HUMANO.

Os germes dentários foram provenientes dos cursos de especialização e atualização em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial ministrados na Fundação para Desenvolvimento Científico e Tecnológico da Odontologia (FUNDECTO), Escola de Aperfeiçoamento Profissional da Associação Paulista de Cirurgias Dentistas (EAP-APCD), órgãos de saúde públicos, ou consultórios particulares, sendo considerados como tecido de descarte cirúrgico.

Conforme a necessidade de cada cirurgia a ser realizada, o cirurgião responsável (capacitado a fazer a captação para ET) fazia a indicação medicamentosa pré-operatória, que consistiu em antibacterianos (penicilina), analgésico se necessário (dipirona), antiinflamatório não hormonal (se necessário).

A técnica cirúrgica consistiu na preparação do paciente realizando-se antissepsia intra e extra-oral com clorexidina a 2%, instalação dos campos operatórios estéreis e realização da técnica de anestesia local. A técnica anestésica local utilizada foi o bloqueio regional ptérgico-mandibular para terceiros molares inferiores, complementada com técnica infiltrativa para o nervo bucal nas regiões do triângulo retro-molar e ângulo mandibular, além de técnica infiltrativa nas papilas inter-dentais entre primeiro e segundo molares inferiores do mesmo lado, assegurando-se assim a hemostasia. Nas cirurgias de terceiros molares superiores a técnica anestésica preconizada foi bloqueio regional pós-tuber, associada a técnica infiltrativa nas papilas inter-dentais entre primeiro e segundo molares superiores do mesmo lado para o controle da hemostasia e finalizando com técnica de bloqueio regional para o nervo palatino maior.

Em todos os pacientes a solução anestésica utilizada foi cloridrato de mepivacaína a 2% associada ao vasoconstritor adrenérgico cloridrato de adrenalina na concentração de 1:100.000, da marca Mepiadre[®] (Laboratórios DFL, Rio de Janeiro- Brasil).

Na execução da técnica anestésica foram utilizadas agulhas descartáveis de calibre 30G da marca Unoject[®] (Medical Industry Co. Japão). Instalado o efeito anestésico, promoveu-se incisão cristal e outra relaxante para facilitar o descolamento de um retalho, região mesial em

relação ao dente terceiro molar, entre o primeiro molar e o segundo molar. Utilizou-se bisturi cirúrgico número três montado com lâmina número 15 para as cirurgias dos dentes mandibulares e lâmina 12 para os maxilares, MED BLADE[®] (Jiangsu Xuyi Kangning Medical – China). Deste modo facilitou-se a exposição do osso subjacente na região do germe dentário.

Uma vez exposto o germe dentário, a remoção e coleta do tecido conjuntivo e a remoção do germe dentário da loja cirúrgica foi realizada por meio de elevadores apicais, curetas e pinças hemostáticas retas e curvas. Todo o tecido de descarte cirúrgico foi imerso em 35 ml de Solução Salina Balanceada de Hank's (HBSS - Meio Modificado – LGC – Biotecnologia[®] Ind. Brasileira) a 37°C, em frascos tipo Falcon com capacidade para 50 ml estéreis Sarstedt[®] (Sarstedt Inc -Newton, NC – USA), descontaminados com álcool 70%, lacrados com membrana de PARAFILM “M”[®] (Pechiney Plastic Packaging, Chicago Illinois) e mantidos nesta condição de temperatura para transporte até o momento do processamento tecidual. Ao final da cirurgia, a cavidade cirúrgica era examinada e, constatadas as condições de normalidade, o fechamento cirúrgico era realizado por meio de sutura simples com fios de sutura 3-0 de seda montados com agulha semi-circulares x-17 ½ por 17 mm - ETHICON[®] (Jonhson & Jonhson do Brasil Ind. Com. de Produtos para Saúde Ltda). Após a sutura foram aplicadas compressas de gaze estéreis secas e como conduta rotineira no pós operatório indicou-se a aplicação extra-oral de compressas frias (gelo) por um período de três horas, aplicadas a cada 15 minutos, durante 20 a 30 segundos.

A medicação pós-operatória indicada (por via oral) foi: dipirona a cada quatro horas enquanto houvesse sintomatologia dolorosa, anti-

inflamatórios não esteroidais a cada cinco horas durante cinco dias e antibiótico, penicilina, a cada oito horas por sete dias.

4.4 ISOLAMENTO CELULAR.

De posse de todo material de doação o isolamento celular se iniciou sob fluxo laminar na câmara da marca VECO[®] (VECO, São Paulo – Brasil, modelo VLFS 12).

O material de descarte cirúrgico foi depositado na placa de vidro (Petri) número cinco, reavaliado e classificado quanto ao estágio evolutivo do germe dentário (DUALIBI *et al.* 2011), lavado duas vezes com HBSS (LGC – Biotecnologia[®] Ind. Brasileira) sendo todo o tecido não mineralizado separado do germe dentário e então pesado.

Na sequência, em nova placa de Petri e com auxílio de dois bisturis número três montados com lâminas número 15, foi feita a fragmentação deste tecido não mineralizado em pedaços menores que um milímetro em solução de HBSS. Todo o líquido e o tecido foram aspirados por pipetas estéreis de 10 mililitros (ml), transferidos para um novo tubo com capacidade para 50 ml e lavados sucessivas vezes em HBSS. O conteúdo desse tubo foi então submetido à digestão tecidual por meio da ação das enzimas dispase e colagenase tipo I Sigma.[®] (Sigma Chemical Co.), conforme protocolo (DUALIBI *et al.* 2008) e novamente disperso por meio de sucessivas aspirações e ejeções com pipetas para 10 ml de solução e durante 10 minutos, para em seguida ser colocado em incubadora rotatória a 37° C por 30 minutos.

O tecido foi então lavado em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) associado a Ham's F 12 (HF-12), filtrado em um separador celular de náilon com malha de 40 micrômetros (μm) da marca BD[®] (Becton Dickinson Franklin Lakes – NJ – USA).

O filtrado foi centrifugado pela última vez durante 10 minutos a 1500 rotações por minuto (rpm) obtendo-se um precipitado celular no fundo do frasco do centrifugado denominado de *pellett*.

O excesso de meio de cultivo foi então removido, mantendo-se esse *pellett* num volume final de cinco mililitros de meio de cultivo isento de suplemento no frasco de 50 ml SARSTEDT[®] (Sarstedt Inc. - Newton, NC – USA).

Como procedimento de rotina laboratorial, a caracterização celular se procedeu por meio de Citometria de Fluxo em FACSCanto, usando FACSDiva software (BD Biosciences) e então analisadas com FlowJo software (Tree Star, San Carlo, CA).

Concluída essa fase, as células estão prontas para serem contadas.

4.5 MÉTODO EMPREGADO NA CONTAGEM CELULAR.

Iniciando a contagem celular, faz-se a dispersão e homogeneização deste *pellett* por meio de aspirações e ejeções sucessivas com uma pipeta

SARSTEDT[®] (Sarstedt Inc. - Newton, NC – USA), estéril com capacidade para cinco mililitros, acoplada a um pipetador automático Gilson[®], Gilson SAS, Villiers-le-Bel - France.

Com um micropipetador Gilson[®] (Gilson SAS, Villiers-le-Bel – France), com capacidade para 100 (P-100) microlitros (μl), calibrado previamente pela assistência técnica e montado com uma ponteira SARSTEDT[®] (Sarstedt Inc -Newton, NC – USA), foi feita a aspiração de um volume equivalente a 50 μl do concentrado celular homogeneizado, depositando-o num frasco tipo *ependorff* SARSTEDT[®] (Sarstedt Inc - Newton, NC – USA), previamente identificado.

Nesse frasco *ependorff* acrescentou-se mais 50 μl do corante eosina a 0,1%.

Com outro micropipetador Gilson[®], com capacidade para volumes entre 0,2 μl e 10 μl montado com uma ponteira SARSTEDT[®] (Sarstedt Inc -Newton, NC – USA), foi feita a aspiração de um volume equivalente a 10 μl deste frasco tipo *ependorff* final com eosina, depositando-o cuidadosamente no espaço entre a lâmina e a lamínula da câmara de Neubauer com duplo espelhamento da marca INLAB[®] (Alamar - Tecnológica Científica Ltda, Importadora Bras.).

A contagem celular sob microscopia óptica, realizada por meio do microscópio óptico invertido AxioVert[®] - 40 C (Carl Zeiss – Germany), da Camera AxioCam[®] (I Cc1 Zeiss – Germany), e por meio do software AxioVison[®] 4.1 - Germany, foi feita computando-se somente as células que não foram coradas pela eosina 0,1% (FIGURA 1).

O número total (nt) de células contadas neste volume foi então multiplicado por 10^4 , que equivale ao volume contido no espaço sob a lamínula e, em seguida, pelo fator de diluição (δ) relacionado à diluição com eosina. Esse resultado foi dividido pelo número de quadrantes contados (nQ) que no caso foram quatro. O resultado representa a quantidade de células no volume de um mililitro.

Esse método de contagem foi empregado em toda situação onde foi necessário se quantificar o número de células durante este estudo. Deste modo, a fórmula empregada para a contagem celular foi

$$\frac{nt \times \delta \times 10^4}{nQ} = \text{cel/ml}$$

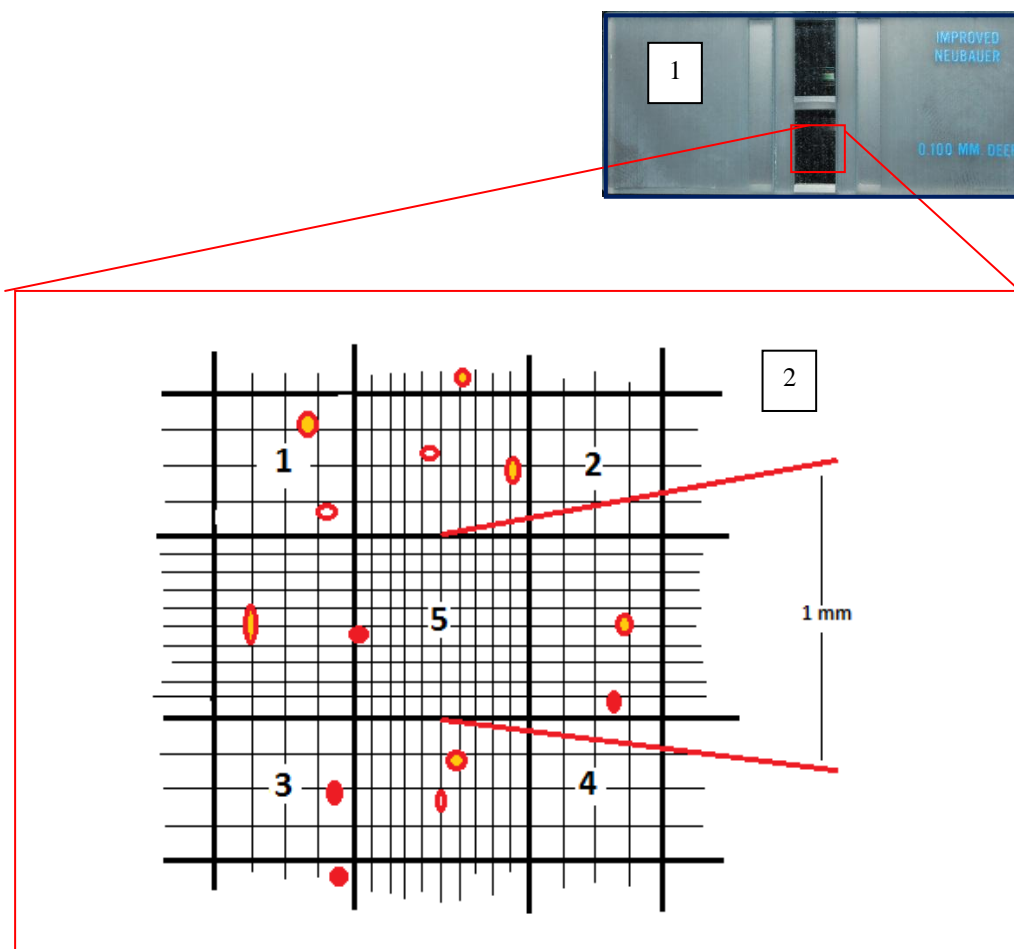


FIGURA 1. Em 1- Câmara de Neubauer, 2- o destaque dos nove quadrantes para contagem celular – células e a identificação da viabilidade celular. célula viável ■, célula inviável ■.

Realizada a contagem celular, obteve-se $10,00 \times 10^6$ células de origem dentária. Esse número de células foi considerado o número mínimo e essencial para a realização de cada experimento.

Inicialmente o número total de células para cada experimento foi dividido em duas alíquotas. A primeira parte com $6,00 \times 10^6$ células, denominada ensaio de proliferação 1, 2 e 3 e testes para evidenciar tecidos mineralizados. Essas células foram distribuídas entre todas as placas de seis poços de cada experimento (FIGURA 2).

Como ensaio de proliferação, foram semeados os poços demarcados em algarismos arábicos de um a três na parte superior da placa de seis poços, estabelecendo uma densidade celular de $6,50 \times 10^3$ células por centímetro quadrado (cm^2) e definindo a forma de triplicata empregada na contagem celular (FIGURA 2).

Na parte inferior da mesma placa de seis poços, a mesma densidade celular foi estabelecida e os poços identificados com as letras “A”, “B” e “C”. Dois poços foram reservados para testes de evidenciação de tecidos mineralizados e um dos poços ficou reservado para o teste do cometa que ocorreu no 28º dia de cada experimento (FIGURA 2).

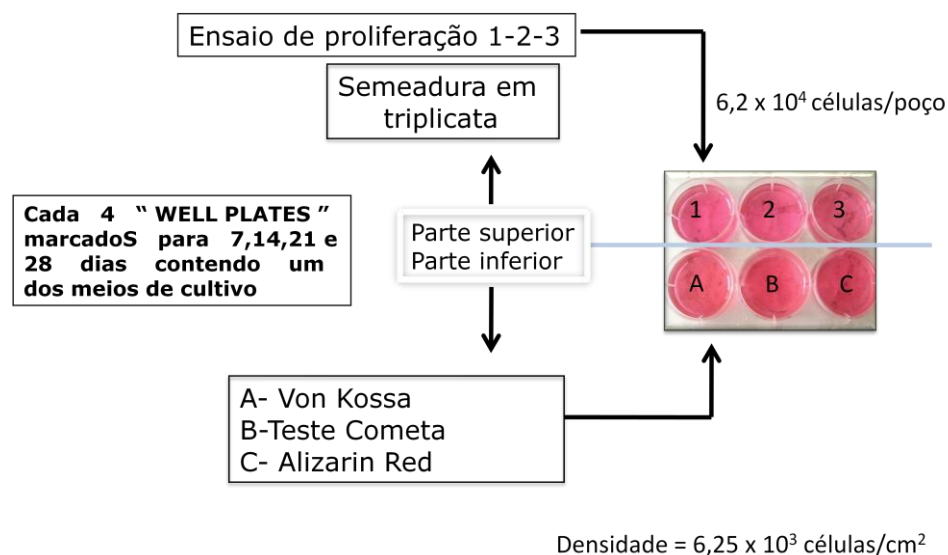


FIGURA 2: Esquema demonstra a divisão da placa com seis poços: superior, números 1-3; triplicatas para proliferação da cultura celular e inferior, letras A;B;C, para cultura celular, coloração com marcadores para tecidos mineralizados (A e C). Teste do Cometa – “B”. Densidade de $6,50 \times 10^3$ células/cm² por poço.

A segunda parte do número inicial de células, 4×10^6 células restantes, foi destinada às garrafas SARSTEDT[®] 25 (T-25) para cultura celular, para serem analisadas as Unidades Formadoras de Colônias (UFCs), estabelecendo uma população inicial de 5×10^5 células por garrafa

4.6 COLETAS DE SANGUE HUMANO.

As coletas sanguíneas para a produção de hemoderivados humanos que suplementaram os meios de cultivo, realizadas nos respectivos doadores, obedeceram sempre ao mesmo protocolo e com antecedência média de cinco dias à cirurgia em relação à coleta do germe dentário.

A coleta foi realizada em ambiente ambulatorial asséptico por meio de punção venosa, utilizando sistema de coleta sanguínea a vácuo. A coleta a vácuo utilizou um canhão adaptador para agulhas amarelo, da marca Becton Dickinson (BD) Vacutainer[®] Brand, uma agulha de calibre 23 estéril da mesma marca BD Vacutainer[®] e frascos secos a vácuo, também da marca BD Vacutainer[®] *serum* (BD Franklin Lakes - NJ USA), estéreis evitando injúrias físicas ao doador.

Ao conjunto de canhão e agulha puncionado ao vaso sanguíneo, introduziu-se o frasco a vácuo com capacidade para 10 ml, coletando-se até oito mililitros de sangue total.

Esse procedimento, quando necessário, foi executado no mesmo paciente no máximo duas vezes e em braços diferentes, de modo a se obter um volume máximo de 80 ml de sangue que pudesse ser processado em soro homólogo ou autólogo, conforme o doador.

Ao final da coleta o local da punção foi prontamente tratado com curativo oclusivo apropriado e as orientações efetivas foram dadas ao paciente quanto aos cuidados com o braço doador.

Os frascos com as doações sangüíneas foram fechados, lacrados com Parafilm “M”[®] (Pechiney Plastic Packaging, Chicago Illinois, USA), identificados, descontaminados externamente com álcool 70%, unidos com fita adesiva, mantidos na vertical em casulos apropriados e transportados em caixa térmica cuidadosamente até o laboratório, de modo a impedir a ocorrência de hemólise, para serem processados num prazo máximo de duas horas.

4.7 OBTENÇÃO E PREPARO DO SUPLEMENTO HEMODERIVADO HUMANO.

No laboratório, os frascos com sangue humano foram novamente descontaminados externamente com álcool 70 por cento, submetidos a

centrifugação de 1500 rotações por minuto (rpm) durante 10 minutos em centrífuga modelo ROTOFIX 32 A Hettich-Zentrifugen (Andreas Hettich GmbH & Co. KG- Tutlingen- Germany), seguidos por repouso de quatro minutos e, em seguida, novamente centrifugados a 4000 rpm durante 20 minutos.

Sob fluxo laminar, o sobrenadante (soro) foi aspirado com uma seringa estéril com capacidade para 10 ml PLASCALP[®] (Plascalp Prods. Cir. Ltda - Feira de Santana, Bahia – Ind. Brasileira), acoplada a uma agulha hipodérmica estéril, descartável, calibre 21G 1¼ BD[®] (Becton Dickinson Ind. Cir. Ltda.- Curitiba, Paraná - Ind. Brasileira), tomando-se o cuidado para não tocar o coágulo.

O soro aspirado foi imediatamente filtrado através de um filtro SARSTEDT[®] (Sarstedt Inc. - Newton, NC – USA) de 0,2 µm, não pirogênico e acoplado à seringa de aspiração.

O filtrado foi depositado em outro frasco falcon estéril com capacidade para 50 ml SARSTEDT[®] (Sarstedt Inc. - Newton, NC – USA). Ao final do processo o frasco Sarstedt[®] foi lacrado com Parafilm “M”[®] (Pechiney Plastic Packaging, Chicago Illinois), levado para imersão em banho sorológico da marca Quimis[®] (Aparelhos Científicos Ltda, Diadema, São Paulo, Brasil modelo 0304M-1106), a temperatura de 56°C durante 60 minutos.

Finalizando, o frasco foi resfriado à temperatura ambiente por 20 minutos para então o produto final (soro humano) ser mantido a -4°C até o momento de ser utilizado na produção do respectivo meio de cultivo, homólogo ou autólogo (FIGURA 3).

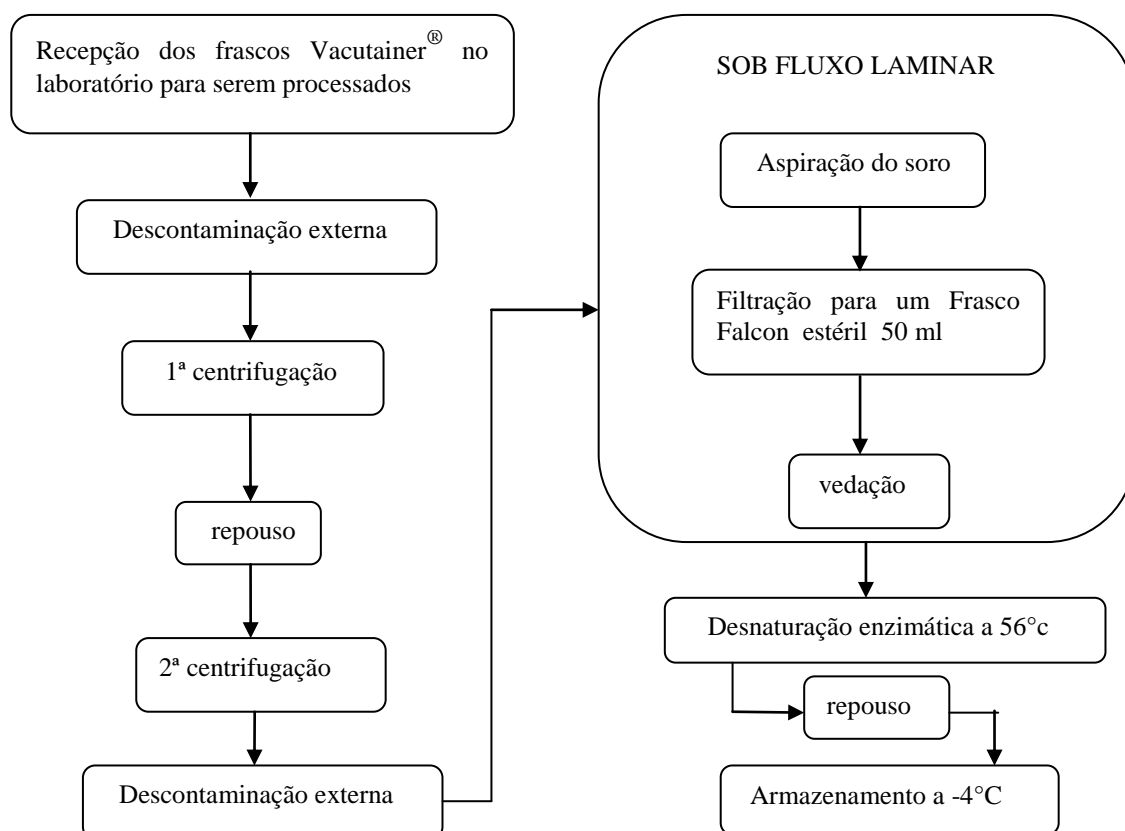


Figura. 3 Fluxograma da preparação dos soros humanos, autólogo e homólogo, que foram utilizados nos processos de produção dos meios de cultivo III e IV

4.8 PREPARO DOS MEIOS DE CULTIVO.

Os meios de cultivo foram preparados com 24 h de antecedência ao isolamento celular de cada experimento do estudo. Quatro tipos de meios

de cultivo diferentes foram feitos para serem utilizados em cada experimento.

Os meios foram identificados em algarismos romanos, sendo o Meio I isento de suplemento animal e utilizado como meio controle; o Meio II suplementado com SFB, um hemoderivado animal (bovino) de espécie animal diferente da espécie doadora do germe dentário (humano) portanto heterólogo (SHe); o meio III, diferindo dos anteriores por utilizar como suplemento animal o soro humano que não do mesmo doador do germe dentário portanto, homólogo (SHHo) e por último o meio IV, que também utilizou suplemento animal de origem humana, cujo doador do soro foi o próprio doador do germe dentário, portanto autólogo (SHAu).

1- O meio de Cultivo I, composto por 1:1 de meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium, High Glicose* (DMEM HG- LGC – Biotecnologia[®] Ind. Brasileira) e de mistura de nutrientes *Ham's F-12* (HF-12 LGC – Biotecnologia[®] Ind. Brasileira) acrescido de dois e meio mililitros de antibióticos na proporção de 10 000 UI/ml de penicilina e 10 mg/ml de estreptomicina (CULTILAB[®] MAT CULT CEL LTDA – Campinas – SP , Brasil), perfazendo um volume total de 500 ml.

2- O meio de cultivo II, denominado de Soro Heterólogo (SFB/SHe), composto por 1:1 de meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium High Glicose* (DMEM HG- LGC – Biotecnologia[®] Ind. Brasileira) e de mistura de nutrientes *Ham's F-12* (HF-12 LGC – Biotecnologia[®] Ind. Brasileira) acrescido em 50 ml de Soro Fetal Bovino (SFB LGC – Biotecnologia[®] Ind. Brasileira) mais dois e meio mililitros de antibióticos na proporção de 10

000 UI/ml de penicilina e 10 mg/ml de estreptomicina (CULTILAB[®] MAT CULT CEL LTDA – Campinas – SP , Brasil), perfazendo um volume total de 500 ml (FIGURA 4).

3- Meio de cultivo III, (SHHo) composto por 1:1 de meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium High Glicose* (DMEM HG- LGC – Biotecnologia[®] Ind. Brasileira) e de mistura de nutrientes *Ham's F-12* (HF-12 LGC – Biotecnologia[®] Ind. Brasileira) acrescido de 50 ml de SHHo produzido a partir de doação de sangue humano de indivíduo não doador do germe dentário, mais dois e meio mililitros de antibióticos na proporção de 10 000 UI/ml de penicilina e 10 mg/ml de estreptomicina (CULTILAB[®] MAT CULT CEL LTDA – Campinas – SP , Brasil), perfazendo um volume total de 500 ml (FIGURA 4).

4- Meio de Cultivo IV, (SHAu), composto por 1:1 de meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium High Glicose* (DMEM HG- LGC – Biotecnologia[®] Ind. Brasileira) e de mistura de nutrientes *Ham's F-12* (HF-12 LGC – Biotecnologia[®] Ind. Brasileira) acrescido de 50 ml de SHAu, produzido a partir de doação de sangue humano do próprio doador do germe dentário, mais dois e meio mililitros de antibióticos na proporção de 10 000 UI/ml de penicilina e 10 mg/ml de estreptomicina (CULTILAB[®] MAT CULT CEL LTDA – Campinas – SP, Brasil), perfazendo um volume total de 500 ml (FIGURA 4).

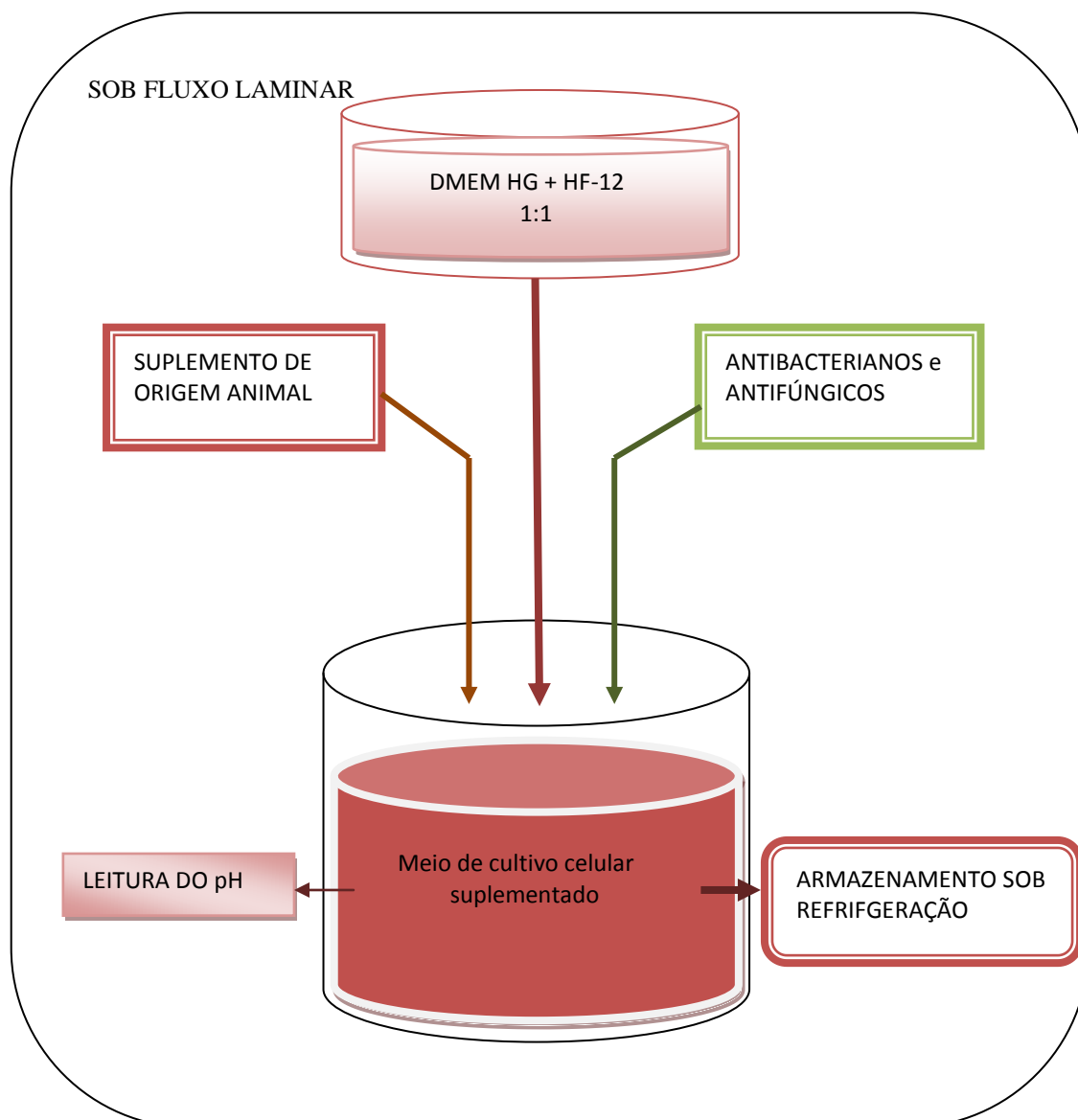


FIGURA 4. Esquema reproduzindo o *modus operandi* da preparação de todos os meios de cultivo suplementados utilizados no estudo.

De cada um dos quatro meios de cultivo foram retiradas alíquotas para leitura de potencial hidrogeniônico (pH) em aparelho da marca JENWAY® - 3510 pH Meter, que serviu como dado de orientação de partida. O pH não foi ajustado ao fisiológico (7,4) para evitar introdução de agentes contaminantes e porque, naturalmente, a formulação gera um pH muito próximo do fisiológico. Em seguida cada um dos respectivos meios

de cultivo foi armazenado em frascos estéreis, lacrados para estocagem e identificados.

A identificação de cada frasco consistiu no registro do experimento conforme o número sequencial dos experimentos no laboratório de Engenharia Tecidual e aqui definidos como experimentos 1, 2, 3, 4 e 5. Além do número, as iniciais do doador do germe dentário, a formulação do meio de cultivo e a data de produção do meio.

Estes frascos foram mantidos sob refrigeração a +4°C até o momento da utilização, quando foram extraídos volumes menores, o suficiente para cada dia de trabalho de cada experimento.

4.9 DISTRIBUIÇÃO CELULAR EM CADA EXPERIMENTO.

Todo material necessário para a distribuição de cada experimento foi levado à câmara de fluxo laminar: as placas de seis poços SARSTEDT[®], as garrafas T-25 SARSTEDT[®] (previamente identificadas), as pipetas descartáveis, os frascos com meios, um recipiente para descarte de materiais. Na identificação constavam as iniciais do doador, o número do experimento, o tipo de meio, a data da semeadura do experimento, a data para análise do material (7°, 14°, 21° e 28° para as placas e 14° e 21° dias para as garrafas) em local apropriado, lateralmente.

Os meios de cultivo empregados foram mantidos aquecidos a 37° C (também sob fluxo laminar) assim como um frasco de 50 ml SARSTEDT[®] com quantidade de $10,00 \times 10^6$ células do doador do germe dentário.

A distribuição das células priorizou a retirada de quatro mililitros do volume inicial, transferindo $4,00 \times 10^6$ de células para outro frasco com capacidade para 50 ml SARSTEDT[®], destinadas ao estudo que envolvia a formação de colônias, denominado UFCs.

Desse modo, passamos a ter dois frascos com volumes diferentes: um com seis mililitros de HBSS e $6,00 \times 10^6$ células (frasco A) e outro com quatro mililitros de HBSS e $4,00 \times 10^6$ células (frasco B).

A partir do frasco A (FIGURA 5), destinado à distribuição nas placas de seis poços, todo o conteúdo foi homogeneizado e redistribuído em quatro novos frascos SARSTEDT[®], com um e meio mililitro cada.

Cada um desses novos frascos continha $1,50 \times 10^6$ de células, os quais foram mantidos à temperatura de 37°C, destinando-se um frasco para cada tipo de meio de cultivo do estudo.

Em seguida, em cada frasco foram acrescentados 46 ml do respectivo meio de cultivo do estudo, totalizando um volume final de 48 ml, os quais foram homogeneizados para se distribuir nas placas. Desses frascos, dois mililitros ($6,25 \times 10^4$ células) foram pipetados e transferidos para cada poço de cultura (24 poços) das quatro placas, para as quatro semanas do experimento. Em cada poço se estabeleceu uma densidade celular de $6,50 \times 10^3/\text{cm}^2$.

Cada conjunto de quatro placas de seis poços totalizou 24 poços que estavam identificados previamente, foi empregado um conjunto para cada meio de cultivo e os mesmos foram analisados semanalmente.

Ao final, para completar o volume em cada poço, foi adicionado mais um mililitro do mesmo meio de cultivo, fresco e previamente

aquecido, perfazendo três mililitros em cada um dos poços. Este procedimento foi executado para todos os quatro meios do experimento. Cada série do respectivo meio foi fechada logo que semeados todos os poços e colocada na incubadora a 37°C, 5% CO₂ e com umidade relativa de 95%.

De posse do frasco B (FIGURA 5), com as células para as análises das UFCs, acrescentamos mais quatro mililitros do meio I e homogeneizamos durante 2 minutos, formando agora um volume de oito mililitros.

Aspirou-se todo esse volume cuidadosamente e, com uma pipeta de 10 ml, depositou-se um mililitro no interior de cada uma das oito garrafas T-25 que estavam previamente identificadas.

Desse modo, cada garrafa T-25 com um mililitro do meio de cultivo I do experimento, continha $5,00 \times 10^5$.

Em cada duas garrafas T-25, para os 14º e 21º dias de cada um dos meios de cultivo, acrescentaram-se mais três mililitros do respectivo meio (I, II, III e IV) fresco, perfazendo um volume de quatro mililitros no interior de cada uma delas.

Em seguida as garrafas foram fechadas, homogeneizadas horizontalmente e levadas à incubadora (Thermo Electron Corporation, Series II – Water Jacketd CO₂ Incubator – HEPA – CLASS 100, modelo 3110 – Marietta – Ohio – USA). Na incubadora foram mantidas a 37°C, 5% de dióxido de carbono (CO₂) e umidade relativa de 95%.

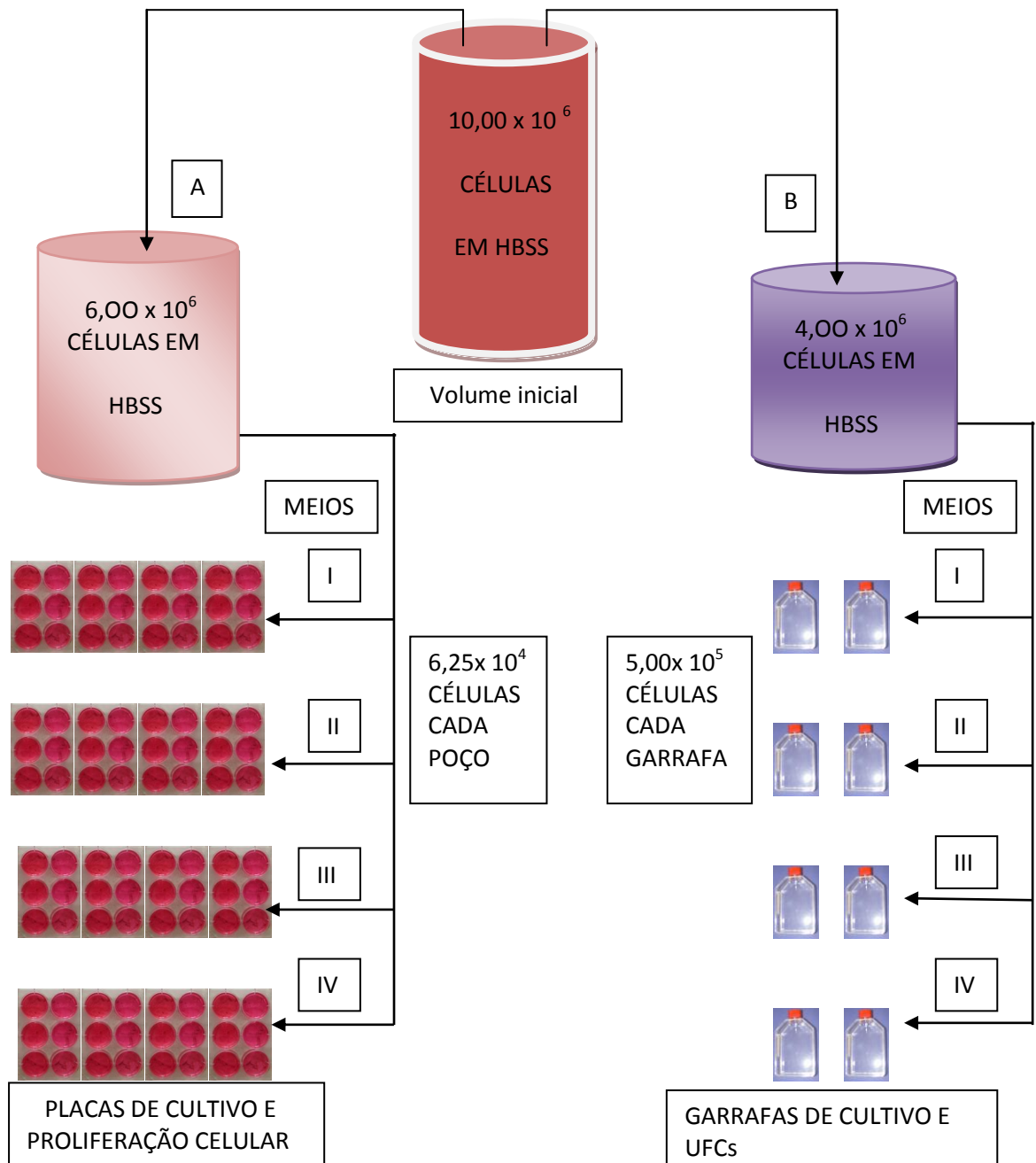


FIGURA 5. Fluxograma resumido da distribuição a partir da digestão tecidual, para cada experimento. Divisão das $10,00 \times 10^6$ células-tronco de origem dentária: $6,00 \times 10^6$ células para as placas de cultura e $4,00 \times 10^6$ células para as garrafas de cultura modelo T-25/ UFCs.

Durante a semeadura das células nos poços, das placas de seis poços, de cada meio de cultivo, para evitar contaminação do experimento, estabeleceu-se uma sequência de distribuição. Iniciou-se pela semeadura das células nas quatro placas para cultura que receberiam o meio de cultivo I (IS) até completar toda a série, sendo colocadas na incubadora. Em seguida, passou-se às placas que receberiam o meio de cultivo II até terminar; depois as com meio III e finalizando com o meio IV, em conformidade com o diagrama do desenho de estudo (FIGURA 6). O mesmo cuidado foi executado em relação às garrafas para UFCs.

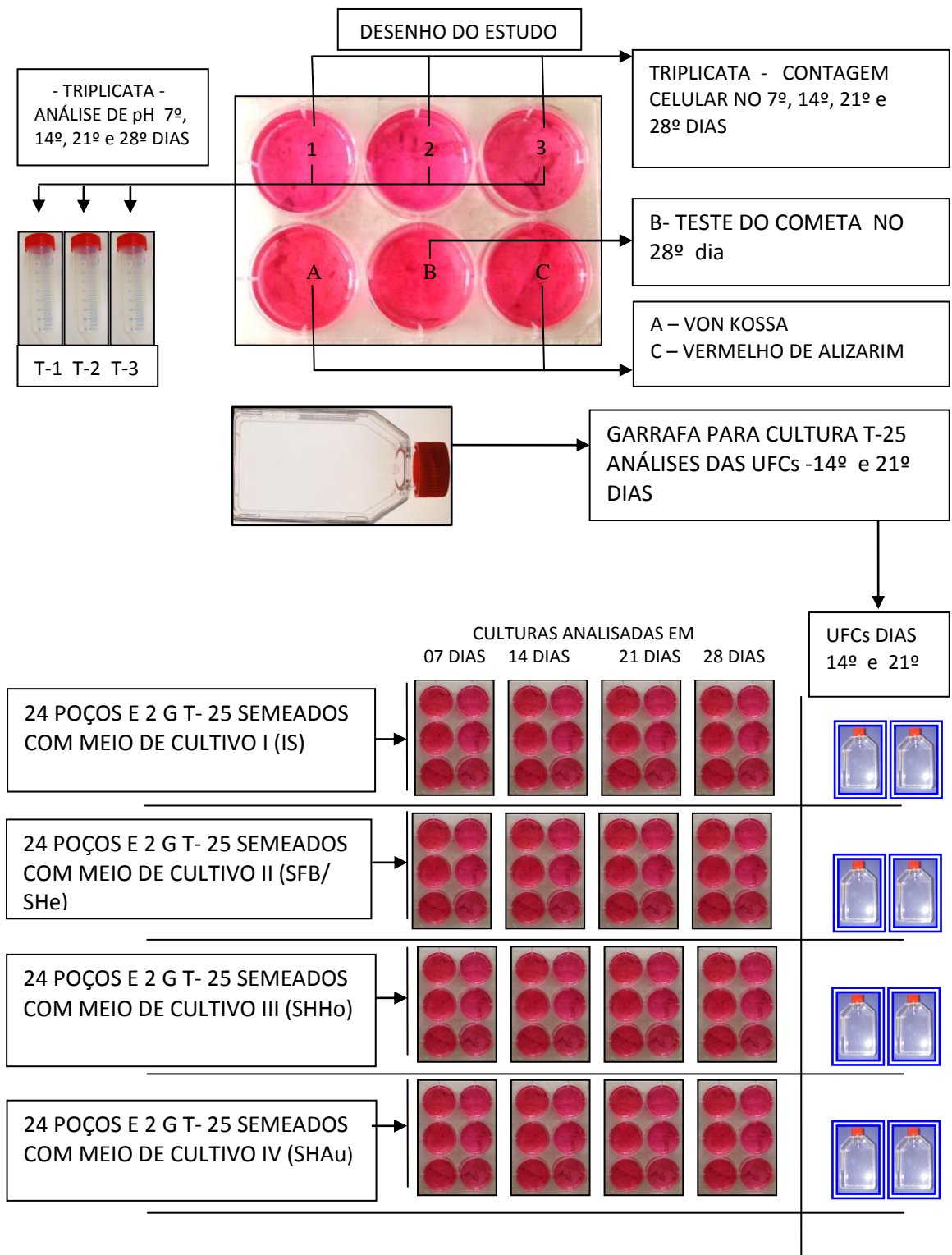


FIGURA 6. Fluxograma do estudo distribuição das células-tronco, planejamento adotado para todos os experimentos.

4.10 EVOLUÇÃO DE CADA EXPERIMENTO.

O dia da semeadura foi estabelecido como sendo o dia “zero” (FIGURA 7).

No início foram feitas observações diárias, tanto das garrafas T-25 quanto das placas da proliferação celular. Verificou-se, por meio da microscopia óptica com microscópio invertido, o progresso do respectivo experimento. Ocorrendo a aderência celular no fundo do recipiente plástico nas primeiras 60 horas, o experimento mostrava-se promissor e estabeleciam-se as datas para controle (FIGURA 7).

Dias/datas	0	3°	7°	10°	14°	17°	21°	24°	28°
Fotografias									
Trocade Meio									
Contagem									
Leitura Ph									
VA e VK									
UFCs									
Cometa									

FIGURA 7. Organograma da agenda de trabalho de cada experimento do dia zero ao 28° dia, adotado para cada Meio de cultivo celular empregado no estudo.

Desta forma, com este organograma fez-se o controle de toda programação de cada experimento, do dia zero ao 28° dia, quando foram

feitas as leituras de pH, as contagens das triplicatas, as evidenciações com Von Kossa (VK) e vermelho de Alizarim (VA), as UFCs e o teste do cometa.

Em todas as data nas quais houve troca de meio de cultivo, as culturas foram fotografadas por meio de microscopia óptica invertida, com microscópio AxioVert[®] - 40 C, Carl Zeiss Germany e Câmera AxioCam,[®] ICc 1 Zeiss Germany, utilizando-se o software AxioVison[®], Germany.

4.10.1 Registros do potencial hidrogeniônico (pH) das triplicatas do meio de cultivo.

As trocas dos meios de cultivo se deram a cada 84 h, aproximadamente três dias e meio.

Nos 7º, 14º, 21º e 28º dias, os poços que foram analisados quanto à proliferação celular não receberam meio, tiveram seus registros fotográficos, seus conteúdos líquidos analisados quanto ao pH e foram submetidos diretamente à contagem celular.

Os poços 1, 2 e 3 (FIGURA 6), nas suas respectivas datas, tiveram os seus meios de cultivo removidos integralmente por meio de uma pipeta descartável estéril SARSTEDT[®] de cinco mililitros, um de cada vez e colocados em três diferentes frascos estéreis SARSTEDT[®], com capacidade para 15 ml, previamente identificados. Imediatamente estes

frascos foram fechados e levados para bancada externa para leitura dos respectivos pH, em aparelho JENWAY® - 3510 pH Meter. Após a leitura e os respectivos registros, os meios foram descartados em solução de hipoclorito de sódio.

Durante a manipulação de cada meio de cultivo, a série inteira de cada meio, do sétimo ao vigésimo oitavo dia, foi retirada da incubadora e levada ao fluxo laminar. Nos poços submetidos exclusivamente à troca, somente 50 % do conteúdo líquido de cada poço (um e meio mililitros) foi trocado e descartado em solução de hipoclorito de sódio.

Com outra pipeta estéril, o meio de cultivo fresco foi repostado em substituição ao meio de cultivo que fora descartado.

Nas datas pré-determinadas para a contagem celular e a leitura de pH em todas as placas de seis poços, os três poços superiores foram analisados isoladamente e de forma a se estabelecer uma triplicata dos resultados, tanto para a contagem celular (proliferação) quanto para as leituras de pH (FIGURA 6).

Os poços submetidos à contagem celular tiveram o seu conteúdo líquido de meio de cultivo totalmente aspirado e colocado em um frasco com capacidade para 15 ml SARSTEDT® estéril, para a análise de pH. Os outros poços inferiores A e C (FIGURA 6) da mesma placa tiveram seus conteúdos mantidos até o momento para análises do VK e do VA, para tecidos mineralizados e neste mesmo dia.

4.10.2 Contagem das triplicatas.

Foram analisadas quatro placas por vez, respectivamente uma para cada meio de cultivo e na data prevista.

A proliferação celular nos três poços superiores de cada placa de cultura manteve o formato de triplicata no estudo, assegurando maior confiabilidade aos resultados.

Para a análise de proliferação, ao conteúdo celular aderido de cada um dos três poços, após remoção do meio, adicionou-se um mililitro de tripsina 0,25% levando-os em seguida à incubadora e mantidos em umidade relativa de 95%, 37°C e 0,5% CO₂ durante 15 minutos.

Após este período, cada poço teve seu conteúdo de tripsina neutralizado pela adição de três mililitros de HBSS (Meio Modificado – LGC – Biotecnologia[®] Ind. Brasileira) a 37°C.

Em seguida cada poço teve seu conteúdo removido integralmente e depositado de forma individualizada em frascos estéreis SARSTEDT[®], com capacidade para 15 ml. Estes frascos foram submetidos à centrifugação em centrífuga ROTOFIX 32 A - Hettich-Zentrifugen, (Andreas Hettich GmbH & Co. KG- Tutlingen Germany), durante 10 minutos a 1500 rpm.

A contagem celular foi realizada de forma análoga àquela no início do experimento, para o estabelecimento da população celular e feita de acordo com as datas agendadas. Ao final da contagem as células foram descartadas.

4.10.3 Análise dos evidenciadores para tecidos mineralizados.

Os três poços inferiores das placas de cultura foram identificados com letras A, B e C, os quais foram submetidos aos corantes, marcadores ou evidenciadores específicos para identificar tecidos mineralizados. Os poços A e C foram submetidos aos corantes Von Kossa (VK) e Alizarina Vermelha (AV) respectivamente. O poço B, intermediário na cultura, foi reservado para o teste do “Cometa” no dia 28º (FIGURA 6).

Os poços corados foram analisados sob microscopia óptica com microscópio invertido AxioVert® - 40 C, Car Zeiss Germany, Câmera AxioCam,® ICc 1 Zeiss Germany e fotografados nas mesmas datas, utilizando-se o software AxioVison®, Germany.

Inicialmente e sob fluxo laminar, promoveu-se a coloração em VK para o poço A conforme a descrição a seguir.

De posse de uma pipeta de cinco mililitros estéril, foi removido o conteúdo líquido do poço A, sendo descartado em frasco com hipoclorito de sódio. Com outra pipeta de cinco mililitros estéril, lavou-se delicadamente com água destilada por duas vezes, aspirando-se em seguida e descartando o conteúdo em frasco com hipoclorito de sódio. Em seguida, foram adicionados dois mililitros de paraformaldeído a quatro por cento, deixando atuar por 30 minutos. Decorridos os 30 minutos, removeu-se o reagente, descartando-o no frasco com hipoclorito de sódio. Novamente se promoveu a lavagem por duas vezes com água destilada, aspirando-se em

seguida e descartando em frasco com hipoclorito de sódio. Na sequência, foram adicionados três mililitros de nitrato de prata a cinco por cento, deixando reagir por 20 minutos sob luz ultravioleta (UV). Decorridos os 20 minutos removeu-se o reagente, o qual também foi descartado no frasco com hipoclorito de sódio. Continuando, foram adicionados mais três mililitros de tiosulfato de sódio a cinco por cento, deixando reagir por cinco minutos. Após esse tempo, removeu-se o reagente descartando-o em hipoclorito de sódio.

Finalizando a etapa dependente da esterilidade, adicionamos dois mililitros de eosina a 0,1%, deixando reagir por três minutos. A partir daqui, os procedimentos foram executados fora do fluxo laminar. Decorridos os três minutos, removeu-se todo o reagente, descartando-o no frasco externo com hipoclorito de sódio, lavando-se em seguida com água destilada e aspiração delicada por duas vezes, descartando em frasco externo com hipoclorito de sódio. Deixou-se secar à temperatura ambiente e, após secos, os poços foram analisados sob microscopia óptica invertida.

Simultaneamente ao que se realizou no poço A com Von Kossa, no poço C (FIGURA 6) empregou-se o Alizarina Vermelha, também sob fluxo laminar. Foi necessário utilizar protetores luminosos nos poços com VA para que fossem protegidos da radiação UV durante a coloração VK. Da mesma maneira, foi removido todo o conteúdo líquido descartando-o em frasco com hipoclorito de sódio e dentro do fluxo laminar. Na sequência, também foi feita uma dupla lavagem com água destilada e aspiração consecutiva, descartando no frasco com hipoclorito de sódio. Em seguida, acrescentaram-se dois mililitros de formol a 10% deixando atuar por 15 minutos. Decorrido esse tempo, foi removido o reagente e descartado no frasco com hipoclorito de sódio. Fez-se lavagem e aspiração

delicadamente com água destilada por duas vezes e novamente foi realizado o descarte em frasco com hipoclorito de sódio.

A partir daqui os procedimentos poderiam ser feitos fora da câmara de fluxo laminar. Para tanto, foram adicionados três mililitros de vermelho de Alizarim a dois por cento, deixando reagir por 10 minutos e sob agitação moderada. Em seguida se removeu o reagente, descartando-o no frasco externo com hipoclorito de sódio. Finalizando, lavou-se e aspirou-se delicadamente com água destilada por duas vezes, descartando em frasco com hipoclorito de sódio até clarear. Deixamos secar à temperatura ambiente para que, em seguida, fosse analisado sob microscopia óptica.

4.10.4 Análise das Unidades formadoras de colônias (UFCs).

Nos 14° e 21° dias de cada experimento, foram analisadas as garrafas plásticas para cultura SARSTEDT® (Sarstedt Inc -Newton, NC – USA), modelo T-25, utilizadas para a análise das UFCs.

Quatro garrafas plásticas foram analisadas no 14° dia (uma para cada meio) e quatro garrafas plásticas foram analisadas no 21° dia.

As garrafas plásticas para cultura SARSTEDT® tiveram seus conteúdos descartados em solução de hipoclorito de sódio e, em seguida, foram submetidas à fixação com formol a 10%, em volume de três mililitros durante 20 minutos. Na sequência, foram mantidas em

incubadora com umidade relativa a 95%, 5% CO₂ e a 37°C. Após os 20 minutos, seu conteúdo foi desprezado em solução de hipoclorito de sódio e, sem que fossem lavadas, submetidas a três mililitros de corante Violeta Cresil a dois por cento, durante 60 minutos.

Decorridos os 60 minutos, foram lavadas novamente com água destilada por três vezes, até clarear. Foram mantidas à temperatura ambiente. Secas, tiveram sua área de cultura delimitada, demarcadas a cada centímetro quadrado.

As formações de colônias foram contadas sempre que visíveis, sem auxílio de qualquer instrumento óptico e com diâmetro mínimo de dois milímetros.

Partindo-se de um número inicial de $5,00 \times 10^4$ células por garrafa, que foi a população semeada nas respectivas garrafas plásticas de cultura no dia “zero”, obtém-se um porcentual final, relativo às formações de colônias, conforme fórmula:
$$\frac{n_{Cpr} \times 100}{n_0} = P_{col}$$

n_{Cpr} = Número de colônias visíveis à vista desarmada

n_0 = Número de células no dia “zero”, no início da cultura

P_{Col} = Razão das Porcentagens de crescimento das colônias

4.10.5 Testes do cometa.

No poço demarcado com a letra B (FIGURA 6) foi aplicado o teste do Cometa, o qual consistiu na análise comparativa em relação ao aparecimento e tamanho dos Cometas, observados no 28º dia de cultivo. Cada cultura (I, II, III e IV) foi manipulada isoladamente durante o processo de estabelecimento das lâminas para o teste do Cometa. Sob fluxo laminar, no 28º dia foi removido todo meio de cultivo de cada um dos poços B. Utilizando-se uma pipeta de cinco mililitros estéril promoveu-se a lavagem com solução salina tamponada de fosfato (PBS - Phosphate Bufered Solution) estéril com pH 7,4 e consecutiva aspiração cuidadosa, descartando o aspirado em solução de hipoclorito de sódio.

Em seguida, em cada um desses poços foram depositados 200 µl de tripsina a 0,25 % LCG e incubados por um minuto, até início do desprendimento das células do fundo da garrafa, o que foi controlado e observado ao microscópio óptico. No início do desprendimento celular, neutralizou-se imediatamente a tripsina com a adição de dois mililitros de PBS estéril a 37°C.

Sempre em campo escuro, promoveu-se homogeneização do conteúdo e a aspiração integral, transferindo-o integralmente para um frasco eppendorff SARSTEDT®, previamente identificado com o respectivo meio e o número do experimento. Ainda em campo escuro, a partir de uma solução de agarose Low-Melting (LM) Invitrogen® aquecida

a 37°C, 100 µl foram pipetados e depositados em um segundo frasco eppendorff SARSTEDT® (FIGURA 8).

De posse desses dois eppendorffs com conteúdos diferentes, um com células e outro com agarose LM, transferiu-se por meio de um micropipetador P-100 Gilson® (Gilson SAS, Villiers-le-Bel – France), 100 µl do frasco eppendorff que continha todas as células em solução PBS para o eppendorff com agarose LM. Obteve-se, desse modo, uma mistura agarose/células num volume total de 200 µl.

Antecipadamente foi preparada uma cobertura de agarose ultra-pura Invitrogen® sobre apenas uma das faces de uma lâmina para microscopia da marca PERFECTA® 26 x 76 milímetros (mm) lapidada, com extremidade fosca e espessura de 1,0 mm a 1,2 mm. Todas as lâminas foram previamente identificadas conforme sua utilização em cada um dos meios de cultivo e em número suficiente para cada experimento.

Da mesma maneira também foram reservadas lamínulas Glasstécnica® nas dimensões de 24x60 mm, as quais foram utilizadas como proteção para a lâmina com agarose. De posse de três lâminas, com o filme de agarose extra-pura numa das faces, transferiu-se um volume de 20 µl do frasco eppendorff, com os 200 µl da mistura células/agarose LM iniciais para a superfície de cada uma das três lâminas, de forma corrida e seguindo o longo eixo. Em seguida, mantendo-se campo escuro e formatando a triplicata do estudo, adaptou-se sobre cada uma dessas três lâminas uma lamínula protetora para que fossem, em seguida, submetidas a resfriamento por 30 minutos (4°C).

Decorridos os 30 minutos, foram removidas as lamínulas cuidadosamente para que, na sequência, fossem submetidas à imersão em solução de lise, *overnight* e 4°C, ao abrigo da luz.

Decorridas 24 horas do início da lise celular, as 12 lâminas, ou seja, as quatro séries de três lâminas, uma série para cada meio de cultivo, foram submetidas à eletroforese em unidade de imersão MAXIGEL ECO 2 mod. 341 000 - APELEX[®] (Z.I. de La Bonde – Massy –France), durante 30 minutos em ambiente escuro. Ao final da eletroforese, todas as lâminas foram neutralizadas imediatamente com solução para neutralização durante cinco minutos e lavadas em água destilada gelada. Foram então colocadas para secar por pelo menos 16 horas em temperatura ambiente e mantidas ao abrigo da luz.

Decorrido esse tempo, as 12 lâminas foram fixadas durante 15 minutos e lavadas por imersão em água destilada gelada por cinco minutos, para novamente serem colocadas para secar por um período de no mínimo 16 horas à temperatura ambiente.

Após esse período, as lâminas foram re-hidratadas com água destilada gelada, de modo que fosse iniciado o processo de impregnação com nitrato de prata.

No processo de colorização, revelação e fixação das lâminas sob campo escuro e em recipientes diferentes foram usadas as seguintes proporções em volume: 34% do revelador e 66% do fixador.

Após a revelação e fixação das lâminas promoveu-se a lavagem com água destilada gelada e, em seguida, foram imersas durante cinco minutos em solução de parada, para novamente se fazer uma segunda lavagem em

água destilada gelada por imersão e finalizando com secagem à temperatura ambiente (FIGURA 8).

Depois de secas, as leituras das lâminas foram feitas sob microscopia óptica invertida utilizando-se o “software” AxioVison[®] - Germany, observando os resultados em relação às fragmentações do DNA nas respectivas culturas. Estas observações tomaram por base o tamanho da cauda do cometa, relacionado ao tamanho da cabeça do cometa (núcleo). A intensidade do dano de DNA está relacionada ao tamanho da cauda do cometa. Uma cauda longa significa maior fragmentação ou maior dano e cauda curta ou ausência de cauda significam dano menor ou ausência de dano no DNA respectivamente. O comprimento destas fragmentações de DNA é classificado proporcionalmente ao tamanho da cabeça do cometa, em várias categorias e conforme vários autores GONTIJO & TICE (2003).

A classificação adotada neste estudo iniciou-se a partir da categoria “0”, na qual a cauda do cometa foi menor ou igual ao tamanho do diâmetro ou com formação de um halo; na categoria “1”, o comprimento da cauda foi superior a uma vez o tamanho do diâmetro e menor ou igual a duas vezes a cabeça; na categoria “2”, o comprimento da cauda foi maior que o tamanho do diâmetro da cabeça em duas vezes e menor ou igual a três vezes; na categoria “3”, o comprimento da cauda foi superior a 3 vezes o tamanho do diâmetro cabeça e inferior ou igual a 4 vezes o tamanho do diâmetro e, finalizando, na categoria 4, quando o comprimento da cauda foi superior a 4 vezes o tamanho do diâmetro da cabeça do cometa.

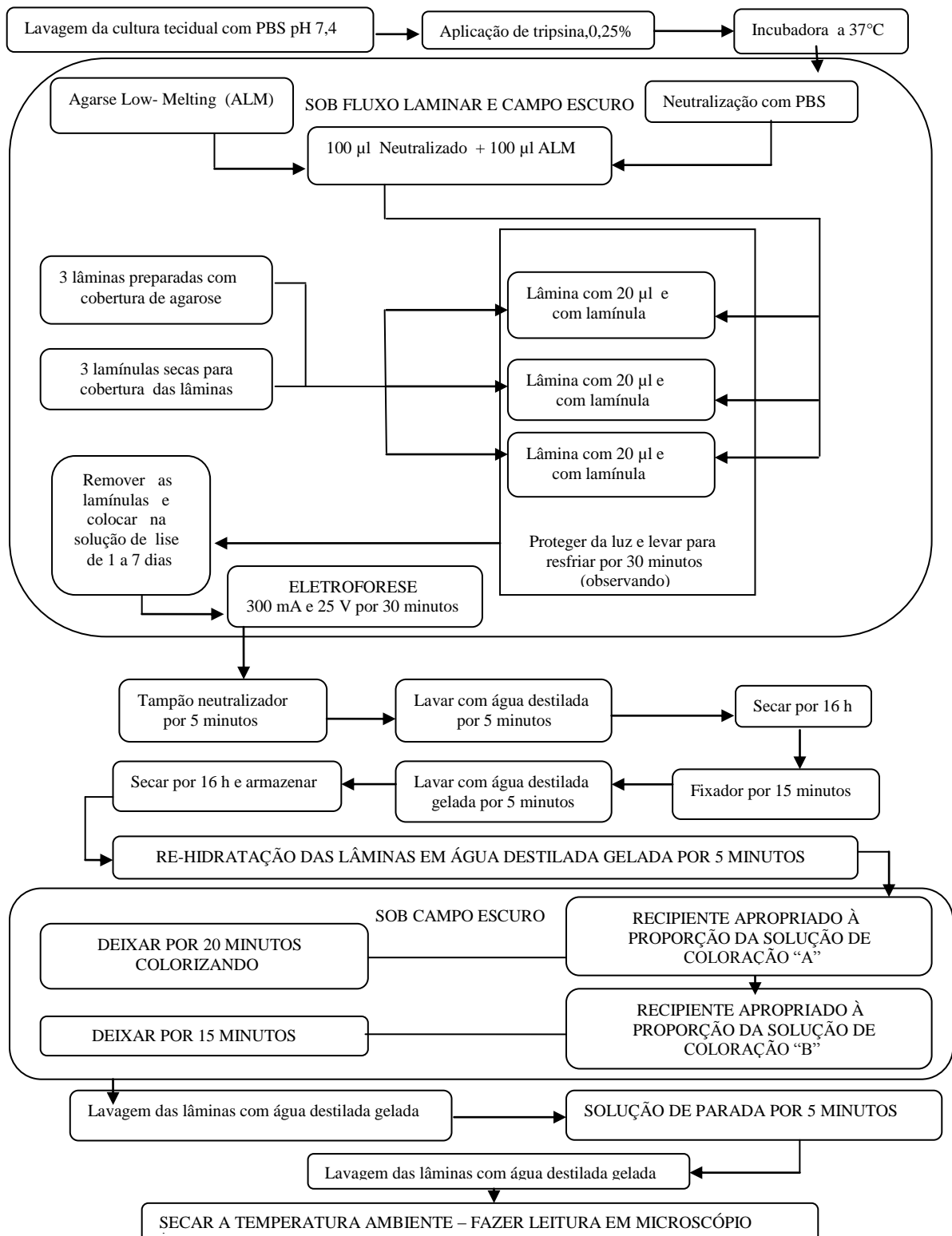


FIGURA 8. Fluxograma do Teste do Cometa; preparação das lâminas, eletroforese, fixador e descanso, re-hidratação e colorização para visualização em MOI (microscopia óptica invertida).

4.11 MÉTODO E ANÁLISE ESTATÍSTICA.

Para a análise dos resultados, aplicou-se a análise de variância de Friedman SIEGEL (2006). Foram comparados entre si as proliferações celulares das culturas de células-tronco de origem dentárias, os pH do meio de cultura de descarte das respectivas culturas e as UFCs, da seguinte maneira:

- Quatro triplicatas em cada semana de estudo, para cada um dos meios de cultura utilizados (meios I, II, III e IV).
- Médias das triplicatas entre as quatro semanas do estudo em cada meio de cultura.
- Médias de cada meio de cultura na respectiva semana.

A análise de variância de Friedman também foi aplicada para o cálculo estatístico referente às porcentagens de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) dos quatro meios de cultura deste estudo para o 14º e para o 21º dias de cada experimento (1º, 2º, 3º, 4º, e 5º experimentos).

Fixou-se em 0,05 ou 5% o nível de rejeição da hipótese de nulidade.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

Os resultados deste estudo estão apresentados sob a forma de tabelas seguidas por análise estatística, aplicando-se o teste de Variância de Friedman (Fr). As apresentações dessas tabelas se iniciam pelas proliferações celulares, seguidas das evoluções dos respectivos pHs, das Unidades Formadoras de Colônias, dos testes do Cometa.

As tabelas numeradas de um a quatro mostram os resultados da proliferação celular dos cinco experimentos nos meios I, II, III e IV nas formas de triplicatas.

TABELA 1. Triplicatas da proliferação celular no meio de cultivo - I (Isento de Suplemento – IS) na potência de 10^3 células, durante as quatro semanas (7°, 14°, 21° e 28° dias) do desenvolvimento de cada um dos cinco experimentos (1°, 2°, 3°, 4° e 5°).

N° Exp	Meio de cultivo I											
	7° dia			14° dia			21° dia			28° dia		
	1ª	2ª	3ª	1ª	2ª	3ª	1ª	2ª	3ª	1ª	2ª	3ª
(1°)	30	20	20	40	40	20	50	60	40	40	30	40
(2°)	40	50	40	80	50	60	80	70	60	120	100	40
(3°)	40	50	40	80	50	60	80	70	60	100	120	40
(4°)	30	20	20	20	30	40	50	50	60	90	70	90
(5°)	40	20	30	80	50	80	100	120	120	170	140	150
Mediana	40	20	30	80	50	60	80	70	60	100	100	40
Média	36	32	30	60	44	52	72	74	68	104	92	72
Desvio Padrão	5,0	16,4	10,0	28,2	8,9	22,8	21,6	27,0	30,3	47,2	43,2	48,6

Legenda : IS - Isento de Suplemento .

Análise de variância de Friedman

7° dia	14° dia	21° dia	28° dia
$X^2 r \text{ calc} = 1,6$ $p = 0,4493$	$X^2 r \text{ calc} = 2,1$ $p = 0,3499$	$X^2 r \text{ calc} = 0,7$ $p = 0,3400$	$X^2 r \text{ calc} = 2,8$ $p = 0,2400$

TABELA 2. Triplicatas da proliferação celular no meio de cultivo - II (Suplementado com – SHe¹/SFB²), na potência de 10³ células, durante as quatro semanas (7°, 14°, 21° e 28° dias) do desenvolvimento de cada um dos cinco experimentos (1°, 2°, 3°, 4° e 5°).

N°	Meio de cultivo II											
	7° dia			14° dia			21° dia			28° dia		
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	1 ^a	2 ^o	3 ^a	1 ^a	2 ^o	3 ^a	1 ^a	2 ^o	3 ^a
Exp												
(1°)	30	20	30	50	50	60	80	120	110	100	100	70
(2°)	50	40	50	90	90	60	100	100	80	110	120	90
(3°)	50	50	60	90	90	60	100	100	80	110	120	90
(4°)	40	30	30	30	60	50	50	80	70	120	150	130
(5°)	60	70	60	100	110	100	140	170	130	160	160	160
Mediana	50	40	50	90	90	60	100	100	80	110	120	90
Média	46	42	46	72	80	66	94	114	94	120	130	108
Desvio Padrão	11,4	19,2	15,1	30,3	24,4	19,4	32,8	34,3	25,0	23,4	24,4	36,3

Legenda : 1- Soro Heterólogo, 2- Soro Fetal Bovino Suplemento.

Análise de variância de Friedman

$\frac{7^\circ \text{ dia}}{X^2 \text{ r calc} = 1,2}$	$\frac{14^\circ \text{ dia}}{X^2 \text{ r calc} = 1,9}$	$\frac{21^\circ \text{ dia}}{X^2 \text{ r calc} = 5,2}$	$\frac{28^\circ \text{ dia}}{X^2 \text{ r calc} = 4,3}$
p = 0,5400	p = 0,3800	p = 0,0700	p = 0,1100

TABELA 3. Triplicatas da proliferação celular no meio de cultivo – III (Suplementado com – SHHo¹), na potência de 10³ células, durante as quatro semanas (7°, 14°, 21° e 28° dias) do desenvolvimento de cada um dos cinco experimentos (1°, 2°, 3°, 4° e 5°).

N°	Meio de cultivo III											
	7° dia			14° dia			21° dia			28° dia		
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	1 ^a	2 ^o	3 ^a	1 ^a	2 ^o	3 ^a	1 ^a	2 ^o	3 ^a
Exp												
(1°)	10	20	20	40	60	50	120	110	100	130	170	120
(2°)	50	50	60	80	90	70	100	100	90	110	140	100
(3°)	50	70	30	80	60	50	100	90	60	160	100	100
(4°)	50	40	40	60	60	30	90	100	80	160	160	150
(5°)	100	70	60	110	110	100	150	160	170	940	750	840
Mediana	50	50	40	80	60	50	100	100	90	160	160	120
Média	52	50	42	74	76	60	112	112	100	300	264	262
DesvioPadrão	31,9	21,2	17,8	26,0	23,0	26,4	23,8	27,7	41,8	358,3	273,0	323,7

Legenda : 1- Soro Humano Homólogo

Análise de variância de Friedman

$$\frac{7^\circ \text{ dia}}{X^2 r \text{ calc} = 0,3}$$

$$p = 0,8600$$

$$\frac{14^\circ \text{ dia}}{X^2 r \text{ calc} = 5,2}$$

$$p = 0,0700$$

$$\frac{21^\circ \text{ dia}}{X^2 r \text{ calc} = 2,7}$$

$$p = 0,2500$$

$$\frac{28^\circ \text{ dia}}{X^2 r \text{ calc} = 3,9}$$

$$p = 0,1400$$

TABELA 4. Triplicatas da proliferação celular no meio de cultivo – IV (Suplementado com SHAu¹), na potência de 10^3 células, durante as quatro semanas do (7°, 14°, 21° e 28° dias) desenvolvimento de cada um dos cinco experimentos (1°, 2°, 3°, 4°, 5°).

N°	Meio de cultivo IV											
	7° dia			14° dia			21° dia			28° dia		
Exp	1 ^a	2 ^a	3 ^a	1 ^a	2 ^o	3 ^a	1 ^a	2 ^o	3 ^a	1 ^a	2 ^o	3 ^a
(1°)	40	40	30	120	60	100	210	460	260	660	500	390
(2°)	60	50	60	80	70	90	110	120	110	130	130	100
(3°)	80	60	60	80	70	80	210	130	110	160	210	160
(4°)	50	60	50	100	80	80	130	140	120	180	200	190
(5°)	70	70	100	130	110	130	200	210	240	690	2690	1090
Mediana	60	60	60	100	70	90	200	140	120	180	210	190
Média	60	56	60	102	78	96	172	212	168	364	746	388
Desvio Padrão	15,8	11,4	25,4	22,8	19,2	20,7	48,1	143,0	75,2	284,6	1096	406

Legenda : 1- Soro Humano Autólogo.

Análise de variância de Friedman

7° dia	14° dia	21° dia	28° dia
$\overline{X^2 r \text{ calc}} = 0,3$	$\overline{X^2 r \text{ calc}} = 6,3$	$\overline{X^2 r \text{ calc}} = 2,7$	$\overline{X^2 r \text{ calc}} = 3,9$
p= 0,8600	p= 0,0400*	p= 0,2500	p= 0,1400

14° < 7° e 21°

Microfotografias das proliferações celulares nos quatro meios de cultivo

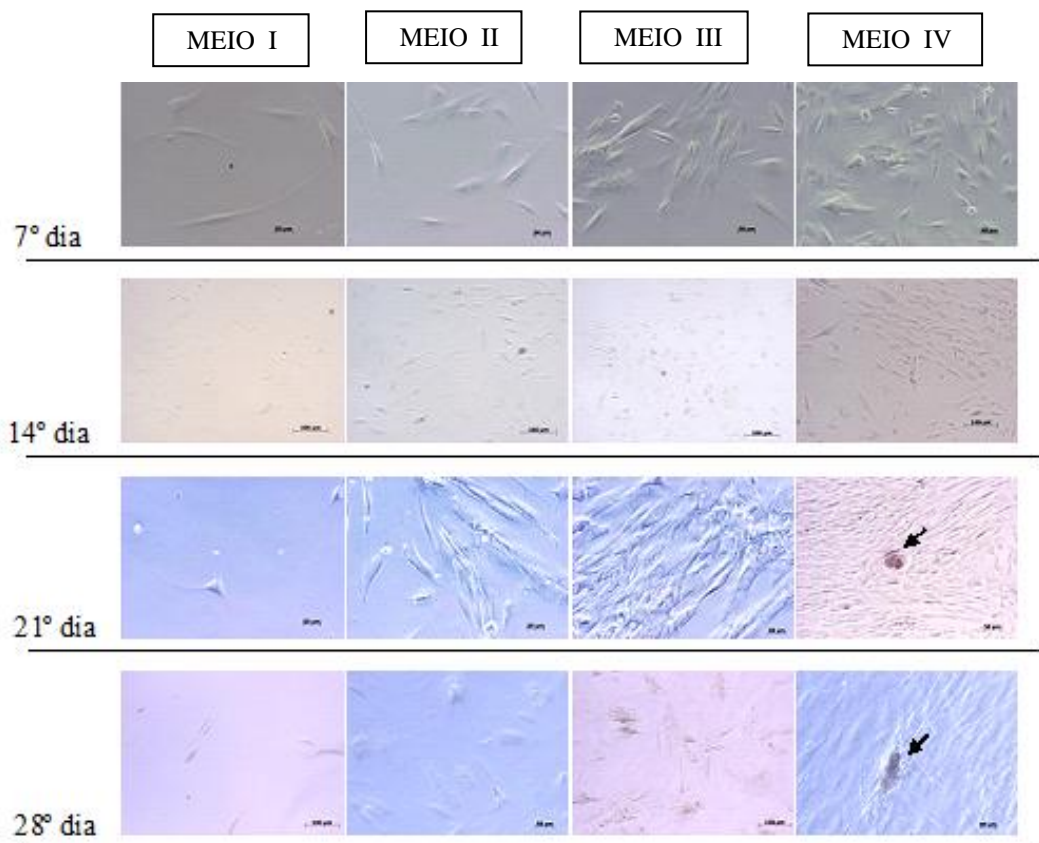


FIGURA 9

Microfotografias das proliferações celulares nos quatro meios de cultivo do estudo durante as 4 semanas de cultura, mostrando a ocorrência de nódulos no meio IV (setas).- notar a menor proliferação generalizada no meio I (IS). Proliferação celular no meio IV significativa em relação ao meio I.

As tabelas numeradas de cinco a oito mostram os resultados da proliferação celular dos cinco experimentos analisando-se as médias das triplicatas durante as quatro semanas de cada experimento. As tabelas se apresentam uma para cada meio de cultivo do estudo, seguidas da análise de Variância de Friedman (X^2_r calc).

TABELA 5. Médias das triplicatas das culturas primárias de células-tronco humanas de origem dentária em cultivo no meio I (IS)¹ aos 7°, 14°, 21° e 28° dias do experimento.

Exp	Meio de cultivo I			
	Média do 7° dia	Média do 14° dia	Média do 21° dia	Média do 28° dia
1°	26 666	33 333	50 000	36 666
2°	43 333	63 333	70 000	86 666
3°	43 333	63 333	70 000	86 666
4°	23 333	30 000	53 333	86 666
5°	30 000	70 000	113 333	153 333
Média	33 333	52 000	71 333	89 999
Mediana	30 000	63 333	70 000	86 667
Desvio Padrão	9 428	18 797	25 232	41 500

Legenda : 1- Isento de Suplemento.

Análise de variância de Friedman

X^2_r calc = 14,04

(p) = 0,0029*

7° dias < 21° e 28° dias

TABELA 6. Médias das triplicatas das culturas primárias de células-tronco humanas de origem dentária, em cultivo no meio II (SHe¹/SFB²) aos 7º, 14º, 21º e 28º dias do experimento.

Meio de cultivo II				
Exp	Média do 7º dia	Média do 14º dia	Média do 21º dia	Média do 28º dia
1º	26 666	53 333	103 333	90 000
2º	46 666	80 000	93 333	106 666
3º	53 333	80 000	93 333	106 666
4º	33 333	46 666	66 666	133 333
5º	63 333	103 333	146 666	160 000
Média	44 666	72 666	100 666	119 333
Mediana	46 666	80 000	93 333	106 666
Desvio Padrão	14 832	22 901	29 097	27 528

Legenda : 1- Soro Heterólogo, 2 - Soro Fetal Bovino.

Análise de variância de Friedman

X^2_r calc = 14,04

(p) = 0,0029*

7º dias < 21º e 28º dias

TABELA 7. Médias das triplicatas das culturas primárias de células-tronco de humanas origem dentária, em cultivo no meio III (SHHo¹) aos 7°, 14°, 21° e 28° dias do experimento.

Meio de cultivo III				
Exp	Média do 7° dia	Média do 14° dia	Média do 21° dia	Média do 28° dia
1°	16 666	50 000	110 000	140 000
2°	53 333	80 000	96 666	116 666
3°	50 000	63 333	83 333	120 000
4°	43 333	50 000	90 000	156 666
5°	73 333	106 666	160 000	843 333
Media	47 333	70 000	108 000	275 333
Mediana	50 000	63 333	96 666	140 000
Desvio Padrão	20 467	23 921	30 696	317 933

Legenda : 1- Soro Humano Homólogo.

Análise de variância de Friedman

$X^2_r \text{ calc} = 15,00$

(p) = 0,0018*

7° dias < 28° dias

TABELA 8. Médias das triplicatas das culturas primárias de células-tronco humanas de origem dentária, em cultivo no meio IV (SHAu¹) aos 7°, 14°, 21° e 28° dias do experimento.

Meio de cultivo IV				
Exp	<u>Média do 7° dia</u>	<u>Média do 14° dia</u>	<u>Média do 21° dia</u>	<u>Média do 28° dia</u>
1°	36 666	93 333	310 000	516 666
2°	56 666	80 000	113 333	120 000
3°	66 666	76 666	150 000	176 666
4°	53 333	86 666	130 000	186 666
5°	90 000	123 333	216 666	1 490 000
Média	60 666	91999	184 000	497 999
Mediana	56 666	86 666	150 000	186 666
Desvio Padrão	19 636	18 649	80 636	57 609

Legenda : 1- Soro Humano Autólogo.

Análise de variância de Friedman

$X^2_r \text{ calc} = 15,00$

(p) = 0,0018*

7° dias < 28° dias

As tabelas numeradas de nove a doze mostram a comparação das médias das triplicatas do crescimento ou proliferação celular dos cinco experimentos em cada meio de cultivo (I, II, III e IV) nos vários períodos estudados (7º ao 28º dias) seguidas de suas análises estatísticas, por meio da Análise de Variância de Friedman (X^2_r calc).

TABELA 9. Comparação entre as médias da proliferação celular das triplicatas em cultura primária de células-tronco humanas de origem dentária, em cultivo nos meios empregados no estudo no 7º dia.

Exp	Médias no 7º dia de cultura			
	Meio I	Meio II	Meio III	Meio IV
1º	26 666	26 666	16 666	36 666
2º	43 333	46 666	53 333	56 666
3º	43 333	53 333	50 000	66 666
4º	23 333	33 333	43 333	53 333
5º	30 000	63 333	73 333	90 000
Média	33 333	44 666	47 333	60 666
Mediana	30 000	46 666	50 000	56 666
Desvio Padrão	9 428	14 832	20 467	19 636

Análise de variância de Friedman

X^2_r calc = 11,22

(p) = 0,0106*

Meio I < Meio IV

TABELA 10. Comparação entre as médias da proliferação celular das triplicatas em cultura primária de células-tronco humanas de origem dentárias em cultivo nos meios empregados no estudo no 14º dia.

Exp	Médias no 14º dia de cultura			
	Meio I	Meio II	Meio III	Meio IV
1º	33 333	53 333	50 000	93 333
2º	63 333	80 000	80 000	80 000
3º	63 333	80 000	63 333	76 666
4º	30 000	46 666	50 000	86 666
5º	70 000	103 333	106 666	123 333
Média	52 000	72 666	70 000	92 000
Mediana	63 333	80 000	63 333	86 666
Desvio Padrão	18 797	22 901	23 921	18 649

Análise de variância de Friedman

$$X^2_r \text{ calc} = 9,78$$

$$(p) = 0,0205^*$$

Meio I < Meio IV

TABELA 11. Comparação entre as médias da proliferação celular das triplicatas em cultura primária de células-tronco humanas de origem dentária em cultivo nos meios empregados no estudo no 21º dia.

Exp	Médias no 21º dia de cultura			
	Meio I	Meio II	Meio III	Meio IV
1º	50 000	103 333	110 000	310 000
2º	70 000	93 333	96 666	113 333
3º	70 000	93 333	83 333	150 000
4º	53 333	66 666	90 000	130 000
5º	113 333	146 666	160 000	216 666
Média	71 333	100 666	108 000	184 000
Mediana	70 000	93 333	96 666	150 000
Desvio Padrão	25 232	29 097	30 696	80 636

Análise de variância de Friedman

$X^2_r \text{ calc} = 14,04$

$(p) = 0,0029^*$

Meio I < Meio IV

TABELA 12. Comparação entre as médias da proliferação celular das triplicatas em cultura primária de células-tronco humanas de origem dentária em cultivo nos meios empregados no estudo no 28º dia.

Exp	Médias no 28º dia de cultura			
	Meio I	Meio II	Meio III	Meio IV
1º	36 666	90 000	140 000	516 666
2º	86 666	106 666	116 666	120 000
3º	86 666	106 666	120 000	176 666
4º	86 666	133 333	156 666	186 666
5º	153 333	160 000	843 333	1 490 000
Média	89 999	119 333	275 333	498 000
Mediana	86 666	106 666	140 000	186 666
Desvio Padrão	41 500	27 528	317 933	576 082

Análise de variância de Friedman

$$X^2_r \text{ calc} = 15,00$$

$$(p) = 0,0018^*$$

Meio I < Meio IV

Gráficos das proliferações dos experimentos celulares nos 4 meios nos 7º e 14º dias

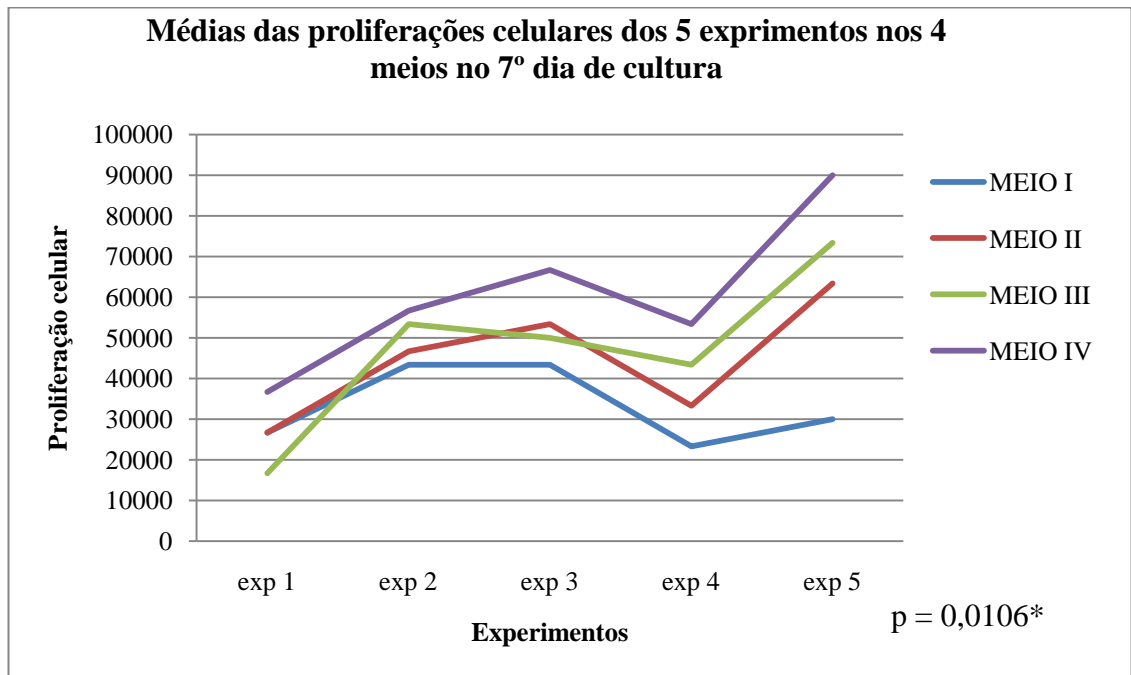


FIGURA 10 - Curvas de proliferação das culturas nos meios I, II, III e IV no 7º dia.

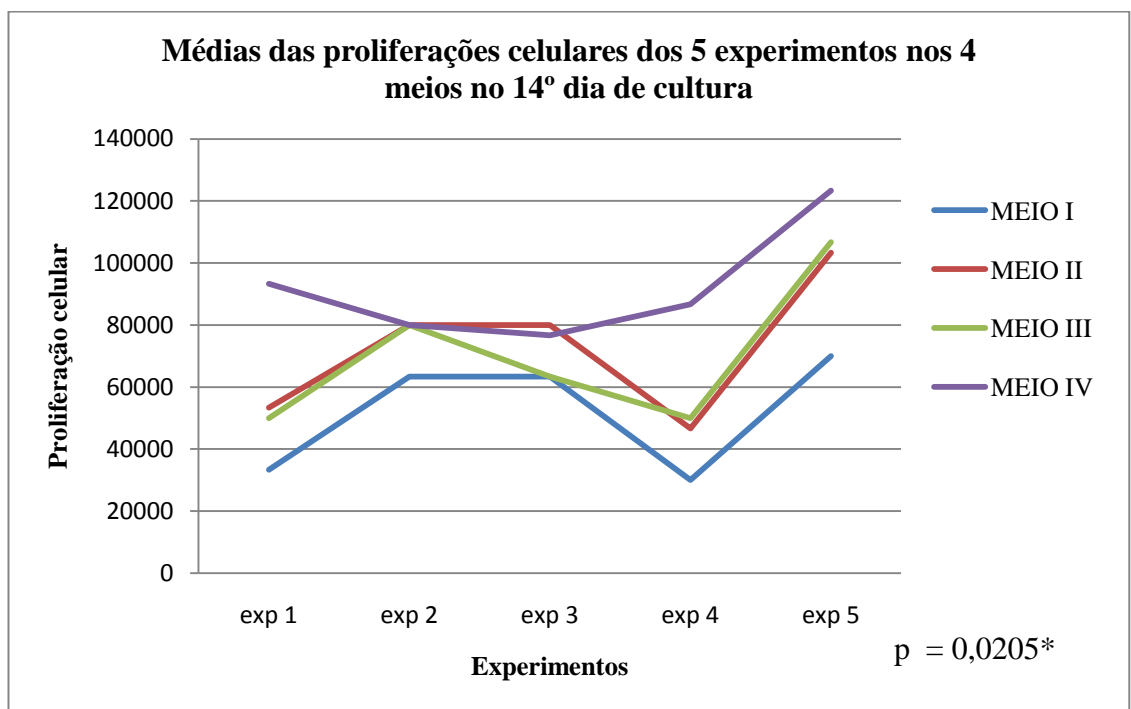


FIGURA 11 - Curvas de proliferação das culturas nos meios I, II, III e IV no 14º dia.

Gráficos das proliferações dos experimentos celulares nos 4 meios nos 21º e 28º dias

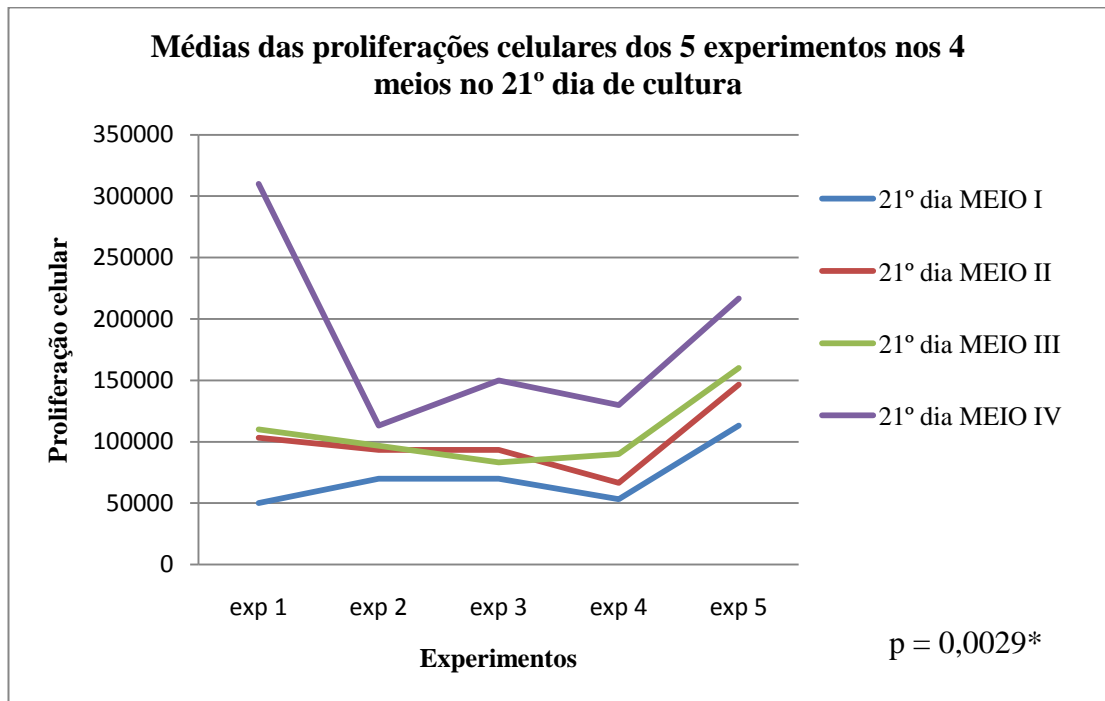


FIGURA 12 - Curvas de proliferação das culturas nos meios I, II, III e IV no 21º dia.

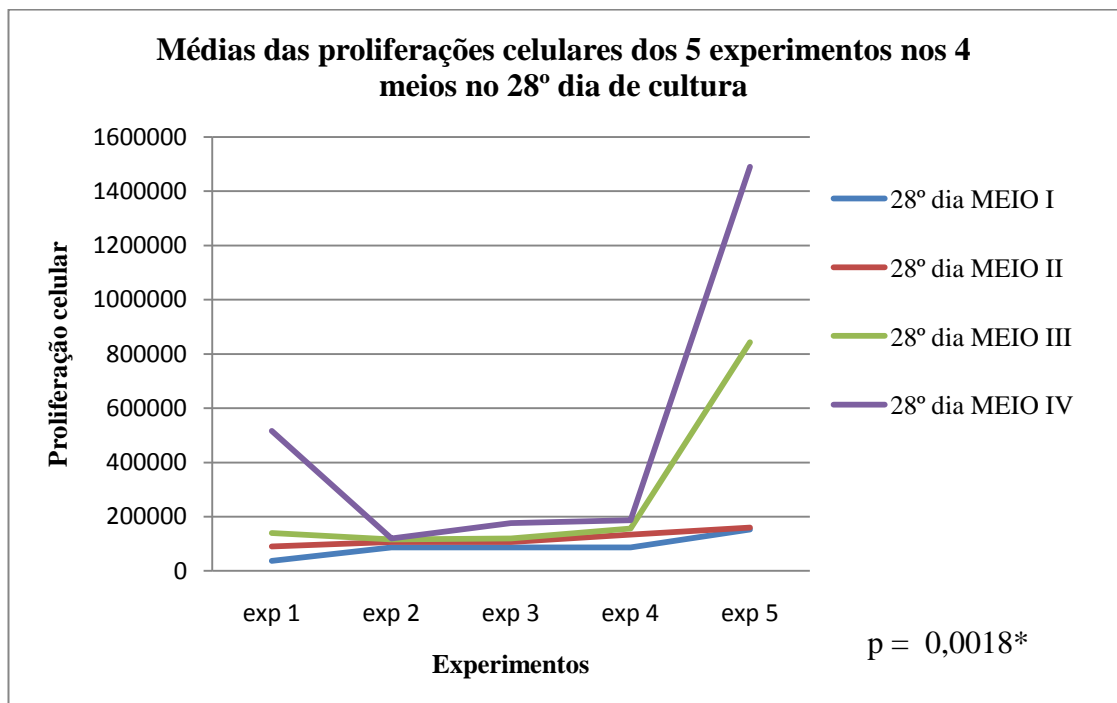


FIGURA 13 - Curvas de proliferação das culturas nos meios I, II, III e IV no 28º dia.

Gráfico das médias das proliferações celulares dos 5 meios de cultivo, durante as quatro semanas de cultura, para cada meio de do estudo : I (IS), II (SHe), III (SHHo) e IV (SHAu)

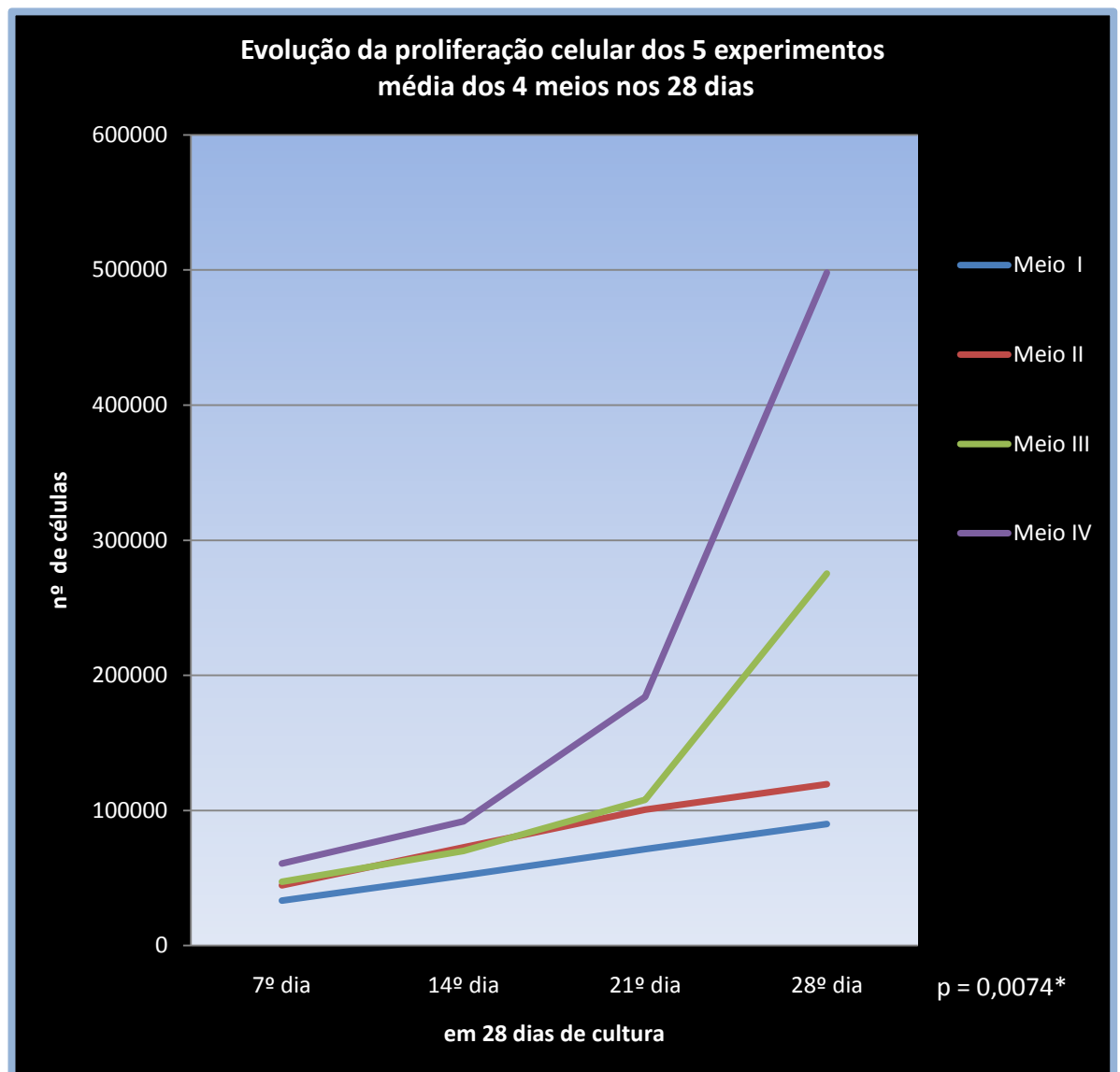


FIGURA 14 - Curvas das médias das proliferações, dos 5 experimentos, nos meios I, II, III e IV

As tabelas numeradas de 13 a 16 mostram os resultados das medidas em triplicatas dos pHs (pontos hidrogeniônicos) dos meios de cultivo, os quais foram extraídos no processo da contagem celular dos cinco experimentos durante as quatro semanas de cada experimento. As tabelas a seguir apresentam-se uma para cada meio de cultivo do estudo, juntamente com os testes estatísticos, aplicando-se a análise de Variância de Friedman (Fr).

TABELA 13. Triplicatas das leituras de pH¹ do meio de cultivo – I (IS²) de cultura primária de células-tronco humanas de origem dentária.

N° Exp	Meio de cultivo I											
	7° dia			14° dia			21° dia			28° dia		
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	1 ^a	2 ^o	3 ^a	1 ^a	2 ^o	3 ^a	1 ^a	2 ^o	3 ^a
1°	8,40	8,40	8,50	8,50	8,50	8,40	8,00	8,00	8,00	8,00	8,10	8,20
2°	8,70	8,70	8,70	8,40	8,30	8,30	9,00	8,90	8,90	9,10	9,10	9,10
3°	8,90	8,80	8,90	8,40	8,30	8,30	8,40	8,30	8,30	8,40	8,30	8,30
4°	8,60	8,60	8,60	8,80	8,90	8,90	8,80	8,90	8,90	8,80	8,90	8,90
5°	8,60	8,50	8,60	8,80	8,80	8,80	8,80	8,80	8,80	8,80	8,80	8,80
Mediana	8,60	8,60	8,60	8,50	8,50	8,40	8,80	8,80	8,80	8,80	8,80	8,80
Média	8,64	8,60	8,66	8,58	8,56	8,54	8,60	8,56	8,58	8,62	8,64	8,66
Desvio Padrão	0,18	0,15	0,15	0,20	0,27	0,28	0,40	0,39	0,40	0,42	0,42	0,39

Legenda : 1- ponto hidrogeniônico, 2- Isento de suplemento.

Análise de variância de Friedman

$\frac{7^\circ \text{ dia}}{x^2 = 2,1}$	$\frac{14^\circ \text{ dia}}{x^2 = 0,9}$	$\frac{21^\circ \text{ dia}}{x^2 = 0,9}$	$\frac{28^\circ \text{ dia}}{x^2 = 0,4}$
p = 0,3499	p = 0,6376	p = 0,6376	p = 0,8187

TABELA 14. Triplicatas das leituras de pH¹ do meio de cultivo – II (SHe²/SFB³) de cultura primária de células-tronco humanas de origem dentária.

N° Exp	Meio de cultivo II											
	7° dia			14° dia			21° dia			28° dia		
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	1 ^a	2 ^o	3 ^a	1 ^a	2 ^o	3 ^a	1 ^a	2 ^o	3 ^a
1°	8,20	8,40	8,30	8,50	8,50	8,40	7,80	7,90	7,90	8,20	8,20	8,20
2°	8,70	8,80	8,70	8,30	8,30	8,40	8,90	8,90	8,90	9,10	9,10	9,10
3°	9,00	9,10	9,00	8,30	8,30	8,40	8,30	8,30	8,40	8,30	8,30	8,40
4°	8,50	8,40	8,40	8,90	8,90	8,90	8,90	8,90	8,90	8,90	8,90	8,90
5°	8,60	8,60	8,60	8,80	8,70	8,70	8,80	8,80	8,80	8,80	8,80	8,70
Mediana	8,60	8,60	8,60	8,50	8,50	8,40	8,80	8,80	8,80	8,80	8,80	8,70
Média	8,60	8,66	8,60	8,56	8,54	8,56	8,54	8,56	8,58	8,66	8,66	8,66
Desvio Padrão	0,29	0,29	0,27	0,27	0,26	0,23	0,48	0,44	0,43	0,39	0,39	0,36

Legenda : 1- ponto hidrogeniônico, 2- Soro Heterólogo, 3- Soro Fetal Bovino.

Análise de variância de Friedman			
7° dia	14° dia	21° dia	28° dia
$x^2 = 1,9$	$x^2 = 0,3$	$x^2 = 0,9$	$x^2 = 0$
$p = 0,3867$	$p = 0,8607$	$p = 0,6376$	$p = 1,000$

TABELA 15. Triplicatas das leituras de pH¹ do meio de cultivo – III (SHHo²)
pH de cultura primária de células-tronco humanas de origem dentária.

N° Exp	Meio de cultivo III											
	7° dia			14° dia			21° dia			28° dia		
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	1 ^a	2 ^o	3 ^a	1 ^a	2 ^o	3 ^a	1 ^a	2 ^o	3 ^a
1°	8,40	8,40	8,50	8,40	8,40	8,50	7,90	7,90	8,00	8,20	8,20	8,30
2°	8,70	8,70	8,70	8,60	8,60	8,60	9,00	9,00	9,00	9,10	9,10	9,10
3°	9,00	8,90	9,00	8,50	8,50	8,40	8,60	8,70	8,90	8,40	8,40	8,40
4°	8,40	8,40	8,40	9,10	9,00	9,10	9,00	9,00	9,10	8,90	9,00	9,00
5°	8,70	8,70	8,70	8,70	8,80	8,80	8,80	8,70	8,80	8,70	8,80	8,70
Médiana	8,70	8,70	8,70	8,60	8,60	8,60	8,80	8,70	8,90	8,70	8,80	8,70
Media	8,64	8,62	8,66	8,66	8,66	8,68	8,66	8,66	8,76	8,66	8,7	8,72
Desvio Padrão	0,25	0,21	0,23	0,27	0,24	0,27	0,45	0,45	0,43	0,36	0,38	0,37

Legenda : 1- ponto hidrogeniônico, 2- Soro Humano Homólogo.

Análise de variância de Friedman

$\frac{7^\circ \text{ dia}}{x^2 = 0,9}$ $p = 0,6376$	$\frac{14^\circ \text{ dia}}{x^2 = 0,3}$ $p = 0,8607$	$\frac{21^\circ \text{ dia}}{x^2 = 3,7}$ $p = 0,1572$	$\frac{28^\circ \text{ dia}}{x^2 = 1,3}$ $p = 0,522$
--	---	---	--

TABELA 16. Triplicatas das leituras de pH¹ do meio de cultivo – IV (SHAu²) de cultura primária de células-tronco humanas de origem dentária.

Nº Exp	Meio de cultivo IV											
	7º dia			14º dia			21º dia			28º dia		
	1ª	2ª	3ª	1ª	2ª	3ª	1ª	2ª	3ª	1ª	2ª	3ª
1º	8,40	8,40	8,40	8,50	8,40	8,50	8,00	7,90	7,90	8,20	8,10	8,20
2º	8,80	8,80	8,80	8,60	8,60	8,60	9,00	9,00	9,00	9,10	9,10	9,10
3º	9,00	9,00	9,00	8,50	8,50	8,60	8,60	8,80	8,80	8,30	8,40	8,40
4º	8,30	8,40	8,40	9,10	9,10	9,00	9,00	9,10	9,00	9,00	8,90	9,00
5º	8,70	8,70	8,80	8,80	8,80	8,80	8,80	8,70	8,80	8,50	8,70	8,70
Mediana	8,7	8,7	8,8	8,6	8,6	8,6	8,8	8,8	8,8	8,5	8,7	8,7
Media	8,64	8,66	8,68	8,7	8,68	8,7	8,68	8,7	8,7	8,62	8,64	8,68
Desvio Padrão	0,28	0,26	0,26	0,25	0,27	0,20	0,41	0,47	0,45	0,40	0,39	0,38

Legenda : 1- ponto hidrogeniônico, 2 - Soro Humano.

Análise de variância de Friedman

7º dia	14º dia	21º dia	28º dia
$x^2 = 0,9$	$x^2 = 0,3$	$x^2 = 0$	$x^2 = 1,2$
$p = 0,6376$	$p = 0,8607$	$p = 1,000$	$p = 0,5488$

As tabelas numeradas de 17 a 20 mostram os resultados em triplicatas das médias das leituras dos pHs dos quatro tipos de meios de cultivo deste estudo, os quais foram extraídos no processo da contagem celular dos cinco experimentos. Complementando, apresentam-se as análises de Variância de Friedman (Fr X^2 r calc) durante as quatro semanas de cada experimento.

TABELA 17. Médias das leituras em triplicatas dos pHs¹ do meio de cultivo – I
pH (IS²) de cultura primária de células-tronco humanas de origem dentária.

Exp	Meio de cultivo I			
	Média do 7º dia	Média do 14º dia	Média do 21º dia	Média do 28º dia
1º	8,43	8,46	8,00	8,10
2º	8,70	8,33	8,93	9,10
3º	8,86	8,33	8,33	8,33
4º	8,60	8,86	8,86	8,86
5º	8,56	8,80	8,80	8,80
Média	8,63	8,55	8,58	8,65
Mediana	8,60	8,46	8,80	8,86
Desvio padrão	0,16	0,25	0,40	0,41

Legenda : 1- pontos Hidrogeniônico, 2- Isento de Suplemento.

Análise de variância de Friedman

$$x^2_r \text{ calc} = 1,14$$

$$p = 0,7674$$

TABELA 18. Médias das leituras em triplicatas dos pHs¹ do meio de cultivo – II (SHe² /SFB³) de cultura primária de células-tronco humanas de origem dentária.

Exp	Meio de cultivo II			
	Média do 7º dia	Média do 14º dia	Média do 21º dia	Média do 28º dia
1º	8,30	8,46	7,86	8,20
2º	8,76	8,33	8,90	9,10
3º	9,03	8,33	8,33	8,33
4º	8,43	8,90	8,90	8,90
5º	8,60	8,73	8,80	8,76
Média	8,62	8,55	8,56	8,65
Mediana	8,60	8,46	8,80	8,76
Desvio padrão	0,28	0,25	0,45	0,38

Legenda : 1- pontos Hidrogeniônicos, 2- Soro Heterólogo, 3- Soro Fetal Bovino.

Análise de variância de Friedman

$$X^2_r \text{ calc} = 0,60$$

$$p = 0,8964$$

TABELA 19. Médias das leituras em triplicatas dos pHs¹ do meio de cultivo – III (SHHo²) de cultura primária de células-tronco humanas de origem dentária.

Exp	Meio de cultivo III			
	Média do 7º dia	Média do 14º dia	Média do 21º dia	Média do 28º dia
1º	8,43	8,43	7,93	8,23
2º	8,70	8,60	9,00	9,10
3º	9,00	8,46	8,73	8,40
4º	8,40	9,06	9,03	9,00
5º	8,70	8,73	8,76	8,73
Media	8,64	8,65	8,70	8,70
Mediana	8,70	8,60	8,76	8,73
Desvio padrão	0,244	0,255	0,44	0,374

Legenda : 1- pontos Hidrogeniônicos, 2- Soro Humano

Análise de variância de Friedman

$$X^2_r \text{ calc} = 0,54$$

$$p = 0,91$$

TABELA 20. Médias das leituras em triplicatas dos pHs¹ do meio de cultivo – I V
pH (SHAu²) de cultura primária de células-tronco humanas de origem dentária.

Meio de cultivo IV				
Exp	Média do 7º dia	Média do 14º dia	Média do 21º dia	Média do 28º dia
1º	8,40	8,46	7,93	8,16
2º	8,80	8,60	9,00	9,10
3º	9,00	8,53	8,73	8,36
4º	8,36	9,06	9,03	8,96
5º	8,73	8,80	8,76	8,63
Média	8,66	8,70	8,70	8,64
Mediana	8,73	8,60	8,76	8,63
Desvio padrão	8,65	8,69	8,69	8,64

Legenda : 1- pontos Hidrogeniônicos, 2- Soro Humano Autólogo .

Análise de variância de Friedman

$$X^2_r \text{ calc} = 1,56$$

$$p = 0,6685$$

As tabelas 21 e 22 mostram as porcentagens de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs), que foram registradas nos quatro meios de cultivo do estudo, exclusivamente no 14º e 21º dias de cultura celular. Complementando, apresentam-se as análises de Variância de Friedman (X^2_r calc) de cada experimento.

TABELA 21. Percentual de Unidade Formadoras de Colônias (UFCs¹) efetivamente encontradas nos quatro meios do estudo no 14º dia de cultivo.

Exp	Porcentual de UFCs – 14º dia			
	% no Meio I	% no Meio II	% no Meio III	% no Meio IV
1º	7,60	16,80	18,60	31,40
2º	5,00	12,00	12,80	20,40
3º	6,00	10,00	15,20	19,40
4º	5,20	15,60	17,40	19,00
5º	6,00	17,00	19,00	20,00
Média	5,96	14,28	16,60	22,04
Mediana	6,00	15,60	17,40	20,00
Desvio padrão	1,02	3,12	2,58	5,26

Legenda : 1- Unidades formadoras de Colônias.

Análise de variância de Friedman

$$x^2_r \text{ calc} = 15,00$$

$$p^* = 0,0018$$

$$\text{Meio I} < \text{Meio IV}$$

TABELA 22. Percentual de Unidade Formadoras de Colônias (UFCs¹) efetivamente encontradas nos quatro meios do estudo no 21º dia de cultivo.

Exp	Porcentual de UFCs – 21º dia			
	% no Meio I	% no Meio II	% no Meio III	% no Meio IV
1º	8,80	19,40	20,20	30,60
2º	6,40	15,00	16,00	23,00
3º	8,80	15,00	17,80	21,60
4º	7,60	17,00	19,00	22,00
5º	8,60	18,40	20,40	30,00
\bar{M} édia	8,04	16,96	18,68	25,44
Mediana	8,60	17,00	19,00	23,00
Desvio padrão	1,04	1,98	1,82	4,47

Legenda : 1 - Unidades formadoras de Colônias.

Análise de variância de Friedman

$$X^2_r \text{ calc} = 15,00$$

$$p^* = 0,0018$$

$$\text{Meio I} < \text{Meio IV}$$

Fotografias das Unidades Formadoras de Colônias (UFCs)

GARRAFAS T-75

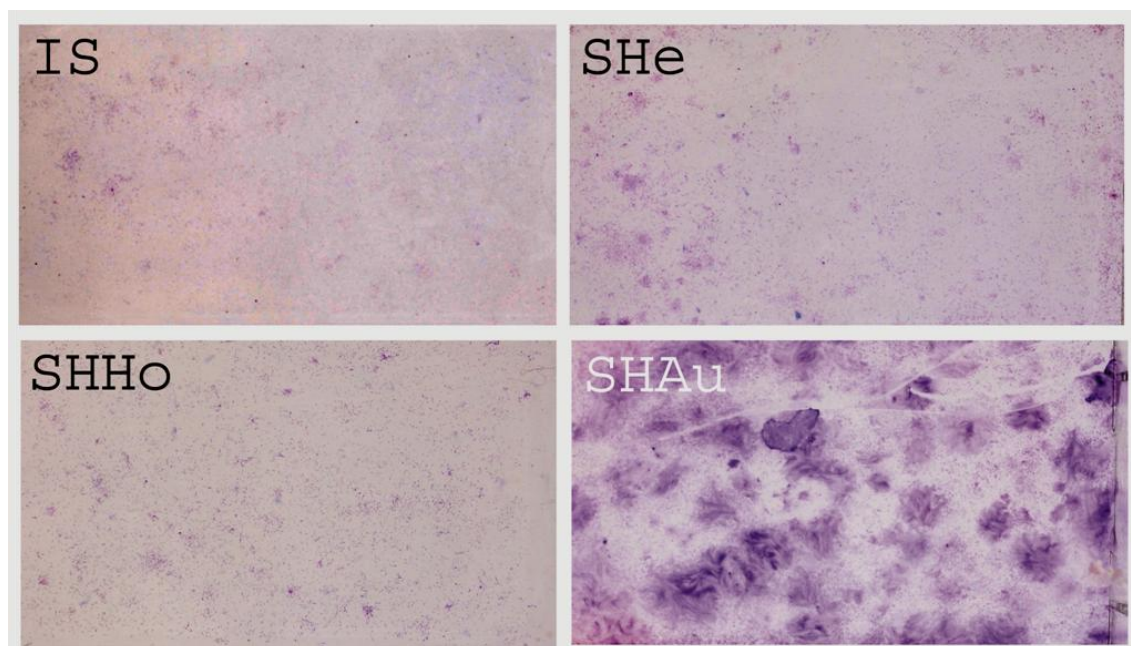


FIGURA 15 - Fotografias das superfícies cultivadas nas garrafas T-75 com 25 cm², notar a grande diferença entre as frequências de UFCs, principalmente entre o meio SHAu e o meio IS. As frequências de UFCs entre SHe (heterólogo) e SHHo (homólogo) são muito semelhantes.

Fotografias das Unidades Formadoras de Colônias (UFCs)

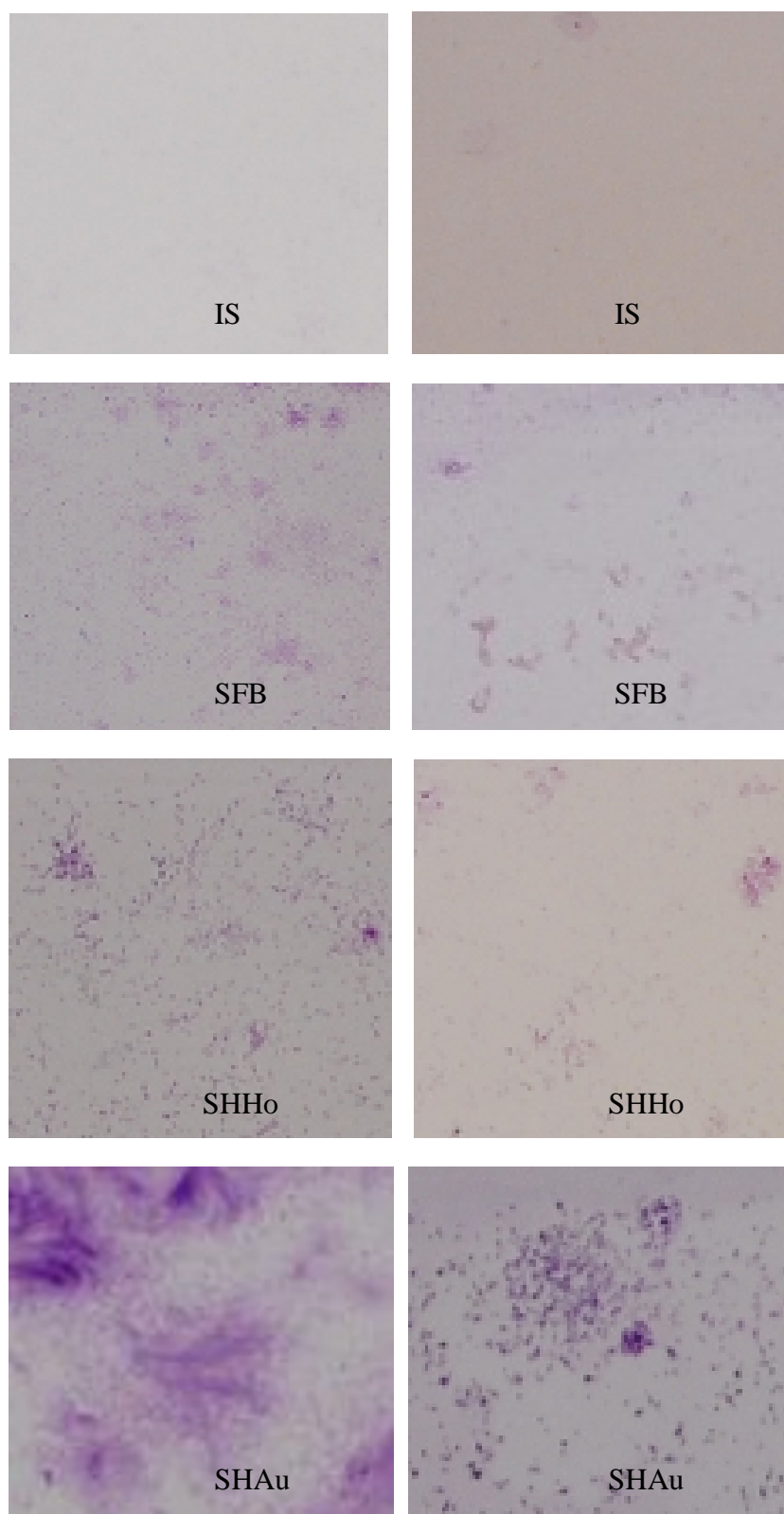


FIGURA 16- Fotografias das CFUs dos quatro meios do estudo. Meio IV (SHAu), colônias mais densas e volumosas. Meio II e III, SFB e SHHo, respectivamente, muito semelhantes. Meio I (IS), quase não aparecem colônias

As tabelas de 23 a 28 mostram os resultados encontrados após as aplicações dos testes do Cometa referentes ao poço B, nos cinco experimentos e nos quatro meios de cultivo do estudo no 28º dia.

TABELA 23. Presença de Cometas no 28º dia, em cada um dos 5 experimentos COMETAS nos 4 diferentes tipos de meios de cultivo.

Presença de Cometas														
Experimentos	Meios													
	I			II			III			IV				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4
SIM						5	(100%)			5	(100%)			
NÃO	5	(100%)											5	(100%)
TOTAL	5	(100%)			5	(100%)			5	(100%)			5	(100%)

TABELA 24. Presença de Cometas com classificação “0” no 28º dia, em cada COMETAS um dos 5 experimentos, nos 4 tipos diferentes de meios de cultivo.

Cometas com Classificação “ 0 ”																
Experimentos	Meios															
	I			II			III			IV						
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	
SIM														5	(100%)	
NÃO	5	(100%)			5	(100%)			5	(100%)						
TOTAL	5	(100%)			5	(100%)			5	(100%)					5	(100%)

TABELA 25. Presença de Cometas com classificação “1” no 28º dia, em cada COMETAS um dos 5 experimentos, nos 4 tipos diferentes de meios de cultivo.

Cometas com Classificação “ 1 ”																		
Experimentos	Meios																	
	I			II			III			IV								
	1	2	3	4	5		1	2	3	4	5		1	2	3	4	5	
SIM																		
NÃO	5						5						5					
TOTAL	5						5						5					

TABELA 26. Presença de Cometas com classificação “2” no 28º dia, em cada COMETAS um dos 5 experimentos, nos 4 tipos diferentes de meios de cultivo.

Cometas com Classificação “ 2 ”																		
Experimentos	Meios																	
	I			II			III			IV								
	1	2	3	4	5		1	2	3	4	5		1	2	3	4	5	
SIM							5						5					
NÃO	5																	
TOTAL	5						5						5					

TABELA 27. Presença de Cometas com classificação “3” no 28º dia, em cada COMETAS um dos 5 experimentos, nos 4 tipos diferentes de meios de cultivo.

Cometas com Classificação “3”																					
Meios																					
Experimentos	I				II				III				IV								
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	
SIM						5	(100%)				5	(100%)									
NÃO	5	(100%)																		5	(100%)
TOTAL	5	(100%)				5	(100%)				5	(100%)				5	(100%)				

TABELA 28. Presença de Cometas com classificação “4” no 28º dia, em COMETAS cada um dos 5 experimentos, nos 4 tipos diferentes de meios de cultivo.

Cometas com Classificação “4”																					
Meios																					
Experimentos	I				II				III				IV								
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	
SIM						5	(100%)				5	(100%)									
NÃO	5	(100%)																		5	(100%)
TOTAL	5	(100%)				5	(100%)				5	(100%)				5	(100%)				

Microfotografias do teste do Cometa, 2º experimento

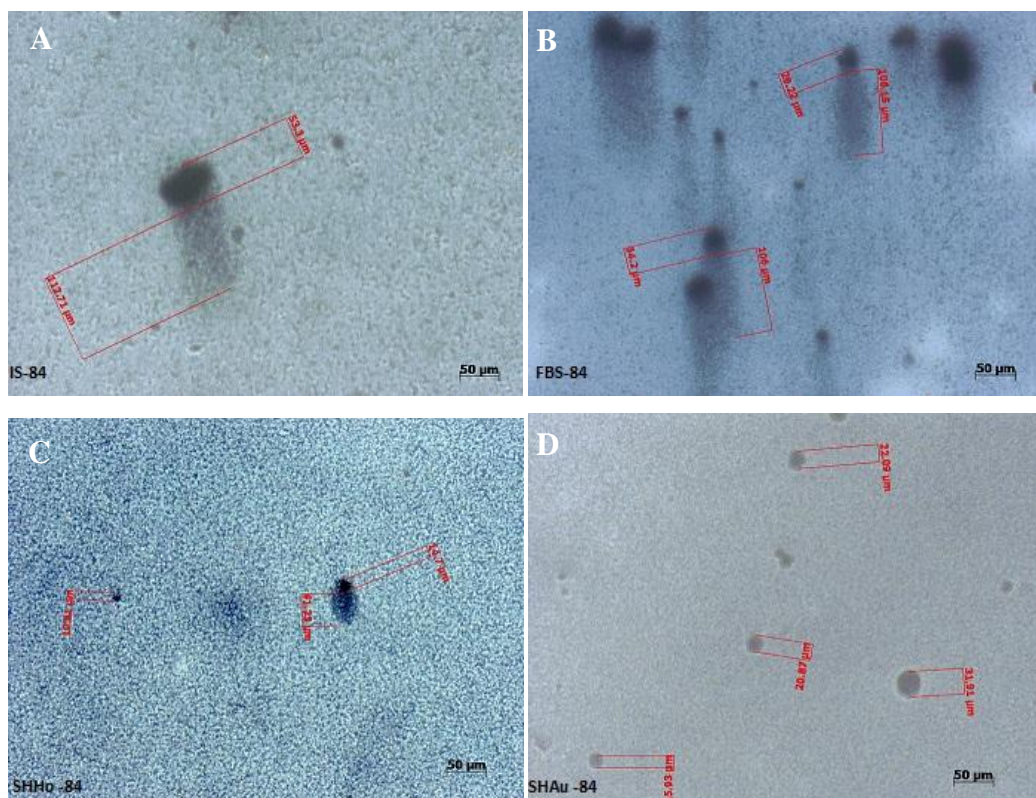


FIGURA 17 - Microfotografias do 28º dia, mostrando a ocorrência de Cometas nos 4 meios de cultivo. Em A, meio I, em B meio II, em C meio III e em D meio IV. Referente ao 2º Experimento do estudo.

Microfotografias do teste do Cometa 5º experimento

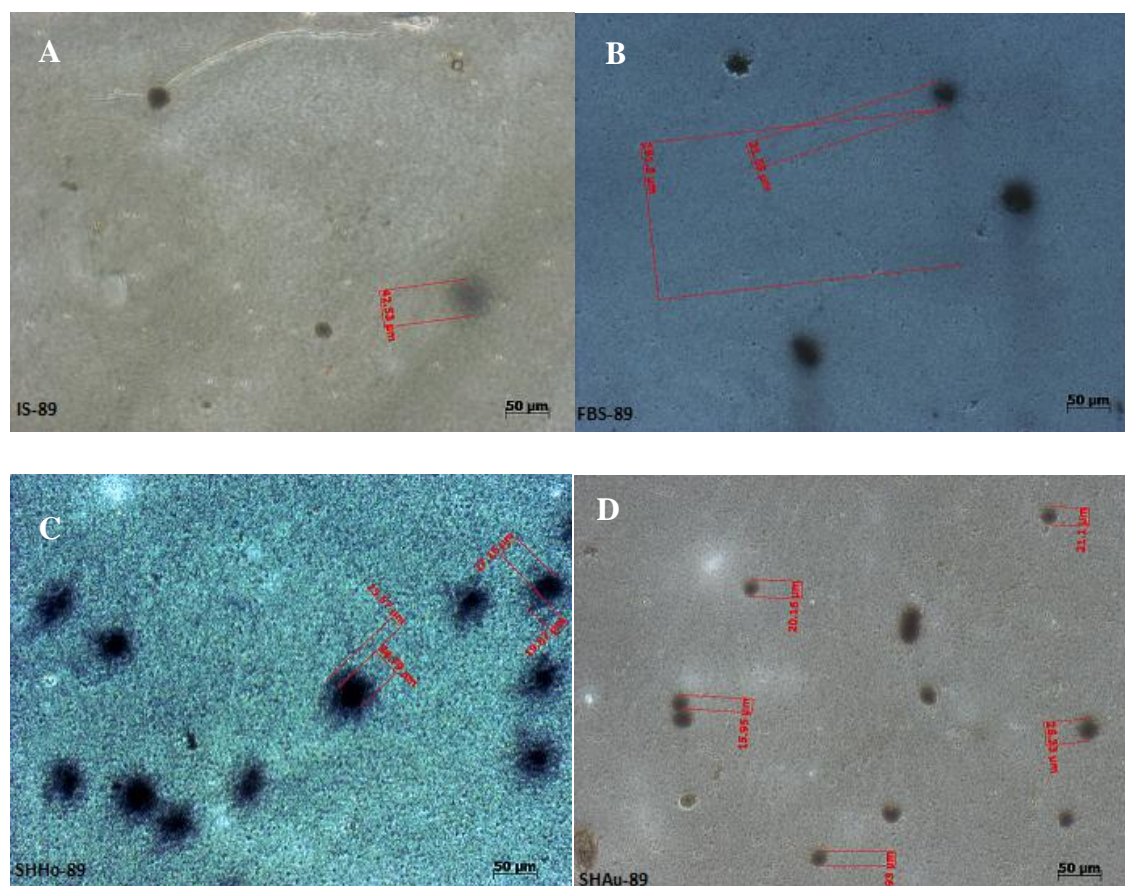


FIGURA 18 - Microfotografias do 28º dia, mostrando a ocorrência de Cometas nos 4 meios de cultivo. Em A, meio I, em B meio II, em C meio III e em D meio IV. Referente ao 5º Experimento do estudo.

Microfotografias de evidenciadores de mineralização
Von Kossa (VK)

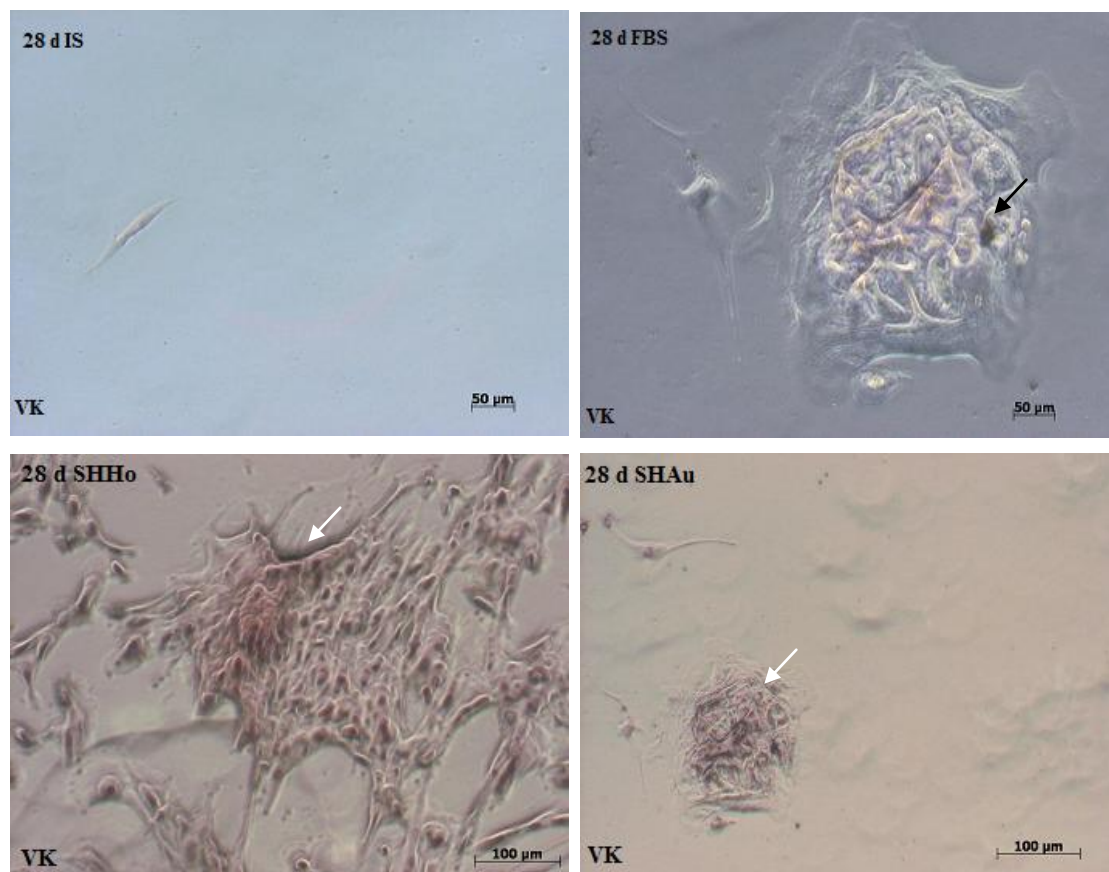


FIGURA 19 - Microfotografias do 28º dia, mostrando a ocorrência de *clusters*, nódulos de mineralizações nos 4 meios (setas), evidenciados pelo corante Von Kossa (VK) - notar a ausência de células no meio I (IS), utilizado como confirmação do (AV).

Microfotografias de evidenciadores de mineralização
Alizarina Vermelha (AV)

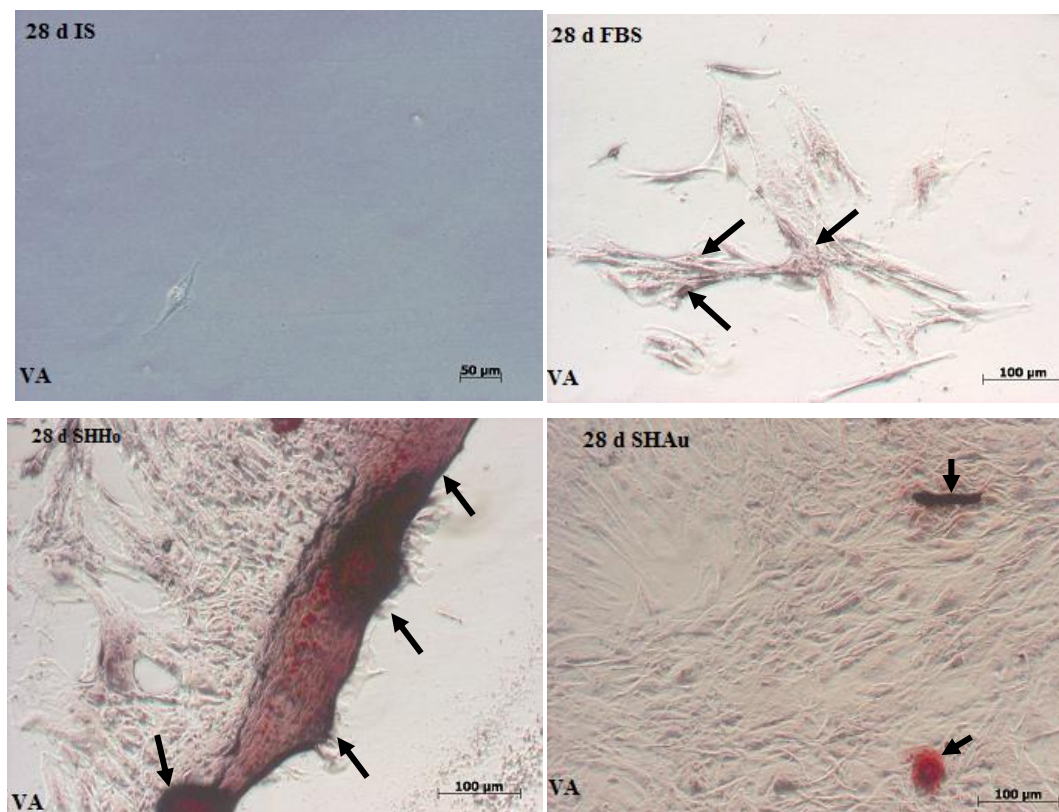


FIGURA 20 - Microfotografias do 28º dia, mostrando a ocorrência de *clusters*, nódulos de mineralizações nos 4 meios (setas), evidenciados pelo corante Alizarina Vermelha (AV) - notar a ausência de células no meio I (IS), utilizado como confirmação do (VK).

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Historicamente os pesquisadores têm-se esforçado para conseguir recuperar partes do organismo perdidas ou danificadas por traumas extensos (queimaduras, grandes perdas viscerais ou ósseas, lacerações por traumas corto-contusos), senilidade, malformações e falências orgânicas. São situações cuja regeneração tecidual mostra-se muitíssimo prejudicada e daí a importância de se utilizarem substitutos biológicos de uma forma rápida, segura, eficiente, funcional e atingindo inclusive objetivos estéticos, um problema discutido hoje, mas que há muito tempo autores como BISCEGLIE (1933), CHICK *et al.* (1975), BELL *et al.* (1981), BURKE *et al.* (1981) já comentaram. A partir do advento de novas tecnologias da ET como atualmente a conhecemos, relatadas nos trabalhos de LANGER & VACANTI (1993), KIM & VACANTI (1999), LANGER & VACANTI (1999), STOCK & VACANTI (2001), KAIGLER & MOONEY (2001) ficou posto que reparar tecidos perdidos em pacientes requer algum tipo de estrutura de reposição que seja readaptada à área afetada pela injúria, inclusive diminuindo os obstáculos de ordem financeira, funcional, temporal e imunológica. A relevância desse estudo reside na sua propositura em conseguir populações celulares sadias com ensaios *in vitro* por meio de ET, empregando meios de cultivo que promovam uma rápida proliferação celular sem o aparecimento de alterações de DNA, ajudando na construção de substitutos biológicos de uma forma rápida.

Analisando as observações de HUTMACHER *et al.* (2001), STOCK & VACANTI (2001), TUAN *et al.* (2002), PRESTON *et al.* (2003), HOVATA (2006) que apontaram em seus estudos possíveis problemas originários tanto do transplante heterógeno quanto da suplementação de

meios de cultivo com hemoderivado bovino, bem como os relatos de STUTE *et al.* (2004), BLUTEAU *et al.* (2008) a respeito da influência do microambiente diretamente na viabilidade, qualidade e quantidade celular e mediante os estudos de aplicabilidade clínica de JAQUIÉRY *et al.* (2005), SOTIROPOULOU *et al.* (2006), BEAUMONT *et al.* (2008) MENDONÇA COSTA *et al.* (2008) surgiram algumas perguntas que motivaram o presente estudo: será possível obter soro humano em quantidade suficiente para conseguir a proliferação celular das células-tronco dentárias humanas? Será que esse soro se comportará melhor em relação à proliferação celular do que o SFB? Uma vez que o SFB como suplemento pode introduzir agentes patógenos na cultura, o SFB pode promover alterações no DNA? Essas células, cultivadas em soro humano, teriam melhores chances de serem reimplantadas em humanos? Se isso for possível, estarão essas células sujeitas aos mesmos riscos e fenômenos que os implantes de células-tronco suplementadas com SFB? O soro humano se comportará da mesma maneira em outras culturas teciduais de células-tronco humanas? A viabilidade celular estará preservada e ou melhorada em relação às culturas com SFB? O soro humano autólogo difere quanto aos resultados do soro humano homólogo? Para suplementação nas culturas, conseguiremos quantidade suficiente de soro humano para expandir a mesma e até quantas passagens? E quanto ao pH, a cultura se alcaliniza ou acidifica? Qual o pH apropriado para esses meios de cultivo de células-tronco dentárias? Haverá diferenças de pH entre as culturas suplementadas com diferentes suplementos ou não?

Para responder essas perguntas, foi avaliada a proliferação de células-tronco adultas dentárias humanas em três condições de suplementação: com hemoderivados humanos autólogo (SHAu) e homólogo (SHHo), hemoderivado bovino heterólogo (SHe) e como

controle ausência de suplemento (IS). No entanto, estudos de HOVATTA (2006), SKOTTMAN & HOVATTA (2006), KAMIL *et al.* (2007) relatam a não utilização de soro de origem animal como suplemento na cultura de hESC, referindo-se à ausência do hemoderivado bovino. Os autores classificaram a suplementação a partir de meio condicionado 12 horas (CO), SR (*KnockOut Serum Replacement*) ou FGF- β como isenta de soro (*serum-free*). O atual estudo difere, nesse aspecto, porque considera como meio isento de soro qualquer tipo de suplemento que estimule a proliferação celular, excetuando-se a suplementação antimicrobiana. Em concordância com a literatura consultada, todas as culturas foram suplementadas com antimicrobianos (penicilina, estreptomicina, vancomicina, anfotericina B). À semelhança dos estudos realizados por KOCAOEMER *et al.* (2007) que analisaram a frequência das UFCs nas culturas suplementadas com hemoderivados humanos e MIURA *et al.* (2003), BAKOPOULOU *et al.* (2011), que verificaram comparativamente a morfologia celular e a ocorrência de diferenciação tecidual nas culturas de DPSCs respectivamente, o estudo avaliou a morfologia, a disposição e a velocidade de confluência das células, as unidades formadoras de colônias (UFCs) e as possíveis alterações de pH ocorridas durante a cultura. Também foi realizado um teste que avaliou o possível dano no material genético dessas células durante as culturas, o teste do cometa.

Para saber se de fato esse estudo manipulava células-tronco, durante o transcorrer da amostra e como procedimento de rotina, em culturas celulares do laboratório de Engenharia Tecidual as células foram caracterizadas por meio de citometria de fluxo. Tal análise permitiu que fosse identificada, por meio de marcadores celulares específicos, a presença de uma população mista com células epiteliais e mesenquimais além de células-tronco, concordando com estudos de GRONTHOs *et al.* (2000),

GRONTHOS *et al.* (2002), GRONTHOS *et al.* (2006). Os anticorpos monoclonais usados no FACs (Flow Amplified Citometer) para caracterização de células mesenquimais são conhecidos na literatura como CD90 e CD105 e os usados para células epiteliais são os CD166 e CD29, além do anticorpo para células-tronco chamado CD34, procedentes da BD Biosciences (San Jose, CA).

Corroborando os estudos de JO *et al.* (2007) quanto às dificuldades e desvantagens de se obter e fazer a coleta de células-tronco adultas, no que se refere às sequelas no sítio doador e à quantidade de células obtidas, o tecido de origem dentária neste estudo também se mostrou uma fonte promissora de células-tronco adultas. Isso porque também não houve risco adicional de injúria, pois se tratou de dentes com exodontia indicada, apesar das dificuldades encontradas na obtenção da amostra deste estudo.

Ao final da coleta de material, e comparativamente ao estudo de BAKOPOULOU *et al.* (2011) que também trabalhou com uma amostra reduzida de três doadores entre 16 e 18 anos, saudáveis, totalizando seis dentes terceiros molares em estágio inicial de desenvolvimento radicular, este estudo totalizou uma amostra com cinco culturas, de cinco doadores saudáveis, perfazendo 10 elementos dentários ao longo de 28 meses. Desta forma, para melhorar a qualidade da amostra no quesito fidelidade de resultados, os experimentos foram realizados em triplicatas, promovendo uma amplificação dos mesmos. Com metodologia semelhante à empregada nos estudos de MIURA *et al.* (2003), PARK *et al.* (2009), esse estudo também avaliou o potencial osteogênico e odontogênico das células-tronco de origem dentária por meio dos evidenciadores alizarina vermelha e Von Kossa.

A conformação do experimento em triplicatas, a partir das 80 placas de seis poços, conferiu ao estudo 480 culturas, sendo 120 poços de cultura para cada meio de cultivo estudado e 40 garrafas T-25 (25 cm²) utilizadas para as UFCs, sendo 10 para cada meio de cultura.

Semelhante ao estudo de XIA *et al.* (2011), os 240 poços destinados para análise da proliferação, confluência e morfologia celulares foram avaliados e fotografados semanalmente. FERREIRA *et al.* (2005), XIA *et al.* (2011) avaliaram seus resultados com a análise de variância. Os nossos resultados foram submetidos à análise de variância de Friedman, demonstrando não haver diferenças significantes, estabelecendo uma amostra homogênea como apresentado nas Tabelas 1, 2, 3 e 4. Por esta primeira análise, corroborando os resultados de KOCAOEMER *et al.* (2007), KURITA *et al.* (2008), XIA *et al.* (2011), que também suplementaram suas culturas com hemoderivados humanos, pôde-se notar a partir do décimo quarto dia nos meios suplementados com soro humano homólogo ou autólogo, um aumento da proliferação celular. Nas culturas suplementadas com hemoderivado bovino, somente a partir do vigésimo primeiro dia se observou o mesmo. Todas as culturas estabeleceram sua aderência celular, nos poços e nas garrafas, em torno da trigésima hora, com formação de pequenas colônias esparsas e bem definidas, que se firmaram a partir do sétimo dia de cultura. Inicialmente notou-se uma concentração celular na região central da área cultivada que se expandiu lentamente, ocupando uma área maior a partir décimo quarto dia, geralmente já duplicando a população inicial de $6,20 \times 10^4$ células. Por outro lado, e confirmando os relatos e comentários nos estudos de TUAN *et al.* (2003), STUTE *et al.* (2004), MARTIN *et al.* (2005), VATS *et al.* (2005), FERREIRA *et al.* (2005), tal fato não ocorreu nas culturas que estavam isentas de suplementação com hemoderivados.

A partir da homogeneidade da amostra, foram estabelecidas as médias das triplicatas de proliferação das culturas em cada meio e as mesmas foram analisadas semanalmente, submetendo-as também à análise de variância de Friedman. Confirmando a afirmação de MARTIN *et al.* (2005) a respeito da necessidade de suplementação dos meios de cultivo como garantia de recursos energéticos para a proliferação celular (Tabela 5) o meio de cultivo I nos cinco experimentos e nas quatro semanas obteve um resultado significativo, com $p = 0,0029^*$, demonstrando que em todos experimentos a proliferação celular evoluiu mais expressivamente a partir do vigésimo primeiro dia. Houve um atraso no progresso da cultura em relação aos meios suplementados, inclusive a morfologia celular mostrou redução de tamanho, em concordância com os achados de DOLATSHAHI-PIROUZ *et al.* (2011), apresentando células de aparência estrelada como as mesenquimais, mais delgadas, esparsas, com *clusters* diminuídos e sem formação nodular. O mesmo observou-se em relação às células de aparência cuboidal como as epiteliais, menores e bastante esparsas. Todas as culturas com IS (MeioI) até o vigésimo oitavo dia não atingiram uma confluência satisfatória, não conseguiram fechar todas as lacunas entre as colônias, com grandes áreas vazias.

À semelhança dos resultados e comentários de BAKOPOULOU *et al.* (2011), DOLATSHAHI-PIROUZ *et al.* (2011) relacionados aos meios de cultivos suplementados, em nosso estudo houve um resultado significativo para a proliferação celular, com $p = 0,0029^*$ no meio de cultivo II (Tabela 6). De modo diferente do meio I, os poços de cultura do meio II se apresentaram bem mais densamente povoados. Porém, a proliferação celular evoluiu mais expressivamente a partir do vigésimo primeiro dia, semelhante ao meio de cultivo I. As células com morfologia estrelada, semelhantes às mesenquimais, apresentaram-se mais esparsas,

com *clusters* formados por células maiores, tanto em volume quanto em número e com poucas formações nodulares, porém em maior número que o meio I, sendo mais evidentes no vigésimo oitavo dia. O mesmo ocorreu em relação às células de aparência cuboidal, semelhantes às células epiteliais, em formação concêntrica espiralada, com colônias em menor número, aparentando tecido em diferenciação, de cor acastanhada em algumas delas, semelhante ao tecido mineralizado. Todas as culturas com SHe (meio II), no 28º dia de cultura, atingiram confluência mais próxima do satisfatório, entre 50% e 70%, confluindo em alguns locais, mas ainda deixando lacunas entre algumas colônias, com muitas áreas vazias.

Em relação ao meio de cultivo III (SHHo), e por se tratar de meio suplementado com hemoderivado humano, os resultados estão sustentados pelos estudos tanto de autores que estudaram culturas de células-tronco de origem dentária, quanto culturas suplementadas com hemoderivados de origem bovina, tais como PITTENGER *et al.* (1999). HARADA *et al.* (1999) ZVAIFLER *et al.* (2000) STOCK & VACANTI (2001) KAIGLER & MOONEY (2001) BIANCO *et al.* (2001) GRONTHOS *et al.* (2002), YOUNG *et al.* (2002), DUAİLİBİ *et al.* (2004), GRONTHOS *et al.* (2006), DUAİLİBİ *et al.* (2008), bem como pelos autores que estudaram meios de cultivo com hemoderivados humanos como STUTE *et al.* (2004), FERREIRA *et al.* (2005), KOCAOEMER *et al.* (2007), KURITA *et al.* (2008), XIA *et al.* (2011). Todos analisaram as proliferações celulares e ou o potencial de diferenciação celular para tecidos mineralizados. Nesse estudo, o meio de cultivo III obteve uma proliferação celular com significância estatística e $p= 0,0018^*$. A diferença entre o sétimo dia de cultura e o vigésimo oitavo está expressa nitidamente na Tabela 7. A aparência celular se assemelhou às células do meio de cultivo II, as células não pareceram maiores em volume e em número, ocorrendo algumas

formações nodulares com aparentes formações acastanhadas, sugerindo tecido diferenciado mineralizado. Essas células em cultura se apresentaram em número ligeiramente maior que no meio II. Notadamente a partir do décimo quarto dia, percebeu-se que em todos os experimentos da amostra com meio de cultivo III houve um crescimento acentuado da população celular. Resumidamente, o meio de cultivo III não se diferiu muito em relação ao meio II; existiu sim uma ligeira melhora na aparência da cultura, mas que não pôde ser detectada estatisticamente. Comparando-se o meio de cultivo I com o meio de cultivo III, nitidamente houve uma melhora na proliferação e volume celulares na cultura, porém da mesma forma ainda não foi detectada na análise estatística.

De maneira análoga ao meio de cultivo III, o meio de cultivo IV (SHAu) suplementado com soro autólogo obteve como resultado da proliferação celular significância estatística $p=0,0018^*$ e, da mesma maneira, a diferença entre o sétimo dia de cultura e o vigésimo oitavo apresentou-se muito clara. A morfologia celular se assemelhou em muito ao meio de cultivo II e III, as células apresentaram-se maiores em volume e em número, com mais formações nodulares e as aparentes formações acastanhadas também em maior número, sugerindo tecido diferenciado. Houve um número de células bem maior que no meio II e III. À semelhança ao meio III, a partir do décimo quarto dia percebeu-se que em todos os experimentos da amostra com meio de cultivo IV houve um crescimento acentuado da população. As culturas do meio IV diferiram-se muito em relação ao meio II e III, de modo que houve uma grande melhora na aparência da cultura, de forma análoga aos estudos de DOLATSHAHI-PIROUZ *et al.* (2011), com indicativos morfológicos de células viáveis, porém nada que tenha sido detectado estatisticamente.

Quando analisamos as médias das triplicatas das culturas quanto ao seu desenvolvimento em cada semana do estudo (para cada experimento) comparativamente entre os meios de cultivo I, II, III e IV, conforme demonstrado nas tabelas numeradas de 9 a 12, evidenciou-se que em todas as semanas houve diferença significativa entre os meios I e IV, estabelecida logo de imediato no sétimo dia de cultura ($p = 0,0106^*$), repetindo-se no décimo quarto dia ($p = 0,0205^*$), no vigésimo primeiro dia ($p = 0,0029^*$) e no vigésimo oitavo dia ($p = 0,0018^*$). Comprovadamente, há um ganho na qualidade da cultura suplementada com soro humano em relação à cultura isenta de qualquer suplemento, corroborando a conclusão de KURITA *et al.* (2008). Interessante porém foi que, embora tenha ocorrido uma proliferação celular acentuadamente maior no meio de cultivo IV em relação ao meio II, a análise de variância de Friedman não resultou em significância.

Assim sendo, e à semelhança dos estudos de FERREIRA *et al.* (2005), KOCAOEMER *et al.* (2007), ficou claro que o suplemento hemoderivado humano, tanto homólogo quanto autólogo, pode ser empregado como suplemento nos meios de cultivo para células-tronco dentárias humanas. Também ficou evidente que o suplemento hemoderivado SHHo (meio III), embora com resultado não significativo, aproxima-se bastante daquele obtido em relação ao suplemento do meio II. Ainda assim, o meio III pode significar uma vantagem em relação às possíveis introduções de fatores imunológicos às culturas, doenças inter-espécies e imunorrejeições, como mencionado nos trabalhos de KAMIL *et al.* (2007), XIA *et al.* (2011). Desse modo também fica patente que ainda melhores são os resultados quando comparado o meio de cultivo IV em relação ao meio de cultivo II, demonstrado marcadamente por uma vertiginosa proliferação celular do meio IV já a partir do décimo quarto dia

dos experimentos. Apesar disso, na análise de variância de Friedman não se detectou qualquer significância estatística entre os meios de cultivo II e IV, mas no gráfico de linhas pode-se identificar uma clara tendência dessa proliferação celular, corroborando os resultados dos autores STUTE *et al.* (2004), FERREIRA *et al.* (2005), KOCAOEMER *et al.* (2007). Comprovou-se também a afirmativa de MARTIN *et al.* (2005) a respeito da necessidade de suplementação para culturas teciduais em ET, estatisticamente comprovada quando analisamos os meios I e IV no vigésimo oitavo dia de cultura ($p = 0,0018^*$).

As mensurações de pH das culturas foram feitas semanalmente, nos mesmos dias em que houve a contagem da proliferação celular. Toda vez que se contou a proliferação celular removeu-se o meio de cultivo também na forma de triplicata e fez-se a leitura dos mesmos, estabelecendo-se em seguida uma média dessa triplicata. As culturas tinham seus meios trocados a cada três dias em média, mas só se faziam leituras de pH nas datas das contagens de proliferação celular.

Nos meios de cultivo, geralmente se acrescenta um agente identificador de pH, o vermelho fenol. A tonalidade do vermelho fenol se altera sempre que se altera o pH, o qual fora previamente ajustado. Portanto, se a tonalidade do meio de cultivo se torna mais clara (vermelho-alaranjado) presume-se que o meio se alcalinizou. O inverso é verdadeiro, ou seja, se o meio de cultivo apresenta uma cor de vermelho-roxeadado é lícito acreditar que o meio tenha se acidificado. No entanto, tal fato depende inclusive da acuidade visual, sendo assim passível de controvérsias.

Não foram encontrados na literatura estudos relativos às alterações de pH durante a proliferação celular de células-tronco de origem dentária ou de qualquer outra cultura tecidual.

Sabidamente, a distribuição dos constituintes de cada meio de cultivo nas proporções estabelecidas apresentam um pH próximo do fisiológico (7,4) admitindo-se uma pequena variação de dois pontos para cima ou para baixo (7,2 a 7,6). Essas leituras foram realizadas sempre no ato da produção de cada meio de cultivo e em cada experimento. As correções seriam feitas, quando necessário, para esses parâmetros, o que não ocorreu em nenhum momento. Porém, durante o armazenamento e ao longo de cada experimento não se corrigiu esse pH, acreditando-se que ele estivesse mantido pela simples observação de sua tonalidade, e também para evitar a introdução qualquer agente estranho.

Interessante que, durante a cultura, observadas as tonalidades de cada meio de cultivo nos três dias que antecederam a contagem celular, houve uma ligeira alteração na cor do meio de cultivo para mais clara que o original e, vez por outra, a cor estava mantida. Pensou-se que os pHs pudessem estar baixando e que as células nessa condição estivessem sob estresse fisiológico. No entanto, em todas as leituras de pH e de uma forma muito próxima, todas as culturas alcalinizaram. Os valores obtidos dos pHs, assim como as suas médias, quando submetidos à análise de variância de Friedman não resultaram em significância estatística. Demonstrou-se então que, num primeiro momento, para esse estudo, o pH alcalinado não influenciou no desenvolvimento das culturas. Muito provavelmente isso se deveu à troca de meio de cultivo que ocorreu a cada três dias, como nos estudos de KAMIL *et al.* (2007), LECHGUER *et al.* (2009), BAKOPOULOU *et al.* (2011). Embora tenha ocorrido alcalinização do meio de cultivo e não havendo confluência total nas culturas, as células não entraram em estresse fisiológico, tanto pela troca do meio de cultivo rigorosamente controlada a cada três dias, quanto pela ausência de confluência superior a 70%, não liberando citocinas celulares no meio de

cultura. Mas não foram encontrados elementos na literatura que justificassem essa ocorrência, necessitando-se dar continuidade a estudos semelhantes para se responder apropriadamente esse questionamento.

Em estudos anteriores, os autores HARADA *et al.* (1999), BIANCO *et al.* (2001), GRONTHOS *et al.* (2002), DUAİLİBİ *et al.* (2004), GRONTHOS *et al.* (2006), DUAİLİBİ *et al.* (2011) já demonstraram que, nas culturas mistas ecto-mesenquimais derivadas de tecidos não mineralizados de dentes terceiros molares em estágios iniciais de desenvolvimento, havia a presença de células-tronco adultas de origem dentária. Essas foram caracterizadas tanto por marcadores específicos para células-tronco dentárias como por marcadores específicos para a determinação de estruturas mineralizadas semelhantes a esmalte (amelogenin), dentina (dental Sialo Protein) e ligamento periodontal (Periostin).

Posto que já fora confirmada a presença de células-tronco nesse tipo de cultura, durante os nossos experimentos no décimo quarto e vigésimo primeiro dias, a nossa intenção foi analisar comparativamente a frequência de ocorrência das UFCs, submetendo o resultado à análise de variância de Friedman. À semelhança dos estudos de ZVAIFLER *et al.* (2000), também observamos que as células-tronco proliferaram logaritmicamente, concentricamente, de forma espiralada, formando núcleos isolados, ampliando-se até se encontrarem e atingirem a confluência. Dentre as variáveis citadas pelo autor tais como a vitalidade celular, o suplemento energético, a periodicidade no intervalo de trocas de meios de cultivo, a qualidade do plástico da garrafa de cultura, a aderência celular à superfície de plástico, o pH dos meios de cultivo, no presente estudo a suplementação do meio do cultivo foi a mais importante.

À semelhança dos relatos de KOCAOEMER *et al.* (2007) em estudos de UFCs, nos quais calcularam a frequência de formação de colônias na razão de 1×10^3 , nosso estudo semeou 5×10^5 células em cada garrafa de cultura T-25, com uma área útil de 25 cm^2 . Notadamente, nos meios de cultura I de todos os experimentos, as culturas não proliferaram satisfatoriamente. Tal fato também ocorreu nos poços de cultura, com poucas formações de colônias, células pequenas e muito esparsas, notadas de maneira uniforme tanto no décimo quarto dia quanto no vigésimo primeiro dia. Já nos experimentos suplementados, houve de fato a formação de colônias de forma bastante evidente, diferindo-se em quantidade e qualidade entre o décimo quarto dia de cultura e vigésimo primeiro dia dentro do mesmo meio de cultivo e também em relação a cada experimento, semelhantes às colônias no estudo de KOCAOEMER *et al.* (2007), que relataram melhora quantitativa (porque houve maior formação em número de colônias) e qualitativa (porque as células aparentemente estavam mais nítidas e em maior número por colônia) ou seja, colônias maiores. Inclusive esses achados foram marcantes quando se comparou o meio de cultivo IV em relação ao meio de cultivo II, denotando a superioridade das UFCs no meio IV. Entre os meios de cultivo II e III, esses achados não foram tão evidentes, ocorrendo uma aparente semelhança nas UFCs. Os valores referentes às formações de colônias foram submetidos à análise de variância de Friedman (Tabelas 21 e 22). Os resultados foram diferenças significantes em ambos os períodos analisados ou seja, décimo quarto e vigésimo primeiro dias de culturas. Na tabela 21 demonstramos uma significância de $0,0018^*$ (p) quando comparamos o meio IV e o meio I, não se evidenciando diferença significativa entre os meios heterólogo (II) e homólogo (III), heterólogo (II) e autólogo (IV), homólogo (III) e autólogo (IV). O mesmo ocorre ao analisarmos a Tabela

22 para o vigésimo primeiro dia de cultura, também com uma significância de 0,0018* (p) na relação entre os meios isento de suplemento (I) e autólogo (IV). O resultado foi insignificante quanto às outras comparações. Esses resultados referentes às UFCs são compatíveis com nossos resultados na proliferação celular desse estudo, evidenciando uma cultura celular no meio IV qualitativamente e quantitativamente superior em relação aos outros meios.

Os corantes alizarina vermelha e Von Kossa foram empregados como evidenciadores para tecidos mineralizados. O corante Von Kossa, empregado como no estudo de PARK *et al.* (2009), pigmenta a célula em diferenciação para tecido mineralizado com um tom enegrecido, evidenciado por manchas escuras ou pretas. Isso ocorre por conta da precipitação da prata do agente nitrato de prata a 5% empregado na técnica de impregnação. A alizarina vermelha, como mais recentemente empregado no estudo de BAKOPOULOU *et al.* (2011), pigmenta de vermelho o mesmo tecido em diferenciação por meio da impregnação com eosina a 0,1%. Essas impregnações foram analisadas pelo método comparativo e como confirmação de resultados dentro de um mesmo meio de cultivo. Nos poços A e C de cada experimento foram empregados respectivamente esses corantes, totalizando 160 poços analisados nos cinco experimentos. Como resultado, onde houve formações nodulares (o que ocorreu praticamente a partir do vigésimo primeiro dia de estudo em cada experimento dentro de cada meio de cultivo) e deu-se a pigmentação desses *clusters*, confirmando-se uma maior tendência em diferenciação celular nos meios de cultivo IV do que nos meios de cultivo III e II. Pigmentações nos meios II e III mostraram-se semelhantes, tanto em número quanto em tamanho, com ocorrências mais remotas. Esses resultados estão de acordo com os de PARK *et al.* (2009), BAKOPOULOU *et al.* (2011), que

confirmaram nódulos de mineralização em suas culturas de origem dentária nos meios de cultura suplementados. Já no meio I, pela própria proliferação celular reduzida e praticamente ausência de formações de *clusters*, não se evidenciou a presença de tecidos diferenciados.

Um dos objetivos de se ter empregado o teste do cometa neste estudo foi o de se identificar possíveis danos no material genético, mais precisamente nos núcleos celulares dessas culturas, de forma relativamente barata, simples, sem o auxílio de técnicas e equipamentos sofisticados, com resultados relativamente rápidos e de fácil leitura. Embora trabalhoso, o teste do cometa emprega materiais acessíveis, não oferecendo uma única técnica de impregnação por corantes. O corante utilizando nesta técnica foi o nitrato de prata em virtude de sua baixa toxicidade, obtendo-se imagens que variaram entre as cores cinza e preto.

O teste baseou-se praticamente em analisar o estresse a que as células-tronco estiveram submetidas durante o maior período de cultivo (28 dias), à semelhança dos estudos de AUGELLO *et al.* (2010), que considerou que as células não estavam em seu ambiente natural. Analisou-se também se os meios de cultivo do estudo proporcionaram melhores ou piores condições de viabilidade dessas células, observando-se rompimentos das cadeias de DNA.

Esses testes foram feitos em campo escuro, pois as células recém-colhidas para o procedimento seriam submetidas à ação de um agente estressante contido na solução de lise, o qual rompe as cadeias de DNA celulares. Para tanto, a luz poderia influenciar os resultados relativos ao estresse dessas células que estiveram submetidas à solução de lise *overnight* e ao abrigo da luz em temperatura de 4° C. A ação do agente de lise celular será mais facilitada quanto mais fragilizada estiver esta célula, daí a necessidade de cuidados com luminosidade.

Em princípio, o teste consistiu em passar uma corrente elétrica através da lâmina com células imersas num filme de agarose ultra-pura (eletroforese) a qual promoveu um distanciamento entre os fragmentos do DNA lisado. Quanto menores e mais leves os fragmentos, mais facilmente seriam carregados em relação ao núcleo, evidenciando-se uma imagem semelhante a um “cometa”. Os fragmentos se distanciam do núcleo denotando uma dificuldade de recombinação, criando uma condição de irreversibilidade, quanto mais distante estiverem. Por outro lado, quanto maiores forem os fragmentos, menor será a distância percorrida por eles ou, noutras palavras, mais pesados serão os fragmentos, maiores serão as chances dessas células se recombinarem estruturalmente, resultando numa condição de maior probabilidade de reversão. Podem, eventualmente, sofrer mutação na dependência da recombinação, com eventual sobrevivência celular, sendo o inverso também verdadeiro. O teste facilita tão somente analisar se houve ou não dano celular e infere acerca da viabilidade celular, conforme o grau do dano envolvido. Não é possível por meio do teste se identificar qual foi o dano, sua causa ou onde ele ocorreu.

Não foram achados na literatura estudos relativos às culturas de células-tronco de origem dentária submetidas aos testes do cometa.

Nas Tabelas 23, 24, 25, 26, 27 e 28 analisamos a ocorrência de cometas nas culturas. As análises foram visuais e diretamente sob microscopia óptica invertida. Na Tabela 23 registramos a presença de cometas (SIM) ou a ausência de cometas (NÃO). Não nos interessou, nesse momento, qual o grau de dano celular relacionado aos cometas que apareceram, mas tão somente se ocorreram. Notadamente, nos cinco experimentos foram evidenciados cometas nos meios II e III e estiveram ausentes no meio IV, porém uma pequena expansão do núcleo foi evidenciada. Tal fato sugeriu um dano reversível, de fácil reestruturação no

meio IV. No meio I os cometas estiveram presentes numa ou noutra lâmina e de maneira pouco expressiva, uma vez que neste meio houve muito pouca proliferação celular, com poucas células isoladas e grandes espaços vazios em todas as lâminas das triplicatas dos cinco experimentos. Isso ocorreu, supostamente, porque as células estavam muito fragilizadas, talvez pela ausência de fatores energéticos (fatores de crescimento, vitaminas, sais minerais, íons, proteínas, aminoácidos, glicose) presentes normalmente nos meios de cultivo suplementados, em concordância com os trabalhos de RICHARDS *et al.* (2002), MARTIN *et al.* (2005), SKOTTMAN & HOVATTA (2006). Esse fato talvez tenha facilitado uma lise integral das células durante o processo de lise, tornando as células inviáveis, totalmente destruídas, com o aparecimento de uma ou outra célula sem expansão nuclear, um ou outro cometa de grau 4, não ultrapassando cinco células por lâminas.

Na Tabela 24, foi analisada a presença de cometas com grau zero, ou seja, no mínimo uma pequena expansão nuclear do material genético ou com, no máximo, um distanciamento dos fragmentos não maior que o diâmetro do núcleo celular. Esse tipo de dano ocorreu somente no meio IV, sendo importante frisar que os danos celulares não passaram de uma pequena expansão do núcleo, facilmente reversíveis. Muito provavelmente, esta aparente proteção ocorreu porque essas culturas continham substâncias facilmente reconhecidas pelas células (concentrações de aminoácidos, sais minerais, glicose, proteínas, fatores de crescimento, citocinas, agentes sinalizadores) presentes no meio de cultivo suplementado com soro autólogo, aproximando-se bastante de um microambiente já conhecido pelas células, consoante as afirmações de AUGELLO *et al.* (2010). Nos meios de cultivo II e III, não apareceram danos nucleares menores que o grau 1 e, no meio de cultivo I, quase não surgiram células nas lâminas.

Na Tabela 25 registramos o aparecimento de cometas de grau 1, o que significa a ocorrência de danos em condições de reversibilidade ou ainda mutações favoráveis. Visualmente, são aqueles cuja cauda do cometa mediu entre uma e duas vezes o diâmetro do núcleo. No meio IV, assim como no meio I, os cometas não foram evidenciados, reforçando nossas teorias; nos meios II e III, estes estiveram presentes em grande número, porém não diferiram muito entre si em termos de ocorrência, distribuindo-se homogeneamente em ambas as culturas.

Na Tabela 26 registramos o aparecimento de cometas de grau 2, o que significa ocorrência de danos supostamente com poucas possibilidades de reversibilidade, com prováveis ocorrências de mutações. Nesse caso, a cauda do cometa mediu entre duas e três vezes o diâmetro do núcleo. Esse grau de dano não foi evidenciado no meio IV; houve ocorrência nos meios II e III, com um número ligeiramente maior de cometas desse nível no meio II em relação ao meio de cultivo III.

Na Tabela 27 registramos o aparecimento dos cometas de grau 3, o que significa a ocorrência de danos considerados irreversíveis. Nesse caso, o tamanho da cauda do cometa variou entre três e quatro vezes o diâmetro do núcleo, com poucas chances de se rearranjarem. Da mesma maneira, houve ausência desses cometas nos meios I e IV e maior ocorrência nos meios II e III. Comparativamente, houve ocorrência um pouco maior desses cometas no meio II.

Na Tabela 28 registramos o aparecimento dos cometas de grau 4, denominados danos irreversíveis, cujo tamanho da cauda foi maior do que quatro vezes o diâmetro do núcleo. No meio IV houve ausência total desses cometas e no meio I a ocorrência foi esporádica. A ocorrência de cometas grau 4 foi mais facilmente visível nos meios II e III e foram relativamente mais evidentes no meio II.

Aparentemente, os meios de cultivo suplementados com soro humano, de certa forma puderam proteger a ocorrência de grandes danos celulares em cultura. Os meios de cultivos II e III demonstraram danos celulares muito semelhantes entre si, mas os maiores danos foram mais facilmente notados nos meios de cultivo II. O meio IV, realmente em nenhuma lâmina do estudo, demonstrou dano celular maior que o grau zero.

Em resumo, o meio de cultivo IV se mostrou melhor em vários quesitos desse estudo. Apesar de não terem ocorrido diferenças significantes entre os meios II e III, II e IV e dos testes do cometa não terem sido submetidos a uma análise estatística, nesse estudo os meios de cultivo IV e III se apresentaram como uma alternativa viável em relação aos meios suplementados com soro bovino.

A continuidade de estudos na linha de meios de cultivo é muito importante para o estabelecimento de novas condutas que, num primeiro momento, podem parecer óbvias e até muito simples (como no caso de pH). Talvez por isso, de certa forma o assunto tenha sido colocado num plano menos atraente para se pesquisar. Apesar dos constantes avanços tecnológicos, do uso da nanotecnologia associada ao desenvolvimento de novos biomateriais, do emprego de equipamentos que promovem proliferação mais acelerada das culturas, ainda assim necessitaremos desenvolver um ambiente de cultura celular que mimetize ao máximo o microambiente de cada tecido celular original. Nesse sentido, os meios de cultivo são uma condição básica para a cultura celular que, a meu entender, ainda são muito deficientes em mimetizar o microambiente “ideal” para cada célula. Até o momento, esses meios têm proporcionado um mínimo de condições para proliferação, sobrevivência e viabilidade celular,

necessitando de adaptação às culturas dos diversos tecidos, pois ainda não são idênticos ao ambiente celular original.

Os experimentos acerca do assunto parecem, à primeira vista, simples ou com respostas previsíveis e conhecidas. Assim, diante dessa falsa impressão, a maioria dos pesquisadores não tem se interessado em desenvolver estudos sobre meios de cultura. A nós, entretanto, parece ser muito importante a continuidade dessa linha de pesquisa uma vez que, nesse estudo, o meio de cultivo IV supostamente “protegeu” do dano celular as células em cultura. Nosso estudo suscitou então alguns questionamentos que poderão promover novas perspectivas e responder algumas dessas questões: por que no meio de cultivo autólogo não houve muito dano celular? Quais substratos destes meios empregados foram utilizados ou preferentemente utilizados pelas células em proliferação? Quais fatores presentes nesse suplemento podem ser isolados, sintetizados e ou dosados para que possam ser empregados como suplementação do próprio meio autólogo ou ainda, empregados como um meio isento totalmente de soro animal, um meio exclusivamente sintético? E quanto às outras culturas teciduais, o meio autólogo é viável?

Desse modo, pesquisas relacionando meios de cultivo totalmente isentos de suplementos hemoderivados, meios com suplementos totalmente sintéticos, meios suplementados com hemoderivados heterólogos, hemoderivados humanos, autólogos e homólogos com diferentes concentrações se fazem necessárias. Tais pesquisas são importantes inclusive para se estabelecer a possibilidade de se conseguir soro autólogo e em quantidade suficiente para se conduzir totalmente um experimento do início da cultura até sua futura e pretensa implantação no organismo original. E assim sendo, parece-nos que um meio de cultivo que nos garanta total isenção de possibilidade de introdução de fatores que possam

gerar lesões malignas no hospedeiro é de fato um grande avanço. Fica claro inclusive que outras variáveis no processo de cultura celular também necessitam ser pesquisadas para atender à questão da imunorrejeição e ou mutações, bem como os nutrientes essenciais de uma cultura com soro humano autólogo, partindo de uma análise prévia individualizada e suplementação sintética. Por fim, também se esperam estudos comparativos entre testes do cometa e outros testes identificando os locais de lise celular.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

O meio de cultivo suplementado com hemoderivado autólogo, favoreceu significativamente a proliferação celular nas culturas de células-tronco dentárias humanas.

O suplemento hemoderivado autólogo, minimizou o dano celular, nas culturas de células-tronco dentárias humanas.

O hemoderivado humano mostrou-se viável como suplemento nas culturas de células-tronco dentárias humana.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

Augello A, Kurth T B, De Bari C. Mesenchymal stem cells: a perspective from *in vitro* cultures to *in vivo* migration and niches. *European Cells and Materials*. 2010; 20: 121-133

Backopoulou A, Leyhausen G, Volk J, Tsiftoglou A, Garefis P, Koidis P, Geurtsen W. Comparative analysis of *in vitro* osteo/odontogenic differentiation potential of human dental pulp stem cells (DPSCs) and stem cells from the apical papilla (SCAP). *Arch Oral Biol*. Forthcoming 2011.

Beaumont C, Schmidt RJ, Tatakis DN, Zafiropoulos GG. Use of Engineered Bone for Sinus Augmentation. *J Periodontol*, 2008; 79; 01-08.

Bell E, Ehrlich P, Butle D J, Nakatsuji T. Living tissue formed *in vitro* and accepted as skin-equivalent full thickness. *Science*, 1981; 221: 1052-1054.

Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey P G. Bone Marrow Stromal Stem Cells: nature, biology and potential applications. *Stem Cell*. 2001; 19; 180 – 192.

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

Bluteau G, Luder H-U, De Bari C, Mitsiadis T A. Stem cell for tooth engineering. *European Cells and Materials*. 2008; 16: 1-9.

Burke J F, Yannas I V, Quimby W C, Bondoc C C, Jung W K. Successful use of a physiologically acceptable artificial skin in the treatment of extensive burn injury. *Ann Surg*, 1981; 194: 413-448.

Chick W L, Like A A, Lauris V. Beta cell culture on synthetic capillars: in artificial endocrine pancreas. *Science*. 1975; 187: 847-848 .

Dolatshahi-Pirouz A, Jensen T H L, Kolind K, Bünger C, Kassem M, Foss M, Basenbacher F. Cell shape and spreading of stromal (mesenchymal) stem cell cultured on fibronectin coated gold and hydroxyapatite surfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. Forthcoming 2011.

Duailibi M T, Duailibi S E, Young C S, Vacanti J P, Bartlett J D, Yelick P C. Bioengineered teeth from cultured rat tooth bud cells. *J Dent Res*, 2004: 83; 523-528.

Duailibi S E, Duailibi M T, Vacanti J P. Yelick P C. Prospects for tooth regeneration. *Periodontology 2000*, 2006: 41; 177–187.

Duailibi S E, Duailibi M T. Zhang W, Asrican R, Vacanti J P, Yelick P C. Bioengineered Dental Tissues Grown in the Rat Jaw. *J Dent Res*, 2008: 87(8); 745-750.

Duailibi M T, Duailibi S E, Duailibi Neto E F, Negreiros R M , Jorge WA, Ferreira L M, Vacanti J P , Yelick P C. Tooth Tissue Engineering: Optimal Dental Stem Cell Harvest Based on Tooth Development. *Artificial Organs*. 2011: Intern Center Artif Organs and Transpl and Wiley Periodicals, Inc.

Ferreira C F, Gomes M C C, Scarso Filho J, Granjeiro J M, Simões C M O, Magini R S. Platelet-rich plasma influence on human osteoblast growth. *Clin Oral Impl Res.* 2005;16; 456-460.

Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey P G, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. *PNAS.*2000;97(25);13625-13630.

Gronthos S, Brahimi J, Li W, Fisher L W, Cherman N, Boyde A, DenBesten P, Robey P G, Shi S. Stem Cell Properties of Human Dental Pulp Stem Cells. *J Dent Res.* 2002; 81(8); 531-535.

Gronthos S, Mrozik K, Shi S, Bartold P M. Ovine periodontal ligament stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Calcif Tissue Int.* 2006; 79; 310-317.

Harada H, Kettune P, Jung H S, Mustonen T, Wang Y A, Thesleff I. Localization of Putative Stem Cell in Dental Epithelium and their association with Notch and FGF signaling. *J Cell Biol.* 1999; 147; 105-120.

Hovatta O. Derivation of human embryonic stem cell lines, towards clinical quality. *Reprod Fert Develop,* 2006; 18; 823-828.

Hutmacher D W, Goh J C H, Teoh S H. An Introduction to Biodegradable Materials for Tissue Engineering Applications. *Ann Acad Med Singapore.* 2001; 30; 180-191.

Jaquiéry C, Schaeren S, Farhadi J, Mainil-Varlet P, Kunz C, Zeilhofer H F, Hebere M, Martin I. In vitro osteogenic differentiation os in vivo bone-forming capacity of human isogenic jaw periosteal cells and bone marrow stromal cells. *Annals of Surgery*. 2005: 242(6);859-868.

Jo Y Y, Lee H J, Kook S Y, Choung H W, Park J Y, Chung J H, Choung Y H, Kim E S, Yang H C, Choung P H. Isolation and Characterization of Postnatal Stem Cells from Human Dental Tissues. *Tissue Engineering*. 2007: 13(4); 767-773.

Kaigler D, Mooney D. Tissue engineering's impact on dentistry. *J Dent Ed*, 2001: 65; 456-462.

Kamil S H, Kojima K, Vacanti M P, Zaporozjan V, Vacanti C A, Eavey R D. Tissue engineered cartilage: Utilization of autologous serum and serum-free media for chondrocyte culture. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*. 2007:71;71-75.

Kim S S, Vacanti J P. The current status of tissue engineering as potential therapy. *Semin Pediatr Surg*, 1999: 8(3); 119-123.

Kocaoemer A, Krn S, Klüter H, Bieback K. Human AB serum and Thrombin-Activated Platelet-rich plasma are suitable alternatives to fetal calf serum for the expansion of mesenchymal stem cells from adipose tissue. *Stem Cells*. 2007:25; 1270-1278.

Kurita M, Aiba-Kojima E, Shigeura T, Matsumoto D, Suga H, Inoue K, Eto H, Kato H, Aoi N, Yoshimura K. Differential effects of three preparations of human serum on expansion of various types of human cells. *Plast Reconstr Surg*. 2008; 122(2); 438-448.

Langer R, Vacanti J P. Tissue engineering: Methods of replacing or substituting for damaged or diseased tissues. *Science*, 1993; 260(5110); 920-927.

Langer R, Vacanti J P. Tissue engineering: the challenges ahead. *Sci Am*. 1999; 280; 62-65.

Lechguer A N, Kuchler-Bopp S, Lesot H. Crown formation during tooth development and tissue engineering. *J.Exp.Zool. (Mol. Dev. Evol.)*.2009; 312B; 1-8.

Martin M J, Muotri A, Gage F, Varki A. Human Embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid. *Nature Medicine*, 2005; 11; 1-5.

Mendonça Costa A, Bueno D F, Martins M T, Kerkis I, Kerkis A, Fanganiello R D. Reconstruction of Large Cranial Defects in Nonimmunosuppressed Experimental Design With Human Dental Pulp Stem Cells. *J Craniofac Surg*, 2008; 19; 204-210.

Miura M, Gronthos S, Zao M, Lu B, Fisher L W, Robey P G, Shi S. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *PNAS*. 2003;100(10); 5807-5812.

Park B W ,Hab Y S, Hab Y S, Choi M J, Ryu Y M, Lee S G, Kim D K, Kim J R, Byum J H. In Vitro Osteogenic Differentiation of Cultured Human Dental Papilla-Derived Cells. J Oral Maxillofac Surg, 2009: 67; 507-514.

Pittenger M F, Mackay A M, Beck S C, Jaiswal R K, Douglas R, Mosca J D. *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science. 1999: 284; 143-147.

Preston S L, Alison M R, Forbes S J, Direkze N C, Poulson R, Wright NA. The new stem cell biology: something for everyone. J Clin Pathol Mol Pathol. 2003: 56; 86–96.

Richards M, Fong C Y, Chang W K, Wong P C, Bongo A. Human feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell masses and embryonic stem cells. Nature Biotech, 2002: 20; 933-936.

Skottman H, Hovatta O. Culture conditions for human embryonic stem cells. Reprod, 2006: 132; 691-698.

Sotiropoulou P A, Perez S A, Salagianni M, Baxevanis C N, Papamichail M. Characterization of the Optimal Culture Conditions for clinical Scale Production of Human Mesenchymal Stem Cells. Stem Cells, 2006: 24; 462-471.

Stock U A, Vacanti J P. Tissue Engineering: Current State and Prospects. Annu Rev Med, 2001: 52; 443-451.

Stute N, Holtz K, Bubenheim M, Lange C, Blake F, Zander A R. Autologous serum for isolation and expansion of human mesenchymal stem cells for clinical use . *Experimental Hematology*. 2004; 32:1212-1225.

Tuan R S, Boland G, Tuli R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arth Res Therp*. 2002; 5(1); 32-45.

Vacanti J P, Langer R. Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. *The Lancet* 1999; 354 (suppl Molecular medicine); 32-34.

Vats A, Bielby R C, Tolley N S, Nerem R, Polak JM. Stem Cells. *Lancet*, 2005; 366; 592-602.

Xia W, Li H, Wang Z, Xu R, Fu Y, Zhang X, Ye X, Huang Y, Xiang A P, Yu W. Human platelet lysate supports ex vivo expansion and enhances osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Cell Biology International*. Forthcoming 2011.

Young C S, Terada S, Vacanti J P, Honda M, Bartlett J D, Yelick P C. Tissue engineering of complex tooth structure on biodegradable polymer scaffolds. *J Dent Res*, 2002; 81; 695–700.

Zvaifler N J, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, Edwards CJ, Moss J, Burger JA, *et al*. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res*, 2000; 2; 477–488.

NORMAS ADOTADAS

NORMAS ADOTADAS

Consulta ao DeCS – Descritores em Ciências da Saúde. [http://decs.bvs.br/-terminologia em saúde.](http://decs.bvs.br/-terminologia%20em%20sa%C3%BAde)

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. 83p.

ABSTRACT

ABSTRACT

Introduction: One among many aims of medicine is to overcome injuries inflicted to the organism by diseases, aging and trauma, re-establishing the usual functions. About tissues losses, several authors claim that the ideal replacement is the healthy tissue itself, originated from the same source or developed by Tissue Engineering (TE). However, much research is needed before *in vivo* application. **Objective:** To evaluate three different kinds of sera supplies used in stem cell culture media, as to cellular proliferation and cellular injuries on dental stem cell. **Methods:** Five experiments were made utilizing incompletely developed third molar teeth. After enzymatic digestion, the adult stem cells were cultivated in four different kinds of culture media. Medium I, serum free (SF); medium II, supplied with FBS (heterologous serum- HeS); medium III, supplied with homologous human serum (homologous serum- HoS) and medium IV, supplied with autologous human serum (autologous serum – AuHS). These cultures were analyzed comparatively as to cellular proliferation; they were submitted Von Kossa (VK) and Alizarin Red (AR) markers tests for four weeks (checked weekly), and each two weeks checked for Colonies Forming Unities (CFUs). On the 28th day, all four cultures were submitted to comet assay, and were inspected for possible cellular DNA injuries. The results underwent a non-parametric statistical Friedman's variance test, with significance $(p) \leq 5\%$. **Results:** Culture medium IV reached a cellular proliferation rate higher than medium I, showing a significant result ($p^*=0,0074$). Culture medium II presented a superior proliferation result than medium I, and similar to medium III, although neither of them presented significant result when compared to medium IV. The comet assay's results showed minor cellular DNA injury in the medium IV cultures, when compared to medium II and III cultures. The CFUs were numerous in the media IV and III cultures, respectively, and there was higher mineralization rate in the medium IV than in the media II and III. **Conclusion:** The culture medium supplied with AuHS significantly improved cellular proliferation. Human sera proved to be a viable supply to human dental stem cell culture.

Apêndice 1 – Caracterização celular por Citometria de Fluxo

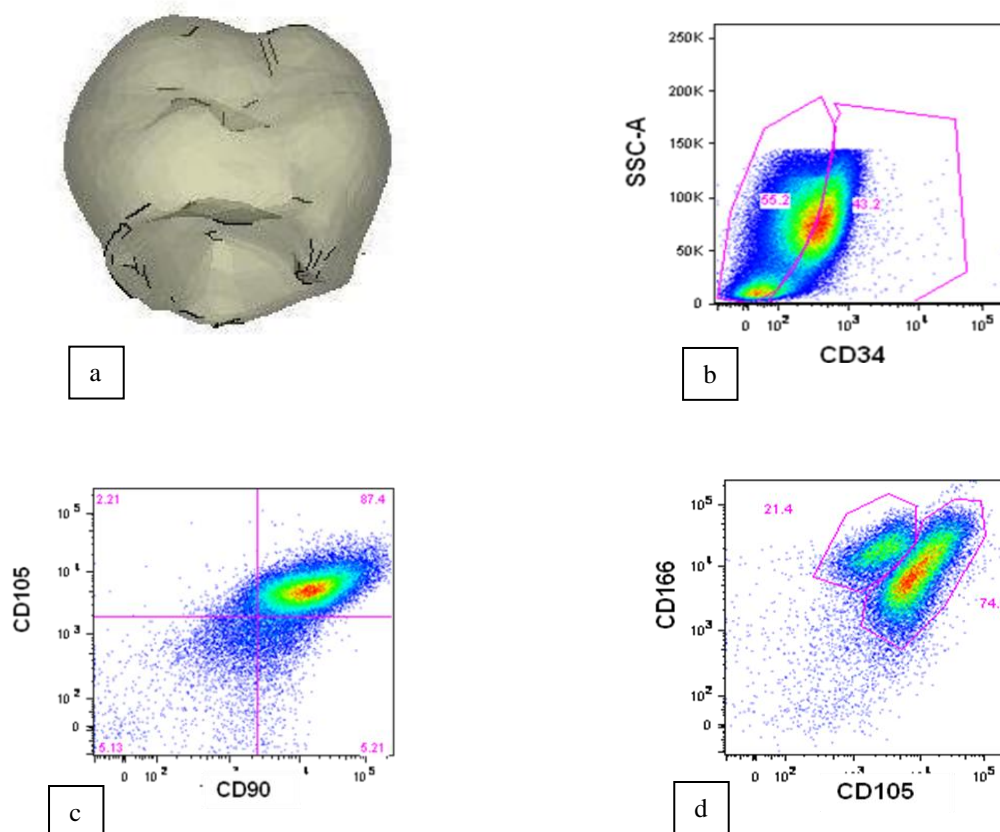


FIGURA - Caracterização celular por Citometria de Fluxo em tecido de polpa de germe dental de 3^a molares a) germe dental com a polpa dental removida b) Identificação de células-tronco por CD 34 c) Identificação de células mesenquimais por CD 105 d) Identificação de células epiteliais por CD 166

ANEXO I – COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - UNIFESP



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 21 de agosto de 2009.
CEP 0968/09

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisador(a) RICARDO LUIZ PISCIOLAROG

Co-Investigadores: Silvio Eduardo Duailibi (orientador); Monica Talarico Duailibi

Disciplina/Departamento: Cirurgia Plástica/Cirurgia da Universidade Federal de São Paulo/Hospital

São Paulo Patrocinador: FAPESP.

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: “**Desenvolvimento de meio de cultivo ideal para a cultura primária de células dentais humanas**”.

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: Estudo de cultura de células para serem utilizados na Engenharia Tecidual.

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: Risco mínimo, desconforto leve com coleta de sangue.

OBJETIVOS: Avaliar um suplemento ideal para meio de cultivo de células dentais humanas para a construção de substitutos biológicos de tecidos mineralizados comparativamente aos suplementos convencionalmente utilizados em Engenharia Tecidual (ET).

RESUMO: As células tronco adultas de origem ecto-mesenquimal, serão isoladas a partir de 5 amostras de germes dentais humanos, terceiros molares, obtidos por meio de doação em clínica odontológica privada ou no atendimento do serviço público odontológico. Os pacientes incluídos no estudo serão submetidos antes do procedimento das exodontias a coleta de sangue para obtenção do PRP (coleta com anticoagulante) e obtenção de soro (sem anticoagulante). A obtenção do PRP se dá a partir do sangue autógeno. É um processo que utiliza o princípio da separação celular por centrifugação diferencial para obtenção das plaquetas. Estas serão cultivadas em 4 meios nutritivos e analisados por espectrofotometria e registrados por meio de computação, e os respectivos PHs será por leitura direta, com transferência para o sistema computacional, sendo esses dados armazenados de modo a se determinar um comparativo com os meios nutritivos tanto do grupo controle, quanto do grupo experimental nos dias 7, 14, 21 e 28.

Sequencialmente ao processo de obtenção de células tronco dentárias adultas, será realizado o processo de digestão celular e estas semeadas sob fluxo laminar e em cada meio de cultivo será distribuído em 4 placas de 12 poços, para que sejam feitas leituras e seus respectivos registros (pH, espectrofotometria e curva de proliferação celular) nos dias 7, 14, 21 e 28, após estabelecida a aderência celular, e os resultados analisados estatisticamente..

FUNDAMENTOS E RACIONAL: O estudo propõe estudar e avaliar meios de cultivo tradicionalmente utilizados em Engenharia Tecidual, para o cultivo de células tronco adultas humanas originárias da polpa dentária, caracterizada por ser uma população células mista ecto-mesenquimal, suplementada com hemoderivados humanos.

MATERIAL E MÉTODO: Descritos os procedimentos experimentais laboratoriais de domínio da equipe.



TCLE: Apresentado adequadamente.

DETALHAMENTO FINANCEIRO: FAPESP.

CRONOGRAMA: 12 meses.

OBJETIVO ACADÊMICO: Doutorado.

ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: **16/08/10** e **16/08/11**.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU** e **APROVOU** o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e termo de consentimento livre e esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

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

0968/09

ANEXO - II - TCLEs

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

“Protocolo de utilização de Tecidos Humanos para o Desenvolvimento de Cultura de Células Dentais Humanas no estudo in vitro/vivo do substituto Biológico do dente utilizando Técnicas de Engenharia de Tecidos”

1 - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA

NOME _____ SEXO: M F
 DATA DE NASCIMENTO: ___/___/____ DOCUMENTO IDENTIDADE N° _____
 FILIAÇÃO: MÃE _____
 PAI _____
 ENDEREÇO: _____ COMPLEMENTO _____
 BAIRRO: _____ CIDADE: _____
 CEP: _____ TELEFONES: _____
 SE MENOR DE IDADE - O RESPONSÁVEL (GRAU DE PARENTESCO)

2 – ESCLARECIMENTOS SOBRE A PESQUISA, RISCOS E BENEFÍCIOS ESPERADOS

Você esta sendo convidado(a) a participar de um estudo intitulado **“Meio de cultivo ideal para a cultura primária de células dentais humanas”**, o que de uma forma bem simples, significa um composto nutritivo para cultivar células.

Como você vai se submeter a uma extração dentária com indicação clínica-cirúrgica do seu dente do siso (terceiro molar), sendo esta extração dentária de pouca complexidade, indicada por especialistas ou clínicos que estão executando o seu tratamento dentário, o cirurgião dentista responsável pela extração dental pretende colocar no lugar de onde foi removido o seu dente um composto que facilita e melhora a cicatrização óssea, feito a partir de um pouco de seu sangue. Uma vez que você já aceitou e faz parte de um estudo em andamento no qual está doando o dente extraído, estudo este que obteve o registro no Comitê de ética em Pesquisa Medica - CEP UNIFESP – 0595/01 e na Comissão Nacional de Pesquisa- CONEP 1039/06, o atual documento tem por objetivo esclarecer a necessidade de coleta de sangue.

Além da extração, você também se submeterá a uma coleta sanguínea com antecedência de até 24 horas da sua extração dentária, que será realizada em instituições de assistência pública e/ou particulares (ambos os procedimentos, extração dentária e coleta de sangue) que prestam atendimento à população tais como; USP-FUNDECTO (Universidade de São Paulo - FUNDAÇÃO PARA O DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO NA ODONTOLOGIA) – APCD-CENTRAL (Associação Paulista de Cir. Dentistas de São Paulo/cursos Atualização e Especialização) – Hospital Heliópolis (Atendimento ambulatorial/hospitalar) nos seus respectivos cursos de especialização/Atualização em Cirurgia e Traumatologia buco-maxilo-facial. Nestes locais o atendimento será realizado por pessoal legalmente capacitado e habilitado a fazer a coleta sanguínea. Este sangue será utilizado para a produção deste composto (que será colocado no local da extração dentária) chamado de Plasma Rico em Plaquetas (PRP), um derivado sanguíneo.

BENEFÍCIOS

Como benefício direto, o cirurgião colocará no lugar de onde foi removido o seu dente (após extração) um composto que facilita e melhora a cicatrização óssea, o PRP. O PRP (que é conhecido como Plasma

Rico em Plaquetas) é feito a partir de um pouco de seu sangue e tem sido muito empregado na clínica odontológica pelos profissionais dentistas.

Como benefício indireto, esta pesquisa experimental tem a finalidade de verificar o comportamento em laboratório das células dentais em cultura e posteriormente observar em organismo animal previamente selecionado, a capacidade da organização celular para promover o substituto biológico do dente. O estudo nos ajudará a reunir informações importantes que poderão orientar novas pesquisas e no futuro ajudar outras pessoas. No entanto somente ao termino deste estudo poderemos concluir os verdadeiros benefícios e suas reais utilidades.

RISCOS E DESCONFORTOS

Os riscos e desconfortos diretos ou indiretos para o participante voluntário deste estudo poderão ser relacionados à anestesia local durante a cirurgia: dor na aplicação da anestesia, sensação de amortecimento na região, pressão, vibração. No pós operatório poderão ocorrer inchaço, dor, limitação de movimento, dor na articulação da boca, gosto desagradável 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 duvidas ou sintomas que observar, telefonando imediatamente ao profissional responsável pelo estudo, o qual estará disponível para ouvi-lo e esclarecer suas dúvidas e perguntas.

CONFIDENCIALIDADE

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.

DESPESAS

As únicas despesas que você terá serão em relação à extração do dente, tais como o custo do procedimento cirúrgico e, no caso da indicação da anestesia geral, as despesas hospitalares e com o serviço de anestesia. Não haverá nenhuma despesa pessoal para o participante voluntário na fase laboratorial deste estudo, como também não haverá compensação financeira relacionada à sua participação.

PARTICIPAÇÃO

Sua participação no estudo é voluntária. Se preferir não participar, não há necessidade de nenhuma justificativa. Caso queira, poderá se retirar do estudo depois de iniciado, sem prejuízo em relação ao atendimento e a atenção dedicados a você .

ALTERNATIVAS DE PROCEDIMENTO

Caso você resolva não participar deste protocolo de pesquisa não doando o(s) dente(s) extraído(s), o(s) mesmo(s) será(ão) desprezado(s), jogado(s) no lixo pelo profissional responsável pelo procedimento cirúrgico.

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 envolvidos neste estudo são o doutorando Ricardo Luiz Pisciolaro (Consultório à R. Chico Pontes, 208 – Vila Guilherme –

fone 2252 4101 e os Professores Doutores Silvio Eduardo Duailibi e Monica Talarico Duailibi (consultório à Av. Chibará, 452, Moema fone 5051 1898). O Comitê de Ética em Pesquisa Médica da UNIFESP, Rua Botucatu nº 572, 1º andar cj. 14, fones (011) 5571-1062 – 5539-7162 também poderá ser contatado para dirimir quaisquer dúvidas.

PROCEDIMENTO(S)

O procedimento clínico-cirúrgico rotineiro consiste na anestesia local, abertura da gengiva que recobre o dente a ser extraído (em alguns casos será necessário remover um pouco de osso para liberar o dente a ser extraído) e em seguida a remoção do dente em questão. A seguir, será realizada limpeza da cavidade onde estava o seu dente, colocação do composto PRP (que melhora a cicatrização óssea), fechamento da gengiva com pontos de sutura e orientação pós operatória.

Parte deste produto feito com seu sangue (PRP) ou seja, o que sobrar depois de utilizado com você, será destinado para fazer a suplementação nutritiva de meios de cultivo celular. Esta pesquisa será realizada pelo doutorando Ricardo Luiz Pisciolaro (CROSP-22175) Cirurgião-Dentista, especialista em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial, doutorando pelo Programa de Pós Graduação em Cirurgia Plástica, da Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, sendo a coleta sangüínea executada nos ambientes onde serão realizadas as cirurgias. A supervisão e orientação deste estudo serão do Prof. Dr. Silvio Eduardo Duailibi (CROSP-17046) com a co-orientação da Profª Drª. Mônica Talarico Duailibi (CROSP- 23976), ambos pesquisadores da Escola Paulista de Medicina na Disciplina de Cirurgia Plástica e experientes na área de Engenharia Tecidual, com projeto do qual você já faz parte ao doar seu dente. Este estudo foi submetido à apreciação do comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal de São Paulo (CEP–UNIFESP - protocolo número 0968-09) cujo endereço é Rua Botucatu nº 572, 1º andar cj. 14, fones (011) 5571-1062 – 5539-7162, que poderá ser contatado para dirimir quaisquer dúvidas. O procedimento de coleta será realizado por pessoal competente e treinado em ambiente ambulatorial, antecedendo a cirurgia de extração em até 24 h e realizado por meio tubos de coleta apropriados, por sistema a vácuo (Vacutainer BD) aumentando o conforto do doador.

Se você concordar em participar também deste estudo, serão feitas algumas perguntas sobre sua saúde e também uma avaliação da radiografia panorâmica, que foi solicitada para o planejamento e procedimento cirúrgico de extração dentária, de acordo com a indicação clínica. De acordo com o protocolo do estudo do qual você já faz parte, também se avalia a possibilidade de realização da extração dentária em ambiente de consultório (ambulatório). Se por algum motivo a cirurgia de extração dentária do seu dente terceiro molar não for possível de se realizar em ambulatório (consultório), outros procedimentos serão necessários e você não fará parte deste estudo de meio de cultivo celular. Neste caso, o(s) dentista(s) responsável(is) pela cirurgia fará(ão) o encaminhamento devido e você será informado antecipadamente das necessidades a serem cumpridas para a realização cirúrgica em nível hospitalar, conforme termo de esclarecimento do estudo do qual você já participa. Na possibilidade de realizar cirurgia em consultório, será indicada uma medicação pré-operatória convencional, seguindo o protocolo cirúrgico de suporte (antibiótico e ou antiinflamatório se necessários) e o agendamento da sua cirurgia será realizado. No dia da cirurgia, a medicação deverá ser administrada uma hora antes do início do procedimento. Nesse período ou algumas horas antes, será feita coleta de 150 mL (em tubos de 10 mL) do seu sangue, o qual será processado para a obtenção do composto que será colocado no local da sua extração dentária.

3- CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Declaro ter lido e entendido todas as informações contidas nesse termo, tendo tempo para pensar sobre o assunto e esclarecer minhas dúvidas. Sei que ainda poderei, a qualquer momento, me informar sobre os procedimentos da pesquisa e tirar dúvidas que eventualmente surjam, pessoalmente ou por telefone com o Dr. Ricardo Pisciolaro, consultório à R. Chico Pontes 208, telefone 2252-4101, celular 7087-7771 ou no CEP- UNIFESP. R. Botucatu 572, 1º andar cj.14 fones (011) 5571-1062 – 5539-7162. Para mim ficaram claros quais são os propósitos do estudo, os procedimentos realizados, os desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Está claro também que minha participação será isenta de despesas laboratoriais como também de remuneração e meus custos são exclusivamente referentes à medicação de suporte e ao procedimento cirúrgico na instituição onde será feita a cirurgia e eventualmente com médicos anestesistas e despesas hospitalares caso haja indicação clínica em ambiente hospitalar. Eu _____, portador(a) do RG: _____, concordo em participar voluntariamente desse pesquisa e sei que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto cause a interrupção do tratamento a que estou sendo submetido(a) ou qualquer outro tipo de prejuízo. Estou ciente de que os dados obtidos nos meus exames serão mostrados em publicações e eventos científicos sem que eu seja identificado (a). Declaro ter recebido cópia deste termo.

São Paulo, ___ de _____ de 20__.

Assinatura da participante (sujeito da pesquisa) e ou responsável

Assinatura do pesquisador (Ricardo Luiz Pisciolaro)

3- CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (aplicável em casos de menores de idade)
 Eu, _____ tutor legal do menor
 _____ grau de parentesco _____

discuti pormenorizadamente com o Dr. _____
 minha decisão em participar deste protocolo de pesquisa.

Declaro ter lido e entendido todas as informações contidas nesse termo, tendo tempo para pensar sobre o assunto e esclarecer minhas dúvidas. Sei que ainda poderei, a qualquer momento, informar-me sobre os procedimentos da pesquisa e tirar dúvidas que eventualmente surjam, pessoalmente ou por telefone com o Dr. Ricardo Pisciolaro, consultório à Rua Chico Pontes 208, telefone 2252-4101, celular 7087-7771 ou no CEP- UNIFESP à Rua Botucatu 572, 1º andar cj.14 fones (011) 5571-1062 – 5539-7162. Para mim ficaram claros quais são os propósitos do estudo, os procedimentos realizados, os desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Está claro também que minha participação será isenta de despesas laboratoriais como também de remuneração e meus custos são exclusivamente referentes à medicação de suporte e ao procedimento cirúrgico na instituição onde será feita a cirurgia e eventualmente com médicos anestesistas e despesas hospitalares caso haja indicação clínica em ambiente hospitalar. Eu _____, portador(a) do RG: _____, concordo em permitir a participação voluntariamente de meu/minha filho(a) nesse estudo e sei que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto cause a interrupção do tratamento a que estou sendo submetido(a) ou qualquer outro tipo de prejuízo. Estou ciente de que os dados obtidos nos exames serão mostrados em publicações e eventos científicos sem que haja identificação do voluntário. Declaro ter recebido cópia deste termo.

Nome do Paciente _____

Nome do Tutor Legal _____

Assinatura do Tutor Legal _____

Nome do Profissional Responsável pela Cirurgia _____

Assinatura do profissional responsável _____

São Paulo, ___ de _____ de 20__.

 Assinatura da participante (sujeito da pesquisa) e ou responsável

 Assinatura do pesquisador (Ricardo Luiz Pisciolaro)

ANEXO – III

PROTOCOLO DE COLETA GERME DENTÁRIO

PROTOCOLO PARA COLETA DE GERME DENTÁRIO

NOME (PACIENTE)

ENDEREÇO Nº

ESTADO CIDADE BAIRRO

DOC DE IDENTIDADE FONE RES CEL COML

CÊNERO M F IDADE ANOS MESES

DATA DE NASCIMENTO NATURALIDADE

GRAU DE INSTRUÇÃO

NOME DO PAI DOC IDENT

NOME DA MÃE DOC IDENT

RESPONSÁVEL DOC IDENT

ASSINOU TCLES ? S N DATA

PREVISÃO DATA DA CIR. COLETADO SANGUE S N DIA

GERME do dente 18 28 38 48 DATA

GERME do dente 18 28 38 48 DATA

ESTÁGIO DOS GERMES Rx 1 2 3 4 5 6

ESTÁGIO DOS GERMES TAMANHO REAL 1 2 3 4 5 6

Dentista que operou CROSP FONE

ENTIDADE TEMPO CIRURGIA

COMPLICAÇÕES

ANAMNESE ALERGIAS

MEDICAÇÃO DE USO CRÔNICO/TRATAMENTO

MEDICAÇÃO PRÉ-OPERATÓRIA

MEDICAÇÃO PÓS-OPERATÓRIA

MANUTENÇÃO DA TEMPERATURA/TRANSPORTE MEIO TRANSPORTE

TEMPO ATÉ INICIAR PROCEDIMENTOS - ET

LOCAL DATA ASS.RESP

FONTES CONSULTADAS

FONTES CONSULTADAS

Barker, Kathy, Na Bancada: Manual de iniciação científica em laboratórios de pesquisas biomédicas, 1 ed. Kathy Barker, Artmed; Porto Alegre , 2002. 474p.

Ferreira LM, Orientação Normativa para Elaboração e Apresentação de Teses. 1 ed. Goldenberg S, Nahas FX, Barbosa MVJ, Ely PB, São Paulo, Livraria Médica Paulista Editora Ltda; 2008. 84p.

Peres CM, Como Cultivar Células, 1 ed. Curi R, Guanabara Koogan; Rio de Janeiro, 2005. 283p.

Ribeiro, L M; Salvadori, D M F; Marques, E K, Mutagênese Ambiental, 1ª Ed, ULBRA; Porto Alegre, 2003.356 p.

Siegel S. Estatística não paramétrica para ciências do comportamento. 2ª ed. Artemed; Porto Alegre, 2006. 448p.