

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

**DAIANA ELISABETH BÖTTCHER**

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E IMUNOLOCALIZAÇÃO DE STRO-1 E BMP-4 EM  
MOLARES DE RATOS COM POLPA VITAL OU NECROSE PULPAR INDUZIDA  
DURANTE O DESENVOLVIMENTO RADICULAR.**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos  
para obtenção do título de Mestre em Clínica  
Odontológica – Área de Concentração Endodontia.

**Orientação: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fabiana Soares Grecca**

**Porto Alegre, janeiro de 2012.**

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **Darcy Célio Böttcher** e **Noeli Elisabetha Böttcher**, pelo apoio irrestrito em todas as minhas decisões pessoais e profissionais. Sem este apoio, eu não teria a segurança para seguir em frente.

À minha orientadora, **Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fabiana Soares Grecca**, por todos os ensinamentos, pelo incentivo e pelo exemplo de dedicação à vida acadêmica. Além disso, e acima de tudo, pela amizade construída nesses anos de convívio.

À **Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Anna Christina Medeiros Fossati**, que me acompanha nessa caminhada científica desde os tempos da graduação, pelo treinamento para a leitura dos resultados e por todos os ensinamentos na área da Histologia.

À **Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Roberta Kochenborger Scarparo**, pela amizade, pelo coleguismo e pelo exemplo de determinação na construção da sua carreira acadêmica.

Ao **Prof.<sup>o</sup> Dr.<sup>o</sup> Manoel Sant'Anna Filho**, pela disponibilidade na solução de dúvidas no momento da análise das imagens.

Aos **Professores de Endodontia** da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelo exemplo de equipe e pela amizade.

Aos responsáveis e colaboradores do **Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, pelos cuidados despendidos com os animais utilizados na presente pesquisa e pelos ensinamentos com a manipulação dos mesmos.

Ao **Programa de Pós Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, pela oportunidade de cursar o Mestrado na Faculdade onde me formei e da qual me orgulho muito, por estar entre as melhores do Brasil.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento Profissional de Nível Superior (CAPES)**, pela bolsa de estudos que oportunizou esse Curso de Mestrado.

Aos **amigos e colegas** desta Faculdade, pelo companheirismo e pelos momentos de descontração proporcionados.

Aos professores **Luciano Casagrande, Manoela Domingues Martins, Roberta Kochenborger Scarparo e Simone Bonato Luisi**, por aceitarem participar da defesa deste trabalho.

E aos demais que contribuíram de alguma maneira com este trabalho, obrigada!

“Nem tão longe que eu não possa ver  
Nem tão perto que eu possa tocar  
Nem tão longe que eu não possa crer que um dia chego lá  
Nem tão perto que eu possa acreditar que o dia já chegou”  
(Humberto Gessinger – A Montanha)

## RESUMO

**Objetivo:** O objetivo do presente estudo foi avaliar morfológicamente os tecidos pulpar e periapical de molares de ratos com a polpa vital e expostos ao meio bucal durante o desenvolvimento radicular, além de detectar a localização do STRO-1 e do BMP4 nos mesmos. **Métodos:** Foram utilizados 24 ratos machos da linhagem Wistar com quatro semanas de idade. A fim de induzir a necrose, foi realizada a exposição pulpar dos primeiros molares inferiores esquerdos em condições não-assépticas e deixando a polpa exposta ao ambiente oral (grupo teste). Os molares inferiores do lado direito não sofreram intervenção e serviram como grupo controle. A eutanásia dos animais foi realizada nos tempos de 7, 10, 13 e 16 semanas de vida (o equivalente a 3, 6, 9 e 12 semanas após a intervenção). Após, as mandíbulas foram dissecadas e processadas para a análise histológica através de Hematoxilina-Eosina e Imunohistoquímica. Foram comparadas, entre os grupos, em cada um dos períodos, a reação inflamatória periapical, as características do tecido pulpar (células inflamatórias, vascularização, odontoblastos, degeneração, destruição tecidual), fechamento do forame e presença de reabsorções. **Resultados:** Todos os dentes do grupo teste apresentaram necrose pulpar e a interrupção do desenvolvimento radicular. Enquanto isso, os dentes do grupo controle apresentaram o desenvolvimento normal dos tecidos dentários. Quanto à imunohistoquímica, foi constatada a marcação pelo BMP-4 no tecido pulpar dos dentes do grupo controle. Não houve, no entanto, marcação nos dentes do grupo teste. Para o STRO-1, a marcação foi mais evidente na região dos vasos sanguíneos, tanto no grupo controle, quanto no grupo teste. Para nenhum dos anticorpos, foi constatada marcação na região da papila apical. **Conclusão:** No presente estudo, a técnica imunohistoquímica não foi suficiente para a avaliação da presença de células-tronco na região da papila de dentes com rizogênese incompleta e necrose pulpar. É possível que a presença de infecção e a reação inflamatória tenham bloqueado a expressão do STRO-1 e do BMP-4.

Palavras-chave: Endodontia, Polpa Dentária, Necrose Pulpar, Rizogênese Incompleta, Células-Tronco Mesenquimais.

## ABSTRACT

**Objective:** the aim of this study was to characterize the features of live and necrotic dental pulps of molar teeth in rats with developing roots, and to assess the expression of STRO-1 and BMP-4. **Methods:** twenty-four 4-month-old male Wistar rats were used. To induce necrosis, the pulps of the first lower left molars were exposed to the oral environment. The lower right molars served as the control non-operated group. Euthanasia of animals was carried out at 7, 10, 13 and 16 weeks and the jaws were dissected and processed for histological analysis by hematoxylin-eosin and immunohistochemistry. The periapical inflammatory reaction, the characteristics of the pulp tissue (inflammatory cells, vascularity, odontoblasts, degeneration, tissue destruction), closure of the foramen and presence of resorptions were described at each period. **Results:** all teeth from the test group presented pulp necrosis, occurring discontinuation of root development. Meanwhile, the teeth of the control group showed normal development of dental tissues. BMP-4-positive cells were detected in the pulp of teeth from the control group. However, there was no expression in teeth of the test group. For STRO-1, expression was more evident in the blood vessels, both for the control group and for the test group. Apical papilla evidenced no BMP-4 nor STRO-1 expression. **Conclusion:** Immunohistochemistry was not sufficient to evaluate the presence of stem cells in the apical papilla region of nonvital immature teeth. It is possible that the inflammatory process has blocked the expression of STRO-1 and BMP-4., Probably, infection has negatively modulated this expression.

Key words: Endodontics, Dental Pulp, Immature Necrotic Teeth, Mesenchymal Stem Cells.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	08
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	10
2.1. O DESENVOLVIMENTO DO DENTE E OS TECIDOS DENTÁRIOS.....	10
2.2. NECROSE PULPAR E INFLAMAÇÃO.....	15
2.3. CÉLULAS-TRONCO.....	17
Células-Tronco e a Odontologia.....	18
2.4. ESTÁGIO ATUAL DO TRATAMENTO DOS DENTES COM RIZOGÊNESE INCOMPLETA.....	24
2.5. IDENTIFICAÇÃO DO POTENCIAL DE REGENERAÇÃO TECIDUAL.....	26
Stro-1.....	27
Fatores de Crescimento.....	29
BMP-4.....	30
3. PROPOSIÇÃO.....	33
4. MÉTODOS.....	34
4.1. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	34
4.2. ANIMAIS.....	34
4.3. ANESTESIA.....	34
4.4. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	35
4.5. EUTANÁSIA.....	35
4.6. PROCESSAMENTO E ANÁLISE DAS PEÇAS.....	35
4.7. AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA QUALITATIVA.....	36
4.8. ANÁLISE DA IMUNOHISTOQUÍMICA.....	37
5. RESULTADOS.....	40
6. DISCUSSÃO.....	51
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
ANEXOS.....	67

## 1 INTRODUÇÃO

O rápido processo de evolução da cárie dentária ou as injúrias traumáticas nos dentes permanentes jovens levam à inflamação pulpar e/ou necrose associada à lesão periapical, com a consequente interrupção da formação radicular. A presença de um ápice aberto, com finas e frágeis paredes dentinárias, é um problema para o manejo clínico da doença pulpar e periapical<sup>1,2,3</sup>. O relato de casos clínicos de dentes com rizogênese incompleta e necrose pulpar mostram que o controle da infecção no canal radicular, sem qualquer outro procedimento de instrumentação e obturação, pode levar à maturação das paredes radiculares e fechamento apical<sup>2,3,4,5,6,7</sup>. Em consequência disso, especula-se a possibilidade do reparo dos tecidos dentários, mesmo em situações consideradas adversas, como a necrose pulpar.

A fim da obtenção do reparo dos tecidos, estão sendo desenvolvidos procedimentos biológicos para a reposição de estruturas danificadas, incluindo o tecido dentinário e a raiz dentária, bem como as células do complexo dentino-pulpar. Esta área compreende a pesquisa das células-tronco, dos fatores de crescimento, da cultura de células e tecidos e dos materiais da engenharia de tecidos<sup>8</sup>.

As células-tronco adultas têm gerado grande interesse na comunidade científica por causa do seu potencial de expansão *in vitro*, por sua capacidade de auto-renovação e por suas propriedades imunomoduladoras<sup>9</sup>. Esta categoria de células, de origem autóloga, são uma fonte para as terapias de regeneração tecidual, com um grande potencial de aplicação clínica. O potencial regenerativo das células-tronco hematopoiéticas da medula óssea, das células-tronco mesenquimais e das células-tronco mesenquimais de origem dentária tem sido o foco de inúmeras pesquisas nos últimos anos<sup>10,11,12</sup>.

Até o momento, já foram identificadas cinco diferentes células-tronco dos tecidos dentários humanos: células-tronco da polpa dentária, células-tronco dos dentes decíduos exfoliados, células-tronco do ligamento periodontal, células-tronco da papila apical e as células progenitoras do folículo dentário. Estas células-tronco pós-natal têm as mesmas características que as células-tronco mesenquimais, incluindo a capacidade de auto-renovação e o potencial de diferenciação<sup>11</sup>.



Junto ao tecido pulpar, na porção apical dos dentes com rizogênese incompleta, situa-se a papila apical. Esta porção é uma rica fonte de células capazes de se diferenciar em odontoblastos<sup>13,14</sup>. Sonoyama *et al.* (2008)<sup>15</sup> levantam a hipótese, através da imunolocalização de marcadores específicos, de que células progenitoras da papila apical sobreviveriam à infecção, como um resultado da proximidade do aporte sanguíneo do periodonto, ocorrendo a diferenciação de odontoblastos, a partir da influência da bainha epitelial radicular, e completando a formação radicular.

No entanto, são hipóteses geradas frente a um maior conhecimento sobre os mecanismos celulares envolvidos na formação dos tecidos dentários<sup>16</sup>. Além disso, o sucesso clínico dos procedimentos de apicigênese, na tentativa de se obter a formação radicular em dentes com necrose pulpar, ainda não está explicado. Faltam estudos que caracterizem as células afetadas pelo processo de necrose pulpar e se essas continuariam aptas para o recebimento de estímulos que poderiam levar à formação do tecido radicular com características normais.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 O DESENVOLVIMENTO DO DENTE E OS TECIDOS DENTÁRIOS

Interações entre células e tecidos constituem o principal mecanismo regulador do desenvolvimento de todos os organismos pluricelulares. Inúmeras moléculas e fatores de crescimento, bem como seus receptores, estão relacionados com essa interação durante o desenvolvimento do dente<sup>17</sup>.

O desenvolvimento dentário é um processo complexo, coordenado pela interação recíproca entre o epitélio e o ectomesênquima derivado da crista neural<sup>18</sup>. Estas interações levam ao crescimento coordenado, à morfogênese e à diferenciação das populações celulares do germe dentário, culminando na deposição dos tecidos dentários<sup>19</sup>.

O primeiro sinal de desenvolvimento dentário é o espessamento do epitélio oral que se transforma em um botão. As células mesenquimais se condensam ao redor desse botão e, durante os estágios de capuz e campânula, o epitélio se organiza, conforme a morfologia do dente que está em formação<sup>17</sup>.

Durante o estágio de campânula, já é possível identificar o germe dentário, que consiste do órgão do esmalte, da papila dental e do folículo dentário. O órgão do esmalte é responsável pela formação do esmalte e é constituído pelo epitélio interno e externo do esmalte, pelo estrato intermediário e pelo retículo estrelado<sup>20</sup>. A papila dental dará origem à polpa e aos odontoblastos, enquanto que o folículo dentário dará origem aos cementoblastos e às fibras do ligamento periodontal<sup>21</sup>. Assim, como em todos os tecidos em desenvolvimento, a morfogênese ocorre no contexto de extensivo crescimento e localização exata, o que determina que a morfogênese e a divisão celular ocorram de forma extremamente coordenada<sup>17</sup>.

O epitélio dentário se divide em epitélio externo e interno do esmalte, de onde se diferenciam os ameloblastos, enquanto que as células ectomesenquimais da papila dental se diferenciam nos odontoblastos. Estas células darão origem ao esmalte e à dentina, respectivamente<sup>18,22</sup>.

O esmalte é o tecido mais duro do corpo humano. É composto por mais de 90% de hidroxiapatita<sup>20</sup> e não possui colágeno na sua composição<sup>23</sup>. As principais

proteínas do esmalte são a amelogenina, a ameloblastina, a enamelinina e a tuftelina<sup>23</sup>.

A dentina é composta de colágeno, sialofosfoproteína dentinária (DSP), matriz dentinária e hidroxiapatita<sup>17</sup>. Ela circunda a polpa, que é um tecido rico em fibroblastos, vasos sanguíneos e nervos, e sua porção externa usualmente é recoberta por uma camada de esmalte<sup>23</sup>.

Os ameloblastos e os odontoblastos são células exclusivamente dentárias que se diferenciam de forma terminal durante o estágio de campânula<sup>24</sup>. Esta característica faz com que eles não tenham mais a capacidade de proliferar a fim de repor as células que foram lesadas de forma irreversível<sup>25</sup>.

A diferenciação de odontoblastos é caracterizada pelos seguintes estágios: 1) pré-odontoblastos (encontram-se perpendiculares à junção epitélio-mesênquima ou membrana basal durante a última etapa da mitose), 2) as células filhas (em contato com a membrana basal, elas se alongam e polarizam – o núcleo toma uma posição alta e ecêntrica à posição basal –, ficando as células alinhadas) e 3) início da síntese de pré-dentina e componentes dentinários<sup>24</sup>. Odontoblastos funcionais exibem uma morfologia colunar e polarizada que muda para um estado de repouso, ficando menores e mais achatados após a formação da dentina primária<sup>26</sup>.

Os odontoblastos produzem e secretam colágeno tipo I, que é o principal componente da pré-dentina. A pré-dentina é transformada em dentina através da calcificação por hidroxiapatita na presença de altas concentrações de tencina e fosfatase alcalina. Após a secreção e aposição da primeira camada de dentina, os ameloblastos iniciam a produção do esmalte imaturo<sup>27</sup>. A aposição dos tecidos mineralizados inicia na ponta de cada cúspide e continua em sucessivas camadas, até que a coroa do dente esteja completamente formada. O esmalte humano não pode ser refeito, e injúrias a ele são permanentes. Em contrapartida, a dentina continua sendo produzida ao longo da vida<sup>23</sup>, na forma de dentina secundária e, como resposta a uma agressão leve<sup>26</sup>.

A dentina possui estrutura tubular e mantém uma íntima relação com a polpa através dos prolongamentos odontoblásticos<sup>28</sup>. A polpa dentária é um tecido conjuntivo frouxo localizado no centro do dente, que contém uma variedade de tipos

celulares e moléculas da matriz extracelular. Tanto a dentina, quanto a polpa derivam das células da crista neural<sup>29</sup>.

A principal função da polpa é a de produzir dentina, incluindo sua forma primária – durante o desenvolvimento inicial do dente, a secundária – ao longo da vida do dente e a terciária – quando da presença de um estímulo nocivo. Os odontoblastos se encontram alinhados na periferia da polpa, próximos à camada interna de dentina<sup>30</sup>.

A característica da polpa de ser um tecido altamente vascularizado com uma grande quantidade de nervos mielinizados e não-mielinizados está relacionada com suas outras duas funções principais: nutrir a dentina e agir como um biosensor para a detecção de estímulos mínimos<sup>30</sup>. Anatomicamente, a polpa é praticamente toda recoberta por dentina. A única conexão entre a polpa e o tecido circundante é através do forame apical. A maioria dos vasos sanguíneos e linfáticos da polpa passa pelo forame, o que faz do ápice a principal via de nutrição do tecido pulpar. Em alguns dentes, há inúmeras pequenas aberturas de canais laterais, localizados próximos ao forame apical. Esse acesso limitado e ambiente restrito diminuem a capacidade de recuperação da polpa frente a uma agressão<sup>29,31</sup>.

Se os estímulos são leves ou progridem lentamente, como ocorre nos casos de pequenas lesões cariosas, atrição, erosão, ou pequenas fraturas, os odontoblastos normalmente sobrevivem e continuam a produção de dentina, permitindo a manutenção da atividade pulpar e protegendo os odontoblastos remanescentes. Quando os estímulos são fortes e/ou progridem rapidamente, como ocorre nos casos de cárie profunda, abrasão severa ou fratura, os odontoblastos primários são destruídos. Nestes casos, os odontoblastos, que são células pós-mitóticas e diferenciadas, não têm mais a capacidade proliferativa para a reposição dos odontoblastos destruídos, nem de produzir mais dentina<sup>32</sup>. Sob essas circunstâncias, células mesenquimais indiferenciadas da polpa dentária podem se diferenciar em odontoblastos e secretar a dentina terciária<sup>33</sup>.

Após a formação da coroa, da deposição da dentina coronária e da matriz extracelular do esmalte, inicia-se o processo de desenvolvimento da raiz dentária. A porção mais apical do germe dentário prolifera durante o período de formação radicular, gerando células responsáveis pela formação da polpa radicular e do

periodonto. Esta porção passa a ser denominada Bainha Epitelial de Hertwig (BEH). A bainha epitelial, derivada das células da alça cervical do órgão do esmalte, prolifera apicalmente, estabelecendo os limites entre a polpa e o periodonto<sup>34</sup>. Esta estrutura epitelial é responsável pela determinação da forma radicular e tem um papel importante na regulação da formação da dentina e do cimento radicular, bem como do periodonto<sup>20, 34,35</sup>. A bainha epitelial é considerada a principal região controladora do desenvolvimento radicular, uma vez que ela desaparece assim que a raiz está completamente formada<sup>36</sup>.

As células pulpareas que estão em contato com a BEH são estimuladas para a diferenciação em odontoblastos, que produzirão a dentina radicular. Após, a BEH se desintegra e é sugerido que algumas células do folículo dentário possam se diferenciar em cementoblastos. A deposição da dentina radicular e do cimento continuam depois da erupção do dente. A formação da raiz dentária humana normalmente se completa entre 2 e 3 anos após a erupção do dente<sup>37</sup>.

Segundo alguns autores, a BEH é sensível ao trauma, mas, devido ao bom aporte vascular e celular da região apical, a formação radicular pode continuar mesmo na presença da inflamação e necrose<sup>38,39</sup>. Por causa do papel da BEH na continuação da formação radicular, todo esforço deve ser feito para manter a sua viabilidade. A completa destruição da BEH resulta na interrupção do desenvolvimento radicular<sup>40</sup>.

Há similaridades entre os eventos que ocorrem durante a dentinogênese coronária e radicular. Os pré-odontoblastos se alinham ao longo da lâmina basal, separando-se do respectivo epitélio, sendo que os odontoblastos mais apicais são menos diferenciados que aqueles em posição mais coronal. A polarização dos odontoblastos precede a secreção de pré-dentina, com focos de mineralização aparecendo na matriz dentinária. A mineralização da camada mais periférica de pré-dentina é retardada, tanto na coroa, quanto na raiz dentária. Essa camada não mineralizada serve de matriz sobre a qual iniciará a formação do esmalte (coroa) e do cimento (raiz), garantindo a íntima relação entre os tecidos mineralizados<sup>34</sup>.

No entanto, há algumas diferenças entre a formação dentinária na raiz e na coroa. A pré-dentina da raiz contém fibras colágenas dispersas, ao passo que, na coroa, elas são mais espessas, organizadas de forma mais densa e normalmente

paralelas aos processos odontoblásticos. Durante a formação da dentina, os prolongamentos odontoblásticos se retraem e ficam distantes da lâmina basal, acompanhando o movimento celular. Após a deposição da dentina, é possível observar a formação de túbulos. Porém, no início da formação da dentina radicular, esta deposição ocorre de uma forma caótica, resultando na camada granular de Tomes. Os odontoblastos da coroa, por sua vez, são colunares, enquanto os radiculares são mais cuboidais<sup>34</sup>.

Da mesma forma, há diferenças entre a composição bioquímica da dentina radicular e da coronária. Elas ocorrem na quantidade e na qualidade das fosfoproteínas sintetizadas e também por uma menor quantidade das cadeias  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$  do RNAm do colágeno tipo I nos odontoblastos radiculares<sup>34</sup>. Essas diferenças morfológicas e fenotípicas entre os odontoblastos coronários e radiculares surgem, provavelmente, a partir de diferenças entre os mecanismos que operam a formação da coroa e da raiz<sup>34</sup>.

Assim que a primeira camada de pré-dentina é depositada, a bainha epitelial começa a se desintegrar em pequenos aglomerados de epitélio, conhecidos por restos epiteliais de Malassez (REM). Existe a hipótese de que essa fragmentação faça com que as células mesenquimais do folículo dentário, em contato com a pré-dentina, se diferenciem em cementoblastos<sup>34</sup>. A deposição e mineralização do cimento na superfície radicular coincidem com a formação das fibras periodontais pelos fibroblastos derivados do folículo dentário. Essas fibras ficam entre o cimento da raiz dentária e o osso alveolar, ancorando o dente na arcada dentária<sup>41</sup>.

Finalmente, há uma região relacionada ao desenvolvimento radicular que merece atenção especial: a papila apical (PA). Ela é um tecido do tipo embrionário, localizado na porção apical da raiz em formação<sup>42</sup>.

Este tecido está fracamente aderido ao ápice do dente em desenvolvimento, podendo ser facilmente destacado dessa região. A PA é apical ao diafragma epitelial, com a presença de uma zona rica em células que a separa da polpa. Morfologicamente, a PA contém menos células e vasos que a polpa dentária<sup>14</sup>.

Além disso, a PA é fonte de um grupo especial de células-tronco (CT) de origem dentária<sup>15,42</sup>. Como ela é um tecido precursor da polpa dentária, as CTs

obtidas desta fonte derivam de um tecido em desenvolvimento e, por isso, representam uma população celular jovem. Em razão disso, poderia ser uma fonte superior de células para a regeneração de tecidos<sup>43</sup>. As células-tronco da PA têm a capacidade de diferenciação em tecidos osteogênicos, dentinogênicos, neurogênicos e adipogênicos<sup>42</sup>.

Em decorrência da localização apical da PA, esse tecido é favorecido pela circulação colateral, o que tornaria viável sua sobrevivência, mesmo durante o processo de necrose pulpar<sup>14</sup>.

## 2.2 NECROSE PULPAR E INFLAMAÇÃO

Com base no conhecimento da existência de células-tronco na região apical, e, no desejo de se obter o reparo dos tecidos destruídos, ainda é necessário descobrir se a resposta inflamatória, decorrente da necrose pulpar, interfere na manutenção dessas células apicais, bem como nos mecanismos envolvidos com a formação radicular.

A necrose pulpar é a morte da polpa, significando a cessação dos processos metabólicos desse órgão, com a consequente perda de sua estrutura, bem como de suas defesas naturais. Inúmeras são as causas que levam à necrose pulpar: traumatismo, presença de materiais irritantes, sobreaquecimento e cárie. Uma vez vencidas as defesas da polpa, inicia-se a necrose desse tecido, acompanhada ou não de invasão bacteriana<sup>44</sup>. Quando há a presença de bactérias no canal com necrose pulpar, estes microorganismos se multiplicam rapidamente e ocorre a liberação de enzimas que atuam na destruição das fibras (colagenase)<sup>45</sup>, na desorganização e destruição da substância fundamental (hialuronidase, condroitinase, hemolisina, fosfatase ácida e nuclease). Como resultado dessa agressão microbiana, tem-se a gangrena pulpar<sup>44</sup>.

O canal, então, torna-se um ambiente propício para a proliferação microbiana, pois há presença de nutrientes e restos orgânicos formados a partir dos produtos microbianos e do tecido pulpar necrosado. Os microrganismos, por sua vez, proliferam sem serem atingidos pelos elementos de defesa do organismo, uma vez que eles se encontram no periápice, e o agente agressor fica restrito ao canal radicular<sup>46</sup>. Devido à proximidade entre o canal radicular e a região periapical, esta

região passa a sofrer com as alterações da necrose pulpar e da propagação bacteriana. As bactérias e suas toxinas, além dos produtos decorrentes da destruição tecidual, representam as causas mais frequentes de reações periapicais, tanto as de caráter proliferativo, quanto as de caráter exudativo<sup>44</sup>.

A agressão tecidual desencadeia a resposta inflamatória, pois induz o rompimento da homeostasia. A inflamação pode ser classificada em aguda ou crônica, conforme os critérios de duração, natureza e células envolvidas<sup>47</sup>. A inflamação aguda consiste na primeira linha de defesa do organismo contra um agente agressor. Ela faz parte da imunidade inata induzida e de caráter inespecífico. Envolve alterações vasculares, células responsáveis pelo combate do agente agressor e mediadores químicos. Por seu turno, os neutrófilos são as primeiras células que deixam os vasos e adentram o local da agressão. Eles fagocitam bactérias, substâncias estranhas, complexos imunes e tecidos degenerados. Também podem perpetuar a resposta inflamatória através da liberação de enzimas, mediadores químicos e radicais livres tóxicos<sup>47</sup>.

Outra característica relevante dos processos agudos é a exudação. O exudato é um fluido extravascular de origem inflamatória, que contém altas concentrações de proteínas e muitos detritos celulares. Nas inflamações graves, o exudato purulento é o que está presente. Ele é caracterizado por um líquido amarelado, rico em piócitos, que liberam enzimas proteolíticas e radicais livres que levam à lise tecidual, além de detritos celulares e microorganismos vivos e mortos. Esse exudato é conhecido como pus<sup>47</sup>.

Em contrapartida, a inflamação crônica pode suceder um episódio de inflamação aguda, desde que o agente agressor não tenha sido eliminado. A maioria dos processos crônicos está associada a infecções persistentes, visando à eliminação dos agentes agressores. As principais células envolvidas no processo crônico são as seguintes: macrófagos, linfócitos, plasmócitos, fibroblastos, mastócitos, células epiteliais, fibras nervosas e elementos vasculares<sup>47</sup>.

Apesar de envolver células imunocompetentes, a inflamação crônica também apresenta um caráter destrutivo. O macrófago, por exemplo, desempenha um papel relevante na inflamação crônica, mas também libera substâncias com potencial destrutivo dos tecidos envolvidos. Concomitante ao processo de destruição tecidual,



ocorre a estimulação de fibroblastos para a produção de colágeno e consequente fibrose. Assim, na resposta inflamatória crônica, períodos de destruição tecidual alternam com períodos de reparo<sup>47</sup>.

## 2.3 CÉLULAS-TRONCO

O estudo da biologia da célula-tronco tornou-se um importante campo para a regeneração e o reparo dos tecidos. Em geral, as CTs são definidas por apresentarem duas grandes propriedades: a primeira é a capacidade de auto-renovação; a segunda é que, ao se dividirem, algumas células-filhas devem gerar células que mantenham as características de CT ou gerar células com potencial de diferenciação<sup>14</sup>.

Existem inúmeras classificações para as CTs. No entanto, uma das mais utilizadas é conforme a sua capacidade de diferenciação: totipotente, pluripotente, multipotente ou pluripotente induzida. As CT totipotentes são aquelas que podem ser implantadas no útero de um ser vivo com a capacidade de formar um organismo completo. De outra parte, as CTs pluripotentes podem originar todas as células de um organismo, exceto os tecidos embrionários (essa característica limita essas células de formarem um organismo completo). Por fim, as CTs multipotentes podem gerar apenas algumas linhagens celulares específicas<sup>9,48</sup>.

As CTs também podem ser genericamente classificadas como embrionárias ou adultas (pós-natais), dependendo do estágio de desenvolvimento do qual elas foram obtidas. O termo adulta é aplicado para aquelas células obtidas de qualquer organismo a partir do nascimento. As CTs dos animais adultos são tradicionalmente consideradas fundamentais para a manutenção dos órgãos e tecidos durante o ciclo normal das células. Cada tecido tem uma população residente de CTs, contribuindo para a linhagem celular onde está presente. No entanto, Blau, Brazelton e Weimann (2001)<sup>49</sup> sugerem que as CTs adultas podem contribuir na formação de diferentes linhagens celulares, surgindo assim o conceito de plasticidade celular.

Atualmente, há abundância de CTs adultas disponíveis para terapia celular. Faz algum tempo que as células mesenquimais da medula óssea, também conhecidas como células-tronco da medula óssea, têm sido estudadas com finalidade terapêutica<sup>50</sup>. Elas são definidas como células multipotentes capazes de

se diferenciar em variados tipos celulares mesenquimais<sup>51</sup>. Foram descritas inicialmente como precursoras de fibroblastos da medula óssea<sup>52</sup>. Também podem ser referidas como unidades formadoras de colônias de fibroblastos ou células do estroma medular<sup>53</sup>. Elas podem ser isoladas a partir de suspensões celulares aspiradas da medula óssea, e possuem características de clonogenicidade (habilidade de uma única célula em produzir uma colônia mesmo em baixas densidades)<sup>54</sup>. Há evidências de que as CTs mesenquimais não existem apenas na medula óssea<sup>55,56,57,58</sup>.

As células-tronco mesenquimais estão localizadas ao longo de todo o organismo<sup>55</sup>. Segundo da Silva Meirelles, Caplan e Nardi (2008), nos casos de injúria, ocorre a ruptura dos vasos sanguíneos próximos ou do próprio tecido lesado e há a liberação de CTs mesenquimais. Elas se dividem e secretam fatores bioativos com função de proteger ou reparar/regenerar o tecido danificado. Os produtos secretados pelas CTs mesenquimais no tecido lesado causam imunossupressão e inibem as células T e B, que mediam a destruição tecidual. Essa imunoproteção evita que o tecido perca sua resiliência, além de eliminar a questão auto-imune. Além disso, os produtos secretados têm efeito no local da injúria, limitando sua extensão, inibindo a cicatrização, estimulando a angiogênese/vasculogênese, e são mitóticos às células progenitoras intrínsecas do tecido. A implicação dessa hipótese é que toda zona perivascular de todos os tecidos é um nicho de células-tronco mesenquimais. Por isso, a diminuição da densidade vascular de alguns tecidos, com o aumento da idade, resultaria na diminuição da fonte desse tipo celular<sup>53</sup>.

### Células-tronco e a Odontologia

O principal potencial de diferenciação das CTs dentárias recai sobre a formação de dentina e dos tecidos associados ao periodonto, independente de essas células serem derivadas da polpa, do ligamento periodontal ou do folículo dentário. As CTs mesenquimais de origem dentária podem ser divididas em dois grupos distintos quanto ao potencial de diferenciação. O primeiro grupo associado à polpa dentária consiste nas CTs da polpa, do dente decíduo esfoliado e da papila apical; o segundo grupo abrange as CTs do ligamento periodontal e as células progenitoras do folículo dentário que estão relacionadas ao ligamento periodontal<sup>59</sup>.

O primeiro relato da identificação de CT no tecido pulpar ocorreu no ano de 2000 por Gronthos *et al.* (2000)<sup>60</sup>. Nesse estudo, foi isolada uma população de células clonogênicas com rápida capacidade proliferativa da polpa dentária humana de um dente permanente. Tais células apresentaram *in vitro* uma capacidade proliferativa comparável com a das células-tronco da medula óssea. Além disso, os autores demonstraram que elas tinham a capacidade de regenerar tecidos. A partir dessas características, foi possível concluir que essa população celular se tratava de CTs adultas. Após esse estudo, passou-se a utilizar a definição de células-tronco da polpa dentária (DPSC: *dental pulp stem cells*).

As DPSCs apresentam características similares às das células-tronco derivadas da medula óssea. Morsczeck *et al.* (2008)<sup>59</sup> relatam que ambos os tipos celulares são formadores de colônia. As células-tronco da polpa dentária têm ainda a capacidade de se diferenciar em células semelhantes aos odontoblastos.

Um estudo de DNA *microarray* comparou as DPSCs com células-tronco derivadas da medula óssea<sup>61</sup>. Os autores constataram que os grupos celulares avaliados possuem um nível similar de expressão gênica de mais de 4000 genes. Além do mais, alguns dos genes comuns são aqueles relacionados com o início do processo de mineralização, homeostase óssea e dentinogênese. Por fim, concluem que os mecanismos envolvidos para o desenvolvimento dentário são similares aos envolvidos com o desenvolvimento ósseo.

Takeda *et al.* (2008)<sup>62</sup> caracterizaram as DPSCs humanas. Estas células foram extraídas do germe de dentes com a formação coronária completa. Observaram que as células extraídas tinham um grande potencial de proliferação e de formação de matriz do tipo dentinária *in vivo*. Porém, estas características foram perdidas ao longo do tempo da cultura, com a mudança do perfil da expressão gênica. Esses resultados mostram que é necessário o preparo de uma maior quantidade de células para o uso em terapias regenerativas sem a perda da capacidade de diferenciação.

Em outro estudo, as DPSCs mostraram capacidade de diferenciação em adipócitos e células do tipo nervosas<sup>63</sup>. Em 2003, Shi e Gronthos (2003)<sup>64</sup> selecionaram células-tronco humanas da medula óssea e da polpa através do STRO-1 (marcador específico para células-tronco mesenquimais), e testaram a

expressão de antígenos presentes em células endoteliais, em células de músculo liso e nos pericitos. A partir dos resultados, os autores evidenciaram que as duas populações celulares selecionadas estão associadas com a microcirculação dos tecidos em que elas residem. Afinal, ambas apresentaram fenótipos consistentes com diferentes populações celulares da região perivascular.

O próximo grupo de CT a ser identificado foram as células-tronco do dente decíduo exfoliado (SHED: *stem cells from human exfoliated deciduous teeth*)<sup>65</sup>. Estas células foram cultivadas, tanto como células aderentes tipo fibroblastos, ou como CTs do tipo nervosas, formando neuroesferas. Além disso, elas apresentaram capacidade de diferenciação em odontoblastos, adipócitos e células neurais, induziram a formação de osso e produziram dentina *in vivo*. Tais células, quando comparadas com as células-tronco da medula óssea e da polpa dentária, apresentaram uma maior taxa de proliferação e uma maior capacidade de duplicação.

Ao se avaliar o potencial de diferenciação das DPSCs e das SHEDs, foi demonstrado que estas células têm a capacidade de se diferenciar em osteoblastos, condrócitos e adipócitos. Concluiu-se que as duas categorias celulares avaliadas são de uma fonte de fácil acesso e também capazes de prover células suficientes para aplicação clínica<sup>66</sup>.

A próxima classe de CTs mesenquimais a serem identificadas foram as células-tronco do ligamento periodontal (PDLSC: *periodontal ligament stem cells*), que foram extraídas da superfície radicular de dentes extraídos<sup>67</sup>. Elas foram isoladas como células formadoras de colônia, mas com um baixo potencial de diferenciação osteogênica *in vitro*. As PDLSCs se diferenciam em células e tecidos muito similares aos do periodonto. Apresentaram também a capacidade de regeneração tecidual e reparo periodontal<sup>67</sup>.

As células-tronco do folículo dentário (HDFC: *human dental follicle cells*), assim como as da medula óssea, são formadoras de colônia, e podem se diferenciar em células do tipo osteoblastos *in vitro*. Assim como as PDLSCs, as provenientes do folículo dentário podem igualmente se diferenciar, formando tecido conjuntivo e nichos de tecido mineralizado<sup>68,69</sup>.

Kémoun *et al.* (2007)<sup>70</sup> avaliaram o papel das proteínas morfogenéticas do osso (BMPs) na indução das HDFCs para a diferenciação em cementoblastos. Através da co-expressão do STRO-1 com os receptores das BMPs, foi possível evidenciar que as HDFCs são alvos potenciais para as BMPs. Os autores também realizaram testes, a fim de evidenciar o papel destas proteínas no processo de mineralização. Eles concluíram que havia um grande envolvimento das BMPs no desenvolvimento do periodonto, e que seu uso na terapia periodontal seria algo racional.

Uma nova classe de células-tronco foi isolada da papila apical de terceiros molares humanos e de incisivos de suínos (SCAP: *stem cells from the apical papilla*)<sup>42,58</sup>. Nesse último estudo, o marcador de superfície de células-tronco mesenquimais STRO-1 se mostrou positivo nas células da papila apical, o que é a primeira evidência da existência de células-tronco na região. Segundo Huang *et al.* (2008)<sup>14</sup>, essa linha de evidência sugere que as células da papila apical derivam de um tecido em desenvolvimento que representa uma população jovem de CT, ou seja, uma fonte superior de células para a regeneração de tecidos. Adicionalmente, isto evidencia o importante aspecto de que os tecidos em desenvolvimento podem conter CT diferentes dos tecidos já formados.

Apesar das SCAPs possuírem características similares às DPSCs, elas apresentaram comportamentos diferentes, ao se realizarem análises histológicas, imunohistoquímicas, celulares e moleculares. Nas revisões de literatura realizadas por Huang (2008)<sup>71</sup> e Friedlander, Cullinan e Love (2009)<sup>72</sup>, é relatado que as células tronco da PA são fonte de odontoblastos primários, responsáveis pela formação da dentina radicular, ao passo que as células-tronco da polpa dentária são fontes de odontoblastos de reposição.

Para se elucidar qual a função da PA, um dos mecanismos utilizados é remover esse tecido e determinar o quanto isso interfere no desenvolvimento radicular. Sonoyama *et al.* (2006)<sup>42</sup> realizaram um estudo utilizando mini-porcos, dos quais foi removida a PA de uma das raízes de um dos molares num estágio inicial de desenvolvimento. Esse procedimento interrompeu o desenvolvimento de tal raiz, apesar de o tecido pulpar permanecer intacto. Segundo os autores, a partir desse estudo, é possível especular, que as SCAPs, e não as DPSCs, são a fonte celular

dos odontoblastos primários.

A capacidade das SCAPs se diferenciarem em células produtoras de dentina tem sido testada em modelos animais<sup>42</sup>. Células-tronco da papila foram transplantadas em camundongos imunocomprometidos, utilizando-se partículas de hidroxiapatita e fosfato tricálcico como carreadores. Uma típica estrutura dentinária foi regenerada, sendo que uma camada de dentina foi formada na superfície de hidroxiapatita/fosfato tricálcico com tecido conjuntivo<sup>42</sup>.

Ao se fazer uma análise comparativa *in vitro* do potencial de diferenciação osteo e odontogênico das DPSCs e das SCAPs, foram encontradas diferenças notáveis entre os dois grupos celulares. As culturas de células da PA demonstraram uma alta capacidade de duplicação e padrão de crescimento; já as culturas de células pulpares apresentaram um crescimento mais lento e com uma maior diferença entre os seus fenótipos<sup>73</sup>.

Segundo os autores, a observação de células com diferentes morfologias não surpreende, uma vez que o método de dissociação enzimática libera todos os tipos celulares do tecido em questão. Em consequência disso, os autores também questionam o uso do termo de CT, pois, na realidade, não se trata de um grupo puro de células-tronco, mas, sim, culturas mistas, contendo diferentes tipos de células progenitoras. Por último, concluíram que tanto as células pulpares, quanto as da papila apical têm potencial de diferenciação em células do tipo odontoblasto, com bom potencial migratório e de mineralização, formando estruturas semelhantes à dentina *in vitro*. Além disso, o maior potencial de mineralização das células da PA é mais um aspecto a ser considerado<sup>73</sup>.

Em contrapartida, no estudo de Sonoyama *et al.* (2008)<sup>15</sup>, foi demonstrado que as células da papila e da polpa foram tão potentes quanto as células da medula óssea, mas apresentaram um menor potencial adipogênico. As SCAPs são similares às DPSCs quanto ao perfil gênico dos receptores osteo e dentinogênicos e dos fatores de crescimento. Os autores, enfim, concluíram que as SCAPs eram similares às pulpares, porém uma fonte diferenciada de CT.

Também foi investigado o potencial das células-tronco da papila apical de dentes humanos para a regeneração de tecido duro. Essas células foram

colonizadas em um meio promotor de mineralização, e apresentaram atividade de fosfatase alcalina em *scaffolds* porosos de hidroxiapatita. Os compostos de células-tronco da papila e hidroxiapatita foram implantados no subcutâneo de ratos imunocomprometidos. Após 12 semanas da implantação, os compostos exibiram a formação de osso e dentina nos poros de hidroxiapatita, através de avaliação histológica. Foi possível concluir que o dente humano com ápice imaturo é uma fonte efetiva de células para a regeneração de tecidos duros<sup>74</sup>.

Huang *et al.* (2010)<sup>75</sup> obtiveram sucesso na tentativa de regenerar tecido pulpar e dentinário através de terapia com CT. Células-tronco da polpa e da papila dentária de humanos foram isoladas, caracterizadas e cultivadas em *scaffolds* sintéticos. O conjunto formado foi inserido em fragmentos de canais radiculares que foram, então, transplantados em camundongos. A partir da análise dos resultados, foi observada a formação de tecido do tipo pulpar, vascularização e deposição de um tecido semelhante à dentina. Esse estudo comprovou ser possível a obtenção da regeneração do tecido pulpar através de CTs dentro do canal radicular.

As células-tronco da papila apical são mais positivas para a telomerase, que está presente em células-tronco embrionárias, em relação às células-tronco da polpa e a outras células-tronco mesenquimais. Sugerindo que são uma fonte de células bastante imaturas para a regeneração de tecidos duros<sup>42</sup>.

As células-tronco mesenquimais normalmente ficam em estado não proliferativo, quiescente, até que sejam estimuladas por sinais liberados pelos tecidos lesados ou em remodelação<sup>76</sup>. Elas entram no ciclo celular quando são isoladas e expostas a meios de cultura<sup>15</sup>.

A descoberta das SCAPs pode ser a explicação para um fenômeno clínico que tem sido apresentado em uma série relatos de caso. A apicigênese tem sido obtida em dentes com rizogênese incompleta e necrose pulpar associada ou não à lesão periapical<sup>4,72</sup>. É possível que as SCAPs sobrevivam à infecção devido à proximidade aos tecidos periapicais. Estes tecidos poderiam ser beneficiados pela circulação colateral, o que permitiria a sua sobrevivência durante o processo de necrose pulpar. Talvez, após a desinfecção endodôntica, tais células dariam origem a novos odontoblastos que seriam responsáveis por completar a formação radicular<sup>11,71,77,78</sup>. Todavia, deve ser salientado que a infecção prolongada pode levar

à total necrose da PA. Dessa forma, não poderia ocorrer a apicigênese e a revascularização do canal radicular<sup>71</sup>. Nessa condição, alguns casos têm mostrado a ocupação do canal radicular por cimento, tecido ósseo e ligamento periodontal, não significando revascularização<sup>79,80</sup>. Mais pesquisas são necessárias com o intuito de se avaliar as características do tecido que faz o preenchimento do canal radicular após os procedimentos ditos de revascularização<sup>11</sup>.

O estudo de Wang *et al.* (2010)<sup>81</sup> avaliou os tipos de tecidos formados no canal radicular de dentes de cães com lesão periapical após a desinfecção com uma pasta poli-antibiótica. Os resultados mostraram o aumento da espessura das paredes dentinárias pela aposição interna de um tecido neo-formado semelhante ao cimento. O aumento do comprimento radicular também ocorreu em função da deposição de cimento independente da presença de reação inflamatória. Além disso, foi constatada a formação de tecido do tipo ósseo e periodontal no canal radicular. Por fim, os autores concluem que os procedimentos de revascularização em dentes com necrose pulpar e rizogênese incompleta permitem a formação tecidual, exceto de tecido pulpar. Por isso, o resultado do procedimento de revitalização não deve ser considerado regeneração, mas sim, reparo.

A questão que permanece é esta: quais os sinais do meio e qual o nível crítico inflamatório necessário para favorecer a migração de células através do ápice aberto, afim de haver deposição de dentina, cimento e/ou osso alveolar<sup>72</sup>?

## 2.4 ESTÁGIO ATUAL DO TRATAMENTO DOS DENTES COM RIZOGÊNESE INCOMPLETA

A injúria irreversível ao tecido pulpar de um dente com rizogênese incompleta causa a interrupção do desenvolvimento radicular e impede a realização do tratamento endodôntico convencional. Entretanto, algumas observações clínicas dos estudos citados anteriormente<sup>2,3,4</sup> têm mostrando que a apicigênese pode ocorrer em dentes com necrose pulpar.

Além da continuidade da formação radicular, a revascularização também é desejada. O princípio da revascularização é a obtenção de uma matriz tecidual capaz de promover o crescimento de novas células, de forma que a vitalidade pulpar possa ser restabelecida. Os protocolos de revascularização estão baseados nas



observações de reimplantes ou auto-transplantes de dentes de forma experimental em animais. Nesses casos, a polpa necrosada, porém livre de infecção, provém de uma matriz na qual as células do periápice crescem, ocorrendo a revascularização e substituindo, aos poucos, o tecido necrosado<sup>82,83</sup>.

Muitos dentistas modificaram a técnica de tratamento de dentes com rizogênese incompleta e necrose pulpar com base em experiência clínica. Alguns realizam seus casos através de meios empíricos, sendo que alguns deles têm demonstrado maior aceitação pela comunidade endodôntica<sup>11</sup>. O primeiro caso foi relatado por Iwaya, Ikawa e Kubota (2001)<sup>2</sup>, apresentando um pré-molar inferior com fístula e radiolucidez periapical, onde foi aplicada uma pasta antibiótica com função exclusiva de desinfecção. O mesmo foi aplicado por Banchs e Trope (2004)<sup>3</sup>. Mais tarde, Chueh e Huang (2006)<sup>4</sup> relataram quatro casos de pré-molares inferiores com a mesma condição clínica, e foram tratados com o uso de hidróxido de cálcio, todos os casos apresentaram reparo e fechamento apical. Esses casos acabaram gerando outros relatos<sup>1,13,83</sup>.

Um dos protocolos de tratamento sugeridos está baseado na indução de hemorragia, com o propósito de preencher o canal com um coágulo sanguíneo que serviria de *scaffold*. Este procedimento permitiria a formação de tecido vivo no espaço do canal radicular, prosseguindo com a formação da raiz (tanto em comprimento, quanto em espessura das paredes)<sup>1,3,84</sup>. O estudo de Lovelace et al. (2011)<sup>85</sup> demonstra, através de RT-PCR (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) e imunocitoquímica, que a indução do coágulo gera a liberação de células-tronco no sistema de canais radiculares. Além disso, os níveis dos marcadores moleculares (CD73 e CD105) presentes no coágulo são superiores aos encontrados no sangue coletado dos pacientes em que o procedimento foi realizado.

Um dos mais importantes obstáculos para a regeneração do tecido pulpar é a obtenção de células tronco com capacidade de divisão contínua, ou de tecido pulpar, que poderia ser implantado no sistema de canais radiculares<sup>8</sup>. Estudos na área de terapias regenerativas precisam ser conduzidos, afim de estabelecerem métodos confiáveis e seguros para todos os dentes que necessitem de tratamento endodôntico<sup>8</sup>.

Assim como Sonoyama *et al.* (2008)<sup>15</sup>, o estudo de Xu *et al.* (2009)<sup>86</sup> avaliou o potencial de formação radicular após a remoção dos tecidos apicais de molares de ratos jovens. Foi observado que as células cultivadas do tecido removido mantiveram a capacidade de desenvolvimento radicular, formando raízes bem estruturadas e com os tecidos de suporte após o seu transplante em ratos. Uma das questões discutidas com relação aos resultados dessa pesquisa é a intensa marcação das células na região pelo marcador de células mesenquimais Stro-1. Segundo os autores, isso seria o indício de identificação das SCAPs.

Os mesmos autores<sup>86</sup> também observaram uma intensa condensação celular próxima à BEH, indicando uma forte interação entre células e entre as células e a matriz extracelular. Outro aspecto constatado foi a persistência de intensa vascularização durante o desenvolvimento radicular, o que confere ao complexo a vantagem de maior nutrição e a presença de células jovens. Dessa forma, a região apical ganha características embrionárias, pois contém células com capacidade de diferenciação para a formação da raiz e do periodonto, e também oferece um local próprio para a formação dessas estruturas. Por essa razão, os autores concluíram que esse conjunto de tecidos apicais atuaria como um centro de desenvolvimento, permitindo o futuro desenvolvimento da raiz e do periodonto.

Na busca de meios adequados para a proliferação das células e de fatores que estimulem a diferenciação celular em odontoblastos, inúmeras técnicas têm sido testadas. A aplicação de fatores angiogênicos foram testados por Mullane *et al.* (2008)<sup>87</sup>, a fim de aumentar o suporte vascular. Essa hipótese foi baseada na criação de um meio favorável para o reparo<sup>87</sup>. Também já foi testado, com sucesso, o uso do plasma rico em plaquetas como um *scaffold* para a revitalização de dentes necrosados<sup>88</sup>.

## 2.5 IDENTIFICAÇÃO DO POTENCIAL DE REGENERAÇÃO TECIDUAL

A forma de definir e identificar uma célula-tronco tem evoluído constantemente, mas ainda não há um consenso sobre um método dito “padrão ouro” para este tipo de identificação<sup>49,89</sup>. Para ambas as células-tronco, embrionárias ou adultas, diferentes marcadores têm sido descritos. Alguns, como a fosfatase alcalina, são comuns aos diferentes tipos celulares<sup>54,90,91,92,93</sup>, porém, ainda faltam marcadores específicos para a identificação exclusiva de uma determinada célula

completamente indiferenciada ou de uma linhagem semelhante<sup>94,95</sup>.

As células-tronco mesenquimais residem em uma variedade de tecidos, mas foram inicialmente descobertas no estroma da medula óssea. Estas células continuam sendo o padrão para a identificação de marcadores celulares de células-tronco<sup>96,97</sup>. Células-tronco adultas são multipotentes e podem ser classificadas conforme a sua origem: hematopoiéticas ou mesenquimais ou conforme o potencial de diferenciação. As CTs mesenquimais compartilham uma série de marcadores com as células hematopoiéticas, por isso, mostra-se importante a identificação de marcadores específicos para as células mesenquimais. O STRO-1 (antígeno fator-1 derivado do estroma) é um marcador imperativo para o isolamento e identificação de células-tronco mesenquimais. O anti-STRO-1 reage com o antígeno de superfície celular dessas células, e é minimamente reativo com as células hematopoiéticas<sup>72</sup>.

Segundo Murray, Garcia-Godoy e Hargreaves (2007)<sup>8</sup>, as células-tronco podem ser identificadas e isoladas de populações celulares mistas, através de quatro técnicas comuns: marcação das células com anticorpos específicos associada a um citômetro de fluxo, seleção imunomagnética, marcação imunoistoquímica e critérios fisiológicos e histológicos, incluindo o fenótipo, quimiotaxia, proliferação, diferenciação e atividade mineralizadora.

### Stro-1

O STRO-1 é um antígeno de superfície celular expresso por células precursoras do estroma da medula óssea<sup>98</sup>. A população celular que for positiva ao anticorpo anti-STRO-1 está relacionada à presença de células-tronco mesenquimais<sup>99</sup>. Células positivas ao anti-STRO-1 na medula óssea humana têm a capacidade de auto-renovação e diferenciação em células de músculo liso, adipócitos, osteoblastos e condrócitos<sup>100,101</sup>; contudo, ele não é positivo para as células de origem hematopoiética<sup>98</sup>. Essas células já foram localizadas através da marcação na polpa dentária, no ligamento periodontal e na medula óssea. No entanto, o gene, a estrutura molecular e a função do antígeno STRO-1 ainda não foram completamente definidas<sup>99</sup>.

Em um estudo realizado por Kaneko *et al.* (2009)<sup>99</sup> para investigar a imunolocalização do STRO-1 em dentes de rato em desenvolvimento, foi constatada

marcação positiva em células da medula óssea. Alguns odontoblastos e células pulpare também se mostraram reativos na região da coroa no final do desenvolvimento dentário. Imunomarcação por STRO-1 também foi observada em odontoblastos e células pulpare durante a formação radicular. As células pulpare da coroa mostraram marcação menos intensa que as da raiz; as células pulpare da região apical não foram marcadas. Algumas células pulpare e perivasculares se mantiveram positivas no estágio final de formação radicular. Da mesma forma, osteoblastos, cementoblastos e células do ligamento periodontal foram imunoreativas. Os autores sugerem que o STRO-1 está relacionado com a diferenciação de células mesenquimais e formação da matriz dos tecidos dentários. Além disso, não foi constatada a identificação de células pulpare positivas ao STRO-1 próximas à BEH.

Diferente desse resultado, Sonoyama *et al.* (2008)<sup>15</sup> identificaram, em dentes humanos em desenvolvimento, a expressão de STRO-1 nas células da papila apical. Em função disso, os autores concluem que, na papila apical, residem células-tronco mesenquimais, uma vez que elas expressaram variados marcadores para este tipo celular. Além disso, tais células foram capazes de se diferenciar em células do tipo odontoblastos e de produzir dentina *in vitro*. Houve co-expressão do STRO-1 com marcadores dentinogênicos como a sialofosfoproteína do osso, a osteoclastina e os fatores de crescimento FGFR1 (*Fibroblast Growth Factor Receptor 1*) e TGFβRI (*Transforming Growth Factor-β Receptor Type 1*). Esse achado sugere que as células marcadas são a origem de odontoblastos primários que formam a dentina radicular.

Outro estudo realizado em ratos que teve como objetivo investigar as características histológicas e a capacidade de desenvolvimento da região periapical mostrou um grande número de células positivas ao STRO-1. Em vista disso, os autores levantam a hipótese de que as possíveis propriedades das células-tronco da papila apical e da BEH facilitariam a correta morfogênese do complexo periapical em desenvolvimento<sup>86</sup>.

Enquanto isso, Miura *et al.* (2003)<sup>65</sup> avaliou as SHEDs e, as mesmas apresentaram marcação tanto para o STRO-1 quanto para CD 146, que também é um marcador de células mesenquimais precursoras. Essas células positivas aos

anticorpos em questão estavam localizadas próximas aos vasos sanguíneos do tecido pulpar remanescente. Os autores concluíram que as células-tronco de dentes decíduos esfoliados poderiam ter origem na região perivascular<sup>65</sup>. O mesmo tipo de marcação foi encontrado nas células do ligamento periodontal<sup>67</sup>.

### Fatores de Crescimento

Fatores de crescimento e fatores morfogênicos são proteínas que se ligam a receptores de membrana específicos e iniciam uma série de sinalizações que coordenam as funções celulares. Muitos fatores de crescimento são versáteis, estimulando a divisão celular em diferentes tipos celulares, enquanto outros são mais específicos. Essas moléculas têm um papel importante durante o desenvolvimento, guiando os processos que determinam em que se diferenciarão as CTs e regulando a geração de todos os tecidos e órgãos do embrião em desenvolvimento. Da mesma forma, essas moléculas têm um papel importante nos processos fisiológicos de regeneração tecidual como, por exemplo, a resposta pulpar frente à progressão da cárie. O mesmo fator de crescimento que guia a embriogênese e a regeneração tecidual pode ser usado de forma terapêutica, de modo a estimular células-tronco na diferenciação em um determinado tipo celular, além de coordenar processos celulares que resultariam na geração de um novo tecido ou órgão, através da engenharia de tecidos<sup>22,72,102</sup>.

A morfogênese e a histogênese da raiz do dente ocorrem a partir de trocas sincronizadas, sequenciais e muitas vezes recíprocas entre o epitélio e o mesênquima nos sucessivos estágios de desenvolvimento<sup>17</sup>. Esses eventos devem ser facilitados pela expressão de famílias de moléculas sinalizadoras<sup>103,104</sup>, ou ocorrem como resultado de interações indutivas<sup>104</sup>. Certa quantidade de genes e seus produtos têm sido identificados como os sinalizadores para a comunicação celular entre o ectoderma e o mesênquima da papila dental e do folículo dentário, que são necessários para o desenvolvimento radicular<sup>103,105</sup>.

Muitos estudos têm sido conduzidos para demonstrar que os fatores de crescimento, incluindo as BMPs e o TGF- $\beta$  (*transforming growth factor*- $\beta$ ) são expressos no mesênquima dentário e mediam as interações recíprocas entre o epitélio e o mesênquima durante o desenvolvimento do dente<sup>17,106,107</sup>.

## BMP-4

As proteínas morfogenéticas do osso pertencem à superfamília dos fatores de crescimento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), que estão amplamente relacionadas com a formação dos tecidos<sup>108</sup>. Elas foram identificadas originalmente em regiões ósseas pela sua habilidade de estimular a formação de osso em partes intra e extra esqueléticas *in vivo*<sup>109</sup>.

As BMPs influenciam a apoptose, a proliferação e a diferenciação celular<sup>110</sup>. Diferentes genes responsáveis pela codificação das BMPs são expressos durante o desenvolvimento dentário<sup>111</sup>. As BMP-2 e/ou BMP-4 têm mostrado a capacidade de mimetizar algumas das funções de sinalização do epitélio dentário e do mesênquima durante o início da formação do dente<sup>103</sup>.

A BMP-4 está envolvida com a mediação da interação entre o epitélio e o mesênquima, tendo papel no controle da morfogênese do dente<sup>111</sup>. Tanto a BMP-4, quanto a BMP-2 têm se mostrado indutoras da diferenciação de odontoblastos<sup>112</sup> e ameloblastos<sup>113</sup>. Além do mais, as BMPs são utilizadas para estimular as células-tronco para a síntese e secreção de matriz e indução da mineralização do osso<sup>8</sup>.

Ao se tratar SHEDs com BMP-4, foi constatada a expressão de CBFA1 (Fator de transcrição para a formação óssea), Osterix (Fator de transcrição para a diferenciação de osteoblastos) e osteocalcina (Proteína óssea e dentinária), através de RT-PCR semi-quantitativo. Segundo os autores, isso indica que estas CT têm a habilidade de se diferenciar em células do tipo odontoblastos *in vitro*<sup>65</sup>.

Apesar de a BEH possuir uma importante função na formação da raiz dentária, os mecanismos que controlam o crescimento e a diferenciação da BEH ainda não estão elucidados. A BMP-4, que é secretada por células mesenquimais, atua no epitélio dentário como uma reguladora da diferenciação celular durante a formação da coroa dentária<sup>36</sup>. Durante a formação dentária, a BMP-4 está expressa no mesênquima próximo à BEH, porém as demais BMPs são raramente detectadas nessa região<sup>114</sup>.

Com o objetivo de determinar se a BMP-4 regularia o desenvolvimento da BEH no epitélio dentário, foi realizado um estudo para localizar a BMP-4 e os seus receptores (BMPR-IB e BMPR-II) durante o período de formação da raiz do molar do

rato. Após a avaliação, foi constatada a presença de células positivas para os marcadores utilizados na papila dental ao redor da BEH, sugerindo, assim, a participação do BMP-4 na formação da BEH, especialmente no controle do crescimento radicular. Certamente, outras moléculas estão relacionadas com o desenvolvimento da BEH, mas a BMP-4 seria a candidata mais forte para ser considerada como um regulador da raiz dentária em formação<sup>36</sup>.

Também foi demonstrado que, durante o desenvolvimento dentário, a BMP-4 não é sintetizada apenas pelas células da BEH<sup>115</sup>, mas igualmente pelos ameloblastos<sup>111</sup> e pelos cementoblastos diferenciados<sup>114</sup>. Por isso, segundo Kémoun *et al.* (2007)<sup>70</sup>, estes dados sugerem que as BMPs estão envolvidas na diferenciação de osteoblastos e cementoblastos, no desenvolvimento do periodonto e no reparo.

O desenvolvimento inicial do dente parece depender da sinalização das BMPs, especialmente a BMP-4 do ectoderma, que ativa a BMP-4 no mesênquima, através do mecanismo dependente do gene *Msx1*. Para se saber exatamente o papel dessa proteína no processo, seria necessária a anulação do gene da BMP-4. Entretanto, a ausência completa do gene é letal no período embrionário<sup>116</sup>. Por essa razão, foi realizado um estudo em que o gene do BMP-4 foi removido de forma seletiva apenas dos precursores do mesênquima ou nos estágios pré-odontoblásticos. A ausência desse gene nos odontoblastos e osteoblastos próximos resultou em defeitos permanentes da citodiferenciação do dente e dos tecidos periodontais. Foi constatada redução da espessura da dentina e aumento do volume da câmara pulpar. Tanto a dentina coronária, quanto a radicular, estava de 30 a 40% reduzida entre os períodos avaliados: de 6 a 12 dias de vida até os nove meses da idade. Também foi constatada redução da radiopacidade do esmalte, amelogênese e dentinogênese imperfeitas e uma menor quantidade de osso alveolar. O estudo demonstrou que a BMP-4 é importante para o desenvolvimento dentário entre o período do nascimento e os 20 primeiros dias de vida e para a maturação do dente durante o primeiro ano<sup>117</sup>.

Na avaliação histológica do estudo anterior, os autores observaram a presença de odontoblastos com atrasos na diferenciação e pouco polarizados, observando-se a presença de menor quantidade de pré-dentina e túbulos dentinários muito finos em relação ao grupo controle. Essas características foram

constatadas, tanto na região coronária, quanto na radicular. Ou seja, a eliminação do gene da BMP-4 nos estágios de pré-odontoblastos gerou defeitos permanentes no desenvolvimento dentário<sup>117</sup>.

A partir do sucesso relatado em diferentes casos clínicos<sup>1,2,3,4,13,83</sup> no tratamento de dentes com rizogênese incompleta e necrose pulpar e, com base nos estudos realizados a respeito da presença de células-tronco nos tecidos dentários, é possível esperar que essas células sejam as responsáveis pela continuação da formação radicular. Todavia, é necessário avaliar o impacto do processo inflamatório, gerado pela necrose pulpar, sobre as células-tronco.



### 3 PROPOSIÇÃO

#### Objetivo geral

Fazer uma avaliação morfológica e detectar a localização do STRO-1 e do BMP4 nos tecidos pulpar e periapical de molares de ratos com a polpa vital e expostos ao meio bucal durante o desenvolvimento radicular.

#### Objetivos específicos

- Descrever as células da polpa e do periápice nos dentes com polpa vital e expostos ao meio bucal durante o desenvolvimento radicular;
- Avaliar a formação radicular dos dentes nos diferentes grupos e periodos;
- Avaliar a reação tecidual e a resposta inflamatória nos dentes com polpa vital e expostos ao meio bucal durante o desenvolvimento radicular;
- Avaliar os eventos de reabsorção dos dentes nos diferentes grupos e periodos;
- Imunolocalizar o BMP4 e o STRO-1 na polpa e nos tecidos perirradiculares nos dentes com polpa vital e expostos ao meio bucal durante o desenvolvimento radicular.

## 4 MÉTODOS

### 4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este trabalho foi estruturado seguindo princípios do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) (anexo 1) e submetido à Comissão de Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Comitê de Ética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Projeto número 19001). Foram respeitados os preceitos da Lei N° 11.794, de 08 de outubro de 2008 (anexo 2).

### 4.2 ANIMAIS

Foram utilizados os primeiros molares inferiores (lado direito para o grupo controle e lado esquerdo para o grupo teste) de 24 ratos machos da linhagem Wistar com quatro semanas de idade, provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CREAL). Os animais foram mantidos no mesmo local, com temperatura controlada ( $22 \pm 1$  °C) e ciclo claro-escuro de 12 h. Eles foram mantidos em gaiolas (dois animais por gaiola) apropriadas para roedores, preenchidas com maravalha de pinus, trocada 3 vezes por semana. Foram fornecidas ração e água filtrada *ad libitum*. Os experimentos foram conduzidos em sala equipada com os equipamentos odontológicos necessários. Durante os procedimentos experimentais, a temperatura da sala foi mantida em  $22 \pm 1$  °C. Foi utilizado um tempo mínimo de adaptação ao novo ambiente de pelo menos 1 h, no qual os animais continuaram com livre acesso à água e à ração.

### 4.3 ANESTESIA

Os procedimentos experimentais foram realizados sob anestesia com mistura de Cloridrato de Cetamina 10% (Syntec, Rhobifarma Indústria Farmacêutica Ltda., Hortolândia, São Paulo, Brasil) – 80 mg/kg de peso e Cloridrato de Xilazina 2% (Syntec, Rhobifarma Indústria Farmacêutica Ltda., Hortolândia, São Paulo, Brasil) – 20mg/kg de peso, administrada por via intraperitoneal com a orientação de um médico veterinário. Ao final dos procedimentos, os animais passaram por um período de recuperação no laboratório, onde foram observados em relação a qualquer alteração comportamental antes de retornarem ao biotério.

#### 4.4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Para o posicionamento e abertura da boca dos animais, foi confeccionado um abridor, a partir de fio ortodôntico metálico 0.8 (Figura 1) conforme descrito por Scarparo *et al.* (2011)<sup>118</sup>. Durante a execução do procedimento de abertura coronária, a mucosa jugal e a língua do animal foram afastadas com o auxílio de uma pinça clínica (Duflex, SS White, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e foi feita a aspiração dos resíduos com uma cânula de aspiração adaptada a um terminal de sugador (BD Brasil, São Paulo, SP, Brasil).

##### Grupo Teste (T):

A fim de induzir necrose pulpar e a formação de lesão periapical, foi realizada a exposição pulpar dos primeiros molares inferiores esquerdos, em condições não-assépticas. Para tanto, foi utilizada ponta diamantada esférica # 1011 de haste longa (KG Sorensen, Cotia, SP, Brazil) em alta rotação e sem refrigeração, penetrando a face oclusal. A polpa foi deixada exposta ao ambiente oral durante três semanas e a presença de lesão periapical foi confirmada por meio de radiografias periapicais.

##### Grupo Controle (C):

Os molares inferiores do lado direito não sofreram intervenção. Estes dentes fazem parte do grupo controle que consiste na avaliação da rizogênese com polpa viva.

#### 4.5 EUTANÁSIA

A eutanásia desses animais (seis por período) foi realizada por inalação de gás carbônico nos tempos de 7, 10, 13 e 16 semanas de vida (o equivalente a 3, 6, 9 e 12 semanas após a intervenção) contemplando todo o período de formação radicular<sup>119</sup>.

#### 4.6 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DAS PEÇAS

Imediatamente após a eutanásia, as mandíbulas foram dissecadas e fixadas em Formalina Neutra Tamponada a 10% pelo período de 24 horas.

A seguir, foram descalcificadas em solução de ácido etilenodiamino tetracético (EDTA 17%, pH 8), sendo que a solução foi renovada diariamente pelo período de 30 dias. Por fim, as peças foram desidratadas em concentrações ascendentes de álcool e embebidas em parafina.

Foram realizados cortes de 5µm de espessura, obtidos com o auxílio de um micrótomo (Leica, SM 2000R, Alemanha). Foram selecionadas 3 secções de cada amostra onde era possível visualizar as raízes e região periapical. Os cortes foram colocados em lâminas pré-tratadas com *Histogrip* (Zymed, USA). Parte das lâminas foi corada em HE para a análise histológica, e a outra parte foi processada para imunohistoquímica.

De cada amostra, foram selecionados os cortes que permitiam a visualização da polpa coronária, radicular e da região periapical. A análise dos cortes histológicos foi realizada por um examinador treinado, seguindo delineamento cego.

Foi utilizado microscópio óptico (Olympus BX-41TF, Olympus Optical Company LTDA., Japão), em aumentos de 40, 100, 200 e 400 vezes.

#### 4.7 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA QUALITATIVA:

Os seguintes critérios foram avaliados:

##### Infiltrado inflamatório periapical:

- 0 - ausente (ausência de reação inflamatória);
- 1 - suave (presença de mononucleares esparsos);
- 2 - moderado (presença de infiltrado mononuclear e/ou presença de neutrófilos e eosinófilos esparsos restritos ao canal radicular);
- 3 - severo (presença de infiltrado polimorfonuclear, neutrófilos e/ou eosinófilo, com presença de áreas de formação de abscesso nos tecidos perirradiculares).

##### Características do tecido pulpar:

- Células inflamatórias ausentes (0) ou presentes (1);

- Odontoblastos saudáveis (0) ou ausentes (1);
- Vascularização suave (0) ou intensa – simulando hiperemia (1);
- Degeneração pulpar (cálcia e hialina) ausente (0) ou presente (1);
- Completa destruição do tecido pulpar ausente (0) ou presente (1);
- Reação imunohistoquímica.

Demais fenômenos:

- Os fenômenos de reabsorção no tecido radicular foram categorizados em ausente (0) ou presente (1).
- Evidências histológicas de fechamento do forame apical, categorizado em fechado (0) ou aberto (1).

#### 4.8 ANÁLISE DA IMUNOHISTOQUÍMICA:

Para processamento de imunohistoquímica, a exposição do antígeno, através da metodologia de recuperação antigênica induzida por calor à alta temperatura foi realizada pela imersão das lâminas em cubas de Coplin, com tampão de recuperação *Dako Target Retrieval Solution*, pH 6 (Dako, Carpinteria, CA, EUA), colocados em banho maria, em temperatura de 100°C por 40 minutos e logo resfriados por 20 minutos em temperatura ambiente.

Após esse período, foi realizada a lavagem das lâminas em tampão PBS, pH 7.2. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com solução de 3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em álcool metílico em duas incubações de 15 minutos seguidos de três ciclos de lavagem com tampão PBS, pH7.2.

O bloqueio das ligações inespecíficas foi realizado com a solução comercial *Protein Block Serum-Free* (Dako, Carpinteria, CA, EUA) por 30 minutos em temperatura ambiente.

Os cortes foram incubados pela metodologia de capilaridade, através da estação de imuno-coloração *Sequenza* (Thermo Scientific, Waltham MA, EUA), *overnight*, em temperatura entre 2°C e 6°C, e diluídos em solução de diluição (Antibody Diluent with background reducing componentes, Dako,

Carpinteria, CA, EUA) para os seguintes anticorpos: BMP-4 (Novocastra, Newcastle, Northumberland, Reino Unido) 1:100, Anti-STRO-1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) 1:100. É necessário ressaltar que o anticorpo STRO-1 utilizado é *anti-human* pois, não existe na forma *anti-rat*. Após a incubação com o anticorpo primário, os cortes foram lavados por 3 passagens de tampão PBS, pH7.2.

Para amplificação da reação antígeno-anticorpo, utilizou-se o sistema *Picture Max, HRP Polymer Conjugate Broad Spectrum* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. A seguir, as lâminas foram lavadas com tampão PBS, pH7.2 e incubadas com solução de diaminobenzidina (Dako Liquid DAB Substrate Chromogen System, Dako, Carpinteria, CA, EUA) por 5 minutos.

Após lavagem em água destilada, as lâminas foram contra-coradas com Hematoxilina de Harris por 1 minuto, seguido de lavagem em água corrente, até remoção completa do corante, e incubadas em um solução de amônia 37mM por 15 segundos. Para finalizar, as lâminas foram desidratadas em álcool etílico absoluto (quatro incubações de 2 minutos), e, após foram feitos dois tratamentos com xileno por 5 minutos. As lâminas foram montadas com meio sintético *Entellan* (Merck, Whitehouse Station, NJ, EUA).

Os controles negativos foram secções encubadas com soro não imunizado das respectivas amostras onde os anticorpos primários foram obtidos. O controle positivo para o BMP-4 foi obtido de amostra de osso alveolar. Já o controle positivo para o STRO-1 foram células do cordão umbilical.

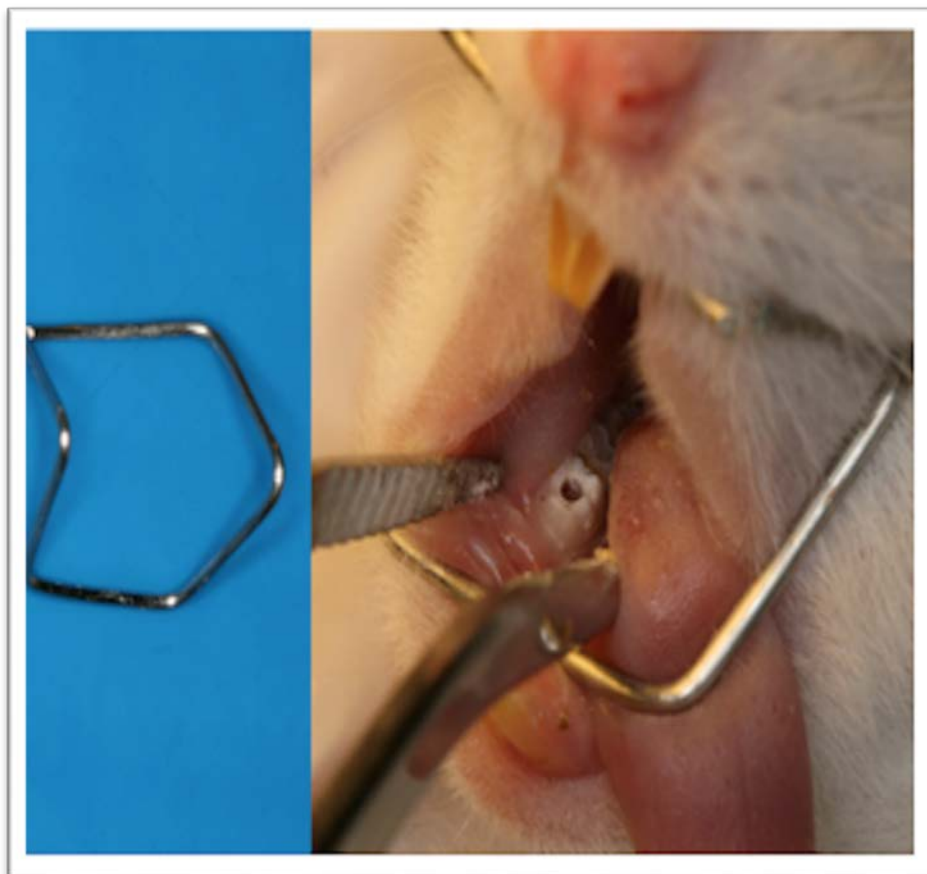
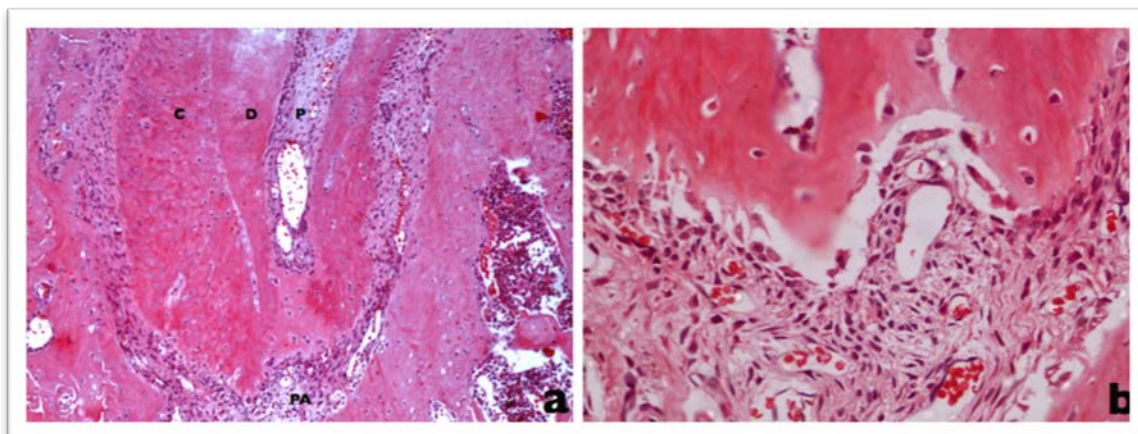


FIGURA 1. Abridor de boca e posicionamento do mesmo no animal <sup>118</sup>.

## 5 RESULTADOS

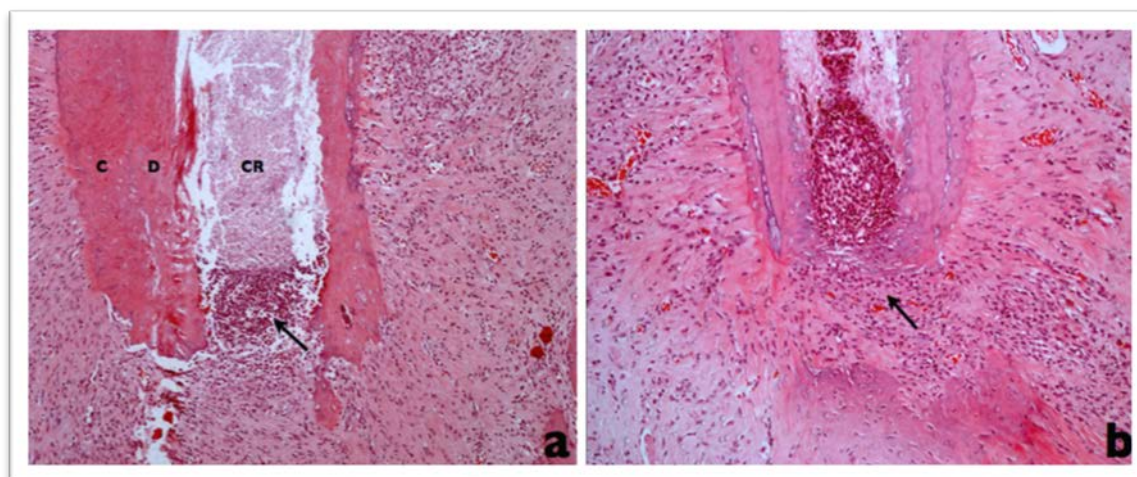
Os grupos teste (T = expostos ao meio bucal) e os grupos controle (C = polpa viva) foram comparados conforme as características histológicas descritas anteriormente.

Ao se avaliar o infiltrado inflamatório, foi constatada a ocorrência de necrose pulpar em todos os dentes do grupo teste com predominância dos escores 2 e 3 (Figuras 3 e 4). Estes escores estão caracterizados pela presença de células inflamatórias do tipo polimorfonucleares e formação de zonas de abscesso. No grupo controle (Figura 2), não foi verificada a presença de infiltrado inflamatório em nenhum dos espécimes.

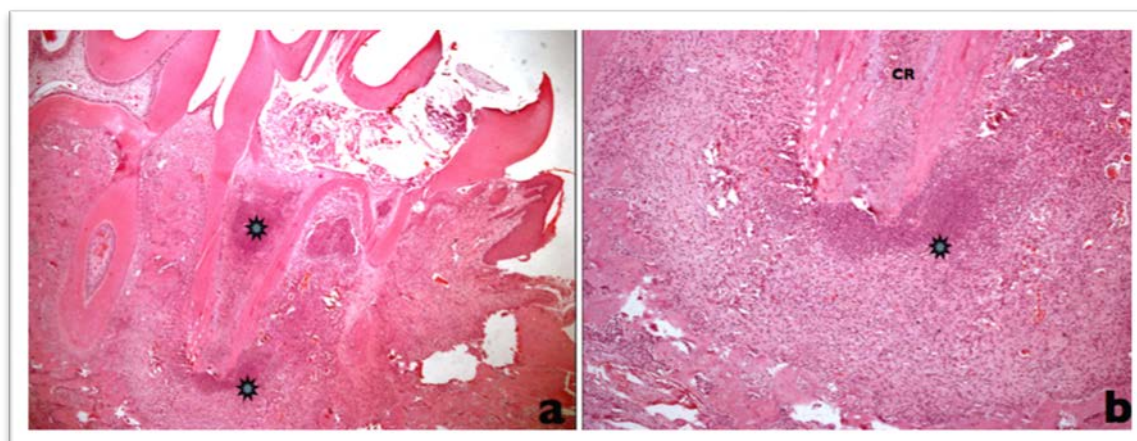


**FIGURA 2.** Aspecto do periápice referente ao escore 0: ausência de células inflamatórias. **a** – espécime do período de 10 semanas, grupo controle (100x). **b** – espécime do período de 10 semanas, grupo controle (400x). Legenda – C: cimento; D: dentina; P: polpa; PA: periápice.



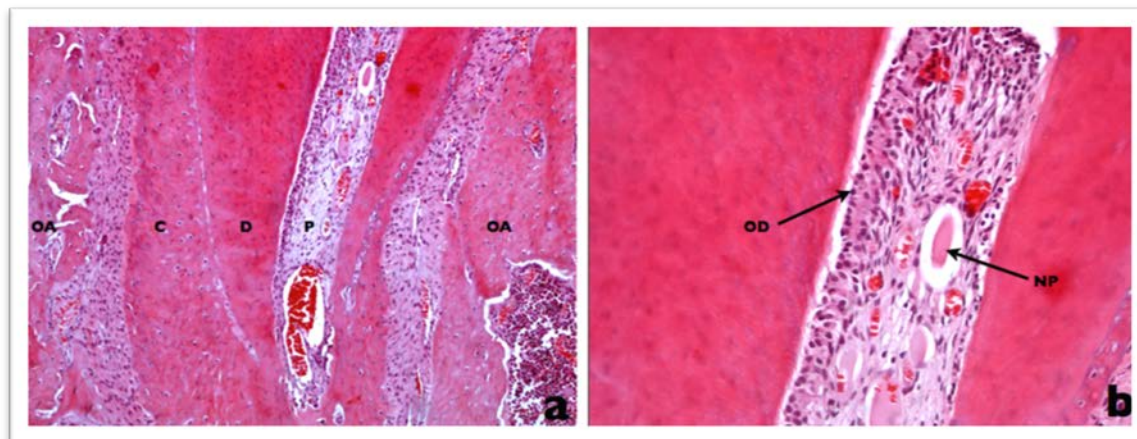


**FIGURA 3.** Aspecto do periápice referente ao escore 2: infiltrado inflamatório moderado, com infiltrado inflamatório restrito ao canal radicular. **a** – espécime do período de 16 semanas, grupo teste. A seta aponta para o infiltrado restrito ao canal (100x). **b** – espécime do período de 10 semanas, grupo teste. A seta aponta para a região periapical sem alteração (200x). Legenda – C: cimento; D: dentina; CR: canal radicular.



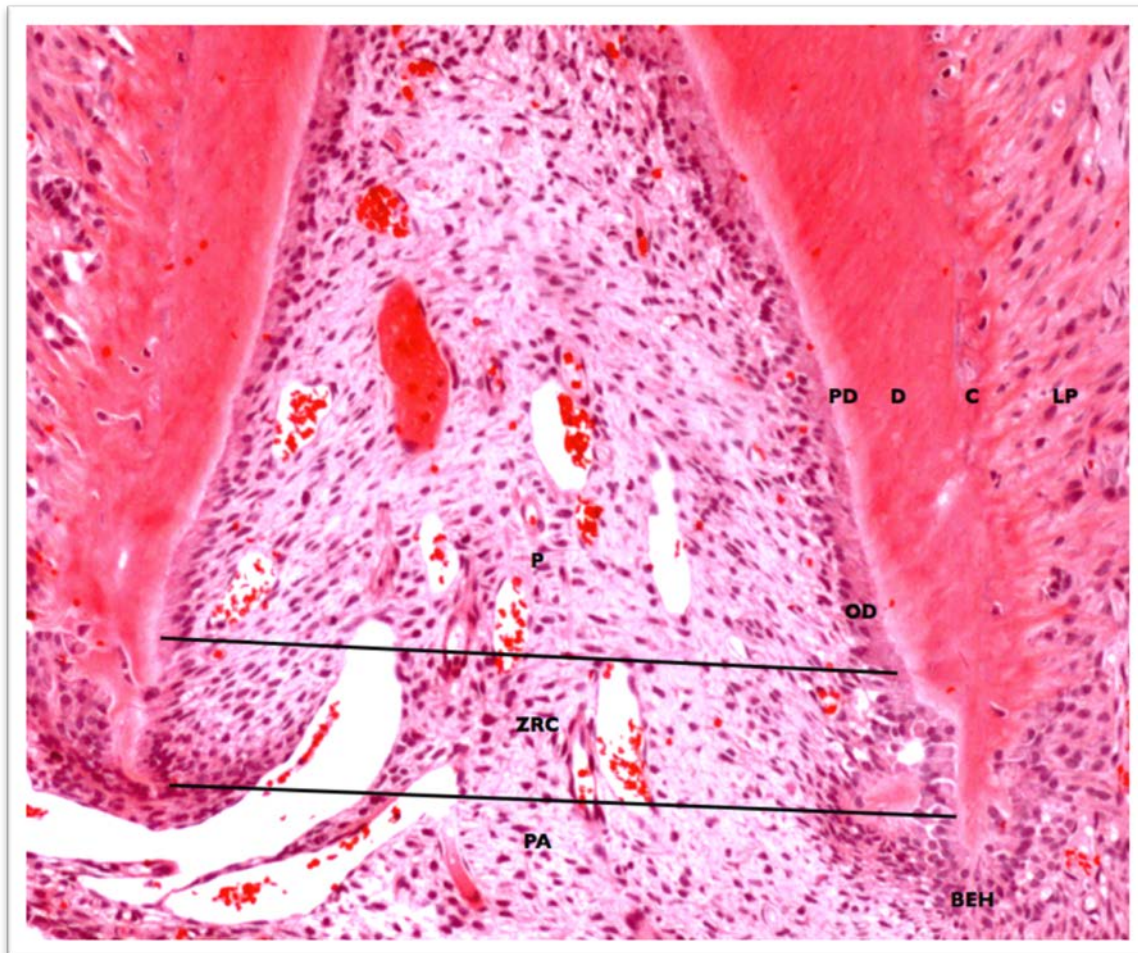
**FIGURA 4.** Aspecto do periápice referente ao escore 3: infiltrado inflamatório severo, com infiltrado inflamatório de polimorfonucleares e zonas de abscesso. **a** – espécime do período de 7 semanas, grupo teste. Atenção para a evidente destruição tecidual (40x). **b** – espécime do período de 7 semanas, grupo teste. (100x). Legenda – CR: canal radicular. As estrelas identificam zonas de infiltrado e abscesso.

Nos dentes do grupo controle, as características teciduais apresentaram aspectos relacionados ao tecido sadio. Na polpa dentária, foi possível observar a presença de fibras, intensa vascularização e odontoblastos polarizados e dispostos em linha (Figura 5).



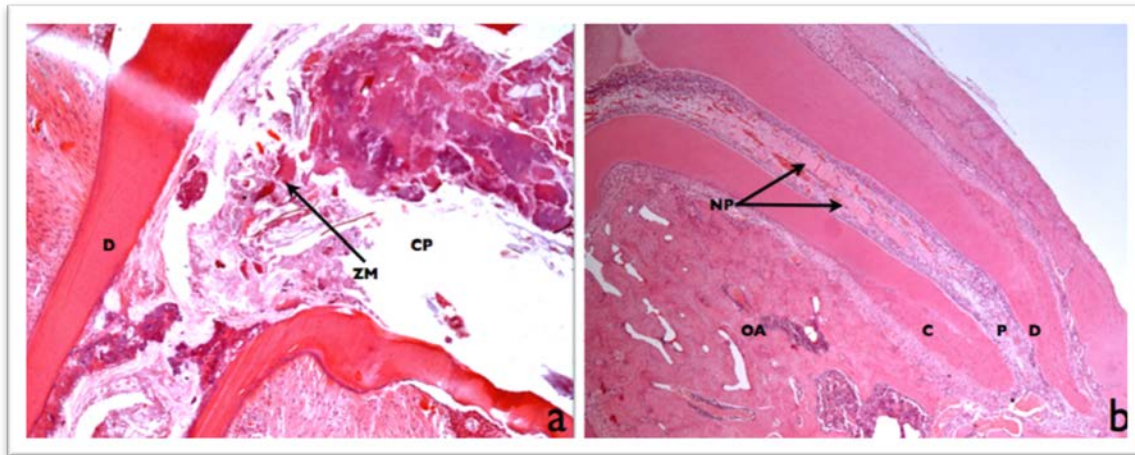
**FIGURA 5.** Aspecto pulpar do grupo controle. **a** – espécime do período de 10 semanas. Atenção para a intensa vascularização (100x). **b** – espécime do período de 10 semanas. (400x) As setas apontam para odontoblastos funcionais e calcificações. Ausência de células inflamatórias. Legenda – OA: osso alveolar; C: cimento; D: dentina; P: polpa; OD: odontoblastos; NP: nódulo pulpar.

Além disso, o desenvolvimento dos demais tecidos (dentina, cimento e ligamento periodontal) seguiram a cronologia e ocorreu a completa formação radicular, evidenciada a partir de 13 semanas de vida. Naqueles dentes com a formação radicular incompleta, foi observada a região periapical em desenvolvimento, com a presença da BEH e da PA (Figura 6).



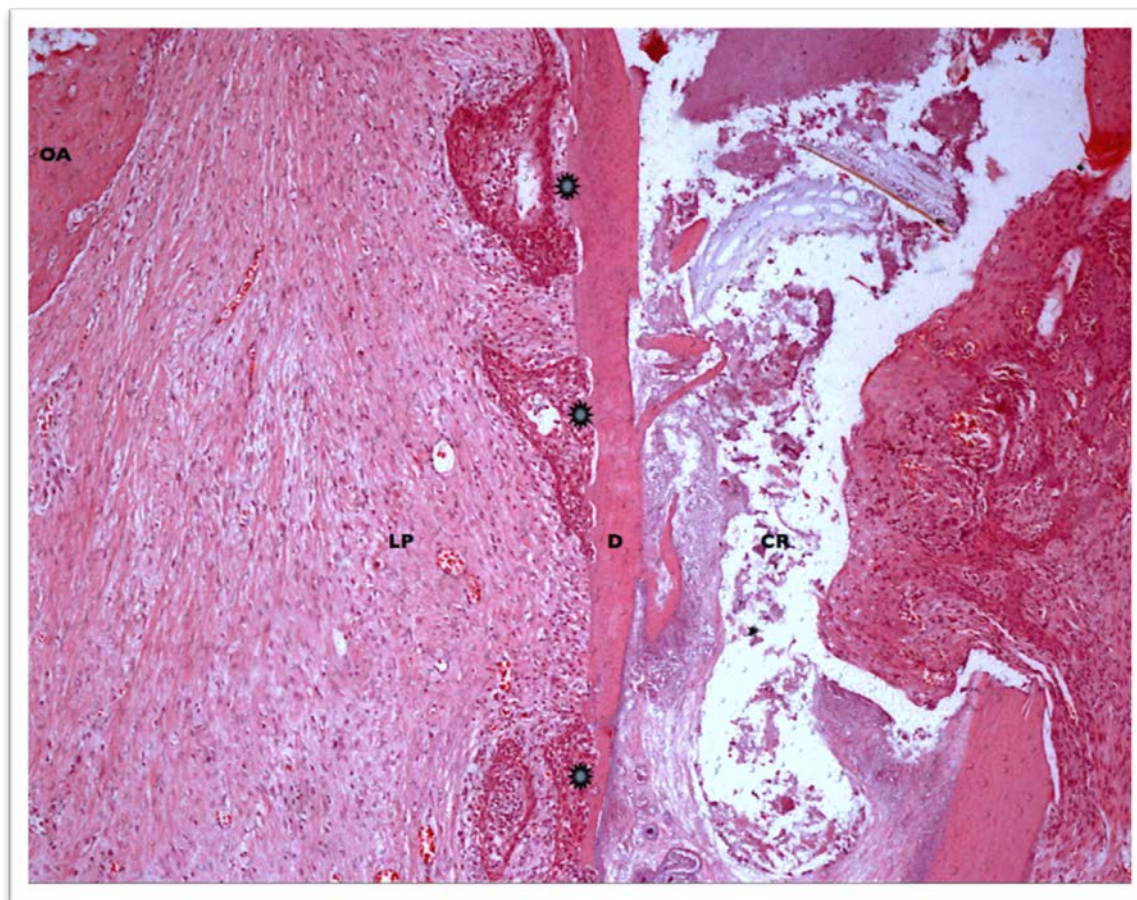
**FIGURA 6.** Rizogênese incompleta. Espécime do período de 7 semanas, grupo controle (100x). Evidenciação das estruturas dentárias em desenvolvimento. Legenda – OD: odontoblastos; PD: pré-dentina D: dentina; C: cemento; LP: ligamento periodontal; BEH: bainha epitelial de Hertwig. Separadas pelas linhas: P: polpa; ZRC: zona rica em células; PA: papila apical.

Enquanto isso, nos dentes que sofreram intervenção, foi observada a completa destruição tecidual. Outra característica observada, porém comum aos dois grupos, foi a presença de zonas de degeneração pulpar (mineralização e degeneração hialina) (Figura 7).



**FIGURA 7.** Degenerações. **a** – espécime do período de 10 semanas. Presença de focos de mineralização, grupo teste (100x). **b** – espécime do período de 10 semanas, grupo controle (100x) As setas apontam para calcificações. Legenda – D: dentina; ZM: focos de mineralização; CP: câmara pulpar; OA: osso alveolar; C: cimento;; P: polpa; NP: nódulo pulpar.

Também foram observadas zonas de reabsorção, característica esperada nestes casos.



**FIGURA 8.** Reabsorção inflamatória. Espécime do período de 13 semanas, grupo teste (100x). As estrelas identificam as zonas de reabsorção. Legenda – OA: osso alveolar; LP: ligamento periodontal; D: dentina; CR: canal radicular.

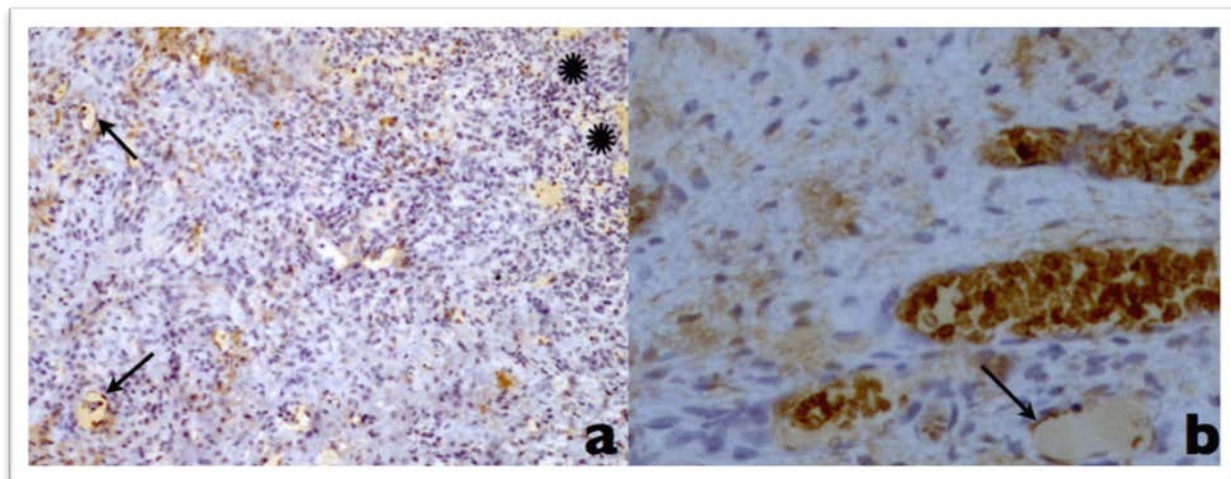
As análises da imunoexpressão do STRO-1 e do BMP-4 foram feitas de forma descritiva por um examinador cego e calibrado, a partir das imagens observadas.

Foi observada a marcação de STRO-1 nos vasos e células sanguíneas (hemáceas) em ambos os grupos avaliados (Figura 9). Foi constatada a presença de marcação na região próxima aos vasos da região periapical nos dentes do período de sete semanas que apresentavam necrose pulpar.

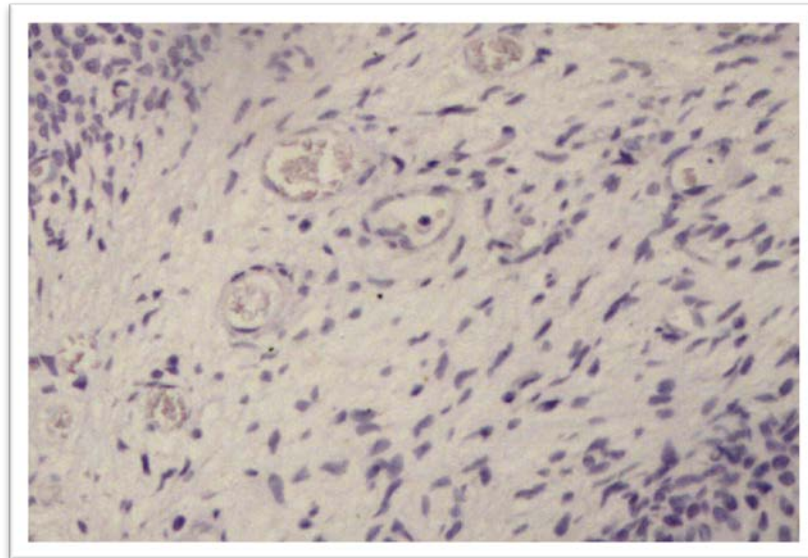
Alguns dentes, tanto do grupo teste, quanto do grupo controle, não apresentaram nenhuma marcação. Esta constatação ocorreu com mais frequência

nos grupos avaliados em períodos tardios (a partir de 10 semanas de vida) (Figura 10).

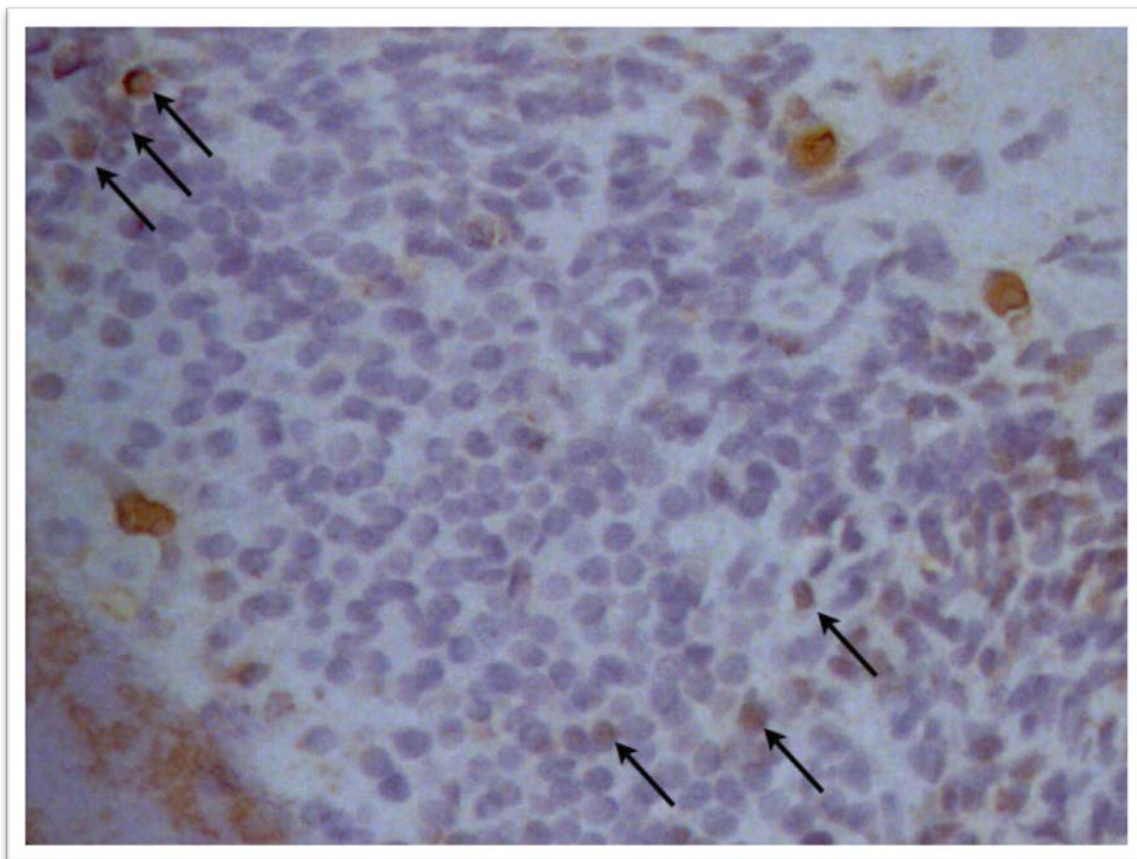
Em alguns casos de polpa viva, foi constatada marcação de células pulpaes (Figura 11).



**FIGURA 9.** Marcação dos vasos pelo STRO-1. **a** – Região periapical de espécime do período de 7 semanas, grupo teste (100X). As setas apontam para a marcação no endotélio. Os asteriscos marcam zona de abscesso, caracterizada pela presença de piócitos **b** – Polpa e vasos de espécime do período de 7 semanas, grupo controle (200x). As setas apontam a marcação no endotélio.

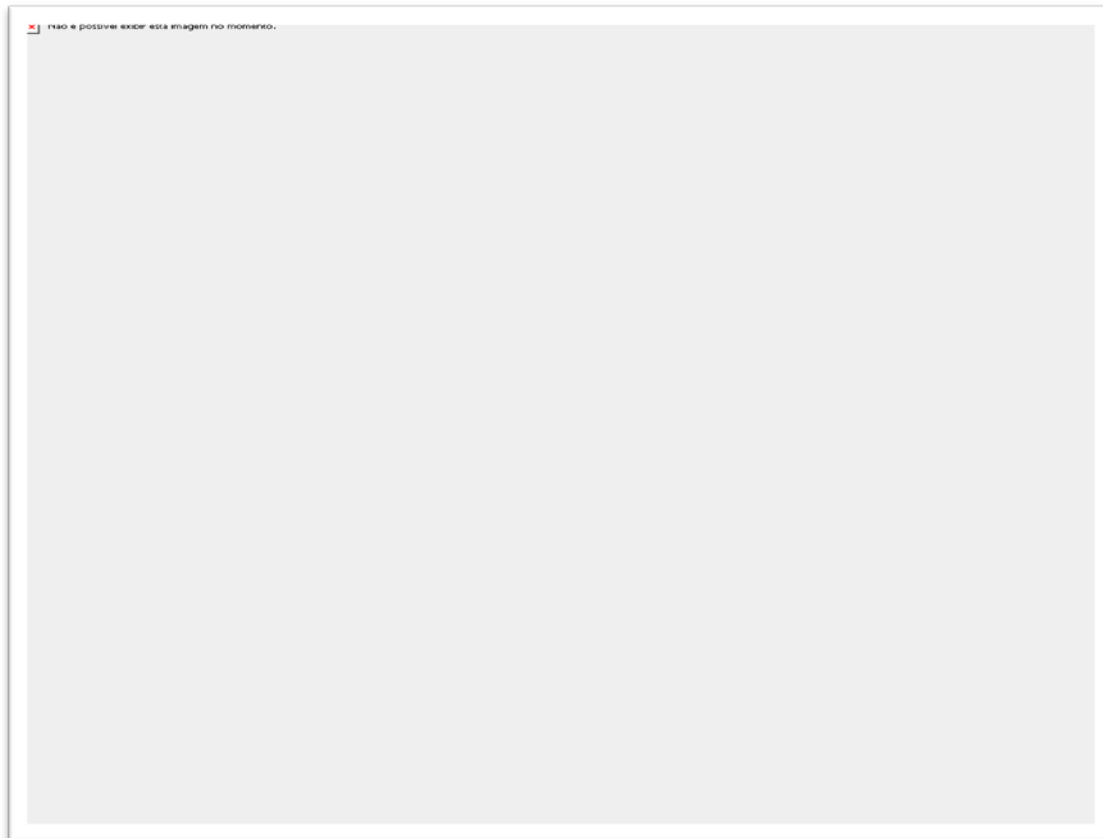


**FIGURA 10.** Ausência de marcação pulpar pelo STRO-1. Espécime do período de 10 semanas, grupo controle (200x).



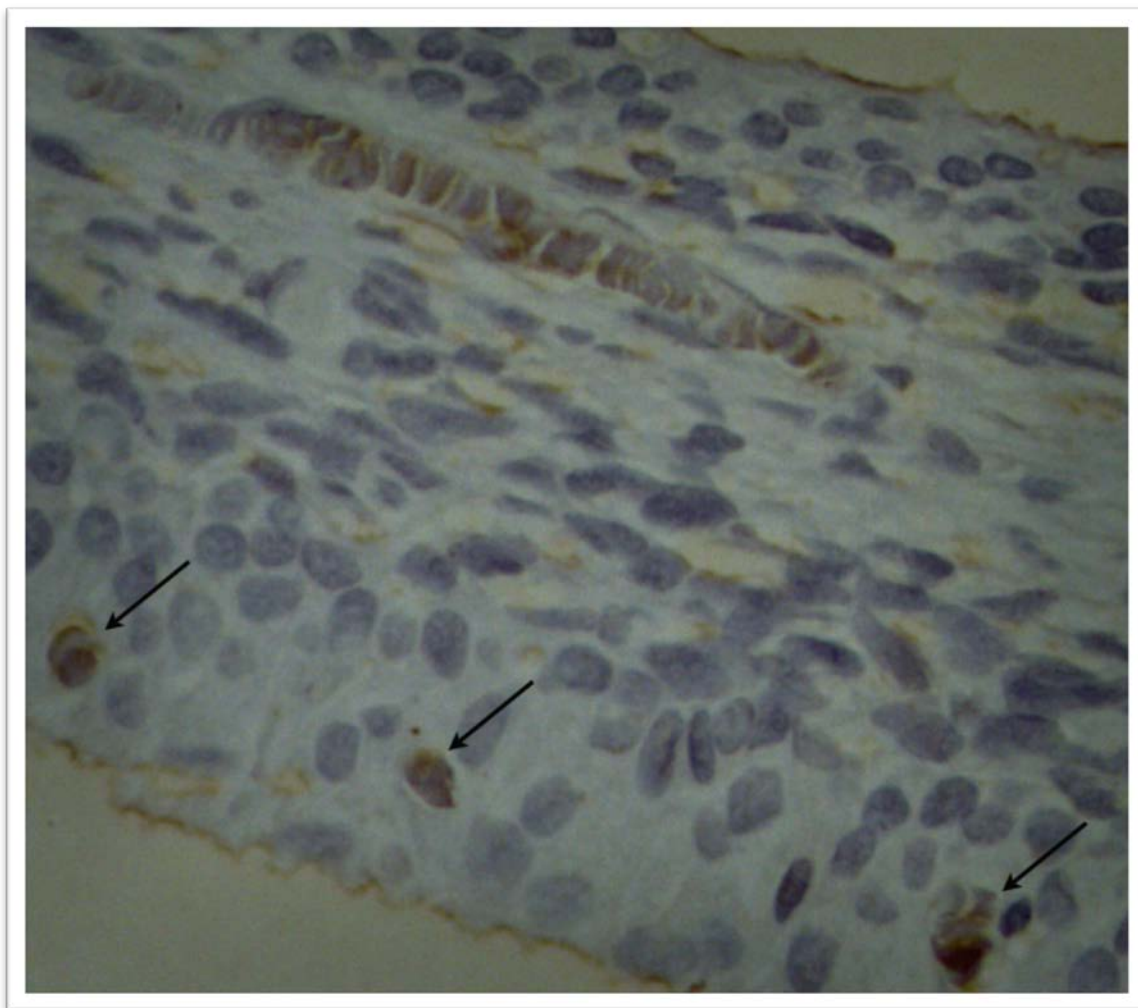
**FIGURA 11.** Marcação na polpa pelo STRO-1. Espécime do período de 7 semanas, grupo controle (200x).

No grupo controle, observou-se a presença de marcação do BMP-4, independente do período. Esta marcação ocorreu nos vasos e células sanguíneas da polpa, além dos odontoblastos e camada subodontoblástica, relacionada à pré-dentina (Figuras 12 e 13). Em duas amostras, não foi constatada marcação (Figura 14). Em relação ao grupo teste, não houve a marcação pelo BMP-4 em nenhuma das amostras.

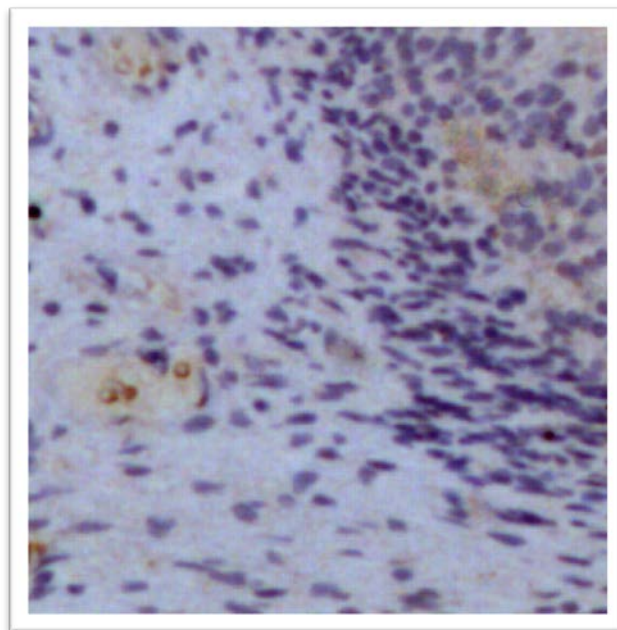


**FIGURA 12.** Marcação pelo BMP-4 da região de pré-dentina (setas), odontoblastos e vasos. Espécime do período de 7 semanas, grupo controle (400x). Legenda – D: dentina; OD: odontoblastos.





**FIGURA 13.** Marcação celular pelo BMP-4 na polpa coronária (setas). Espécime do período de 10 semanas, grupo controle (400x).



**FIGURA 14.** Ausência de marcação pelo BMP-4 em células pulpares. Espécime do período de 10 semanas, grupo controle (100x).

## 5 DISCUSSÃO

### Da Metodologia:

O presente estudo permitiu a avaliação das características histológicas e da imunolocalização de um marcador de células-tronco (STRO-1) e de um fator de crescimento relacionado com o desenvolvimento dentário (BMP-4) em dentes com a polpa intacta ou exposta ao meio bucal durante o período de formação radicular. A fim de se alcançar esse objetivo, foi necessária a escolha de um modelo experimental que permitisse a indução da necrose pulpar. Para tanto, a opção recaiu sobre um modelo animal, neste caso, ratos da espécie Wistar.

Apesar das limitações relacionadas à extrapolação dos resultados encontrados para os humanos, a espécie escolhida como modelo possui os dentes molares (objeto da intervenção) com estruturas, tecidos e desenvolvimento semelhantes aos do homem<sup>120,121</sup>. Além disso, a escolha do primeiro molar inferior ocorreu por três razões: facilidade da identificação das raízes em exames radiográficos para a comprovação da indução de lesão periapical, acesso e por não possuírem a característica de crescimento contínuo presente nos incisivos dos ratos<sup>122</sup>.

O período de desenvolvimento radicular do primeiro molar inferior do rato foi outro aspecto a ser considerado. O estudo de Shiube et al. (1998)<sup>119</sup> demonstra que a formação radicular nas três semanas de vida do rato é de aproximadamente metade do comprimento final, e que ela está completa na 13.<sup>a</sup> semana de vida. Dessa forma, foi estabelecido o protocolo para a intervenção (quatro semanas de vida) com o ápice ainda aberto, e a eutanásia dos animais (sete, dez, treze e dezesseis semanas de vida), com o propósito de se observar a interrupção do desenvolvimento radicular.

Para a indução da necrose pulpar, foi utilizado o protocolo estabelecido por Scarparo *et al.* (2011)<sup>118</sup>. A única variação em relação ao proposto por esses autores, foi a não extirpação do tecido pulpar. Frente ao reduzido tamanho do dente do rato, e considerando-se que o desejado era avaliar as alterações ocasionadas exclusivamente pela necrose pulpar, tomou-se o cuidado para que não houvesse nenhum outro tipo de trauma na região periapical, especialmente na porção da

papila apical, foco desta avaliação. Poder-se-ia questionar se a necrose ocorreria apenas com a exposição pulpar ao ambiente bucal, mas essa dúvida foi solucionada ao se constatar a presença de lesão periapical, tanto radiograficamente, quanto histologicamente, já no período de sete semanas de vida. Além disso, não foi necessária a ampla abertura oclusal. A exposição pulpar e uma pequena extensão da abertura foram suficientes para a ocorrência da necrose nas três raízes do primeiro molar inferior. Esse aspecto é relevante, pois preserva os tecidos dentários e diminui o risco de fratura coronária.

A partir da necessidade de um controle da formação radicular para comparar o desenvolvimento normal dos tecidos dentários e periapicais com as alterações desencadeadas pela necrose, optou-se pelo modelo da boca dividida. A vantagem desse modelo é a possibilidade da comparação, em um dente homólogo, respeitando as características individuais e evitando viéses que ocorreriam se o controle fosse realizado em um indivíduo diferente daquele que sofreu a intervenção.

A avaliação tecidual através de imunohistoquímica permite a identificação de características celulares, pela sua reatividade a anticorpos específicos. No presente estudo, optou-se pela utilização de dois marcadores que pudessem identificar características relacionadas ao desenvolvimento radicular. A escolha do BMP-4 ocorreu por se tratar de uma proteína relacionada com o desenvolvimento de tecidos mineralizados<sup>8</sup> e diferenciação de odontoblastos<sup>112</sup>, aspectos relevantes durante o desenvolvimento da raiz dentária. Enquanto isso, a escolha do STRO-1 ocorreu por se tratar de um marcador de células-tronco mesenquimais perivasculares e da polpa<sup>98</sup>. Conforme os estudos de Iwaya, Ikawa e Kubota (2001)<sup>2</sup>, Huang *et al.* (2008)<sup>14</sup> e Lin, Huang e Rosenberg (2007)<sup>123</sup>, essas células seriam as responsáveis pela continuação da formação radicular após a necrose pulpar.

#### Da análise histológica:

Ao se avaliar a região periapical dos dentes que sofreram intervenção, foi possível constatar a presença de infiltrado inflamatório do tipo severo com a presença de polimorfonucleares e zonas de abscesso. Estas constatações comprovam que o procedimento de exposição pulpar foi capaz de induzir necrose e

gerar alterações na região periapical<sup>118,124</sup>. O mesmo aspecto não foi constatado nos dentes do grupo controle, onde foi observada ausência de inflamação.

Apesar da severa destruição do tecido pulpar e alteração periapical, a reabsorção radicular não foi uma alteração observada com frequência. Essa observação pode ter sido prejudicada pela anatomia e inclinação das raízes, pois durante a realização dos cortes histológicos, nem sempre, é possível a visualização de toda a extensão radicular.

A partir do estabelecimento da necrose pulpar, não ocorreu o fechamento do forame nos dentes do grupo teste. Neste grupo, ocorreu o fechamento do forame, com a completa formação radicular a partir do período de 13 semanas de vida, validando o período de observação<sup>118,119</sup>.

Os dentes do grupo controle apresentaram características de tecido pulpar sadio. Neste grupo, não foram observadas células inflamatórias nem destruição tecidual. Intensa vascularização foi predominante, simulando um quadro de hiperemia pulpar. Esse achado foi recorrente, e nos leva a crer que é uma característica normal dos dentes da espécie, devido à agressão gerada pela atrição dentária típica dos roedores.

Além disso, o grupo controle apresentou odontoblastos alinhados e polarizados, caracterizando células funcionais<sup>26</sup>. Enquanto isso e, conforme esperado, o tecido pulpar do grupo teste estava completamente destruído, com ausência de células. Essa destruição foi mais intensa ao longo dos períodos avaliados.

Outras alterações observadas foram as degenerações do tipo cálcica e hialina. No entanto, essa observação ocorreu tanto nos dentes com necrose pulpar, quanto nos dentes do grupo controle, sem diferença estatística entre eles. As degenerações ocorrem frente a agressões ao tecido pulpar<sup>125</sup> e, por isso, podem ser consideradas como achados normais. O ato mastigatório dos roedores gera atrição dentária, o que poderia estar relacionado com degeneração do tecido pulpar. Já no caso da necrose, a degeneração também ocorre pelas alterações teciduais frente à invasão bacteriana<sup>125</sup>.

Os fatores de crescimento (FC) são proteínas extracelulares que se ligam a receptores presentes na célula, modulando sua atividade. Inúmeros FCs interferem no desenvolvimento e no reparo dos tecidos dentários através da regulação da proliferação de CTs, sua diferenciação e formação de tecido mineralizado<sup>72</sup>. O BMP-4 é um FC relacionado ao desenvolvimento dentário; por isso, optou-se pela identificação deste fator no presente estudo.

Assim como nos estudos de Hosoya *et al.* (2008)<sup>36</sup> e Gluhak-Heinrich *et al.* (2010)<sup>117</sup>, o BMP-4 foi positivo nas regiões de produção de tecido mineralizado. Nos dentes do grupo controle, houve a marcação desse anticorpo na região de odontoblastos e pré-dentina, evidenciando o papel desse fator na formação da matriz dentinária. Também houve marcação no tecido ósseo.

A fim de determinar o papel do BMP-4 na regulação do desenvolvimento da BEH em dentes vitais, Hosoya *et al.* (2008)<sup>36</sup> localizaram a proteína nas células da papila dentária, condensadas próximas à BHE durante o desenvolvimento radicular em camundongos. O mesmo não foi constatado no presente estudo, sugerindo que outro fator de crescimento possa estar envolvido com o desenvolvimento da BEH nos ratos, uma vez que, Hosoya *et al.* (2008)<sup>36</sup> utilizaram outro modelo animal.

Nos dentes com necrose pulpar avaliados no atual estudo, não houve marcação do BMP-4. Nos estudos em que têm sido realizados procedimentos de revascularização<sup>81,118</sup> há a predominância de formação de tecidos semelhantes a cimento e osso, sem a evidência da diferenciação de odontoblastos. Esta poderia ser uma justificativa para a ausência de marcação pelo BMP-4, uma vez que, não foram observados indícios da presença de odontoblastos nem de qualquer outra célula pulpar viável.

Em oposição ao encontrado por alguns autores<sup>1,2,3,4,13,83</sup>, que verificaram a formação completa do ápice após a desinfecção do canal radicular e, atribuíram esse fato à possível presença de células-tronco remanescentes neste local, no presente estudo não foram evidenciadas CT na papila apical. Suspeita-se que as células responsáveis pela continuação da formação radicular, durante a necrose pulpar, sejam recrutadas através da corrente sanguínea no momento em que o procedimento de apicigênese é realizado. Nessa pesquisa, no período de sete semanas, foi constatada a presença de marcação pelo STRO-1 no endotélio dos

vasos da região periapical, sugerindo a possibilidade do recrutamento no início do processo inflamatório. Além disso, conforme as técnicas sugeridas por Huang (2008)<sup>71</sup>, baseadas na desinfecção do canal radicular, os tecidos sofreriam reparo e poderiam adquirir a capacidade de dar continuidade à formação radicular.

Não foi possível evidenciar a presença de células-tronco na região da papila apical tanto no grupo teste, quanto no controle. Alguns autores utilizaram o STRO-1 para a identificação de células tronco da polpa dentária humana<sup>64</sup> e da PA extraída de terceiros molares humanos<sup>15,42</sup>. Porém, o modelo utilizado na presente pesquisa é diferente daquele aplicado pelos autores que obtiveram marcação positiva. O anticorpo para a identificação da molécula STRO-1 é específico para reagir com a espécie humana.

No entanto, Kaneko *et al.* (2009)<sup>99</sup> usou esse marcador em dentes de rato Wistar. Foi encontrada, pelos autores, marcação positiva em células da medula óssea, odontoblastos e células pulpares nos estágios finais de formação da coroa e da raiz, osteoblastos, cementoblastos e células do ligamento periodontal. Entretanto, nesse mesmo estudo, não foi encontrada marcação na região próxima à BEH. Surpreendentemente, os autores especulam que a marcação com STRO-1 requer células pulpares em um estágio mais avançado de diferenciação. Segundo os mesmos, também não foi confirmado se um anticorpo anti-humano reagiria em tecidos de ratos, dúvida que persiste no presente trabalho. Porém, como houve a marcação no estudo de Kaneko *et al.* (2009)<sup>99</sup>, o STRO-1 parece ser capaz de reconhecer alguns antígenos das células mesenquimais do rato, o que nos encorajou a utilizá-lo no presente estudo.

Outro aspecto que pode justificar a dificuldade da marcação de células-tronco é o fato de algumas células serem específicas para determinados marcadores<sup>126</sup>. Por se tratar de um marcador específico para células-tronco mesenquimais, com mínima expressão em células hematopoiéticas, a nossa escolha de marcador para identificar as CTs dentárias recaiu sobre o STRO-1. Todavia, Hass *et al.* (2011)<sup>126</sup>, em uma revisão a respeito das diferentes populações e fontes de células-tronco mesenquimais humanas, relatam que ocorrem algumas discrepâncias na expressão deste marcador nos diferentes estudos analisados por eles. Tais diferenças podem ocorrer em função dos diferentes métodos de isolamento e composição dos meios,

nos casos de cultura de células, ocasionando diferenças na expressão na superfície molecular.

Nesta pesquisa, o STRO-1 marcou vasos e células endoteliais, tanto no grupo controle, quanto no grupo teste nos períodos iniciais, achado semelhante ao de Shi e Gronthos (2003)<sup>64</sup>. A presença de células tronco na região dos pericitos<sup>64</sup> justificaria a marcação dos vasos com o STRO-1.

A partir desta constatação, resta como especulação que, em estágios mais avançados do processo, frente à destruição tecidual gerada pela necrose pulpar, é provável que não restem células-tronco na região da papila apical. Frente aos resultados encontrados por Lovelace *et al.* (2011)<sup>85</sup>, o que parece ocorrer é o recrutamento dessas células através da corrente sanguínea, seja pelo aumento da vascularização durante o processo inflamatório, ou pela indução do coágulo no procedimento de apicigênese.



## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo, a técnica imunohistoquímica não foi suficiente para a avaliação da presença de células-tronco na papila apical de dentes com rizogênese incompleta e necrose pulpar. É possível que a presença de infecção e a consequente reação inflamatória tenham bloqueado a expressão do STRO-1 e do BMP-4. Talvez, a desinfecção do canal radicular seja imprescindível para que se tenha alguma possibilidade de avaliação das células responsáveis pelo reparo nestes casos. No entanto, é importante ressaltar que esse estudo foi pioneiro na tentativa de imunolocalizar o STRO-1 e o BMP-4 em dentes com necrose pulpar e rizogênese incompleta. Portanto, serão necessários novos estudos, aplicando-se técnicas moleculares mais sensíveis que complementem a imunohistoquímica.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Thibodeau B, Trope M. Pulp revascularization of a necrotic infected immature permanent tooth: case report and review of the literature. *Pediatr Dent*. 2007;29(1):47-50.
2. Iwaya SI, Ikawa M, Kubota M. Revascularization of an immature permanent tooth with apical periodontitis and sinus tract. *Dent Traumatol*. 2001;17(4):185-7.
3. Banchs F, Trope M. Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: new treatment protocol? *J Endod*. 2004;30(4):196-200.
4. Chueh LH, Huang GT. Immature teeth with periradicular periodontitis or abscess undergoing apexogenesis: a paradigm shift. *J Endod*. 2006;32(12):1205-13.
5. Ding RY, Cheung GS, Chen J, Yin XZ, Wang QQ, Zhang CF. Pulp revascularization of immature teeth with apical periodontitis: a clinical study. *J Endod*. 2009;35(5):745-9.
6. Shin SY, Albert JS, Mortman RE. One step pulp revascularization treatment of an immature permanent tooth with chronic apical abscess: a case report. *Int Endod J*. 2009;42(12):1118-26.
7. Thomson A, Kahler B. Regenerative endodontics--biologically-based treatment for immature permanent teeth: a case report and review of the literature. *Aust Dent J*. 2010;55(4):446-52.
8. Murray PE, Garcia-Godoy F, Hargreaves KM. Regenerative endodontics: a review of current status and a call for action. *J Endod*. 2007;33(4):377-90.
9. Leeb C, Jurga M, McGuckin C, Moriggl R, Kenner L. Promising new sources for pluripotent stem cells. *Stem Cell Rev*. 2010;6(1):15-26.
10. Cabanes C, Bonilla S, Tabares L, Martínez S. Neuroprotective effect of adult hematopoietic stem cells in a mouse model of motoneuron degeneration. *Neurobiol Dis*. 2007;26(2):408-18.
11. Huang GT. Apexification: the beginning of its end. *Int Endod J*. 2009;42(10):855-66.
12. Jones J, Jaramillo-Merchán J, Bueno C, Pastor D, Viso-León M, Martínez S. Mesenchymal stem cells rescue Purkinje cells and improve motor functions in a mouse model of cerebellar ataxia. *Neurobiol Dis*. 2010;40(2):415-23.
13. Hargreaves KM, Giesler T, Henry M, Wang Y. Regeneration potential of the young permanent tooth: what does the future hold? *J Endod*. 2008;34(7 Suppl):S51-6.
14. Huang GT, Sonoyama W, Liu Y, Liu H, Wang S, Shi S. The hidden treasure in apical papilla: the potential role in pulp/dentin regeneration and bioroot engineering. *J Endod*. 2008;34(6):645-51.

15. Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan RS, Wang S, Shi S, et al. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *J Endod.* 2008;34(2):166-71.
16. Tziafas D, Kodonas K. Differentiation potential of dental papilla, dental pulp, and apical papilla progenitor cells. *J Endod.* 2010;36(5):781-9.
17. Thesleff I, Sharpe P. Signalling networks regulating dental development. *Mech Dev.* 1997;67(2):111-23.
18. Sharpe PT. Neural crest and tooth morphogenesis. *Adv Dent Res.* 2001;15:4-7.
19. Tucker A, Sharpe P. The cutting-edge of mammalian development; how the embryo makes teeth. *Nat Rev Genet.* 2004;5(7):499-508.
20. Huang X, Xu X, Bringas P, Hung YP, Chai Y. Smad4-Shh-Nfic signaling cascade-mediated epithelial-mesenchymal interaction is crucial in regulating tooth root development. *J Bone Miner Res.* 2010;25(5):1167-78.
21. Ten Cate R. *Histologia Bucal.* 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.; 2001. 439 p.
22. Smith AJ, Lesot H. Induction and regulation of crown dentinogenesis: embryonic events as a template for dental tissue repair? *Crit Rev Oral Biol Med.* 2001;12(5):425-37.
23. Koussoulakou DS, Margaritis LH, Koussoulakos SL. A curriculum vitae of teeth: evolution, generation, regeneration. *Int J Biol Sci.* 2009;5(3):226-43.
24. Ruch JV, Lesot H, Bègue-Kirn C. Odontoblast differentiation. *Int J Dev Biol.* 1995;39(1):51-68.
25. Ruch JV. Odontoblast commitment and differentiation. *Biochem Cell Biol.* 1998;76(6):923-38.
26. Yen AH, Yelick PC. Dental tissue regeneration - a mini-review. *Gerontology.* 2011;57(1):85-94.
27. Goldberg M, Septier D, Lécolle S, Chardin H, Quintana MA, Acevedo AC, et al. Dental mineralization. *Int J Dev Biol.* 1995;39(1):93-110.
28. Smith AJ, Lumley PJ, Tomson PL, Cooper PR. Dental regeneration and materials: a partnership. *Clin Oral Investig.* 2008;12(2):103-8.
29. Zhang W, Yelick PC. Vital pulp therapy-current progress of dental pulp regeneration and revascularization. *Int J Dent.* 2010;2010:856087.
30. Nanci A. *Ten Cate Histologia oral: desenvolvimento, estrutura e função.* 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008. 414 p.
31. Demarco FF, Conde MC, Cavalcanti BN, Casagrande L, Sakai VT, Nör JE. Dental pulp tissue engineering. *Braz Dent J.* 2011;22(1):3-13.

32. Arana-Chavez VE, Massa LF. Odontoblasts: the cells forming and maintaining dentine. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36(8):1367-73.
33. Fitzgerald M, Chiego DJ, Heys DR. Autoradiographic analysis of odontoblast replacement following pulp exposure in primate teeth. *Arch Oral Biol.* 1990;35(9):707-15.
34. Thomas HF. Root formation. *Int J Dev Biol.* 1995;39(1):231-7.
35. Thomas HF, Kollar EJ. Differentiation of odontoblasts in grafted recombinants of murine epithelial root sheath and dental mesenchyme. *Arch Oral Biol.* 1989;34(1):27-35.
36. Hosoya A, Kim JY, Cho SW, Jung HS. BMP4 signaling regulates formation of Hertwig's epithelial root sheath during tooth root development. *Cell Tissue Res.* 2008;333(3):503-9.
37. Marks SC, Schroeder HE. Tooth eruption: theories and facts. *Anat Rec.* 1996;245(2):374-93.
38. Andreasen JO, Hjorting-Hansen E. Intraalveolar root fractures: radiographic and histologic study of 50 cases. *J Oral Surg.* 1967;25(5):414-26.
39. Pindborg JJ. Clinical, radiographic and histologic aspects of intra-alveolar fractures of upper central incisors. *Acta Odontol Scand.* 1956;13:41-7.
40. Rafter M. Apexification: a review. *Dent Traumatol.* 2005;21(1):1-8.
41. Khan M, Seppala M, Zoupa M, Cobourne MT. Hedgehog pathway gene expression during early development of the molar tooth root in the mouse. *Gene Expr Patterns.* 2007;7(3):239-43.
42. Sonoyama W, Liu Y, Fang D, Yamaza T, Seo BM, Zhang C, et al. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PLoS One.* 2006;1:e79.
43. Rodríguez-Lozano FJ, Bueno C, Insausti CL, Meseguer L, Ramírez MC, Blanquer M, et al. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues. *Int Endod J.* 2011;44(9):800-6.
44. Leonardo MR. Endodontia: tratamento dos canais radiculares - princípios técnicos e biológicos. São Paulo: Artes Médicas Ltda.; 2008. 720 p.
45. Krepel CJ, Gohr CM, Edmiston CE, Farmer SG. Anaerobic pathogenesis: collagenase production by *Peptostreptococcus magnus* and its relationship to site of infection. *J Infect Dis.* 1991;163(5):1148-50.
46. Assed S, Ito IY, Leonardo MR, Silva LA, Lopatin DE. Anaerobic microorganisms in root canals of human teeth with chronic apical periodontitis detected by indirect immunofluorescence. *Endod Dent Traumatol.* 1996;12(2):66-9.
47. Lopes HP, Siqueira Jr. JF. Endodontia: biologia e técnica 3ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2010. 950 p.
48. McKay R. Stem cells--hype and hope. *Nature.* 2000;406(6794):361-4.

49. Blau HM, Brazelton TR, Weimann JM. The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell*. 2001;105(7):829-41.
50. Friedenstein A, Kuralesova AI. Osteogenic precursor cells of bone marrow in radiation chimeras. *Transplantation*. 1971;12(2):99-108.
51. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 1991;9(5):641-50.
52. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*. 1970;3(4):393-403.
53. da Silva Meirelles L, Caplan AI, Nardi NB. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2008;26(9):2287-99.
54. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284(5411):143-7.
55. da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci*. 2006;119(Pt 11):2204-13.
56. Krampera M, Marconi S, Pasini A, Galiè M, Rigotti G, Mosna F, et al. Induction of neural-like differentiation in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, fat, spleen and thymus. *Bone*. 2007;40(2):382-90.
57. Prunet-Marcassus B, Cousin B, Caton D, André M, Pénicaud L, Casteilla L. From heterogeneity to plasticity in adipose tissues: site-specific differences. *Exp Cell Res*. 2006;312(6):727-36.
58. Jo YY, Lee HJ, Kook SY, Choung HW, Park JY, Chung JH, et al. Isolation and characterization of postnatal stem cells from human dental tissues. *Tissue Eng*. 2007;13(4):767-73.
59. Morsczeck C, Schmalz G, Reichert TE, Völlner F, Galler K, Driemel O. Somatic stem cells for regenerative dentistry. *Clin Oral Investig*. 2008;12(2):113-8.
60. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(25):13625-30.
61. Shi S, Robey PG, Gronthos S. Comparison of human dental pulp and bone marrow stromal stem cells by cDNA microarray analysis. *Bone*. 2001;29(6):532-9.
62. Takeda T, Tezuka Y, Horiuchi M, Hosono K, Iida K, Hatakeyama D, et al. Characterization of dental pulp stem cells of human tooth germs. *J Dent Res*. 2008;87(7):676-81.
63. Gronthos S, Brahimi J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res*. 2002;81(8):531-5.
64. Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res*. 2003;18(4):696-704.

65. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(10):5807-12.
66. Koyama N, Okubo Y, Nakao K, Bessho K. Evaluation of pluripotency in human dental pulp cells. *J Oral Maxillofac Surg*. 2009;67(3):501-6.
67. Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahimi J, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*. 2004;364(9429):149-55.
68. Morsczeck C, Moehl C, Götz W, Heredia A, Schäffer TE, Eckstein N, et al. In vitro differentiation of human dental follicle cells with dexamethasone and insulin. *Cell Biol Int*. 2005;29(7):567-75.
69. Morsczeck C. Gene expression of runx2, Osterix, c-fos, DLX-3, DLX-5, and MSX-2 in dental follicle cells during osteogenic differentiation in vitro. *Calcif Tissue Int*. 2006;78(2):98-102.
70. Kémoun P, Laurencin-Dalacieux S, Rue J, Farges JC, Gennero I, Conte-Auriol F, et al. Human dental follicle cells acquire cementoblast features under stimulation by BMP-2/-7 and enamel matrix derivatives (EMD) in vitro. *Cell Tissue Res*. 2007;329(2):283-94.
71. Huang GT. A paradigm shift in endodontic management of immature teeth: conservation of stem cells for regeneration. *J Dent*. 2008;36(6):379-86.
72. Friedlander LT, Cullinan MP, Love RM. Dental stem cells and their potential role in apexogenesis and apexification. *Int Endod J*. 2009;42(11):955-62.
73. Bakopoulou A, Leyhausen G, Volk J, Tsiftoglou A, Garefis P, Koidis P, et al. 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*. 2011;56(7):709-21.
74. Abe S, Yamaguchi S, Watanabe A, Hamada K, Amagasa T. Hard tissue regeneration capacity of apical pulp derived cells (APDCs) from human tooth with immature apex. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;371(1):90-3.
75. Huang GT, Yamaza T, Shea LD, Djouad F, Kuhn NZ, Tuan RS, et al. Stem/progenitor cell-mediated de novo regeneration of dental pulp with newly deposited continuous layer of dentin in an in vivo model. *Tissue Eng Part A*. 2010;16(2):605-15.
76. Song L, Webb NE, Song Y, Tuan RS. Identification and functional analysis of candidate genes regulating mesenchymal stem cell self-renewal and multipotency. *Stem Cells*. 2006;24(7):1707-18.
77. Estrela C, Alencar AH, Kitten GT, Vencio EF, Gava E. Mesenchymal stem cells in the dental tissues: perspectives for tissue regeneration. *Braz Dent J*. 2011;22(2):91-8.
78. Shah N, Logani A, Bhaskar U, Aggarwal V. Efficacy of revascularization to induce apexification/apexogenesis in infected, nonvital, immature teeth: a pilot clinical

study. *J Endod.* 2008;34(8):919-25.

79. King GN, King N, Cruchley AT, Wozney JM, Hughes FJ. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 promotes wound healing in rat periodontal fenestration defects. *J Dent Res.* 1997;76(8):1460-70.

80. King GN, Hughes FJ. Bone morphogenetic protein-2 stimulates cell recruitment and cementogenesis during early wound healing. *J Clin Periodontol.* 2001;28(5):465-75.

81. Wang X, Thibodeau B, M Trope, LM Lin, Huang GTJ. Histologic Characterization of Regenerated Tissues in Canal Space after the Revitalization/Revascularization Procedure of Immature Dog Teeth with Apical Periodontitis. *J Endod.* 2010;36(1):56-63.

82. Cvek M, Cleaton-Jones P, Austin J, Lownie J, Kling M, Fatti P. Pulp revascularization in reimplanted immature monkey incisors--predictability and the effect of antibiotic systemic prophylaxis. *Endod Dent Traumatol.* 1990;6(4):157-69.

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

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

85. Lovelace TW, Henry MA, Hargreaves KM, Diogenes A. Evaluation of the delivery of mesenchymal stem cells into the root canal space of necrotic immature teeth after clinical regenerative endodontic procedure. *J Endod.* 2011;37(2):133-8.

86. Xu L, Tang L, Jin F, Liu XH, Yu JH, Wu JJ, et al. The apical region of developing tooth root constitutes a complex and maintains the ability to generate root and periodontium-like tissues. *J Periodontol Res.* 2009;44(2):275-82.

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

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

89. Mayhall EA, Paffett-Lugassy N, Zon LI. The clinical potential of stem cells. *Curr Opin Cell Biol.* 2004;16(6):713-20.

90. Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med.* 2004;8(3):301-16.

91. Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36(4):568-84.

92. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 1998;282(5391):1145-7.

93. Baharvand H, Ashtiani SK, Valojerdi MR, Shahverdi A, Taei A, Sabour D. Establishment and in vitro differentiation of a new embryonic stem cell line from human blastocyst. *Differentiation*. 2004;72(5):224-9.
94. Ginis I, Luo Y, Miura T, Thies S, Brandenberger R, Gerecht-Nir S, et al. Differences between human and mouse embryonic stem cells. *Dev Biol*. 2004;269(2):360-80.
95. zur Nieden NI, Ruf LJ, Kempka G, Hildebrand H, Ahr HJ. Molecular markers in embryonic stem cells. *Toxicol In Vitro*. 2001;15(4-5):455-61.
96. Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol*. 1966;16(3):381-90.
97. Gronthos S, Zannettino AC, Hay SJ, Shi S, Graves SE, Kortessidis A, et al. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci*. 2003;116(Pt 9):1827-35.
98. Simmons PJ, Torok-Storb B. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood*. 1991;78(1):55-62.
99. Kaneko R, Akita H, Shimauchi H, Sasano Y. Immunohistochemical localization of the STRO-1 antigen in developing rat teeth by light microscopy and electron microscopy. *J Electron Microsc (Tokyo)*. 2009;58(6):363-73.
100. Gronthos S, Graves SE, Ohta S, Simmons PJ. The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors. *Blood*. 1994;84(12):4164-73.
101. Dennis JE, Carbillet JP, Caplan AI, Charbord P. The STRO-1+ marrow cell population is multipotential. *Cells Tissues Organs*. 2002;170(2-3):73-82.
102. Casagrande L, Cordeiro MM, Nör SA, Nör JE. Dental pulp stem cells in regenerative dentistry. *Odontology*. 2011;99(1):1-7.
103. Vainio S, Karavanova I, Jowett A, Thesleff I. Identification of BMP-4 as a signal mediating secondary induction between epithelial and mesenchymal tissues during early tooth development. *Cell*. 1993;75(1):45-58.
104. Thesleff I. Genetic basis of tooth development and dental defects. *Acta Odontol Scand*. 2000;58(5):191-4.
105. Chen Y, Bei M, Woo I, Satokata I, Maas R. Msx1 controls inductive signaling in mammalian tooth morphogenesis. *Development*. 1996;122(10):3035-44.
106. Thesleff I. Epithelial-mesenchymal signalling regulating tooth morphogenesis. *J Cell Sci*. 2003;116(Pt 9):1647-8.
107. Zhang Y, Zhang Z, Zhao X, Yu X, Hu Y, Geronimo B, et al. A new function of BMP4: dual role for BMP4 in regulation of Sonic hedgehog expression in the mouse tooth germ. *Development*. 2000;127(7):1431-43.
108. Kingsley DM. The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev*. 1994;8(2):133-46.



109. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. 1965. *Clin Orthop Relat Res.* 2002(395):4-10.
110. von Bubnoff A, Cho KW. Intracellular BMP signaling regulation in vertebrates: pathway or network? *Dev Biol.* 2001;239(1):1-14.
111. Aberg T, Wozney J, Thesleff I. Expression patterns of bone morphogenetic proteins (Bmps) in the developing mouse tooth suggest roles in morphogenesis and cell differentiation. *Dev Dyn.* 1997;210(4):383-96.
112. Bègue-Kirn C, Smith AJ, Lorient M, Kupferle C, Ruch JV, Lesot H. Comparative analysis of TGF beta s, BMPs, IGF1, msxs, fibronectin, osteonectin and bone sialoprotein gene expression during normal and in vitro-induced odontoblast differentiation. *Int J Dev Biol.* 1994;38(3):405-20.
113. Coin R, Haïkel Y, Ruch JV. Effects of apatite, transforming growth factor beta-1, bone morphogenetic protein-2 and interleukin-7 on ameloblast differentiation in vitro. *Eur J Oral Sci.* 1999;107(6):487-95.
114. Yamashiro T, Tummers M, Thesleff I. Expression of bone morphogenetic proteins and Msx genes during root formation. *J Dent Res.* 2003;82(3):172-6.
115. Yamamoto H, Cho SW, Kim EJ, Kim JY, Fujiwara N, Jung HS. Developmental properties of the Hertwig's epithelial root sheath in mice. *J Dent Res.* 2004;83(9):688-92.
116. Winnier G, Blessing M, Labosky PA, Hogan BL. Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes Dev.* 1995;9(17):2105-16.
117. Gluhak-Heinrich J, Guo D, Yang W, Harris MA, Lichtler A, Kream B, et al. New roles and mechanism of action of BMP4 in postnatal tooth cytodifferentiation. *Bone.* 2010;46(6):1533-45.
118. Scarparo RK, Dondoni L, Böttcher DE, Grecca FS, Rockenbach MI, Batista EL. Response to intracanal medication in immature teeth with pulp necrosis: an experimental model in rat molars. *J Endod.* 2011;37(8):1069-73.
119. Shibue T, Taniguchi K, Motokawa W. Pulp and root development after partial extrusion in immature rat molars: a histopathological study. *Endod Dent Traumatol.* 1998;14(4):174-81.
120. Stashenko P, Wang CY, Tani-ishi N, Yu SM. Pathogenesis of induced rat periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994;78:494–502.
121. Dammaschke T. Rat molar teeth as a study model for direct pulp capping research in dentistry. *Lab Anim* 2010;44:1–6.
122. Merzel J, Salmon CR. Growth and the modeling/remodeling of the alveolar bone of the rat incisor. *Anat Rec (Hoboken).* 2008;291(7):827-34.
123. Lin LM, Huang GT, Rosenberg PA. Proliferation of epithelial cell rests, formation of apical cysts, and regression of apical cysts after periapical wound healing. *J Endod.* 2007;33(8):908-16.

124. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1965; 20:340-9.
125. Neville B, Damm D, Allen C, Bouquot J. *Patologia Oral e Maxilofacial.* 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998. 705 p.
126. Hass R, Kasper C, Böhm S, Jacobs R. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun Signal.* 2011;9:12.

## ANEXOS

### Anexo 1

#### PRINCÍPIOS ÉTICOS NA PESQUISA EXPERIMENTAL - COBEA

Artigo I - É primordial manter posturas de respeito ao animal, como ser vivo e pela contribuição científica que ele proporciona.

Artigo II - Ter consciência de que a sensibilidade do animal é similar à humana no que se refere a dor, memória, angústia, instinto de sobrevivência, apenas lhe sendo impostas limitações para se salvaguardar das manobras experimentais e da dor que possam causar.

Artigo III - É de responsabilidade moral do experimentador a escolha de métodos e ações de experimentação animal

Artigo IV - É relevante considerar a importância dos estudos realizados através de experimentação animal quanto a sua contribuição para a saúde humana em animal, o desenvolvimento do conhecimento e o bem da sociedade.

Artigo V - Utilizar apenas animais em bom estado de saúde.

Artigo VI - Considerar a possibilidade de desenvolvimento de métodos alternativos, como modelos matemáticos, simulações computadorizadas, sistemas biológicos "*in vitro*", utilizando-se o menor número possível de espécimes animais, se caracterizada como única alternativa plausível.

Artigo VII - Utilizar animais através de métodos que previnam desconforto, angústia e dor, considerando que determinariam os mesmos quadros em seres humanos, salvo se demonstrados, cientificamente, resultados contrários.

Artigo VIII - Desenvolver procedimentos com animais, assegurando-lhes sedação, analgesia ou anestesia quando se configurar o desencadeamento de dor ou angústia, rejeitando, sob qualquer argumento ou justificativa, o uso de agentes químicos e/ou físicos paralizantes e não anestésicos.

Artigo IX - Se os procedimentos experimentais determinarem dor ou angústia nos animais, após o uso da pesquisa desenvolvida, aplicar método indolor para sacrifício imediato.

Artigo X - Dispor de alojamentos que propiciem condições adequadas de saúde e conforto, conforme as necessidades das espécies animais mantidas para experimentação ou docência.

Artigo XI - Oferecer assistência de profissional qualificado para orientar e desenvolver atividades de transportes, acomodação, alimentação e atendimento de animais destinados a fins biomédicos.

Artigo XII - Desenvolver trabalhos de capacitação específica de pesquisadores e funcionários envolvidos nos procedimentos com animais de experimentação, salientando aspectos de trato e uso humanitário com animais de laboratório.

## Anexo 2

### LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008.

#### Mensagem de veto

Regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências.

**O PRESIDENTE DA REPÚBLICA** Faço saber que o Congresso Nacional decreta e eu sanciono a seguinte Lei:

#### CAPÍTULO I

#### DAS DISPOSIÇÕES PRELIMINARES

Art. 1º A criação e a utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa científica, em todo o território nacional, obedece aos critérios estabelecidos nesta Lei.

§ 1º A utilização de animais em atividades educacionais fica restrita a:

I – estabelecimentos de ensino superior;

II – estabelecimentos de educação profissional técnica de nível médio da área biomédica.

§ 2º São consideradas como atividades de pesquisa científica todas aquelas relacionadas com ciência básica, ciência aplicada, desenvolvimento tecnológico, produção e controle da qualidade de drogas, medicamentos, alimentos, imunobiológicos, instrumentos, ou quaisquer outros testados em animais, conforme definido em regulamento próprio.

§ 3º Não são consideradas como atividades de pesquisa as práticas zootécnicas relacionadas à agropecuária.

Art. 2º O disposto nesta Lei aplica-se aos animais das espécies classificadas como filo **Chordata**, subfilo **Vertebrata**, observada a legislação ambiental.

Art. 3º Para as finalidades desta Lei entende-se por:

I – filo **Chordata**: animais que possuem, como características exclusivas, ao menos na fase embrionária, a presença de notocorda, fendas branquiais na faringe e tubo nervoso dorsal único;

II – subfilo **Vertebrata**: animais cordados que têm, como características exclusivas, um encéfalo grande encerrado numa caixa craniana e uma coluna vertebral;

III – experimentos: procedimentos efetuados em animais vivos, visando à elucidação de fenômenos fisiológicos ou patológicos, mediante técnicas específicas e preestabelecidas;

IV – morte por meios humanitários: a morte de um animal em condições que envolvam, segundo as espécies, um mínimo de sofrimento físico ou mental.

Parágrafo único. Não se considera experimento:

I – a profilaxia e o tratamento veterinário do animal que deles necessite;

II – o anilhamento, a tatuagem, a marcação ou a aplicação de outro método com finalidade de identificação do animal, desde que cause apenas dor ou aflição momentânea ou dano passageiro;

III – as intervenções não-experimentais relacionadas às práticas agropecuárias.

## CAPÍTULO II

### DO CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE

### EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – CONCEA

Art. 4º Fica criado o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA.

Art. 5º Compete ao CONCEA:

I – formular e zelar pelo cumprimento das normas relativas à utilização humanitária de animais com finalidade de ensino e pesquisa científica;

II – credenciar instituições para criação ou utilização de animais em ensino e pesquisa científica;

III – monitorar e avaliar a introdução de técnicas alternativas que substituam a utilização de animais em ensino e pesquisa;

IV – estabelecer e rever, periodicamente, as normas para uso e cuidados com animais para ensino e pesquisa, em consonância com as convenções internacionais das quais o Brasil seja signatário;

V – estabelecer e rever, periodicamente, normas técnicas para instalação e funcionamento de centros de criação, de biotérios e de laboratórios de experimentação animal, bem como sobre as condições de trabalho em tais instalações;

VI – estabelecer e rever, periodicamente, normas para credenciamento de instituições que criem ou utilizem animais para ensino e pesquisa;

VII – manter cadastro atualizado dos procedimentos de ensino e pesquisa realizados ou em andamento no País, assim como dos pesquisadores, a partir de informações remetidas pelas Comissões de Ética no Uso de Animais - CEUAs, de que trata o art. 8º desta Lei;

VIII – apreciar e decidir recursos interpostos contra decisões das CEUAs;

IX – elaborar e submeter ao Ministro de Estado da Ciência e Tecnologia, para aprovação, o seu regimento interno;

X – assessorar o Poder Executivo a respeito das atividades de ensino e pesquisa tratadas nesta Lei.

Art. 6º O CONCEA é constituído por:

I – Plenário;

II – Câmaras Permanentes e Temporárias;

III – Secretaria-Executiva.

§ 1º As Câmaras Permanentes e Temporárias do CONCEA serão definidas no regimento interno.

§ 2º A Secretaria-Executiva é responsável pelo expediente do CONCEA e terá o apoio administrativo do Ministério da Ciência e Tecnologia.

§ 3º O CONCEA poderá valer-se de consultores **ad hoc** de reconhecida competência técnica e científica, para instruir quaisquer processos de sua pauta de trabalhos.

Art. 7º O CONCEA será presidido pelo Ministro de Estado da Ciência e Tecnologia e integrado por:

I – 1 (um) representante de cada órgão e entidade a seguir indicados:

a) Ministério da Ciência e Tecnologia;

- b) Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq;
- c) Ministério da Educação;
- d) Ministério do Meio Ambiente;
- e) Ministério da Saúde;
- f) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento;
- g) Conselho de Reitores das Universidades do Brasil – CRUB;
- h) Academia Brasileira de Ciências;
- i) Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência;
- j) Federação das Sociedades de Biologia Experimental;
- l) Colégio Brasileiro de Experimentação Animal;
- m) Federação Nacional da Indústria Farmacêutica;

II – 2 (dois) representantes das sociedades protetoras de animais legalmente estabelecidas no País.

§ 1º Nos seus impedimentos, o Ministro de Estado da Ciência e Tecnologia será substituído, na Presidência do CONCEA, pelo Secretário-Executivo do respectivo Ministério.

§ 2º O Presidente do CONCEA terá o voto de qualidade.

§ 3º Os membros do CONCEA não serão remunerados, sendo os serviços por eles prestados considerados, para todos os efeitos, de relevante serviço público.

### CAPÍTULO III

#### DAS COMISSÕES DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUAs

Art. 8º É condição indispensável para o credenciamento das instituições com atividades de ensino ou pesquisa com animais a constituição prévia de Comissões de Ética no Uso de Animais – CEUAs.

Art. 9º As CEUAs são integradas por:

- I – médicos veterinários e biólogos;



II – docentes e pesquisadores na área específica;

III – 1 (um) representante de sociedades protetoras de animais legalmente estabelecidas no País, na forma do Regulamento.

Art. 10. Compete às CEUAs:

I – cumprir e fazer cumprir, no âmbito de suas atribuições, o disposto nesta Lei e nas demais normas aplicáveis à utilização de animais para ensino e pesquisa, especialmente nas resoluções do CONCEA;

II – examinar previamente os procedimentos de ensino e pesquisa a serem realizados na instituição à qual esteja vinculada, para determinar sua compatibilidade com a legislação aplicável;

III – manter cadastro atualizado dos procedimentos de ensino e pesquisa realizados, ou em andamento, na instituição, enviando cópia ao CONCEA;

IV – manter cadastro dos pesquisadores que realizem procedimentos de ensino e pesquisa, enviando cópia ao CONCEA;

V – expedir, no âmbito de suas atribuições, certificados que se fizerem necessários perante órgãos de financiamento de pesquisa, periódicos científicos ou outros;

VI – notificar imediatamente ao CONCEA e às autoridades sanitárias a ocorrência de qualquer acidente com os animais nas instituições credenciadas, fornecendo informações que permitam ações saneadoras.

§ 1º Constatado qualquer procedimento em descumprimento às disposições desta Lei na execução de atividade de ensino e pesquisa, a respectiva CEUA determinará a paralisação de sua execução, até que a irregularidade seja sanada, sem prejuízo da aplicação de outras sanções cabíveis.

§ 2º Quando se configurar a hipótese prevista no § 1º deste artigo, a omissão da CEUA acarretará sanções à instituição, nos termos dos arts. 17 e 20 desta Lei.

§ 3º Das decisões proferidas pelas CEUAs cabe recurso, sem efeito suspensivo, ao CONCEA.

§ 4º Os membros das CEUAs responderão pelos prejuízos que, por dolo, causarem às pesquisas em andamento.

§ 5º Os membros das CEUAs estão obrigados a resguardar o segredo industrial, sob pena de responsabilidade.

## CAPÍTULO IV

### DAS CONDIÇÕES DE CRIAÇÃO E USO DE ANIMAIS PARA ENSINO E

### PESQUISA CIENTÍFICA

Art. 11. Compete ao Ministério da Ciência e Tecnologia licenciar as atividades destinadas à criação de animais, ao ensino e à pesquisa científica de que trata esta Lei.

§ 1º (VETADO)

§ 2º (VETADO)

§ 3º (VETADO)

Art. 12. A criação ou a utilização de animais para pesquisa ficam restritas, exclusivamente, às instituições credenciadas no CONCEA.

Art. 13. Qualquer instituição legalmente estabelecida em território nacional que crie ou utilize animais para ensino e pesquisa deverá requerer credenciamento no CONCEA, para uso de animais, desde que, previamente, crie a CEUA.

§ 1º A critério da instituição e mediante autorização do CONCEA, é admitida a criação de mais de uma CEUA por instituição.

§ 2º Na hipótese prevista no § 1º deste artigo, cada CEUA definirá os laboratórios de experimentação animal, biotérios e centros de criação sob seu controle.

Art. 14. O animal só poderá ser submetido às intervenções recomendadas nos protocolos dos experimentos que constituem a pesquisa ou programa de aprendizado quando, antes, durante e após o experimento, receber cuidados especiais, conforme estabelecido pelo CONCEA.

§ 1º O animal será submetido a eutanásia, sob estrita obediência às prescrições pertinentes a cada espécie, conforme as diretrizes do Ministério da Ciência e Tecnologia, sempre que, encerrado o experimento ou em qualquer de suas fases, for tecnicamente recomendado aquele procedimento ou quando ocorrer intenso sofrimento.

§ 2º Excepcionalmente, quando os animais utilizados em experiências ou demonstrações não forem submetidos a eutanásia, poderão sair do biotério após a intervenção, ouvida a respectiva CEUA quanto aos critérios vigentes de segurança, desde que destinados a pessoas idôneas ou entidades protetoras de animais devidamente legalizadas, que por eles queiram responsabilizar-se.

§ 3º Sempre que possível, as práticas de ensino deverão ser fotografadas, filmadas ou gravadas, de forma a permitir sua reprodução para ilustração de práticas futuras, evitando-se a repetição desnecessária de procedimentos didáticos com animais.

§ 4º O número de animais a serem utilizados para a execução de um projeto e o tempo de duração de cada experimento será o mínimo indispensável para produzir o resultado conclusivo, poupando-se, ao máximo, o animal de sofrimento.

§ 5º Experimentos que possam causar dor ou angústia desenvolver-se-ão sob sedação, analgesia ou anestesia adequadas.

§ 6º Experimentos cujo objetivo seja o estudo dos processos relacionados à dor e à angústia exigem autorização específica da CEUA, em obediência a normas estabelecidas pelo CONCEA.

§ 7º É vedado o uso de bloqueadores neuromusculares ou de relaxantes musculares em substituição a substâncias sedativas, analgésicas ou anestésicas.

§ 8º É vedada a reutilização do mesmo animal depois de alcançado o objetivo principal do projeto de pesquisa.

§ 9º Em programa de ensino, sempre que forem empregados procedimentos traumáticos, vários procedimentos poderão ser realizados num mesmo animal, desde que todos sejam executados durante a vigência de um único anestésico e que o animal seja sacrificado antes de recobrar a consciência.

§ 10. Para a realização de trabalhos de criação e experimentação de animais em sistemas fechados, serão consideradas as condições e normas de segurança recomendadas pelos organismos internacionais aos quais o Brasil se vincula.

Art. 15. O CONCEA, levando em conta a relação entre o nível de sofrimento para o animal e os resultados práticos que se esperam obter, poderá restringir ou proibir experimentos que importem em elevado grau de agressão.

Art. 16. Todo projeto de pesquisa científica ou atividade de ensino será supervisionado por profissional de nível superior, graduado ou pós-graduado na área biomédica, vinculado a entidade de ensino ou pesquisa credenciada pelo CONCEA.

## CAPÍTULO V

### DAS PENALIDADES

Art. 17. As instituições que executem atividades reguladas por esta Lei estão sujeitas, em caso de transgressão às suas disposições e ao seu regulamento, às penalidades administrativas de:

I – advertência;

II – multa de R\$ 5.000,00 (cinco mil reais) a R\$ 20.000,00 (vinte mil reais);

III – interdição temporária;

IV – suspensão de financiamentos provenientes de fontes oficiais de crédito e fomento científico;

V – interdição definitiva.

Parágrafo único. A interdição por prazo superior a 30 (trinta) dias somente poderá ser determinada em ato do Ministro de Estado da Ciência e Tecnologia, ouvido o CONCEA.

Art. 18. Qualquer pessoa que execute de forma indevida atividades reguladas por esta Lei ou participe de procedimentos não autorizados pelo CONCEA será passível das seguintes penalidades administrativas:

I – advertência;

II – multa de R\$ 1.000,00 (mil reais) a R\$ 5.000,00 (cinco mil reais);

III – suspensão temporária;

IV – interdição definitiva para o exercício da atividade regulada nesta Lei.

Art. 19. As penalidades previstas nos arts. 17 e 18 desta Lei serão aplicadas de acordo com a gravidade da infração, os danos que dela provierem, as circunstâncias agravantes ou atenuantes e os antecedentes do infrator.

Art. 20. As sanções previstas nos arts. 17 e 18 desta Lei serão aplicadas pelo CONCEA, sem prejuízo de correspondente responsabilidade penal.

Art. 21. A fiscalização das atividades reguladas por esta Lei fica a cargo dos órgãos dos Ministérios da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, da Saúde, da Educação, da Ciência e Tecnologia e do Meio Ambiente, nas respectivas áreas de competência.

## CAPÍTULO VI

### DISPOSIÇÕES GERAIS E TRANSITÓRIAS

Art. 22. As instituições que criem ou utilizem animais para ensino ou pesquisa existentes no País antes da data de vigência desta Lei deverão:

I – criar a CEUA, no prazo máximo de 90 (noventa) dias, após a regulamentação referida no art. 25 desta Lei;

II – compatibilizar suas instalações físicas, no prazo máximo de 5 (cinco) anos, a partir da entrada em vigor das normas estabelecidas pelo CONCEA, com base no inciso V do **caput** do art. 5º desta Lei.

Art. 23. O CONCEA, mediante resolução, recomendará às agências de amparo e fomento à pesquisa científica o indeferimento de projetos por qualquer dos seguintes motivos:

I – que estejam sendo realizados sem a aprovação da CEUA;

II – cuja realização tenha sido suspensa pela CEUA.

Art. 24. Os recursos orçamentários necessários ao funcionamento do CONCEA serão previstos nas dotações do Ministério da Ciência e Tecnologia.

Art. 25. Esta Lei será regulamentada no prazo de 180 (cento e oitenta) dias.

Art. 26. Esta Lei entra em vigor na data de sua publicação.

Art. 27. Revoga-se a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979.

Brasília, 8 de outubro de 2008; 187º da Independência e 120º da República.

LUIZ INÁCIO LULA DA SILVA

*Tarso Genro*

*Reinhold Stephanes*

*José Gomes Temporão*

*Miguel Jorge*

*Luiz Antonio Rodrigues Elias*

*Carlos Min*