

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

PAULO OTÁVIO CARMO SOUZA

**EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS
EM LESÕES PERIAPICAIS CRÔNICAS**

Goiânia

2019

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **Dissertação** **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

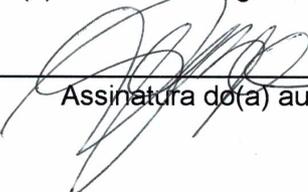
Nome completo do autor: Paulo Otávio Carmo Souza

Título do trabalho: Expressão imuno-histoquímica de células-tronco mesenquimais em lesões periapicais crônicas

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento **SIM** **NÃO**¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.



Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:



Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 20 / 03 / 2019

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Versão atualizada em setembro de 2017.

² A assinatura deve ser escaneada.

PAULO OTÁVIO CARMO SOUZA

**EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS
EM LESÕES PERIAPICAIS CRÔNICAS**

Exame de defesa apresentado como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Odontologia pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás

Linha de pesquisa: Perspectivas em odontologia clínica

Orientador: Prof. Dr. Carlos Estrela

Coorientador: Prof Dr. Brunno S. Freitas Silva

GOIÂNIA

2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Souza, Paulo Otávio Carmo

Expressão imuno-histoquímica de células-tronco mesenquimais em lesões periapicais crônicas [manuscrito] / Paulo Otávio Carmo Souza. - 2019.

XLVI, 46 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Estrela; co-orientador Dr. Brunno Santos de Freitas Silva.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Odontologia (FO), Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Goiânia, 2019.

Bibliografia. Anexos. Apêndice.

Inclui siglas, abreviaturas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Células-tronco. 2. Diferenciação celular. 3. Periodontite apical. I. Estrela, Carlos , orient. II. Título.

CDU 616.314

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu pai, Amando, meu exemplo de vida. Me espelho na sua forma de viver, na sua bondade, no seu carinho e honestidade. Lembrar de toda sua trajetória profissional é combustível para a realização dos meus sonhos.

À minha mãe, Anita, que nunca deixou de me apoiar. Se abdicou de muitas coisas na sua vida para dar o melhor para seus filhos. Um exemplo de mãe. Trabalhadora, perseverante e religiosa.

Ao meu grande irmão, Victor Hugo. Pessoa de coração gigante e exímio profissional. Agradeço pela amizade, pelos momentos felizes juntos. Tenho grande admiração pela pessoa que se tornou e pela Odontologia que exerce.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que é luz para minha vida, um exemplo que eu sigo. Todos meus passos são guiados por ele, que sempre me concedeu saúde, sabedoria, alegria e perseverança. Sou extremamente grato por todas as pessoas colocadas no meu caminho. Sem ele não sou nada!

Ao meu orientador Dr. Carlos Estrela, exemplo de pai, pesquisador e professor. Agradeço a paciência, a sinceridade e os ensinamentos compartilhados durante esta trajetória. Te admiro e respeito pelo caráter e ética na pesquisa, e pelo amor a endodontia. Muito obrigado pela oportunidade de trabalhar contigo.

Ao meu coorientador Dr. Brunno, uma das pessoas mais inteligentes que conheci. Agradeço imensamente sua disposição e solicitude. Sinto-me honrado em poder conviver com você, que foi essencial para realização deste trabalho.

Às minhas professoras Ana Helena e Patrícia. Com vocês aprendi o valor da docência e evolui muito como pessoa. Agradeço infinitamente todo carinho, conhecimento compartilhado e disposição em ajudar.

Aos meus professores Júlio e Daniel. Pessoas essenciais no meu crescimento profissional e pessoal. Fonte de inspiração para todos que os rodeiam. Espero um dia poder retribuir toda contribuição que tive. Agradeço a amizade de vocês.

À minha namorada Carolina, minha companheira desde o primeiro dia de graduação. Agradeço pela força, amizade, e carinho durante todos esses anos. Não tenho palavras para agradecer a cumplicidade e os momentos compartilhados. Me inspiro diariamente em você.

Aos meus amigos Mateus e Marco, companheiros de vida acadêmica. Vocês fizeram parte e contribuíram muito na minha formação profissional e pessoal. Muito obrigado pela convivência, lealdade e amizade.

Aos meus amigos Allisson Martins e Iussif Mamede, que foram peças-chave na minha carreira profissional e pessoal. Me inspirou muito em vocês e serei eternamente grato por tudo que fizeram por mim.

Aos meus colegas de pós-graduação Marcela, Vinícius, Gustavo, Giulliano, Luiz, Olavo, Luma, Sara, Marcus, Alexandre, Marília e todos os outros pós-graduandos, pela convivência e aprendizado juntos.

À equipe do Laboratório de Patologia da FOUSP, em especial ao prof. Décio e a sra. Elisa, que tornaram possível a realização da pesquisa.

À equipe do Laboratório de Patologia da FO/UFG, especialmente ao prof. Elismauro, profa. Aline e sr. Erildo, pelos ensinamentos durante a graduação e também pelo apoio e disponibilidade durante a realização da pesquisa.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

Agradeço à Universidade Federal de Goiás (UFG) e a Faculdade de Odontologia da UFG que tornaram possível a realização da pesquisa e do curso de pós-graduação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio na forma de concessão de bolsa de Mestrado (número do processo 1706513).

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da FO-UFG pelo conhecimento adquirido, pela busca incessante em capacitar os alunos e pela solicitude em ajudar os discentes.

Ao Laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP) por disponibilizar grande parte dos insumos necessários para realização da pesquisa.

RESUMO

Introdução: Os mecanismos do processo de patogênese das lesões periapicais crônicas ainda necessitam de mais discussões. Células-tronco mesenquimais (CTM) presentes na região periapical podem participar do processo de gênese e desenvolvimento das periodontites apicais crônicas, em virtude da capacidade de migração e diferenciação em ambientes inflamatórios. **Objetivo:** Avaliar a expressão imuno-histoquímica dos marcadores de CTM (CD44, CD45, CD73 e CD105) em lesões periapicais crônicas. **Metodologia:** Dez amostras de cistos periapicais e dez granulomas periapicais foram selecionadas do arquivo de blocos do laboratório de ciência endodôntica da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás (FO/UFG) para realização de reação imuno-histoquímica. A frequência da presença ou ausência dos marcadores CD44, CD45, CD73 e CD105 foi avaliada sob microscopia óptica de luz nos campos de maior expressão, e a expressão imuno-histoquímica de CTM foi determinada quando houve co-expressão positiva nos marcadores CD44, CD73 e CD105 e expressão negativa para o marcador CD45. A frequência das variáveis qualitativas foram obtidas e avaliadas pelo Teste do Qui-quadrado. Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$. **Resultados:** Nos granulomas periapicais, 20% (2/10) apresentaram co-expressão para os marcadores positivos de CTM (CD44, CD73 e CD105) associado a ausência de expressão para o marcador negativo de CTM (CD45). No grupo de cistos periapicais não houve casos (0/10) de co-expressão imuno-histoquímica para os marcadores CD44, CD73 e CD105 associado a ausência de expressão de CD45. **Conclusão:** Nos cistos periapicais não houve expressão imuno-histoquímica de CTM e a expressão imuno-histoquímica ocorreu em 2 dos 10 casos de granulomas periapicais.

Palavras-chave: Células-tronco, Diferenciação Celular, Periodontite apical

ABSTRACT

Introduction: Mechanisms of the pathogenesis process of chronic periapical lesions still require further discussion. Mesenchymal stem cells (MTC) present in the periapical region may participate in the process of genesis and development of chronic apical periodontitis, due to the ability of migration and differentiation in inflammatory environments. **Objective:** To evaluate the immunohistochemical expression of CTM markers (CD44, CD45, CD73 and CD105) in chronic periapical lesions. **Method:** Ten samples of periapical cysts and ten periapical granulomas were selected from the block file of the endodontic science laboratory of the Faculty of Dentistry of the Federal University of Goiás to perform an immunohistochemical reaction. The frequency of the presence or absence of the CD44, CD45, CD73 and CD105 markers was assessed under light microscopy in the fields of higher expression, and the immunohistochemical expression of CTM was determined when there was positive co-expression on the CD44, CD73 and CD105 markers and negative expression for the CD45 marker. The frequency of the qualitative variables were obtained and evaluated by the Chi-square test. Values of $p < 0.05$ were considered significant. **Results:** In the periapical granulomas, 20% (2/10) presented co-expression for CTM positive markers (CD44, CD73 and CD105) associated with no expression for the CTM (CD45) negative marker. In the periapical cysts group there were no cases (0/10) of immunohistochemical coexpression for CD44, CD73 and CD105 markers associated with absence of CD45 expression. **Conclusion:** In the periapical cysts there was no immunohistochemical expression of CTM and the immunohistochemical expression occurred in 2 of the 10 cases of periapical granulomas.

Key-words: Stem Cells, Cell Differentiation, Periapical Periodontitis

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Fotomicrografia de Corte histológico em Hematoxilina e Eosina representando: A) Granuloma periapical com presença de infiltrado inflamatório crônico, vasos sanguíneos e fibroblastos e B) cisto periapical, com presença de tecido epitelial, revestido por cápsula de tecido conjuntivo associado a infiltrado inflamatório crônico (Aumento 100x)..... 21
- Figura 2** - Fotomicrografia da expressão imuno-histoquímica nos controles positivos (200x) - Expressão citoplasmática de A) CD44 em amígdala humana; apresentando marcação em tecido linfóide nodular; B) CD45 em líquen-plano, presente principalmente na região de cristas epiteliais; C) CD73 em carcinoma espinocelular de boca; D) CD105 em carcinoma espinocelular de boca..... 27
- Figura 3** - Fotomicrografia da expressão imuno-histoquímica dos marcadores na papila apical (200x) - Expressão citoplasmática positiva na região rica em célula da papila apical em A) marcador CD44, C) marcador CD73 e D) marcador CD105 e expressão citoplasmática negativa em B)CD45..... 28
- Figura 4** - Fotomicrografia da expressão imuno-histoquímica dos marcadores no cisto periapical (200x) - Expressão citoplasmática de: A) CD44, B) CD45, C) CD73 e D) CD105..... 29
- Figura 5** - Fotomicrografia da expressão imuno-histoquímica dos marcadores no granuloma periapical (200x) - Expressão citoplasmática de:CD44, B) CD45, C) CD73 e D) CD105..... 30
- Figura 6** - Gráfico com porcentagem dos casos que apresentaram co-expressão do marcadores CD44+/CD73+/CD105+/CD45- em cistos e granulomas..... 33

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1 - Anticorpos utilizados para estudo imuno-histoquímico.....	24
Tabela 1 - Expressão dos cistos e granulomas periapicais em relação aos marcadores – CD44, CD73, CD45 e CD105.....	31
Tabela 2 – Expressão de cada marcador em relação aos grupos cisto e granuloma periapical.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

>	Maior que
<	Menor que
™	Marca comercial
®	Marca registrada
°C	Graus Celsius
%	Porcento
µm	Micrometros
CTM	Células-Tronco Mesenquimais
DAB	3,3'- Diaminobenzidina
FO/UFG	Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
HE	Hematoxilina e Eosina
PBS	Tampão fosfato-salino
TRIS	(Hidroximetil) Aminometano
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TALE	Termo de assentimento livre e esclarecido
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 OBJETIVOS.....	19
2.1 OBJETIVO GERAL.....	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
3 METODOLOGIA.....	20
3.1 OBTENÇÃO, SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	20
3.2 TÉCNICAS EMPREGADAS	21
3.2.1 TÉCNICA DE ROTINA.....	21
3.2.2 TÉCNICA DE IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	22
3.3 AVALIAÇÃO QUALITATIVA E QUANTITATIVA DOS DADOS.....	24
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS	25
4 RESULTADOS.....	26
5 DISCUSSÃO.....	34
6 CONCLUSÃO.....	36
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37
APÊNDICES.....	41
ANEXOS.....	46

1 INTRODUÇÃO

A Periodontite Apical é uma consequência da dinâmica reação entre infecção endodôntica e resposta imunológica do hospedeiro (NAIR, 2004). A colonização de micro-organismos no canal radicular desencadeia uma resposta imune nos tecidos periapicais, a qual induz destruição do ligamento periodontal e reabsorção do osso alveolar, com o estabelecimento da lesão periapical (STASHENKO, 1998).

No estágio inicial da periodontite apical, as primeiras células inflamatórias envolvidas são neutrófilos, as quais liberam prostaglandinas e outros mediadores inflamatórios (NEVILLE *et al.* 2016). Estas células são capazes de induzir sintomatologia dolorosa e ativar os osteoclastos para reabsorção do osso circundante, cujo objetivo é uma tentativa de impedir a propagação da infecção (NEVILLE *et al.*, 2016).

Na infecção intrarradicular persistente com equilíbrio da resposta do hospedeiro verifica-se o predomínio de infiltrado inflamatório crônico na região periapical e diminuição da reabsorção óssea, desenvolvendo assim uma lesão periapical crônica (ESTRELA, 2009). O granuloma periapical é uma lesão periapical crônica caracterizada por um tecido de granulação com células inflamatórias crônicas, vasos neoformados, circundado por um tecido conjuntivo fibroso (MAEDA *et al.* 2004; NEVILLE *et al.* 2016).

Os cistos periapicais são lesões que apresentam uma cápsula de tecido conjuntivo fibroso infiltrado por células inflamatórias mistas (mononucleares e polimorfonucleares) revestido por um epitélio estratificado não queratinizado de espessura variável (REGEZI *et al.* 2016). A teoria mais aceita na literatura sobre sua patogênese, propõe que durante a inflamação periapical, os restos epiteliais de Malassez que permanecem na região periapical são induzidos e se proliferam a partir de fatores de crescimento, citocinas e mediadores inflamatórios (LIN *et al.* 2007). Com o crescimento dos restos epiteliais, forma-se uma massa celular esférica, em que as células centrais se afastam da sua fonte de nutrição, sofrem necrose, degeneração por liquefação e, conseqüentemente, inicia-se a formação da cavidade cística revestida por epitélio (LIN *et al.* 2007).

Nair *et al.* (1996) avaliaram o diagnóstico histopatológico de 256 lesões periapicais e observaram uma incidência aproximadamente 3 vezes maior de granulomas

(50%) quando comparados com cistos periapicais (15%). Foi observado que 52% das lesões apresentavam algum tipo de epitélio odontogênico. Estes resultados sugerem que mesmo apresentando remanescentes epiteliais sob condição inflamatória, nem todo granuloma evolui para um cisto periapical. Pode-se concluir que os mecanismos do processo de patogênese das lesões periapicais crônicas ainda não estão totalmente elucidados na literatura.

Em um estudo recente, Estrela *et al.* (2017) avaliaram a expressão de um marcador de CTM (CD90) em lesões periapicais persistentes. Foi observado elevada expressão de CD90 em lesões periapicais persistentes associado a presença de infiltrado inflamatório crônico. Neste estudo, os autores discutiram sobre a origem destas células imunomarcadas, levantando o questionamento sobre a possibilidade destas células serem ativadas e emergirem para a lesão, frente a liberação de citocinas inflamatórias.

As células-tronco são definidas como células com capacidade de auto-renovação ou diferenciação em múltiplas linhagens celulares, e geralmente são classificadas de acordo com sua capacidade de diferenciação em: totipotentes, pluripotentes e multipotentes. (GRONTHOS *et al.* 2002).

As células-tronco totipotentes são derivadas de células germinativas, apresenta elevado poder de multiplicação e são capazes de se diferenciar em qualquer outro tecido humano. As células pluripotentes ou embrionárias podem se diferenciar em todos os tipos de células adultas, exceto em células que formam os tecidos extra-embrionários. As células multipotentes ou adultas têm o potencial de diferenciação em células especializadas mais reduzido (EGUSA *et al.* 2012; RODRÍGUEZ-LOZANO *et al.* 2012).

As principais estruturas presentes no dente são derivadas do ectomesênquima dentário, por isso as células-tronco mesenquimais são as células multipotentes mais estudadas na odontologia (GRONTHOS, 2000; RODRÍGUEZ-LOZANO *et al.* 2012). Estas células podem ser encontradas na polpa dental, ligamento periodontal, dente decíduo esfoliado, papila apical e folículo dental (ESTRELA *et al.* 2011; EGUSA *et al.* 2012; CUI *et al.* 2018). Estas células permanecem quiescentes e podem ser ativadas a qualquer momento podendo se diferenciar em diversos tipos celulares (EGUSA *et al.* 2012).

Segundo a Sociedade Internacional de Terapia Celular, para caracterização de uma CTM é necessário que a célula apresente co-expressão positiva para os marcadores CD73, CD90, CD105 associado a expressão negativa do marcador CD45 (DOMINICI *et al.* 2006). Além desses marcadores, Calloni *et al.* (2013) fizeram uma revisão e atualização dos marcadores e descreveram que CD44 apresenta alta expressão de CTM.

O CD44 é uma classe muito ampla de glicoproteína transmembrana que é expressa na matriz extracelular e na superfície celular de células epiteliais, mesenquimais e hematopoiéticas (CHEN *et al.* 2006; BUHRING *et al.* 2007). Esta molécula apresenta diversas atividades celulares como interação célula-célula, célula-matriz extracelular, migração celular, apresentação de fatores de crescimento, citocinas, transmissão de sinal da superfície celular para o seu interior, apoptose, sobrevivência celular e proliferação (ZÖLLER *et al.* 2011).

O CD45 é expresso exclusivamente nas células do sistema hematopoiético e é uma das mais abundantes glicoproteínas da superfície celular de leucócitos, participando do sinal de transdução de linfócitos (TROWBRIDGE e THOMAS, 1994; BAKOPOLOU *et al.* 2011).

O CD73 conhecida como ecto-5'-nucleotidase é uma enzima da superfície celular ligada a glicosil-fosfatidilinositol encontrada na maioria dos tecidos, foi originalmente definida como um antígeno de diferenciação de linfócitos, funciona como uma molécula de co-sinalização em linfócitos T e como uma molécula de adesão importante para a ligação de linfócitos ao endotélio (ZHANG, 2010).

O CD105, também chamado de endoglina é uma proteína transmembrânica componente do receptor do fator transformador de crescimento- β , que é predominantemente expresso em células endoteliais angiogênicas (DUFF *et al.* 2003).

A capacidade de migração das CTM foi verificada por Lovelace *et al.* (2011), sendo observado um elevado influxo de CTM para o canal radicular durante procedimentos endodônticos regenerativos, o que caracteriza uma excelente mobilidade destas células. Alguns fatores quimiotáticos comuns no processo inflamatório foram verificados neste ambiente, o que mostra o potencial de recrutar células-tronco de sítios distintos e ao mesmo tempo modular a diferenciação celular (FAYAZI *et al.* 2017).

Nos últimos anos a papila apical têm recebido notável atenção no estudo de CTM, visto que é um sítio com grande presença destas células (SONOYAMA *et al.* 2006; EGUSA *et al.* 2012; HARGREAVES *et al.* 2013; RUPAREL *et al.* 2013). A papila apical consiste na porção apical da papila dental e em conjunto com a bainha epitelial de Hertwig é responsável pelo desenvolvimento da porção radicular dos dentes (HUANG *et al.* 2008).

Até a presente data não há na literatura estudos que avaliem especificamente a expressão de CTM em lesões periapicais crônicas, o que reforça a necessidade de caracterizar a sua expressão. Além disso, é plausível sugerir que posterior a infecção endodôntica, há a possibilidade destas CTM presentes na região periapical participarem do processo de gênese e desenvolvimento das periodontites apicais crônicas, em virtude da capacidade de migração e diferenciação em ambientes inflamatórios.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão imuno-histoquímica de células-tronco mesenquimais em lesões periapicais crônicas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar e comparar a frequência da presença ou ausência de expressão dos marcadores CD44, CD45, CD73 e CD105 em cistos e granulomas periapicais.

Avaliar a co-expressão positiva dos marcadores CD44, CD73 e CD105, associado a marcação negativa do marcador CD45 em cistos e granulomas periapicais.

3 METODOLOGIA

3.1 OBTENÇÃO, SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Para este estudo transversal analítico foram selecionados vinte amostras de lesões periapicais do arquivo de blocos do Laboratório de Ciência Endodôntica da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás (FO/UFG), provenientes de dentes de pacientes maiores de 18 anos, que apresentavam indicação de extração ou cirurgia periapical atendidos na Disciplina de Urgência da FO/UFG.

Os critérios de inclusão envolviam espécimes de lesões periapicais de dentes de pacientes saudáveis com diagnóstico clínico de periodontite apical assintomática e diagnóstico microscópico de cisto ou granuloma periapical. Foram excluídos espécimes de pacientes que apresentavam: ficha clínica com dados incompletos, blocos parafinados com quantidade insuficiente de tecido.

Foi utilizado como controle positivo para caracterização das CTM papilas apicais coletadas de cinco terceiros molares hígidos, com rizogênese incompleta, ausência de infecção, sintomatologia de origem pulpar ou pericoronarite, extraídos de pacientes da Clínica de Extensão de Cirurgia Bucomaxilofacial da FO/UFG. As papilas apicais foram armazenadas em solução de formol a 10%, incluídas em parafina para posterior caracterização das CTM.

Para o controle positivo das reações foram utilizados espécimes de carcinoma espinocelular de boca para os marcadores CD73 e CD105, de amígdala humana para CD44 e de líquen-plano para CD45, provenientes do arquivo de blocos do Laboratório de Patologia Bucal da FO/UFG. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal de Goiás - protocolo No. 2.472.461 (Anexo 1).

3.2 TÉCNICAS EMPREGADAS

3.2.1 TÉCNICA DE ROTINA

As amostras selecionadas foram seccionadas em micrótomo (Leica RM2165, *Boston Laboratory Equipment*, Heidelberg, Alemanha), obtendo-se de cada bloco cortes consecutivos de 5 μ m, os quais foram posicionados sobre lâminas histológicas e corados pelo método de Hematoxilina-Eosina (HE). Esses cortes foram examinados para confirmação do diagnóstico microscópico de cisto periapical ou granuloma periapical por especialista em patologia bucal com mais de dez anos de experiência. A seguir, as amostras, de acordo com o diagnóstico, foram divididas em 2 grupos: cistos periapicais (n=10) e granulomas periapicais (n=10) (Figura 1).

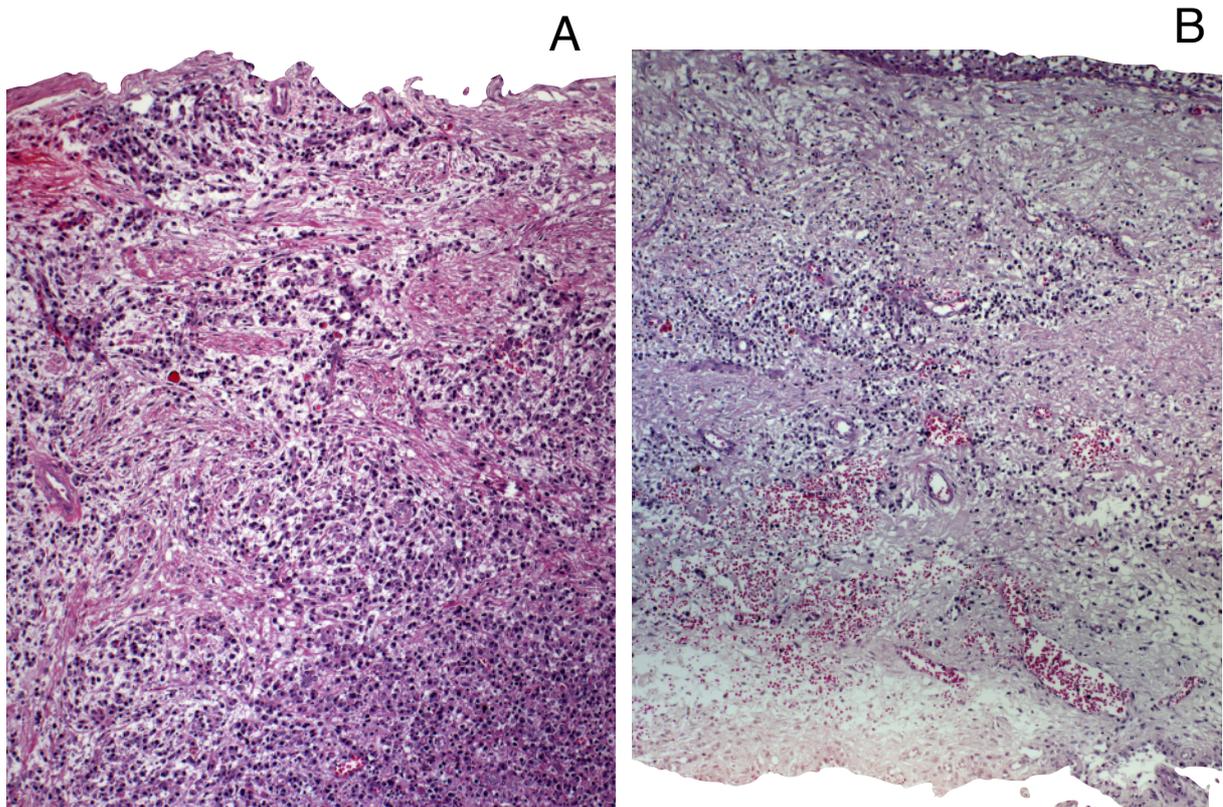


Figura 1 - Fotomicrografia de Corte histológico em Hematoxilina e Eosina representando: A) Granuloma periapical com presença de infiltrado inflamatório crônico, vasos sanguíneos e fibroblastos e B) cisto periapical, com presença de tecido epitelial, revestido por cápsula de tecido conjuntivo associado a infiltrado inflamatório crônico (Aumento 100x).

3.2.2 TÉCNICA DE IMUNO-HISTOQUÍMICA

Foram obtidos cortes seriados com aproximadamente 3µm de espessura em micrótomo (Leica RM2165, *Boston Laboratory Equipment*, Heidelberg, Alemanha) das amostras de cistos, granulomas periapicais e papila apical. A seguir, os cortes foram montados em lâminas silanizadas e submetidos à técnica da imuno-histoquímica no laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP).

Primeiramente foi realizado a desparafinização em 2 banhos de xilol: o primeiro por 30 minutos à temperatura de 60°C; e o segundo banho por 15 minutos à temperatura de aproximadamente 25°C. Posteriormente, foi realizado a reidratação dos cortes em uma série de 7 banhos em etanol com concentrações decrescentes, por 3 minutos cada, sendo que os primeiros 3 banhos foram realizados em etanol absoluto, o quarto, quinto, sexto e sétimo em concentrações de 95%, 90%, 85%, 80%, respectivamente.

Ao final, foi realizado um banho de 5 minutos em hidróxido de amônio a 10% associado a etanol 95% para a remoção de pigmentos formólicos, seguidos de 10 minutos em água corrente e 2 banhos em água destilada. Posteriormente, a realização da exposição antigênica foi realizada através da imersão em ácido cítrico monohidratado (pH=6,0) em banho-maria digital 96°C durante 30 minutos, seguido de 10 minutos em água corrente.

Para o bloqueio da peroxidase endógena tecidual foi utilizado solução de peróxido de hidrogênio a 6% associado a metanol na proporção de 1:1, em 2 banhos de 15 minutos cada. E ao fim desta etapa foi realizada a lavagem em água destilada por 5 minutos e colocação das lâminas em solução de TRIS (hidroximetil-aminometano) pH= 7,6 por 5 minutos.

Todos os cortes seguiram para o equipamento automatizado DAKO *Autostainer Universal Staining System* (DAKO Corp. ®, Carpinteria, CA, EUA) para incubação dos anticorpos primários anti-CD44, anti-CD45, anti-CD73, anti-CD105 sob temperatura controlada a 37°C por 40 minutos. Sendo que a diluição dos anticorpos foi realizada utilizando TBS associado a soro albumina bovina (TBS-BSA) a 1% (Tabela 1).

Em seguida foi realizada a incubação do kit secundário ADVANCE™ HRP (DAKO Corp. ®, Carpinteria, CA, EUA), em que primeiramente incuba-se em ADVANCE™ HRP Link por 30 minutos e depois em ADVANCE™ HRP *Enzyme* por 30 minutos e posterior revelação da reação com DAKO *Liquid DAB plus* (Dako Corp.®, Carpinteria, CA, EUA) por 10 minutos e contra-coloração com hematoxilina por 2 minutos .

Entre cada uma das reações realizadas automaticamente, os cortes foram lavados duas vezes em solução de TRIS. Posteriormente, todos os cortes foram desidratados numa série de etanol em concentrações crescentes (70%, 75%, 80%, 85%, 90% 95% e 3 vezes em álcool absoluto) por 3 minutos cada e em seguida, diafanizados duas vezes em xilol por 10 minutos, seguindo para montagem final em equipamento automatizado (*Tissue-Tek® Film® Coverslipper, Sakura Finetechnical, Osaka, JPN*).

As amostras de amígdala humana, líquen-plano e carcinoma espinocelular, utilizadas como controle positivo da reação, foram submetidas ao protocolo imuno-histoquímico para determinar o correto funcionamento da reação. Além disso, como controle negativo foi realizada omissão dos anticorpos primários durante a reação imuno-histoquímica.

Quadro 1. Anticorpos utilizados para estudo imuno-histoquímico

Anticorpo	Fabricante	Diluição/Exposição	Controle Positivo
Anticorpo monoclonal de rato CD44 (156-3C11) - Específico para imuno-histoquímica	Cell Signaling, MA, USA	1:400 / Citrato (pH=6,0) - Banho maria - 30 minutos	Amígdala Humana
Anticorpo monoclonal de coelho CD45 (D9M8I) - Específico para imuno-histoquímica	Cell Signaling, MA, USA	1:400 / Citrato (pH=6,0) - Banho maria - 30 minutos	Líquen-plano
Anticorpo monoclonal de coelho CD73/NT5E (D7F9A) - Específico para imuno-histoquímica	Cell Signaling, MA, USA	1:400 / Citrato (pH=6,0) - Banho maria - 30 minutos	Carcinoma espinocelular
Anticorpo monoclonal de rato CD105 (Endoglin - 3A9) - Específico para imuno-histoquímica	Cell Signaling, MA, USA	1:400 / Citrato (pH=6,0) - Banho maria - 30 minutos	Carcinoma espinocelular

3.3 AVALIAÇÃO QUALITATIVA E QUANTITATIVA DOS DADOS

A expressão imuno-histoquímica de CD44, CD45, CD73 e CD105 foi analisada de forma qualitativa, de acordo com a presença ou ausência de células positivas para coloração citoplasmática e/ou membrana citoplasmática. Foram consideradas positivas somente as células que apresentavam morfologia celular de células inflamatórias e CTM, que apresentavam formato alongado, fusiforme e citoplasma abundante.

A expressão imuno-histoquímica foi avaliada na região da cápsula e epitélio dos cistos periapicais, em toda extensão do granuloma periapical e no grupo controle positivo das papilas apicais sob microscópio óptico de luz (*PrimoStar*, Carls Zeiss, Zurich, Switzerland) em aumento de 200x. Foram selecionados os campos de maior expressão (*hot spots*) em um aumento de 400x para confirmação da expressão. A análise foi realizada por um especialista em patologia bucal com mais de dez anos de experiência e cegado para informações clínicas sobre os casos.

Após análise microscópica, para ser considerado CTM foi avaliado quantitativamente o número de casos que apresentavam co-expressão imuno-histoquímica positiva para os marcadores CD73 e CD105 e expressão imuno-histoquímica negativa para o marcador CD45, de acordo com Dominici *et al.* (2006) associado a expressão positiva para CD44 (CALLONI *et al.* 2013).

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

A frequência das variáveis qualitativas foram obtidas e avaliadas a associação pelo Teste do Chi-quadrado. Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$. A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o software *Statistical Package for the Social Sciences*, versão 20 (SPSS, Chicago, IL).

4 RESULTADOS

Os controles positivos da reação demonstraram expressão imuno-histoquímica positiva para carcinoma espinocelular de boca para os marcadores CD73 e CD105, de amígdala humana para CD44 e de líquen-plano para CD45 (Figura 2).

A avaliação do grupo controle positivo das cinco papilas apicais caracterizou a presença de CTM, pois apresentou co-expressão imuno-histoquímica positiva para os marcadores CD44, CD73 e CD105 e negativa para o marcador CD45 em todas as amostras, (Figura 3).

No grupo de cistos periapicais, a expressão imuno-histoquímica foi observada claramente em toda extensão da lesão (Figura 4). Quando avaliada a associação da expressão positiva dos quatro marcadores CD44, CD45, CD73 e CD105 no grupo de cistos periapicais não houve diferença estatística significativa ($p=0,310$). Os resultados da análise da frequência da ausência e presença dos marcadores nos cistos periapicais estão apresentados na Tabela 1.

No grupo de granulomas periapicais a expressão imuno-histoquímica também foi observada em toda extensão da lesão (Figura 5). Quando avaliada a associação da expressão positiva dos quatro marcadores CD44, CD45, CD73 e CD105 no grupo de granulomas periapicais houve diferença estatística significativa ($p=0,028$). Os resultados da análise da frequência da ausência e presença dos marcadores nos granulomas periapicais estão apresentados na Tabela 1.

Quando avaliada a associação da expressão de cada marcador em relação aos grupos cistos e granulomas periapicais, não houve diferenças estatísticas entre a frequência dos marcadores analisados (Tabela 2).

Dos granulomas avaliados, 20% (2/10) dos casos apresentaram co-expressão para os marcadores positivos de CTM (CD44, CD73 e CD105) associado a ausência de expressão para o marcador negativo de CTM (CD45). Diferentemente do grupo de cistos periapicais, que não apresentaram casos (0/10) de co-expressão imuno-histoquímica para os marcadores CD44, CD73 e CD105 associado a ausência de expressão de CD45 (Figura 6).

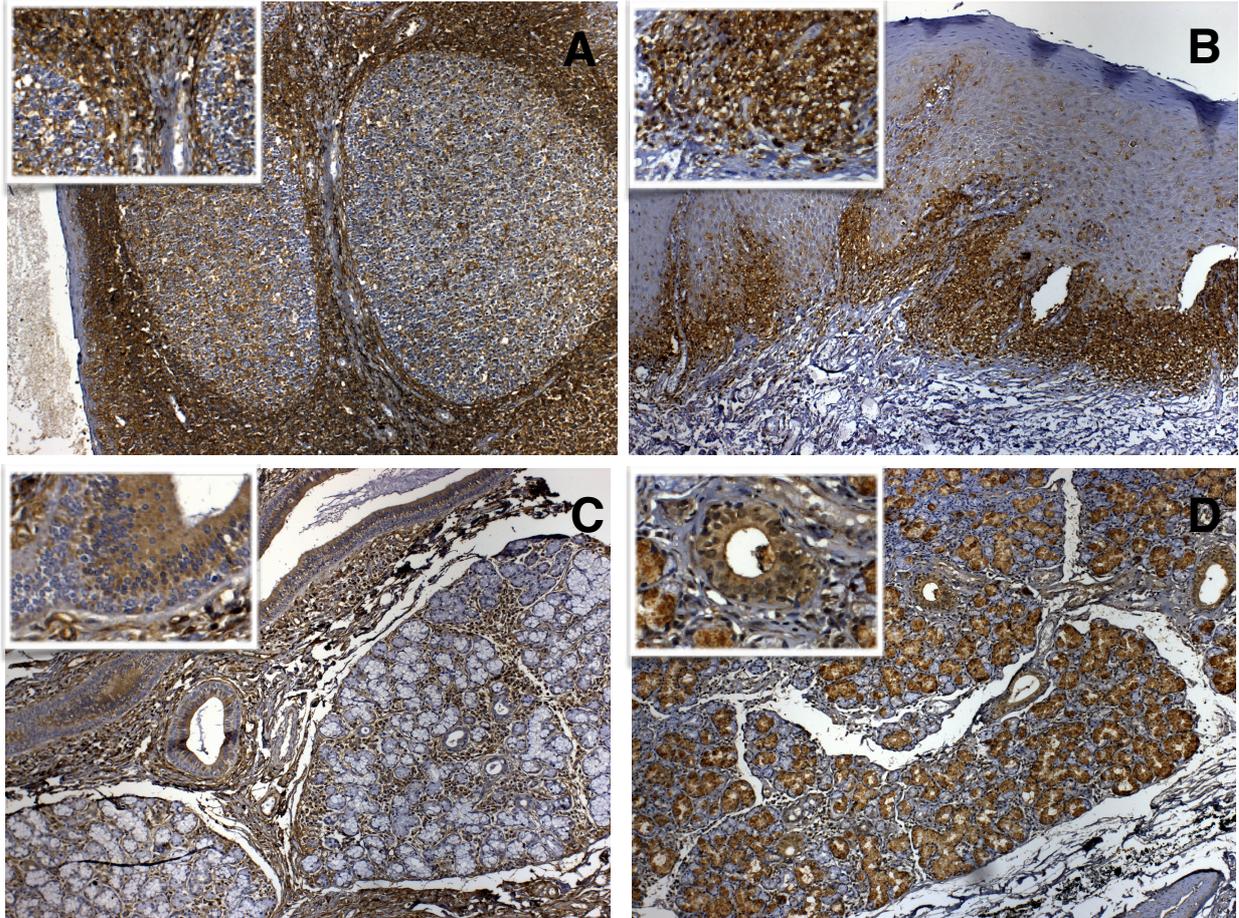


Figura 2 - Fotomicrografia da expressão imuno-histoquímica nos controles positivos (200x) - Expressão citoplasmática de A) CD44 em amígdala humana; apresentando marcação em tecido linfóide nodular; B) CD45 em líquen-plano, presente principalmente na região de cristas epiteliais; C) CD73 em carcinoma espinocelular de boca; D) CD105 em carcinoma espinocelular de boca.

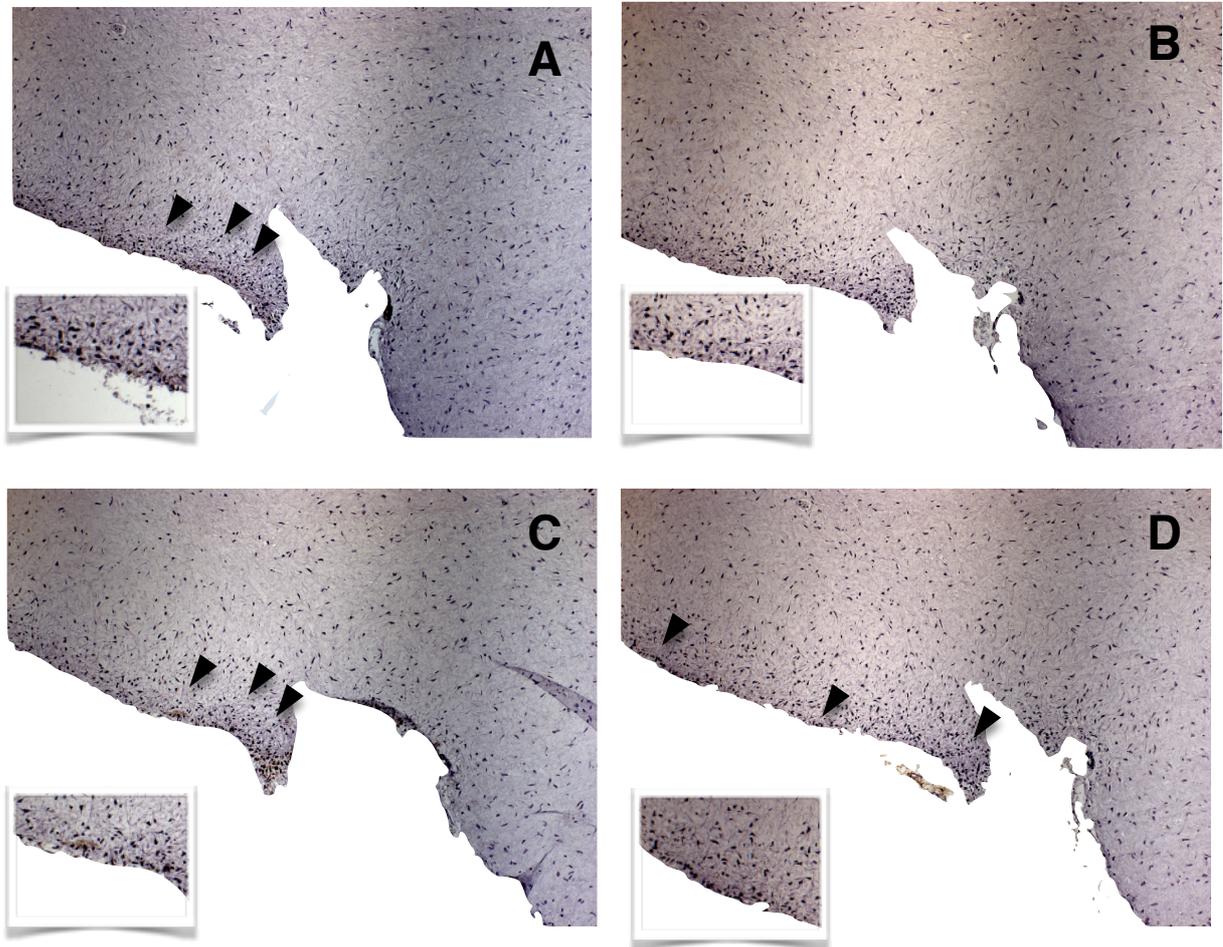


Figura 3 - Fotomicrografia da expressão imuno-histoquímica dos marcadores na papila apical (200x)
- Expressão citoplasmática positiva na região rica em célula da papila apical em A) marcador CD44, C) marcador CD73 e D) marcador CD105 e expressão citoplasmática negativa em B)CD45.

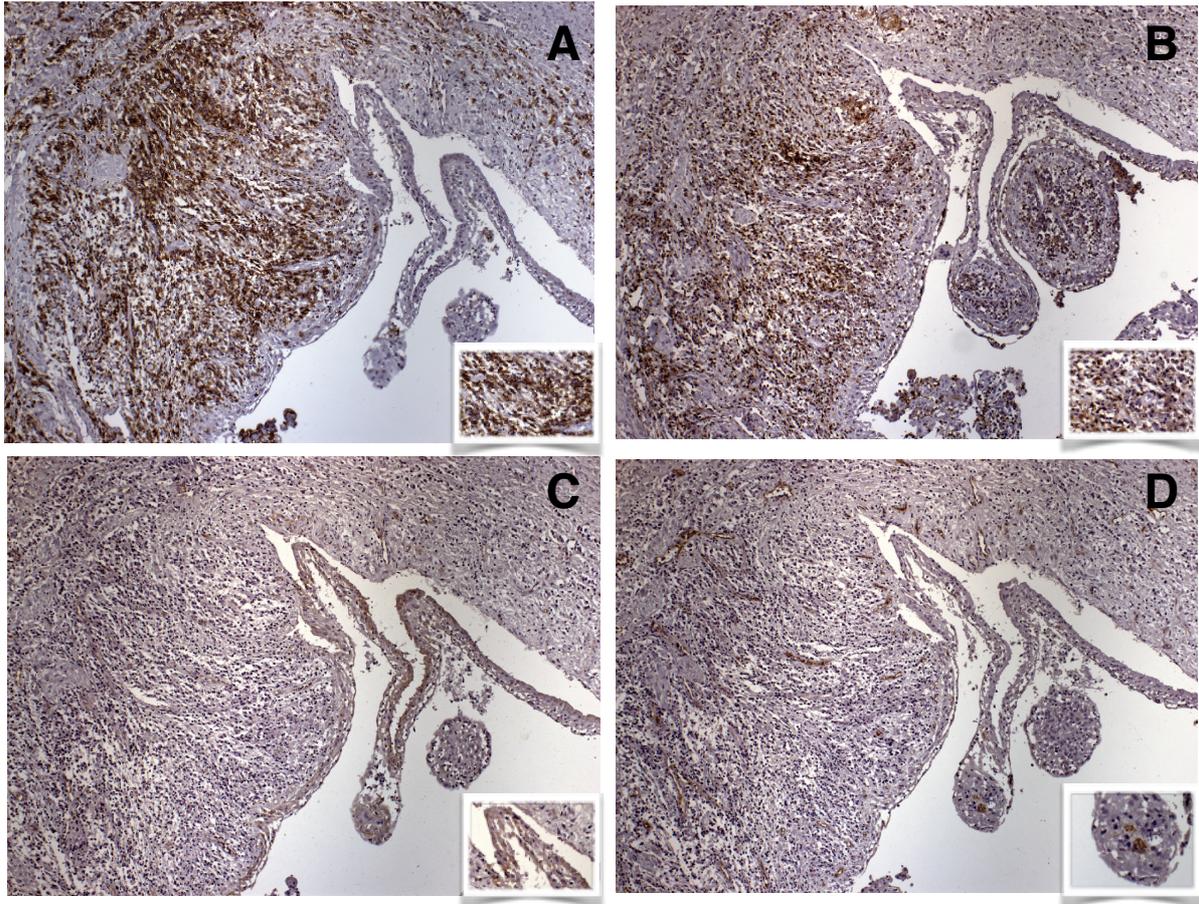


Figura 4 - Fotomicrografia da expressão imuno-histoquímica dos marcadores no cisto periapical (200x) - Expressão citoplasmática de: A) CD44, B) CD45, C) CD73 e D) CD105.

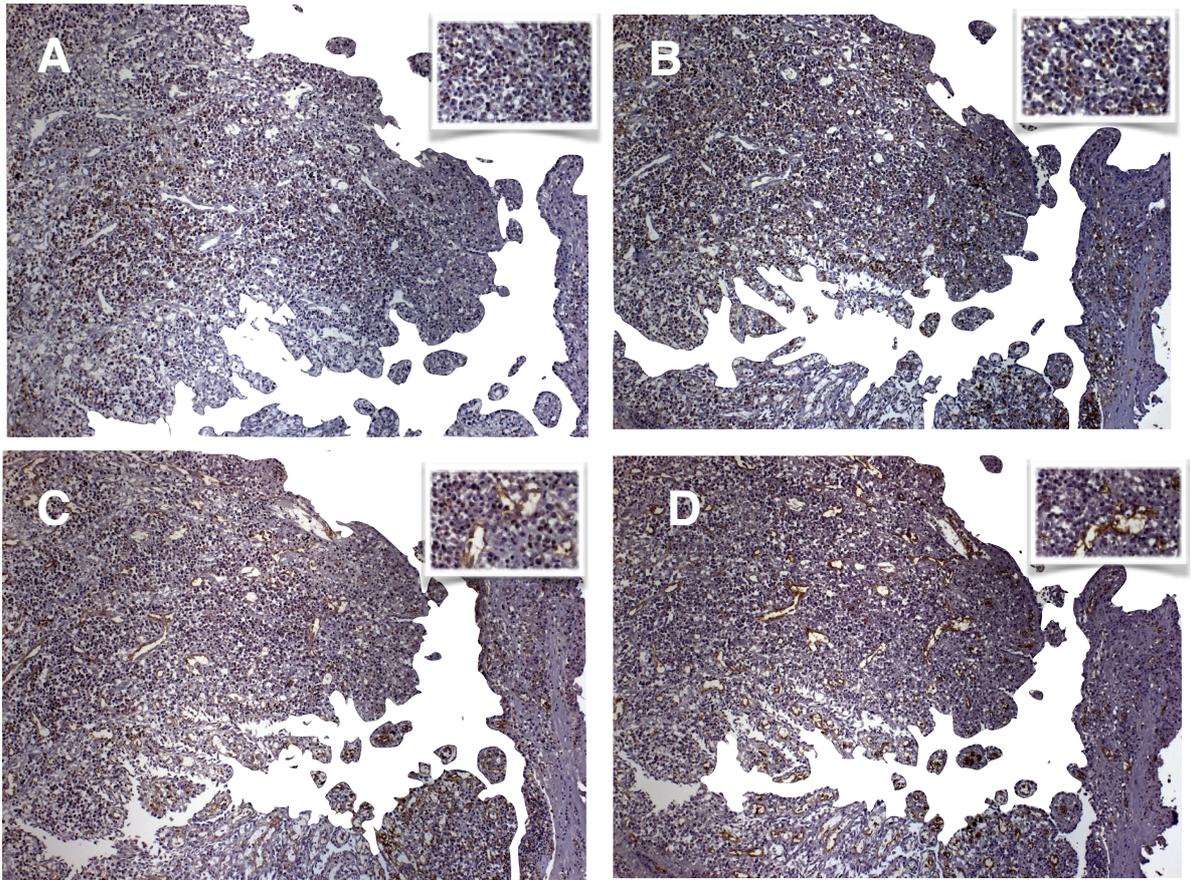


Figura 5 - Fotomicrografia da expressão imuno-histoquímica dos marcadores no granuloma periapical (200x) - Expressão citoplasmática de: A) CD44, B) CD45, C) CD73 e D) CD105.

Tabela 1 - Expressão dos cistos e granulomas periapicais em relação aos marcadores – CD44, CD73, CD45 e CD105

Grupo	Marcador	Ausência	Presença	<i>p</i>
Cisto	CD44	4	6	0,310
	CD73	5	5	
	CD45	6	4	
	CD105	8	2	
Granuloma	CD44	2	8	0,028*
	CD73	4	6	
	CD45	8	2	
	CD105	7	3	

(*)indica uma diferença estatisticamente significativa (Teste chi-quadrado de Pearson)

Tabela 2 – Expressão de cada marcador em relação aos grupos cisto e granuloma periapical

Marcador	Grupo	Ausência	Presença	<i>p</i>
CD44	Cisto (n=10)	4	6	0,329
	Granuloma (n=10)	2	8	
CD73	Cisto (n=10)	5	5	0,653
	Granuloma (n=10)	4	6	
CD45	Cisto (n=10)	6	4	0,329
	Granuloma (n=10)	8	2	
CD105	Cisto (n=10)	8	2	0,606
	Granuloma (n=10)	7	3	

(Teste chi-quadrado de Pearson)

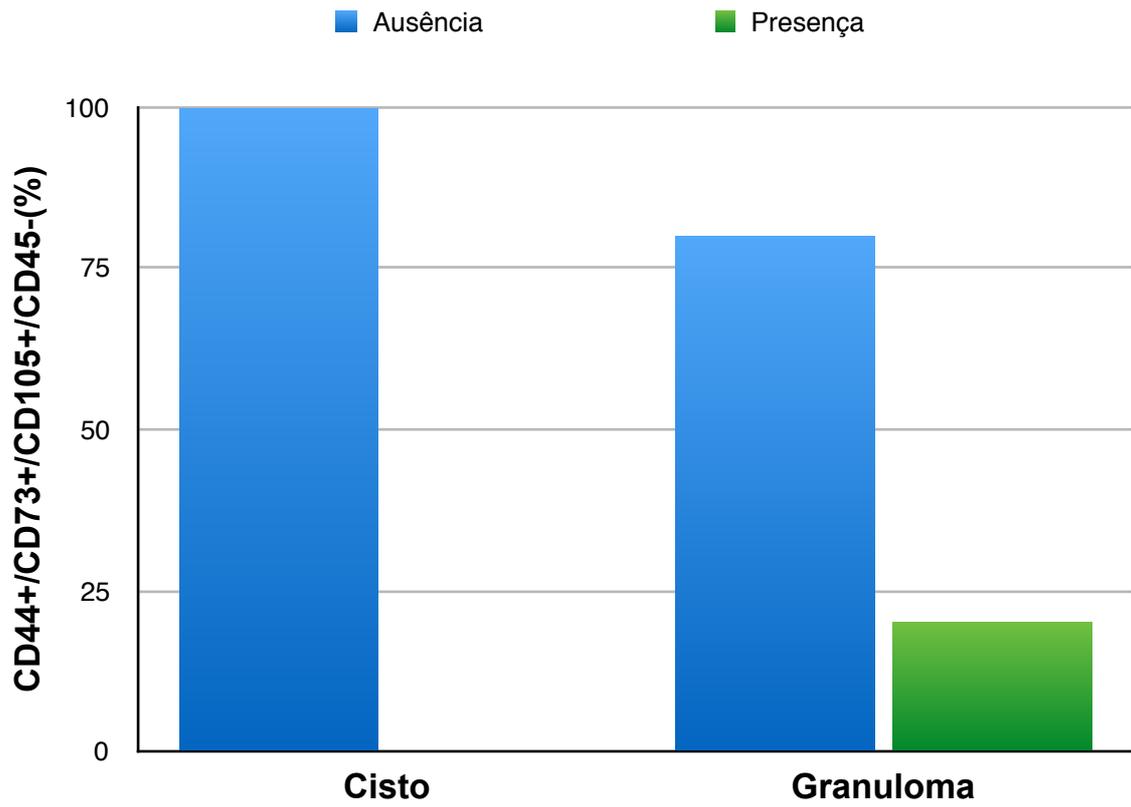


Figura 6 - Gráfico com porcentagem dos casos que apresentaram co-expressão do marcadores CD44+/CD73+/CD105+/CD45- em cistos e granulomas

5 DISCUSSÃO

A expressão imuno-histoquímica de CTM não foi observada nos casos de cistos periapicais. Nos granulomas periapicais a expressão de CTM foi observada em 20% (2/10) dos casos. Desta forma, pode-se concluir que os granulomas periapicais podem apresentar uma maior capacidade de induzir a diferenciação e proliferação dos remanescentes epiteliais, devido a maior presença de CTM.

Sabendo que há a possibilidade das CTM serem ativadas e emergirem para a lesão frente a liberação de citocinas inflamatórias (ESTRELA *et al.* 2017), esta diferença de expressão pode ser explicada devido a resposta imunorregulatória distinta dos dois tipos de lesões (TEIXEIRA-SALUM *et al.* 2010). Teixeira-Salum *et al.* (2010) avaliaram citocinas inflamatórias presentes em setenta e dois casos de cistos radiculares e trinta casos de granulomas periapicais e sugeriram que o balanço de citocinas Th1, Th2 e Treg destas lesões apresentam diferenças.

Marrelli *et al.* (2013) isolaram células de 12 cistos periapicais para identificação de CTM através de imunofluorescência e citometria de fluxo. Foi observado expressão positiva para os marcadores CD44, CD73, CD90, CD105, STRO-1, CD29, CD13, CD146, associado a expressão negativa do marcador CD45, em todas as lesões avaliadas. Possivelmente a diferença entre os resultados dos trabalhos encontra-se na diferença metodológica, visto que a técnica de imuno-histoquímica não realiza o isolamento celular para avaliação da expressão dos marcadores.

Em um estudo realizado em animais, Patel *et al.* (2010) induziram a formação de granulomas de corpo estranho em ratos e, posteriormente, fizeram a análise dos anticorpos CD90, CD59, CD44 e CD45 através de imunofluorescência e citometria de fluxo. Os resultados indicaram expressão positiva para os marcadores CD90, CD59, CD44 e expressão negativa para o CD45. Entretanto, o nosso estudo foi o único a comparar a expressão de CTM entre os granulomas e cistos periapicais.

Liao *et al.* (2011) realizaram uma avaliação com marcadores de CTM (CD90, CD146 e STRO-1) em tecido periapical inflamado, utilizando-se da técnica de imuno-histoquímica observaram a expressão positiva nestes marcadores. Entretanto, não foi utilizado a co-expressão de um marcador negativo, segundo Dominic *et al.* (2006) a utilização de um marcador negativo faz parte do critério mínimo para caracterização de CTM.

Os marcadores positivos CD73 e CD105, associado ao marcador negativo CD45 são os marcadores mais utilizados na literatura para avaliar a expressão de CTM (RUPAREL *et al.* 2013; CHREPA *et al.* 2017). A alta expressão do marcador CD105 nos granulomas pode ser explicada pela grande presença de angiogênese neste tipo de lesão (NEVILLE *et al.* 2016). O marcador CD44 também apresenta alta expressão em CTM (CALLONI *et al.* 2013).

A papila apical é a principal fonte de CTM no processo de desenvolvimento de raízes, suas células possuem altas taxas de proliferação e capacidade de se diferenciar em células semelhantes a odontoblastos (HUANG *et al.* 2009). Diversos estudos mostram a alta expressão de marcadores imuno-histoquímicos de CTM neste tecido (SONOYAMA *et al.* 2008; CHREPA *et al.* 2017). Desta forma, é importante ressaltar que o presente trabalho foi o primeiro trabalho a utilizar como controle positivo as papilas apicais no intuito de caracterizar as CTM presentes no tecido.

Chrepa *et al.* (2017) analisaram um tecido periapical inflamado associado a papila apical em um dente com rizogênese incompleta com necrose pulpar. Mesmo sob condições inflamatórias, as CTM da papila apical apresentaram viabilidade e capacidade de diferenciação.

Em contrapartida, por Liu *et al.* (2016) observaram que citocinas inflamatórias presentes no microambiente das lesões periapicais podem interferir na sobrevivência das CTM presentes na papila apical (LIU *et al.* 2016). Da mesma forma, Tobias-Duarte *et al.* (2014) em um estudo em ratos, mostraram que a papila apical apresentava viabilidade somente até 90 dias após indução de necrose pulpar (TOBIAS-DUARTE *et al.* 2014). Desta forma, conclui-se que o efeito da infecção prolongada do canal radicular associado a inflamação periapical pode interferir na sobrevivência das CTM na região periapical.

A técnica de imuno-histoquímica apresenta satisfatória especificidade e sensibilidade na avaliação da expressão de marcadores de CTM, associado a isso, a utilização da automatização no protocolo da reação diminui o risco de vieses metodológicos. Os achados obtidos no estudo podem contribuir para compreensão do processo de desenvolvimento das lesões periapicais crônicas e, conseqüentemente, influenciar futuramente a terapia endodôntica. Desta forma, se faz necessário mais pesquisas neste campo para elucidar os mecanismos de sua patogênese.

6 CONCLUSÃO

Frente a metodologia empregada, pode-se concluir que não houve expressão imuno-histoquímica de células-tronco mesenquimais nos casos de cistos periapicais, enquanto a expressão imuno-histoquímica foi observada em 2 dos 10 casos de granulomas periapicais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALCANTARA, B. A. R.; CARLI, M. L.; BEIJO, L. A.; PEREIRA, A. A. C.; HANEMANN, J. A. C. Correlation between inflammatory infiltrate and epithelial lining in 214 cases of periapical cysts. **Brazilian Oral Research**, v. 27, n. 6, p. 490-5, 2013.
2. BAKOPOULOU, A.; LEYHAUSEN, G.; VOLK, J.; TSIFTSOGLU, A.; GAREFIS, P.; KOIDIS, P.; GEURTSSEN, W. Comparative analysis of in vitro osteo/odontogenic differentiation potential of human dental pulp stem cells (DPSCs) and stem cells from the apical papilla (SCAP). **Archives of oral biology**, v. 56, n. 7, p. 709–21, 2011.
3. BUHRING, H. J.; BATTULA, V. L.; TREML, S.; SCHEWE, B. KANZ, L.; VOGEL, W. Novel markers for the prospective isolation of human MSC. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1106, p.262-71, 2007.
4. CALLONI, R.; CORDERO, R. A.; HENRIQUES, J. A.; BONATTO, D. Reviewing and updating the major molecular markers for stem cells. **Stem cells and development**, v.22, n.9, p.1455-76, 2013.
5. CHEN, S. C.; MARINO, V.; GRONTHOS, S.; BARTOLD, P. M. Location of putative stem cells in human periodontal ligament. **Journal of periodontal research**, v. 41, n. 6, p. 547– 53, 2006.
6. CHREPA, V.; PITCHER, B.; HENRY, M. A.; DIOGENES, A. Survival of the Apical Papilla and Its Resident Stem Cells in a Case of Advanced Pulpal Necrosis and Apical Periodontitis. **Journal of Endodontics**, v. 43, n. 4, p. 561–67, 2017.
7. CUI, D.; LI, H.; WAN, M.; PENG, Y.; XU, X.; ZHOU, X.; ZHENG, L. The Origin and Identification of Mesenchymal Stem Cells in Teeth: from Odontogenic to Non-odontogenic. **Current stem cell research & therapy**, v. 13, n. 1, p. 39–45, 2018.
8. DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.; KRAUSE, D.; DEANS, R.; KEATING, A.; PROCKOP, D.; HORWITZ, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315–7, 2006.
9. DUFF, S. E.; LI, C.; GARLAND, J. M.; KUMAR, S. CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. **The FASEB Journal**, v.17, n.9, p.984-92, 2003.
10. EGUSA, H.; SONOYAMA, W.; NISHIMURA, M.; ATSUTA, I.; AKIYAMA, K. Stem cells in dentistry-part I: stem cell sources. **Journal of Prosthodontic Research**, v. 56, n. 3, p. 151–65, 2012.

11. ESTRELA, C. **Endodontic Science**. 2. ed. São Paulo: Artes Médicas, 2009. 2v. 1223p.
12. ESTRELA, C.; ALENCAR, A. H. G. de; KITTEN, G. T.; VENCIO, E. F.; GAVA, E. Mesenchymal stem cells in the dental tissues: perspectives for tissue regeneration. **Brazilian Dental Journal**, v. 22, n. 2, p. 91–8, 2011.
13. ESTRELA, C.; FREITAS SILVA, B. S.; SILVA, J. A.; YAMAMOTO-SILVA, F. P.; PINTO-JÚNIOR, D. D. S.; GOMEZ, R. S. Stem Cell Marker Expression in Persistent Apical Periodontitis. **Journal of Endodontics**, v. 43, n. 1, p. 63–8, 2017.
14. FAYAZI, S.; TAKIMOTO, K.; DIOGENES, A. Comparative Evaluation of Chemotactic Factor Effect on Migration and Differentiation of Stem Cells of the Apical Papilla. **Journal of Endodontics**, v. 43, n. 8, p. 1288–1293, 2017.
15. GRONTHOS, S.; BRAHIM, J.; LI, W.; FISHER, L. W.; CHERMAN, N.; BOYDE, A.; DENBESTEN, P.; ROBEY, P. G.; SHI, S. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. **Journal of dental research**, v. 81, n. 8, p. 531–5, 2002.
16. GRONTHOS, S.; MANKANI, M.; BRAHIM, J.; ROBEY, P. G.; SHI, S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 25, p. 13625–30, 2000.
17. HARGREAVES, K. M.; DIOGENES, A.; TEIXEIRA, F. B. Treatment options: biological basis of regenerative endodontic procedures. **Journal of endodontics**, v. 39, n. 3, p. 30–43, mar. 2013.
18. HUANG, G. T.-J.; GRONTHOS, S.; SHI, S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. **Journal of Dental Research**, v. 88, n. 9, p. 792–806, 2009.
19. HUANG, G. T.-J.; 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. **Journal of Endodontics**, v. 34, n. 6, p. 645–51, 2008.
20. LIAO, J.; AL SHAHRANI, M.; AL-HABIB, M.; TANAKA, T.; HUANG, G. T.-J. Cells isolated from inflamed periapical tissue express mesenchymal stem cell markers and are highly osteogenic. **Journal of Endodontics**, v. 37, n. 9, p. 1217–24, 2011.
21. LIAPATAS, S.; NAKOU, M.; RONTOGIANNI, D. Inflammatory infiltrate of chronic periapical lesions: an immunohistochemical study. **International Endodontic Journal**, v. 7, p.464-71, 2003.
22. LIN, L. M.; HUANG, G. T.-J.; ROSENBERG, P. A. Proliferation of epithelial cell rests, formation of apical cysts, and regression of apical cysts after periapical wound healing. **Journal of Endodontics**, v. 33, n. 8, p. 908–16, 2007.

23. LIU, C.; XIONG, H.; CHEN, K.; HUANG, Y.; HUANG, Y.; YIN, X. Long-term exposure to pro-inflammatory cytokines inhibits the osteogenic/dentinogenic differentiation of stem cells from the apical papilla. **International endodontic journal**, v. 49, n. 10, p. 950–9, 2016.
24. LOVELACE, T. W.; HENRY, M. A.; HARGREAVES, K. M.; DIOGENES, A. Evaluation of the delivery of mesenchymal stem cells into the root canal space of necrotic immature teeth after clinical regenerative endodontic procedure. **Journal of Endodontics**, v. 37, n. 2, p. 133–8, 2011.
25. MAEDA, H.; WADA, N.; NAKAMUTA, H.; AKAMINE, A. Human periapical granulation tissue contains osteogenic cells. **Cell and Tissue Research**, v. 315, n. 2, p. 203–8, 2004.
26. MARRELLI, M.; PADUANO, F.; TATULLO, M. Cells isolated from human periapical cysts express mesenchymal stem cell-like properties. **International Journal of Biological Sciences**, v. 9, n. 10, p. 1070–8, 2013.
27. NAIR, P. N. R.; PAJAROLA, G.; SCHROEDER, H. E. Types and incidence of human periapical lesions obtained with extracted teeth. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, v. 81, n. 1, p. 93–102, 1996.
28. NAIR, P. N. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v.16, n.6, p.348-81, 2004.
29. NEVILLE, B.; DAMM, D. D.; ALLEN, C.; CHI, A. **Oral and Maxillofacial Pathology**. 4 ed.: Saunders: Philadelphia, 2016. 928p.
30. PATEL, J.; GUDEHITHLU, K. P.; DUNEA, G.; ARRUDA, J. A. L.; SINGH, A. K. Foreign body-induced granulation tissue is a source of adult stem cells. **Translational Research : The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 155, n. 4, p. 191–9, 2010.
31. REGEZI, J. A.; SCIUBBA, J. J.; JORDAN, R. C. **Oral Pathology: Clinical Pathologic Correlations**. 7 ed.: Saunders: Philadelphia, 2016. 496p.
32. RODRÍGUEZ-LOZANO, F.-J.; INSAUSTI, C.-L.; INIESTA, F.; BLANQUER, M.; RAMÍREZ, M.-C.; MESEGUER, L.; MESEGUER-HENAREJOS, A.-B.; MARÍN, N.; MARTÍNEZ, S.; MORALEDA, J.-M. Mesenchymal dental stem cells in regenerative dentistry. **Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal**, v. 17, n. 6, p. e1062-7, 2012.
33. RUPAREL, N. B.; DE ALMEIDA, J. F. A.; HENRY, M. A.; DIOGENES, A. Characterization of a stem cell of apical papilla cell line: effect of passage on cellular phenotype. **Journal of Endodontics**, v. 39, n. 3, p. 357–63, 2013.
34. SONOYAMA, W.; LIU, Y.; FANG, D.; YAMAZA, T.; SEO, B.-M.; ZHANG, C.; LIU, H.; GRONTHOS, S.; WANG, C.-Y.; WANG, S.; SHI, S. Mesenchymal stem cell-mediated

- functional tooth regeneration in swine. **PloS One**, v. 1, p. 1–8, 2006.
35. SONOYAMA, W.; LIU, Y.; YAMAZA, T.; TUAN, R. S.; WANG, S.; SHI, S.; HUANG, G. T.-J. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. **Journal of Endodontics**, v. 34, n. 2, p. 166–71, 2008.
 36. STASHENKO P.; TELES, R.; D'SOUZA, R. Periapical inflammatory responses and their modulation. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v.9, n.4, p. 498-521,1998.
 37. TEIXEIRA-SALUM, T. B.; RODRIGUES, D. B. R.; GERVÁSIO, A. M.; SOUZA, C. J. A.; JUNIOR, V. R.; LOYOLA, A. M. Distinct Th1, Th2 and Treg cytokines balance in chronic periapical granulomas and radicular cysts. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v.39, p. 250-6, 2010.
 38. TOBIAS DUARTE, P. C.; GOMES-FILHO, J. E.; ERVOLINO, E.; MARÇAL MAZZA SUNDEFELD, M. L.; TADAHIROWAYAMA, M.; LODI, C. S.; DEZAN-JÚNIOR, E.; ANGELO CINTRA, L. T. Histopathological condition of the remaining tissues after endodontic infection of rat immature teeth. **Journal of endodontics**, v. 40, n. 4, p. 538–42, 2014.
 39. TROWBRIDGE, I. S.; THOMAS, M. L. CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development. **Annual review of immunology**, v. 12, p. 85–116, 1994.
 40. ZHANG, B. CD73: A novel target for cancer immunotherapy. **Cancer Research**, v.70, n. 16, p. 6407-11, 2010
 41. ZÖLLER, M. CD44: can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule? **Nature reviews. Cancer**, v. 11, n. 4, p. 254–67, 2011.

APÊNDICES



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA**



**Apêndice 1 - Termo de assentimento livre e esclarecido
(TALE) - Grupo Controle**

Você está sendo convidado a participar da pesquisa: Expressão de células-tronco em lesões periapicais, coordenada pelo pesquisador: Carlos Estrela – Telefone: (62)986261477. Seus pais permitiram que você participe.

Queremos saber se há presença de células tronco em lesões periapicais de dentes de indivíduos adultos. Para isto, precisamos de dentes humanos extraídos para realizar o estudo, desta forma, estamos solicitando a doação de seus terceiros molares que serão extraídos.

Você só precisa doar os dentes se quiser, é um direito seu e não terá nenhum problema se desistir. Os jovens que irão participar desta pesquisa têm de 14 a 17 anos de idade. Como será realizada em dentes extraídos por indicação terapêutica, a pesquisa não oferecerá riscos à sua saúde.

Ninguém saberá que você está participando da pesquisa; não falaremos a outras pessoas, nem daremos a estranhos as informações que você nos der. Os resultados da pesquisa vão ser publicados na UFG, mas sem identificar os jovens que participaram.

Eu _____ aceito participar da pesquisa: Avaliação da expressão de células-tronco da papila apical em lesões periapicais.

Entendi as coisas ruins e as coisas boas que podem acontecer. Entendi que posso dizer “sim” e participar, mas que, a qualquer momento, posso dizer “não” e desistir e que ninguém vai ficar com raiva de mim. Os pesquisadores tiraram minhas dúvidas e conversaram com os meus responsáveis. Recebi uma cópia deste termo de assentimento e li e concordo em participar da pesquisa.

Goiânia, ____ de _____ de _____.

Assinatura do responsável pelo paciente

Assinatura do Pesquisador Responsável

Testemunha (não ligada à equipe de pesquisadores)



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA**



Apêndice 2 - Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) – Pai/Responsável - Grupo Controle

O paciente por você responsável está sendo convidado(a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa, o paciente não será penalizado (a) de forma alguma. Em caso de dúvida você pode procurar o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás pelo telefone (62) 3521 – 1215.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Título do Projeto: Expressão de células-tronco em lesões periapicais.

Pesquisador responsável: Carlos Estrela

Telefone para contato (inclusive ligações a cobrar): (62)986261477

Pesquisadores participantes: Júlio Almeida Silva, Daniel de Almeida Decúrcio, Brunno Santos de Freitas Silva, Paulo Otávio Carmo Souza e Mateus Gehrke Barbosa.

Pretendemos realizar uma pesquisa que tem o objetivo de estudar a presença de células tronco em lesões periapicais de dentes adultos. Para isto, precisamos de dentes humanos extraídos para o desenvolvimento do estudo.

Como será realizada em dentes extraídos por indicação terapêutica, a pesquisa não oferecerá riscos à saúde do paciente.

No decorrer da pesquisa e na publicação dos resultados a identidade do paciente será mantida em sigilo absoluto através da omissão total de quaisquer informações que permitam identificar o paciente.

O prazo máximo de armazenamento deste material biológico será de 10 anos. Caso queira, o sujeito da pesquisa, ou seu representante legal, a qualquer tempo e sem quaisquer ônus ou prejuízos, pode retirar o consentimento de guarda e utilização do material biológico, valendo a desistência a partir da data dessa formalização.

Os resultados da pesquisa serão divulgados na Universidade Federal de Goiás - UFG, podendo ser publicados posteriormente. Os dentes utilizados na pesquisa ficarão sob a guarda

do pesquisador e após a conclusão da pesquisa serão descartados conforme as normas de descarte de materiais biológicos da Faculdade de Odontologia da FO/UFG.

Ressaltamos também que a não concordância em doar os dentes para este estudo não implica em qualquer modificação no tratamento estabelecido.

Eu, _____, CPF nº _____, responsável pelo paciente, _____, RG/Certidão de Nascimento _____, autorizo a coleta, o depósito, o armazenamento e a utilização do(s) dente(s) _____ extraídos por indicação terapêutica, conforme consta no prontuário clínico, para a pesquisa “Expressão de células-tronco em lesões periapicais”.

Declaro que compreendi os objetivos desta pesquisa, como ela será realizada, e concordo em doar meus dentes, conforme os dados acima.

Goiânia, ____ de _____ de _____

Assinatura do responsável pelo paciente

Assinatura do Pesquisador Responsável

Testemunha (não ligada à equipe de pesquisadores)



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA**



Apêndice 3 - Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) – Grupo Controle

Você está sendo convidado(a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa, você não será penalizado (a) de forma alguma. Em caso de dúvida você pode procurar o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás pelo telefone (62) 3521 – 1215.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Título do Projeto: Avaliação da expressão de células-tronco da papila apical em lesões periapicais.

Pesquisador responsável: Carlos Estrela

Telefone para contato (inclusive ligações a cobrar): (62)986261477

Pesquisadores participantes: Júlio Almeida Silva, Daniel de Almeida Decúrcio, Brunno Santos de Freitas Silva, Paulo Otávio Carmo Souza e Mateus Gehrke Barbosa.

Pretendemos realizar uma pesquisa que tem o objetivo de estudar a presença de células-tronco em lesões periapicais de dentes adultos. Para isto, precisamos de dentes humanos extraídos para o desenvolvimento do estudo.

Como será realizada em dentes extraídos por indicação terapêutica, a pesquisa não oferecerá riscos à sua saúde.

No decorrer da pesquisa e na publicação dos resultados sua identidade será mantida em sigilo absoluto através da omissão total de quaisquer informações que permitam identificar o paciente.

O prazo máximo de armazenamento deste material biológico será de 10 anos. Caso queira, o sujeito da pesquisa, ou seu representante legal, a qualquer tempo e sem quaisquer ônus ou prejuízos, pode retirar o consentimento de guarda e utilização do material biológico, valendo a desistência a partir da data dessa formalização.

Os resultados da pesquisa serão divulgados na Universidade Federal de Goiás - UFG, podendo ser publicados posteriormente. Os dentes utilizados na pesquisa ficarão sob a guarda

do pesquisador e após a conclusão da pesquisa serão descartados conforme as normas de descarte de materiais biológicos da Faculdade de Odontologia da FO/UFG.

Ressaltamos também que a não concordância em doar os dentes para este estudo não implica em qualquer modificação no tratamento estabelecido.

Eu, _____, CPF nº _____, autorizo a coleta, o depósito, o armazenamento e a utilização do(s) dente(s) _____ extraídos por indicação terapêutica, conforme consta no prontuário clínico, para a pesquisa “Expressão de células-tronco em lesões periapicais”.

Declaro que compreendi os objetivos desta pesquisa, como ela será realizada, e concordo em doar meus dentes, conforme os dados acima.

Goiânia, ____ de _____ de _____

Assinatura do doador

Assinatura do Pesquisador Responsável

Testemunha (não ligada à equipe de pesquisadores)

ANEXO

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: EXPRESSÃO DE CÉLULAS-TRONCO EM LESÕES PERIAPICAIS

Pesquisador: Carlos Estrela

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 80954417.1.0000.5083

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.472.461

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo observacional para avaliação da expressão de células-tronco da papila apical em lesões periapicais primárias (n=30) removidas cirurgicamente de pacientes atendidos na Disciplina de Urgência na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás (FO/UFG). Os casos de lesões periapicais primárias serão comparados com 10 espécimes de papila apical colhidos de terceiros molares com rizogênese incompleta removidos de pacientes atendidos na Clínica de Cirurgia da FO/UFG, que terão função de controle positivo. O estudo objetiva avaliar a presença de CTPA em lesões periapicais primárias (LPP) de dentes com rizogênese completa. A caracterização microscópica e confirmação diagnóstica das amostras serão realizadas a partir da análise das lâminas com coloração de Hematoxilina e Eosina e a reação imunoistoquímica será realizada para avaliar a expressão dos marcadores nas LPP's.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Avaliar a expressão imunoistoquímica de marcadores de células-tronco da papila apical em lesões periapicais primárias de dentes com rizogênese completa. **Objetivo Secundário:** 1) Avaliar a expressão de CD105, CD146, CD73 e CD45 em lesões periapicais primárias associadas a dentes com rizogênese completa. 2) Comparar a expressão de CD105, CD146, CD73 e CD45 entre lesões periapicais primárias associadas a dentes com rizogênese completa e a região da papila apical de dentes com rizogênese incompleta.

Endereço: Prédio da Reitoria Térreo Cx. Postal 131

Bairro: Campus Samambaia

CEP: 74.001-970

UF: GO

Município: GOIANIA

Telefone: (62)3521-1215

Fax: (62)3521-1163

E-mail: cep.prpi.ufg@gmail.com



Continuação do Parecer: 2.472.461

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Como a cirurgia será realizada em um dente que já tem a necessidade de extração, a pesquisa não oferecerá riscos à saúde do paciente, somente os riscos próprios da cirurgia (dor e inchaço). O paciente receberá os cuidados antes e depois da cirurgia, como preconizado no atendimento clínico da Faculdade de Odontologia da UFG.

Benefícios: O paciente não terá benefício direto em participar desta pesquisa, mas indiretamente estará ajudando a conhecer melhor os fatores que contribuem para a formação de lesões na raiz do dente.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto de pesquisa apresenta delineamento e estrutura adequados e bem definidos. Os objetivos são claros e coerentes com a metodologia, bem como cronograma adequado.

Os riscos e benefícios estão contemplados, garantem sigilo e confidencialidade e a minimização de riscos com o tratamento pré e pós operatório.

Em atendimento às pendências, foi acrescida a informação...receberá a assistência integral e imediata, de forma gratuita, pelo tempo que for necessário em caso de danos decorrentes da pesquisa, com direito a indenização, conforme Resolução 466/2012' ...ao TCLE e ao projeto detalhado.

Em relação ao armazenamento e a utilização do material biológico, os pesquisadores informaram que haverá retenção de material biológico constituindo um biorrepositório.

A recomendação de inclusão do laboratório de análises patológicas foi acatada e acrescido o nome do Laboratório de Ciência Endodôntica FO/UFG.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram inseridos os seguintes documentos apresentando as alterações em atenção às pendências:

- Carta de encaminhamento
- TCLEs com alterações

Endereço: Prédio da Reitoria Térreo Cx. Postal 131	CEP: 74.001-970
Bairro: Campus Samambaia	
UF: GO	Município: GOIANIA
Telefone: (62)3521-1215	Fax: (62)3521-1163
E-mail: cep.prpi.ufg@gmail.com	



Continuação do Parecer: 2.472.461

- Projeto detalhado com alterações
- PB informações básicas do projeto.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

SMJ do Comitê de Ética em Pesquisa este parecer favorável à aprovação do projeto.

Considerações Finais a critério do CEP:

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa/CEP-UFG considera o presente protocolo APROVADO, o mesmo foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes. Reiteramos a importância deste Parecer Consubstanciado, e lembramos que o(a) pesquisador(a) responsável deverá encaminhar ao CEP-UFG o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Resolução CNS n. 466/12. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, prevista para março de 2019.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1050803.pdf	10/01/2018 15:42:06		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_detalhado.pdf	10/01/2018 15:37:01	PAULO OTAVIO CARMO SOUZA	Aceito
Outros	CARTA_DE_ENCAMINHAMENTO.pdf	10/01/2018 15:36:36	PAULO OTAVIO CARMO SOUZA	Aceito
Outros	TCLE_3.pdf	10/01/2018 15:35:56	PAULO OTAVIO CARMO SOUZA	Aceito
Outros	TCLE_2.pdf	10/01/2018 15:35:31	PAULO OTAVIO CARMO SOUZA	Aceito
Outros	TALE.pdf	10/01/2018 15:34:46	PAULO OTAVIO CARMO SOUZA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_1.pdf	10/01/2018 15:34:04	PAULO OTAVIO CARMO SOUZA	Aceito
Outros	Aprovacao_Coordenadoria_de_pesquisa.pdf	11/12/2017 09:29:36	PAULO OTAVIO CARMO SOUZA	Aceito
Outros	Aprovacao_Conselho_diretor.pdf	11/12/2017 09:28:43	PAULO OTAVIO CARMO SOUZA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_de_compromisso_pesquisadores.pdf	11/12/2017 09:27:31	PAULO OTAVIO CARMO SOUZA	Aceito

Endereço: Prédio da Reitoria Térreo Cx. Postal 131
Bairro: Campus Samambaia **CEP:** 74.001-970
UF: GO **Município:** GOIANIA
Telefone: (62)3521-1215 **Fax:** (62)3521-1163 **E-mail:** cep.prpi.ufg@gmail.com



Continuação do Parecer: 2.472.461

Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	termo_de_material_biologico.pdf	11/12/2017 09:24:52	PAULO OTAVIO CARMO SOUZA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Termo_de_infraestrutura_e_instituicao.pdf	11/12/2017 09:22:33	PAULO OTAVIO CARMO SOUZA	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	11/12/2017 09:21:24	PAULO OTAVIO CARMO SOUZA	Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	11/12/2017 09:21:12	PAULO OTAVIO CARMO SOUZA	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	11/12/2017 09:13:17	PAULO OTAVIO CARMO SOUZA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

GOIANIA, 24 de Janeiro de 2018

Assinado por:
João Batista de Souza
(Coordenador)

Endereço: Prédio da Reitoria Térreo Cx. Postal 131
Bairro: Campus Samambaia **CEP:** 74.001-970
UF: GO **Município:** GOIANIA
Telefone: (62)3521-1215 **Fax:** (62)3521-1163 **E-mail:** cep.prpi.ufg@gmail.com