

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

MATEUS GEHRKE BARBOSA

**EXPRESSÃO DE MARCADORES DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS EM
ABCESSO E GRANULOMA PERIAPICAL**

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: Mateus Gehrke Barbosa

Título do trabalho: Expressão de marcadores de células-tronco mesenquimais em abscesso e granuloma periapical

3. Informações de acesso ao documento:

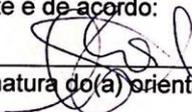
Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

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: 09/05/2019

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.

² A assinatura deve ser escaneada.

MATEUS GEHRKE BARBOSA

**EXPRESSÃO DE MARCADORES DE CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS EM ABSCESSO E GRANULOMA PERIAPICAL**

Dissertação apresentada como requisito 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

Orientador: Carlos Estrela

Coorientador: Brunno Santos de Freitas Silva

Goiânia
2019

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

Gehrke Barbosa, Mateus

Expressão de marcadores de células-tronco mesenquimais em abscesso e granuloma periapical [manuscrito] / Mateus Gehrke Barbosa. - 2019.

XLV, 45 f.

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, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Abscesso periapical. 2. Células-tronco. 3. Papila apical. 4. granuloma periapical. I. Estrela, Carlos, orient. II. Título.

CDU 616.314

Ministério da Educação
 Universidade Federal de Goiás
 Faculdade de Odontologia
 Programa de Pós-Graduação em Odontologia



Ata de Defesa de Dissertação número 203

Aos sete dias do mês de março de 2019, às 14:30 horas, reuniu-se no auditório da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás a Comissão Julgadora infranomeada para proceder ao julgamento da Defesa de Dissertação de **Mateus Gehrke Barbosa** intitulada "Expressão de marcadores de células-tronco mesenquimais em abscesso e granuloma periapical", como parte de requisitos necessários à obtenção do título de **Mestre**, área de concentração **Clinica Odontológica**. Inicialmente, o Prof. Dr. Carlos Estrela apresentou a Comissão Examinadora, da qual é presidente, e concedeu a palavra ao candidato para exposição de sua dissertação em quarenta minutos. A seguir, o senhor presidente concedeu a palavra aos examinadores, os quais passaram a arguir o candidato conforme os termos regimentais. Finalizada a arguição, a comissão expressou seu julgamento conforme abaixo:

Comissão Examinadora	Aprovado/Reprovado
Prof. Dr. Carlos Estrela – Presidente	<u>Aprovado</u>
Prof. Dr. Júlio Almeida Silva – Membro	<u>Júlio APROVADO</u>
Prof. Dr. Manoel Damiano de Sousa Neto – Membro	<u>Aprovado</u>

Em face do resultado obtido, a Comissão Examinadora considerou o candidato **Mateus Gehrke Barbosa**:

- Aprovado – Artigo 60 da Resolução CEPEC 1403/2016, que regulamenta este Programa.
 Reprovado – Artigo 60 CEPEC 1403/2016.

Alteração de título da dissertação? Não Sim,
 para _____

Outras observações da Comissão Examinadora (se necessário): _____

Nada mais havendo a tratar, eu, Clara Di Assis do Patrocínio, secretária do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, lavrei a presente ata que segue assinada pelos membros da Comissão Examinadora, pelo candidato e por mim.

Comissão Examinadora	Assinatura
Prof. Dr. Carlos Estrela – Presidente	<u>[Assinatura]</u>
Prof. Dr. Júlio Almeida Silva – Membro	<u>[Assinatura]</u>
Prof. Dr. Manoel Damiano de Sousa Neto – Membro	<u>[Assinatura]</u>
Candidato Mateus Gehrke Barbosa	<u>[Assinatura]</u>
Secretária Clara Di Assis do Patrocínio	<u>Clara Di Assis do Patrocínio</u>

Ata homologada pela Comissão Administrativa em 7/3/2019
 Assinatura da Presidente da Comissão Administrativa:

[Assinatura]
[Assinatura]
 Jaisa Costa

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a toda minha família, em especial meu pai, minha mãe e meu irmão. Valmir, Sandra e Diogo sem o apoio incondicional de vocês nada seria possível.

Dedico este trabalho aos meus avós Antônio, Sebastiana, Ivô (*in memoriam*) e Lori quisera que por um descuido Deus tivesse feito vocês eternos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço ao meu orientador da pesquisa e mentor da vida, professor Carlos Estrela, agradeço imensamente a oportunidade de poder ter convivido e aprendido tanto durante essa etapa de minha formação profissional e pessoal. Obrigado por todos os momentos que me indicou o caminho correto.

Agradeço também a todos os meus demais orientadores, professor Daniel, professor Julio, professora Ana Helena e professora Patrícia. Obrigado pelo convívio, pelas críticas que me fizeram crescer, pela paciência no meu processo de amadurecimento e pela amizade.

Agradeço ao meu co-orientador Brunno Santos de Freitas Silva por todo suporte para realização do trabalho, disposição, paciência e momentos de aprendizado.

Agradeço aos meus amigos Paulo Otávio e Marco Antônio pelo companheirismo em toda essa etapa. Acredito que as amizades conquistadas na pós-graduação são as que levamos para a vida, os momentos de convívio, dúvida, anseios e alegrias compartilhados foram maximizados com vocês.

Agradeço a todos da equipe de Endodontia: Vinicius, Gustavo, Marcela, Luma, Marcus Vinicius, Luiz, Olavo, Giuliano e todos pós-graduandos que conviveram e me ajudaram na minha formação.

Por último e mais especial agradeço a Deus por tudo que tem me dado na vida e pela proteção durante minha caminhada.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

Agradeço à Universidade Federal de Goiás (UFG) e a Faculdade de Odontologia da UFG, ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia (PPGO) pela oportunidade e estrutura a realização da pesquisa e do curso de pós-graduação.

A Fundação de Amparo e Pesquisa de Goiás pelo apoio financeiro durante a pós-graduação (Bolsa de formação de Mestrado – Chamada pública 03/2018).

Ao Laboratório Ciência Endodôntica da UFG por disponibilizar sua estrutura para realização da pesquisa. Ao Laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP) por disponibilizar sua estrutura para realização da pesquisa.

RESUMO

Introdução: A relação entre a inflamação, a formação de lesões periapicais e as células-tronco mesenquimais necessitam maior elucidação. Evidenciar a caracterização das células-tronco mesenquimais em abscessos e granulomas periapicais torna-se oportuno para um melhor entendimento da formação do microambiente da lesão periapical. **Objetivo:** Avaliar a expressão imuno-histoquímica de marcadores CD44, CD73, CD105 e CD45 de células-tronco mesenquimais em lesões periapicais de dentes com diagnóstico histopatológico de abscesso e granuloma periapical por meio de imuno-histoquímica. **Metodologia:** Foram selecionadas amostras de lesões periapicais diagnosticadas como abscesso (n=10) e granuloma periapical (n=10), provenientes de dentes de pacientes atendidos na disciplina de urgência na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás (FO/UFG), mantidas em blocos de parafina no banco do laboratório de Ciência Endodôntica. A confirmação diagnóstica das amostras foi realizada a partir da análise das lâminas com coloração de hematoxilina e eosina. A expressão imuno-histoquímica dos marcadores positivos CD44, CD73 e CD105 e do marcador negativo CD45 foi analisada, sendo a presença ou ausência de células positivas evidenciadas na área examinada. Foi considerada como expressão imuno-histoquímica de células-tronco mesenquimais quando houve a expressão dos três marcadores positivos e a não expressão do marcador negativo. As frequências das variáveis qualitativas foram obtidas. As variáveis qualitativas foram avaliadas pelo Teste do Qui-quadrado. Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$. **Resultados:** A expressão de células-tronco mesenquimais foi confirmada pela expressão positiva dos marcadores CD44, CD73 e CD105 e a ausência de expressão do marcador CD45. Isso ocorreu em 40% (4/10) nos casos de abscessos e no grupo de granulomas em 20% (2/10) dos casos. **Conclusões:** O abscesso e o granuloma periapical apresentaram expressão imuno-histoquímica de células-tronco mesenquimais. Os casos de abscessos periapicais apresentaram uma maior porcentagem de expressão imuno-histoquímica para células-tronco mesenquimais do que os de granulomas periapicais.

Palavras-chave: Abscesso periapical, granuloma periapical, células-tronco.

ABSTRACT

Introduction: The relationship between inflammation, the formation of periapical lesions and mesenchymal stem cells need further elucidation. Evidence for the characterization of mesenchymal stem cells in periapical abscesses and granulomas becomes opportune for a better understanding of the periapical lesion microenvironment formation. **Objective:** To evaluate the immunohistochemical expression of CD44, CD73, CD105 and CD45 markers of mesenchymal stem cells in periapical lesions of teeth with histopathological diagnosis of abscess and periapical granuloma by means of immunohistochemistry. **Methodology:** Samples of periapical lesions diagnosed as abscess (n = 10) and periapical granuloma (n = 10) were selected from teeth of patients attended at the Emergency Department of the Faculty of Dentistry of the Federal University of Goiás (FO / UFG) kept in blocks of paraffin on the bench of the Endodontic Science laboratory. The diagnostic confirmation of the samples was made from the analysis of the slides with hematoxylin and eosin staining. The immunohistochemical expression of the CD44, CD73 and CD105 positive markers and the CD45 negative marker was analyzed, and the presence or absence of positive cells was evidenced in the area examined. It was considered as immunohistochemical expression of mesenchymal stem cells when there was the expression of the three positive markers and no expression of the negative marker. The frequencies of the qualitative variables were obtained. Qualitative variables were assessed using the Chi-square test. Values of $p < 0.05$ were considered significant. **Results:** Expression of mesenchymal stem cells was confirmed by positive expression of CD44, CD73 and CD105 markers and absence of CD45 marker expression. This occurred 40% (4/10) in cases of abscesses and in the group of granulomas in 20% (2/10) of the cases. **Conclusions:** Abscess and periapical granuloma presented immunohistochemical expression of mesenchymal stem cells. The cases of periapical abscesses presented a higher percentage of immunohistochemical expression for mesenchymal stem cells than those of periapical granuloma.

Key words: Periapical abscess, periapical granuloma, stem cells.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Fotomicrografia representando o corte histológico em HE da confirmação diagnóstica: A. abscesso periapical; B. granuloma periapical (200X, PrimoStar, Carls Zeiss, Zurich, Switerzland).....	24
Figura 2-	Fotomicrografia de cortes histológicos dos controles positivos da reação de imuno-histoquímica: A. Amígdala humana (CD44); B. Líquen-plano (CD45); C. Carcinoma espinocelular (CD73); D. Carcinoma espinocelular (CD105) (200x, PrimoStar, Carls Zeiss, Zurich, Switerzland).....	25
Figura 3-	Fotomicrografia de cortes histológicos da papila apical evidenciando a expressão dos marcadores: A. CD44; B. CD45; C. CD73; D. CD105 (200X, PrimoStar, Carls Zeiss, Zurich, Switerzland).....	26
Figura 4-	Expressão dos marcadores CD44 (Figura 4A), CD73 (Figura 4B), CD45 (Figura 4C), CD105 (Figura 4D) em abscesso periapical. (200X, PrimoStar, Carls Zeiss, Zurich, Switerzland).....	27
Figura 5-	Expressão dos marcadores CD44 (Figura 4A), CD73 (Figura 4B), CD45 (Figura 4C), CD105 (Figura 4D) em granuloma periapical. (200X, PrimoStar, Carls Zeiss, Zurich, Switerzland).....	28

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1 -	Anticorpos primários, fabricante e diluição utilizados.....	19
Tabela 1 -	Expressão dos marcadores – CD44, CD73, CD45 e CD105 em abscessos e granulomas periapicais.....	22
Tabela 2 -	Frequência da expressão dos marcadores CD44, CD73, CD105 e CD45 – abscesso e granuloma.....	23

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

>	Maior que
<	Menor que
™	Marca comercial
®	Marca registrada
%	Porcento
µm	Micrometros
CTPA	Células-Tronco da Papila Apical
DAB	3,3'- Diaminobenzidina
DP	Desvio-Padrão
FO/UFG	Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
PPGO	Programa de Pós-Graduação em Odontologia
TRIS	Hidroximetil Aminometano
°C	Graus Celsius

HE	Hematoxilina e Eosina
PBS	Tampão fosfato-salino
TALE	Termo de Assentimento Livre e Esclarecido
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
<i>n</i>	Número de amostra
<i>et al.</i>	<i>et alli</i>
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	16
2.1	OBJETIVO GERAL	16
2.2	OBJETIVOS ESPECIFICOS	16
3	METODOLOGIA	17
3.1	OBTENÇÃO, SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	17
3.2	TÉCNICA DE ROTINA	17
3.3	TÉCNICA DE IMUNO-HISTOQUÍMICA	18
3.4	ANÁLISE QUALITATIVA E QUALITATIVA DOS DADOS	20
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS	20
4	RESULTADOS	21
5	DISCUSSÃO	29
6	CONCLUSÕES	32
7	REFERÊNCIAS	33
8	ANEXO	37
9	APENDICES	41

1 INTRODUÇÃO

A necrose pulpar constitui um ambiente com condições favoráveis em substrato e tensão de oxigênio para a colonização microbiana que pode resultar no desenvolvimento da infecção do canal radicular e região periapical (SUNDQVIST, 1992). Essa comunidade de bactérias organiza-se em uma estrutura de biofilme, sendo incorporadas em uma matriz e aderidas a uma superfície. O biofilme bacteriano induz alterações inflamatórias no osso alveolar, ligamento periodontal e cimento (HALL-STOODLEY *et al.*, 2004; RICCUCI; SIQUEIRA-JR, 2010).

A periodontite apical representa o resultado da inflamação decorrente da microbiota patogênica de um canal radicular infectado e a resposta imune do indivíduo. Os microrganismos patogênicos que invadem tecido periapical e os mediadores inflamatórios que sustentam uma resposta inflamatória, podem estimular a destruição do osso periapical, e conseqüentemente o desenvolvimento de abscessos, granulomas e cistos periapicais (STASHENKO *et al.*, 1998).

O abscesso periapical clinicamente caracteriza-se como uma alteração periapical com a presença de coleção purulenta (exsudato inflamatório), presença de dor localizada, intensa, associada a dor a palpação/percussão. Histologicamente caracteriza-se por um infiltrado inflamatório agudo, evidenciado pela densa acumulação de células polimorfonucleares (neutrófilos). A presença de neutrófilos liberando enzimas com características lisossômicas no microambiente periapical dão origem ao abscesso periapical (ESTRELA, 2009). As lesões inflamatórias agudas podem partir de uma alteração periapical primária ou um reagudecimento a partir de lesões periapicais (NEVILLE, 2016).

Granulomas e cistos periapicais caracterizam-se como reações inflamatórias crônicas frente a uma agressão aos tecidos periapicais. O granuloma periapical caracteriza-se histologicamente por um tecido de granulação com a presença de linfócitos e macrófagos circundado por uma cápsula de tecido fibroso com vasos sanguíneos neoformados e fibroblastos jovens. A origem de um granuloma periapical pode representar uma estabilização de um abscesso periapical ou uma patologia periapical inicial. O cisto periapical caracteriza-se histologicamente por uma cápsula de tecido conjuntivo fibroso revestido por epitélio de espessura variável e um infiltrado inflamatório misto (NEVILLE, 2016). A incidência entre as duas lesões é

variável, sendo que há uma menor prevalência de cistos radiculares quando comparados aos granulomas periapicais, o que demonstra que a relação entre patogênese de um cisto e um granuloma periapical ainda não é totalmente esclarecida e merece mais estudos (NAIR *et al.*, 1996; SANCHIS *et al.*, 1998; VIER; FIGUEIREDO, 2002; VIER; FIGUEIREDO, 2004; RICUCCI *et al.*, 2006; LOVE; FIRFTH, 2009; SCHULZ *et al.*, 2009; LIN *et al.*, 2010; BECCONSALL-RYAN *et al.*, 2010; KOLVISTO *et al.*, 2012; ÇALIŞKAN *et al.*, 2016).

Há várias hipóteses para a formação de cistos periapicais. O agudecimento de lesões periapicais crônicas com a proliferação de restos epiteliais odontogênicos é a base de uma hipótese conhecida por “teoria do abscesso”, que sustenta os cistos periapicais serem originados da proliferação dos restos epiteliais de Malassez estimulados por um foco de inflamação aguda. Assim o crescimento da cavidade cística depende de fatores inflamatórios e da pressão osmótica situados na lesão (TEN CATE, 1972; BROWNE, 1975; NAIR *et al.*, 2008). Essa teoria foi comprovada em um estudo experimental animal onde inoculou-se *Fusobacterium nucleatum* em tecido subcutâneo de ratos e houve a indução da formação de abscessos onde havia previamente queratinócitos orais implantados. Posterior a essa estimulação, o ambiente inflamatório agudo parece ter favorecido os queratinócitos a se estimularem, agruparem e englobarem o foco de infecção formando uma estrutura semelhante a um cisto periapical. Este estudo evidenciou a associação entre a formação de cistos e o infiltrado inflamatório agudo na lesão periapical (NAIR *et al.*, 2008).

As células-tronco mesenquimais são células imaturas que apresentam duas características fundamentais: primeiro são células com a capacidade de autoregeneração; segundo, são células não especializadas com capacidade de diferenciação em múltiplas linhagens (HUANG *et al.*, 2008; EGUSA *et al.*, 2012). Essas células conseguem sobreviver mesmo em ambientes associados a inflamação e a dentes com diagnóstico clínico de necrose pulpar (SONOYAMA *et al.*, 2008; BANCHS; TROPE, 2004; CHREPA *et al.*, 2017) e ainda não têm todos seus mecanismos elucidados. Em relação a estrutura morfológica as células-tronco mesenquimais apresentam-se como células fusiformes, com citoplasma abundante, mononucleares e com seu núcleo de formato oval e com uma grande quantidade de

cromatina menos condensada em seu interior (TRUBIANI *et al.*, 2006).

A análise da presença ou ausência de células-tronco pode ser realizada por várias metodologias. A imuno-histoquímica é uma das mais frequentes, e utilizada em vários estudos para revelar a expressão de células-tronco. Vários são os marcadores que podem ser utilizados para avaliar a expressão positiva de células-tronco mesenquimais, em especial os marcadores CD44, CD73, CD 105, enquanto o CD45 é utilizado como marcador negativo (EGUSA *et al.*, 2012; LIN *et al.*, 2013).

O CD44 é uma glicoproteína transmembrana, expressa na matriz extracelular e na superfície celular de células epiteliais, mesenquimais e hematopoiéticas (CHEN *et al.*, 2006; BUHRING *et al.*, 2007). Sendo uma molécula que apresenta diversas atividades celulares como migração, sobrevivência e proliferação celular (ZOELLER, 2011). O CD73 é expresso em uma grande variedade de células como linfócitos, células endoteliais, células epiteliais e células musculares lisas e fibroblastos (LIN *et al.*, 2013). O CD105 é uma glicoproteína de membrana celular encontrada em células humanas endoteliais, eritroblastos em formação, células estromais, células mesenquimais, sendo considerado um marcador de neovascularização (PIERELLI *et al.*, 2001; FONSATTI *et al.*, 2003).

O CD45 é uma glicoproteína essencial nas vias de transdução de sinal de células imunes, é uma das mais abundantes proteínas na superfície de leucócitos e considerada exclusiva em células do sistema hemotopoiético, não tendo uma expressão marcante em células-tronco mesenquimais (YEH *et al.*, 2006).

A relação entre a inflamação, a formação de lesões periapicais e as células-tronco mesenquimais necessitam maior elucidação. Evidenciar a caracterização das células-tronco mesenquimais em abscessos e granulomas periapicais torna-se oportuno para um melhor entendimento da formação do microambiente da lesão periapical.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão imuno-histoquímica de células-tronco mesenquimais em lesões periapicais de dentes com diagnóstico histopatológico de abscesso e granuloma periapical.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a expressão imuno-histoquímica de marcadores CD44, CD73, CD105 e CD45 em casos de abscessos e granulomas periapicais.

Comparar a co-expressão positiva dos marcadores CD44, CD73, CD105 e a ausência da marcação do CD45 em abscessos e granulomas periapicais.

3 METODOLOGIA

3.1 Obtenção, caracterização e seleção da amostra

Para este estudo transversal foram selecionadas amostras de lesões periapicais com diagnóstico clínico e microscópico de abscesso (n=10) e granuloma periapical (n=10), provenientes de dentes de pacientes atendidos na Disciplina de Urgência na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás (FO/UFG), mantidas em blocos de parafina no banco do Laboratório de Ciência Endodôntica. Esta pesquisa é integrante do projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Goiás - Protocolo No. 2.472.461 (Anexo 1).

Os critérios de inclusão foram espécimes de lesões periapicais de dentes de pacientes saudáveis com diagnóstico microscópico de abscesso ou granuloma periapical. Foram excluídos blocos parafinados com quantidade insuficiente de tecido, e após a revisão de prontuários, as amostras cujos pacientes apresentavam história clínica de imunossupressão, diabetes, e com dados clínicos e demográficos incompletos.

Como controle positivo da expressão de células-tronco mesenquimais, foram coletadas as papilas apicais de cinco terceiros molares com rizogênese incompleta extraídas de pacientes provenientes da Clínica de Extensão de Cirurgia Buco-Maxilo-Facial da FO/UFG. Após a remoção, as papilas foram armazenadas em solução de formol a 10%, incluídas em parafina e encaminhadas para o processo imunohistoquímico e técnica de rotina.

3.2 Técnica de rotina

As amostras selecionadas, incluídas em blocos de parafina, foram seccionadas em micrótomo Leica RM2165 (Leica Biosystems, Wetzlar, Alemanha), obtendo-se cortes consecutivos de 5µm, que foram colocados sobre lâminas histológicas e corados pelo método de Hematoxilina-Eosina (HE). Esses cortes foram utilizados para confirmação diagnóstica por especialista em Patologia Bucal, com mais de dez anos de experiência.

3.3 Técnica de imuno-histoquímica

A partir das amostras selecionadas, emblocadas em parafina, foram obtidos cortes seriados com aproximadamente 3µm de espessura, em micrótomo Leica RM2165 (Leica Biosystems, Wetzlar, Alemanha), montados em lâminas silanizadas e submetidos à técnica da imuno-histoquímica (método da estreptavidina-biotina-peroxidase e/ou de polímeros). As lâminas foram submetidas ao processo de padronização no Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás.

As reações de imuno-histoquímica foram realizadas no Laboratório de Patologia Bucal da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil (USP-SP). Inicialmente, os cortes sobre as lâminas foram desparafinizados em dois banhos de xilol, sendo o primeiro realizado a 60°C durante 30 minutos, e o segundo, por 10 minutos a temperatura ambiente controlada a 20°C. Posteriormente, foram hidratados em álcool etílico absoluto, três banhos consecutivos de três minutos cada, a seguir, foram executados banhos em álcool etílico a 95%, 90%, 85%, 80% por três minutos cada. Um banho em hidróxido de amônia a 10% em solução alcoólica (etanol 95%) foi realizado para remoção do pigmento formólico. Após esta etapa, os cortes foram imediatamente lavados durante 10 minutos em água destilada, a seguir, mais duas lavagens foram executadas. Um banho ácido cítrico monoidratado, 10Mm, pH 6,0 em banho Maria (95°), foi realizado por 30 minutos para, posteriormente, ser executada a etapa de bloqueio da peroxidase endógena tecidual.

O bloqueio da peroxidase endógena dos espécimes foi efetuado por meio da imersão das lâminas, por duas vezes, em uma solução na proporção de 1:1 de peróxido de hidrogênio a 6% e metanol por 15 minutos cada. Em continuidade, a lavagem em água destilada foi repetida, seguida pela imersão dos cortes por três vezes em solução de TRIS (Hidroximetil Aminometano) pH 7,6, por 5 minutos.

Os anticorpos primários utilizados, o fabricante e a diluição estão citados no Quadro 1. Os marcadores CD44, CD73 e CD 105 são marcadores positivos para as células-tronco mesenquimais enquanto o marcador CD45 é um marcador negativo (BUHRING *et al.*, 2007; LIN *et al.*, 2013; PIERELLI *et al.*, 2001; FONSATTI *et al.*, 2003; YEH *et al.* 2006).

Quadro 1- Anticorpos primários, fabricante e diluição utilizados.

Anticorpo	Fabricante	Diluição
CD44	Cell Signaling, MA, USA	1:400
CD73	Cell Signaling, MA, USA	1:400
CD105	Cell Signaling, MA, USA	1:400
CD45	Cell Signaling, MA, USA	1:400

O controle negativo realizado com a omissão dos anticorpos primários, e os cortes das amostras selecionadas seguiram para o equipamento automatizado DAKO Autostainer Universal Staining System (DAKO Corp. ®, CA, EUA) que realizou as seguintes etapas: Incubação dos anticorpos primários sob temperatura controlada a 37°C por 40m; Diluição dos anticorpos utilizando TBS associado a soro de albumina bovina (TBS-BSA) a 1%; Incubação do kit secundário Advance™ HRP (DAKO Corp ®, CA, EUA); Revelação da reação com DAKO Liquid DAB (3,3'-Diaminobenzidina) plus (DAKO Corp ®, CA, EUA) por 10 minutos; Contra- coloração com hematoxilina por 2 minutos; Duas lavagens com solução de TRIS.

Após os cortes saírem do equipamento automatizado, houve o processo de desidratação em banhos de etanol nas seguintes concentrações crescentes 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% e álcool absoluto por três vezes, por 3 minutos cada. Em seguida, os cortes foram diafanizados duas vezes em xilol por 10 minutos, e posteriormente, encaminhados para montagem final das lâminas em equipamento automatizado (Tissue-Tek® Film® Coverslipper, Osaka, Japão).

Como controle positivo da expressão de células-tronco mesenquimais foram utilizadas papilas apicais de terceiros molares caracterizado pela reação imuno-histoquímica com expressão para os marcadores positivos e não expressão do marcador negativo.

3.4 Análise qualitativa e quantitativa dos dados

A avaliação qualitativa foi analisada pela expressão imuno-histoquímica de CD44, CD73, CD105 e CD45, de acordo com a presença ou ausência de células positivas para coloração citoplasmática e/ou membrana plasmática, realizada por um especialista em Patologia Bucal, com mais de dez anos de experiência, cegado quanto aos marcadores. Foi considerada como expressão imuno-histoquímica de células-tronco mesenquimais quando houve a expressão dos três marcadores positivos e a não expressão do marcador negativo, onde foi observado a presença de células fusiformes, com citoplasma abundante, mononucleares e com núcleo ovalado.

A expressão imuno-histoquímica foi avaliada em toda a extensão de abscessos periapicais, granulomas periapicais e no grupo controle positivo das papilas apicais utilizando-se um microscópio óptico de luz (PrimoStar, Carls Zeiss, Zurich, Switserzland) em aumento de 200X. Um aumento de 400X foi realizado nos campos de maior expressão (hot spots) para confirmação da expressão de células-tronco mesenquimais.

Após análise microscópica, para ser considerada expressão positiva de células-tronco mesenquimais foi avaliado quantitativamente o número de casos que apresentavam co-expressão imuno-histoquímica positiva para os marcadores CD44, CD73, CD105 e expressão imuno-histoquímica negativa para o marcador CD45.

3.5 Análise estatística dos dados

As frequências das variáveis qualitativas foram obtidas. As variáveis qualitativas foram avaliadas pelo Teste do Qui-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

A tabela 1 demonstra a frequência da expressão dos marcadores CD44, CD45, CD 73 e CD 105 em abscessos e granulomas periapicais. A tabela 2 demonstra a frequência da expressão dos marcadores comparando estes dois grupos. A expressão de células-tronco mesenquimais foi confirmada pela expressão positiva dos marcadores CD44, CD73 e CD105 e a ausência de expressão do marcador CD45. Isso ocorreu em 40% (4/10) dos casos de abscessos e no grupo de granulomas em 20% (2/10) dos casos.

A figura 1 representa uma fotomicrografia de um corte histológico em HE da confirmação diagnóstica de um caso de abscesso e um caso de granuloma periapical. A figura 2 representa uma fotomicrografia de cortes histológicos dos controles positivos da reação caracterizados por expressão positiva do CD 44 em amígdala humana, CD45 em líquen-plano, CD73 e CD105 em carcinoma espinocelular de boca. A figura 3 representa uma fotomicrografia de cortes histológicos da papila apical evidenciando a expressão dos marcadores.

A figura 3 exemplifica um caso em que houve marcação positiva dos marcadores CD44, CD73, CD 105 e a não expressão do marcador 45 em um caso de abscesso periapical. A figura 4 exemplifica um caso em que houve marcação positiva dos marcadores CD44, CD73, CD 105 e a não expressão do marcador 45 em um caso de granuloma periapical.

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

Grupo	Marcador	Ausência	Presença	P
Abscesso	CD44	0	10	0,001
	CD73	1	9	
	CD45	7	3	
	CD105	2	8	
				P
Granuloma	CD44	2	8	0,028
	CD73	4	6	
	CD45	8	2	
	CD105	7	3	

Tabela 2 – Frequência da expressão dos marcadores CD44, CD73, CD105 e CD45 – abscesso e granuloma.

Marcadores			
CD44	Ausente	Presente	p
Abscesso	0	10	0,136
Granuloma	2	8	
CD73			
Abscesso	1	9	0,121
Granuloma	4	6	
CD45b			
Abscesso	7	3	0,606
Granuloma	8	2	
CD105			
Abscesso	2	8	0,025
Granuloma	7	3	

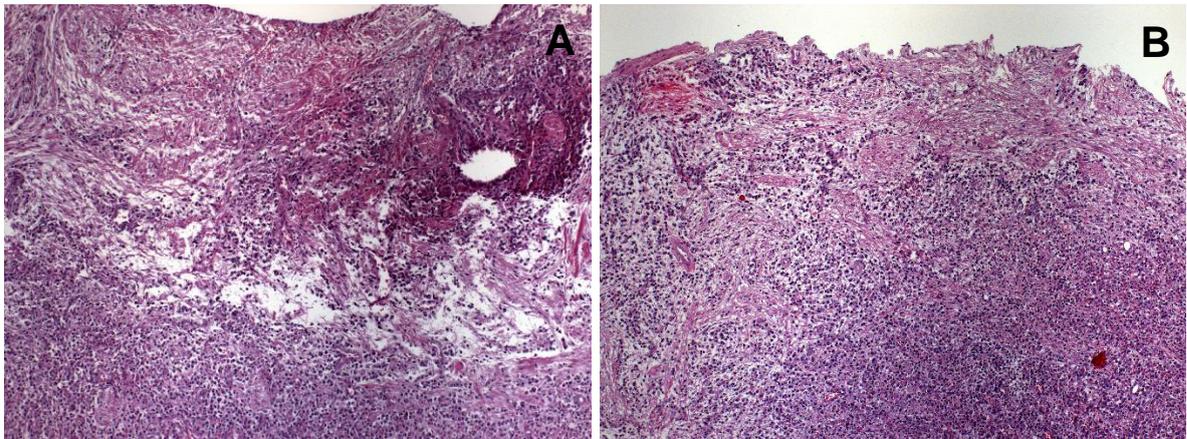


Figura 1- Fotomicrografia representando o corte histológico em HE da confirmação diagnóstica: A. abscesso periapical; B. granuloma periapical (200x, PrimoStar, Carls Zeiss, Zurich, Switserzland)

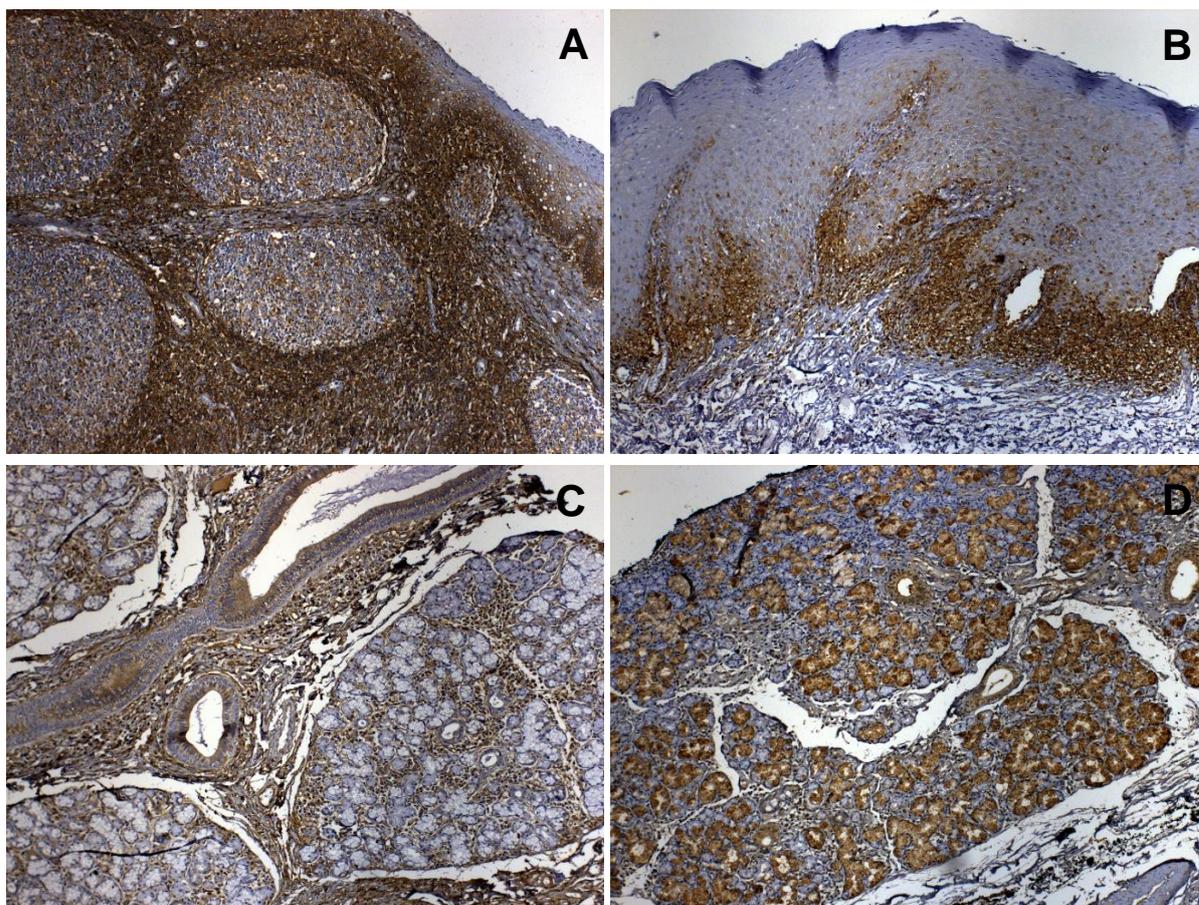


Figura 2- Fotomicrografia de cortes histológicos dos controles positivos da reação de imunohistoquímica: A. Amígdala humana (CD44); B. Líquen-plano (CD45); C. Carcinoma espinocelular (CD73); D. Carcinoma espinocelular (CD105) (200X, PrimoStar, Carls Zeiss, Zurich, Switserzland).

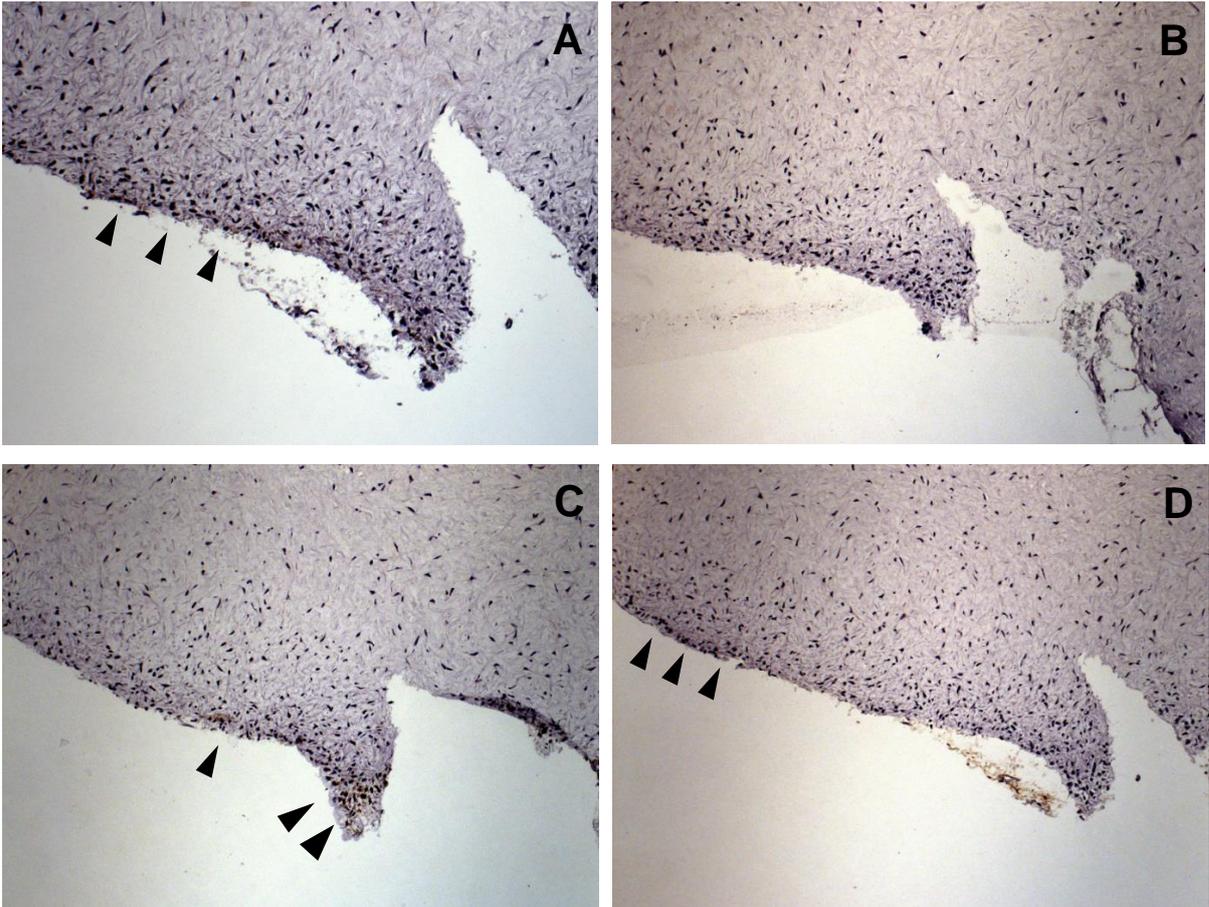


Figura 3 – Fotomicrografia de cortes histológicos da papila apical evidenciando a expressão dos marcadores: A. CD44; B. CD45; C. CD73; D. CD105 (200x, PrimoStar, Carls Zeiss, Zurich, Switserzland).

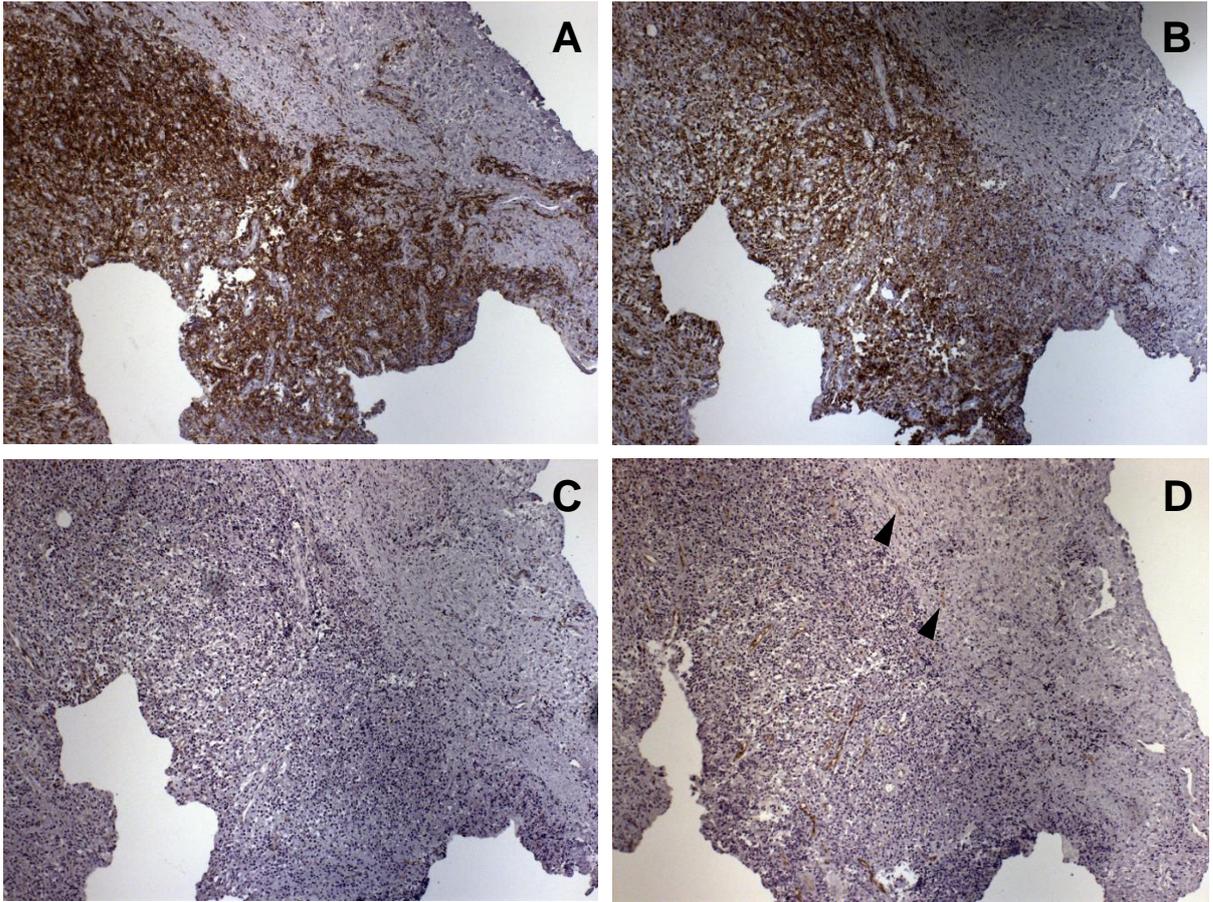


Figura 4- Expressão dos marcadores CD44 (Figura 4A), CD73 (Figura 4B), CD45 (Figura 4C), CD105 (Figura 4D) em abscesso periapical. (200X, PrimoStar, Carls Zeiss, Zurich, Switzerland).

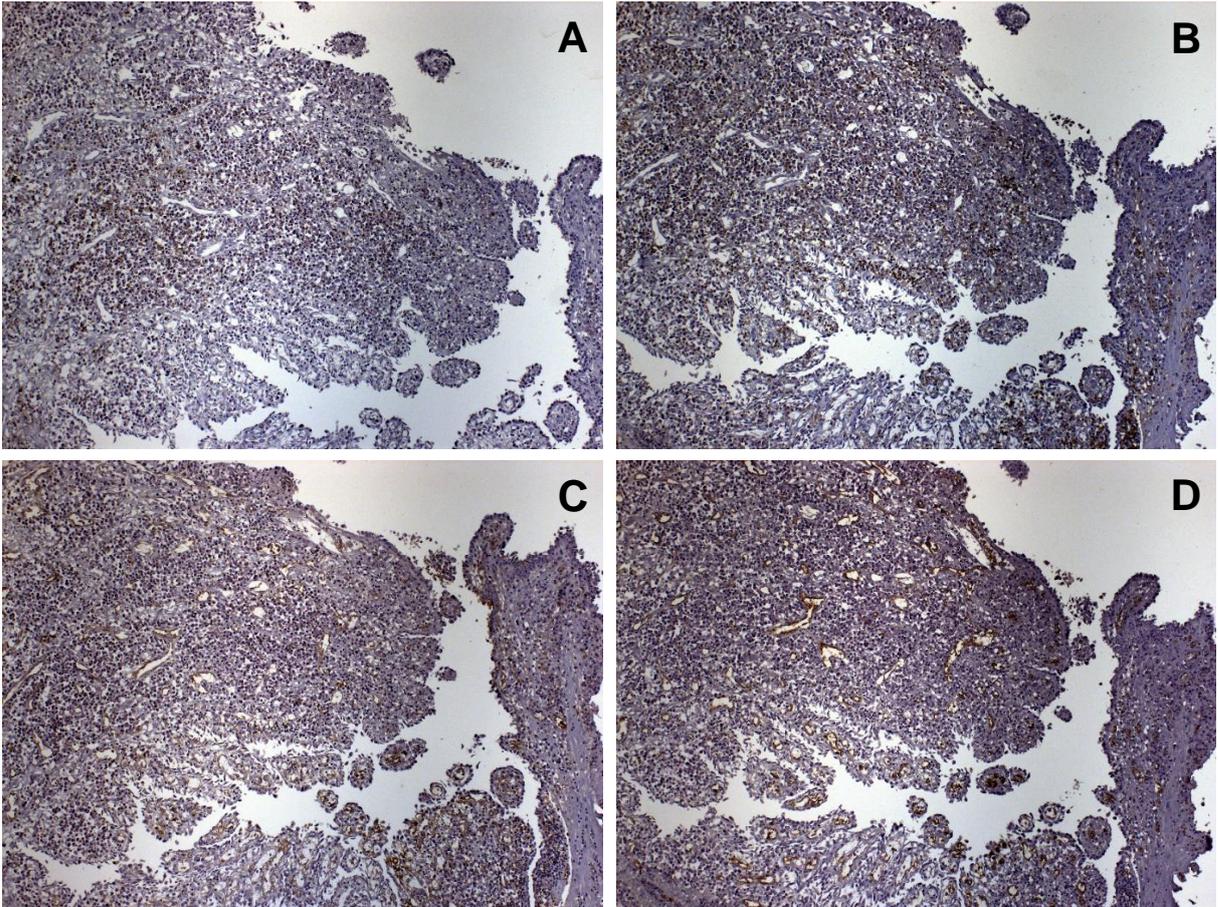


Figura 5- Expressão dos marcadores CD44 –(Figura 5A), CD73 (Figura 5B), CD45 (Figura 5C), CD105 (Figura 5D) em granuloma periapical (200X, PrimoStar, Carls Zeiss, Zurich, Switzerland).

5 DISCUSSÃO

A expressão de marcadores CD44, CD73 e CD105 e a ausência de expressão do marcador CD45 em abscessos e granulomas periapicais certificam a presença dessas células na região periapical e a possível participação no processo de formação da lesão periapical tanto aguda quanto crônica. A expressão de células-tronco mesenquimais ocorreu em 40% dos casos diagnosticados como abscesso periapical e 20% dos casos diagnosticados como granuloma periapical. Este achado sugere que a natureza aguda dos abscessos, os intensos fatores de crescimento e a renovação celular pode influenciar em uma maior diferenciação de células-tronco mesenquimais.

Nos casos de abscessos houve uma maior expressão de marcadores quando comparado com os granulomas periapicais, este achado vem ao encontro da “teoria dos abscessos” descrita por Nair *et al.* (2008) em um estudo experimental em animal onde os autores relataram que o infiltrado inflamatório agudo induz a formação de cistos periapicais. Assim, em um foco de inflamação aguda as células epiteliais tendem a se proliferar e revestir a cavidade existente devido a tendência de englobar as superfícies do conjuntivo (HUANG, 2010). As células-tronco mesenquimais presentes na região periapical podem ser influenciadas pelo infiltrado inflamatório agudo e contribuir para a patogênese do cisto periapical.

A presença de células-tronco mesenquimais com a inflamação é descrita em outros estudos experimentais. Chrepa *et al.* (2017) avaliaram por meio de citometria de fluxo e imuno-histoquímica a vitalidade e o potencial osteogênico de células-tronco da papila apical obtidas em dente com rizogênese incompleta diagnosticado com periodontite apical. Dentre os anticorpos avaliados os autores utilizaram CD73, CD90, CD105, CD45. Mesmo considerando as condições inflamatórias, as células-tronco residentes na região apical apresentaram vitalidade e um potencial osteogênico. Nossos resultados demonstraram a presença de células-tronco residentes ou com capacidade de migração para a região apical, também em dentes com rizogênese completa mesmo sob condições de inflamação aguda e crônica.

Estrela *et al.* (2016) avaliaram a presença de células-tronco mesenquimais em lesões periapicais persistentes utilizando os marcadores CD90 e Sox2. Os autores demonstraram que a presença do infiltrado inflamatório agudo pode ativar as células-

tronco mesenquimais e que essas células-tronco podem estar associadas ao processo crônico das lesões periapicais persistentes e no desenvolvimento de lesões periapicais primárias. Nossos achados demonstraram que o infiltrado inflamatório agudo teve uma maior porcentagem na expressão de células-tronco mesenquimais, o que reforça que o infiltrado inflamatório agudo pode ter relação na ativação dessas células mesenquimais.

No presente estudo a presença de células-tronco mesenquimais foi confirmada em espécimes de papila apical extraídas de terceiros molares com rizogênese incompleta. Este controle foi escolhido por ser uma fonte rica em células-tronco mesenquimais (HUANG *et al.*, 2008). Devido à localização, provavelmente as células-tronco mesenquimais encontradas são células-tronco oriundas da papila apical que podem manter sua viabilidade mesmo em ambientes necróticos (SONOYAMA *et al.*, 2008), porém as células-tronco mesenquimais apresentam uma capacidade de migração. Dessa forma, uma limitação do estudo foi a não caracterização com marcadores específicos da origem das células-tronco mesenquimais encontradas. Esta caracterização torna-se pertinente visto que a zona orofacial é uma região rica em células-tronco que podem ser derivadas da polpa dentária, da papila apical, do ligamento periodontal, do periósteo, da medula óssea, de dentes decíduos exfoliados, de células-progenitoras de germes dentários e de glândulas salivares (EGUSA *et al.*, 2012, VOLPONI; SHARPE, 2013).

Estudos (SONOYAMA *et al.*, 2008; BANCHS; TROPE, 2004; CHREPA *et al.*, 2014) sobre regeneração endodôntica relatam casos de dentes com rizogênese incompleta diagnosticados com periodontite apical. Esse novo protocolo terapêutico necessita da presença de células-tronco, um coágulo sanguíneo e de fatores de crescimento para que possa ser possível a regeneração endodôntica. Os resultados do presente estudo mostraram que há a presença de células-tronco em casos de abscessos periapicais em dentes com rizogênese completa e que esta presença deve ser estudada para avaliar sua possível viabilidade em casos de regeneração.

O presente estudo avaliou a expressão imuno-histoquímica de células-tronco em abscessos e granulomas periapicais. Nossos resultados fortalecem a ideia de que ambientes de inflamação, tanto aguda quanto crônica, são fontes de fatores que podem auxiliar na diferenciação e migração celular de células-tronco. Assim, futuros

estudos são necessários para a detalhar a relação da inflamação aguda e crônica na expressão de células-tronco mesenquimais e, conseqüentemente, na patogênese de lesões periapicais inflamatórias e também torna-se oportuno avaliar o fenótipo destas células-tronco mesenquimais.

6 CONCLUSÕES

O abscesso e o granuloma periapical apresentaram expressão imuno-histoquímica de células-tronco mesenquimais. Os casos de abscesso periapical apresentaram uma maior porcentagem de expressão imuno-histoquímica para células-tronco mesenquimais do que os de granuloma periapical.

REFERÊNCIAS

1. BANCHS, F.; TROPE, M. Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: new treatment protocol? **Journal of Endodontics**, v. 30, n. 4, p. 196-200, 2004.
2. BECCONSALL-RYAN, K.; TANG, D.; LOVE, R.M. Radiolucent inflammatory jaw lesions: a twenty-year analysis. **International Endodontic Journal**, v. 43, p. 859–65, 2010.
3. BROWNE, R. M. The patogenesis of odontogenic cysts: a review. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 4, n. 1, p. 31-46, 1975.
4. 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.
5. ÇALIŞKAN, M. K.; KAVAL, M. E.; TEKIN, U.; UNAL, T. Radiographic and histological evaluation of persistent periapical lesions associated with endodontic failures after apical microsurgery. **International Endodontic Journal**, v. 49, p. 1011-1019, 2016.
6. 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.
7. 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. 561–567, 2017.
8. 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.
9. ESTRELA, C. **Endodontic Science**. 2. ed. São Paulo: Artes Médicas, 2009. 2v.
10. 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. 63–68, 2017.
11. FONSATTI, E.; SIGALOTTI, L.; ARSLAN, P.; ALTOMONTE, M.; MAIO, M. Emerging role of endoglin (CD105) as a marker of angiogenesis with clinical potential

- in human malignancies. **Current Cancer Drug Targets**, v. 3, n. 6, p. 427–432, 2003.
12. HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J. W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nature Reviews**, v. 2, p. 95-108, 2004.
 13. HUANG, G. T. Apical cyst theory: a missing link. **Dent Hypotheses**, v. 5, n. 1, p. 76-84, 2010.
 14. 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.
 15. KOLVISTO, T.; BOWLES, W. R.; ROHRER, M. Frequency and distribution of radiolucent jaw lesions: a retrospective analysis of 9,723 cases. **Journal of Endodontics**, v. 38, n. 6, p.729–32, 2012.
 16. LIN, C. S.; XIN, Z. C.; DAI, J.; LUE, T. F. Commonly used mesenchymal stem cell markers and tracking labels: limitations and challenges. **Histol Histopathol**, v. 28, n. 9, p. 1109-1116, 2013.
 17. LIN, H. B.; CHEN, H. M.; YU, C. H.; KUO, R. C; KUO, Y. S.; WANG, P.W. Clinicopathological study of 252 jaw bone periapical lesions from a private pathology laboratory. **Journal of the Formosan Medical Association**, v. 109, p. 810-818, 2010.
 18. LOVE, R. M.; FIRTH, N. Histopathological profile of surgically removed persistent periapical radiolucent lesions of endodontic origin. **International Endodontic Journal**, v. 42, p. 198-202, 2009.
 19. NEVILLE, B.; DAMM, D. D.; ALLEN, C.; CHI, A. **Oral and Maxillofacial Pathology**. 4 ed.: Saunders: Philadelphia, 2016. 928p.
 20. 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 endodontology**, v. 81, n. 1, p. 93–102, 1996.
 21. NAIR, P. N.; SUNDQVIST, G.; SJOGREN, U. Experimental evidence supports the abscess theory of development of radicular cysts. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology, and Endodontology**, v. 106, n. 2, p. 294–303, 2008.

22. PIERELLI, L.; BONANNO, G.; RUTELLA, S.; MARONE, M.; SCAMBIA, G.; LEONE, G. CD105 (Endoglin) expression on hematopoietic stem/progenitor cells. **Leukemia and Lymphoma**, v. 42, n. 6, p. 1195–1206, 2001.
23. RICUCCI, D.; SIQUEIRA-JR, J.F. Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. **Journal of Endodontics**, v. 36, n. 8, p. 1277-1278, 2010.
24. RICUCCI, D.; MANNOCCI, F.; FORD, T. R. A study of periapical lesions correlating the presence of a radiopaque lamina with histological findings. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontology**, v. 101, p. 389–94, 2006.
25. SANCHIS, J. M.; PEÑARROCHA, M.; BAGAN, J. V.; GUARINOS, J.; VERA, F. Incidence of radicular cysts in a series of 125 chronic periapical lesions. Histopathologic study. **Rev Stomatol Chir Maxillofacial**, v. 98, n. 6, p. 354-8, 1998.
26. SCHULZ, M.; VON ARX, T.; ALTERMATT, H. J.; BOSSHARDT, D. Histology of periapical lesions obtained during apical surgery. **Journal of Endodontics**, v. 35, p. 634-42, 2009.
27. 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.
28. 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.
29. SUNDQVIST, G. Ecology of the root canal flora. **Journal of Endodontics**, v. 18, n. 9, p.427-430, 1992.
30. TEN CATE, A. R. Epithelial cell rests of Malassez and the genesis of the dental cyst. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology**, v. 34, p. 956-64, 1972.
31. TRUBIANI, O.; ORSINI, G.; CAPUTI, S.; PIATTELLI, A. Adult mesenchymal stem cells in dental research: a new approach for tissue engineering. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 19, n. 3, p. 451-460, 2006.
32. VIER, F. V.; FIGUEIREDO, J. A. Internal apical resorption and its correlation with the type of apical lesion. **International Endodontic Journal**, v.37, p. 730- 737,

2004.

33. VIER, F.; FIGUEIREDO, J.A. Prevalence of different periapical lesions associated with human teeth and their correlation with the presence and extent of apical external root resorption. **International Endodontic Journal**, v. 35, p. 710– 9, 2002.

34. VOLPONI, A. A.; SHARPE, P. T. The tooth – a treasure chest of stem cells. **British Dental Journal**, v. 215, n. 7, p. 353-358, 2013.

35. YEH, S. P.; CHANG, J. G.; LIAW, Y. C.; LIN, C. L. Induction of CD45 expression on bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Leukemia**, v. 20, p. 894-896, 2006.

36. ZÖLLER, M. CD44: can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule? **Nature Reviews. Cancer**, v. 11, n. 4, p. 254–67, abr. 2011.

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 imunohistoquímica será realizada para avaliar a expressão dos marcadores nas LPP's.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Avaliar a expressão imunohistoquímica 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 Samambala **CEP:** 74.001-970
UF: GO **Município:** GOIÂNIA
Telefone: (62)3521-1215 **Fax:** (62)3521-1163 **E-mail:** cep.prol.ufg@gmail.com



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 488/2012' ...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
Bairro: Campus Samambaia CEP: 74.001-970
UF: GO Município: GOIANIA
Telefone: (62)3521-1215 Fax: (62)3521-1163 E-mail: cep.prpl.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_P RQJETO_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_Conseelho_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 Tâmeo 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.prplutg@gmail.com



UFG - UNIVERSIDADE
FEDERAL DE GOIÁS



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.pipi.ufg@gmail.com

Página 04 de 04



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: 0(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 paciente

Assinatura do pesquisador

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)

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)