

Universidade Federal do ABC

Vanderley Espirandelli

Células-tronco obtidas a partir de dentes decíduos: Revisão bibliográfica e caracterização morfológica de célula-tronco mesenquimal

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Christiane Bertachini Lombello

Santo André – SP

2018

Vanderley Espirandelli

Células-tronco obtidas a partir de dentes decíduos: Revisão bibliográfica e caracterização morfológica de célula-tronco mesenquimal

Monografia entregue cumprindo os requisitos do Trabalho de Conclusão de Curso obrigatório para a graduação no Programa de Ciências Biológicas da Universidade Federal do ABC.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Christiane Bertachini Lombello

Santo André, SP - Abril de 2018

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do ABC
Elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFABC
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Espirandelli, Vanderley

Células tronco obtidas a partir de dentes decíduos :
Revisão bibliográfica e caracterização morfológica de célula
tronco mesenquimal / Vanderley Espirandelli. — 2018.

55 fls.

Orientadora: Christiane Bertachini Lombello

Trabalho de Conclusão de Curso — Universidade Federal do
ABC, Bacharelado em Ciências Biológicas, Santo André,
2018.

1. Células Tronco. 2. Dente Decíduo. 3. Regeneração. 4.

Técnicas de Cultura de Células. I. Bertachini Lombello,
Christiane. II. Bacharelado em Ciências Biológicas, 2018. III.
Título.

Agradecimentos

Este trabalho não teria acontecido sem a colaboração, empenho e estímulo de várias pessoas. Expressar toda a minha gratidão é mais que um dever, é com prazer que o faço a todos os que de forma direta ou indireta contribuíram para que esta tarefa se tornasse realidade. A todos manifesto aqui uma sincera e singela homenagem.

A Deus por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades.

A Universidade Federal do ABC, seu corpo docente, direção e administração pela ética e compromisso com a educação e pesquisa.

A minha orientadora Prof^a. Dr^a. Christiane Bertachini Lombello, pelo suporte, pelas suas orientações, correções e incentivos além da fundamental transmissão de experiências e solidificação de conceitos e reconhecimento nos meus pequenos sucessos.

A Doutoranda Débora Carajiliascov Ferraraz, pela contribuição a partir de sua tese de doutorado com o título “**Avaliação dos efeitos da laserterapia em baixa intensidade na proliferação e diferenciação de células-tronco da polpa de dentes humanos decíduos esfoliados em arcabouços de dentina/osso**”, pelas células utilizadas.

A CRIOGENESIS BIOTECNOLOGIA LTDA pelo assessoramento na utilização dos equipamentos de citometria de fluxo.

Ao Doutorando Thiago Minami Sheguti pelo empenho e conhecimento em citometria de fluxo.

Aos meus pais, Domingos (*in memorian*) e Anna Maria pelos ensinamentos.

As minhas filhas Tatiana, Mariana e Júlia pela compreensão pelas as ausências e pelos erros nesta longa trajetória.

A minha companheira, amiga e amor Ana Lúcia pelas críticas, incentivos, correções e compreensão.

“Os investimentos em conhecimento geram os
melhores dividendos”

Benjamin Franklin

RESUMO

A polpa dentária tem sido estudada como fonte para células-tronco (CT), pela facilidade de obtenção e devido às características que estas células apresentam. Diversos estudos demonstram que as CT isoladas a partir da polpa de dentes decíduos, apresentam grande capacidade de diferenciação em células neurais, osteoblásticas, condroblásticas, adipócitos e miócitos. A obtenção e o processamento dos tecidos dentários para o isolamento das CT são fundamentais para o cultivo destas e a proposição de aplicação clínica. Neste estudo foram analisados criticamente artigos científicos a respeito da obtenção, isolamento e caracterização de CTs obtidas a partir de dentes de leite humanos decíduos. Dentre as principais aplicações clínicas citadas na literatura constam: reconstrução de defeitos craniofaciais, reconstrução do epitélio da córnea, diferenciação de hepatócitos, lesão da coluna vertebral, modelos para o tratamento de epilepsia e diferenciação em células neuroprogenitoras. A partir dos dados de literatura foi proposto um protocolo de obtenção, isolamento e cultura de CTs de dentes decíduos esfoliados humanos (SHED). As células foram acompanhadas por análises morfológicas durante as fases citadas acima, e foram caracterizadas por citometria de fluxo. O protocolo proposto resultou na obtenção de quantidade de células suficientes para o cultivo. As células apresentaram boa capacidade proliferativa. A análise morfológica segue o padrão descrito em literatura, células alongadas, fusiformes, tipo fibroblastos, crescendo preferencialmente em monocamadas. A análise por citometria de fluxo confirmaram a expressão dos marcadores CD90+ e CD 45-, CD34-.

Palavras-chave: Células-Tronco; Dente Decíduo; Regeneração; Técnicas de Cultura de Células.

ABSTRACT

Dental pulp has been studied as a source of stem cells, because of the easy of the harvest and the characteristics of these cells. Several studies shows that the stem cells isolated form deciduous tooth have great differentiation potential into cells from other tissues, neural, osteoblastic, condrobalstic, adipocytes and myocytes. The dental tissue achievement and processing to the stem cell isolation are important for these cells culture and clinical application proposition. In this study there were critically analyzed scientific papers on the stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) harvest, isolation, and characterization. The mainly clinical applications cited in the literature includes: craniofacial defects reconstitution, cornea epithelial reconstitution, differentiated hepatocytes, lesions on the vertebral column, models to treat epilepsy, and differentiation of neuroprogenitor cells. Based on the literature data it was proposed a protocol of human exfoliated deciduous teeth (SHED) harvest, isolation, and culture. The cells were analyzed by morphological assessment during the phases mentioned above, and were characterized by flow cytometry. The proposed protocol resulted in a cell quantity sufficient for the cultivation. The cells showed a good proliferative capacity. The morphological analyzes follows the pattern described in the literature, elongated cells, fusiform, fibroblast-like, grow in monolayer, preferentially. The flow cytometry analyzes confirmed the expression of the markers CD90+ and CD 45-, CD34-.

Key words: Stem cells; Exfoliated tooth; Regeneration; Cell culture technique.

SUMÁRIO

RESUMO	VI
ABSTRACT	VII
SUMÁRIO	VIII
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABELAS	X
ANEXO 1	58
I INTRODUÇÃO	1
I.1. CTs	3
I.2. Plasticidade das CTs	9
I.3. CTs	11
I.4. CTs obtidas de polpa de dente decíduo	15
II OBJETIVOS E METAS.....	15
II.1. Objetivos específicos	16
III METODOLOGIA	16
III.1. Localização e seleção de artigos publicados.....	16
III.2. Avaliação crítica das publicações e coleta de dados.....	17
III.3. Estabelecimento do protocolo e congelamento	17
III.4. Descongelamento e Cultura celular.....	17
III.5. Caracterização	18
IV RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
IV.1. Obtenção e processamento das CTs	20
IV.2. Descongelamento e cultura: caracterização morfológica	27
IV.3. Citometria de fluxo.....	34
IV.4. Aplicação clínica	39
V CONCLUSÕES	42
VI BIBLIOGRAFIA	44

Lista de Figuras

Figura 1: Número de testes clínicos utilizando CTs , entre 1992 e 2012.....	1
Figura 2: Defasagem entre pacientes esperando por transplantes e procedimentos efetuados.....	2
Figura 3: Etapas do desenvolvimento embrionário. A.mórula; B.blastocisto; C.três folhetos embionários (gástrula).....	7
Figura 4: Potencial de diferenciação de CTs	9
Figura 5: Pesquisas por ano.....	20
Figura 6: Número de pesquisas por ano.....	21
Figura 7: Polpa dente decíduo, preservada, com potencial, isolamento de CT.....	22
Figura 8: Células espalhadas, ainda em forma arredondada, em suspensão logo após o descongelamento.....	28
Figura 9: Células em processo de adesão (seta), em suspensão 1 hora após o descongelamento. Já podem ser observadas células em adesão.....	29
Figura 10: Células em adesão, após 2 horas do descongelamento. Poucas células em suspensão são observadas.....	29
Figura 11: Células alongadas, poligonais e fusiformes, início da confluência após 24 horas de cultura.	30
Figura 12: Monocamada após 48 horas, células alongadas.....	30
Figura 13: Confluência da cultura celular após 96 horas, 4 dias, com células alongadas, e sobreposição de células.....	31
Figura 14: A monocamada, após repique com 7 dias de cultura, já apresentando células alongadas, em semi-confluência.....	32
Figura 15: Monocamada após 8 dias de cultura, já apresentando aumento da confluência.....	32
Figura 16: Confluência da monocamada após 9 dias de cultura, com células alongadas, e sobreposição de células.....	33
Figuras 17: 1. São citados todos os eventos; 2. Mostra CD34 e CD 45 negativos; 3. A área R2 mostra confluência de 93,50% de CD90.....	36
Figura 18: 1. São citados todos os eventos; 2. Mostra CD34 e CD45 negativos; 3. A área R2 mostra confluência de 3,99% de CD 105.....	37
Figura 19: Gráfico do tamanho em função da granulidade.....	38

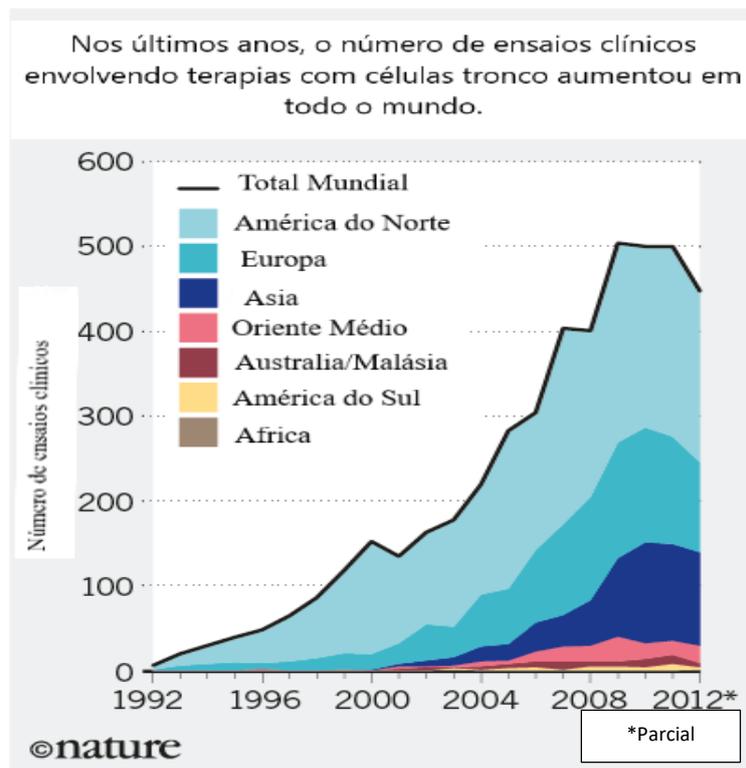
Lista de Tabelas

Tabela 1: Eventos históricos relacionados a pesquisa de CTs humanas.....	5
--	---

I. INTRODUÇÃO

A terapia com CTs passou a despertar grande interesse na comunidade científica uma vez constatada a capacidade que essas células indiferenciadas têm de renovar sua própria população e se diferenciar em células dos diversos tecidos, levando a um aumento significativo no número de pesquisas clínicas (figura 1). Encontrar a fonte de CTs apropriada para uso terapêutico depende de fatores como a sua capacidade de proliferação e estabilidade citogenética, e também de suas características fenotípicas e potencial de diferenciação (MIURA *et al* 2003).

Figura 1. Número de testes clínicos utilizando CTs, entre 1992 e 2012.



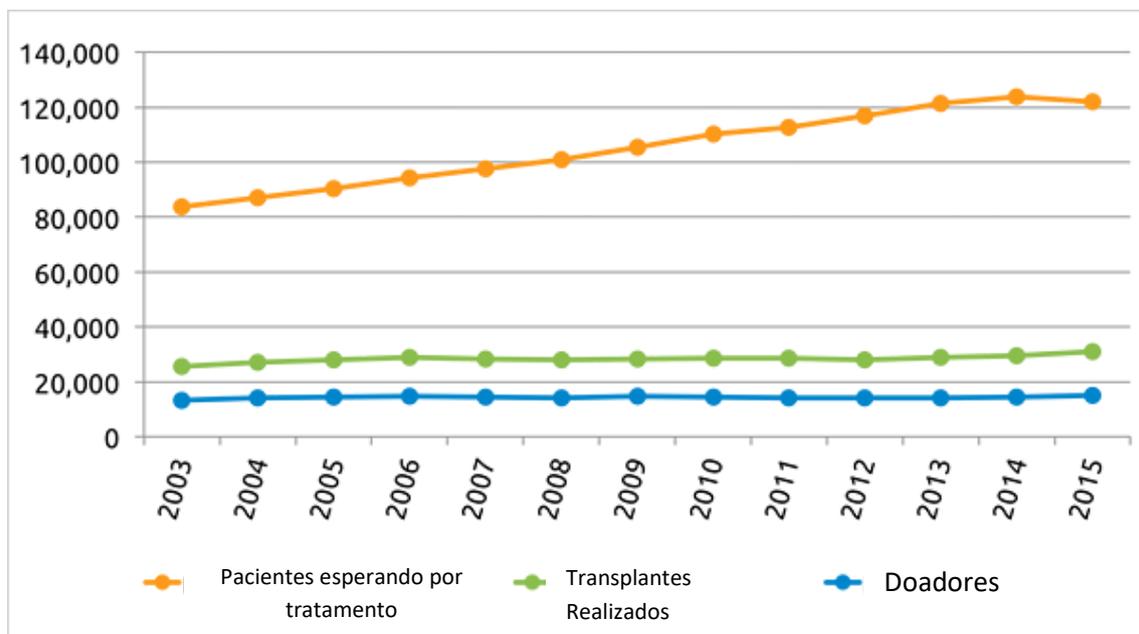
Fonte: KIMMELMAN *et al.*, 2016.

Os tecidos perdem progressivamente, por diversas causas, sua capacidade de funcionamento. Doenças, traumas decorrentes de acidentes, medicamentos ou terapias como quimioterapia ou radioterapia podem afetar o metabolismo celular e tecidual, assim

como a senescência celular, processo que ocorre naturalmente no organismo (CAPLAN, 2009). Também devem ser considerados outros tratamentos ou terapias que podem levar a diminuição da qualidade de vida do indivíduo, como drogas imunossupressoras, próteses. Existe uma grande demanda por procedimentos que eliminem ou diminuam as limitações causadas por doenças, envelhecimento ou trauma, permitindo a retomada de qualidade de vida destes pacientes.

Uma solução para a reposição de tecidos que apresentam suas funções comprometidas é o transplante de órgãos. No entanto, os transplantes correspondem a apenas uma fração muito pequena da necessidade atual (figura 2). O número quase constante de doadores e transplantes realizados, o número crescente de pacientes esperando por tratamento, isso por escassez de doadores, pela dificuldade de se encontrar doadores compatíveis, e pela dificuldade de se cooptar doadores, resulta na falta de disponibilidade efetiva de órgãos, ou tecidos, a serem transplantados (ABTO, 2017).

Figura 2: Defasagem entre pacientes esperando por transplantes e procedimentos efetuados.



Fonte: Modificado de US Departamento f Health & Human Services.

Neste contexto, a terapia celular com CTs se apresenta como uma fonte potencial para a regeneração de tecidos, em substituição ao transplante de tecidos e órgãos.

Dentre as pesquisas que mais se desenvolveram nos últimos anos, relacionadas à terapia celular, as CTs se destacam como as mais promissoras no tratamento e remissão de várias patologias. Atualmente, diversas linhagens de CTs, têm sido estudadas devido à sua capacidade de diferenciação em células de vários tecidos do organismo (fígado, pâncreas, sistema nervoso central, rins, pulmões, pele, músculo esquelético), e à sua atuação como precursoras de recuperação tissular (PEREIRA, 2008).

I.1. Células-tronco (CT)

Por definição, as CTs são células indiferenciadas capazes de se proliferar indefinidamente, gerando células filhas idênticas à célula mãe. Mas ao mesmo tempo estas células podem ser induzidas a diferenciação e, neste caso, são responsáveis por originar células especializadas como osteoblastos, condrócitos, células musculares, epidérmicas, neurais, entre outras (WATT e HOGAN, 2000; MOTA *et al.*, 2005). As células presentes no organismo, células somáticas, em geral sofrem processos proliferativos limitados, e estão previamente comprometidas e um determinado ramo de diferenciação celular tecido-específica, e de acordo com a origem embriológica das células (MORRISON *et al.*, 1997; WEISSMAN, 2000).

No final do século XIX os primeiros experimentos com a finalidade de fertilização *in vitro* podem ser considerados precursores dos estudos envolvendo CTs humanas com a finalidade de aplicação clínica. Na tabela 1 são listados alguns dos principais avanços

desta área de pesquisa até os dias atuais (LITTLE e STORB, 2002; SOLTER, 2006; FAIS *et al.*, 2010; GENRON, 2012; LIZIER *et al.*, 2012; NYSCF, 2017; IPCT, 2018).

Tabela 1: Eventos históricos relacionados a pesquisa de CTs humanas.

Século XIX	Descrição dos estágios embrionários pré-implantacionais e primeiras tentativas de fertilizar óvulos fora do corpo de mamíferos (SCHENK, 1878).
1950	Estabelecida a primeira linhagem de células humanas, HeLa, a partir de células de um câncer cervical da paciente Henrietta Lacks (MASTERS, 2002).
1959	Primeiro animal, um coelho, gerado por fertilização <i>in vitro</i> (NCBI, 2009).
1964	Experimentos com teratocarcinomas e sensibilidade a radiação da medula óssea, verificaram a existência de células na medula identificadas como CTs (KLEINSMITH e PIERCE, 1964; TILL <i>et al.</i> , 1964).
1968	Primeiro óvulo humano fertilizado <i>in vitro</i> (EDWARDS <i>et al.</i> , 1969).
1980	CTs embrionárias cultivadas são exploradas como modelos de desenvolvimento embrionário em camundongos, incluindo quimeras, apesar de anormalidades cromossômicas constatadas (MARTIN, 1980).
1978	Primeiro bebê de proveta nasce na Inglaterra, Louise Brown (STEPTOE e EDWARDS, 1978).
1981	Isolamento de CTs a partir de blastocistos de camundongos (EVANS e KAUFMAN, 1981)
1984	Identificadas a capacidade de diferenciação de células pluripotentes, clonadas a partir de teratocarcinoma testicular humano, em neurônios e outros tipos celulares (THOMPSON <i>et al.</i> , 1984; ANDREWS, 1988).
1989	Linhagem de células de carcinoma embrionário humano, com capacidade de diferenciar em células dos 3 folhetos germinativos, são células aneuplóides e com potencial de diferenciação <i>in vitro</i> (PERA <i>et al.</i> , 1989).
1994	Blastocistos humanos são obtidos a partir da massa celular interna de embriões fertilizados <i>in vitro</i> e mantidos em cultura por duas passagens, com cariótipo normal (BONGSO <i>et al.</i> , 1994a; 1994b).
1995	CTs embrionárias de primatas são mantidas <i>in vitro</i> , com cariótipo normal e semelhança com CTs embrionárias humanas (THOMSON <i>et al.</i> , 1995; 1996).
1998	Células de blastocistos humanos são cultivadas <i>in vitro</i> por até 20 passagens, com cariótipo normal, pluripotentes (SHAMBLOTT <i>et al.</i> , 1998; THOMSON <i>et al.</i> , 1998).
2000	Cientistas utilizam CTs embrionárias a partir da massa celular interna de blastocistos em estudos de proliferação e diferenciação celular (BONGSO, 1999; TROUNSON e GARDNER, 1999; PERA, <i>et al.</i> , 2000).
2001	É criado o INCA. O primeiro banco público de CT de cordão umbilical no Brasil (BRASIL, 2005)
2005	Brasil, a Lei de Biossegurança 11.105/2005, permite início da pesquisa com CT do embrião humano.
2006	CTs adultas pluripotentes induzidas (IPSCs) são descritas (TAKAHASHI e YAMANAKA, 2006).
2007	Células somáticas são reprogramadas para o estado de CTs embrionárias pluripotentes, as CTs pluripotentes induzidas (IPSC) (TAKAHASHI E YAMANAKA, 2006).
2007	Evans compartilha o Prêmio Nobel de medicina com Mario Capecchi e Oliver Smithies por trabalho em genética e CTs embrionárias (NOBEL, 2012).
2012	Uma pessoa com lesão na coluna vertebral se torna a primeira a receber um tratamento médico derivado de células estaminais embrionárias humanas como parte de uma pesquisa por Geron de Menlo Park, Califórnia, uma empresa pioneira para terapias de células estaminais embrionárias humanas (GENRON, 2012).
2012	As CTs embrionárias humanas, promessa em um tratamento que facilita a cura para a cegueira.
2012	Yamanaka ganha prêmio Nobel pela criação de CTs pluripotentes induzidas, que ele compartilha com John Gurdon da Universidade de Cambridge (NOBEL, 2012)
2012	Cientistas brasileiros conseguem alta taxa de proliferação de CT do leite de leite (LIZIER <i>et al.</i> , 2012).
2014	Charles Vacanti da Harvard Medical School junto com Haruko Obokata no Riken Center for Developmental Biology em Kobe, Japão, e colegas anunciaram uma descoberta revolucionária de que qualquer célula pode potencialmente ser reprogramada em um estado pré-embrionário (IPCT, 2018).
2014	Dieter Egli, da New York Stem Cell Foundation e Young Gie Chung, da Universidade CHA em Seul, Coreia do Sul, produzem células estaminais embrionárias humanas de células adultas, com clonagem terapêutica. A equipe de Egli usa células de pele de uma mulher e demonstra que podem ser transformadas em células beta produtoras de insulina. (NYSCF, 2017).
2018	Masayo Takahashi no centro de Riken seleciona pacientes para o que promete ser o primeiro teste mundial de uma terapia baseada em CT pluripotentes induzidas, para tratar uma forma de cegueira relacionada à idade (IPCT, 2018).

Fonte: NCBI, 2006 e New Scientist 2018.

No início das pesquisas com CTs, as CTs embrionárias foram consideradas as mais promissoras, no entanto a constatação do potencial mutagênico destas células, além das limitações relacionadas ao questionamento ético e regulamentar, dificultou o uso experimental e clínico destas células. No entanto, estudos com CTs adultas foram desenvolvidos (MULLER, 2013).

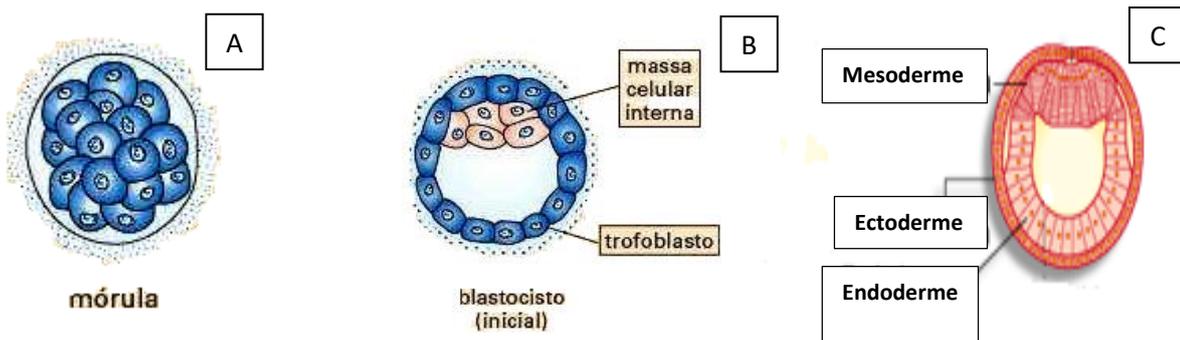
As CTs adultas são encontradas no cordão umbilical e placenta, e em tecidos jovens, como no dente decíduo, além de vários outros tecidos do organismo adulto, como na medula óssea (LEMISCHKA, 2005). As CTs seguem dois modelos básicos de divisão: o determinístico, pelo qual a divisão celular de uma CT gera uma nova CT e também uma célula diferenciada; e o aleatório ou estocástico, pelo qual as CTs podem gerar novas CTs ou células com potencial para sofrer diferenciação (SANTOS *et al.*, 2004).

Dependendo de onde se originam estas células apresentam propriedades distintas. Podem ser identificados três tipos de CTs, dependendo de sua origem: embrionárias, germinativas embrionárias e adultas (WAGERS e WEISSMAN, 2004).

As CTs embrionárias são obtidas no estágio inicial do embrião, o óvulo fecundado por um espermatozoide (zigoto), é a primeira fase embrionária. O zigoto começa a se dividir cerca de 30 horas após a fecundação, e por volta do terceiro dia o embrião é uma massa compacta de 12 ou mais células, caracterizando o estágio de mórula (Figura 3 a). Cinco a seis dias após fertilização, e depois de vários ciclos de divisão celular, é formada o blastocisto. A camada externa do blastocisto é chamada de trofoblasto, e internamente é encontrado um aglomerado celular, a massa celular interna, formada por blastocistos (Figura 3 b). Nesta fase, há cerca de 70 células trofoblásticas e cerca de 30 células na massa celular interna. As células da massa celular interna são as CTs embrionárias

(THOMSON *et al.* 1998), capazes de originar células dos três folhetos embrionários (ectoderme, mesoderme e endoderme) e anexos embrionários, sendo denominadas células totipotentes (ODORICO, 2001; SMITH, 2001) (Figura 3 c).

Figura 3: Etapas do desenvolvimento embrionário. A.mórula; B.blastocisto; C.três folhetos embionários (gástrula).



Fonte: Adaptado de: www.lance-ufrij.org/células-tronco.html.

No final do desenvolvimento embrionário fetal a região conhecida como crista gonadal, que acabaria por se tornar os órgãos sexuais, é fonte de um tipo particular de células embrionárias, as células germinativas embrionárias. Estas células compartilham algumas características das CTs embrionárias, e podem originar células dos três folhetos embrionários, mas não originam anexos embrionários. São consideradas células pluripotentes, que são células que conseguem dividir e produzir todos os tecidos menos os anexos embrionários (WAGERS e WEISSMAN, 2004).

Em geral, em organismos jovens e adultos, as CTs estão presentes em tecidos com alta taxa de renovação, por exemplo a medula óssea, responsável pela reposição das células do sistema hematopoiético, como as hemácias, cuja vida média é de aproximadamente 120 dias (VERFAILLIE, 2002; KRAUSE, 2002). Atualmente são bem caracterizadas as CTs obtidas a partir de medula óssea, tecido adiposo, tecido muscular, tecido neural, córnea, retina, fígado, pâncreas, entre outros. A plasticidade destas células

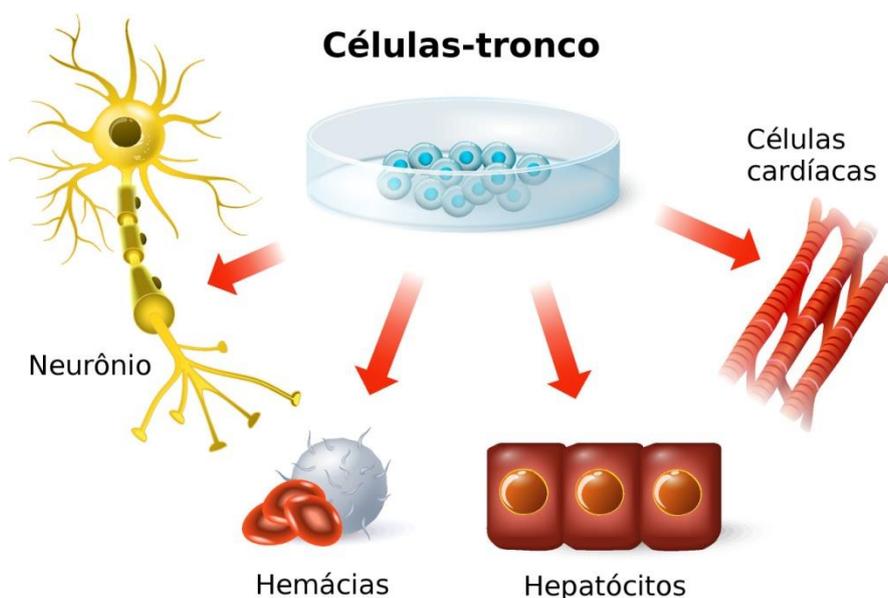
em geral é limitada, se comparada às CTs embrionárias, têm a capacidade de se diferenciar em células do tecido no qual se localizam ou mesmo tecidos da mesma origem embrionária (algumas poucas CTs apresentam esta característica), são consideradas células multipotentes (2004; BRESSAM *et al*, 2008).

As CTs pluripotentes induzidas (iPSC) são células somáticas, induzidas a se comportarem como CTs, pela reprogramação gênica, com a ativação de genes como Oct-4, Sox2, c-Myc e Klf4 (TAKAHASHI e YAMANAKA, 2006). O gene Zeb2-NAT facilita a reprogramação de fibroblastos envelhecidos e protege a pluripotencialidade das CTs (JESUS *et al.*, 2008). São consideradas importantes fontes de CTs autólogas para tratamentos clínicos, e apresentam alta capacidade proliferativa, plasticidade, morfologia, além de estados genômico e epigenômico, condizentes com as CTs embrionárias (AMABILE e MEISSNER, 2009).

I.2. Plasticidade das células-tronco

As CTs podem também ser classificadas de acordo com seu grau de plasticidade (figura 4), ou versatilidade para diferenciação, conforme citado anteriormente (LOEFFLER e ROEDER, 2002). Podem ser classificadas como totipotentes, pluripotentes, multipotentes e unipotentes (VERFAILLIE, 2002).

Figura 4. Potencial de diferenciação de CTs.



Fonte: <https://www.infoescola.com/citologia/células-tronco/>.

As CTs totipotentes apresentam a maior plasticidade. O zigoto é totipotente, ou seja, capaz de diferenciar nos três folhetos que formam o corpo humano, incluindo placenta e anexos embrionários. As células totipotentes são encontradas nos embriões nas primeiras fases de divisão, isto é, quando o embrião tem entre 16 e 32 células, que corresponde a 3 ou 5 dias de vida (ROBEY, 2000).

As células obtidas da massa interna do blastocisto, formado no 5º dia do desenvolvimento embrionário, são consideradas pluripotentes, pois podem dar origem a

todos os tipos de tecidos humanos, excluindo a placenta e anexos embrionários (ROBEY, 2000). A plasticidade ainda é suficiente para a obtenção de qualquer tipo celular presente no organismo. Devido à disponibilidade de blastocistos inviáveis e/ou excedentes resultantes dos procedimentos de fertilização *in vitro* e diagnóstico pré-implantacional, a utilização destas células em protocolos experimentais e clínicos é uma realidade (ODORICO *et al.*, 2001; SOLTER, 2006). De acordo com a Lei de Biossegurança (Lei 11.105/05), apenas poderão ser utilizados para fins de pesquisa os embriões humanos produzidos por fertilização *in vitro* inviáveis para a implantação ou aqueles excedentes, congelados por três anos no mínimo e, em qualquer dos casos, com autorização dos doadores (BRASIL, 2005).

As células multipotentes e unipotentes apresentam plasticidade mais limitada, originam células em um determinado tipo de tecido, e no caso das unipotentes apenas um tipo celular. As CTs hematopoiéticas multipotentes da medula óssea, presentes em organismos adultos, podem se desenvolver em hemácias, glóbulos brancos ou plaquetas (KRAUSE, 2002). Estas CTs hematopoiéticas adultas têm como função a renovação celular e tecidual, para a reposição de células que morreram ou perderam a função. É, portanto, uma célula indiferenciada presente no tecido adulto diferenciado (CLARKE *et al.*, 2000).

As CTs adultas, multi e unipotentes, já foram identificadas nos tecidos neural, muscular, endotelial, mesenquimal, gastrointestinal e células da epiderme. Na medula óssea, além das CTs hematopoiéticas citadas, são encontradas CTs mesenquimais, correspondendo a 0,01% a 0,0001% das células nucleadas. Estas células têm potencialidade para formar células ósseas, cartilagenosas, musculares de tendão,

ligamentos, adipócitos entre outros (PITTENGER *et al.*, 1999; MINGUELL *et al.*, 2000; MEIRELLES *et al.*, 2006; CAPLAN, 2009; BYDLOWSKI *et al.*, 2009).

Apesar dos avanços nas pesquisas com CTs nas últimas décadas, podem ser citados dois fatores fundamentais a serem elucidados para a utilização clínica de CTs adultas: quais as fontes ideais para obtenção das células; e como ocorre a indução e o controle da diferenciação.

I.3. Células-tronco mesenquimais

O interesse do uso clínico das CTs mesenquimais, em virtude de seu potencial terapêutico, e tomando por base a quantidade de equipes de pesquisa que estudam estas células nos últimos anos, gerou muitas dúvidas quanto sua nomenclatura e identificação (HORWITZ *et al.*, 2005).

A Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT), em relatório de 2005, através do Comitê de Células-Tronco do Tecido Mesenquimal, propôs um conjunto de normas para definir CTs mesenquimais humanas (HORWITZ *et al.*, 2005; ULLAH *et al.*, 2015). Estas normas tem o objetivo de proporcionar à comunidade científica um padrão de critérios, com base nos dados disponíveis, e reconhece que as investigações futuras provavelmente poderão proporcionar uma revisão destes a medida que novos dados surgirem. Portanto, os três critérios para definir as CTs mesenquimais são:

- a. Aderência ao plástico.

As CTs mesenquimais, isoladas de uma população de células mononucleares, apresenta aderência seletiva em cultura, à superfície do plástico (poliestireno).

Aderência ao plástico é propriedade bem descrita de CTs mesenquimais, conforme SILVA *et al* (2012).

b. Caracterização das CTs mesenquimais.

Há um consenso geral que CTs mesenquimais humanas de medula óssea não expressam os marcadores hematopoiéticos como CD45 (marcador de todas as células hematopoiéticas), CD34 (um marcador de CT hematopoiética primitiva, raramente expressa em CTs mesenquimais humanas, apesar de ser positiva em camundongos), e CD14 (marcador de monócito). Também não devem ser expressos o CD11b (um marcador de célula imune) e glicoforina-A (marcador de linhagem eritróide). O CD117 (CT progenitora hematopoiética) está quase sempre ausente de CTs mesenquimais humanas. Não expressam as moléculas co-estimulatórias, tais como CD80, CD86, e CD40, ou as moléculas de adesão CD31 (PECAM-1, expresso em células endoteliais e hematopoiéticas), CD18 (LCAMB), CD58 (NCAM-1). Expressam níveis variáveis de CD105 (endoglina), CD73 (ecto-5'-nucleotidase), CD44, CD90 (Thy-1), CD71 (receptor de transferrina), gangliosídeo GD2, e CD271 (receptor do fator de crescimento nervoso de baixa afinidade), que são reconhecidos pelo anticorpo monoclonal Stro-1, assim como as moléculas de adesão CD106 (VCAM-1), ALCAM, ICAM-1 E CD29 (BAER, 2014).

c. Plasticidade.

As CTs mesenquimais são caracterizadas por serem multipotentes, que tem duas propriedades únicas. A primeira é sua capacidade de auto renovação para

além do limite de Hayflick. Na década de 1960, o Dr. Leonard Hayflick realizou experimentos com tecido pulmonar e as células se dividem por apenas 50 ou 60 gerações antes de seus telômeros fiquem muito curtos para dar a proteção aos cromossomos, chegando a um limite mínimo de tamanho, a partir daí as divisões celulares param e tem início o envelhecimento programado, uma propriedade compartilhada por CTs embrionárias (YOUNG *et al.*, 2001). A segunda é a capacidade de se diferenciar em células tais como osso, tecido adiposo, cartilagem (PEREIRA *et al.*, 1995) e em células neurais (PITTENGER *et al.*, 1999; SANCHEZ-RAMOS *et al.*, 2000; MEIRELLES *et al.*, 2006; MONTEIRO, 2009). Estas características sugerem que a utilização das CTs mesenquimais em terapias celulares seja das mais promissoras, ampliando as possibilidades de utilização clínica e tratamento (CANO, 2006; LIU e VELAZQUEZ, 2009).

Permanece pouco compreendido para a comunidade científica o mecanismo de regulação gênica que determina no embrião que uma CT pluripotente se diferencie em determinado tecido específico, como hepático, ósseo ou hematológico. Diferentes suplementos atuam como fatores de diferenciação e podem determinar a diferenciação das CTs em células de diversos tecidos. Estudos ainda em andamento averigam as consequências do contato direto das CTs com um tecido já diferenciado, trabalhando com a hipótese do desenvolvimento da mesma expressão gênica do tecido onde foram alocadas (GBT, 2000; IOMSA, 2002).

A fonte mais estudada de CTs mesenquimais é a medula óssea, onde estão localizadas tanto as CTs mesenquimais quanto as hematopoiéticas. Desde 1950, o uso clínico da medula óssea com finalidade de recuperação do sistema hematológico e

imunológico vem demonstrando que a regeneração de tecidos não hematológicos ocorre devido à presença da linhagem de CTs mesenquimais. Uma análise dos resultados obtidos pelo uso clínico das CTs da medula óssea trará base teórica do potencial dessa célula a partir de outras fontes como tecido adiposo e polpa dentária (PEREIRA, 2008).

I.4. Células-tronco obtidas de polpa de dente decíduo

A polpa dentária tem sido estudada como uma fonte para obtenção de CTs. São derivadas de um tecido acessível e também permite a obtenção de células para uma potencial aplicação clínica (MIURA *et al.*, 2003). Os dentes permanentes, removidos por razões específicas, também são fontes de CTs (GRONTHOS *et al.*, 2000; GRONTHOS *et al.*, 2002), mas apresentam a desvantagem se ter uma população de células menos imaturas que as do dente decíduo, e apresentam menor capacidade de proliferação celular. Alguns autores citam a capacidade de diferenciação de CTs obtidas a partir de polpa de dentes decíduos em células neurais, osteoblásticas, condroblásticas, adipócitos e miócitos (MIURA *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2010; ESTRELA *et al.*, 2011; RODRÍGUEZ-LOZANO *et al.*, 2011; SUCHÁNEK *et al.*, 2011).

Este trabalho propõe a análise das publicações científicas sobre o isolamento, cultivo, caracterização e aplicação clínica das CTs obtidas a partir de polpa de dentes decíduos.

II. OBJETIVOS e METAS

O objetivo do presente estudo é o levantamento sistemático de informações sobre a obtenção, isolamento, a cultura e a caracterização de CTs isoladas a partir de dentes decíduos, bem como a aplicação prática destes processos.

II.1. Objetivos Específicos

- 1- Delinear um Protocolo Obtenção, Isolamento e Cultura, a ser desenvolvido em continuidade ao presente projeto;
- 2- Caracterizar das células isoladas e cultivadas por microscopia de luz;
- 3- Caracterizar das células isoladas e cultivadas por citometria de fluxo;
- 4- Avaliar o potencial de uso das CTs isoladas de dentes decíduos.

III. METODOLOGIA

A revisão sistemática de literatura foi realizada em sete etapas distintas (ATALLAH e CASTRO, 1998; CASTRO, 2001). A primeira etapa corresponde à formulação do questionamento para definir o tema da revisão bibliográfica. As demais etapas referem-se a: localização e seleção de artigos publicados; avaliação crítica das publicações; coleta de dados; apresentação dos dados; interpretação dos resultados; aprimoramento da revisão.

III.1. Localização e seleção de artigos publicados

Foram identificados artigos científicos publicados nas bases de dados Pubmed, Scielo, Capes e Clinical Trials, relevantes para o isolamento e a caracterização de CTs a partir de dentes decíduos, neste primeiro momento da pesquisa. Como palavras-chave para a busca em questão foram utilizadas: dentes decíduos (inglês: *deciduous teeth*), células-tronco (inglês: *stem cells*) e CTs mesenquimais (inglês: *mesenchymal stem cells*).

III.2. Avaliação crítica das publicações e coleta de dados

Os artigos científicos obtidos com o levantamento bibliográfico foram analisados criticamente para sua inclusão ou não nesta revisão sistemática, sendo excluídos apenas os artigos que não contribuíram para a descrição da metodologia pretendida.

III.3. Estabelecimento do Protocolo e Congelamento

As CTs foram obtidas de dentes decíduos a partir do protocolo estabelecido e descrito em Resultados (item IV deste documento). Estas células foram devidamente isoladas, cultivadas e congeladas. Estas etapas não foram desenvolvidas neste Trabalho, sendo realizada uma parceria com a Tese de Doutorado da aluna Débora Carajiliascov Ferraraz com o título “**Avaliação dos efeitos da laserterapia em baixa intensidade na proliferação e diferenciação de células-tronco da polpa de dentes humanos decíduos esfoliados em arcabouços de dentina/osso**”, pelo Programa de Biotecnociência, da Universidade Federal do ABC. A obtenção dos dentes humanos decíduos foi devidamente aprovada por **Comitê de Ética CAAE 80572417.0.1001.5594**.

III.4. Descongelamento e Cultura celular

Para o descongelamento das CTs, os tubos criogênicos foram retirados do nitrogênio líquido e colocados em banho maria a 37 ° C. Foram descongeladas duas amostras de células cultivadas durante 2 passagens, e as células permaneceram congeladas durante 4 meses.

As amostras A e B, correspondendo a tratamento com 10 e 20 minutos de tripsina respectivamente para a obtenção do explante celular a partir das pólas dentárias.

O *pellet* celular foi transferido para tubo Falcon®, e ressuspenso com 9 mL de meio de cultura, Meio Mínimo de Eagle (MEM) (SIGMA ALDRICH), com 10 % de Soro

Fetal Bovino (SFB) (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). As células foram centrifugadas a 1.000 rpm por 5 minutos, com o posterior descarte do sobrenadante. O *pellet* celular resultante foi novamente ressuspensionado com 9 ml de meio de cultura Eagle. Foi realizada a contagem celular, com azul de Tripán 0,2 % (SIGMA ALDRICH) em Câmara de Neubauer. Após esta etapa foram cultivadas em garrafa de cultura de 25cm² em Meio Mínimo de Eagle (MEM) (SIGMA ALDRICH), suplementado com 15% de Soro Fetal Bovino (SFB), 0,1 µM de ácido ascórbico 2-fosfato, 100U/ml de penicilina e 100 mg/ml de estreptomicina, e incubadas a 37 ° C e 5 % de CO₂ (SEO *et al.*, 2008), esta mesma condição de cultura foi utilizada desde o isolamento das células até a etapa de congelamento.

A troca do meio completo foi feita a cada três dias. O repique, com a tripsinização da monocamada (ver Anexo 1) foi realizada após 7 dias de cultura.

Todo o procedimento de descongelamento e cultura celular foi realizado em cabine de segurança biológica (FILTERFLUX).

III.5. Caracterização

A caracterização das células cultivadas a partir do protocolo estabelecido foi realizada através dos critérios de aderência aos frascos de cultura, morfologia e por meio da citometria de fluxo.

Para análise de aderência e morfologia, as células foram observadas ao microscópio de luz invertido com contraste de fase (AXIOVERT A1, ZEISS).

Para citometria de fluxo foi utilizado o BD FACSCalibur™ 4 Cores Ativo (Becton&Dicson) e foram utilizados marcadores para CTs mesenquimais: anti-CD90 humano PerCP-Cy™ 5.5 (BD Biosciences), o CD105 PerCP-Cy™ (BD Biosciences), o FITC Mouse Anti-humano CD45 (BD Biosciences), o PE Mouse Anti-Human CD34 (BD

Biosciences). Esta etapa do trabalho foi realizada nos laboratórios da CRIOGENESIS BIOTECNOLOGIA LTDA.

Para ressuspender as células, foi adicionada 1 ml de solução de Tripsina/EDTA a 0,25%, mantida em incubadora 37° C durante 10 minutos. Após este tempo, foi feita a verificação se as células estavam totalmente suspensas. Foi acrescentado 1 ml de PBS (Hyclone™ GE Healthcare Life Sciences, Logan, Utah, EUA) na garrafa de cultura, e após agitação o conteúdo foi transferido para tubo Falcon® de 15 ml e centrifugado à 1.600 rpm durante 5 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi retirado, e foi adicionado 1 ml de PBS (Hyclone™ GE Healthcare Life Sciences, Logan, Utah, EUA) novamente, o conteúdo agitado manualmente e separado uma alíquota de 10 µl para contagem na câmara de Neubauer para contagem das células.

Foram colocadas 5×10^5 células em 2 tubos, separadamente, para a análise ao citômetro de fluxo. No primeiro tubo foi acrescentado 20 µl de CD105, 20 µl DE CD34 e 20 µl de CD45 para a leitura positiva de CD105, e as negativas de CD34 e CD45. No segundo tubo foram colocados 20 µl de CD90, 20 µl DE CD34 e 20 µl de CD45 para a leitura positiva de CD90 e as negativas de CD34 e CD45. Os tubos foram armazenados no escuro em temperatura ambiente por 30 minutos e foi feita a contagem e as análises dos dados. A contagem foi realizada no citômetro de fluxo FACScalibur™ utilizando o programa BD FACSCOUNT™ (Becton Dickinson, San Diego, CA,US), e 30.000 eventos foram coletados para análise.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.1. Obtenção e processamento das células-tronco. Levantamento Bibliográfico.

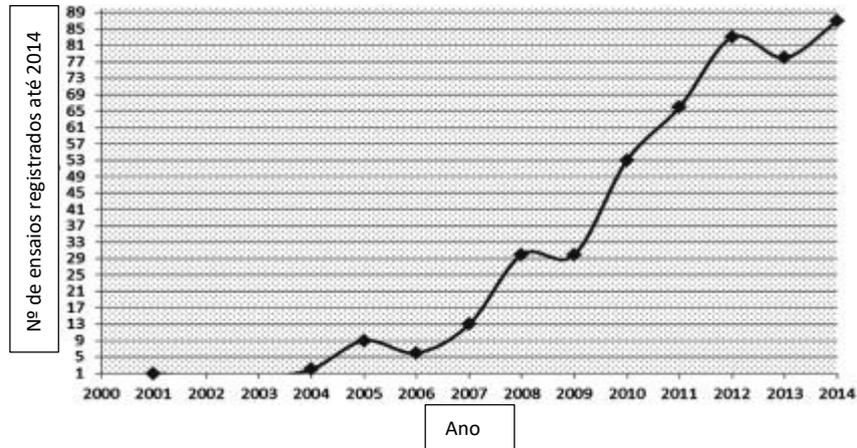
O levantamento bibliográfico na base de dados *PUBMED* (figura 5) utilizando as palavras-chave *deciduous teeth* e *mesenchymal stem cells*, como constantes dos títulos ou resumos de artigos publicados em inglês, até o mês de abril de 2018. Foi possível obter 398 referências bibliográficas, entre artigos inéditos e revisões bibliográficas, estas últimas correspondem a 70 artigos. A mesma busca realizada no banco de dados *SCIELO*, com os mesmos termos em inglês, resultou em 197 artigos publicados até o presente momento. Já no site *CAPES*, foram identificados 2.204 trabalhos com os mesmos termos. No site *CLINICAL TRIALS* (figura 6) foram localizados 825 ensaios clínicos englobando 831 condições relacionadas aos termos *mesenchymal stem cells*. A partir deste levantamento foram selecionados primeiramente artigos que abordam especificamente a obtenção e caracterização das CTs a partir de dentes decíduos.

Figura 5 – pesquisas por ano



Fonte: PUBMED

Figura 6: Número de pesquisas por ano.



Fonte: ClinicalTrials.gov

As informações relativas à obtenção, isolamento e caracterização de CTs de dentes decíduos, ou seja, de dentes de leite, objeto principal deste estudo, estão transcritas a seguir.

Os dentes decíduos devem ser coletados a partir de um centro odontológico, onde cirurgiões dentistas se responsabilizam pela remoção deste dente preservando o tecido mole. Todo o procedimento de coleta do dente decíduo deve estar de acordo com a legislação vigente de Pesquisa Clínica (Resolução MS 196/1996).

A presença de polpa vermelha (figura 7), indicando fluxo sanguíneo até o momento da remoção, favorece a viabilidade das células presentes. A presença de polpa acinzentada nos dentes decíduos é indicativa que o fluxo sanguíneo para a polpa possa ter sido comprometido, provocando morte celular e, portanto, inviabilidade do tecido para a obtenção de CTs. Dentes com grande mobilidade e propensão a cair tem grande probabilidade de apresentar comprometimento do fluxo sanguíneo da polpa, e correspondente probabilidade de comprometimento da viabilidade celular. Devem ser

excluídos dentes que apresentam abscessos apicais, tumores ou cistos também, evitando o comprometimento das linhagens celulares presentes (ARORA *et al.*, 2009).

Figura 7 – Polpa de dente decíduo, preservada e com potencial para isolamento de CTs.



Fonte: www.criogenesis.com.br

A coleta deve envolver condições de assepsia adequadas como a esterilização e desinfecção dos instrumentos, utilização de agentes antissépticos, e preparação do campo operativo com uso de barreiras para minimizar a contaminação do tecido obtido. O transporte do dente, a partir do centro odontológico até o laboratório onde será realizada sua manipulação, deve ser realizado em frascos estéreis, de preferência em ambientes refrigerados, com temperatura de 4°C, controlada até o momento do processamento.

Como meio de coleta e armazenamento podem ser utilizadas soluções que visem a preservação do tecido da polpa dentária, tais como: HypoThermosol (HTS; BioLife Solutions, Bothell, WA), MesenCult meio basal (StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canadá), tampão fosfato salino (PBS; Sigma Chemical, St. Louis, MO), solução salina balanceada de Hank (HBSS, Invitrogen, USA) (KERKIS *et al.*, 2006; PERRY *et al.*, 2008; SEO *et al.*, 2008; SUCHÁNEK *et al.*, 2011). Pode ainda ser adicionada solução antibiótica, por exemplo, 100U/ml penicilina e 100 mg/ml de estreptomicina, para

minimizar o risco de contaminação do tecido durante o transporte e armazenamento do tecido (KERKIS *et al.*, 2008; SUCHÁNEK *et al.*, 2011).

As etapas de processamento descritas a seguir forma baseadas principalmente em 5 relevantes referências bibliográficas: MIURA *et al.* (2003), KERKIS *et al.* (2006), PERRY *et al.* (2008), SEO *et al.* (2008), ARORA *et al.* (2009), SUCHÁNEK *et al.* (2010).

Os dentes de leite podem ser submetidos a processo de desinfecção com lavagem em solução fosfato tamponada, essencialmente a solução de transporte e armazenamento do tecido recém-coletado, contendo solução antibiótica a 10%. A lavagem deve ser realizada três vezes, podendo ser feita uma última lavagem em meio sem antibiótico (KERKIS *et al.*, 2008). A lavagem do tecido também pode ser realizada em 1% de povidoneiodine (PVP-I) durante 2 minutos e imersão, em tiosulfato de sódio a 0,1% em PBS durante 1 minuto, lavagem final em PBS estéril, sem antibiótico (PERRY *et al.*, 2008). Os procedimentos devem ser executados em capela de fluxo laminar esterilizada, observando o uso de luvas de procedimento e avental.

As raízes dos dentes devem ser separadas a partir da coroa para revelar a polpa dentária, sendo utilizado forceps ou escavador dental. A polpa dentária deve ser fracionada e colocada em placa de Petri estéril com solução fisiológica. Existe a opção de obter células da polpa dentária por digestão enzimática (MIURA *et al.*, 2003; SEO *et al.*, 2008; ARORA *et al.*, 2009; SUCHÁNEK *et al.*, 2010), ou por explante (KERKIS *et al.* 2006).

Na obtenção de células por digestão enzimática o tecido é digerido com colagenase tipo I (3mg/ml) e dispase (4mg/ml) por 30 minutos a 1 hora, a 37 °C (SEO *et al.*, 2008; MIURA *et al.*, 2003). Como alternativa pode ser usado colagenases I e II, e termolisina como protease neutra, durante 40 minutos (PERRY *et al.*, 2008). Uma vez que

a digestão seja finalizada, deixar em Meio Mínimo de Eagle (MEM), com 15% de Soro Fetal Bovino (SFB) para neutralizar a ação enzimática (KERKIS *et al.*, 2006; SEO *et al.*, 2008).

Posteriormente a digestão enzimática as células podem ser obtidas com centrifugação a 600 g (2.000 rpm, durante 5 minutos). O pellet celular pode ser filtrado, em filtro de 70 µm, para se obter suspensões de células isoladas, não sendo esta uma etapa obrigatória (SUCHÁNEK *et al.*, 2010).

Uma alternativa ao método de isolamento enzimático é o método de explante. Neste caso as polpas dentárias são tratadas com enzimas proteolíticas de ampla ação, como a tripsina / EDTA 0,25% por até 30 minutos (ARANY, *et al.*, 2014). As polpas são então mantidas em condição de cultura das células, como descrito a seguir, até que as células migrem a partir das margens das polpas dentárias.

As células obtidas devem ser cultivadas em um Meio Mínimo de Eagle (MEM), suplementado com 15% de Soro Fetal Bovino (SFB), 0,1 µM de ácido ascórbico 2-fosfato, 100U/ml de penicilina e 100 mg/ml de estreptomicina, e incubadas a 37 ° C e 5% de CO₂ (SEO *et al.*, 2008). As células devem ser contadas em Câmara de Neubauer com solução de 0,2% de Azul de Tripán, para verificação da viabilidade celular. As culturas devem ser observadas aderidas à placa de cultura após 24h, e o meio de cultura trocado para a eliminação das células não aderentes (SEO *et al.*, 2008; ARORA *et al.*, 2009).

As culturas devem ser monitoradas diariamente, para verificar a presença de contaminação, e em caso de contaminação positiva as culturas devem ser imediatamente descartadas. As células não contaminadas, mas não aderentes à placa de cultura devem ser removidas junto com a troca de meio, sendo realizada a substituição deste meio nos primeiros dias de cultura (PERRY *et al.*, 2008; SUCHÁNEK *et al.*, 2010). As células

obtidas por este processo são dependentes de ancoragem e devem se apresentar como pequenas colônias inicialmente, chegando a colônias de 50 células entre 5 e 7 dias de cultura, quando deve ser feita a passagem, ou repique, das células, com 0.25% tripsina / 1mM EDTA (Invitrogen, Carlsbad, CA), (PERRY *et al.*, 2008; SUCHÁNEK *et al.*, 2010).

O monitoramento do comportamento celular deve ser realizado com a manutenção das culturas. Deve ser efetuada a troca de meio de cultura (descrito acima) três vezes por semana (PERRY *et al.*, 2008). As passagens seguintes devem ser efetuadas com 70% da confluência da monocamada, em média a cada 98,7 hs (SUCHÁNEK *et al.*, 2010). Deve ser obtido o tempo de duplicação celular de aproximadamente 41,3 horas (21,3–97,3 horas) a ser feito com o monitoramento (SUCHÁNEK *et al.*, 2010).

As células apresentam morfologia alongada, com processos celulares inicialmente. Com as passagens subsequentes as células adquirem morfologia mais diferenciada, tipo fibroblasto, e se organizam em monocamadas (SUCHÁNEK *et al.*, 2010).

Para o congelamento e descongelamento das células podem ser utilizados protocolos de rotina para a manutenção de diferentes linhagens celulares. Devem ser congeladas passagens iniciais das culturas, utilizando meio de cultura com 10 % Dimetilsulfóxido (DMSO). Para tanto as células devem ser ressuspensas com tripsina EDTA 0,25 % e centrifugadas a 1.000rpm, durante 5 minutos. As células devem ser ressuspensas no meio de congelamento, sendo recomendável utilizar quantidades de $0,5 \times 10^6$ a $1,5 \times 10^6$ células / ml para cada amostra a ser congelada (PERRY *et al.*, 2008). As amostras devem ser refrigeradas gradativamente até serem estocadas em nitrogênio líquido (-196 °C).

Para o descongelamento as amostras devem ser submetidas a banho a 37 °C, assim que removidas do nitrogênio líquido. O meio de cultura deve ser adicionado e as células devem ser submetidas ao processo de centrifugação, para remoção do meio de congelamento (1.000rpm, durante 5 minutos). Após este processo o pellet celular deve ser ressuspenso em meio de cultura e as células devem ser mantidas nas condições descritas acima (PERRY *et al.*, 2008).

A presença sabida de células da linhagem mesenquimal na polpa do dente decíduo, aliada a facilidade de sua obtenção em comparação a outras fontes da linhagem mesenquimal, implica em que esta fonte de células mesenquimais seja uma estratégia interessante no tratamento de futuras doenças crônico-degenerativas. Além disso, as pesquisas demonstram sua alta capacidade de proliferação e plasticidade como citado anteriormente.

Alguns exemplos expressivos do uso terapêutico que as CTs mesenquimais de medula relatados recentemente abordam um amplo espectro de indicações, incluindo a reparação cardiovascular, tratamento de fibrose pulmonar, lesão da medula espinhal, osso e reparação da cartilagem (SCHÄFFLER *et al* 2007).

Apesar dos estudos já efetuados quanto à utilização, coleta, identificação, cultura e criopreservação de CTs do dente decíduo, os aspectos práticos quanto à obtenção destes tecidos, tais como: o tempo limite decorrido a partir da extração do dente para sua utilização; as condições em que o dente deve ser armazenado antes do processamento; o melhor processo para a separação e cultura das células, são de fundamental importância em virtude do potencial que estas células têm para aplicação em tratamentos.

A análise crítica dos trabalhos mencionados resultou no estabelecimento de um Protocolo de Obtenção, Isolamento e Cultura de Células-Tronco obtidas a partir de

Dentes Decíduos Esfoliados Humanos (Anexo 1). Este protocolo foi testado pela aluna Débora Carajiliascov Ferraraz, até a etapa de congelamento celular, tendo sido obtidas CTs viáveis, mantidas em cultura por 16 dias.

As etapas seguintes de descongelamento e caracterização das CTs correspondem à parte prática desta Monografia.

IV.2. Descongelamento e Cultura: Caracterização Morfológica

Foram descongeladas duas amostras celulares, tendo sido obtidos 2×10^6 células/ml em cada amostra. As células descongeladas foram inoculadas em garrafa de cultura de 25cm^2 , com meio de cultura, e incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO_2 para adesão e proliferação celular. Foi obtida a viabilidade de 85% e 89% para as amostras A e B respectivamente após o descongelamento. Ambas as mostras foram acompanhadas por microscopia de luz, com contraste de fase, no entanto o registro fotográfico apresentado corresponde às amostras A. Não houve alteração das observações em relação a amostra B.

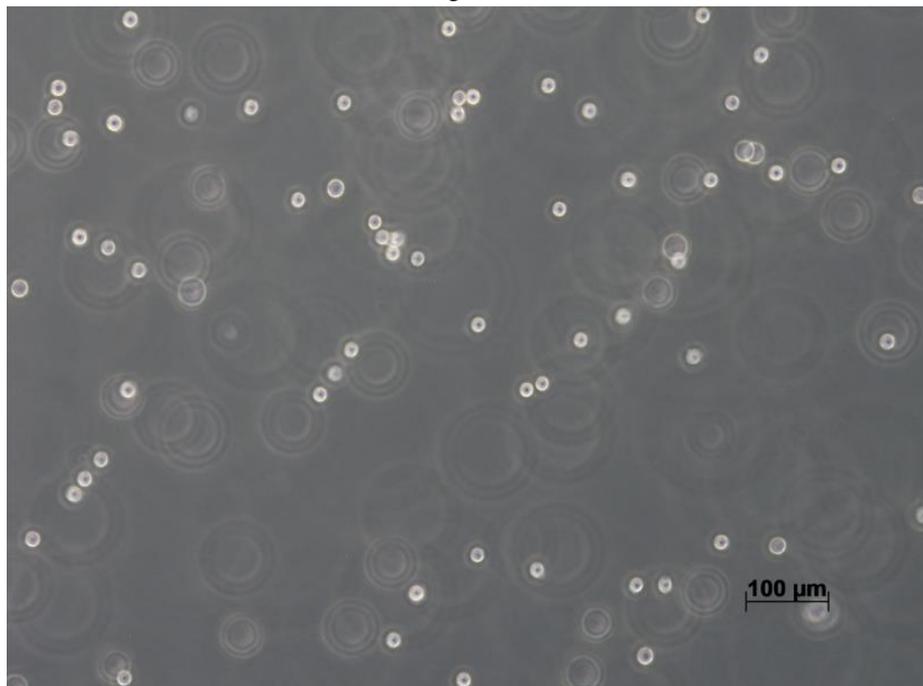
As CTs, após adesão à superfície plástica, apresentaram uma forma inicial ovoide (figura 8), que evoluiu durante as primeiras 24 horas para uma forma tipo fibroblasto, que se manteve até a confluência (Figura 9). Foi observada a adesão celular nas primeiras duas horas de cultura (Figuras 9 e 10), sendo que as células deixaram a morfologia arredondada, típica após o processo de descongelamento ou mesmo tripsinização, e adquiriram morfologia inicialmente poligonal e em seguida fusiforme, nas primeiras 24 horas de cultura (Figura 11), sendo mantida a morfologia preferencialmente fusiforme nos tempos seguintes de cultura (Figura 12). A monocamada se tornou confluenta após 4 dias em cultura (Figura 13), tendo sido observada a sobreposição de células até o

momento do repique no sétimo dia de cultura. Após o repique as células adquiriram o mesmo padrão de comportamento.

Ao longo das trocas de meio para a manutenção da cultura, as CT aderentes foram selecionadas, enquanto as células suspensas no meio de cultura foram descartadas.

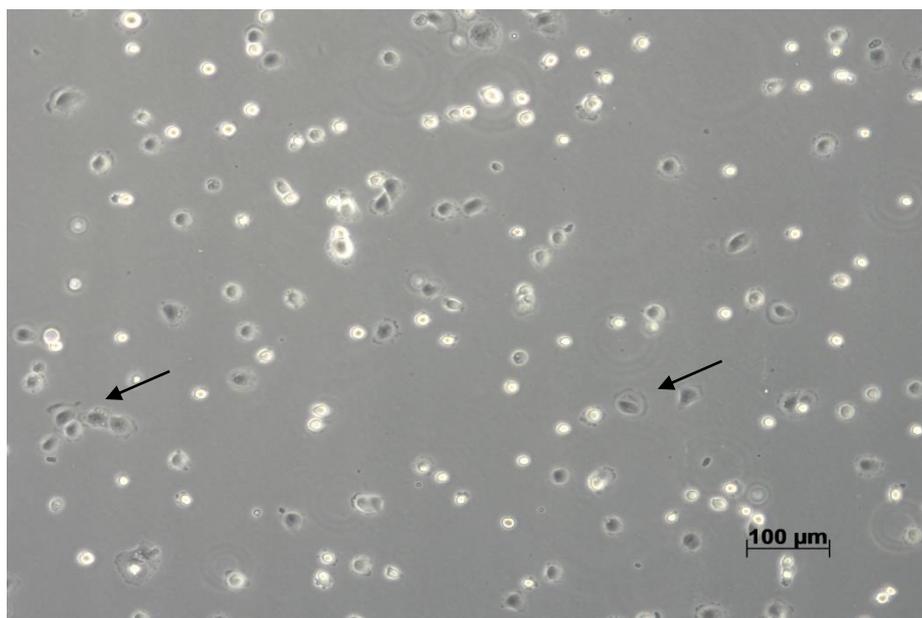
Após 7 dias de cultura, foi realizada a tripsinização das células, resultando em nova passagem. As células foram mantidas por mais 3 dias em cultura, até a subconfluência da monocamada. O acompanhamento por microscopia de luz com contraste de fase da cultura de CTs de dentes decíduos pode ser observado nas Figuras 14 a 15.

Figura 8: Células espalhadas, ainda em forma arredondada, em suspensão logo após o descongelamento.



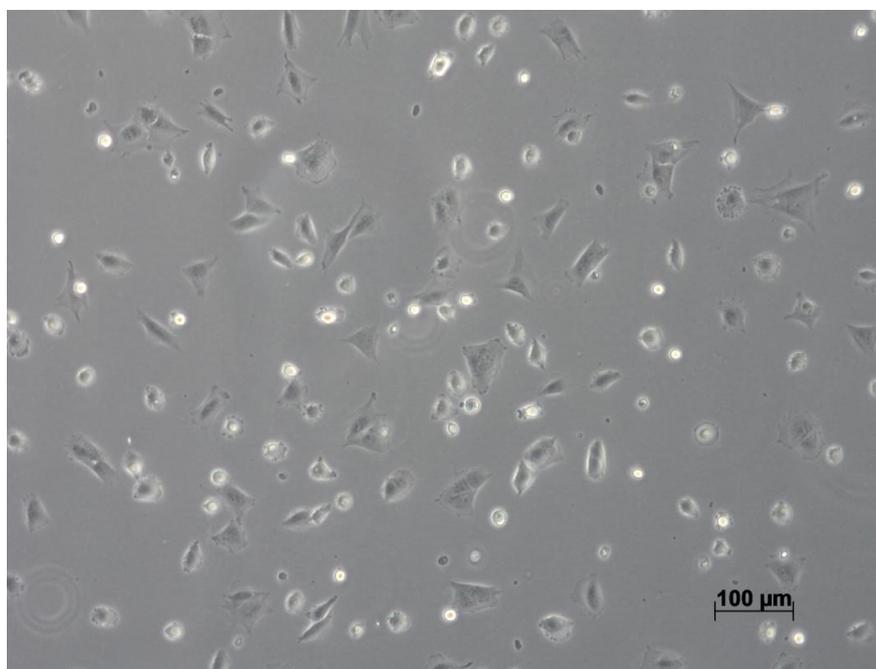
Fonte: O autor.

Figura 9: Células em processo de adesão (seta), em suspensão 1 hora após o descongelamento. Já podem ser observadas células em adesão.



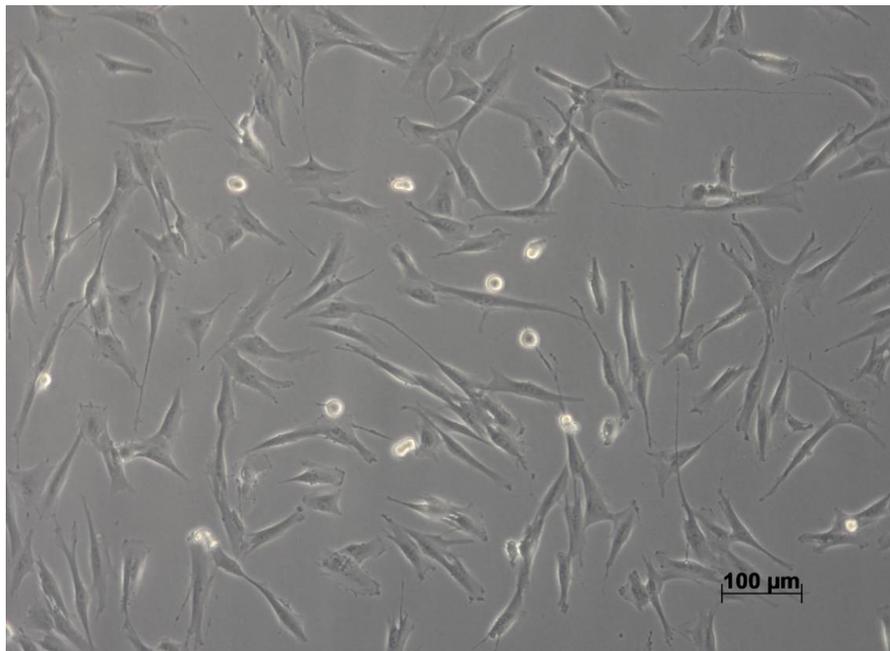
Fonte: O autor

Figura 10: Células em adesão, após 2 horas do descongelamento. Poucas células em suspensão são observadas.



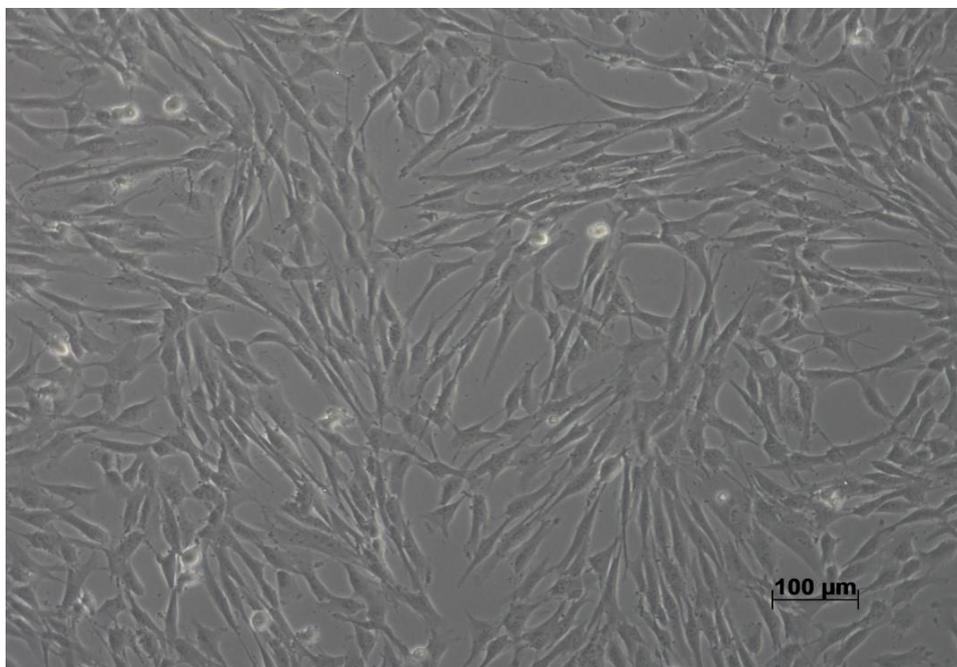
Fonte: O autor

Figura 11: Células alongadas, poligonais e fusiformes, início da confluência após 24 horas de cultura.



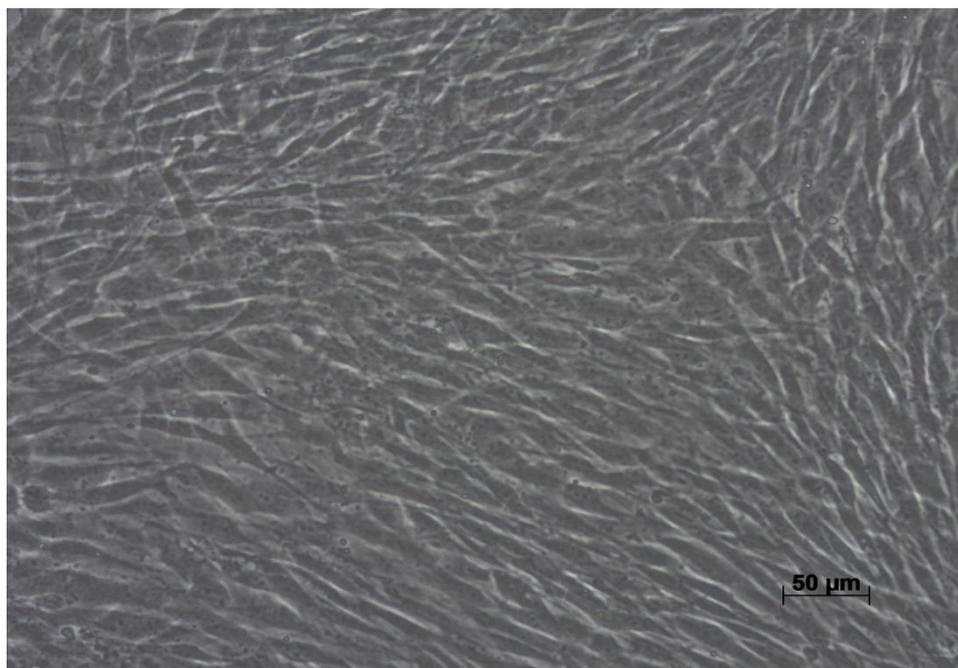
Fonte: O autor.

Figura 12: Monocamada após 48 horas, células alongadas.



Fonte: O autor.

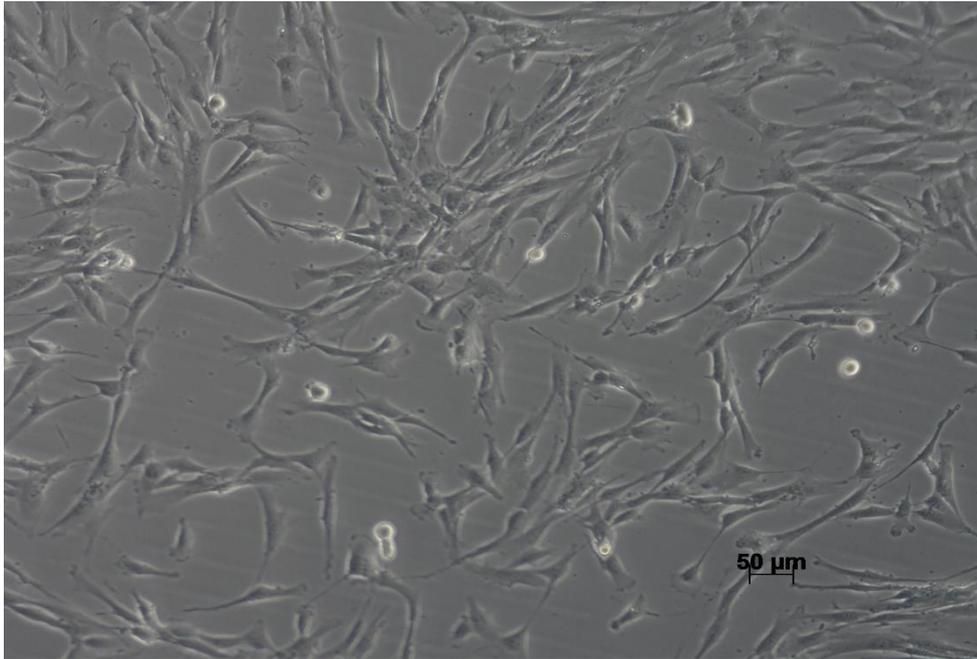
Figura 13: Confluência da cultura celular após 96 horas, 4 dias, com células alongadas, e sobreposição de células.



Fonte: O autor.

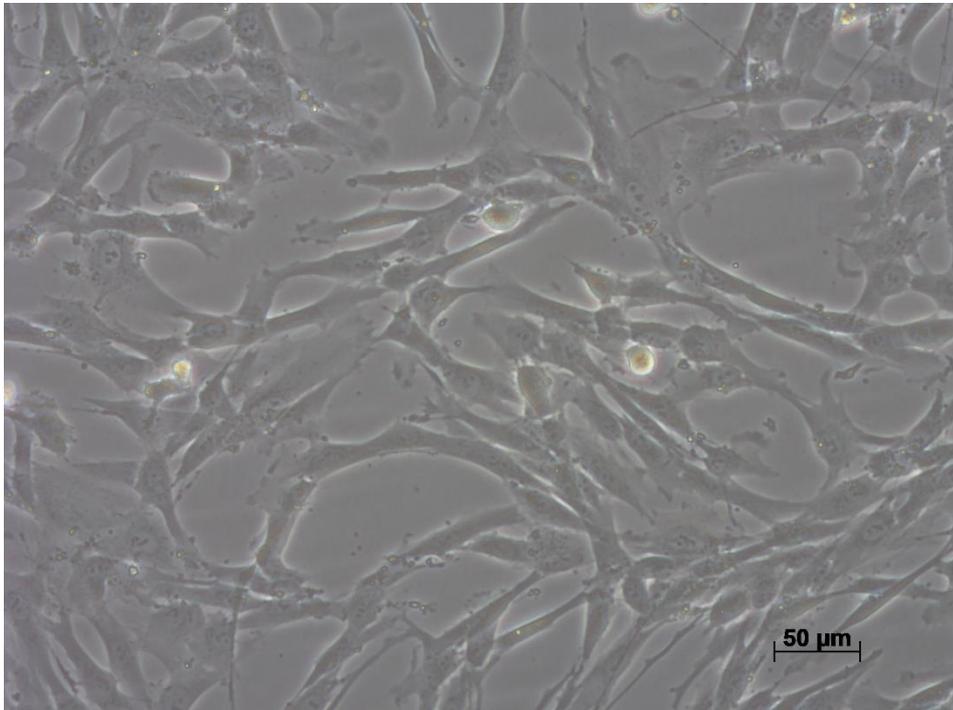
No sétimo dia foi feito o repique para a quarta passagem das células que apresentavam confluência acima de 80% com a tripsinização da monocamada e foi feita a troca do meio completo a cada três dias. Foi feito novamente o acompanhamento por microscopia de luz com contraste de fase da cultura de CTs de dentes decíduos podendo ser observado nas Figuras 14 e 16.

Figura 14: A monocamada, após repique com 7 dias de cultura, já apresentando células alongadas, em semi-confluência.



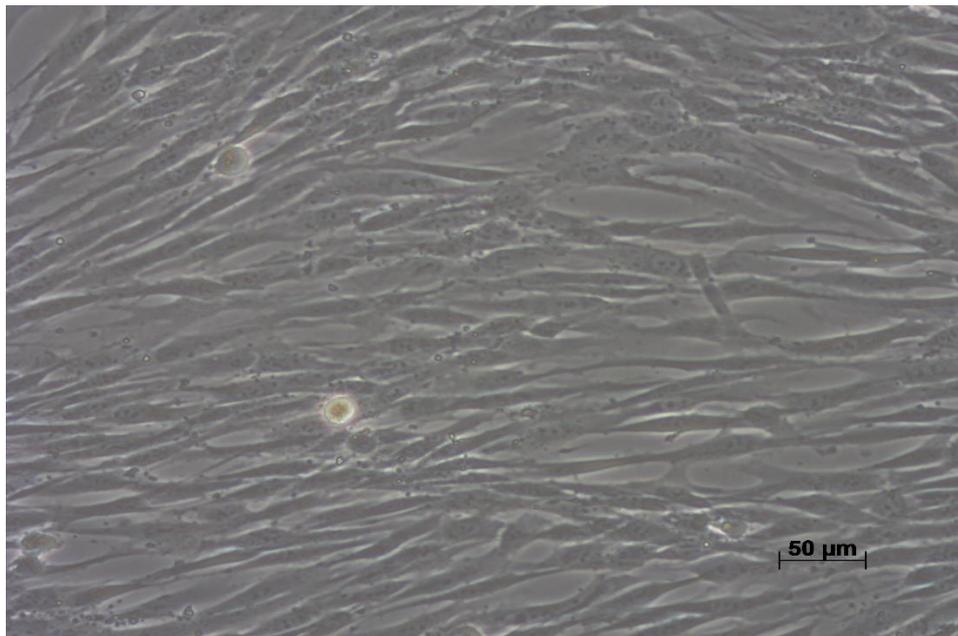
Fonte: O autor.

Figura 15: Monocamada após 8 dias de cultura, já apresentando aumento da confluência.



Fonte: O autor.

Figura 16: Confluência da cultura celular após 9 dias de cultura, com células alongadas, e sobreposição de células.



Fonte: O autor.

As análises morfológicas permitiram identificar que as células apresentaram adesão ao plástico obedecendo o primeiro critério da ISCT (SILVA *et al.*, 2012) e sua morfologia apresenta a forma alongada, semelhante ao fibroblasto conforme DOMINICCI, (2006).

Diferentes linhagens celulares podem ser obtidas através de mudanças no meio de cultivo celular. Se as culturas forem obtidas com preparação não selecionada, colônias de células com morfologia semelhante às células epiteliais ou endoteliais podem se estabelecer. Geralmente estas células desaparecem durante o curso de sucessivas passagens celulares e são observadas as células tipo fibroblastos. Se a presença destas células for expressiva, a cultura pode ser submetida a tripsina por cinco minutos, para que somente as células de interesse sejam isoladas uma vez que as células endoteliais ou epiteliais aderem à placa de cultura (SILVA *et al.*, 2012).

IV.3. Citometria de Fluxo

A caracterização das células foi feita utilizando-se a citometria de fluxo para identificar os marcadores indicados, em associação a análise da morfologia e comportamento das células durante a cultura. Foram testadas as amostras A e B que não apresentaram diferença de resultado, sendo apresentado os resultados da amostra A.

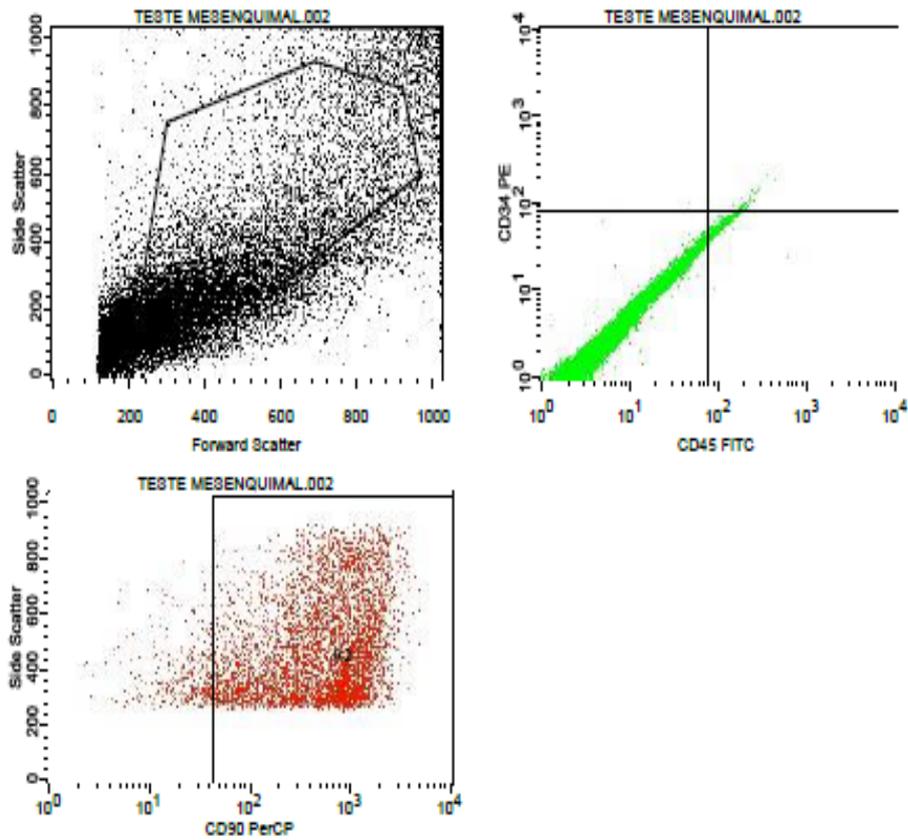
A caracterização das células cultivadas, como sendo CTs, deve envolver marcadores moleculares específicos. Uma caracterização bastante completa de marcadores foi realizada por SUCHÁNEK *et al.* (2010). Foi identificada a presença fortemente positiva de CD44 (91.7 %), CD73 (82.3 %), CD90 (96.5 %), CD117 (96.2 %), CD166 (74.3 %) e HLA I (88.3 %); a presença moderada de CD29 (67.0 %), CD105 (49.1 %) e a presença mesmo que fraca de CD45 (13.2 %), CD63 (35.1 %) e CD71 (36.6 %). As células foram negativas para CD18 (0.1 %), CD31 (0.0 %), CD34 (0.1 %), CD49d (0.5 %), CD49e (3.5 %), CD106 (0.0 %), CD133 (3.9 %), CD146 (1.7 %), CD184 (1.3 %), CD197 (0.2 %) e HLA II (0.4 %). Para DOMINICI *et al* (2006), em seu trabalho de caracterização de CT de medula, pelo método de citometria de fluxo, deve apresentar pelo menos 3 marcadores positivos e 2 negativos com um valor igual ou maior que 95% da população de células mesenquimais devem expressar CD105, CD73 e CD90. Devem também expressar valores menores ou iguais que 2% para CD45, CD 34, CD14, ou CD11b, CD79a ou CD19 E JLA classe II. Em nossa avaliação pelo citômetro de fluxo foram utilizados os marcadores positivos CD105 e CD90, e marcadores negativo CD34 e CD45.

Segundo DOMINICCI (2006), os resultados devem mostrar baixos níveis na expressão de antígenos CD34 e CD45, que por serem marcadores de células hematopoiéticas não devem aparecer em CTs mesenquimais. Foram observados altos

níveis na expressão dos antígenos CD90, conforme esperado para CTs mesenquimais. No entanto foram observados baixos níveis na expressão dos antígenos CD105 conforme figura 17 e 18 respectivamente.

A homogeneidade encontrada da população de células cultivadas do dente decíduo, representada pela área delimitada pelo polígono (Figura 19), mostra as células consideradas positivas para o perfil analisado pela citometria de fluxo e a alta concentração desses eventos demonstra a homogeneidade da população das células analisadas.

Figuras 17: 1. São citados todos os eventos; 2. Mostra CD34 e CD45 negativos; 3. A área R2 mostra confluência de 93,50% de CD 90.



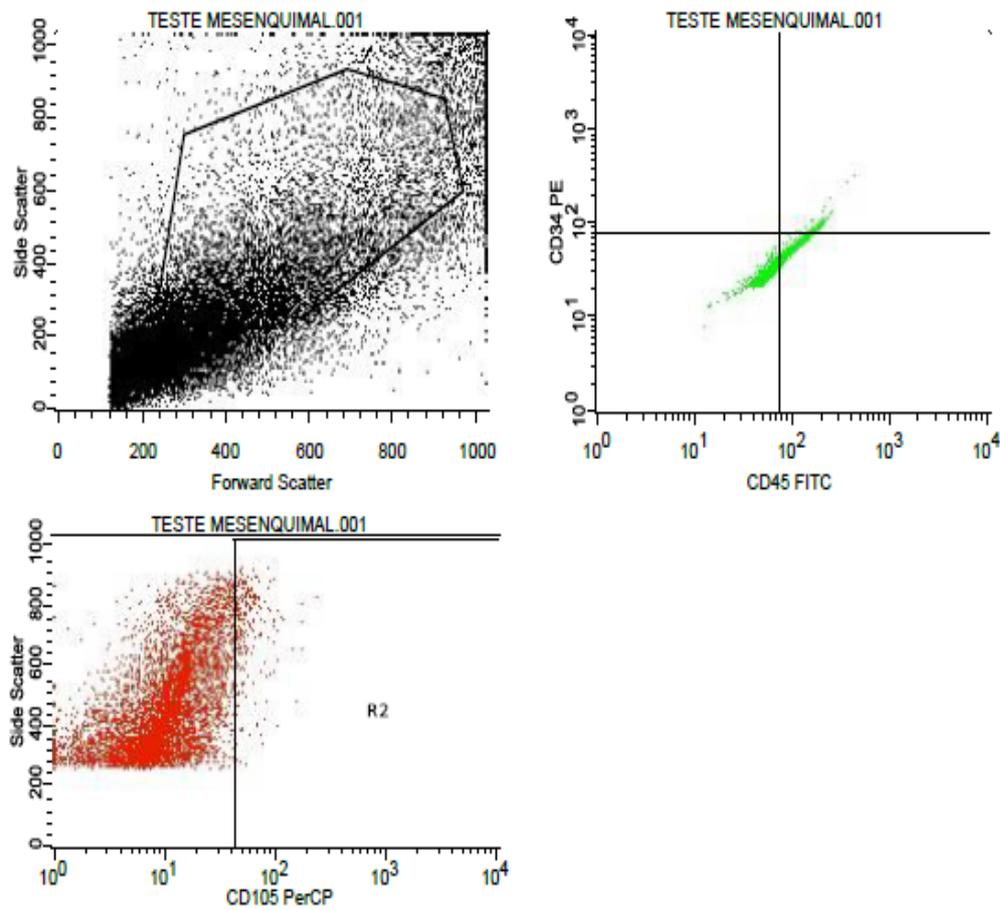
Region Statistics

File: Vanderiel Polpa Log Data Units: Linear Values Sample
 ID: TESTE POLPA DE DENTE DE LEITE
 Tube: Untitled Panel: Untitled Acquisition Tube List
 Acquisition Date: 29-March-2018 Gate: G1
 Gated Events: 5065 Total Events: 30000
 X Parameter: CD90 PerCP (Log) Y Parameter: Side Scatter (Linear)

Region	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean	Px,Py
R1	5065	100.00	16.88	734.11	411.18	472.40	444.47	1,2
R2	4736	93.50	15.79	783.42	505.48	478.58	450.02	5,2

Fonte: O autor.

Figura 18: 1. São citados todos os eventos; 2. Mostra CD34 e VC45 negativos; 3. A área R2 mostra confluência de 3,99% de CD 105.



Region Statistics

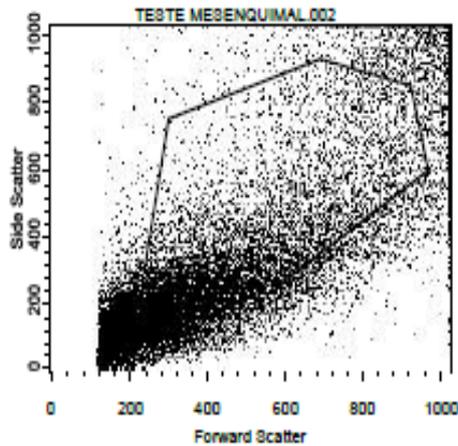
TESTE Vanderlei Polpa de dente Log Data Units: Linear Values Sample ID: TESTE MESENQUIMAL Patient ID:

Tube: Untitled Panel: Untitled Acquisition Tube List
 Acquisition Date: 29-March-2018 Gate: G1
 Gated Events: 6263 Total Events: 30000
 X Parameter: CD90 PerCP (Log) Y Parameter: Side Scatter (Linear)

Region	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean	Px,Py
R1	6263	100.00	20.88	13.66	9.77	462.18	437.33	1, 2
R2	250	3.99	0.83	58.90	55.98	718.28	699.93	5, 2

Fonte: O autor.

Figura 19: Grafico do tamanho em função da granulidade



Fonte: O autor.

Os resultados obtidos na citometria de fluxo apresentaram baixa expressão de CD105, aliado a falta do marcador CD73, não disponível no momento da análise, o que poderia corroborar a positividade da marcação. Novos ensaios estão previstos para continuidade das culturas, sua caracterização e potencial de diferenciação, assim como a repetição do resultado de CD105 com novos reagentes.

As CTs obtidas de dentes decíduos constituem uma população celular heterogênea, a partir da polpa dentária. A caracterização destas células como mesenquimais seguem protocolos descritos para células de outras fontes, sendo que não há marcadores específicos para estas células (SUKARAWAN, 2016).

Portanto, os três critérios para definir as CTs mesenquimais, aderência ao plástico (SILVA *et al.*, 2012), baixa expressão de CD45 CD34 que são marcadores de CT hematopoiética primitiva e alta expressão de CD105, CD90 E CD73 (DOMINICCI 2006), apesar de inconclusivos no que tange os marcadores CD105 e CD73, mostram as características necessária para identificar CTs, a plasticidade de se diferenciar em células

tais como osso, gordura, cartilagem (PEREIRA *et al.*, 1995) e em células neurais (PITTINGER *et al.*, 1999; SANCHEZ-RAMOS *et al.*, 2000; MEIRELLES *et al.*, 2006; MONTEIRO, 2009), será avaliada em novos ensaios.

IV.4. Aplicação clínica

O levantamento bibliográfico resultou em três ensaios clínicos relatos pelo site PUBMED, apresentando principalmente a potencialidade de aplicação clínica ou o resultado de protocolos experimentais, envolvendo modelos animais. No site CLINICAL TRIALS foram encontrados 825 ensaios clínicos abrangendo 831 condições ou doenças abrangidas. Não foi observado protocolo de aplicação clínica em humanos com dados conclusivos. Esta realidade é condizente com os dados apresentados também para CTs mesenquimais de forma geral (SUMMER e FINE, 2008).

Como citado anteriormente, a facilidade de obtenção de dentes decíduos, o isolamento e cultivo das CTs obtidas a partir destes são fatores que favorecem a aplicação clínica deste tipo celular.

Os primeiros estudos realizados com CTs do dente decíduo visavam a reconstrução de defeitos craniofaciais. Mendonça Costa e colaboradores (2008), em estudo realizado com roedores, concluíram que as CTs de dentes decíduos constituem um modelo promissor para a reconstrução de defeitos cranianos em cirurgias craniofaciais, demonstrando ainda que elas podem se diferenciar eficientemente em adipócitos e células musculares esqueléticas, o que, junto com a formação do osso, são elementos essenciais para a reconstrução de tecidos neste tipo de aplicação. Em estudo pré-clínico sobre a recuperação óssea de defeitos orofaciais foi comprovada a eficácia na utilização de CTs do dente decíduo, indicando ainda que a passagem dos ensaios experimentais para ensaios

com humanos seja rápida (BHATT e LE, 2009; ZHENG *et al.*, 2009; HYNES *et al.*, 2012; ZHU *et al.*, 2012). Paralelamente diversos estudos propõe a utilização de CTs mesenquimais em ortopedia, células obtidas de outras fontes, como a medula óssea. O tratamento de osteoporose e das lesões decorrentes desta é um importante potencial de aplicação clínica para as células obtidas para dente de leite, uma vez que se conhece o potencial de diferenciação osteogênica destas (CANCEDDA *et al.*, 2003; BYDLOWSKI *et al.*, 2009).

O transplante de tecidos produzidos a partir de CTs da polpa do dente decíduo para a reconstrução do epitélio da córnea também se mostrou promissor, o que representa uma alternativa válida para a reconstrução da superfície ocular em casos de deficiência límbica bilateral com importantes implicações clínicas, na área de oftalmologia (GOMES *et al.*, 2010).

Hepatócitos (células hepáticas principais) foram induzidos a partir das CTs do dente decíduo, e foi verificada que além destas produzirem ureia, uma quantidade significativa de glicogênio foi encontrada armazenado, indicando que estas CTs adquiriram características morfológicas e funcionais dos hepatócitos sob condições específicas de cultura. Este estudo propõe a aplicação clínica destas células para o reparo de lesões hepáticas (ISHKITIEV *et al.*, 2010).

Os dados obtidos no trabalho de Freitas (2011) demonstram que o transplante de CTs da polpa de dente, apresentam potencial terapêutico em modelo experimental de epilepsia uma vez que o transplante foi capaz de reduzir a manifestação das crises espontâneas recorrentes em animais com epilepsia induzida. Ainda na área de neurologia o potencial de reparo e regeneração do tecido nervoso para as CTs do dente de leite

apresentam dados interessantes em casos de isquemia cerebral. A migração e diferenciação em células neuronais progenitoras, vasculogênese induzida, e melhora em danos cerebrais isquêmicos foram observados após oclusão permanente da artéria cerebral média, com transplante das CTs de polpa de dente em estudo experimental em ratos (INOUE *et al.*, 2011). Além de patologias e doenças degenerativas, o uso de CTs de dente decíduo foi estudado em casos de traumas que resultam em lesão aguda de medula espinhal. Foi identificada uma significativa recuperação funcional em ratos com esta lesão, demonstrando que o transplante de CTs do dente decíduo pode ser um candidato adequado para o tratamento deste tipo de trauma, bem como doenças degenerativas neuronais (TAGHIPOUR *et al.*, 2011).

Outras áreas em que se conhecem promissores resultados experimentais com a utilização de CTs mesenquimais poderiam ter protocolos clínicos envolvendo células obtidas a partir de dentes decíduos, uma vez que as características e a plasticidade destas duas populações celulares em muito se assemelham (BYDLOWSKI *et al.*, 2009). Estas áreas incluem, entre outras: em cardiologia, para diversas cardiopatias incluindo infarto do miocárdio, doença de Chagas, e outras mio cardiopatias; em endocrinologia, para o tratamento da diabetes, substituindo a função das ilhotas pancreáticas; em urologia e nefrologia, para a substituição de células epiteliais dos túbulos renais cuja disfunção resulta em insuficiência renal aguda; em dermatologia, para o tratamento de queimaduras e feridas de difícil cicatrização, como no pé diabético; em oncologia, para o reparo de tecidos acometidos por câncer, principalmente de origem hematológica (BARRY e MURPHY, 2004; BYDLOWSKI *et al.*, 2009; ESTRELA *et al.*, 2011).

ELNA *et al* (2017) relata em sua revisão as principais áreas de estudo das CTs mesenquimais do dente decíduo que abrangem diversas áreas, tendo como principais:

- 1- Doenças neurodegenerativas: Esclerose lateral amiotrófica, doença de Parkinson e doença de Alzheimer;
- 2- Doenças autoimunes: Artrite reumatoide, Diabetes tipo 1;
- 3- Doenças cardiovasculares.

Apesar do aspecto promissor apresentado pela terapia de CTs, muitos estudos e pesquisas devem ser realizados para que sua utilização seja um procedimento confiável. As dúvidas quanto a disponibilidade tanto imediata quanto futura, envolvendo viabilidade após criopreservação, rejeição, condições de cultura, armazenamento e risco de transmissão de patógenos são cruciais para que haja segurança em seu uso.

As aplicações terapêuticas têm progredido a passos lentos se comparadas ao crescimento das pesquisas, mas apresentam um futuro promissor em regeneração de diversos tecidos mesmo levando em consideração as dificuldades no avanço das técnicas de engenharia de tecido. As pesquisas trarão ferramentas que facilitarão sua aplicação nos próximos anos.

V. CONCLUSÕES

Podemos concluir que o Protocolo de Obtenção, Isolamento e Cultura de Células-Tronco obtidas a partir de Dentes Decíduos Esfoliados Humanos definido a partir do levantamento dos dados de literatura foi eficiente para a finalidade a que se propôs.

As células obtidas do Protocolo proposto foram cultivadas com características de adesão, ou seja, células aderentes, e morfologia, fusiforme tipo fibroblasto, de CTs.

Não houve alteração da viabilidade, do comportamento, e da caracterização celular com o tratamento das polpas dentárias com 10 ou 20 minutos de tripsina previamente a cultura, tendo sido definido no Protocolo proposto o menor tempo.

A caracterização por citometria de fluxo confirmou o padrão de CTs, com a expressão positiva de CD 90, e negativa de CD34 e CD45.

VI. BIBLIOGRAFIA

ABTO - <http://www.abto.org.br/abtov03/>.

AMABILE G, MEISSNER A. **Induced pluripotent stem cells: current progress and potential for regenerative medicine.** *Trends Mol Med*, v.15, n.2, p.59-68, 2009.

ANDREWS PW. Human teratocarcinomas. *Biochim Biophys Acta*, v.948, p.17–36, 1998.

ARANY PR, CHO A, HUNT TD, *et al.* **Photoactivation of Endogenous Latent Transforming Growth Factor- β 1 Directs Dental Stem Cell Differentiation for Regeneration.** *Science translational medicine*. 2014;6(238):238ra69. doi:10.1126/scitranslmed.3008234.

ARORA V, ARORA P, MUNSHI AK. **Banking stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED): Saving for the future.** *J Clin Pediatr Dent*, v.33, n.4, p. 289–294, 2009.

ATALLAH AN, CASTRO AA. **Revisão sistemática e metanálise. Evidências para melhores decisões clínicas.** São Paulo: Lemos-Editorial, 1998.

BAER CP, **Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: update on their phenotype *in vivo* and *in vitro*.** *World J Stem Cells*, jul 2014.

BARRY FB, MURPHY JM. **Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization.** *Inter J Biochem Cell Biol*, v.36, p.568–584, 2004.

BHATT A, LE AD. Craniofacial tissue regeneration: where are we? *CDA Tissue Reg*, v.37, n.11, p.799-803, 2009.

BONGSO A, FONG CY, NG SC, RATNAM SS. **Blastocyst transfer in human *in vitro*: fertilization; the use of embryo co-culture.** *Cell Biol Int*, v.18, p.1181–1189, 1994.

BONGSO A, FONG CY, NG SC, RATNAM SS. **Isolation and culture of inner cell mass cells from human blastocysts.** *Hum Reprod*, v.9, p.2110–2117, 1994.

BRASIL. Lei n. 11.105, de 24 de março de 2005. **Dispõe sobre a política de biossegurança.** Lex: publicada no DOU, de 28.03.2005. Disponível em: <<http://planalto.gov.br>>. Acesso em 20 jul. 2011.

BRASIL. Lei nº 11.105/05, de 24 de março de 2005. **Lei de Biossegurança.** Disponível em: Acesso em: 26 abr 2013.

BRESSAN FF, MIRANDA MS, DE BEM H C, PEREIRA FTV, BINELLI M, MEIRELLES F V, **Produção de animais transgênicos por transferência nuclear como modelo de estudo biológico.** *Rev Bras Reprod Anim*, Belo Horizonte, v.32, n.4, p.240-250, out. /dez. 2008.

BYDŁOWSKI SP, DEBES AA, MASELLI LMF, JANZ FL. **Características biológicas das células-tronco mesenquimais.** *Rev Bras Hemat Hemota*, v.31, n.1, p.25-35, 2009.

CANCEDDA R, BIANCHI G, DERUBEIS A, QUARTO R. **Cell therapy for bone disease: a review of current status.** *Stem Cells*, v.21, n.5, p.610-619, 2003.

CANO MIN. A vida nas “pontas”. *Ciência hoje*, vol. 39, n.229, p.16-23, 2006.

CAPES: <http://www-periodicos-capes-gov-br.ez42.periodicos.capes.gov.br/>.

CAPLAN AI. **Why are MSCs therapeutic?** New data: new insight. *J Pathol*, v.217, n.2, p.318-324, 2009.

CASTRO AA. **Revisão sistemática e meta-análise. Compacta: temas de cardiologia**, v3, n.1, p. 5-9, jan. 2001.

CLARKE DL, JOHANSSON CB, WILBERTZ J, VERESS BE, KARLSTROM NH, LENDAHL U, FRISEN J. **Generalized potential of adult neural stem cells. Science**, v. 288, p.1660-1663, 2000.

DOMINICI M, LE BLANC K, MUELLER I, SLAPER-CORTENBACH I, MARINI FC, KRAUSE DS, DEANSRJ, KEATING A, PROCKOP DJ, HORWITZ EM. **Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement; ISCT Cytotherapy (2006) Vol. 8, No. 4, 315-317.**

EDWARDS RG, BAVISTER BD, STEPTOE PC. **Early stages of fertilization in vitro of human oocytes matured *in vitro*. Nature**, v.221, p. 632–635, 1969.

ELNA PC, SEUNG YN, SANG HP, SUKUMARAN A. **Therapeutic potential of dental stem cells. J Tissue Eng.** 2017 Jan-Dec; 8: 2041731417702531.

ESTREYLA C, ALENCAR AHG, KITTEN GT, VENCIO EF, GAVA E. **Mesenchymal stem cells in the dental tissues: perspectives for tissue regeneration. Braz Dent J**, v.22, n.2, p.91-98, 2011.

EVANS MJ, KAUFMAN MH. **Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature**, v.292, p.154-156, 1981.

FAIS LMG, REIS JMSN, SILVA RHBT, SEGALLA JCM, PINELLI LAP. **Pesquisas com células-tronco: histórico geral e aplicações nas especialidades odontológicas. Full dent sci**, v.1, n.3, p.290-297, 2010.

FREITAS DP. **Células-tronco mesenquimais derivadas da polpa de dente humano: caracterização e estudos funcionais em modelo experimental de epilepsia.** Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa, Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz. 71p. 2011.

GBT. General BioTechnology, LLC, Indianapolis, Indiana. Disponível em: www.gnrbiotech.com/. Acesso em: setembro de 2012.

GENRON - <http://ir.geron.com/news-releases/news-release-details/geron-proceed-first-human-clinical-trial-embryonic-stem-cell>. 2012.

GOMES JAP, GERALDES MONTEIRO B, MELO GB, SMITH RL, CAVENAGHI PEREIRA DA SILVA M, FORESTO N, KERKIS LA, CERRUTI H, KERKIS I. **Corneal reconstruction with tissue-engineered cel sheets composed of human immature dental pulp stem cells.** *Invest Ophthalmol Vis Sci*, v.51, n.3, p.1408-1414, 2010.

GRONTHOS S, MANKANI M, BRAHIM J, ROBEY PG, SHI S. **Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*.** *Proc Natl Acad Sci USA*, v.97, n.25, p.13625-13630, 2000.

GRONTHOS S, BRAHIM J, LI W, FISHER LW, CHERMAN N, BOYDE A, DENBESTEN P, ROBEY PG, SHI S. **Stem cell properties of human dental pulp stem cells.** *J Dent Res*, v.81, n.8, p.531-535, 2002.

HORWITZ EM, LE BLANC K, DOMINICI M, MUELLER I, SLAPER-CORTENBACHI, MARINI FC, KRAUSE DS, KEATING A, **Classification of the nomenclature for MSC.** The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v.7, n.5, p.393-395, 2005.

HYNES K, MENICANIN D, GRONTHOS S, BARTOLD PM. **Clinical utility of stem cells for periodontal regeneration;** **Periodontology 2000**, v.59, n.1, p.203-227, 2012.

INOUE T, SUGIYAMA M, HATTORI H, WAKITA H, WAKABAYASHI T, UEDA M. **Stem cells from human exfoliated deciduous teeth-derived conditioned medium enhances recovery of focal cerebral ischemia in rats;** **Tissue Eng Part A.** [Epub ahead of print], 2012.

IOMSA. Indiana Oral and Maxillofacial Surgery Associates, Indianapolis, Indiana. Disponível em: www.iomsa.com/. Acesso em: setembro de 2012.

IPCT - <http://celulastroncors.org.br>. Acesso em 15/02/2018.

ISHKITIEV N, YAEGAKI K, CALENIC B, NAKAHARA T, ISHIKAWA H, MITIEV V, HAAPASALO M. **Deciduous and permanent dental pulp mesenchymal cells acquire hepatic morphologic and functional features *in vitro*.** **J Endod**, v.,36, n.3 p.469–474, 2010.

JESUS BB, MARINHO SP, BARROS S, FRANCO AS, VALE CA, CARVALHO T, FONSECA MC. **Silencing of the incRNA Zeb2-NAT facilitates reprogramming of aged fibroblasts and safeguards stem cell pluripotency.** **Nature Communications** 9, article number:94 2018.

KERKIS I, AMBROSIO CE, KERKIS A, MARTINS DS, ZUCCONI E, FONSECA SAS, CABRAL RM, MARANDUBA CMC, GAIAD T, MORINIAC, VIEIRA NM, BROLIO MP, SANT'ANNA OA, MIGLINO MA, ZATZ M. **Early transplantation of human immature dental pulp stem cells from baby teeth to golden retriever muscular dystrophy (GRMD) dogs: Local or systemic?** *J Transl Med*, v.6, p.35, 2008.

KERKIS I, KERKIS A, DOZORTSEV D, STUKART-PARSONS GC, MASSIRONI SMG, PEREIRA LV, CAPLAN AI, CERRUTI HF. **Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing oct-4 and other embryonic stem cell markers.** *Cells Tissues Organs*, v.184, p.105–116. 2006.

KIMMELMAN J, HYUN I, BENVENISTY N, CAULFIESD T, HESLOP H E, MURRY C E, SIPP D, STUDER L, SUGARMAN J, DALEY G Q; **Policy: Global standards for stem cell research**, 12 May 2016.

KLEINSMITH LJ, PIERCE JR GB. **Multipotentiality of single embryonal carcinoma cells.** *Cancer Res*, v.24, p.1544–1551, 1964.

KRAUSE DS. **Plasticity of marrow-derived stem cells.** *Gene Therapy*, v.9, p.754-758, 2002.

LEMISCHKA IR. **Stem cell biology: a view toward the future.** *Ann NY Acad Sci*, v.1044, p.132-138, 2005.

LITTLE MT, STORB R. **History of haematopoietic stem-cell transplantation.** *Nature Reviews Cancer*, v.2, p.231-238, 2002.

- LIU ZJ, ZHUGE Y, VELAZQUEZ OC. **Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells.** *J Cell Biochem.*v.106, n.6, p.984-991, 2009.
- LIZIER NF, KERKIS A, GOMES CM, HEBLING J, OLIVEIRA CF, CAPLAN AI, KERKIS I. **Scaling-up of dental pulp stem cells isolated from multiple niches.** *PLoS ONE*, v.7, n.6.: e39885. doi: 10.1371/journal.pone.0039885, 2012.
- LOEFFLER M, ROEDER I. **Tissue stem cells: definition, plasticity, heterogeneity, self-organization and models--a conceptual approach.** *Cells Tissues Organs*, v.171, n.1, p.8-26, 2002.
- MARTIN GR. **Teratocarcinomas and mammalian embryogenesis.** *Science*, v.209, p.768–776, 1980.
- MASTERS, J. R. **TIMELINE HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly.** *Nature Reviews Cancer*. 2 (4): 315–319. 2002.
- MEIRELLES LS, CAPLAN AL, NARDI NB. **Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues.** *J Cell Sci*, v. 119, p.2204-2213, 2006.
- MENDONÇA COSTA A, BUENO DF, MARTINS MT, KERKIS I, KERKIS A, FANGANIELLO RD, CERRUTI H, ALONSO N, PASSOS-BUENO MR. **Reconstruction of large cranial defects in nonimmunosuppressed experimental design with human dental pulp stem cells.** *J Craniof Surg*, v.19, n.1, p.204-2010, 2008.
- MINGUELL JJ, CONGET P, ERICES A. **Biology and clinical utilization of mesenchymal progenitor cells.** *Braz J Med Biolog Res*, v33, p.881-887, 2000.

MIURA M, GRONTHOS S, ZHAO M, LU B, FISHER LW, ROBEY PG, SHI S. **SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. Proc Natl Acad Sci USA**, v.100, n.10, p.5807-5812, 2003.

MONTEIRO BS, NETO NMA, CARLO RJD. **Células-tronco mesenquimais, Ciencia Rural, Santa Maria, online**, v.40, n.1, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/cr/v40n1/a409cr1878.pdf>. Acesso em: setembro de 2012.

MORRISSON SJ, SHAN NM, ANDERSON DJ. **Regulatory mechanisms in stem cell biology. Cell**, v.88, p.287-298. 1997.

MOTA ACA, SOARES MBP, SANTOS RR. **Uso de terapia regenerativa com células da medula óssea em doenças cardiovasculares: perspectiva do hematologista. Rev Bras Hematol Hemoter**, v.27, n.2, p.126- 132, 2005.

MULLER, VS. **Células-tronco na regeneração muscular e nervosa. UFRGS**, 2013.

NCBI. **National Institute of Health. In Stem Cell Information. 3. The Human Embryonic Stem Cell and the Human Embryonic Germ Cell.** 2009. Disponível em:<http://stemcells.nih.gov/info/scireport/chapter3>. Acesso em: setembro de 2012.

NEW SCIENTIST. <https://www.newscientist.com/article/dn24970-stem-cell-timeline-the-history-of-a-medical-sensation>. Acesso em novembro/2017.

NOBEL - https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2012/yamanaka-facts.html. Acesso em novembro/2017.

NYCSF - <https://nyscf.org/people/dieter-egli-phd>. Acesso em novembro/2017.

ODORICO JS, KAUFMANN DS, THONSON JA. **Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines.** *Stem Cell*, v.19, p.193-204, 2001.

PERA MF, COOPER S, MILLS J, PARRINGTON JM. **Isolation and characterization of a multipotent clone of human embryonal carcinoma cells.** *Differentiation*, v.42, p.10–23, 1989.

PERA MF, REUBINOFF B, TROUNSON A. **Human embryonic stem cells.** *J Cell Sci*, v.113, n.1, p.5–10, 2000.

PEREIRA LV. A importância do uso das células-tronco para a saúde pública.
Ciênc Saúde Coletiva, v.13, n.1, p. 7-14, 2008.

PEREIRA RF, HALFORD, KW, O'HARA MD, LEEPER DB, SODOLOV BP, POLLARD MD, BAGASRA O, PROCKOP DJ. **Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursors cells for bone, cartilage and lung in irradiated mice.** *Proc Natl.Acad Sci.USA*, v.92, p.4857-4861, 1995.

PERRY BC, ZHOU D, WU X, YANG FC, BYERS MA, CHU TM, HOCKEMA JJ, WOODS EJ, GOEBEL WS. **Collection, cryopreservation, and characterization of human dental pulp-derived mesenchymal stem cells for banking and clinical use.** *Tissue Eng Part C Methods*, v.14, n.2, p.149–156, 2008.

PITTENGER MF, MACKAY AM, BECK SC, JAISWAL RK, DOUGLAS R, MOSCA JD, MOORMAN MA, SIMONETTI DW, CRAIG S, MARSAHK DR. **Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells.** *Science*, v.284, p.143-147, 1999.

ROBEY PG. **Stem cells near the century mark.** *J Clinic Invest*, v.105, n.11, p.1489-1491, 2000.

RODRÍGUEZ-LOZANO FJ, BUENO C, INSAUSTI CL, MESEGUER L, RAMÍREZ MC, BLANQUER M, MARÍN N, MARTÍNEZ S, MORALEDA JM. **Mesenchymal stem cells derived from dental tissues.** *Int Endod J*. v.44, n.9, p.800-806, 2011.

SANCHEZ-RAMOS J, SONG S, CARDOZO-PELAEZ F, HAZZI C, STEDEFORD T, WILLING A, FREEMAN TB, SAPORTA S, JANSEN W, PATEL N, COOPER DR, SANBERG PR. **Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells *in vitro*.** *Exp Neurol*, v.164, p.247-256, 2000.

SANTOS RR, SOARES MBP, CARVALHO ACC. **Transplante de células da medula óssea no tratamento da cardiopatia chagásica crônica,** *Revista da SBMT*, v.37, n.6, p.490-495 2004.

SCHENK SL. **Das Säugetierei Künstlich befruchtet ausserhalb des Muttertieres Mittheilungen aus dem Embryologischen.** Institute der Kaiserlich-Königlichen Universität in Wien, v.1 p.107, 1878.

SEO BM, SONOYAMA W, YAMAZA T, COPPE C, KIKUIRI T, AKIYAMA K, LEE JS, SHI S. **SHED repair critical-size calvarial defects in mice.** *Oral Dis*, v.14, n.5, p.428-434, 2008.

SCHÄFFLER A, BÜCHLER C. **CONCISE REVIEW: adipose tissue-derived stromal cells-basic and clinical implications for novel cell-based therapies.** *Stem Cells*. 2007;25 818-27.

SHAMBLOTT MJ, AXELMAN J, WANG S, BUGG EM, LITTLEFIELD JW, DONOVAN PJ, BLUMENTHAL PD, HUGGINS GR, GEARHART JD. **Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells.** *Proc Natl Acad Sci USA*, v.95, p.13726–13731, 1998.

SIGMA ALDRICH. www.sigmaaldrich.com/life-science/learning-center/biogiles/biofiles-5-4/proccol-cryopresenvation-of-cell-lines. Acesso em novembro/2017

SILVA AC; PERCEGONA LS; FRANÇA AL; DOS SANTOS TM; PERINI CC; GONZÁLEZ P; REBELATTO CLK; CÂMARA NOS; AITA CAM. **Expression of pancreatic endocrine markers by mesenchymal stem cells from human adipose tissue.** *Transplantation proceedings*, October 2012, Vol.44(8), pp.2495-6

SMITH AG. **Embryo-derived stem cells: of mice and men.** *Annu Rev Cell Dev Biol*, v.17, p.435-462, 2001.

SOLTER D. **From teratocarcinomas to embryonic stem cells and beyond: a history of embryonic stem cell research.** *Nature Rev Gen*, v.7, p.319-327, 2006.

STEPTOE PC, EDWARDS RG. **Birth after the reimplantation of a human embryo.** *Lancet*, v.312, n.8085, p.366, 1978.

SUCHÁNEK J, VISEK B, SOUKUP T, EL-DIN MOHAMED SK, IVANCAKOVÁ R, MOKRÝ J, ABOUL-EZZ EH, OMRAN A. **Stem cells from a human exfoliated deciduous teeth – isolation, long term cultivation and phenotypical analysis.** *Acta Medica (Hradec Kralove)*, v.53, n.2, p.93-99, 2011.

SUKARAWAN W, NOWWAROTE N, PAVASANT P, OSATHANON T. **Basic Fibroblast Growth Factor Regulates REX1 Expression via IL-6 Stem cells isolated from Human Exfoliated Deciduous Teeth.** *Journal of Cellular Biochemistry*, volume 118, issue – November 2016.

SUMMER R, FINE A. **Mesenchymal progenitor cell research: limitations and recommendations.** *Proc Am Thorac Soc*, v.5, n.6, p.707-710, 2008.

TAGHIPOUR Z, KARBALAIE K, KIANI A, NIAPOUR A, BAHRAMIAN H, NASR-ESFAHANI MH, BAHARVAND H. **Transplantation of undifferentiated and induced human exfoliated deciduous teeth-derived stem cells promote functional recovery of rat spinal cord contusion injury model.** *Stem Cells and Development*, v.21, n.10, p.1794-1802, 2012.

TAKAHASHI K, YAMANAKA S. **Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors.** *Cell*, v.126, n.4, p.6636-6676, 2006.

THOMSON JA, ITSKOVITZ-ELDOR J, SHAPIRO SS, WAKNITZ MA, SWIERGIEL JJ, MARSHALL VS, JONES JM. **Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts.** *Science*, v.282, n.5391, p.1145-1147, 1998.

THOMSON JA, KALISHMAN J, GOLOS TG, DURNING M, HARRIS CP, HEARN JP. **Pluripotent cell lines derived from common marmoset (*Callithrix jacchus*) blastocysts.** *Biol Reprod*, v.55, p.254–259, 1996.

THOMPSON S, STERN PL, WEBB M, WALSH FS, ENGSTROM W, EVANS EP, SHI WK, HOPKINS B, GRAHAM CF. **Cloned human teratoma cells differentiate into neuron-like cells and other cell types in retinoic acid.** *J Cell Sci* v.72, p.37–64, 1984.

TILL JE, MCCULLOCH EA, SIMINOVITCH L. **A stochastic model of stem cell proliferation, based on the growth of spleen colony-forming cells.** *Proc Natl Acad Sci USA*, v.51, p.29-36. 1964.

TROUNSON AO, GARDNER DK. **Handbook of *in vitro* fertilization**, 2ND. Ed. Ed. Boca Raton, London, New York, Washington, D.C.: CRC Press. 576P. 1999.

ULLAH I, SUBBARAO RB, THO GJ, Human mesenchymal stem cells – current trends and future prospective. *Bioscience reports*, 2015.

VERFAILLIE CM. **Adult stem cells: assessing the case for pluripotency.** *Trends Cell Biol*, v.12, p.502-508, 2002.

WAGERS AJ, WEISSMAN IL. **Plasticity of adult stem cells.** *Cell*, v.116, p.639-648, 2004.

WANG J, WANG X, SUN Z, WANG X, YANG H, SHI S, WANG S. **Stem cells from human exfoliated deciduous teeth can differentiate into dopaminergic neuron-like cells.** *Stem Cells Dev*, v.4, p.1375–1383, 2010.

WATT FM, HOGAN BLM. Out of the Eden: **Stem cells and their niches.** *Science*, v.287, p.1427-1430, 2000.

YOUNG H. E., STEELET.A., BRAY R.A., HUDSON J., FLOYD J.A., HAWKINS K., THOMAS K., AUSTIN T., EDWARDS C., CUZZOURT J., DUENZL M., LUCAS P.A., AND BLACK, JR A.C. **Human Reserve Pluripotent Mesenchymal Stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors.** *Anat Rec*, v.264, p.51–62, 2001.

WEISSMAN IL. **Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities.** *Science*, v.287 n.5457, p.1442-1446, 2000.

ZHENG Y, LIU Y, ZHANG CM, LI WH, SHI S, LE AD, WANG SL. **Stem cells from deciduous tooth repair mandibular defect in swine.** *J Dent Res*, v.88, n.3, p. 249-254, 2009.

ZHU Y, SHANG L, CHEN X, KONG X, LIU N, BAI Y, FANG J, DANG J, WANG X, JIN Y. **Deciduous dental pulp stem cells are involved in osteoclastogenesis during physiologic root resorption.** *J Cell Phys*, Epub ahead of print. 2012.

ANEXO 1: Protocolo de Obtenção, Isolamento e Cultura de Células-Tronco obtidas a partir de Dentes Decíduos Esfoliados Humanos

Os dentes decíduos devem ser coletados a partir de um centro odontológico, onde cirurgiões dentistas se responsabilizam pela remoção deste dente preservando o tecido mole. Todo o procedimento de coleta do dente decíduo deve estar de acordo com a legislação vigente de Pesquisa Clínica (Resolução MS 196/1996).

Devem ser obtidos dentes com a presença de polpa vermelha, indicando fluxo sanguíneo até o momento da remoção.

A coleta deve envolver condições de assepsia adequadas, como a esterilização e desinfecção dos instrumentos, utilização de agentes antissépticos, e preparação do campo operativo com uso de barreiras para minimizar a contaminação do tecido obtido.

O transporte do dente deve ser realizado em frascos estéreis com temperatura controlada.

Como meio de coleta e armazenamento foi utilizada solução salina balanceada de Hank (HBSS, Invitrogen, USA) com solução antibiótica, 100U/ml penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina.

Os procedimentos a seguir devem ser executados em capela de fluxo laminar, observando as técnicas de assepsia cabíveis.

Os dentes de leite podem ser submetidos a processo de desinfecção com lavagem em solução de transporte e armazenamento do tecido recém-coletado (solução salina balanceada de Hank (HBSS, Invitrogen, USA), contendo 10 % de solução antibiótica. A lavagem deve ser realizada três vezes, podendo ser feita uma última lavagem em meio sem antibiótico.

As raízes dos dentes devem ser separadas a partir da coroa para revelar a polpa dentária. A polpa dentária pode ser fracionada e colocada em placa de Petri estéril com solução fisiológica, sendo substituída por solução de tripsina/EDTA (CULTILAB), por tempos de 10 ou 20 minutos. Foi utilizado Meio Mínimo de Eagle (MEM), com 15% de Soro Fetal Bovino (SFB) para neutralizar a ação enzimática. As polpas foram mantidas em condição de cultura para obtenção de células pelo método de explante. A manutenção das polpas e posterior cultura das células foi realizada em Meio Mínimo de Eagle (MEM), suplementado com 15% de Soro Fetal Bovino (SFB), 0,1 μ M de ácido ascórbico 2-fosfato, 100U/ml de penicilina e 100 μ g/ml de estreptomicina, e incubadas a 37 ° C e 5% de CO₂.

Após 8 dias foram observadas células a partir das polpas dentárias. A troca de meio deve ser realizada sempre que necessário, com acidificação do meio de cultura ou presença de células em suspensão, correspondendo a aproximadamente 2 trocas por semana.

As subculturas foram realizadas com tripsinização das monocamadas (tripsina / EDTA 0,25%). As células foram contadas em Câmara de Neubauer com solução de 0,2% de Azul de Tripán, para contagem e verificação da viabilidade celular.

Para o congelamento as células foram ser ressuspendias com tripsina / EDTA 0,25%, e centrifugadas a 1.000rpm. O pellet celular foi ressuspendido em meio descongelamento, meio de cultura com 10 % Dimetilsulfóxido (DMSO) (SIGMA ALDRICH), correspondendo a aproximadamente 10⁶ células / ml para cada amostra a ser congelada. As amostras foram refrigeradas gradativamente até serem estocadas em nitrogênio líquido (-196 ° C).