



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

# **Caracterização de células-tronco de polpa dental humana obtida de dentes decíduos e permanentes**

**LELIANE MACEDO DE SOUZA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre

**Orientador: Professor Doutor Orlando Ayrton de Toledo**

**Co-orientador: Professor Doutor Marcelo de Macêdo Brígido**

**Brasília, DF  
2008**

**TRABALHO DESENVOLVIDO NO LABORATÓRIO DE BIOLOGIA  
MOLECULAR DO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DA  
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**Banca examinadora:**

**Professor Doutor Orlando Ayrton de Toledo  
(ORIENTADOR)**

**Professor Doutor Ricardo Bentes de Azevedo  
(EXAMINADOR INTERNO)**

**Professor Doutor Carlos Estrela  
(EXAMINADOR EXTERNO)**

**Professora Doutora Ana Cristina Barreto Bezerra  
(SUPLENTE)**

## **DEDICATÓRIA**

A Deus, que, dentre infinitas possibilidades, permitiu a minha existência.

Aos meus amadíssimos pais, Jerônimo e Conceição, a quem devo a minha vida, a minha melhor formação, a prática das virtudes do amor, da fé, do bom combate e do alinhamento com o bem e a verdade. Serei sempre grata pela dedicação amorosa e incondicional, assim como pela diligente atenção em me ensinar, desde cedo, que conhecimento é carga leve e gratificante.

Ao meu muito amado filho Daniel, razão da minha vida e a quem dedico o meu coração. Meu grande e fiel amigo, que sempre me apoiou e compreendeu em todas as minhas decisões. Seu amor, sua tranquilidade e sua presença e constituem a felicidade na minha vida.

À minha avó Creusa, exemplo de mulher guerreira em seus 90 anos, cujo entusiasmo sobre minha formação me reforçou na busca de melhorar meus papéis como mãe e profissional.

Ao meu amado companheiro Paulo de Tarso, cujo amor, carinho e dedicação ampliaram as minhas motivações na vida, pela sublime possibilidade de unir nossos corações na construção de um relacionamento maduro e equilibrado que me proporcionou conforto para concluir com segurança esta importante conquista profissional e acadêmica.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu muito estimado orientador Prof. Dr. Orlando Ayrton de Toledo, meu orientador em toda a minha formação acadêmica, e para o meu desenvolvimento como pesquisadora. Considero-o responsável pelo meu encanto com a Odontologia, pela minha opção na minha especialidade em Odontopediatria e agradeço seus exemplos de equilíbrio, temperança e dignidade, virtudes de um verdadeiro e raro Mestre.

Ao Prof. Dr. Marcelo de Macedo Brígido, meu querido co-orientador, pelo inestimável apoio, paciência, pelo valioso e constante incentivo, dedicação e amizade essenciais para o desenvolvimento deste trabalho e o empenho no desenvolvimento desta pesquisa, e por ter confiado, a mim, esta linha de pesquisa e conseguindo todos os recursos necessários junto à equipe do laboratório de Biologia Molecular.

Ao Prof. Dr. Márcio Poças e à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Soraya Coelho, pela excelente iniciativa em construir esta linha de pesquisa envolvendo células-tronco de polpa dental, por terem me aceitado na equipe e pelas valiosas contribuições ao nosso trabalho.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Cristina B. Bezerra, meu agradecimento pela constante presença e inestimável amizade. Seu exemplo nos diversos papéis que desempenha com elevada competência na vida muito me inspirou, desde minha formação como acadêmica em Odontologia e no despertar da minha intenção em pesquisar.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andréa Maranhão pelas valiosas colaborações e orientações na execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. João Milki Neto pela inestimável colaboração e acolhimento em sua clínica, onde foi possível coletar o material da pesquisa e pelo interesse sobre todas as etapas do desenvolvimento do nosso trabalho.

Ao Prof. Dr. Silvio Arantes e à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Simone Otero, por toda a colaboração que recebi e pela disponibilidade em me ajudar com a coleta de material para a pesquisa.

À querida amiga Luciana Pereira, brilhante profissional e colaboradora na pesquisa. Devo a ela todo o aprendizado nas práticas e manejo laboratoriais. Sua simpatia e especial inteligência fazem desta colega uma pesquisadora notável e de grande valia para a Universidade de Brasília.

À colega e colaboradora da pesquisa Juliana Bittar, imprescindível parceira nas etapas da pesquisa, por sua dedicação e agradável companhia neste aprendizado.

À Izabel Cristina, parceira, amiga e colaboradora na pesquisa, por sua inestimável e diligente participação e elaboração das análises estatísticas, e pela amizade conquistada.

Ao colega e importantíssimo colaborador Sócrates Ornelas pelas orientações nas análises em citometria de fluxo, dentre outras contribuições.

A todos os colegas do Laboratório de Biologia Molecular, pelas experiências compartilhadas.

Ao amigo Prof. Dr. André Tannus e ao amigo Marlon Azevedo, por todas as orientações que diligentemente prestaram a mim durante o mestrado.

À Mônica Macêdo Fischer, minha amiga, por sua valiosa contribuição na leitura e organização bibliográfica da minha dissertação.

Ao meu primo Marcos de Souza, por sua valiosa e paciente contribuição com os recursos de informática.

Aos meus colegas do Superior Tribunal de Justiça, pelo apoio no ambiente de trabalho que me ajudou a compensar as horas dedicadas para o desenvolvimento desta pesquisa.

A todos os meus familiares e amigos que puderam compreender minhas eventuais ausências por conta da dedicação a esta pesquisa.

À Universidade de Brasília e a todos os mestres pela minha formação acadêmica.

## ÍNDICE

DEDICATÓRIA .....	ii
AGRADECIMENTOS .....	iii
ÍNDICE DE SIGLAS .....	vii
ÍNDICE DE TABELAS .....	x
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xi
RESUMO .....	xiii
ABSTRACT .....	xiv
<i>1. Introdução</i> .....	1
<i>2. Objetivos</i> .....	6
2.1 – Objetivo Geral .....	7
2.2 – Objetivos Específicos .....	7
<i>3. Revisão da Literatura</i> .....	8
3.1 – Células-tronco .....	9
3.2 – Células-tronco de polpa dental .....	16
Odontogênese: diferenciação celular e biologia pulpar .....	16
3.3 – Derivação e diferenciação celular na odontogênese. Regulação gênica e fatores de transcrição para diferenciação de ameloblastos e odontoblastos .....	19
3.4 – Caracterização e localização das células-tronco em polpas dentárias .....	30
3.5 – Terapias regenerativas utilizando células-tronco de polpa dental .....	42
<i>4. Material e Métodos</i> .....	48
4.1 – Procedimento de obtenção das células de polpa dental .....	49
4.2 – Estabelecimento da cultura primária de CPdp e CPdd por dois métodos de isolamento .....	51
4.3 – Avaliação morfológica dos grupos CPdp e CPdd em microscopia de luz .....	52
4.4 – Avaliação do crescimento/proliferação de CPdp e CPdd em relação aos métodos de isolamento .....	52
4.4.1 – Análise estatística do crescimento e proliferação de CPdp e CPdd .....	53
4.5 – Caracterização do padrão imunofenotípico das CPdd e CPdp in vitro .....	54
4.5.1 – Análise estatística da caracterização do padrão imunofenotípico de CPdp e CPdd .....	54
4.6 – Aspectos éticos: .....	55

5. Resultados .....	57
5.1 – Avaliação morfológica dos tipos celulares CPdd e CPdp em microscopia de luz.....	58
5.2 – Avaliação do crescimento/proliferação dos tipos celulares CPdd e CPdp:	
Característica da Amostra .....	63
5.3 - Caracterização do padrão imunofenotípico das CPdp e CPdd in vitro.....	68
5.3.1 – Perfil imunofenotípico das células adquiridas e marcadas com os diferentes anticorpos, para os dois métodos de isolamento C/D e OG nos tipos celulares em CPdp .....	69
5.3.2 – Perfil imunofenotípico das células adquiridas e marcadas com os diferentes anticorpos, para os dois métodos de isolamento C/D e OG nos tipos celulares em CPdd .....	73
5.3.3 – Perfil imunofenotípico das células em CPdp e CPdd adquiridas e marcadas com os diferentes anticorpos, para o método de isolamento C/D.....	79
5.3.4 – Perfil imunofenotípico das células em CPdp e CPdd adquiridas e marcadas com os diferentes anticorpos, para o método de isolamento OG.....	82
6. Discussão .....	85
7. Conclusões .....	96
8. Referências.....	98
9. Anexo 1.....	106
10. Apêndices .....	108

## ÍNDICE DE SIGLAS

ALP	Fosfatase alcalina ( <i>alkaline phosphate</i> )
ANOVA	Análise de variância
AP-1	Ativador de proteína-1 ( <i>Activator Protein-1</i> )
bFGF	Fator de crescimento básico para fibroblastos ( <i>basic fibroblast growth factor</i> )
BMPs	Proteínas morfogenéticas ósseas ( <i>bone morphogenetic proteins</i> )
BMSSCs	Células-tronco do estroma da medula óssea ( <i>bone marrow stromal stem cells</i> )
BrdU	Sigla do inglês: <i>5-bromo-2'deoxyuridine</i>
BSA	Albumina de soro bovino ( <i>Albumine from Bovine Serum</i> )
BSP	Sialoproteína óssea ( <i>bone sialoprotein – BSP</i> )
Col III	Proteína colágena tipo III ( <i>type III collagen</i> )
C/D	Método de dispersão celular enzimática com colagenase tipo I e dispase
CPdd	Células de polpa dental humana de dentes decíduos
CPdp	Células de polpa dental humana de dentes permanentes
CSF	Fator estimulador de formação de colônias ( <i>colony stimulating factor</i> )
CTM	Células-tronco mesenquimais ( <i>mesenchymal stem cells – MSCs</i> )
DiI	Sigla do inglês: <i>1,1-dioctadecyl-6, 6-di(4-sulfophenyl)-3, 3, 3', 3'-tetramethylindocarbocyanine</i>
DMEM	Meio essencial mínimo modificado por Dulbecco
DMP-1	Proteína da matriz óssea – 1 ( <i>bone matrix-protein-1</i> )
DPP	Dentino-fosfoproteína
DPSCs	Células-tronco da polpa de dentes permanentes de humanos ( <i>postnatal Human dental pulp stem cells</i> )
DSP	Dentino-sialoproteína
DSPP	Proteína dentino-sialofosfoproteína
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGF	Fator de crescimento epidermal ( <i>epidermal growth factor</i> )
FACS	Separação celular ativada por marcação com anticorpos conjugados à substâncias fluorescentes ( <i>fluorescent antibody cell sorting</i> )

FGF	Fator de crescimento de fibroblastos ( <i>fibroblast growth factor</i> )
FITC	Fluorescina isoticianato
GDF-10	Fator de crescimento e diferenciação 10 ( <i>growth/differentiation factor 10</i> )
GDNF	Fator neuronal de crescimento e diferenciação glial ( <i>glial cell line-derived neurotrophic factor</i> )
HA/TCP	Hidroxiapatita associada a tricálcio-fosfato
HBSS	Solução salina balanceada de Hanks ( <i>Hank's Balanced Salt Solution</i> ), sem Cloreto de cálcio, cloreto de magnésio ou sulfato de magnésio
hDPCs	Células de polpa dental humana ( <i>human dental pulp cells</i> )
IGF-1	Fator de crescimento derivado da insulina ( <i>Insulin Growth Factor – 1</i> )
IGF-I e IGF-II	Fator de crescimento derivado de insulina I e II ( <i>insulin-like growth factor I and II</i> )
MAP-1B	Proteína 1B associada à matriz mineral de microtubulos ( <i>Microtubule-associated Protein 1B</i> )
MEPE	Proteína fosforilada da matrix extracelular ( <i>Matrix Extracellular Phosphorilated protein</i> )
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
Nanog	Fator de transcrição presente no cormosso 12 humano em células-tronco embrionárias
NGF	Fator de crescimento neural ( <i>nerve growth factor</i> )
Oct-4	Fator de transcrição presente em células-tronco embrionárias ( <i>Octamer-binding transcription factor 4</i> )
OG	<i>Outgrowth</i> : dispersão celular por cultura de fragmento de tecido ou órgão
OPN	Osteopontina ( <i>osteopontin</i> )
Organ explants	Cultura de fragmentos de tecido ou de órgãos
PBS	Solução salina tamponada com sais de fosfato ( <i>Phosphate-Buffered Saline</i> )
PCR	Reação de polimerase em cadeia
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas ( <i>Platelet-derived growth factor</i> )
PDLSCs	Células-tronco do ligamento periodontal de humanos ( <i>human</i>

	<i>periodontal ligament stem cells</i> )
PDT	Tempo de duplicação ou dobramento da cultura celular ( <i>population doubling time</i> )
PE	Ficoeritrina
PGA	Ácido poli-glicólico ( <i>poly glycolic acid</i> )
PGLA	Ácido láctico poli-glicólico ( <i>poly lactic-co-glycolic acid</i> )
PHEX	Gen homólogo fosfato-regulador de endopepitase no cromossomo X ( <i>PHosphate-regulating gene with homologies to Endopepitase, on X-chromosome</i> )
PLA	Ácido poli-lático ( <i>poly lactic acid</i> )
rhBMP	Proteína morfogenética recombinante
Scaffold	Molde ou guia de matriz extracelular
SCF	Fator de células-tronco ( <i>stem cell factor</i> )
SSEA	Antígeno específico de estágio embriogênico de células-tronco ( <i>stage-specific embryonic antigen</i> )
SHED	Células-tronco de dentes decíduos recém-esfoliados de humanos ( <i>stem cells from human exfoliated deciduous teeth</i> )
Shh	Sigla do inglês: <i>sonic Hedgehog</i>
SIBLING	Proteína ligante – integrina (do inglês: <i>Small Integrin-Binding Ligand N-Linked Glycoproteins</i> )
SLRP	Partícula de proteoglicana rica em Leucina ( <i>Small Leucine-rich Proteoglycan</i> )
STRO-1	Marcador positivo para células-tronco mesenquimais estromais
TGFβ	Fator transformador de crescimento-beta
TNF	Fator de tumor necrótico ( <i>tumor necrotic factor</i> )
TRA	Antígeno de reconhecimento de tumor
UFC-F	Unidades formadoras de colônia de fibroblastos ( <i>Fibroblast Colony-Forming Cells - CFU-F</i> )
VACAM-1	Molécula – 1 da adesão celular vascular ( <i>vascular cell adhesion molecule-1, VACAM-1</i> )
Wingless (Wnts)	Proteínas inter-relacionadas transmembrana no processo de diferenciação/proliferação
α-MEM	Meio essencial mínimo de Eagle.

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Tempos de duplicação das culturas primarias estabelecidas para CPdp e CPdd, em relação aos dois métodos de isolamento (C/D e O/G).....	67
Tabela 2 - Caracterização dos tipos celulares em CPdp para os dois métodos de isolamento. Valores normalizados.....	69
Tabela 3 - Tipo Celular CPdp com as comparações dos marcadores em relação aos respectivos grupos controles.....	71
Tabela 4 - Caracterização dos tipos celulares em CPdd para os dois métodos de isolamento. Valores normalizados.....	74
Tabela 5 - Tipo Celular CPdd com as comparações dos marcadores em relação aos respectivos grupos controles.....	76
Tabela 6 - Médias das diferenças de marcação de CPdp e CPdd em relação ao método de isolamento por digestão enzimática com Colagenase tipo I e Dispase (C/D). Valores normalizados.....	79
Tabela 7 - Médias das diferenças entre as marcações de CPdp e CPdd em relação ao método de isolamento por com Colagenase tipo I e Dispase (C/D)..	81
Tabela 8 - Médias das diferenças entre as marcações de CPdp e CPdd em relação ao método de isolamento por outgrowth. Valores normalizados. ....	82
Tabela 9 - Médias das diferenças entre as marcações de CPdp e CPdd em relação ao método de isolamento por outgrowth (OG).....	84

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Diferenciação dos tecidos humanos. ....	11
Figura 2: Diferenciação terminal das células-tronco. ....	12
Figura 3: Coleta do tecido pulpar.....	50
Figura 4: Culturas em confluência de CPdp e CPdd para o método de isolamento C/D.....	58
Figura 5: Culturas de CPdp para os dois métodos de isolamento.....	59
Figura 6: Cultura do fragmento de CPdd-OG, primeiro subcultivo. ....	60
Figura 7: Presença de aglomerados celulares, típico de unidades formadoras de colônias semelhantes a fibroblastos. ....	61
Figura 8: Amostras de culturas coradas com corante de Giemsa de CPdp-C/D eCPdd-C/D..	62
Figura 9: Amostras de culturas coradas com corante de Giemsa, Culturas confluentes..	63
Figura 10: Curva de crescimento dos tipos celulares de CPdd.....	64
Figura 11: Curva de crescimento dos tipos celulares de CPdp.....	65
Figura 12: Curva de crescimento dos tipos celulares de CPdp e Cpdd comparando as médias de crescimento das células obtidas pelo método de isolamento por digestão enzimática (C/D)..	65
Figura 13: Curva de crescimento dos tipos celulares de CPdp e CPdd comparando as médias de crescimento das células obtidas pelo método de isolamento <i>outgrowth</i> (OG). ....	66
Figura 14: Curva de crescimento global dos grupos celulares em relação aos dois métodos de isolamento. ....	67
Figura 15: Médias das diferenças das células adquiridas e marcadas com os diferentes anticorpos, para os dois métodos de isolamento C/D e OG do grupo CPdp..	70
Figura 16: Gráficos ilustrando as análises das marcações comparadas com o grupo controle para CPdp.....	71
Figura 17: Histogramas exemplificando os valores de células adquiridas e os deslocamentos das marcações de CPdp para o método de isolamento C/D e para o método de isolamento OG .....	72
Figura 18: Representação das medidas analíticas geradas na avaliação em citometria de fluxo, relacionando a intensidade de fluorescência (Y Geo) e a porcentagem de células marcadas para CPdp.....	73

Figura 19: Médias das diferenças das células adquiridas e marcadas com os diferentes anticorpos, para os dois métodos de isolamento C/D e OG do grupo CPdd. Valores normalizados. ....	75
Figura 20: Gráficos ilustrando as análises das marcações comparadas com o grupo controle para CPdd. ....	77
Figura 21: Histogramas exemplificando os valores de células adquiridas e os deslocamentos das marcações de CPdd para o método de isolamento C/D e para o método de isolamento OG. ....	78
Figura 22: Representação das medidas analíticas geradas na avaliação em citometria de fluxo, relacionando a intensidade de fluorescência (Y Geo) e a porcentagem de células marcadas para CPdd. ....	78
Figura 23: Médias das diferenças de marcação de CPdp e CPdd em relação ao método de isolamento por digestão enzimática com Colagenase tipo I e Dispase (C/D). Valores normalizados. ....	80
Figura 24: Médias das diferenças entre as marcações de CPdp e CPdd múltiplas comparações para o método de isolamento com Colagenase tipo I e Dispase (C/D). ....	81
Figura 25: Médias das diferenças entre as marcações de CPdp e CPdd em relação ao método de isolamento por <i>outgrowth</i> (OG). Valores normalizados. ....	83
Figura 26: Médias das diferenças entre as marcações de CPdp e CPdd. Múltiplas comparações para o método de isolamento por <i>outgrowth</i> . ....	84

## RESUMO

Células-tronco adultas representam uma nova abordagem em terapia regenerativa. Recentes pesquisas revelaram que o tecido pulpar de dentes humanos permanentes e decíduos contém células-tronco com grande potencial proliferativo, apresentam capacidade de auto-renovação e de diferenciação em diversas linhagens celulares *in vitro*. O objetivo deste projeto foi comparar o perfil morfológico e proliferativo dos tipos celulares cultivados e caracterizar as células-tronco pulpares humanas de dentes permanentes (CPdp) e decíduos (CPdd) em relação a dois métodos de isolamento. Terceiros molares impactados e dentes decíduos recém-esfoliados foram coletados, limpos e seccionados no limite da junção cimento-esmalte. Os tecidos pulpares foram cuidadosamente removidos e cultivados, utilizando os métodos de isolamento por digestão enzimática com solução de 3mg/mL de colagenase tipo I e 4mg/mL de dispase e pela cultura direta do fragmento do tecido pulpar. Realizamos análises morfológicas e do potencial proliferativo. Para a caracterização do perfil imunofenótipo foram utilizados anticorpos monoclonais anti: CD117, CD34, CD45 RA e a avaliação em citometria de fluxo. Nossos resultados indicaram grande potencial proliferativo *in vitro* de CPdp e CPdd, principalmente para CPdd. Os tipos celulares apresentaram imunofenótipo compatível para células-tronco, sendo expressivamente positivos para CD117, independente do método de isolamento. Houve diferença na expressão do CD34 entre os grupos celulares. A análise fenotípica final demonstrou as CPdp como CD117<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup> e CD45<sup>-</sup>, e as CPdd como CD117<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup> e CD45<sup>-</sup>.

**Unitermos:** células-tronco, odontoblastos, antígenos de superfície

## ABSTRACT

Adult Stem cells represents a new approach in regenerative therapies. Recent researches have shown that postnatal and deciduous dental pulp contains stem cells with high proliferation capacity, ability to self-renew and to differentiate into multiple cell lineages. The aim of this study was to compare the morphological and proliferative profiles of the cells types in dental pulp of permanent and deciduous teeth, and to characterize the progeny by two isolation methods *in vitro*. Normal human impacted third molars and exfoliated deciduous teeth were collected, cleaned and cut around the cementum-enamel junction. The pulp tissue was gently separated from the crown and root. Pulp cell cultures were established via two approaches by enzyme digestion in a solution of 3mg/mL collagenase type I and 4mg/mL dispase and by culture of the explants into tissue culture dishes. We performed morphological, proliferative analyses and immunophenotype studies to characterize the progeny using a cytometer for monoclonal antibodies: CD117, CD34, CD45 RA. Our findings indicated high proliferative rates for permanent and deciduous teeth, mainly for deciduous teeth. The cells population showed phenotypes compatible for stem cells, with remarkable positive expression of the marker CD117, irrespective of the isolation method. We identified significant difference for the expression of CD34 among the cells groups. The immunophenotype profiles were CD117<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup> and CD45<sup>-</sup> for cells from permanent teeth, and CD117<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup> and CD45<sup>-</sup> for cells from deciduous teeth.

**Keywords: stem cells, odontoblasts, surface's antigens.**

# *1. Introdução*

Terapias voltadas à substituição e engenharia de tecidos, fundamentadas nos conceitos da biologia de células-tronco, têm emergido como estratégias de grande potencial na medicina e na odontologia regenerativa atual.

Diversas pesquisas investigaram o uso do tecido pulpar de dentes humanos como fonte de células-tronco multipotentes, descritas como capazes de se auto-renovar e de se diferenciar em tipos celulares diversos. Estas células-tronco apresentam eficiência clonogênica quando orientadas e estimuladas com fatores de diferenciação, tanto para formação de tecidos relacionados com as estruturas dentárias, como para outras estratégias e terapias em engenharia de tecidos (Gronthos et al., 2000 - 2002; Shi et al., 2001; Batouli et al. 2003, Miura et al.,2003; Seo et al., 2004; Bowen et al., 2006; kerkis et al., 2006).

Durante o desenvolvimento dentário, interações entre células do epitélio bucal e do ectomesênquima ocorrem para a promoção da morfogênese dentária, resultando em uma população bastante heterogênea de células, derivadas da crista neural e do mesoderma paraxial na polpa embrionária. (Stanislawski et al., 1997; Katchburian e Arana, 2004).

Desta interação resulta uma camada externa de esmalte formada pela atividade dos ameloblastos derivados do epitélio oral e uma camada interna de dentina primária sintetizada pelos odontoblastos, derivados da papila dental.

Na polpa dental adulta, uma mistura de células é identificada como: células semelhantes a fibroblastos (também chamadas de pulpoblastos), células implicadas na resposta imune (linfócitos, macrófagos, células dentríticas), células neurais, células vasculares e perivasculares (pericitos), e células mesenquimais indiferenciadas. Algumas destas células mantêm a capacidade de se diferenciar e participar do processo de reparação das estruturas dentais.

A composição estrutural complexa do dente promove dureza e durabilidade, mas é vulnerável a traumas mecânicos, químicos, defeitos congênitos, câncer e infecções bacterianas (Shi et al.,2005).

Tem-se especulado que células pós-mitóticas são deslocadas e estimuladas a se diferenciar em células semelhantes a odontoblastos a partir da porção central da polpa, na zona rica em células, da camada sub-odontoblástica de Höhl e perto da periferia deste tecido (Stanislawski et al., 1997; Seo et al., 2004; Kikuchi et al, 2004; Chen et al., 2006). Shi e

Gronthos (2003) demonstraram que estas células residem na microvasculatura ou região perivascular dentro do seu tecido de origem.

Após o desenvolvimento completo do dente, em casos de quebra da integridade dentinária que levem à desintegração da camada odontoblástica, células precursoras de odontoblastos são recrutadas de algum sítio da polpa dentária, e se diferenciam em odontoblastos que sintetizam dentina reparadora (terciária), como uma barreira para proteção do tecido pulpar. (Tziafas et al., 2000; Shi e Gronthos, 2003). Esta estimulação se deve ao efeito de várias moléculas de sinalização liberadas da dentina durante o processo de desmineralização (TGF- $\beta$ s, BMPs) (About e Mitsiadis, 2001).

Do mesmo modo, o processo de regeneração periodontal é viabilizado com a mobilização de população de células indiferenciadas formadoras de ligamento periodontal, de cimento radicular e osso alveolar (Seo et al, 2004).

Estas células, envolvidas nos processos de reparação da dentina (dentinogênese terciária) e do ligamento periodontal, têm sido relatadas como células-tronco de origem somática e mesenquimal, com grande potencialidade de uso terapêutico para as novas abordagens de atuação regenerativa em odontologia.

Células-tronco são geralmente definidas como células indiferenciadas, que têm capacidade única de auto-renovação e de diferenciação em tipos celulares especializados (multilinhagem), durante o processo de ontogênese (células-tronco embrionárias) e por toda a vida do organismo (células-tronco adultas ou somáticas) (Peres e Curi, 2005; Zago e Covas, 2006; Novakovic e Freshney, 2006; Freshney et al., 2007). Originam células progenitoras capazes de regenerar um tecido após uma lesão e que têm capacidade de modular estas atribuições (Peres e Curi, 2005).

Células-tronco têm sido identificadas na polpa de dentes humanos permanentes (*postnatal human dental pulp stem cells, DPSCs*); de decíduos recém-esfoliados (*stem cells from human exfoliated deciduous teeth, SHED*) (Gronthos et al., 2000; Miura et al., 2003), como também no ligamento periodontal (*human periodontal ligament stem cells, PDLSCs*) (Seo et al., 2004, Kramer et al., 2004).

DPSCs são capazes *in vitro* e em transplantes *in vivo* de formar dentina ectópica, impressionando pela habilidade de gerar um complexo dentino-pulpar, composto por matriz mineralizada, com túbulos dentinários alinhados e preenchidos por prolongamentos de

odontoblastos, contendo tecido pulpar vascularizado, em arranjo similar encontrado nas estruturas dentárias humanas naturais (Gronthos et al., 2000; Miura et al., 2003).

SHED foram identificadas como uma população de células clonogênicas com alta capacidade proliferativa, capazes de formar de osso e dentina, apresentando habilidade de diferenciação em variedades celulares incluindo células neurais, adipócitos e odontoblastos, mas não chegaram a reconstituir o complexo dentino-pulpar, como as DPSCs, sendo sugeridas como mais imaturas (Miura et al., 2003).

A outra fonte de células-tronco somáticas, dentro das especialidades odontológicas, identificada no ligamento periodontal de dentes humanos, quando estimuladas, desenvolveram estruturas tipo cimento radicular e fibras do ligamento periodontal, inclusive utilizando células criopreservadas consideradas viáveis, *in vitro* e *in vivo* (Seo et al., 2005).

Células oriundas da polpa dental têm sido isoladas tanto pelo método de digestão enzimática (Mooney et al., 1996; About et al., 2000, Gronthos et al. 2000-2002; Shi et al., 2001-2003; Miura et al., 2003; Batouli et al., 2003; Huang et al., 2006; Yamada et al., 2006, Gagari et al., 2006; Laino et al., 2005-2006; Pappacio et al., 2006; Wei et al., 2007) como pelo método de cultura do fragmento de tecido, sendo designanda a migração celular por *outgrowth* (Kamata et al., 2004; Saito et al., 2004; Pierdomenico et al., 2005; Liu et al., 2005; Kerkis et al., 2006; Otaki et al., 2007; Stanislawski et al., 2007).

No entanto, poucos estudos têm avaliado se existe diferença imunofenotípica, morfológica e de proliferação entre os métodos de isolamento em relação aos grupos celulares de células pulpares de dentes permanentes (CPdp) e decíduos (CPdd).

Nos levantamentos bibliográficos realizados, foi identificado apenas um estudo comparando a caracterização das células-tronco pulpares humanas de dentes permanentes em relação aos dois métodos de isolamento (Huang et al., 2006a).

Portanto, mais pesquisas devem ser dirigidas a este grupo de células-tronco mesenquimais (CTM) de origem dentária, a fim de verificar o perfil imunofenotípico e se diferentes métodos de isolamento dão origem a populações celulares distintas.

Com base nestas constatações, o presente estudo teve por objetivo isolar e caracterizar *in vitro* células-tronco obtidas da polpa dental de dentes humanos decíduos

(CPdd) e permanentes (CPdp). Foram analisados comparativamente os perfis morfológicos, imunofenotípicos e proliferativos dos tipos celulares em relação aos métodos de isolamento por digestão enzimática e pela cultura do fragmento do tecido pulpar.

# *2. Objetivos*

## **2.1 – Objetivo Geral**

Caracterizar células-tronco de polpa dental de dentes humanos decíduos e permanentes obtida através de dois métodos de isolamento.

## **2.2 – Objetivos Específicos**

Estabelecer uma cultura primária dos tipos celulares do tecido pulpar de dentes humanos permanentes (CPdp) e decíduos (CPdd) através dos métodos de isolamento por digestão enzimática pela ação das enzimas colagenase tipo I e dispase (C/D) e por migração celular (*outgrowth*) diretamente do fragmento do tecido pulpar (OG).

Avaliar os aspectos morfológicos dos tipos celulares cultivados em microscopia óptica de luz para os dois métodos de isolamento.

Comparar as performances de crescimento e proliferação dos dois grupos celulares em relação aos métodos de isolamento.

Caracterizar o perfil imunofenótipo de CPdp e CPdd *in vitro*, identificando as populações de células-tronco dos tipos celulares, para cada método de isolamento, em citômetro de fluxo.

# *3. Revisão da Literatura*

### **3.1 – Células-tronco**

Terapias voltadas para a bioengenharia através da utilização de células-tronco têm despertado grande interesse da comunidade científica para o desenvolvimento de tratamentos regenerativos em tecidos e órgãos.

Nos organismos pluricelulares, vários tecidos apresentam capacidade de renovação fisiológica e, em alguns tecidos como pele e sangue, esta capacidade acompanha toda a vida do indivíduo. A renovação celular pressupõe a ocorrência de eventos de proliferação e diferenciação celular para a manutenção do número de células, a matriz extracelular, a arquitetura e função dos órgãos. Estes processos de proliferação e diferenciação dependem da existência de células que tenham capacidade de auto-renovação e de diferenciação, sendo denominadas de células pluripotentes, multipotentes, células de reserva e células-tronco (Peres e Curi, 2005; Zago e Covas, 2006).

Células-tronco são descritas como células indiferenciadas, com alta capacidade de proliferação, com habilidade de se auto-renovarem, originam células progenitoras, são capazes de regenerar um tecido após um trauma ou lesão, e são capacitadas para modular as funções celulares envolvidas nestes processos (Gronthos et al., 2002; Peres e Curi, 2005; Zago e Covas, 2006).

Células-tronco praticamente não expressam ou expressam poucos marcadores específicos, por isso são tão difíceis de serem caracterizadas. Outro aspecto importante das células-tronco é a capacidade de manutenção da celularidade do tecido e originar diferentes linhagens através da diferenciação. A proliferação celular é um processo cíclico que resulta na duplicação do DNA pela ativação gênica e de outras moléculas de ativação, que servem como indicadores da divisão celular. A diferenciação é um processo não cíclico, também por ativação gênica, resultando no aparecimento de marcadores de diferenciação. Tanto os mecanismos de auto-regeneração e de diferenciação ainda não são totalmente conhecidos (Peres e Curi, 2005; Zago e Covas, 2006).

As primeiras pesquisas com células-tronco embrionárias humanas foram publicadas pelo biólogo James A. Thompson, da Universidade de Wisconsin/EUA, e no mesmo ano, pelo embriologista John D. Gearhart, da Universidade Johns Hopkins. Os pesquisadores realizaram estudos com células-tronco de embriões humanos obtidos de casais

doadores em tratamento de reprodução assistida e isolando células embrionárias germinativas humanas (Thomson et al., 1998; Shablott et al., 1998).

Estes autores definiram as células-tronco como células indiferenciadas, que têm capacidade única de auto-renovação e de diferenciação em tipos celulares especializados (multilinhagem), durante o processo de ontogênese (células-tronco embrionárias) e por toda a vida do organismo (células-tronco adultas ou somáticas) (Thomson et al., 1998; Shablott et al., 1998; Gronthos et al., 2000; Goldberg, 2004; Murray et al., 2007).

Células-tronco embrionárias (do inglês: *Embryonic Stem Cell* - ESC) são encontradas na fase embrionária, na massa celular interna do blastocito, nas células germinais embrionárias (derivadas da prega genital do feto de 5 a 10 semanas). Também são consideradas células-tronco as células obtidas por transferência de núcleo somático em adultos. Apresentam a habilidade de dar origem aos mais de 250 tipos celulares diferentes de tecido do adulto, ou seja, se diferenciam em todas as células dos tecidos do organismo (Zago e Covas, 2006).

Porém, as pesquisas com células-tronco embrionárias têm gerado conflitos de ordem política, moral e religiosa, o que vem restringindo os avanços de estudos com esta fonte primária de células totipotentes e pluripotentes. Estas células apresentam como desvantagens, além da questão ética (pela falta de consenso sobre a origem da vida e a moralidade do seu uso), a dificuldade de controlar o potencial proliferativo e de diferenciação, podendo resultar em formações tumorais justamente por descontrole destas propriedades (Thomson et al., 1998; Shablott et al., 1998; Gronthos et al., 2000; Goldberg, 2004; Murray et al., 2007).

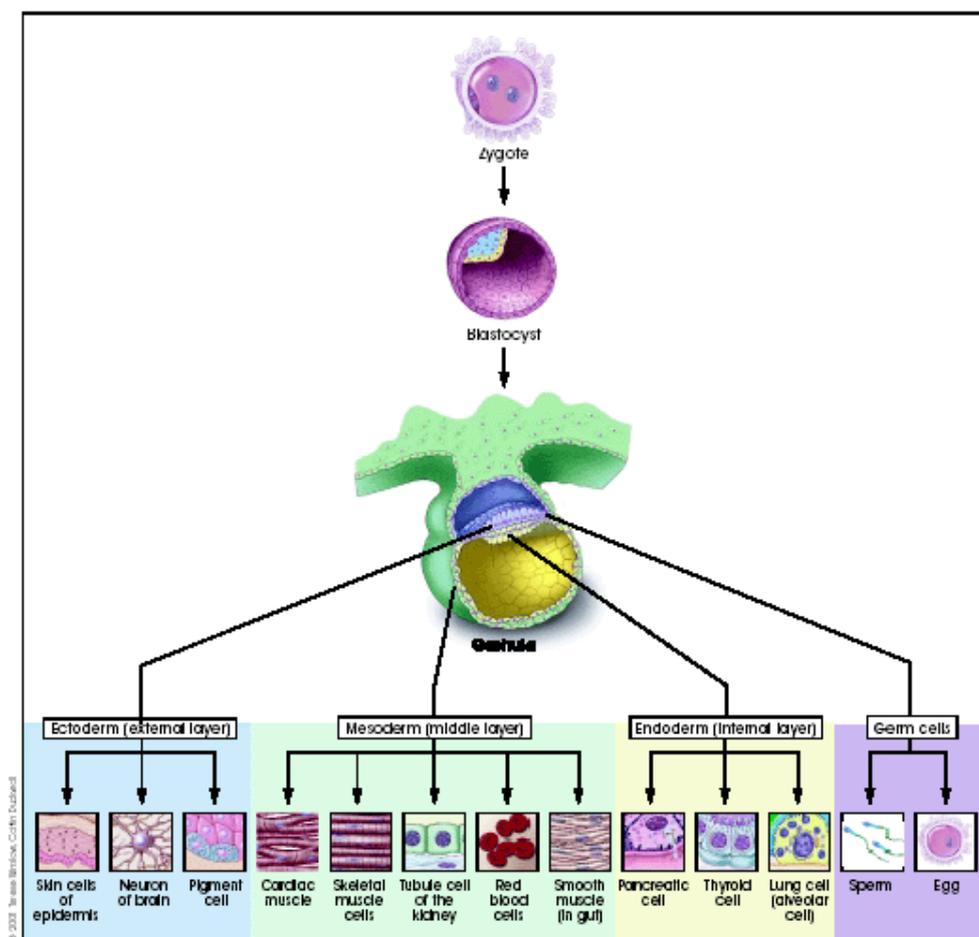


Figure 1.1. Differentiation of Human Tissues.

**Figura 1: Diferenciação dos tecidos humanos. Fonte:**  
[www.brown.edu/courses/BIOO32/adltstem/bi-picture.gif](http://www.brown.edu/courses/BIOO32/adltstem/bi-picture.gif)

Células-tronco adultas ou somáticas (*Adult Stem Cells - ASCs*) são células indiferenciadas, encontradas em tecidos especializados como nos tecidos: hematopoiético, tecido neural, pele, retina, folículo piloso, fígado, medula óssea, e muito recentemente vêm sendo pesquisadas no tecido de polpa dental de animais e de humanos, com evidência de se reprogramarem geneticamente (Harada et al., 1999; Gronthos et al., 2000; Bianco et al., 2001). ASCs são classificadas como células-tronco multipotentes, por poderem se diferenciar em diversas linhagens celulares, e apresentam mais vantagens no controle dos processos de diferenciação e proliferação *in vitro*. Não apresentam os conflitos de natureza ética enfrentados pelas células-tronco embrionárias (figura 1).

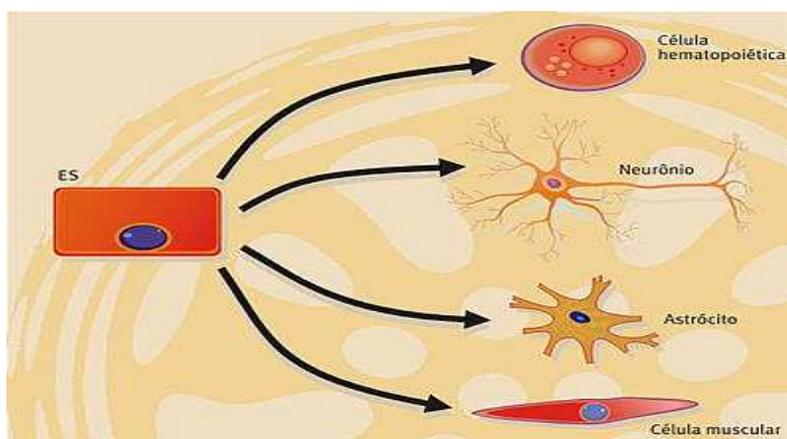
Devido a estas características, as células-tronco adultas têm sido amplamente pesquisadas e de grande interesse para a medicina e a engenharia tecidual, com aplicações

terapêuticas no combate a doenças crônicas, como: doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, diabetes tipo I, acidentes vascular-cerebrais, doenças hematológicas, enfisema pulmonar, trauma de medula espinhal, infartos, imunodeficiências e em determinados tipos de câncer (Murray et al., 2007).

Em geral, as células-tronco são classificadas como:

1. Totipotentes: com potencial de originar todas as células que compõem os tecidos do organismo adulto, e podem se proliferar *in vitro* indefinidamente sem se diferenciar, ou seja, se diferenciam em todos os tipos celulares do embrião, placenta e anexos embrionários. São originárias do embrião com 16 a 32 células, aproximadamente com 3 a 4 dias;
2. Pluripotentes: dão origem a todos os tipos celulares do embrião, exceto a placenta e anexos embrionários, e são encontradas no embrião com 32 a 64 células, na massa interna do blastocito.
3. Multipotentes: podem produzir células de várias linhagens. São as células-tronco somáticas ou do organismo adulto;
4. Oligopotentes: podem produzir células de uma única linhagem;
5. Unipotentes: produzem somente um único tipo celular maduro.

No final da cadeia de diferenciação se encontram as células com diferenciação terminal (figura 2), comprometidas com função específica (Murray et al, 2002-2007).



**Figura 2: Diferenciação terminal das células-tronco.**

Fonte: [www.brasilecola.com/biologia/image018.jpg/celula-mãe2.htm](http://www.brasilecola.com/biologia/image018.jpg/celula-mãe2.htm)

Das habilidades funcionais das células-tronco, a auto-renovação e capacidade de modulação são as mais fundamentais e típicas. Uma célula-tronco é capaz de se diferenciar no mínimo em dois tipos celulares distintos. Estas duas propriedades devem ser satisfeitas para que uma célula seja definida como célula-tronco (Alhadlaq e Mao, 2004). A capacidade de auto-renovação tecidual é compreendida como uma divisão assimétrica especializada, formando uma célula-filha que se mantém no sistema ao longo da vida do indivíduo, e outra célula-filha idêntica que se mantém indiferenciada entrando na cascata de diferenciação, sofrendo dicotomias até formar células especializadas. Estas células apresentam baixa taxa de proliferação e grande capacidade de auto-renovação (Mao et al., 2006; Zago e Covas, 2006).

Células oriundas de uma linhagem imortalizada podem se replicar em várias gerações, mas geralmente são incapazes de se diferenciarem em multilinhagens. Multilinhagem se refere à capacidade de uma população de células-tronco em se diferenciarem no mínimo em dois tipos celulares diferentes. Por exemplo, uma população simples de células-tronco mesenquimais pode se diferenciar em osteoblastos e condrócitos, mas os pré-osteoblastos não podem se diferenciar em outras células de linhagem mesenquimal (Papaccio et al., 2006; Mao et al., 2006). Então, pré-osteoblastos não são considerados células-tronco, e sim células progenitoras, ou células-tronco tecido-específicas (Zago e Covas, 2006). Células progenitoras são definidas como aquelas em estágio de diferenciação entre células-tronco e células especializadas (em estágio terminal de diferenciação) (Alhadlaq e Mao, 2004).

Estas células imediatamente derivadas das células-tronco denominadas de células progenitoras intermediárias, que não têm capacidade de auto-renovação, apresentam grande potencial de proliferação, participando dos processos de regeneração tecidual por derivarem células especializadas (Mao et al., 2006).

A plasticidade é uma característica das células-tronco somáticas de um tecido que têm capacidade de originarem células diferenciadas de outros tecidos, por exemplo, capacidade das células-tronco pulpares em originar as células adiposas. Esta habilidade é descrita como a propriedade de transdiferenciação (Zago e Covas, 2006; Maria et al., 2007).

Os estudos com ASCs, em particular com células-tronco mesenquimais (do inglês: *Mesenchymal Stem Cells* - MSCs) não apresentam as restrições éticas e polêmicas

daqueles gerados com ESCs, embora não apresentem o mesmo potencial de diferenciação (não são totipotentes e pluripotentes), podem oferecer dificuldade de isolamento e cultivo *in vitro*, e se apresentam em menor quantidade nos tecidos. No entanto, oferecem maiores vantagens, pois são igualmente histocompatíveis, e oferecem possibilidade de controle dos processos de proliferação e diferenciação (Gronthos et al., 2000-2002; Soares et al., 2007).

As fontes mais utilizadas de células-tronco adultas ou somáticas são as da medula óssea, do sangue de cordão umbilical e do tecido adiposo. As células-tronco oriundas da medula óssea originam três sistemas: 1- células-tronco progenitoras endoteliais (utilizadas na revascularização de tecidos, terapia angiogênica e indiretamente reparam os tecidos lesados); 2- células-tronco hematopoiéticas (recuperam tipos celulares do sangue) e 3- células-tronco mesenquimais - CTM (responsáveis pela diferenciação das células do músculo esquelético) (Thomson et al., 1998; Shambloott et al., 1998; Gronthos et al., 2000; Goldberg, 2004; Murray et al., 2002-2007).

Dentre as populações distintas de células-tronco adultas (do inglês: *post-natal stem cells*) na matriz da medula óssea, as células-tronco hematopoiéticas são reconhecidas desde os últimos 40 anos, pela habilidade de reconstrução do sistema hematopoiético e sua constante capacidade de auto-renovação, garantindo o suprimento sanguíneo por toda a vida do organismo. As células-tronco mesenquimais têm origem na camada mesodérmica do embrião, estão presentes em pequenas quantidades na medula óssea e em diversos tecidos do organismo, e mantêm capacidade de diferenciação em multi-linhagens para células do osso, cartilagem, tendão, músculo e tecido adiposo (Maria et al., 2007). Vários estudos citam a capacidade de se diferenciarem em hepatócitos, células renais, cardiomiócitos, células neurais, células endoteliais, células epiteliais, células endócrinas pancreáticas (Mao et al., 2006; Maria et al., 2007).

Portanto, de todas as formas de células-tronco adultas, as CTM são as que podem ser derivadas de uma maior variedade de tecidos e que têm maior capacidade de diferenciação (Zago e Covas, 2006).

O primeiro experimento que isolou CTM do estroma de medula óssea foi realizado em 1970 por Friedenstein, que as classificaram como células formadoras de colônias semelhantes a fibroblastos (UFC-F) (Mao et al., 2006). O método de isolamento se

deu pela aderência das células em placa de poliestireno, ficando as células hematopoiéticas em suspensão.

Células-tronco também podem ser classificadas de acordo com sua origem (Murray et al., 2007):

1. Células-tronco autólogas: são oriundas do mesmo indivíduo em quem serão implantadas. Apresentam muito pouca ou nenhuma rejeição, com isolamento menos oneroso e sem implicações éticas ou legais. As fontes mais utilizadas são: de medula óssea, sangue periférico, gordura lipoaspirada, ligamento periodontal, pele, cordão umbilical. Dentro da perspectiva em medicina regenerativa, as linhagens mais valiosas de células-tronco são as que têm potencial de diferenciação neuronal, pois estas células também podem se diferenciar *in vitro* em linhagens neurais, adipogênicas, condrogênicas, miogênicas e osteogênica.

2. Células-tronco alogênicas: são oriundas de doadores da mesma espécie. Como exemplo de doação alogênica inclui-se a doação de sangue e de óvulos para fertilização *in vitro*. São geralmente estocadas em um banco de células, mas eventualmente apresentam questionamentos éticos e problemas de rejeição e transmissão de patógenos.

3. Células-tronco xenogênicas: são isoladas de indivíduos de outra espécie. Algumas células de origem animal têm sido usadas na construção de implantes cardiovasculares. A grande desvantagem reside no fato de provocarem altos índices de rejeição e transmissão de patógenos, embora não enfrem questionamentos éticos severos.

Recentemente, a identificação de supostas populações de células-tronco de origem dental, capazes de regenerarem estruturas dentárias e de originarem tipos celulares diversos, tem estimulado grande interesse no potencial uso para terapias regenerativas no tratamento de danos causados por traumas, câncer, cárie e doença periodontal. (Seo et al., 2004; Gronthos et al., 2000 - 2002).

### **3.2 – Células-tronco de polpa dental**

#### ***Odontogênese: diferenciação celular e biologia pulpar***

A maioria das estruturas craniofaciais deriva das células de origem mesenquimal. Durante o desenvolvimento facial, células mesenquimais de origem da crista neural, migram, e interagem sinergicamente com células do mesoderma e ectoderma (ambas derivadas das células-tronco embrionárias da massa interna do blastócito), para se diferenciarem e participarem da morfogênese de estruturas craniofaciais, tais como: cartilagem, osso, ligamentos, músculos, tendões, periodonto e dente (exceto o esmalte dental de origem ectodérmica). Após o nascimento, as células mesenquimais são definidas como células-tronco mesenquimais, pois matém no organismo adulto a habilidade e plasticidade para participarem do processo de regeneração tecidual (Mao et al., 2006).

Durante o desenvolvimento dentário, interações entre células do epitélio bucal e do epitélio ectomesenquimal, ocorrem para a promoção da morfogênese dentária. Desta interação, resulta uma camada externa de esmalte formada pela atividade dos ameloblastos derivados do epitélio oral, e uma camada interna de dentina primária sintetizada pelos odontoblastos, derivados da papila dental (Gronthos et al., 200-2002).

O processo de desenvolvimento do dente, denominado odontogênese, é então, iniciado como resultado da interação entre epitélio oral e o ectomesênquima subjacente, originando a banda epitelial primária e a seguir a lâmina dentária. Os germes dentários seguem um processo de crescimento em fases de botão, capuz, campânula, coroa e raiz. É na fase de campânula que ocorrem os processos de morfogênese e a diferenciação das estruturas dos tecidos que constituirão o futuro dente (Katchburian e Arana, 2004).

A indução recíproca pela interação do epitélio interno do esmalte, de origem ectodérmica, com as células da papila dental, de origem ectomesenquimal, resultam na diferenciação de odontoblastos e ameloblastos. A diferenciação dos odontoblastos, de origem ectomesenquimal, é induzida com a participação da lâmina basal, pelas células do epitélio interno do órgão do esmalte, que após inversão de sua polaridade se transformam em pré-ameloblastos (Katchburian e Arana, 2004).

Nesta fase a lâmina basal desempenha importante papel na indução da diferenciação dos odontoblastos. Esta estrutura é a interface entre o epitélio interno do órgão

de esmalte e o ectomesênquima da papila dentária. É composta por proteínas e proteoglicanas específicas como por exemplo: laminina, fibronectina, glicosaminoglicanas, colágeno tipos I, I-trímero, III e IV, ácido hialurônico e condroitinas 4 e 6 fosfato. Assim, a diferenciação final dos odontoblastos é controlada e mediada por um fluxo de informações moduladas por uma rede de agentes bioquímicos (Katchburian e Arana, 2004).

A divisão final na diferenciação das células pulpares em contato com a lâmina basal dá origem a duas populações celulares-filhas: odontoblastos e células da camada subodontoblástica de Höhl. Odontoblastos produzem a maior parte dos componentes da matriz extracelular da dentina e são os responsáveis pela mineralização dentinária (Goldberg, 2004, Mitsiadis e Rahiotis, 2004).

Os odontoblastos passam então a secretar a primeira camada de matriz de dentina - a dentina do manto. A presença desta matriz dentinária, cujo constituinte mais abundante é o colágeno I, as interações entre células odontoblastos e pré-ameloblastos desencadeiam a diferenciação final destes últimos em ameloblastos, que passam a secretar a matriz orgânica do esmalte, também protéica, mas não de natureza colágena (Goldberg et al., 2004).

Morfologicamente, odontoblastos são células colunares polarizadas, com núcleo excêntrico, com prolongações citoplasmáticas denominadas de processos ou prolongamentos odontoblásticos, embutidas com vitalidade dentro de canalículos dentinários. Assim a polpa se estende até a junção amelo-dentinária. A dentina é considerada um prolongamento da polpa, e a polpa, por meio dos processos odontoblastos, é parte integrante da dentina (Thesleff e Sharpe, 1997; Katchburian e Arana, 2004; Shi et al, 2005).

A papila dental, resultante da invaginação da lâmina dentária no tecido conjuntivo, é constituída por uma concentração de células ectomesenquimais, diretamente abaixo do órgão do esmalte. Esta papila dará origem à dentina, pela atividade diferenciada dos odontoblastos e à polpa dental, que é um tecido conjuntivo frouxo, composto por vasos, nervos, células, fibras e substância intercelular (Katchburian e Arana, 2004).

As pesquisas envolvendo a caracterização dos processos responsáveis pela sinalização da indução da diferenciação dos odontoblastos são fundamentais para a compreensão da dentinogênese fisiológica e da reparação tecidual.

A característica mais conhecida da polpa dental é a formação da dentina terciária, que dependendo da intensidade da injúria, pode ser classificada em dentina reparativa e

reacional. Dentina reacional geralmente é formada após uma injúria leve ou moderada (lesão cariiosa de progressão lenta, preparo cavitário moderado, traumas sem exposição pulpar) onde a camada odontoblástica é preservada. Dentina reparativa é formada após uma injúria mais severa (exposição pulpar por lesão de cárie ou trauma), onde há necrose da camada odontoblástica na região afetada (Tziafas et al, 2000; Goldberg e Smith, 2004, Mitsiadis e Rahiotis, 2004).

O elemento dentário é conectado ao osso alveolar circundante, por um extrato fibrocelular, também de origem ectomesenquimal, denominado de ligamento periodontal. Feixes de fibras se infiltram na fina camada de cemento dentinário (fibras de *Sharpey*) e se conectam ao osso alveolar (Shi et al., 2005).

Quando uma injúria traumática ou por lesão de cárie compromete o complexo dentino-pulpar, células adjacentes ao sítio da lesão iniciam o processo de dentinogênese reparativa. No elemento dentário adulto, a atividade proliferativa e secretora dos odontoblastos é limitada, mas pode ser reativada após o estímulo (Tziafas et al., 2004).

Apesar do grande conhecimento relativo à odontogênese, à variedade de tipos celulares associados com a estrutura dentária, à histopatologia das doenças cárie e periodontal, pouco se sabe sobre as características e propriedades das células somáticas precursoras envolvidas com a reparação dos tecidos dentários e bucais.

Estudos preliminares demonstraram que, assim como os osteoblastos da medula óssea, as células pulpares expressam marcadores de osso, como a sialoproteína óssea, fosfatase alcalina, colágeno tipo I e osteocalcina (Batouli et al, 2003).

A diferenciação das células-tronco da polpa dental e do ligamento periodontal é um processo modulado por vários agentes reguladores, incluindo fatores de crescimento de fibroblastos e citocinas, o que as identifica e classifica como potenciais células mesenquimais, e chamam a atenção pela grande similaridade de perfil gênico entre as DPSCs (do inglês: *postnatal dental pulp stem cells*) com os precursores de osteoblastos presentes na matriz do estroma de medula óssea, as BMSSCs (do inglês: *bone marrow stromal stem cells*) (Thesleff e Sharpe, 1997).

Em estudos comparando os perfis de expressão gênica em microarranjos de cDNA entre, BMSSCs e DPSCs, constataram que estes precursores de osteogênese e odontogênese respectivamente apresentam expressões semelhantes para mais de 4.000

(quatro mil) genes humanos conhecidos, o que passou a despertar grande interesse em pesquisar e estimular crescimento desta nova fonte somática de células-tronco: as DPSC (Shi et al., 2001; Yamada et al., 2006).

Os processos de osteogênese e odontogênese mediados por BMSSCs e DPSCs, respectivamente, são regulados por mecanismos distintos levando a diferentes estruturas de organização de tecidos mineralizados e não-mineralizados (Batouli et al., 2003).

BMSSCs têm sido definidas em estudos *in vitro* e *in vivo* como células-tronco adultas pluripotentes, pela capacidade de se diferenciarem em vários tipos celulares como osteoblastos, condrócitos, adipócitos, células de músculos e células de tecido neural (Gronthos et al., 2002.).

Mais é sabido sobre as características multipotentes de outras fontes de células-tronco somáticas, como das BMSSCs. Pouco se sabe até então, sobre as propriedades das DPSCs e seu potencial proliferativo, capacidade de auto-renovação e de diferenciação em multi-linhagens de células.

A compreensão dos processos biológicos que regulam a odontogênese e aqueles envolvidos na reparação do complexo dentino-pulpar é importante para a melhor orientação de pesquisas envolvendo as habilidades das células-tronco de origem dentária em terapias regenerativas e para a engenharia tecidual.

### ***3.3 - Derivação e diferenciação celular na odontogênese. Regulação gênica e fatores de transcrição para diferenciação de ameloblastos e odontoblastos***

Durante o desenvolvimento do elemento dental, interações entre células da camada interna do órgão de esmalte e células ectomesenquimais da papila dental, sofrem diferenciação em ameloblastos e odontoblastos, cada qual passando a sintetizar matrizes mineralizadas de esmalte e dentina respectivamente. Assim como alguns tecidos musculares e o tecido nervoso, uma vez formados, estes tecidos mineralizados dentários não sofrerão remodelação durante a vida pós-natal. (Gronthos et al, 2000).

No entanto, depois da erupção dentária, traumas mecânicos, cárie, e outras injúrias que afetam o complexo dentino-pulpar de forma não irreversível, induzem a formação de dentina terciária, que constitui uma matriz mais desorganizada em comparação com as matrizes de dentina primária e secundária. Esta barreira funciona como proteção para a polpa dental.

Durante uma injúria ao dente que resulte em morte de odontoblastos, uma nova geração de células similares a odontoblastos (do inglês: *odontoblast-like cells*) ou odontoblastos secundários podem ser diferenciados de uma população de progenitores oriunda da porção central da polpa e passam a secretar dentina reparadora. Nesta população se incluem células da camada sub-odontoblástica de Höhl, fibroblastos, células mesenquimais indiferenciadas, e células derivadas dos pericitos vasculares. A constatação da transdiferenciação de determinadas células da polpa tem ressaltado o conceito da existência de células-tronco no tecido pulpar (Tziafas et al., 2000; Goldberg e Smith, 2004, Mitsiadis e Rahiotis, 2004).

Supõe-se que células progenitoras, os pré-odontoblastos, são recrutadas de algum sítio da polpa dental para então se diferenciarem em odontoblastos e secretarem matriz de dentina para a reparação tecidual. Assim acontece nas injúrias que acometem o ligamento periodontal e o osso alveolar, onde células precursoras na formação destas estruturas são acionadas para os processos de regeneração (Shi e Gronthos , 2003; Shi et al., 2005,).

A análise do perfil de expressão gênica e o acompanhamento deste perfil durante a diferenciação visam melhor entender dois aspectos importantes: a) quais são os mecanismos que conferem o estado indiferenciado e multipotente das células-tronco e, b) quais são os genes ativados ou desativados durante o processo de diferenciação (Zago e Covas, 2006).

Vários estudos demonstram que não existe um padrão rígido que possa ser associado ao estado indiferenciado, ou seja, células-tronco ou progenitoras não têm obrigatoriamente a mesma coleção de genes expressos. No entanto a expressão de alguns genes parece estar associada ao estado indiferenciado e com a pluripotência das células-tronco, como a proteína Oct-4 (do inglês: *Octamer-binding transcription factor 4*), o gene Nanog, o antígeno específico para estágio embrionário - SSEA (do inglês: *Stage-Specific-Embryonic Antigen*) e outros marcadores de células-tronco mais primitivas como o TRA (do inglês: *Tumor Recognition Antigen*) (Zago e Covas, 2006, Kerkis et al., 2006).

A proteína Oct-4 é um fator de transcrição presente nas células-tronco da fase embrionária do blastocisto e epiblastos. O gene Nanog é um fator de transcrição localizado no cromossomo 12 humano e igualmente expresso por células indiferenciadas na fase embrionária (Zago e Covas, 2006, Kerkis et al., 2006).

A consideração dos fatores que regulam os processos de odontogênese e da reparação tecidual da polpa e dentina pode contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias para terapias de reparação na prática da clínica odontológica.

Segundo Nakashima e Akimine (2005), os elementos essenciais para a engenharia de tecidos são: células-tronco adultas ou somáticas, atividade morfogenética (fatores de crescimento e diferenciação) e presença de moldes ou condutores de matriz extracelular (do inglês: *scaffold*).

As células-tronco adultas respondem a sinalizações de morfogens, e apresentam capacidade de diferenciação em células especializadas. Morfogens são fatores que regulam a morfogênese durante as interações epitélio-mesenquimais.

As cinco maiores famílias evolucionárias destes genes conservados são: proteínas morfogenéticas ósseas (do inglês: *Bone Morphogenetic Proteins* - BMPs); fatores de crescimento para fibroblastos (do inglês: *Fibroblast Growth Factors* - FGFs), proteínas inter-relacionadas Wingless (Wnts), proteínas *Hedgehog* (shh), fator de necrose tumoral (do inglês: *Tumor Necrotic Factor* - TNF) (Mitsiadis e Rahiotis, 2004; Goldberg e Smith, 2004; Srisuwan et al., 2006).

Genes, fatores de crescimento, componentes da matriz dentinária e do esmalte, moléculas e estruturas de organização do cito-esqueleto, a adesão célula-célula, podem influenciar no comportamento das células pulpares nos estágios iniciais de preparação tecidual até a fase terminal de diferenciação dos odontoblastos com deposição de dentina (Goldberg e Smith, 2004).

As abordagens mais sofisticadas de engenharia de tecidos incluem o uso de proteínas morfogenéticas ósseas, de fatores transformadores de crescimento beta (do inglês: *Transforming Growth Factor* –  $\beta$ , TGF- $\beta$ ), do fator básico de crescimento de fibroblastos (do inglês: *Fibroblasts Growth Factors*, bFGF), do fator de crescimento de Insulina tipo I e II (do inglês: *Insulin Growth Factor* – 1 e -2, IGF-I e IGF-II), do fator de crescimento derivados de plaquetas (do inglês: *Platelet-Derived Growth Factor*, PDGF), e a utilização de arcabouços

artificiais ou naturais (por exemplo: ácido poliglicólico, colágeno) para auxiliar na regeneração endógena de tecido pulpar, e facilitar a formação de dentina reparadora e dos tecidos da face (Mitsiadis e Rahiotis, 2004; Goldberg e Smith, 2004).

Para a reparação de tecido periodontal, tem-se observado esforços dirigidos para a reparação de perda óssea alveolar, incluindo o uso de enxerto autógeno de osso corticalizado, matriz de osso homogêneo e heterogêneo, osso desmineralizado e/ou descorticalizado, osso liofilizado, como também o uso de materiais aloplásticos (partículas cerâmicas, hidroxiapatita, polímeros, biovidro) (Shi et al, 2005; Sloan e Smith, 2007).

Um dos eventos moleculares mais precoces na diferenciação dos odontoblastos e no processo de reparação dentinária acontece por uma via evolucionária e conservada de sinalização, um mecanismo que governa vários destinos e funções celulares: a via de sinalização Notch (Harada et al., 1999-2002; Mitsiadis et al 2004). Esta via transmembrana de transdução de sinais, que determina o destino de diversos tipos celulares, é reativada durante a cicatrização do tecido dentinário, permitindo a diferenciação de células com características secretoras odontoblásticas, restituindo a capacidade das células indiferenciadas de auto-renovação (Harada et al., 1999-2002; Mitsiadis et al 2004). Os sinais trocados pela interação célula-célula, através dos receptores da via Notch, influenciam na diferenciação, proliferação e apoptose celular.

Tem sido sugerido que a manutenção do estágio indiferenciado (do inglês: *stemness*) das células-tronco, em geral, é regulada pelas interações entre células envolvendo a via Notch, e tem sido demonstrado que receptores Notch e seus ligantes são expressos também em células neurais indiferenciadas, queratinócitos, células-tronco hematopoiéticas, entre outros tipos celulares (Harada et al., 1999-2002). A baixa expressão de Notch resulta na formação de células especializadas (Zago e Covas, 2006).

Nas injúrias que acometem dentes humanos, os receptores Notch são mais expressos nos precursores dos odontoblastos e em células em estágio intermediário de diferenciação, da camada sub-odontoblástica, mas não pelos odontoblastos em estágio final de diferenciação. Em síntese, a via Notch reforça a sobrevivência dos precursores celulares que não foram atingidos pelas injúrias ao complexo dentino-pulpar, por preservar o potencial de formação de multi-linhagens (Mitsiadis et al., 2003). A ativação desta importante via de transdução de sinais pelas células após uma injúria reflete nos padrões de formação de vasos

sangüíneos na polpa em regeneração. Estudando a ativação da via Notch em incisivos de ratos, Thesleff e Sharpe (1997) verificaram que a regeneração pulpar induzida pela aplicação de hidróxido de cálcio foi mediada pela sinalização Notch célula-célula.

Fatores de crescimento presentes nos sítios das lesões na dentina e polpa agem tanto como fatores mitogênicos como quimotáticos para as células pulpares, mais verificados em ensaios e experimentos *in vitro*, do que *in vivo*, tais como: TGF $\beta$ -1 e TGF $\beta$ -3 (fator transformador de crescimento-beta); proteínas morfogenéticas de osso particularmente as BMP-2 e BMP-7; FGF, IGF-I; NGF (do inglês: *Neuronal Growth Factor*) (Smith e Lesot, 2001; Mitsiadis e Rahiotis, 2004; Liu et al., 2005). Estes fatores de crescimento são secretados por odontoblastos funcionais e fibroblastos pulpares.

Uma variedade de moléculas contribui para a cascata de sinalização resultando na diferenciação de células tipo odontoblastos. Os proto-oncogenes *c-jun* e *jun-B* são conhecidos por regular a transcrição via um fator denominado de AP-1 ou ativador de proteína-1 (do inglês: *Ativator Protein-1*), que por sua vez é estimulado por fatores de crescimento como as BMPs, fator de necrose tumoral – TNF, IGF. AP-1 estimula a transcrição de osteocalcina, fosfatase alcalina e de colágenos (Goldberg e Smith, 2004; Morsczeck, 2006).

Este conjunto de fatores inicia uma cascata de eventos envolvidos no processo de dentinogênese natural e regenerativa, promovendo atividade quimiotática para recrutamento de células do sistema imune e células indiferenciadas, como também estimulam resposta angiogênica (Tziafas et al., 2000; Goldberg e Smith, 2004).

A matriz dentinária serve como um reservatório destas moléculas que são liberadas no momento da injúria pulpar. Tem sido fortemente sugerido que a superfície dentinária exposta promove as sinalizações necessárias para a ativação das respostas durante o processo de regeneração dentino-pulpar. Materiais dentários, e mesmo a lesão cariada, liberam moléculas bioativas e fatores de crescimento, solubilizando-as da matriz dentinária. A aplicação de EDTA em dentina de roedores evidenciou a estimulação de odontoblastos para a formação de dentina reacional (Smith et al, 2001, Tziafas, 2004).

No estudo realizado por Liu et al. (2005), com a finalidade de avaliar a diferenciação e mineralização de células de polpa dental humana *in vitro*, foram cultivadas DPSCs humanas com extrato de dentina (ED) radicular de porco, solubilizado com EDTA

(10 mg/mL), com e sem adição de um suplemento promotor de mineralização (ácido ascórbico 50 mg/mL associado a  $\beta$ -glicerofosfato a 10 mM). Sabe-se que a dentina, quando solubilizada frente a uma injúria decorrente da cárie libera de sua matriz fatores de crescimento e de diferenciação (TGF- $\beta$ 1, BMPs, IGF, DMP-1, proteínas não-colágenas DSP, DPP, DSPP presentes na matriz dentinária), Visando a indução da diferenciação destas células-tronco pulpares pelas moléculas de sinalização presentes no ED e o efeito indutor de mineralização, *in vitro*, com adição do suplemento mineralizador, foi avaliado a expressão de genes marcadores relacionados á mineralização. Os resultados mostravam a formação de nódulos mineralizados pela matriz dentinária, confirmados por microscopia de contraste de fase, após o 7º dia de cultivo, e marcados com corante *von Kossa* aos 14, 21 e 28 dias. Os autores concluíram que o suplemento de mineralização (ácido ascórbico com  $\beta$ -glicerofosfato) associados ao extrato dentinário sinergicamente induziram a diferenciação das células-tronco pulpares humanas (DPSCs) em tipos celulares semelhantes a odontoblastos e foram capazes de induzir a mineralização das culturas *in vitro*.

O contato entre células e matriz dentinária é essencial para a manutenção da morfologia e função dos odontoblastos. Quando os odontoblastos são removidos do contato com a dentina e cultivados isoladamente, eles passam a exibir apenas a morfologia de fibroblastos (Sloan et al., 1998). No entanto, é possível substituir a matriz dentinária natural, com preparações de componentes isolados da matriz extracelular para manutenção da morfologia e diferenciação dos odontoblastos (Smith et al.,1994). Durante a diferenciação celular, várias mudanças no citoesqueleto ocorrem e uma rede de moléculas da matriz está envolvida na polarização funcional dos odontoblastos. Os componentes da matriz dentinária funcionam como a membrana basal nos estágios iniciais de citodiferenciação durante o desenvolvimento do dente.

A matriz orgânica da dentina é constituída por proteoglicanas, metaloproteínas, proteínas de natureza colágena cujo constituinte mais abundante é o colágeno tipo I, por proteínas não-colágenas fosforiladas (DSP, DPP, DSPP), e por proteínas não-colágenas não fosforiladas, como as osteocalcina, osteopontina, osteonectina, amelogenina, enamesina, proteína-1 da matriz óssea (do inglês: *bone matrix-protein-1*, DMP-1). Estes componentes são importantes para a indução da diferenciação dos odontoblastos, tanto na dentinogênese primária como na terciária (Tziafas et al., 2000; Goldberg e Smith, 2004).

A proteína Dentina-Matriz- 1 é expressa tanto em dentina como no osso. O gene que a codifica se localiza no *locus* do gene da proteína dentino-sialofosfoproteína, mesma região gênica que identifica o defeito da dentinogênese imperfeita tipo II. Esta proteína está fortemente relacionada com o crescimento dos cristais durante a formação da dentina. DSPP e conseqüentemente DSP e DPP, DMP-1, sialoproteína óssea (do inglês: *bone sialoprotein* – BSP), oteopontina (*osteopontin* - OPN), MEPE (do inglês: *Matrix Extracellular Phosphorilated protein*) e enamalina (*enemalin*) fazem parte do grupo da família SIBLING (do inglês: *Small Integrin-Biding Ligand N-Linked Glycoproteins*), identificadas como envolvidas na odontogênese.

DSPP, DSP, DPP e DMP-1 têm sido fortemente consideradas como marcadores específicos da dentina e de odontoblastos secretores (Goldberg e Smith, 2004; Liu, H. et al., 2006).

Apesar das cinco classes de morfogens estarem envolvidas no desenvolvimento embriogênico do dente, as BMPs exercem a maioria das sinalizações para a regeneração dentária. (Nakashima e Akamine, 2005).

As BMPs são moléculas pertencentes à super família dos fatores de transformação de crescimento beta (TGF- $\beta$ ), composta por 25 fatores moleculares e se apresentam sob duas formas: 1-proteínas morfogenéticas ósseas, e 2-proteínas morfogenéticas recombinantes. Participam no desenvolvimento de vários tecidos e órgãos, estão envolvidas na quimiotaxia, mitose e diferenciação de células mesenquimais dos tecidos ósseos (Santos et al., 2005). São fortes candidatas para terapia pulpar por serem responsáveis pela indução de osso e por apresentarem atividade condrogenética (Saito et al., 2004; Nakashima, 2005).

As BMPs são conhecidas por ativarem múltiplas vias de sinalizações relacionadas aos processos de biomineralização. Estas proteínas se ligam aos receptores tirosina/serina quinase e ativam o grupo *Smads* de moléculas de transdução de sinais. Uma vez ligadas, elas oligomerizam com mediador Smad4 e são translocadas ao núcleo onde dirigem a transcrição para resposta da célula á indução da BMP (Saito et al., 2004).

Podem ser subdivididas em quatro subfamílias: a primeira com BMP-2 e -4; a segunda com BMP-3 e BMP- 3B, conhecida como fator de crescimento e diferenciação 10 (do inglês: *growth/differentiation factor 10* – GDF-10); a terceira com BMP-5, -6, -7 e -8; e a

quarta são as Gdf-5,- 6 e -7 ou BMP-1, 2 e 3 derivadas da cartilagem (revisado por Soares et al.,2007). Dez membros da família BMPs (BMP-2, -4, -6, -7,- 8, Gdf-1, -5,-6, -7, -11) e GDNF (fator neuronal de crescimento e diferenciação glial, do inglês: *glial cell line-derived neurotrophic factor*) foram expressos em clones de células pulpares de ratos (Saito et al, 2004).

As BMPs são expressas na fase embriogênica do capuz e campânula, e estão associadas pela diferenciação de ameloblastos e odontoblastos. A BMP-4 induz a atividade odontogênica do ectomesênquima da papila dental. As BMPs-2, -4, -6,-7, Gdf-11 são expressos durante a diferenciação dos odontoblastos enquanto que as BMPs-4 e -5 são expressas durante a diferenciação dos ameloblastos (Nakashima e Akimine, 2005; Soares et al., 2007).

A super-família de fatores de crescimento incluem fatores betas de crescimento (TGF- $\beta$ ), ativinas e proteínas morfogenéticas (BMP).

Os fatores transformadores de crescimento beta (TGF- $\beta$ ) regulam uma variedade de funções celulares incluindo proliferação, determinação do destino celular, diferenciação, motilidade, adesão, apoptose, formação de matriz extracelular. Desempenham papel importante na reparação e regeneração tecidual. Os membros desta família exercem seus efeitos pela ligação de receptores transmembrana serina/teorina quinases, e classificados em tipos I e II. Os tipos celulares da polpa dental expressam esses receptores, e a compreensão destes eventos moleculares são de grande importância para a compreensão dos processos de reparação dentinária e pulpar. (Toyono et al., 1997; Soares et al., 2007). TGF- $\beta$ s tem sido relatados na diferenciação dos odontoblastos e conseqüentemente participam da mineralização dentinária *in vivo* e *in vitro* (Toyono et al., 1997; Huojia et.al,2005; Soares et al., 2007).

Sloan e Smith (1999) demonstraram que, ao inocularem ímãs impregnados com TGF $\beta$ -1, -2 e -3 na camada odontoblástica, foi possível verificar a secreção de pré-dentina e um aumento da densidade das células da camada sub-odontoblástica pela ação das TGF $\beta$ -1 e 3, mas não pela TGF $\beta$ -2 (Toyono et al., 1997; Huojia et al.,2005).

Dos fatores transformadores de crescimento, TGF $\beta$ -1 é o mais importante fator envolvido na reparação dental, pois é sobre-regulado pelas células recrutadas para o sítio da injúria. Juntamente com algumas citocinas antiinflamatórias, TGF $\beta$ -1 estimula subunidades

de integrinas que facilitam a migração das células que vão iniciar a diferenciação em odontoblastos e outros tipos celulares comprometidos com a cura do tecido afetado (Mitsiadis et al., 2004). Outra ação do TGF $\beta$ -1 é a estimulação da sobre-regulação de NGF pelos odontoblastos. As terminações nervosas sensoriais são sensíveis aos sinais liberados durante a injúria dental, resultando num rápido crescimento neural no sítio da lesão.

Os membros FGF atuam em vários gradientes de diferenciação durante a odontogênese. FGF-2 em associação com outros fatores de crescimento liberados da matriz dentinária, assim como células endoteliais e células atingidas pela lesão, promovem angiogênese e podem ser mitogênicas para células progenitoras pulpar (Goldberg e Smith, 2004; Mitsiadis e Rahiotis, 2004).

Shh (do inglês: *sonic Hedgehog*) é uma das três proteínas pertencentes à família *Hedgehog* de transdução de sinais dos vertebrados, responsáveis pelo controle da divisão celular de células-tronco adultas, e o único ligante expresso nas células pulpares nos estágios iniciais da odontogênese. Possui atuação importante na regulação da proliferação e manutenção das células durante o desenvolvimento do germe dentário (Soares et al., 2007). Shh e a via Wnt sinalizam os locais de formação dos futuros germes dentários, na lâmina dentinária. (Zhang et al., 2005).

Estruturas do cito-esqueleto, como filamentos intermediários (nestina, queratina, desmina, vimetinas), comunicação célula-célula, moléculas de adesão da família das CAMs (*cell adhesion molecules*), como as caderinas, são importantes para organização e função das células nos tecidos, para o controle da divisão celular, migração e diferenciação celular (Goldberg e Smith, 2004; Srisuwan et al., 2006).

Nestina, por exemplo, é expressa por odontoblastos e fibroblastos durante a odontogênese, na região das cúspides. Sabe-se que os fatores de necrose tumoral (TNF) são importantes na formação das cúspides dos molares (Soares et al., 2007). Quinesina, miosina e actina, desempenham papel importante no processo de reparação da dentina. Foi demonstrado que nos sítios de injúria na camada odontoblástica, há uma super-expressão de proteína ligante de fibronectina, uma glicoproteína importante para adesão celular e organização do cito-esqueleto, sintetizada pelos odontoblastos reorganizados e envolvidos com a síntese de colágeno e dentina regenerativa (About, 2000; Mitsiadis e Rahiotis, 2004).

Além da participação destas moléculas e fatores de crescimento na odontogênese, dentinogênese natural e terciária, é necessária a presença de um molde ou guia de matriz extracelular (do inglês: *scaffold*) para a restauração funcional das estruturas do dente. (Buurma et al., 1999; Young et al., 2002; Duailibi et al., 2004; Nakashima e Akimane 2005).

O *scaffold* proporciona condições biológicas e fisicoquímicas tri-dimensionais para o crescimento e diferenciação célula, promovendo adesão e migração celular. Serve como transportador de morfogens e proteínas em terapia celular. Com característica, devem ser biocompatíveis, efetivos no transporte e refugio de nutrientes e de oxigênio, proporcionar resistência física e mecânica. São gradualmente reabsorvidos, sendo substituídos por tecido regenerativo, retendo a característica final da estrutura reconstruída. (Young et al., 2002; Nakashima e Akamine, 2005; Srisuwan et a., 2006; Soares et al., 2007).

*Scaffolds* podem ser constituídos de polímeros naturais, como o colágeno e glicosaminoglicanas, sendo bastante bioativos e biocompatíveis, ou serem constituídos de polímeros sintéticos, como os confeccionados com ácido poli-lático (do inglês: *poly lactic acid*, PLA). Outros co-polímeros são utilizados na estrutura dos *scaffolds*, como, por exemplo, os de ácido poli-glicólico (do inglês: *poly glycolic acid*, PGA), ácido lático poli-glicólico (do inglês: *poly lactic-glycolic acid*, PGLA). Os hidrogéis sintéticos também são utilizados para adesão celular, incluindo polímeros de polietileno glicol (do inglês: *poly ethylene glycol*, PEG), e aqueles modificados com peptídeos de adesão celular como arginina, glicina e ácido aspártico. *Scaffolds* contendo componetes inorgânicos como hidroxiapatita associada ao tricalcio-fosfato (HA/TCP) são mais utilizados para suporte da reconstrução de tecido ósseo. Matriz de matrigel, um composto rico em componentes da membrana basal, arcabouços contendo fibrina e fibriogênio são outras apresentações utilizadas nos *scaffolds* para a engenharia de tecidos como para tecido neural, tecido adiposo e tecido esquelético (Buurma et al, 1999; Gronthos et al., 2000-2002; Young et al., 2002; Batouli et al., 2003; Duailibi et al., 2004; Nakashima e Akimane, 2005; Srisuwan et al., 2006; Soares et al., 2007).

Buurma et al. (1999) e Mooney et al. (1996) demonstraram que fibroblastos de polpa dental humana e fibroblastos gengivais aderem em *scaffolds* sintéticos de ácido poli-glicólico (PGA), sobrevivem e secretaram colágeno tipo I, fibronectina celular e expressaram genes de sinalização para transdução de sinais das BMP-2, -4, e -7 (osteopontina -1). Estas constuções tri-dimensionais são indicadas para formação de tecidos e substituição de defeitos

ósseos. Os autores ressaltam que os tecidos de conexão da polpa dental e gengiva contêm células que respondem aos sinais das BMPs para a formação ectópica de osso.

Batouli et al. (2003), comparando a osteogênese e odontogêneses mediados por BMSSCs e DPSCs, transplantaram estes grupos celulares em *scaffolds* contendo HA/TCP em ratos imunocomprometidos e observaram que após quatro semanas, BMSSCs e DPSCs se diferenciaram em osteoblastos e odontoblastos gerando osso e dentina, respectivamente. Elevada expressão do fator de crescimento básico de fibroblastos (bFGF) e da matriz metatoproteinase - 9 (MMP-9) foi observada associada com a formação da medula hematopoiética nos transplantes de BMSSCs. Nos transplantes com DPSCs foi observada forte expressão de dentino-sialoproteína, e formação de estrutura semelhante à dentina reparadora sobre a estrutura de dentina humana em cultura.

Uma grande variedade de genes e moléculas tem sido identificada no processo de desenvolvimento do elemento dentário, assim como para os processos para dentinogênese natural e regenerativa.

Saito et al. (2004) testaram a hipótese de que a diferenciação de células-tronco pulparem em odontoblastos pode ser acelerada por moléculas de sinalização, como estratégia de capeamento pulpar, particularmente as que contêm BMPs. Utilizando o método de cultivo do fragemento de tecidos pulparem humanos, os pesquisadores adicionaram rhBMP-2 (recombinante) na cultura celular, em quantidades de 0, 10, 100 e 1000 ng/mL. As células mudaram pouco de padrão morfológico, a atividade de fosfatase alcalina (marcador de biomineralização) foi mensurada, e a expressão de mRNA de DSPP (marcador de odontoblastos) foi verificada por PCR. O crescimento celular dos grupos com e sem rhBMP não variou significativamente, mas a atividade de fosfatase alcalina foi mais que o dobro para o grupo que recebeu rhBMP-2, para as concentrações de 0 a 100 ng/mL. Nas culturas que receberam a proteína recombinante a expressão de DSPP foi significativamente maior comparada com o grupo que foi cultivado sem rhBMP-2, sugerindo que BMP-2 promove a diferenciação de células pulparem em odontoblastos, portando se apresenta como promissor material de capeamento pulpar biocompatível, com capacidade de indução de dentina reparativa.

Bleicher et al. (2001), relacionaram cDNAs para diversos genes específicos expressos por odontoblastos, e ressaltaram a expressão de alguns genes implicados na

diferenciação de odontoblastos, tais como o PHEX (do inglês: *PHosphate-regulating gene with homologies to Endopeptidase, on X-chromosome*), expresso pelos odontoblastos alinhados na interface dentina-polpa. Outro gene muito expresso foi a osteoadarina, que é uma proteína pertencente a família de proteoglicanas SLRP (do inglês: *Small Leucine-rich Proteoglycan*), relacionada com o processo de citodiferenciação e na polarização dos odontoblastos, com grande afinidade pela hidroxiapatita. MAP1B (do inglês: *Microtubule-associated Protein 1B*) pertencente a família de proteínas associadas com a organização dos microtúbulos dentro das células e relacionadas com a diferenciação neuronal regulando a dinâmica do desenvolvimento dos microtúbulos no crescimento dos axônios e células dendríticas (organização do citoesqueleto), também apresentou elevada expressão quando sintetizada por odontoblastos em cultura.

A Reelina, uma glicoproteína da matriz extracelular específica para região do cérebro, mas também expressada por odontoblastos de dentes humanos, tendo sido sugerida como estar envolvida na diferenciação e orientação das fibras nervosas na polpa dental e/ou na manutenção da relação nervosa terminal com o processo odontoblástico (Srisuwan et al., 2006).

A elucidação dos mecanismos moleculares e bioquímicos envolvidos no processo de desenvolvimento das estruturas dentárias (polpa, esmalte e dentina) e dos tecidos de suporte (ligamento periodontal e osso alveolar) é de extrema importância para os avanços em engenharia tecidual e para a prática regenerativa em odontologia do futuro.

### **3.4 - Caracterização e localização das células-tronco em polpas dentárias**

Células-tronco podem ser isoladas de uma população heterogênea de células basicamente pela utilização de quatro técnicas: 1- marcação das células com anticorpos específicos, usando citômetro de fluxo, num processo denominado de separação celular por anticorpo fluorescente (do inglês: *fluorescent antibody cell sorting* - FACS); 2- seleção imunomagnética; 3- marcação imunohistoquímica e 4- avaliação histológica e fisiológica, incluindo fenótipo, quimiotaxia, proliferação, diferenciação e atividade mineralizante (Zago e Covas, 2006; Murray et al., 2007).

A caracterização das células-tronco permanece ainda pouco definida, uma vez que não existem muitos marcadores específicos para este grupo de células.

Culturas com polpa dental de dentes humanos passaram, bem recentemente, a serem reproduzidas, testando grande variedade de marcadores celulares para identificação de supostas populações de células-tronco, também como a aplicação de fatores de crescimento/diferenciação, comparando com a referência controle de células-tronco do estroma de medula óssea, BMSSCs.

Para determinar a existência destas populações celulares, os pesquisadores ampliaram as metodologias que tinham sido previamente desenvolvidas para isolamento e caracterização de células-tronco de estroma da matriz de medula óssea, as BMSSCs (do inglês: *bone marrow stromal stem cells*) (Gronthos et al, 2000-2002; Miura et al., 2003; Gregório et al.,2005; Shi et al., 2005).

Em um estudo preliminar para caracterização das células envolvidas no processo de reparação dentinária, Stanislawski et al. (1997), acreditaram ter desenvolvido um método de avaliação morfológica e histoquímica pelo cultivo do fragmento de tecido pulpar ( do inglês: *culture explant*). Eles investigaram estas características nas células que se dispersaram em estágios bem iniciais de crescimento, logo nos primeiros dias de dispersão celular (até 10 dias de cultivo), antes da diferenciação em fibroblastos. Como recurso para caracterização, foi utilizado a imunomarcagem com substratos corantes para avaliar a atividade da enzima fosfatase alcalina. Os autores concluíram (através da avaliação da mobilidade e morfologia) que as células que migram do *explant* são células mesenquimais relacionadas com fagócitos e histiócitos mononucleares.

A associação de FACS e CD34 é uma técnica largamente utilizada para separação de células-tronco humanas CD34<sup>+</sup> de células do sangue periférico, do cordão umbilical e de muitas culturas celulares (Murray et al., 2007).

Apesar dos estudos apontarem como marcador de células-tronco, o papel funcional do CD34 ainda não está bem definido. O CD34 é uma proteína de superfície integral altamente glicosilada, e tem sido demonstrada como reguladora das propriedades de adesão diferenciação citocina-dependente e proliferação das células-tronco hematopoiéticas e de células progenitoras endoteliais. A atividade do CD34 é medida através da sua interação com o domínio SH-3/SH-4 de uma proteína intracelular das células-tronco do CD73,

expresso principalmente nas células-tronco mesenquimais. O Potencial sítio de ligação com SH3 se encontra nos aminoácidos Glu325 a Ser334 (Gangenahalli et al., 2005; Abbas, 2007).

Os atuais estudos são controversos quanto ao conjunto de marcadores para identificação de células-tronco da polpa. A caracterização fenotípica das células-tronco de origem mesenquimais requer um conjunto de anticorpos.

As CTM expressam os seguintes antígenos de superfície: o CD105 (endoglina, que está relacionado com as células progenitoras endotelial); com os anticorpos monoclonais de CTM denominado SH-2 (CD105), SH-3 e SH-4 no CD73 (marcador de subpopulações de células B e T, células dendríticas e células dos centros germinativos); os STRO-1 e o CD90 (Thy-1, negativo para progenitores hematopoéticos e positivo para CTM). Não expressam os marcadores de células hematopoéticas (CD45, CD34, CD14), assim como não expressam os marcadores de células endoteliais (KDR e VE-caderina) e os antígenos do complexo de histocompatibilidade principal de classe II (HLA-DR) (Zago e Covas, 2006).

Para estabelecer a caracterização e localização das células mesenquimais de polpa dental, diversos marcadores celulares têm sido testados, para a compreensão das análises fenotípicas das culturas celulares expandidas *ex vivo*.

Em estudo para identificar a eficácia de células-tronco mesenquimais (MSC) em regenerar e reparar estruturas dentais, Shi et al. (2005), demonstraram que SHED/DPSCs/PDLSCs expressam grande variedade de marcadores heterogêneos associados com a atividade de células mesenquimais indiferenciadas, como para dentina, osso, músculo, tecido neural, endotélio e tendão.

Em vários estudos, BMSSCs/SHED/DPSCs/PDLSC demonstraram perfis de expressão gênica em comum para uma grande variedade de antígenos associados à formação de endotélio (CD106, CD 146); do tecido perivascular (3G5); para músculo liso ( *$\alpha$ -smooth muscle actin*) para osso (BMPs, fosfatase alcalina, colágeno tipo I, osteocalcina, osteopontina, sialoprotéina óssea); para fibroblastos (que expressam o colágeno do tipo III). As PDLSC reagiram aos marcadores para tendão (do inglês: *Scleraxis*) (Gronthos 2000-2002; Seo et al., 2004; Saito et al., 2004; Priam et al., 2005; Iohara et al 2006; Murray et al., 2007). Também expressaram perfis gênicos para CD44 (marcador de adesão de células mesenquimais) e CD117 ou c-kit (marcadores para células-tronco).

Estas mesmas culturas primárias falharam ao reagir com marcadores hematopoiéticos CD 14 (monócito/macrófago), para o CD45 (leucócito), CD34 (células-tronco/progenitoras hematopoiéticas), MyoD (para músculo liso), neurofilamentos, colágeno tipo II (cartilagem). (Shi et al., 2005; Gronthos et al., 2000-2002).

O CD117 é ressaltado por Laino et al. (2006) por ser um marcador celular para células-tronco, pois interage com fator SCF (do inglês: *stem cell factor*) e com precursores de células de crista neural. O CD117, ou c-kit, tem sido apontado com um evidente marcador precoce de células-tronco.

Estudando a expressão do fator de células-tronco e seu receptor CD117, em células mesenquimais humanas da cavidade oral, Gagari et al. (2006) realizaram a primeira avaliação sistemática em que o c-kit é estudado nos níveis transcricionais, translacionais e pós-translacionais em células de origem mesenquimal. *Stem cell factor* é um importante fator de crescimento hematopoiético, que se liga e ativa o CD117, um receptor tirosina-quinase classe III. A proteína tirosina-quinase (do inglês: *tyrosine-kinase-III*) é uma enzima quinase que regula a maioria das vias celulares envolvidas em transdução de sinais e a transmissão de sinais intercelulares para o crescimento, proliferação, diferenciação celular e recrutamento de células progenitoras em vários sistemas biológicos. Os receptores tirosina-quinase são receptores celulares de alta afinidade para vários fatores de natureza polipeptídica, como fatores de crescimento, citocinas, e hormônios. Regulam processos celulares normais e estão envolvidos na evolução de cânceres. Os receptores tirosina-quinase constituem uma família com mais de vinte classes, entre eles se incluem os fatores de crescimento de fibroblastos, epidermal, de insulina, vascular endotelial e o fator de células-tronco (Gagari et al., 2006; Abbas, 2007).

A expressão, em comum, de proteínas ou perfis gênicos, implica na existência de um padrão igualmente em comum para moléculas sinalizadoras de formação de osso, dentina e cimento, reguladas por fatores de transcrição e fatores de crescimento (Gronthos et al., 2000, Tziafas et al., 2000, Mitsiadis e Rahiots., 2004; Morsczech, 2006).

Investigando a habilidade de diferenciação odontogênica entre DPSCs de células apicais de folículos dentários da dobra cervical de incisivos de ratos e BMSSCs *in vitro*, Yu et al. (2007) descreveram, em técnicas imunocitoquímicas, perfis semelhantes de expressão de ALP (do inglês: *alkaline phosphate*), um marcador positivo para odontoblastos; do bFGF

(do inglês: *basic fibroblast growth factor*) e de Col III (do inglês: *type III collagen*), marcadores positivos para fibroblastos; do fator VIII, um marcador para células endoteliais; STRO-1 e vimetina que são marcadores positivos para células-tronco mesenquimais.

A caracterização da dentinogênese nas células progenitoras isoladas da polpa dental requer investigação com marcadores de fenótipos. Estes marcadores incluem proteínas colágenas e não colágenas.

Como exemplo, temos Colágeno tipo I, que é o componente mais abundante da matriz dentinária e promove um substrato para a deposição de cristais de hidroxiapatita. A DPP (dentino-fosfoproteína) é a proteína não colágena mais abundante e está relacionada com a iniciação da formação dos cristais de hidroxiapatita dentro das fibrilas de colágeno, como também regula a formação destas fibrilas.

A dentino-sialoproteína é uma glicoproteína rica em ácido siálico que exerce papel regulador da mineralização dentinária. DSP e DPP têm sido proteínas consideradas como reguladoras da biomineralização. DSP é expressa por odontoblastos jovens, e DPP é outro marcador específico para dentina, proteína mais expressa e localizada nos odontoblastos funcionais (secretores). Outra proteína importante, de constituição não-colágena, a sialoproteína óssea (do inglês: *bone sialoprotein- BSP*), também exerce função na nucleação dos cristais de hidroxiapatita. (Bianco et al., 1991; Liu et al., 2005; Kikuchi et al., 2004) (Onishi et al., 1999; Shi et al., 2001; Nakashima et al., 2002; Batouli et al., 2003; Seo et al., 2004; Iohara 2004; Almushay et al, 2006).

Utilizando células mesenquimais da papila dental de murinos, Kikuchi et al. (2004), desenvolveram um sistema tridimensional de cultivo do tipo *organ explant* consistindo de dois tipos de colágeno tipo I em uma matriz de matrigel. As células de incisivos mandibulares de ratos foram incubadas com matriz extracelular artificial, onde a diferenciação em odontoblastos e células formadoras de dentina tubular foram registradas, expressando os marcadores de DSPP e DMP-1, reforçando a expressão destes marcadores para identificação fenotípica dos odontoblastos diferenciados (Almushay et al, 2006).

Como investigação de supostas células-tronco no ligamento periodontal (PDLSCs), Seo et al. (2004), isolaram células de ligamento periodontal de terceiros molares humanos. Os resultados mostraram que as PDLSCs expressaram marcadores celulares específicos para células-tronco (STRO-1, CD146, Muc18), quando cultivadas *in vitro* se

diferenciaram em células tipo cementoblastos, adipócitos, e colágeno. Ao serem transplantadas em ratos imunocomprometidos, PDLSCs mostraram capacidade de gerar estrutura do tipo cimento/ligamento periodontal e contribuíram para a reparação de tecido periodontal. Este estudo forneceu bases para futuras utilizações terapêuticas destas células na reconstrução do tecido periodontal.

Para avaliar as características de células-tronco de ligamento periodontal, Kramer et al. (2004), utilizando uma combinação de imunohistoquímica e *in situ* hibridização em co-culturas de 7 a 21 dias com PDLSCs, observaram significativo aumento de expressão de osteocalcina, osteoporina e significativo decréscimo de sialoproteína óssea. Concluíram que PDLSCs podem induzir a formação de estruturas com características do tipo ligamento periodontal e acreditam nas possibilidades de utilizações terapêuticas.

Em um estudo para verificar se as células-tronco de polpa dentária e sua linhagem de osteoblastos diferenciados mantinham suas propriedades de diferenciação e morfofuncionais após serem crio-preservedas por um período de dois anos, Pappacio et al., (2006) observaram que as células-tronco descongeladas voltaram a formar colônias aderentes após 12 horas de cultivo e recomeçaram a proliferar após 48 horas. Utilizando a citometria de fluxo, as células voltaram a expressar os marcadores anti- CD117 (marcador que reconhece um receptor tirosina-quinase para células-tronco), anti-CD34 e STRO-1 (ambos marcadores de precursores de células hematopoiéticas, de células endoteliais das vênulas do alto endotélio), anti-CD45 (marcador de células linfócitos T, para excluir a possibilidade de fonte hematopoiética) e anti-flk-1 (marcador de receptor do fator 1 de crescimento endotelial). A análise no FACS, de células CD117<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>/STRO-1<sup>+</sup>/flk-1<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>, demonstrou que os resultados foram compatíveis com os achados obtidos com as células frescas, e estavam de acordo com as análises de Laino et al. (2005) e D'Aquino et al. (2007), sendo este protocolo designado como critério de identificação de células indiferenciadas.

Ainda neste trabalho, Papaccio et al. (2006) estabeleceram a caracterização para as células diferenciadas. As células-tronco frescas caracterizadas e separadas inicialmente no FACS, antes de serem congeladas, foram cultivadas em meio de cultura com 20% de soro fetal bovino até se diferenciarem em osteoblastos (Laino et al., 2005-2006; D'Aquino et al., 2007). Depois de igual período de congelamento, foram recuperadas e apresentaram capacidade de secretarem matriz extracelular e produziram osso trabeculado. Em seguida

foram novamente caracterizadas. Estas células foram negativas para os anticorpos CD117, CD34, e flk-1, e para CD14 (marcador específico para monócito), indicando o estado de diferenciação terminal preservado.

Vários antígenos de superfície têm sido usados como marcadores de células-tronco e para seu isolamento de outros tecidos.

Em particular o STRO-1 que é um antígeno de superfície que pode ser isolado de um grupo homogêneo de células-tronco mesenquimais capazes de formar colônias formadoras de fibroblastos *in vitro*. Foi um dos primeiros anticorpos utilizados para marcação de células-tronco, sendo uma glicoproteína de superfície presente em células estromais da medula óssea e nas células-tronco mesenquimais (Zago e Covas, 2006; Renard et al., 2007). Isoladamente o STRO-1 não é suficiente para obter uma população pura de células-tronco. A utilização recente de STRO-1 em combinação com anticorpos relacionados à molécula-1 de adesão vascular (do inglês: *vascular cell adhesion molecule-1*, VACAM-1) e com anticorpos que reconhecem receptores de adesão celular (CD44), têm sido aplicados para isolar, por citometria de fluxo, populações de células-tronco com alto potencial clonogênico e de multilinhagem. As células isoladas do tecido pulpar utilizando esta técnica, expressaram marcadores associados com endotélio, músculo liso, osso e fibroblastos. O antígeno CD44 também é expresso por estas células e tem sido reportado em células-tronco de medula óssea e polpa dental. É uma glicoproteína transmembrana expressa na matriz extracelular e na superfície de células endoteliais, mesenquimais e hematopoéticas. Está associada com adesão celular, e se liga aos componentes da matriz dentinária como fibronectina, laminina, colágeno e hialurona. Também é expresso por fibroblastos gengivais, tecido epitelial gengival e no ligamento periodontal. Por ser um marcador heterogêneo, não pode ser considerado isoladamente como um marcador específico para células-tronco (Gronthos et al., 2000-2002, Chen et al., 2006; Abbas, 2007).

Com a finalidade de identificar células-tronco mesenquimais no ligamento periodontal de dentes saudáveis e com periodontite, Chen et al. (2006) utilizaram a marcação com anticorpos monoclonais de camundongos anti-STRO-1, CC (anti-CD146) e anti-CD44 (Gronthos et al., 2002, Seo et al., 2004). Células STRO-1 positivas foram detectadas nas porções médias e apicais dos ligamentos periodontais radiculares e cemento radicular nos dentes afetados por periodontites, e na região perivascular perto do ápice nos dentes

saudáveis. O anti-CD146 e anti-CD44 foram observados nas áreas coronárias, nas furcações radiculares e nas superfícies radiculares tanto de dentes hígidos como com periodontite, sendo que para os três antígenos, houve maior expressão nos ligamentos dos dentes afetados pela doença periodontal.

Ao investigar a capacidade de mineralização das células pulpares e de identificar potenciais marcadores de diferenciação para odontoblastos, Wei et al. (2007) observaram, em seus resultados, que mais de 90% das células-tronco isoladas de dentes molares humanos expressaram características imunofenotípicas semelhantes com as de células-tronco mesenquimais de medula óssea, ou seja, foram positivas para CD29, CD44 e para marcador de células endoteliais, o CD146. Mais de 20% das amostras expressaram o marcador de células-tronco mesenquimais, o STRO-1. As DPSCs foram negativas para a expressão de marcadores hematopoiéticos como os CD34, CD45 e CD133 (um marcador inespecífico para células-tronco).

Semelhante conclusão, nas análises imunofenotípicas destes antígenos de superfície, chegaram Ikeda et al. (2006) em um estudo da diferenciação osteogênica de células mesenquimais da papila de terceiros molares humanos. Os autores constataram por FACS que as células isoladas apresentaram-se negativas para marcadores hematopoiéticos (CD14, CD34 e CD45) e foram positivas para marcadores presentes em CTM, como o CD29 (marcador de leucócitos T ativados), CD44, CD90, CD105, e CD166 (ALCAM – molécula de adesão de leucócitos T ativados).

Comparando as caracterizações morfológicas e fenotípicas (em citometria de fluxo) das células-tronco humanas de polpa dental (hDPSCs) com células-tronco humanas mesenquimais extraídas de medula óssea (hMSCs), Yamada et al. (2006) observaram as mudanças morfológicas e o potencial de diferenciação em multilinhagens. Tanto hDPSCs como hMSCs permaneceram indiferenciadas e, quando apropriadamente cultivadas, apresentaram diferenciação osteogênica, condrogênica e adipogênica. As hMSCs se apresentaram negativas para marcadores de linhagem hematopoética (CD34 e CD45) e para monócitos (CD14), sendo positivas para CD13, CD73, CD29, CD44 e CD105.

Com o propósito de caracterizar células isoladas de polpa dental de dentes permanentes, Huang et al. (2006a) avaliaram o potencial de crescimento e diferenciação destas células em superfície dentinária. Os pesquisadores isolaram células de polpa humana

por digestão enzimática e fibroblastos de gengiva humana, utilizando como controle uma linhagem de fibroblastos NIH 3T3. Para estimular a formação de nódulos mineralizados, às células foram cultivadas em meio de cultura ( $\alpha$ -MEM com 20% de soro fetal bovino) acrescido de dexametasona, associado a 1,25-dihydroxivitamina D3. Na presença ainda de ácido L-ascórbico e fosfatos inorgânicos, as células de polpa dental humana produziram nódulos minerais. Após a terceira passagem, foram avaliadas as proliferações em superfícies de dentina tratadas quimicamente e mecanicamente (com o intuito de reproduzir um polimento dentinário após tratamento endodôntico) para a remoção da *smear layer* e levadas para análise em microscopia eletrônica. O trabalho concluiu que mesmo apresentando pouco crescimento sobre a dentina *in vitro* as células apresentaram morfologia típica de odontoblastos, com processos citoplasmáticos se estendendo dentro dos túbulos dentinários e aderindo a esta superfície.

Com a intenção de avaliar, *in vitro*, a capacidade de diferenciação de células-tronco de polpas dentais de incisivos permanentes superiores de ratos Wistar, Zango et al. (2005) isolaram células-tronco utilizando marcador específico para identificar células mesenquimais, o STRO-1. Em seguida, estas células foram cultivadas, e amostras foram coletadas em 1, 5, 10, 14, 15, 21, e 28 dias. As amostras foram analisadas quanto à diferenciação clonogênica através de microscopia de luz, atividade de fosfatase alcalina, conteúdo de cálcio e RT-PCR para a dentino-sialofosfoproteína. Os resultados indicaram que as células de polpa dental foram STRO-1 positivas, os índices de proliferação celular, de atividade de fosfatase alcalina e de conteúdo de cálcio foram similares para as células-tronco da medula destes animais. Sob indução com fatores específicos, as células STRO-1 foram capazes de se diferenciar em odontoblastos e de formar nódulos calcificados de dentina, quando cultivadas em *scaffolds* ou arcabouços de orientação de formação tecidual.

A fim de avaliar novos modelos celulares que permitam a identificação do fenótipo de odontoblastos, e para identificar marcadores específicos de linhagem de odontoblastos, Priam et al. (2005) utilizaram células-tronco transfectadas pelo antígeno T do adenovírus SV40 de ratos em estágio embrionário de 18 dias. Neste estudo, foram analisados os fenótipos de três clones que sintetizaram as dentino-sialoproteína (DSP) e dentino matriz-proteína- 1 (DMP-1). Estas proteínas matriciais são também sintetizadas por osteoblastos. A proposta dos autores foi de isolar o gene específico do fenótipo odontoblástico e de melhor compreender as vias de sinalizações da diferenciação odontoblástica.

Estudando os vetores de estimulação da proliferação e diferenciação de células de polpa dental de caninos, em meio de cultura sem soro fetal bovino, suplementado com IGF-I e IGF-II, transferrina, e outros fatores de crescimento, Onishi et al. (1999) observaram que as células pulpares produziram colágeno do tipo I, sugerindo que sob estes estímulos podem se proliferar e diferenciar em células-tipo odontoblastos em meio de cultura sem soro fetal bovino (SFB). Ressaltaram que IGF-I e II (fatores de crescimento insulina I e II) são considerados importantes para o crescimento e diferenciação de células de polpa dental.

Em estudos com células-tronco de tecido pulpar de porcos, Iohara et al. (2006) constataram a habilidade de auto-renovação e diferenciação em multilinhagens pela conversão condrogênica, adipogênica e neurogênica, e demonstraram que houve estimulação de formação de dentina reparadora em transplantes autógenos induzidas pela proteína recombinante morfogênica, a rhBMP-2, que estimulou expressões da dentino-sialofosfoproteína (DSPP) e enamelisina (do inglês: *enamelysin*). Concluíram que a polpa estudada continha frações de populações de células indiferenciadas (do inglês: *side population of stem cells*), e que terapias associadas a BMP-2 podem ser de grande utilidade para regeneração dentinária.

Balic e Mina (2005) analisaram e caracterizaram o potencial de desenvolvimento de células pulpares derivadas de camundongos transgênicos (Coll1a1-3.6-GFP) e, compararam com células da medula óssea destes animais. Avaliaram a capacidade clonogênica e potencial de formação de minerais. As células pulpares foram cultivadas por 14 dias em meio específico para diferenciação de odontoblastos, contendo 50 µg/ml de ácido ascórbico e 4 mM de β-glicerofosfato. A eficiência de formação de colônias, após cinco dias de cultura, mostrou significativo aumento em relação ao potencial clonogênico das células derivadas da medula óssea. Ambas as amostras formaram depósitos minerais, com porcentagens de células alcalino-fosfatase positivas maiores para células da medula. O padrão da expressão da proteína verde fluorescente (GFP) nestes animais transgênicos foi expresso em baixos níveis nos odontoblastos polarizados, e ocorreram antes da formação dos nódulos minerais. Concluíram que os transgenes Coll1a1-GFP podem ser utilizados como marcadores precoces para células pulpares em cultura primária, antes da diferenciação terminal e funcional destas células.

Muito se tem investigado sobre os sítios de origem de células-tronco. Apesar de que muitas evidências tenham sugerido fortemente a presença de progenitores ou células-tronco na polpa dental, pouco se sabe acerca da ativação e migração destas células em resposta às injúrias provocadas aos odontoblastos.

Muitos autores têm utilizado incisivos de ratos como modelo para analisar certos aspectos da regulação de destinos e funções das células-tronco. Os incisivos de roedores apresentam crescimento contínuo através de toda a vida do animal. As células situadas no limite apical, mais precisamente, da alça apical cervical da coroa dental, têm a capacidade de se proliferarem e diferenciarem em várias células formadoras do órgão dentário, incluindo as células diferenciadas do mesênquima como odontoblastos secretores de dentina e de células diferenciadas de epitélio, como ameloblastos secretores de esmalte (Harada et al, 1999).

Realizando uma cultura do tecido ou parte de um órgão (do inglês: *organ explant*) da porção apical polpa de incisivos inferiores de ratos com dois dias de idade, Harada et al. (1999), demonstraram que as células-tronco de polpa dos roedores se situam na alça cervical da coroa dos incisivos inferiores, através da marcação do fragmento cultivado com BrdU (sigla do inglês: *5-bromo-2'-deoxyuridine*) e DiI [sigla do inglês: *1,1-dioctadecyl-6,6-di(4-sulfophenyl)-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine*]. Os autores observaram que as células marcadas deram origem a células progenitoras (do inglês: *transit-amplifying cells*), cuja progenia deu origem a ameloblastos formando matriz de esmalte. Através de ensaios de hibridização *in situ* observaram a expressão de genes da via de sinalização Notch e FGF-10, genes e moléculas implicadas na mediação das interações epitélio-mesenquimais que regulam a morfogênese e diferenciação celular das células do elemento dental. Concluíram que as supostas células-tronco expressaram Notch-1 se localizavam próximo á camada epitelial basal de células expressando *lunatic fringe*. *Lunatic Fringe* é uma molécula secretora envolvida na modulação da via de sinalização Notch em invertebrados. Ressaltaram a indicação do FGF-10 como um sinalizador mesenquimal que, além de estimular a divisão das células-tronco e sua progenia, podem regular o destino destas células, ou seja, FGF-10 além de ser um sinalizador para divisão celular determina a diferenciação em ameloblastos, podendo ser útil na identificação e localização das células-tronco nos estádios iniciais da odontogênese.

Para avaliar a localização das células-tronco mesenquimais somáticas em medula óssea e em polpa dental, Shi e Gronthos (2003) demonstraram que estas células residem na microvasculatura ou região perivascular dentro do seu tecido de origem. Eles isolaram BMSSCs e DPSC por imunoseleção com marcadores STRO-1 (que reconhece um antígeno de superfície nas células-tronco mesenquimais), assim como com 3G5 (para tecido perivascular) e CD146 (relacionado com a formação do endotélio).

Na periferia dos vasos sanguíneos residem as células denominadas miofibroblastos ou pericitos (células de *Rouget*). Estas células respondem às características de células-tronco (capacidade de auto-renovação e diferenciação), e são caracterizadas por marcadores do citoesqueleto, como o alfa actina do músculo liso, assim como com marcadores específicos do endotélio como os CD146 e 3G5 (também expressos pelas células cultivadas do tecido pulpar). Isto sugere a semelhança dos pericitos com células-tronco e reforçam a conclusão de que a localização das células-tronco está na região perivascular (Zago e Covas, 2006; Renard et al., 2007).

A ativação de células progenitoras de polpa dental humana também foi investigada por Tecles et al. (2005). Terceiros molares extraídos por indicações ortodônticas foram utilizados, realizando-se preparação cavitária com exposição da polpa e usando um análogo/marcador de nucleotídeo, o *5-bromo-2'-deoxyuridina* (BrdU). Depois de 01 dia de cultura, BrDU foi localizado nos núcleos de células nas áreas perivascular. Apesar de não ser conclusiva a localização predominante de células-tronco nas superfícies radiculares, estudos revelam que são mais abundantes no ligamento periodontal de dentes com periodontites, significando a ativação deste grupo para regeneração da área afetada. As supostas células-tronco devem responder a mudanças na matriz extracelular e citocinas inflamatórias. Através de subsequente diferenciação e proliferação vão contribuir para a cicatrização da área afetada (Seo et al., 2004; Chen et al., 2006).

Podemos concluir que a localização das células-tronco e células progenitoras (envolvidas em alguma diferenciação tecidual) da polpa dental destinadas a dar origem aos odontoblastos e ameloblastos ainda permanece pouco esclarecida. Mais pesquisas estão sendo complementadas para uma maior compreensão das análises de expressão de proteínas e dos padrões genotípicos das BMSSC, DPSCs, e SHED, a fim de melhor identificar os

mecanismos moleculares que regulam os processos de desenvolvimento do osso, dentina, cimento e ligamento periodontal (Yamada et al., 2006).

### **3.5 – Terapias regenerativas utilizando células-tronco de polpa dental**

As terapias convencionais de proteção e restauração do complexo dentino-pulpar ainda se baseiam largamente na utilização de materiais inertes, mesmo que biocompatíveis.

Várias técnicas têm sido testadas como alternativas terapêuticas atuais, como a utilização de partículas de dentina desmineralizada, componentes de matriz extracelulares (colágeno, fibronectina e cola de fibrina) e cimentos biocompatíveis de fosfato de cálcio (hidroxiapatita,  $\alpha$ 1 $\beta$ -tricalcium fosfato, tetracálcio e octacálcio) (Shi et al., 2005).

As abordagens mais sofisticadas de engenharia de tecidos incluem o uso de citocinas, proteínas morfogenéticas, fatores de crescimento e arcabouços ou moldes artificiais para auxiliar na regeneração endógena de tecido pulpar e facilitar a formação de dentina reparadora (Mooney et al., 1996).

Para a reparação de tecido periodontal, tem-se observado esforços dirigidos mais para a reparação de perda óssea alveolar, incluindo o uso de enxerto autógeno de osso corticalizado, matriz de osso homogêneo e heterogêneo, osso desmineralizado e/ou descorticalizado e liofilizado, como também o uso de materiais aloplásticos (partículas cerâmicas, hidroxiapatita, polímeros, biovidro) (Shi et al., 2005).

Ainda como alternativa a tratamentos convencionais para reparação de tecidos bucais, tem-se empregado tratamentos bem prósperos, incluindo terapia gênica e administração local de arcabouços ou guias (*scaffolds*) com a presença de fatores de crescimento como as BMPS, TGF $\beta$ , bFGF, PDGF, e IGF-1 (Shi et al., 2005; Murray et al., 2007).

Terapias voltadas à substituição e engenharia de tecidos, fundamentadas nos conceitos da biologia de células-tronco, têm emergido como estratégias de grande potencial na medicina e na odontologia regenerativa atual.

Recentemente, tem sido verificado o potencial do uso de ASCs da polpa dental de modelos animais e com polpa dental humana, como nova fonte de células-tronco. (Bowen et al., 2006, Gronthos et al., 2000-2002, Batouli et al. 2003, Miura et al., 2003).

Diversas pesquisas investigam o uso do tecido pulpar de dentes humanos como fonte de células-tronco multipotentes (Bowen et al., 2006), descritas como capazes de se auto-renovarem e de diferenciarem em tipos celulares diversos, apresentando eficiência clonogênica quando orientadas e estimuladas com fatores de diferenciação, tanto para formação de tecidos relacionados com as estruturas dentárias, como para outras estratégias e terapias em engenharia de tecidos. (Gronthos et al., 2000-2002).

Os estudos em odontologia foram inicialmente realizados com polpa de modelos animais com semelhanças genéticas aos seres humanos, levando em conta o padrão de respostas fisiológicas e imunocitológicas das células de polpa dental e de ligamento periodontal. (Harada et al., 1999; Zhang et al., 2005; Gronthos et al., 2000-2003; Otaki et al., 2007).

Estudo preliminar com células-tronco de polpa dental realizado em porcos foi capaz de isolar estruturas de elementos dentais (Young et al., 2002).

Em um estudo praticado com ratos, utilizando o protocolo desenvolvido por Young et al. (2002), uma pesquisa realizada por cientistas do Forysth Institute, da Escola de Medicina de Harvard, Boston, e do Departamento de Cirurgia do Hospital Geral de Massachusetts de Boston, em conjunto com professores da Universidade Federal de São Paulo, promoveram o crescimento de células tronco de dentes decíduos de ratos de quatro dias de vida, cultivadas em meio rico em biopolímeros por 6 dias *in vitro*, sendo implantadas no abdome de ratos imunocomprometidos. Após 12 semanas, os implantes foram analisados e as estruturas identificadas como do tipo complexo dentina-polpa. (Duailibi et al., 2004; Young et al., 2005).

Cultivando células da cavidade bucal humana e células de incisivos e molares da papila dental de ratos, Rynolds e Johada (2004), conseguiram induzir regeneração de folículo capilar e o crescimento da fibra capilar, enxertando estas células em regiões onde o bulbo capilar foi amputado e inativado. Os autores argumentam que o folículo piloso e o folículo dentário revelam similaridades em relação à base molecular e em relação a vários fatores

envolvidos no desenvolvimento destas estruturas. Este estudo tem a finalidade de comprovar a multipotencialidade de diferenciação das células de origem dentária e bucal.

Em estudos com células-tronco isoladas de polpa dental humana (DPSCs) e com células-tronco de medula óssea (BMSSC), Gronthos et al. (2000-2002), desenvolveram metodologia para a cultura *in vitro*, expansão *ex vivo* e transplantes em abdome de ratos, guiados por ósteo-condutores com partículas de hidroxiapatita/tricalciofosfato. Comparando estes grupos precursores de odontogênese e osteogênese respectivamente, observaram que quando transplantadas em tecido dorsal de ratos imunocomprometidos, DPSCs geraram estruturas identificadas como de complexo dentino-pulpar, circundada por tecido intersticial do tipo pulpar, em contraste com BMSSCs, que formaram osso lamelar constituído de osteócitos e superfície de camada de osteoblastos, circundado por tecido vascular fibroso com atividade hematopoiética e adipócita.

BMSSCs são células progenitoras de componentes de tecido esquelético como osso, cartilagens, estroma de suporte hematopoético e adipócitos. Além disso, podem experimentalmente se diferenciar em tipos não ortodoxos, possibilitando a formação de células neurais (neurônios) e células miogênicas (tecido muscular).

Transplantes *in vivo*, sob condições experimentais definidas, tem sido “padrão ouro” para a definição da diferenciação, pois se verifica, em transplantes locais para aplicações terapêuticas, a eficiência da reconstrução de defeitos ósseos bem como para os tecidos associados. Esta plasticidade garante para as BMSSCs a classificação como células-tronco, pela habilidade de se diferenciarem fenotipicamente em multi-linhagens diferentes das de sua origem tecidual (Bianco et al., 2001; Krebsbach et al., 2002). BMSSCs têm sido identificadas pela capacidade de se aderirem em cultura, e de formarem morfológicamente colônias de fibroblastos (Unidades Formadoras de Colônias de Fibroblastos – UFC-F; ou do inglês: *Fibroblast Colony-Forming Cells* - CFU-F). Cada colônia é originalmente derivada de expansão clonal de um progenitor celular da cultura primária simples, em meio de cultura suplementado com fatores de crescimento e maiores concentrações de soro fetal de bezerro (Castro-Malaspina et al., 1980; Shi et al., 2005).

Paralelamente, vários estudos recentemente identificaram populações de células-tronco derivadas de polpa dental de terceiros molares (DPSCs), de decíduos esfoliados (SHED) e de ligamento periodontal (PDLSCs), pela capacidade de gerarem colônias

clonogênicas aderidas e CFU-F, sob as mesmas condições de cultura das BMSSCs. (Gronthos et al., 2000-2002; Miura et al., 2003).

As recentes identificações de diferentes populações de células mesenquimais isoladas de tecidos craniofaciais e dos dentes ampliam o escopo de benefícios potenciais de MSC no auxílio da regeneração e reconstrução tecidual (Mao et al., 2005).

Várias terapias regenerativas do tecido pulpar têm sido sugeridas por diversos autores e testadas em alguns ensaios *in vitro* e *in vivo*. Alguns pesquisadores (Nakashima e Akamine, 2005; Mao et al 2006; Murray et al., 2007) identificaram áreas de investigação que podem ter aplicação no desenvolvimento de técnicas regenerativas nos tratamentos endodônticos. As técnicas envolvendo engenharia craniofacial surgiram nos últimos anos, a partir das décadas de 90, e apresentam substanciais avanços a partir das seguintes constatações:

1. Células-tronco têm sido isoladas e purificadas de vários tecidos da cabeça e pescoço e utilizadas na regeneração de estruturas craniofaciais;
2. Vários protótipos de reconstrução do côndilo mandibular humano têm sido fabricados com cartilagens integradas a camadas de osso lamelar obtido através de células-tronco mesenquimais;
3. Vários elementos do periodonto, incluindo o ligamento periodontal e cimento têm sido fabricados via abordagens celulares e moleculares;
4. Osso craniofacial tem sido fabricado de células-tronco associadas a fatores de crescimento e/ou biomateriais;
5. Tecido adiposo tem sido fabricado *in vivo* através de células-tronco mesenquimais com potencial uso em cirurgias de reconstrução plástica da face.
6. Revascularização dos canais radiculares via sobre-instrumentação do ápice para permitir o sangramento e nova irrigação;
7. Tratamento dos canais radiculares injetando na polpa revascularizada populações de células-tronco capazes de diferenciarem nas populações celulares pulpares (como fibroblatos, células endoteliais,

odontoblastos), utilizando células-tronco derivadas do próprio paciente (autólogas), ou células-tronco alogênicas purificadas de polpas dentárias livres de patologias, ou até mesmo enxerto de células-tronco xenogências expandidas em laboratórios;

8. Implantação de um tecido cultivado *in vitro*, semelhante à polpa dental, através de filtros e moldes de membranas biodegradáveis. Os tecidos de células agregadas e cultivadas nestes moldes são mais estáveis, e por necessitarem de vascularização só podem ser implantadas nas porções apicais dos canais radiculares limpos e em revascularização. A porção coronária do dente receberia um arcabouço capaz de suportar e mediar a proliferação e diferenciação celular. Ambos os sistemas receberiam a suspensão celular expandidas com fatores de crescimento, componentes da matriz dentinária e matriz extracelular, entre outros indutores de proliferação e diferenciação;

9. Implantação de *scaffolds* de arcabouço tridimensional, como os de matriz de hidrogel, promovendo substratos para a regeneração do tecido pulpar;

10. Terapia gênica pela utilização de novas técnicas envolvendo vetores virais e não virais capazes de liberar de genes, fatores de crescimento, morfogens e fatores de transcrição, para os sítios de regeneração tecidual.

Todas as propostas de terapias regenerativas utilizando células-tronco das estruturas dentárias sugerem o uso de vários fatores de crescimento e moléculas de sinalização que têm sido investigados para serem associados nas terapias de reconstrução dos tecidos pulpares e craniofaciais.

Os fatores de estimulação de colônias CSF (do inglês: *colony stimulating factor*), EGF (do inglês: *epidermal growth factor*) e FGF (do inglês: *fibroblast growth factor*) e IGF-I e IGF-II (do inglês: *insulin-like growth factor I e II*) podem ser utilizados para aumentar o número de células-tronco. TGF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ 1 têm sido usados para induzir o desenvolvimento epitelial e promover mineralização do tecido pulpar respectivamente. NGF (do inglês: *nerve growth factor*) promove o crescimento neural e sobrevivência celular (Onishi et al., 1999; Goldberg e Smith, 2004; Nakashima e Akamine, 2005; Murray et al., 2007).

Terapias gênicas têm sido empregadas para tratamentos envolvendo a liberação de moléculas dos fatores de crescimento, morfogenes, extrato da matriz extracelular, resultando em efeitos regenerativos, pois estes genes simulam ou induzem processos biológicos naturais envolvidos nas respostas regenerativas do tecido de interesse. Muitos podem ser transfectados diretamente para os tecidos. Por exemplo, a estimulação da angiogênese para a estimulação da vascularização em casos de insuficiência cardíaca tem sido demonstrada e aplicada nos ensaios pré-clínicos em humanos. As abordagens *ex vivo* envolvem a manipulação *in vitro* das células de um determinado tecido que são subsequentemente transplantadas para o sítio que se pretende regenerar, como em defeitos de cartilagem e osso utilizando células-tronco mesenquimais transduzidas com morfogenes e/ou fatores de crescimento (Nakashima e Akamine, 2005).

Para a diferenciação odontogênica os protocolos de cultivo sugerem a utilização de dexametasona no meio indutor. Para a diferenciação adipogênica, o meio indutor é suplementado com dexametasona, insulina e indometacina. Para a diferenciação osteogênica, o meio indutor consiste de suplementação com dexametasona e  $\beta$ -glicerofosfato. Para a diferenciação condrogênica o meio indutor não apresenta soro fetal bovino e é suplementado com TGF- $\beta$ , dexametasona e insulina-trasferrina-selenium. DPSCs e SHED apresentam a habilidade de diferenciação neural quando cultivadas em meio neuronal basal, suplementado com B27 e fatores de crescimento como FGF, TGF- $\beta$ , IGF entre outros (Novakovic e Freshney, 2006; Zago e Covas, 2006; Freshney, et al., 2007).

As abordagens para tratamentos regenerativos com a utilização das células-tronco superam as mais modernas alternativas encontradas em tratamentos reparadores e para a engenharia de tecidos da atualidade. Os avanços pretendidos pelos pesquisadores com células mesenquimais de origem dentária têm inspirado novas rotinas terapêuticas preventivas em promoção de saúde.

# *4. Material e Métodos*

#### **4.1 – Procedimento de obtenção das células de polpa dental**

Este trabalho foi realizado com polpas coletadas de dentes permanentes e decíduos no Instituto Maxilo-Facial LTDA.

Foram selecionados 20 terceiros molares humanos impactados e extraídos por indicação ortodôntica, de indivíduos adultos de 15 a 39 anos de idade, e 20 dentes decíduos em estágio final de esfoliação ou com extração indicada, de crianças entre 07 e 12 anos de idade. Os dentes foram extraídos após a obtenção da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (apêndice 1) diretamente com os pacientes doadores ou seus respectivos responsáveis.

Os pacientes foram examinados clinicamente e com documentação radiográfica, a fim de verificar as condições sistêmicas e locais de saúde. Foi realizada profilaxia prévia às exodontias, com pasta profilática e bochecho com solução de 0,12% de clorexidina por um minuto.

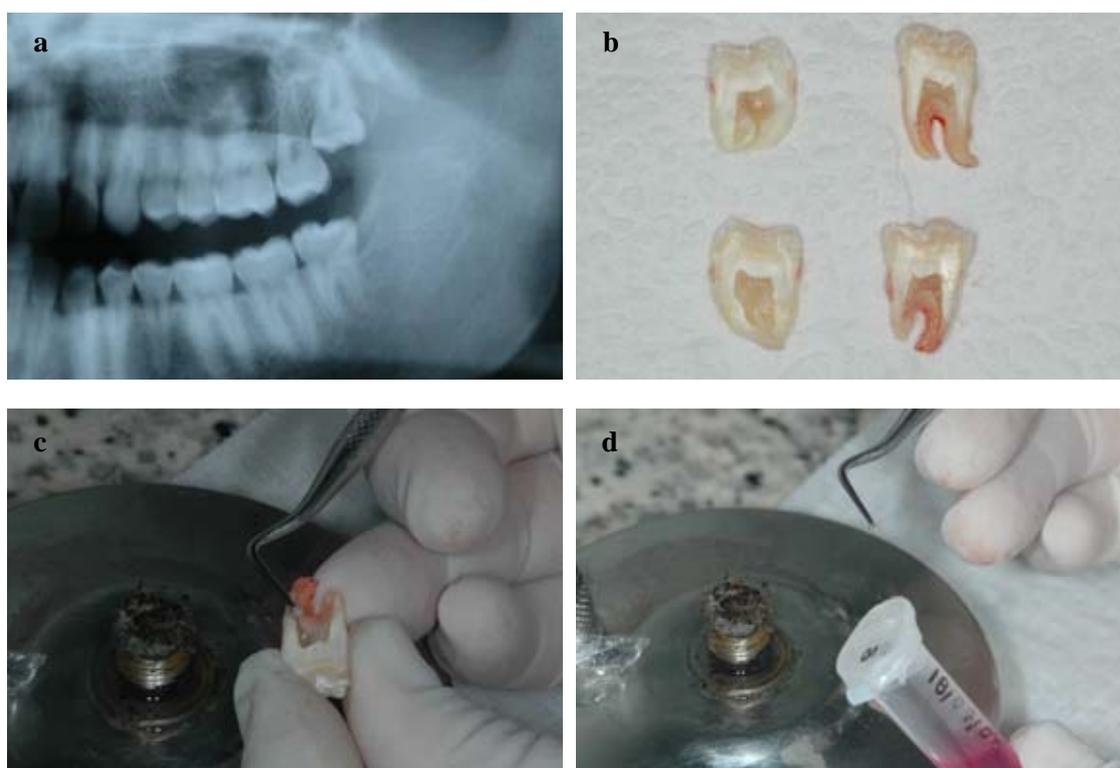
Foram incluídos na pesquisa elementos dentários hígidos, ainda na cavidade bucal, e o tecido pulpar foi coletado imediatamente após a remoção cirúrgica dos dentes.

Como fatores de exclusão não participaram do estudo dentes que apresentassem lesão de cárie de qualquer natureza (ativa ou crônica) independente do estágio de comprometimento das estruturas dentárias. Não foram considerados os elementos dentários com patologia pulpar e periodontal, dentes com formação cística ou que apresentassem pericoronarite. Não foram coletadas as polpas dentárias dos dentes decíduos e permanentes que apresentassem reabsorção interna e/ou externa avançada.

Imediatamente após cada exodontia, as polpas dentais foram obtidas seccionando o dente gentilmente (clivagem) com disco diamantado de dupla face (KG Sorensen, ref: 7020) até próximo à câmara pulpar.

O tecido pulpar foi cuidadosamente retirado e imerso em microtubos contendo meio de cultura DMEM (GIBCO-BRL), suplementado com 20% de soro fetal bovino (GIBCO-BRL) e acrescido de solução com 1% de antibiótico e antimicótico (GIBCO-BRL - 10000 unidades de penicilina G sódica, 10 mg de sulfato de estreptomicina, 25 µg de anfotericina B dissolvidos em 1mL de solução salina a 0,85%). Em seguida, os microtubos

foram transportados ao laboratório de Biologia Molecular, do Instituto de Biologia, da Universidade de Brasília.



**Figura 3: Coleta do tecido pulpar de dente permanente: (a) Radiografia panorâmica da região dos 28 e 38 na seleção dos dentes (permanentes) com indicação cirúrgica de extração; (b) Dentes após serem seccionados; (c) Remoção do tecido pulpar; (d) Colocação do tecido pulpar em microtubo de poliestireno para ser transportado e processado no laboratório.**

## **4.2 – Estabelecimento da cultura primária de CPdp e CPdd por dois métodos de isolamento**

No laboratório, o tecido pulpar coletado foi lavado em *Hank's Balanced Salt Solution* sem cloreto de cálcio, cloreto de magnésio ou sulfato de magnésio- HBSS (GIBCO-BRL).

Para a digestão enzimática, os tecidos coletados foram imersos em 1mL de solução salina tamponada com sais de fosfato (do inglês: *Phosphate- Buffered Saline* –PBS, contendo: NaCl 0,154 M; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1 M; pH 7,4) com colagenase tipo I de *Clostridium histolyticum* (GIBCO- BRL) a 3mg/ml, e dispase de *Bacillus polymyxa* (GIBCO-BRL) a 4mg/ml (Gronthos et al., 2000) e incubadas por uma hora a 37°C.

Uma vez dissociadas enzimaticamente, à suspensão de células pulpares foi acrescido 1mL de meio sem soro para inativação das enzimas. Em seguida, foram centrifugadas por oito minutos a 1200 rpm. O sobrenadante foi descartado, o sedimento ressuspendido em meio de cultura e as suspensões de células obtidas foram distribuídas em placas de cultura de poliestireno. Foram plaqueadas inicialmente a concentração de 10<sup>4</sup> células por poço da placa de cultura.

Para a cultura do fragmento, o tecido pulpar foi lavado duas vezes com HBSS, centrifugado por oito minutos a 1200 rpm, o sobrenadante foi descartado e o tecido retirado delicadamente com a ponta da pipeta para ser alocado nos poços da placa de poliestireno, com 2ml de meio de cultura (Mooney et al., 1996).

A suspensão de células obtidas por digestão enzimática e o fragmento de tecido pulpar foram transferidos para uma placa de seis poços de poliestireno contendo 2mL de meio de cultura (Mooney et al., 1996; Gronthos et al., 2000-2002; Gagari et al., 2006). As células foram mantidas à 37°C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e 70% de umidade, e o meio trocado a cada dois dias.

Para estabelecimento de subculturas, as células foram soltas do fundo do frasco por tratamento com solução de tripsina-EDTA contendo 2,5 g/L de tripsina (1:250) e 0,38 g/L de EDTA em HBSS por três minutos a 37° C. A suspensão de células foi transferida para um tubo de centrífuga contendo meio de cultura com soro fetal bovino para inativação da tripsina

e, em seguida, centrifugada a 1200 rpm por 5 minutos. As células foram contadas em câmara de Neubauer (*Boeco*, Germany) e passadas para novo frasco de cultura.

### **4.3 – Avaliação morfológica dos grupos CPdp e CPdd em microscopia de luz**

Para a análise morfológica em microscopia de luz, após 14 dias de cultivo, uma lamínula (18 x 18 mm) foi primeiramente posicionada em cada um dos seis poços de uma placa de cultura e tratada por 30 minutos com poli-L-lisina (0,1 mg/mL). Cada um dos seis poços recebeu 2 mL de meio de cultura e o proporcional a  $5 \times 10^4$  células.

Após as 48 horas de cultivo, o meio de cultura foi retirado e as células lavadas com PBS. As células aderidas a cada uma das lamínulas foram fixadas com paraformaldeído 2% em tampão fosfato por 10 minutos. Depois de serem lavadas com PBS, as células foram coradas com Giemsa 4% em metanol, por 5 minutos. Após serem lavadas com solução salina tamponada com sais de fosfato (do inglês: *Phosphate- Buffered Saline* –PBS) para remoção do excedente de corante, as lamínulas foram retiradas dos poços e montadas sobre lâminas de vidro para microscopia (26 x 76 mm), com a face contendo as células coradas em contato com a lâmina e fotografadas no microscópio óptico de luz invertida NIKON- DIAPHOT TMD, com câmera NIKON FE2, nas objetivas de 10x, 20x e 40x. No microscópio Zeiss Axiaphot foi utilizada a ocular de 10x e a objetiva de 100x. Utilizamos como referência barra de tamanho de 50 $\mu$ m.

Para análise morfológica, foram consideradas as células semelhantes a fibroblastos e aos aglomerados de colônias de células, denominadas de unidades formadoras de colônias semelhantes a fibroblastos (UFC-F) e outros tipos celulares capazes de formar colônias aderentes, quando cultivadas em baixa densidade celular, na presença de soro fetal bovino, de origem mesenquimal (CTM) (Bianco et al., 2000, Goldberg, 2004; Zago e Covas, 2006; Novakovic e Freshney, 2006).

### **4.4 – Avaliação do crescimento/proliferação de CPdp e CPdd em relação aos métodos de isolamento**

Para observar e comparar a proliferação celular de CPdp e CPdd, após o 5<sup>o</sup> subcultivo de cultura, foram feitas passagens iniciais de  $5 \times 10^4$  células, de ambos grupos celulares (CPdp e CPdd), para os dois métodos de isolamento. Os procedimentos foram

realizados em triplicata e para cada um dos tempos de cultura: 48, 96, 144, 192, 240, 288 e 336 horas (Mooney et al, 1996; Kamata et al., 2004).

Após esses períodos, os sobrenadantes de cada cultura foram descartados, as células foram soltas do fundo do frasco utilizando-se solução de tripsina- EDTA, centrifugadas e ressuspensas em meio de cultura. Dessa amostra, foram retirados 10  $\mu$ L que foram subsequentemente adicionados a 190  $\mu$ L de solução salina contendo 0,15% do corante vital azul de tripan (Kamata et al, 2004), de modo a efetuar-se, em câmara de Neubauer (*Boeco*, Germany), a contagem de células viáveis.

O corante vital azul de tripan penetra apenas nas células que perderam a integridade da membrana citoplasmática. Assim, enquanto as células não viáveis se coram, as células viáveis permanecem transparentes. Por meio da análise dos valores obtidos nas contagens, foram feitas curvas de crescimento para cada grupo celular, em relação aos dois métodos de isolamento, possibilitando a comparação.

#### **4.4.1 – Análise estatística do crescimento e proliferação de CPdp e CPdd**

Foram comparadas as médias de crescimento de dois grupos: CPdp (células de polpa dental humana de dentes permanentes) e CPdd (células de polpa dental humana de dentes decíduos) em relação aos dois métodos de isolamento C/D (digestão enzimática pela ação das enzimas collagenase tipo I e dispase) e OG (cultura do fragmento do tecido pulpar).

Utilizamos o teste paramétrico para duas amostras independentes, o Teste T de *Student*, com a finalidade de avaliar as diferenças entre as duas populações. Foi aplicado o teste de *Shapiro - Wilk* para avaliar se as células apresentaram distribuição normal, e o teste de *Levene*, para verificar se as variâncias se apresentaram homogêneas, se houve diferença entre os grupos e se foram significativas. Em seguida foram gerados gráficos para análises e conclusões com barra de erro representando uma vez o erro padrão das médias. O nível de significância considerado foi de 5% ( $p < 0,05$ ).

O cálculo para estimativa do Tempo de Duplicação (TD) foi aplicado levando em consideração o crescimento exponencial dos grupos celulares estudados, aplicando a seguinte fórmula:  $TD = \text{tempo total de horas ou } T \times \ln 2 \times 1 / [\ln(N_0 - N)]$ ; N= número final de células;  $N_0 = N$  inicial de células; e  $\ln =$  logaritmo natural de 2. Esta fórmula deriva do cálculo das curvas de crescimento em  $N=N_0 \times 2^{t/T}$ .

#### **4.5 – Caracterização do padrão imunofenotípico das CPdd e CPdp *in vitro***

Análise imunofenotípica foi obtida para caracterizar a progenia das populações clonogênicas de CPdp e CPdd, através da marcação direta com os anticorpos monoclonais de camundongos anti-humanos, conjugados a fluorocromos, conforme a seguir: 1- Anti-CD117 ou c-kit conjugado a APC (Alofocianina - Invitrogen), marcador celular para célula-tronco, pois interage com o fator SCF ou *stem cell factor* e com precursores de células de crista neural (Gagari et al., 2006); 2- Anti-CD34 conjugado a PE (Ficoeritrina - FK Biotec), marcador para células progenitoras hematopoiéticas mielóides e linfóides humanas, células do endotélio vascular, fibroblasto embrionário, algumas células de tecido nervoso adulto e fetal, e algumas formas de leucemia; e 3- CD45 RA conjugado com FITC (*Fluorescein Isothiocyanate* - FK - Biotec), marcador específico para linfócitos T imaturos ou ainda não expostos (Laino et al., 2006; Papaccio et al., 2006).

Para a marcação direta da linhagem celular, as células foram coletadas, centrifugadas a 1500 rpm por 7 minutos e ajustadas para a concentração de  $2 \times 10^6$  células/mL utilizando solução de marcação com PBS, 0,1% de Azida Sódica e 1% de BSA (do inglês: *Albumine from Bovine Serum*- Sigma/Aldrich).

Foram acrescentados 10  $\mu$ L do anticorpo correspondente a cada tubo e adicionados 100  $\mu$ L da suspensão celular. Depois de levemente agitados, foram incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente. Em seguida foram ressuspensas em 0,5 mL de solução de marcação e levadas imediatamente para o citômetro de fluxo, marca FACScalibur Becton Dickinson, coletando de 10.000 eventos e analisados pelo *software Cell Quest* (Becton Dickinson).

##### **4.5.1 – Análise estatística da caracterização do padrão imunofenotípico de CPdp e CPdd**

Os dados das análises geradas para estabelecer a comparação dos tipos celulares em relação aos métodos de isolamento e dos métodos de isolamento em relação aos mesmos tipos celulares (amostras CPdp e CPdd) foram normalizados, ou seja, de cada valor da média das células adquiridas e marcadas com os anticorpos utilizados (marcadores) foi subtraído o

valor das médias dos respectivos grupos controle de células não marcadas, e aplicado o teste T de *Student*.

Para a análise dos valores não normalizados, comparando os diferentes anticorpos (anti-CD117, anti-CD34 e anti-CD45) com os seus respectivos grupos controle de células não marcadas, foi aplicado o Teste T de *Student*.

Para a análise das comparações das médias de marcação dos diferentes anticorpos entre si para CPdp e CPdd, com a forma de isolamento C/D, foi aplicado o teste ANOVA One Way com o *post hoc* da ANOVA, para as múltiplas comparações utilizando o teste de *Benferroni*.

Para a análise das comparações das médias de marcação dos diferentes anticorpos entre si para CPdp e CPdd, com a forma de isolamento OG, as pressuposições da ANOVA não foram respeitadas (teste de *Shapiro-Wilk* e teste de *Levene* com  $P < 0,05$ ). Portanto foi utilizado o teste da ANOVA não paramétrico (teste H de *Kruskal-Wallis*, e o *post hoc* da ANOVA, pelo teste de *Benferroni*) para as múltiplas comparações com os respectivos grupos controle.

Para testar qualquer das hipóteses, foi considerada o nível de significância o valor de  $P < 0,05$ . O software utilizado foi o SPSS® com os parâmetros de informação considerando os métodos de isolamento (C/D e OG), os tipos celulares (CPdp e CPdd) e os anticorpos/marcadores (grupo controle, CD34, CD45, CD117).

As estatísticas descritivas consideraram a média, erro e o desvio padrão, enquanto que os gráficos foram gerados pelos dados da tabela de estimativa da média das células adquiridas e marcadas com barra de erro representando uma vez o erro padrão das médias.

#### **4.6 – Aspectos éticos:**

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, com o registro número 034/2007 (anexo-1).

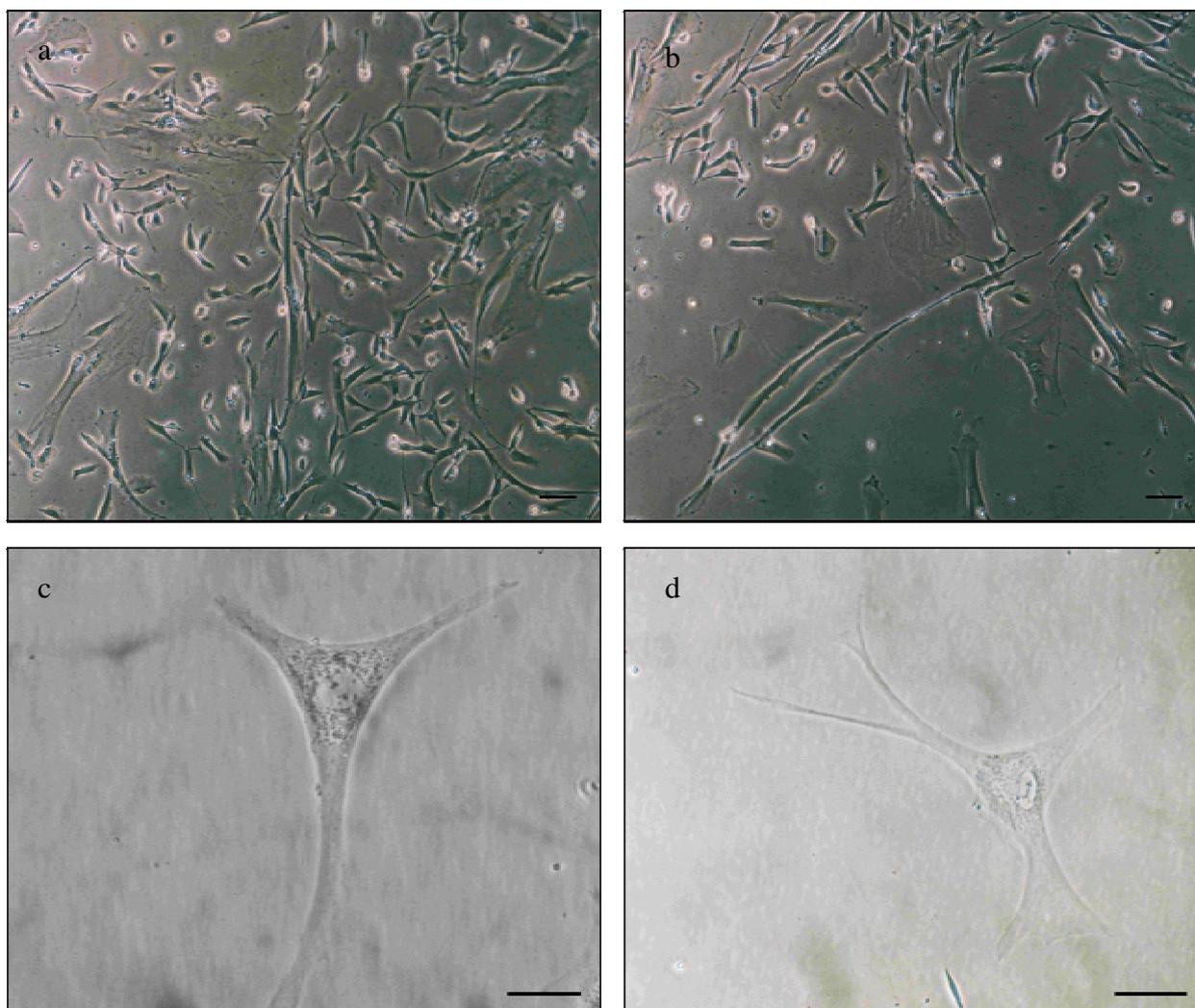
Os pacientes doadores e seus responsáveis legais foram orientados verbalmente e por escrito sobre a natureza da pesquisa, os objetivos, justificativas, riscos e benefícios. Assinaram e receberam uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), e foram informados sobre o nome dos responsáveis da pesquisa (pesquisadora e orientadores), assim como receberam todos os contatos telefônicos e emails para estabelecerem contato em caso de dúvidas ou desistência.

Todos os itens do TCLE foram respeitados e o CEP/FS foi atualizado em relatório final, conforme orientações da Resolução 196/96.

# *5. Resultados*

### 5.1 - Avaliação morfológica dos tipos celulares CPdd e CPdp em microscopia de luz

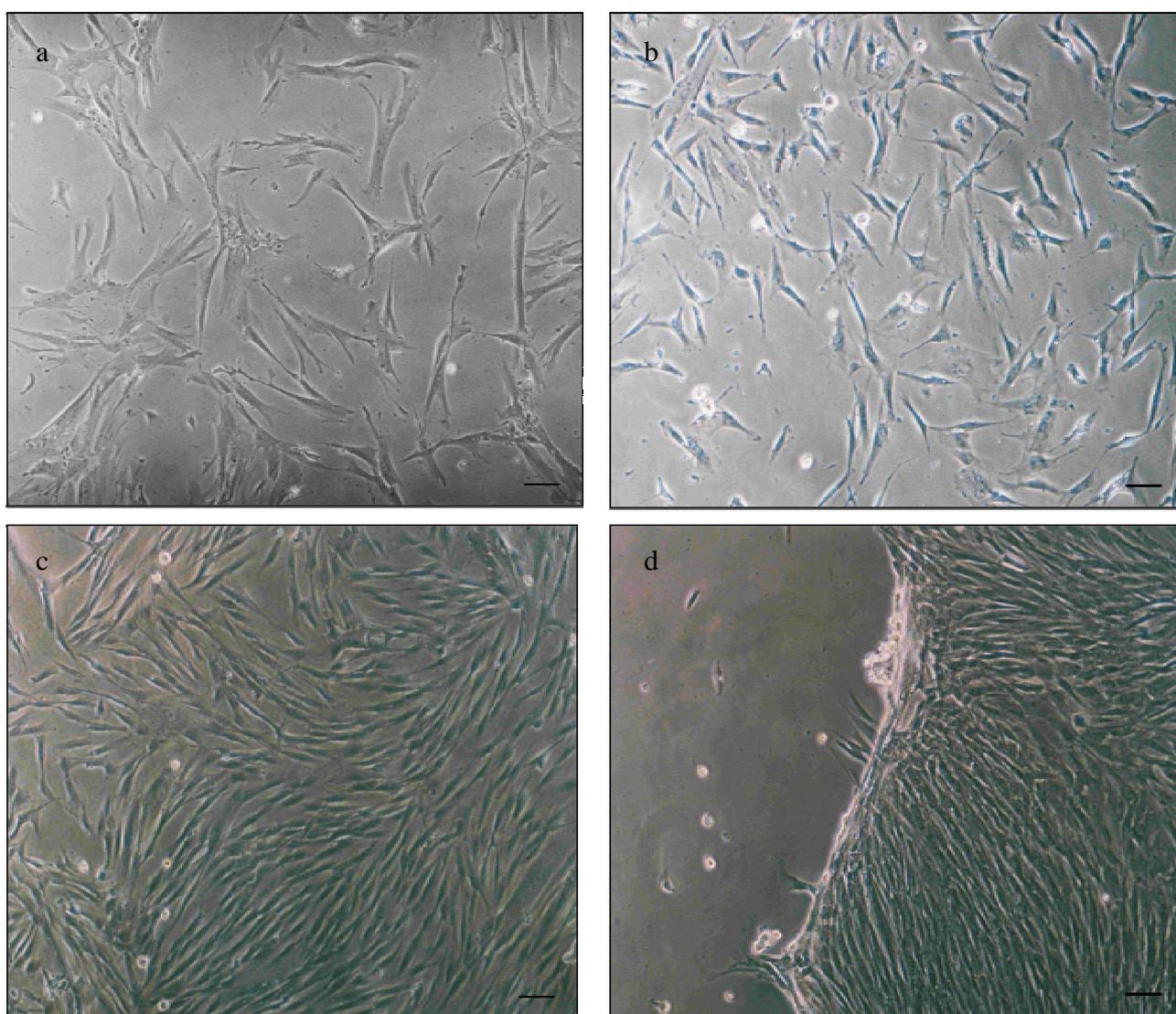
Inicialmente, entre a primeira e terceira passagem, as culturas primárias celulares de ambos os grupos, independente do método de isolamento, apresentaram-se aderentes à placa de cultura de poliestireno, bastante heterogêneas, com uma mistura de populações celulares demonstrando aspectos morfológicos semelhantes a fibroblastos, e algumas células com formas esféricas semelhantes aos tipos celulares epiteliais e endoteliais (figura 4).



**Figura 4:** Culturas em confluência de CPdd e CPdp para o método de isolamento celular com collagenase tipo I e dispase (C/D). Em (a) e (c) culturas representativas de CPdp-C/D. Em (b) e (d) culturas representativas de CPdd-C/D. Em (c) e (d) apresentadas as fotomicrografias de células poligonais, apresentando extensões citoplasmáticas, aspectos morfológicos semelhantes a fibroblastos, para CPdp e CPdd respectivamente.

Foi possível constatar que a cultura de células obtida pelo método de dispersão celular pela digestão enzimática do tecido pulpar alcançava confluência mais rápida no início do cultivo, em comparação com o método isolamento pelo cultivo do fragmento do tecido. Após 14 dias de cultura, a proliferação (confluência) celular por OG estava nivelada com o método de isolamento C/D.

Ao microscópio óptico de luz invertida não foram observadas diferenças morfológicas em relação aos métodos de isolamento para os grupos celulares em estudo, principalmente nas culturas confluentes (figura 5).



**Figura 5: Culturas CPdp para os dois métodos de isolamento. Em (a) e (c) fotomicrografias representativas das culturas de CPdp-OG. Em (b) e (d) fotomicrografias das culturas de CPdp-C/D. Em (c) e (d) ilustração das colônias em camadas com alta densidade celular.**

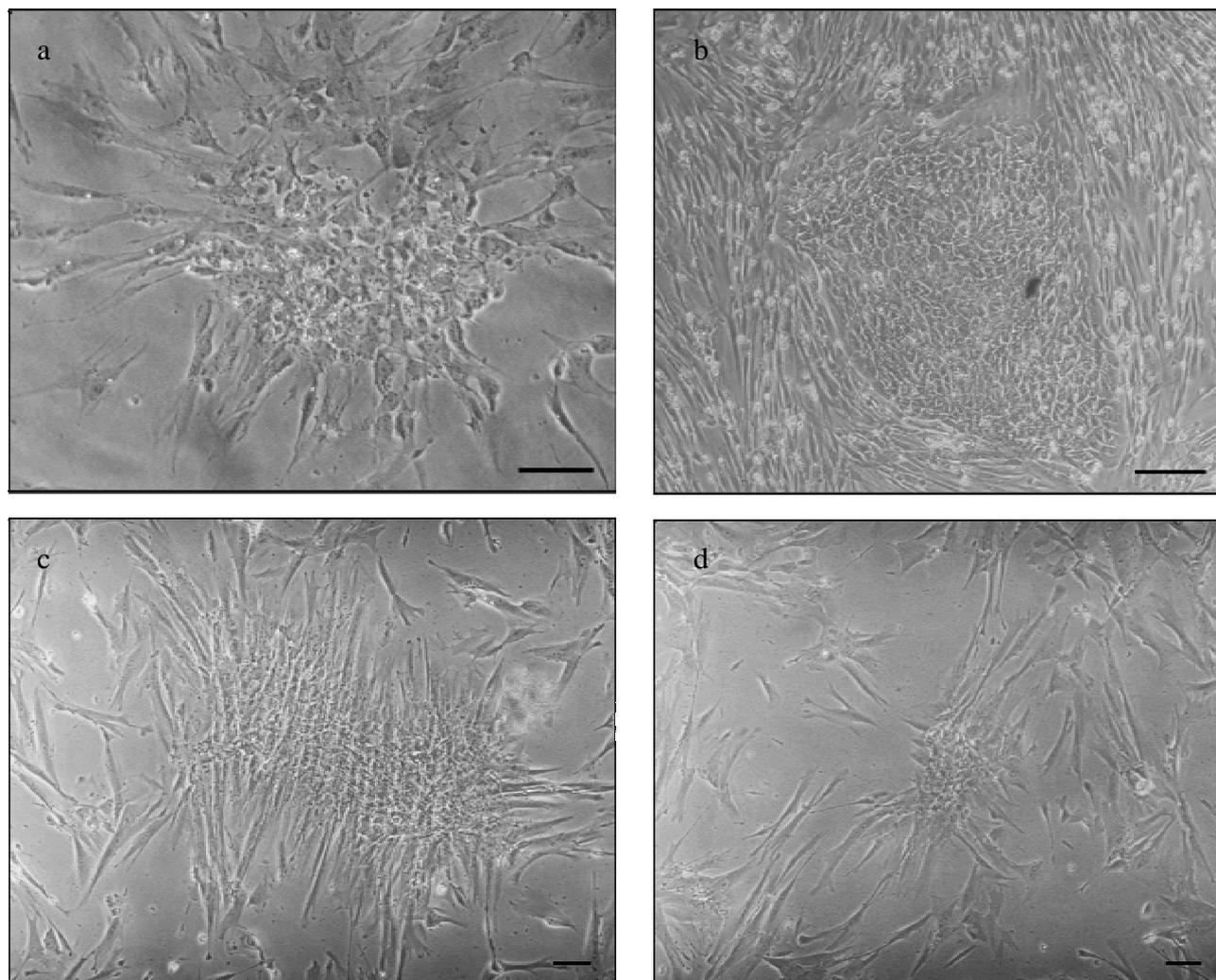
Nas culturas com o fragmento do tecido pulpar, foi observada a migração celular do tecido para a placa de cultura. As células próximas ao fragmento exibiram formas heterogêneas, mas adquirindo morfologia predominantemente poligonal ou alongada, semelhante ao padrão observado nas culturas por C/D (figura 6).



**Figura 6: Cultura primária do fragmento de CPdd-OG. Migração celular (seta) do fragmento do tecido pulpar (FTP) para a placa de cultura. Colônias formadas em duas semanas. Próximas ao fragmento foram observados grupos celulares de formas heterogêneas, mas com o avanço da proliferação as células foram adquirindo formas predominantemente alongadas semelhantes a fibroblastos.**

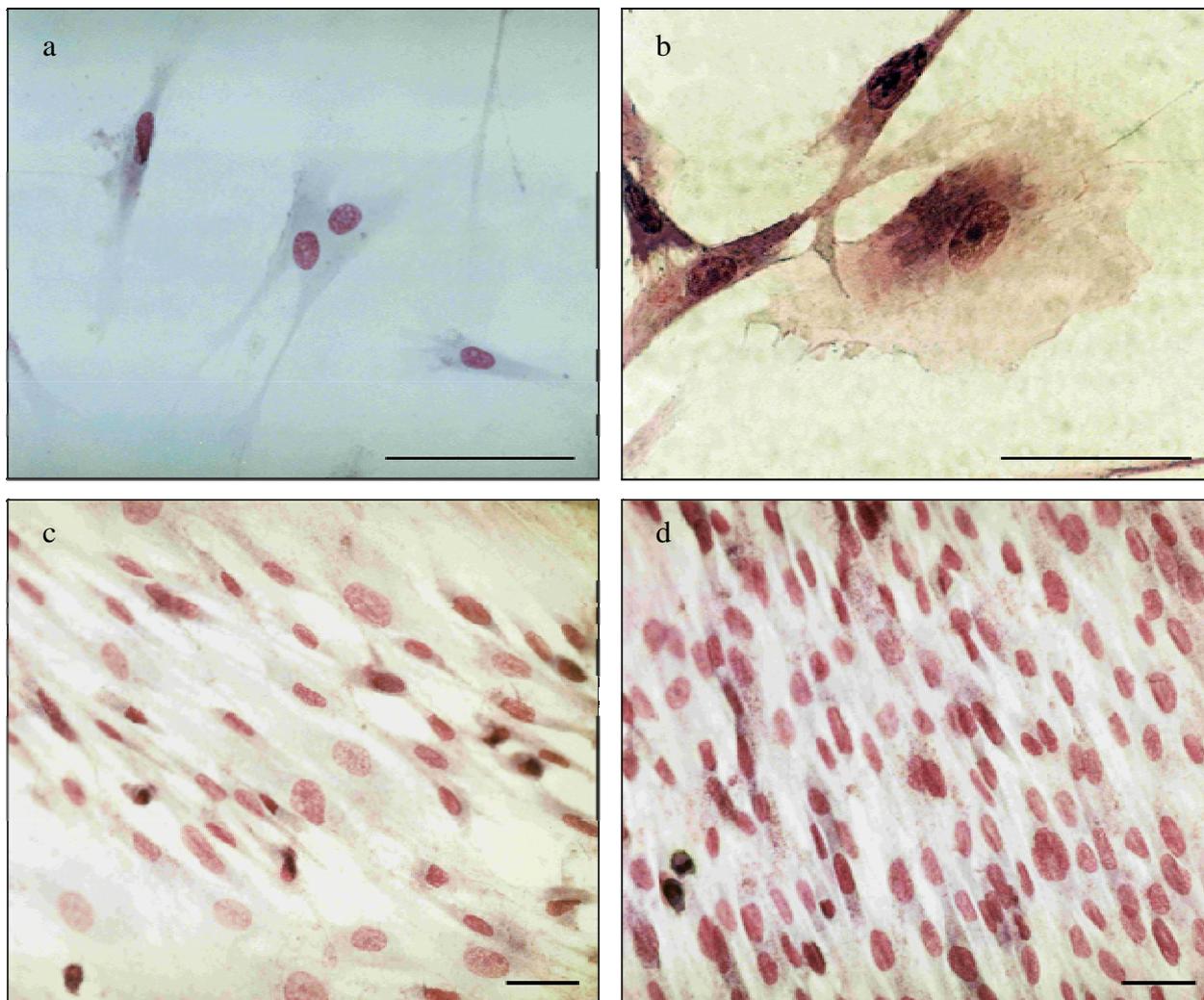
Uma constatação interessante, nas culturas mais incipientes pelo método de isolamento por C/D (culturas entre 07 e 15 dias) e no início da confluência celular de cada subcultivo (até a quinta passagem), foi a formação de aglomerados das unidades formadoras de colônias celulares semelhantes a fibroblastos (UFC-F), cuja porção central de células

apresentou-se predominantemente com células esféricas (Figura 7). Partindo dos aglomerados celulares, as células originalmente esféricas começam a adquirir formas mais alongadas.



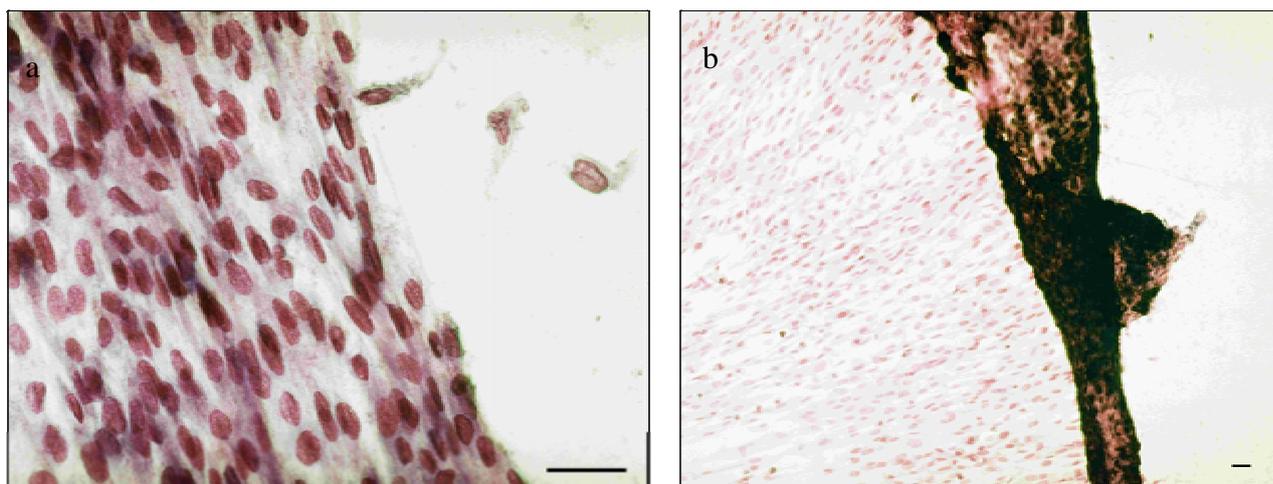
**Figura 7: Aglomerados celulares de Unidades Formadoras de Colônias semelhantes a fibroblastos (UFC-F). Em (a) e (c) cultura de CPdp-C/D. Em (b) e (d) cultura de CPdd-C/D. Partindo dos aglomerados as células, originalmente esféricas, começaram a adquirir formas mais alongadas. Culturas de duas semanas, primeiro cultivo.**

Nas culturas em confluência tanto para CPdd como para CPdp, independente do método de isolamento, as células foram adquirindo aspectos predominantemente semelhantes a fibroblastos, com formas mais alongadas, algumas com núcleos excêntricos e polarizados, exibindo prolongamentos citoplasmáticos, resultando em uma monocamada de células alinhadas na periferia do tecido celular cultivado (avaliação com corante Giemsa, figura 8).



**Figura 8:** Avaliação morfológica de amostras celulares coradas com Giemsa, terceiro subcultivo. Culturas de 28 dias. Células aderentes, alongadas, alinhadas em uma monocamada, apresentando extensões citoplasmáticas, algumas células com núcleos polarizados (a e b). Em (a) e (c) culturas representativas das culturas de CPdp-C/D. Em (b) e (d) culturas representativas de CPdd-C/D.

Com o avanço da cultura, após três semanas de cultivo, para os dois métodos de isolamento, as células se mostraram alinhadas, com longos prolongamentos do citoplasma, e estabelecendo uniões citoplasmáticas, organizando monocamadas, e dobras do tecido de células (figura 09). Após sucessivas passagens, não foram mais observadas colônias de células com morfologia esférica semelhantes aos tipos celulares epiteliais e endoteliais.



**Figura 9:** Amostras de culturas coradas com corante de Giemsa, Culturas confluentes, terceiro subcultivo em (a) CPdp-OG e em (b) CPdp-C/D. A cada passagem, nas culturas confluentes, observamos o alinhamento celular em monocamada e dobras do tecido de células.

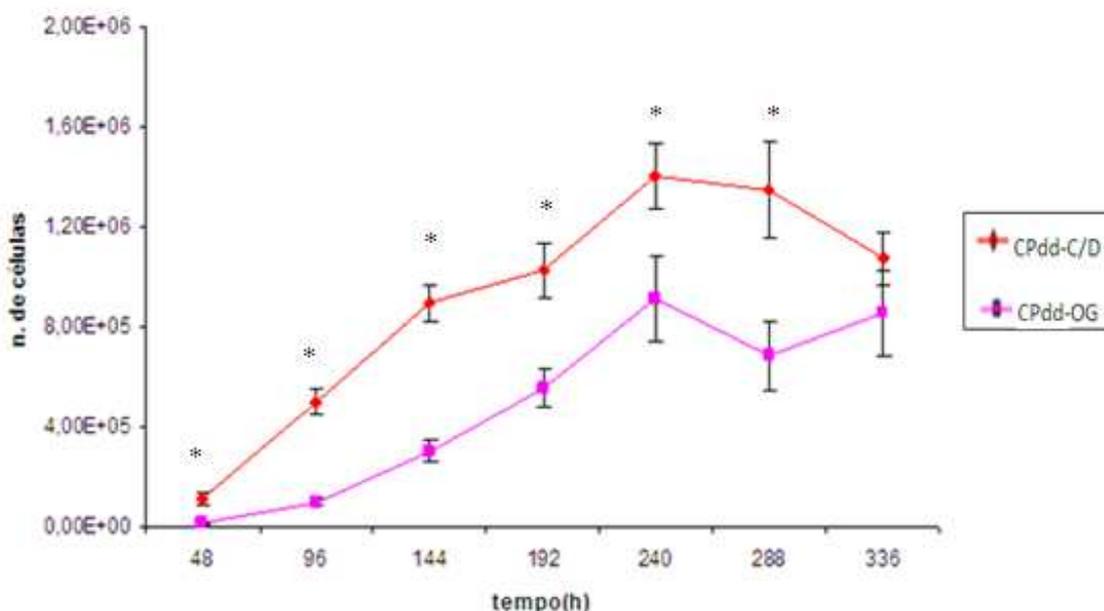
As análises morfológicas demonstraram que os protocolos desenvolvidos para a obtenção e o estabelecimento das culturas primárias dos tipos celulares CPdp e CPdd foram eficientes, permitindo o crescimento e proliferação celular *in vitro*.

## **5.2 - Avaliação do crescimento/proliferação dos tipos celulares CPdd e CPdp: Característica da Amostra**

As amostras de células CPdd e CPdp constituem variáveis independentes, não pareadas, e quantitativas. Foi utilizado o teste paramétrico T de *Student* para duas amostras independentes. Todas as variáveis (número de células por tempo) apresentaram distribuição normal,  $P > 0,05$  (verificada pelo teste de normalidade de *Shapiro-Wilk*) e apresentaram variâncias homogêneas  $P > 0,05$  (verificada pelo teste de *Levene*).

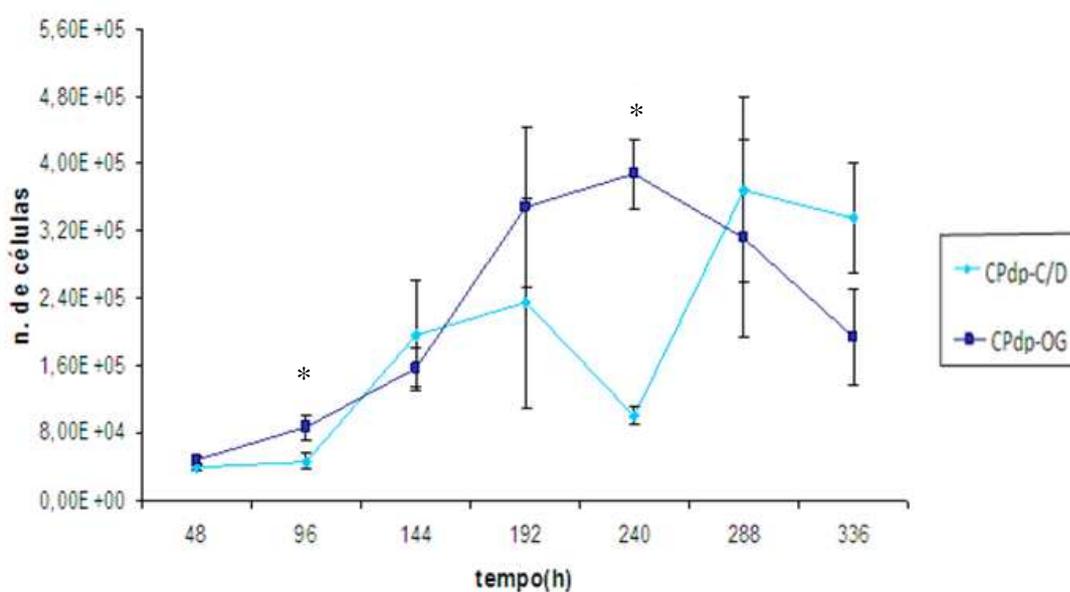
Foram comparadas as médias de crescimento das amostras para os tempos de cultivo de 48, 96, 144, 196, 240 e 336 horas entre: Cpdd em relação à C/D e OG; CPdp em relação à C/D e OG, entre os CPdd-C/D e CPdp-C/D e entre CPdd-OG e CPdp-OG.

As análises entre CPdd-C/D e CPdd-OG demonstraram haver diferença de proliferação celular ( $P$  valor  $< 0,05$ ). O grupo de células obtidas pelo método de digestão enzimática apresentou médias de crescimento maiores em relação ao grupo de células obtidas pelo método de cultura do fragmento, ou *outgrowth* (figura 10), exceto para o tempo 336 horas.



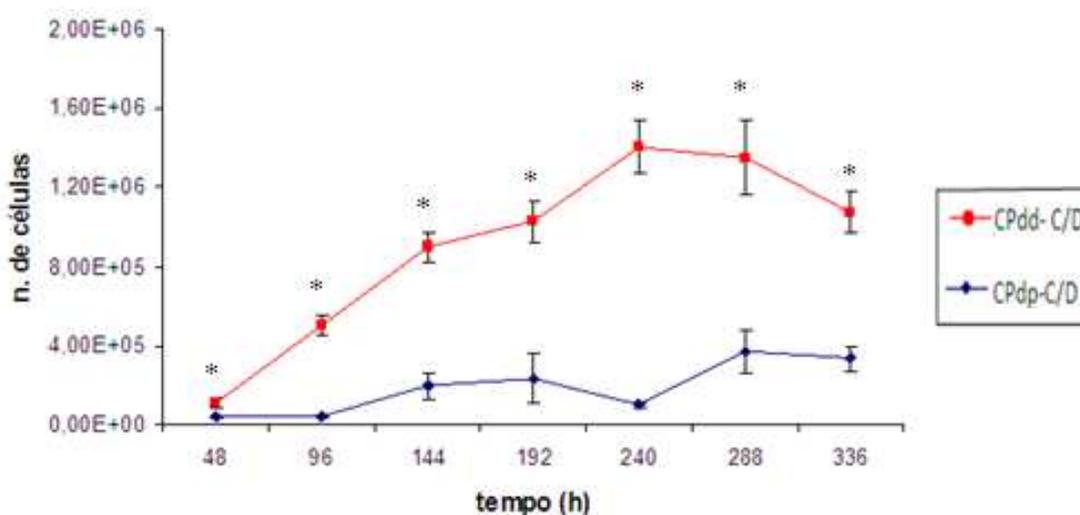
**Figura 10:** Curva de crescimento dos tipos celulares de CPdd comparando as médias de crescimento das células obtidas pelo método de digestão enzimática (C/D) e outgrowth (OG). O asterisco destaca as diferenças entre os métodos de isolamento para cada tempo ( $P < 0,05$ ).

Em relação ao grupo CPdp-C/D e CPdp-OG, as análises estatísticas demonstraram que as médias de crescimento celular, nos tempos de cultivo de 48, 144, 192, 288 e 336 não foram diferentes entre os dois métodos de isolamento ( $P > 0,05$ ). Em relação ao método de isolamento C/D, houve uma queda acentuada no tempo 240 horas (apêndice 3), mas recuperando-se a elevação do crescimento na cultura nos tempos subsequentes (figura 11).



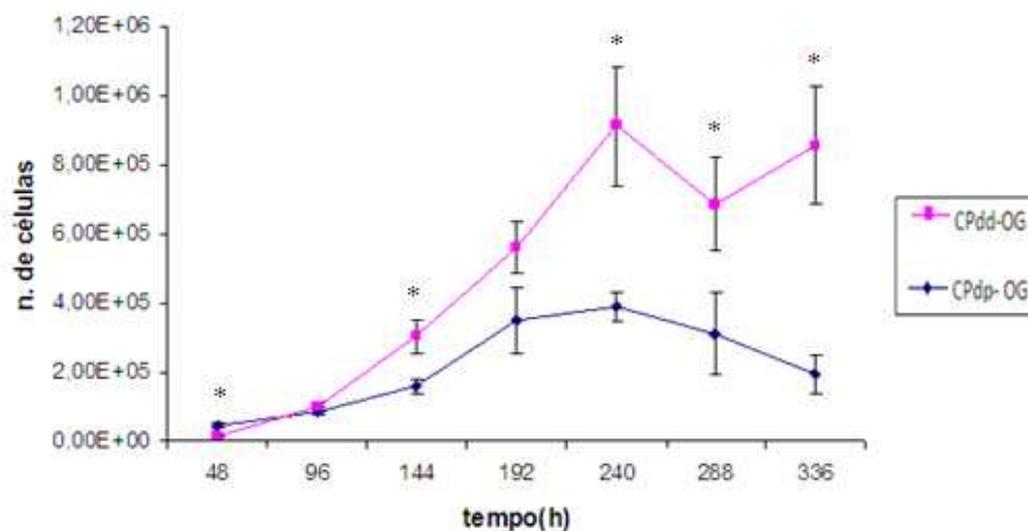
**Figura 11:** Curva de crescimento dos tipos celulares de CPdp, comparando as médias de crescimento das células obtidas pelos métodos de isolamento por digestão enzimática (C/D) e *outgrowth* (OG). O asterisco destaca as diferenças entre os métodos de isolamento para cada tempo ( $P < 0,05$ ).

Comparando as taxas de crescimento dos tipos celulares CPdp e CPdd para o método de isolamento por digestão enzimática (C/D) (figura 12), o grupo celular de dentes decíduos apresentou médias de crescimento maiores em relação aos tempos de cultivo analisados (apêndice 4). Houve diferença significativa para todos os tempos da curva de crescimento ( $P < 0,05$ ).



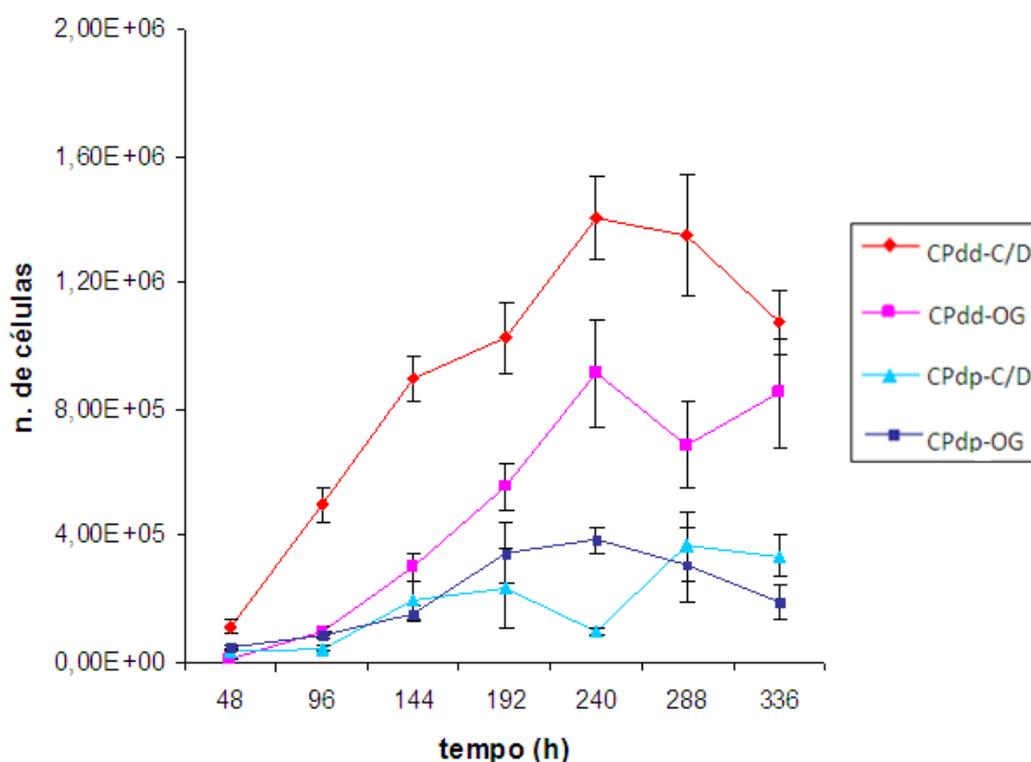
**Figura 12:** Curva de crescimento dos tipos celulares de CPdp e Cpdd comparando as médias de crescimento das células obtidas pelo método de isolamento por digestão enzimática (C/D). O asterisco destaca as diferenças entre os métodos de isolamento para cada tempo ( $P < 0,05$ ).

Ao serem analisadas as médias de crescimento dos dois grupos celulares (CPdp e CPdd) obtidos pelo método de *outgrowth* (apêndice 5), o grupo representado pelos tipos celulares CPdd apresentou médias de crescimento maiores em comparação com as CPdp (figura 13), nos tempos de contagem de 48, 144, 240, 288 e 336 horas ( $P < 0,05$ ), não sendo diferentes apenas para os tempos de 96 e 192 horas ( $P > 0,05$ ).



**Figura 13:** Curva de crescimento dos tipos celulares de CPdp e CPdd comparando as médias de crescimento das células obtidas pelo método de isolamento *outgrowth* (OG). O asterisco destaca as diferenças entre os métodos de isolamento para cada tempo ( $P < 0,05$ ).

A figura 14 mostra, de forma global, as análises de crescimento dos grupos celulares em relação aos métodos de isolamento. As células obtidas de dentes decíduos apresentaram as maiores médias de proliferação para ambos os métodos de isolamento.



**Figura 14:** Curva de crescimento global dos grupos celulares em relação aos dois métodos de isolamento.

O Tempo de Dobramento (TD) para cada tipo celular está apresentado na tabela 1. Os tipos celulares CPdd apresentaram os melhores tempos de dobramento, confirmando os dados ilustrados nas tabelas das curvas de crescimento.

**Tabela 1 - Tempos de duplicação das culturas primárias estabelecidas para CPdp e CPdd, em relação aos dois métodos de isolamento (C/D e O/G).**

Tipo Celular	Colagenase/Dispase	<i>Outgrowth</i>
CPdp	18,54 horas	19,61 horas
CPdd	16,87 horas	17,13 horas

### **5.3 - Caracterização do padrão imunofenotípico das CPdp e CPdd *in vitro***

Da amostra de pacientes, foram selecionados três doadores de dentes decíduos e três doadores de dentes terceiros molares permanentes, conforme os critérios de inclusão descritos na metodologia.

Foram testadas duas hipóteses: 1- se houve diferença significativa na imunofenotipagem entre os diferentes marcadores para os tipos celulares (CPdd e CPdp); 2- se houve diferença na imunofenotipagem dos tipos celulares em relação aos métodos de isolamento (C/D e OG). Todas as hipóteses foram testadas para os diferentes tipos de anticorpos, e comparadas com o grupo controle de células não marcadas.

Foram considerados os valores absolutos e normalizados comparando as variáveis dos seguintes grupos conforme a seguir:

1. Perfil imunofenotípico das células adquiridas e marcadas com os diferentes anticorpos, para os dois métodos de isolamento C/D e OG nos tipos celulares em CPdp;
2. Perfil imunofenotípico das células adquiridas e marcadas com os diferentes anticorpos, para os dois métodos de isolamento C/D e OG nos tipos celulares em CPdd;
3. Perfil imunofenotípico das células em CPdp e CPdd adquiridas e marcadas com os diferentes anticorpos, para o método de isolamento C/D;
4. Perfil imunofenotípico das células em CPdp e CPdd adquiridas e marcadas com os diferentes anticorpos, para o método de isolamento OG.

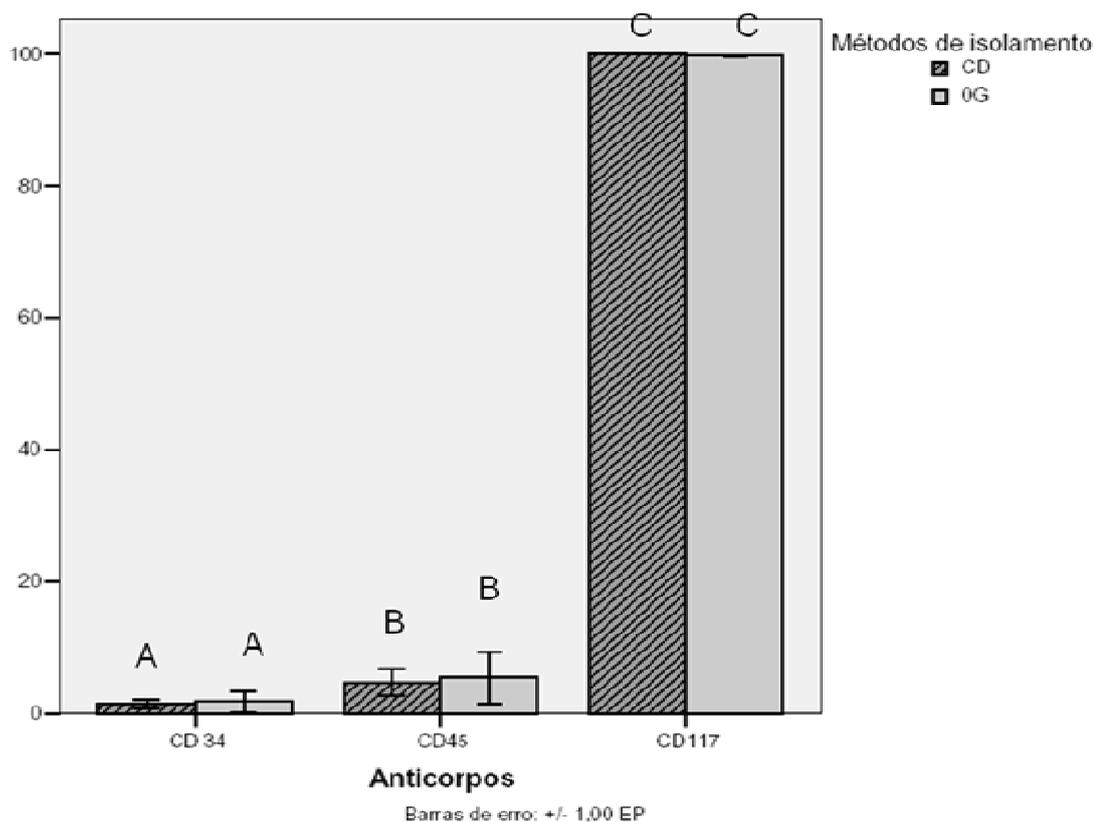
### 5.3.1 – Perfil imunofenotípico das células adquiridas e marcadas com os diferentes anticorpos, para os dois métodos de isolamento C/D e OG nos tipos celulares em CPdp

Considerando as análises com valores normalizados, estimados das médias e erros padrões, entre os métodos de isolamento em relação aos tipos de anticorpos utilizados para identificação do perfil fenotípico de CPdp, o marcador CD117 apresentou as maiores médias, em porcentagens, de expressão para ambos os métodos de isolamento C/D e OG, conforme os valores normalizados na tabela 2 (100% para as células obtidas pelo método de digestão enzimática C/D, e 99,69% para as células obtidas pelo método de cultura do fragmento *outgrowth* – OG).

**Tabela 2 - Caracterização dos tipos celulares em CPdp para os dois métodos de isolamento. Valores normalizados. Percentual de células imunomarcadas.**

	C/D			OG			P(valor)
	Média	DP	EP	Média	DP	EP	
<b>CD34</b>	1,33	1,16	0,39	1,73	2,70	0,93	0,83
<b>CD45</b>	4,67	3,51	1,17	5,43	6,84	2,28	0,88
<b>CD117</b>	100	0,00	0,00	99,69	0,08	0,03	0,96

Os resultados obtidos com o teste T de *Student* indicaram que não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre os diferentes métodos de isolamento (tabela 2) para CPdp. O marcador CD117 apresentou maior expressão nos dois métodos de isolamento, e não houve expressão significativa dos antígenos de superfície relacionados com as células progenitoras hematopoiéticas (CD34) nem com células de linhagem hematopoiética com diferenciação terminal (CD45) (figura 15).



**Figura 15: Médias das diferenças das células adquiridas e marcadas com os diferentes anticorpos, para os dois métodos de isolamento C/D e OG do grupo CPdp. Valores normalizados. Teste T de Student. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas.**

Na figura 16, procuramos ilustrar, separadamente, as comparações entre as médias das diferenças das células adquiridas e marcadas com os diferentes anticorpos comparando com o grupo controle de células não marcadas, para o método de isolamento (teste T de Student).

As análises demonstraram que, independente do método de isolamento, o CD117 foi o marcador mais expresso (figura 16a e 16b) e o único que apresentou diferença em relação ao grupo controle (99,83% para C/D e 99,84% para OG, conforme as comparações ilustradas na tabela 3).

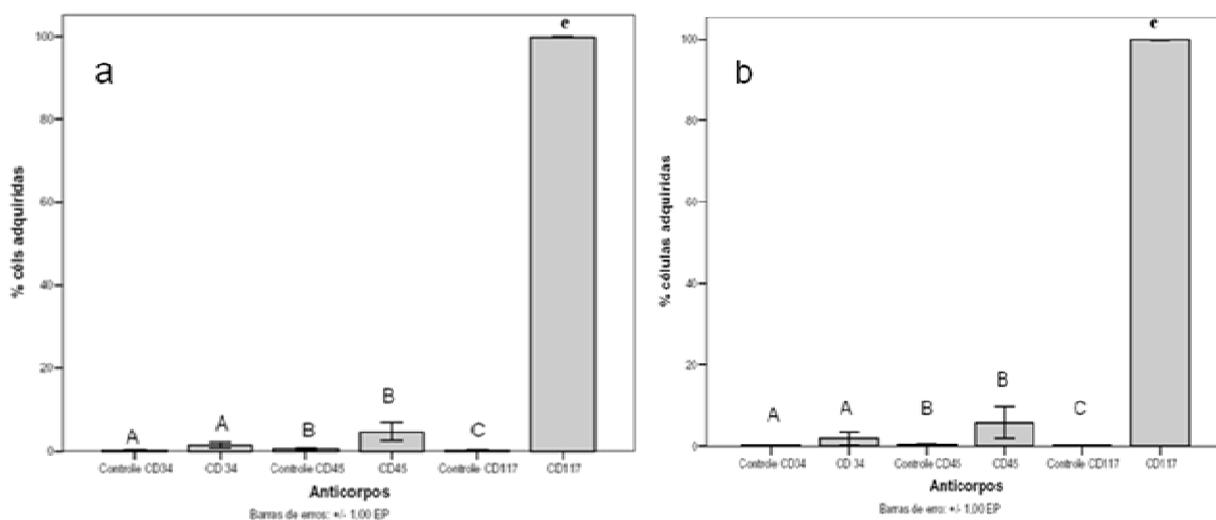


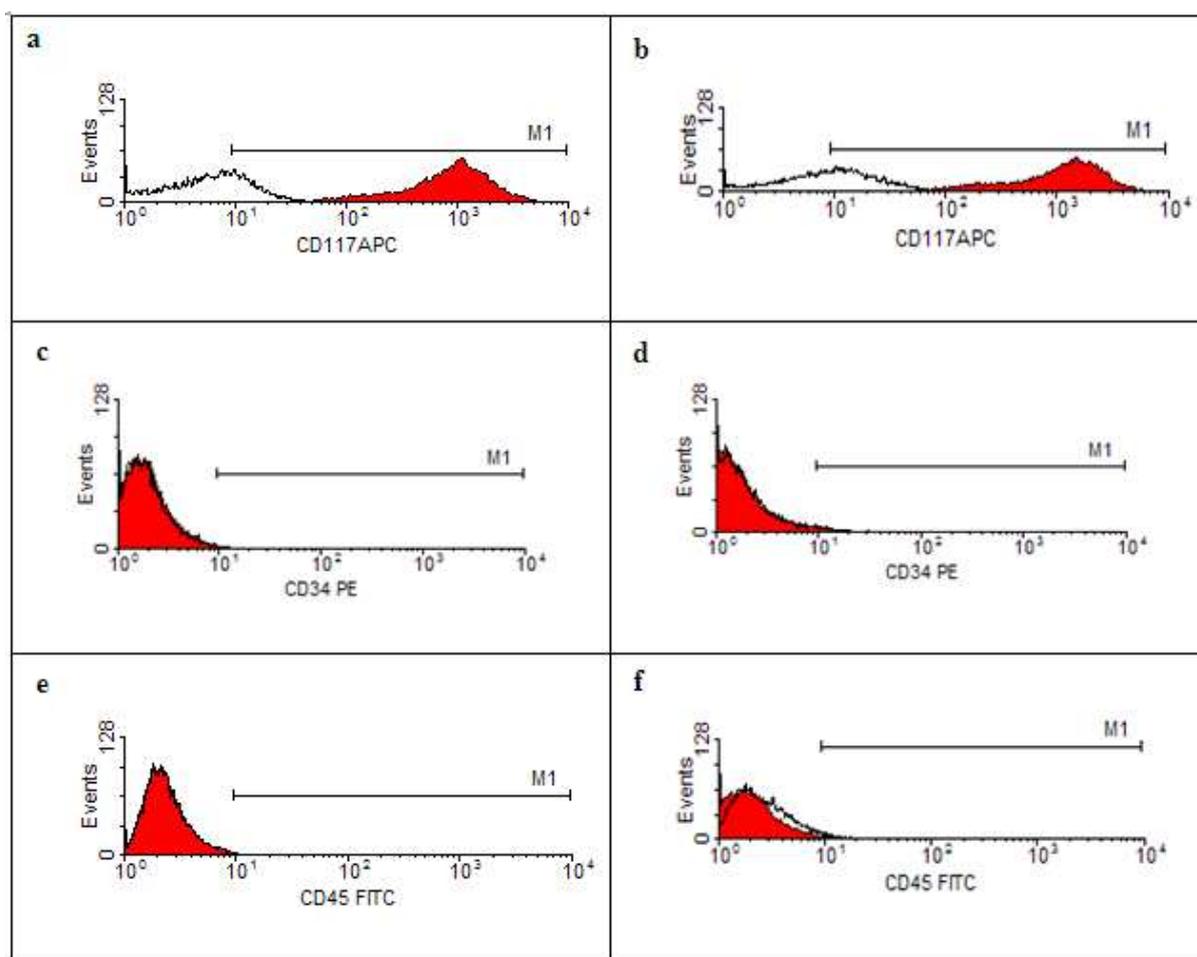
Figura 16: Gráficos ilustrando as análises das marcações comparadas com o grupo controle para CPdp. Em (a) CPdp-C/D. Em (b) CPdp-OG. Letras e tamanhos de fonte diferentes indicam diferenças estatísticas.

As médias, em porcentagem, de células expressando CD34 (1,35% para C/D e 1,88% para OG) e CD45 (4,63% para C/D e 5,77% para OG) não apresentaram diferença significativa, em relação aos grupos controle (tabela 3).

Tabela 3 - Tipo Celular CPdp com as comparações dos marcadores em relação aos respectivos grupos controles. As diferenças estatísticas ( $P < 0,05$ ) estão assinaladas com asterisco (\*).

	C/D				OG			
	Média	DP	EP	P (valor)	Média	DP	EP	P(valor)
<b>CD34</b>	1,35	1,16	0,05	0,22	1,88	2,79	0,93	0,40
<b>Controle/CD34</b>	0,21	0,18	0,06		0,16	0,14	0,05	
<b>CD45</b>	4,63	3,85	1,28	0,2	5,77	6,85	2,28	0,30
<b>Controle/CD45</b>	0,47	0,52	0,17		0,34	0,40	0,13	
<b>CD117</b>	99,83	0,21	0,07	0,00*	99,84	0,9	0,3	0,00*
<b>Controle/CD117</b>	0,21	0,17	0,05		0,16	0,14	0,05	

As representações gráficas das medidas analíticas geradas na citometria de fluxo estão apresentadas nos histogramas ilustrados na figuras 17, com as diferenças nas intensidades de fluorescência demonstrando o maior deslocamento do pico de células positivamente marcadas para o marcador CD117. A figura 18 ilustra um exemplo da amostra das intensidades de fluorescência nas células imunomarcadas.



**Figura 17:** Histogramas exemplificando os valores de células adquiridas e os deslocamentos das marcações de CPdp para o método de isolamento C/D (a, c, e) e para o método de isolamento OG (b, d, f).

<b>a</b>	Anticorpo	Y Geo	Porcentagem de células adquiridas	<b>b</b>	Anticorpo	Y Geo	Porcentagem de células adquiridas
	Anti-CD34	23,29	2,13		Anti-CD34	22,48	5,10
	Controle CD34	22,57	0,37		Controle CD34	36,89	0,13
	Anti-CD45	41,34	4,70		Anti-CD45	33,88	13,63
	Controle CD45	29,25	1,05		Controle CD45	49,58	0,11
	Anti-CD117	954,12	99,85		Anti-CD117	1093,97	99,88
	Controle CD117	71,41	0,61		Controle CD117	70,95	1,87

**Figura 18: Representação das medidas analíticas geradas na avaliação em citometria de fluxo, relacionando a intensidade de fluorescência (YGeo) e a porcentagem de células marcadas. Em (a) para CPdp-C/D e em (b) para CPdp-OG.**

Portanto, os resultados demonstraram que as células do grupo CPdp, marcadas com anticorpos anti-CD34, anti-CD45 e anti-CD117 apresentaram-se positivas para o marcador CD117 e negativas para os marcadores CD34 e CD45.

### **5.3.2 – Perfil imunofenotípico das células adquiridas e marcadas com os diferentes anticorpos, para os dois métodos de isolamento C/D e OG nos tipos celulares em CPdd**

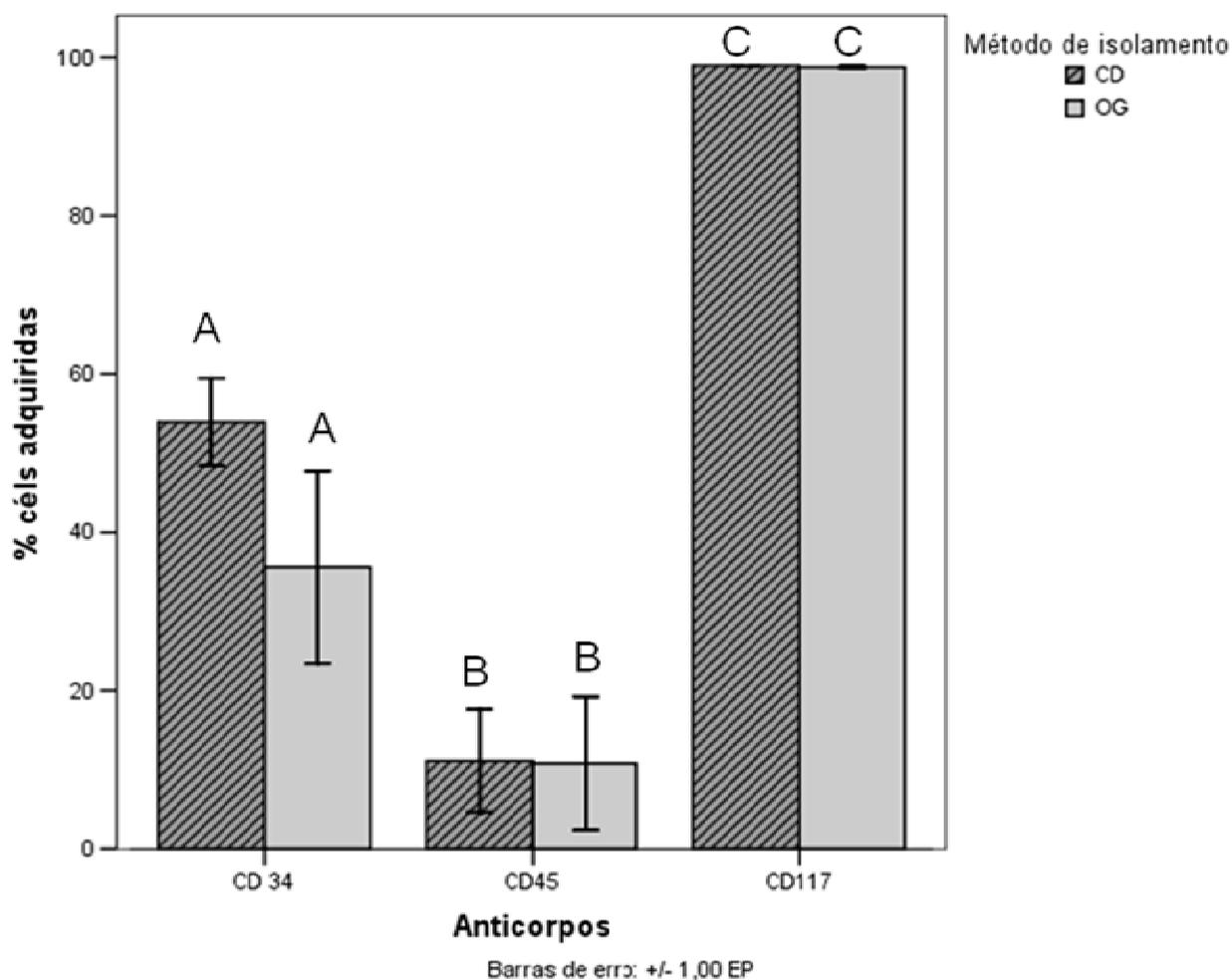
As análises com valores normalizados, estimados das médias e erros padrões, entre os métodos de isolamento em relação aos tipos de anticorpos utilizados para identificação do perfil imunofenotípico de CPdd, demonstraram que o marcador CD117 apresentou as maiores médias, em porcentagens, de expressão para ambos os métodos de isolamento C/D e OG, conforme a tabela 4 (98,95% para as células obtidas pelo método de digestão enzimática C/D, e 98,73% para as células obtidas pelo método de cultura do fragmento *outgrowth* – OG).

**Tabela 4 - Caracterização dos tipos celulares em CPdd para os dois métodos de isolamento. Valores normalizados. Percentual de células imunomarcadas.**

	C/D			OG			P(valor)
	Média	DP	EP	Média	DP	EP	
<b>CD34</b>	53,91	9,59	3,20	35,59	21,04	7,01	0,24
<b>CD45</b>	11,10	11,25	3,75	10,79	14,64	4,88	0,97
<b>CD117</b>	98,95	0,26	0,09	98,73	0,31	0,10	0,40

Os resultados, normalizados e obtidos com o teste T de *Student* indicaram que não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre os diferentes métodos de isolamento (tabela 4) para CPdd. O marcador CD117 apresentou maior expressão nos dois métodos de isolamento, seguido da marcação do CD34, principalmente para o método de isolamento C/D (53,91% para o grupo CPdd-C/D e 35,59% para CPdd-OG).

Para os dois métodos de isolamento, houve baixa expressão dos antígenos de superfície relacionados com linhagem hematopoiética com diferenciação terminal (CD45) (figura 19).



**Figura 19:** Médias das diferenças das células adquiridas e marcadas com os diferentes anticorpos, para os dois métodos de isolamento C/D e OG do grupo CPdd. Valores normalizados. Teste T de *Student*. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas.

Estabelecendo uma comparação da imunoreatividade entre os dois métodos de isolamento para CPdd, está ilustrado na figura 20, separadamente, as comparações entre as médias das diferenças das células adquiridas e marcadas com os diferentes anticorpos e comparadas com o respectivos grupos controle de células não marcadas. Pelas análises gráficas, independente do método de isolamento, o CD117 foi o marcador mais expresso, seguido do CD34 (tabela 5).

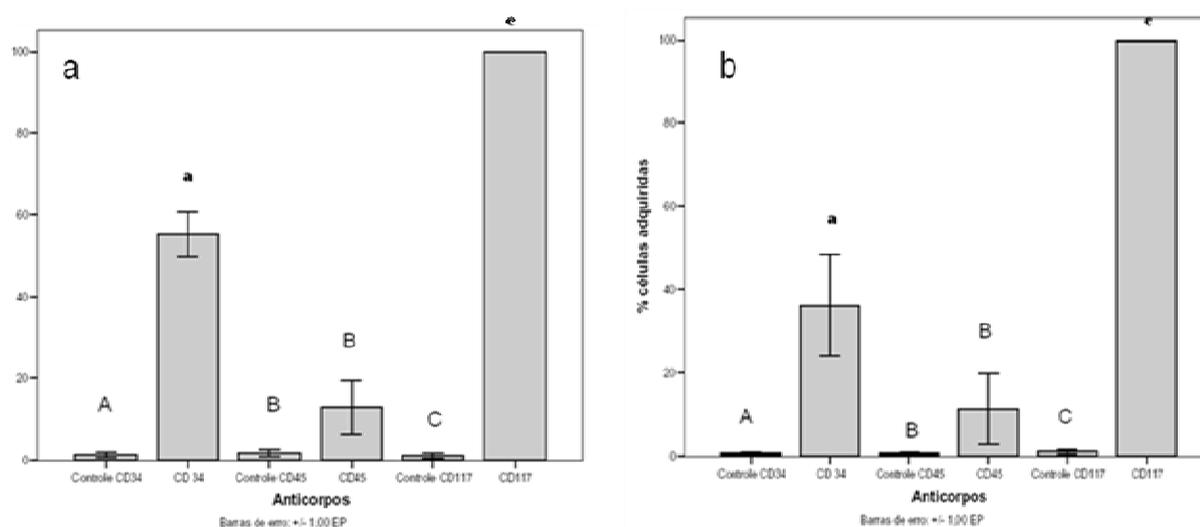
**Tabela 5 - Tipo Celular CPdd com as comparações dos marcadores em relação aos respectivos grupos controle. As diferenças estatísticas ( $P < 0,05$ ) estão assinaladas com asterisco (\*).**

	C/D				OG			
	Média	DP	EP	P (valor)	Média	DP	EP	P(valor)
<b>CD34</b>	55,24	9,59	3,20	0,01*	36,13	21,04	7,01	0,04*
<b>Controle/CD34</b>	1,33	0,97	0,32		0,54	0,43	0,14	
<b>CD45</b>	12,80	11,25	3,75	0,22	11,34	14,64	4,88	0,33
<b>Controle/CD45</b>	1,70	1,40	0,47		0,55	0,44	0,15	
<b>CD117</b>	99,95	0,03	0,01	0,00*	99,79	0,31	0,10	0,00*
<b>Controle/CD117</b>	1,00	1,13	0,38		1,03	0,86	0,29	

Para o grupo celular CPdd, as médias, em porcentagem, de células positivas para o CD117 (55,24% para C/D e 38,13% para OG) e para o CD34 (55,24% para C/D e 38,13% para OG) foram diferentes do grupo controle ( $P < 0,05$ ). A marcação com o anticorpo anti-CD45 (12,80% para C/D e 11,34% para OG) não apresentou diferença em relação aos grupos controle (tabela 5).

Os gráficos apresentados na figura 20 demonstram a expressão dos anticorpos, que representam os valores das comparações da tabela 5. Foi observado que os tipos celulares em CPdd, independente do método de isolamento, expressaram positivamente os marcadores CD117 e CD34 e apresentam baixa expressão do CD45 ( $P < 0,05$ ), sem contudo representarem valores significativos (figura 21f).

A expressão do CD34 estabelece uma diferença de imunoreatividade em relação aos tipos celulares em CPdp para este antígeno de superfície.



**Figura 20: Gráficos ilustrando as análises das marcações comparadas com o grupo controle para CPdd. Em (a) CPdd-C/D. Em (b) CPdd-OG. Letras e fontes diferentes indicam diferenças estatísticas.**

Na figura 21 estão ilustradas as representações gráficas das medidas analíticas geradas na citometria de fluxo, apresentando nos histogramas as diferenças nas intensidades de fluorescência e o deslocamento do pico de células positivamente marcadas com os anticorpos anti-CD117 e anti-CD34. A figura 22 ilustra um exemplo da amostra das intensidades de fluorescência nas células imunomarcadas.

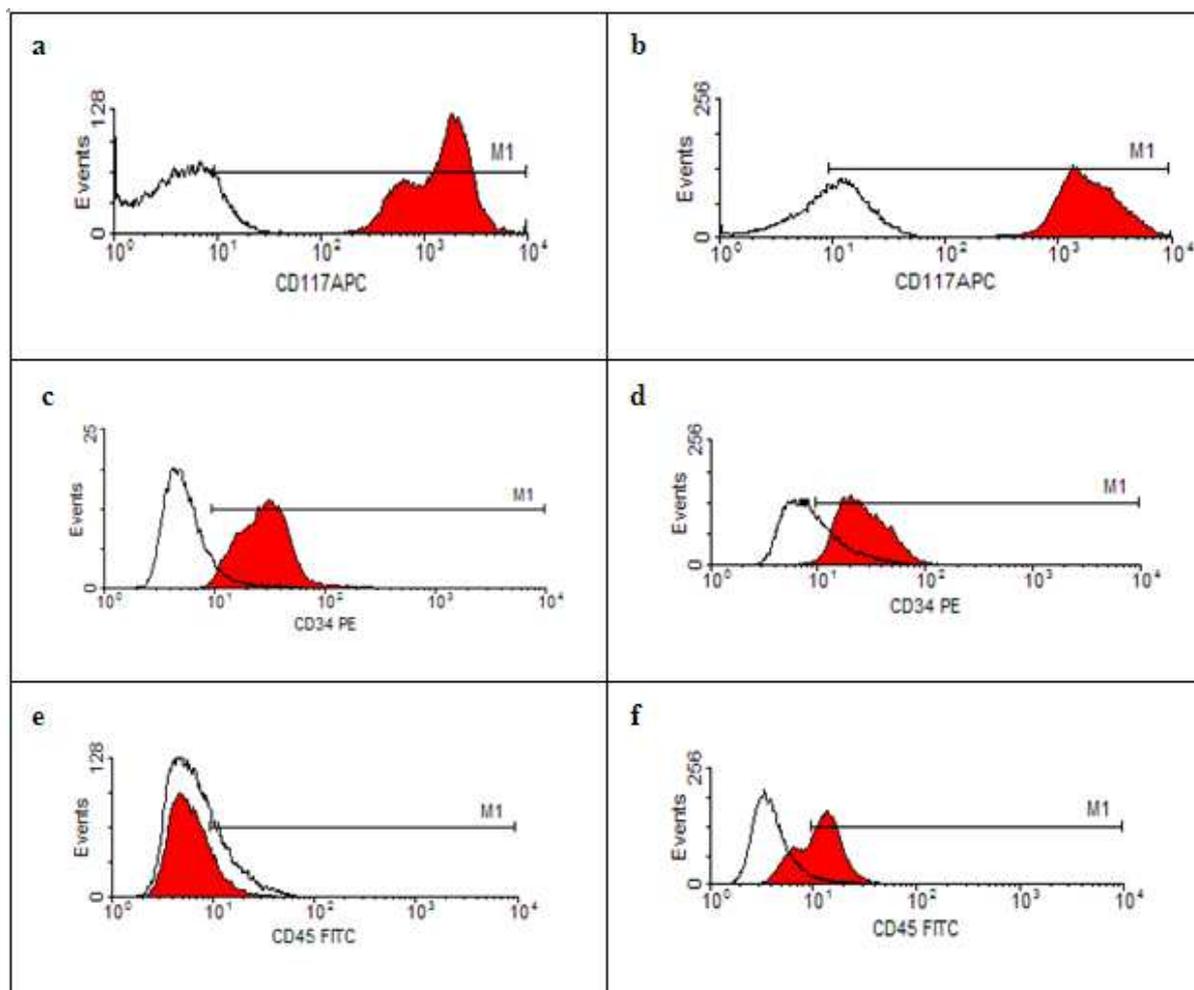


Figura 21: Histogramas exemplificando os valores de células adquiridas e os deslocamentos das marcações de CPdd para o método de isolamento C/D (a, c, e) e para o método de isolamento OG (b,d,f).

a			b		
Anticorpo	Y Geo	Porcentagem de células adquiridas	Anticorpo	Y Geo	Porcentagem de células adquiridas
Anti-CD34	22,99	44,38	Anti-CD34	26,75	49,49
Controle CD34	21,79	1,60	Controle CD34	24,26	0,24
Anti-CD45	21,69	24,19	Anti-CD45	22,95	28,11
Controle CD45	22,44	2,91	Controle CD45	26,73	0,24
Anti-CD117	1863,32	99,98	Anti-CD117	1647,03	99,97
Controle CD117	136,86	0,19	Controle CD117	80,10	0,66

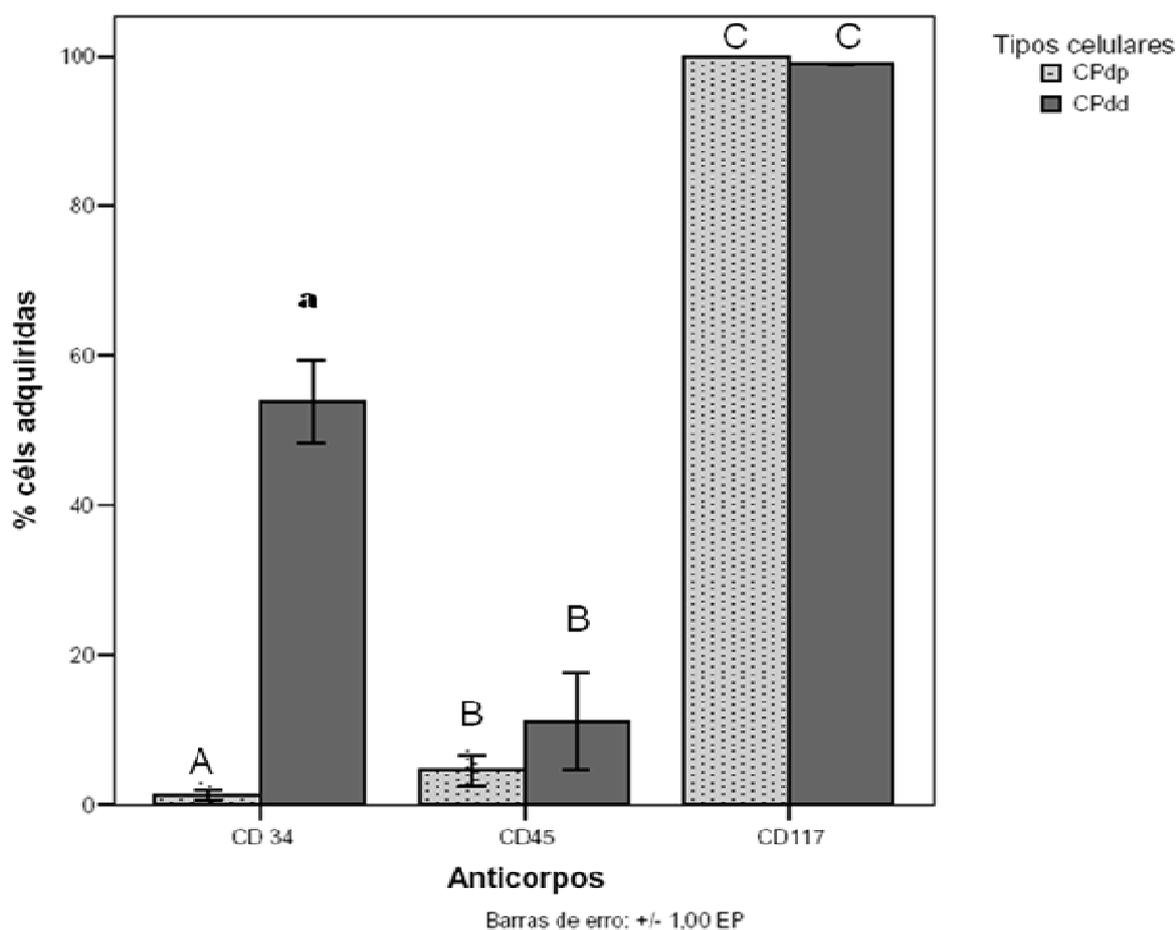
Figura 22: Representação das medidas analíticas geradas na avaliação em citometria de fluxo, relacionando a intensidade de fluorescência (Y Geo) e a porcentagem de células marcadas. Em (a) para CPdd-C/D e em (b) para CPdd (OG).

### 5.3.3 - Perfil imunofenotípico das células em CPdp e CPdd adquiridas e marcadas com os diferentes anticorpos, para o método de isolamento C/D

Os valores normalizados estimados para a comparação das médias, desvios e erros padrões (teste T de *Student*), entre as marcações dos tipos celulares em CPdp e CPdd (figura 23), em relação ao método de isolamento C/D demonstraram que houve diferença para a marcação com o anticorpo anti-CD34 ( $P < 0,05$ ), com a média de caracterização em 53,91% contra 1,33% em relação a CPdp (tabela 6). Em ambos os tipos celulares o marcador CD117 apresentou as maiores médias, em porcentagens, de expressão (100% para CPdp e 98,95% para CPdd).

**Tabela 6 - Médias das diferenças de marcação de CPdp e CPdd em relação ao método de isolamento por digestão enzimática com Colagenase tipo I e Dispase (C/D). Valores normalizados. Percentual de células imunomarcadas. As diferenças estatísticas ( $P < 0,05$ ) estão assinaladas com asterisco (\*).**

	CPdp			CPdd			P(valor)
	Média	DP	EP	Média	DP	EP	
<b>CD34</b>	1,33	1,16	0,39	53,91	9,59	3,20	0,01*
<b>CD45</b>	4,67	3,51	1,17	11,10	11,25	3,75	0,04
<b>CD117</b>	100	0,00	0,00	98,95	0,26	0,09	0,05

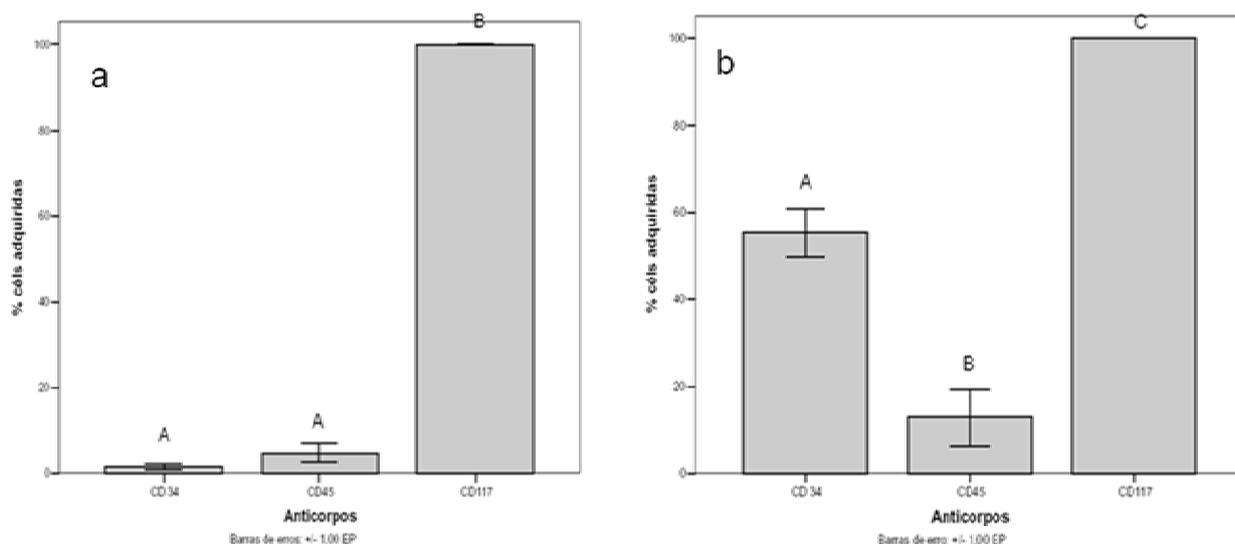


**Figura 23:** Médias das diferenças de marcação de CPdp e CPdd em relação ao método de isolamento por digestão enzimática com Colagenase tipo I e Dispase (C/D). Valores normalizados. Teste T de *Student*. Letras e fontes diferentes indicam diferenças estatísticas.

Os gráficos apresentados na figura 24 ilustram as múltiplas comparações e as expressões dos marcadores, representados nos valores das médias, em porcentagem, de células positivamente marcadas (tabela 7).

Para os tipos celulares em CPdp-C/D (figura 24a) houve diferença ( $P < 0,05$ ) entre os marcadores (tabela 7). O marcador mais expresso foi o CD117 (99,83%) com baixa expressão dos marcadores CD34 (1,35%) e CD45 (4,63%). Este resultado reforça a caracterização imunofenotípica em que os tipos celulares CPdp foram positivos para CD117 e negativos para CD34 e CD45. Não houve diferença significativa entre os CD34 e CD45 ( $P > 0,05$ ).

Para os tipos celulares em CPdd-C/D (figura 24b) houve diferença entre os anticorpos ( $P < 0,05$ ), com maiores expressões dos marcadores CD117 (99,95%) e CD34 (55,24%), e baixa expressão para o CD45 (12,80%) (tabela 7).



**Figura 24:** Médias das diferenças entre as marcações de CPdp e CPdd. Múltiplas comparações para o método de isolamento com Colagenase tipo I e Dispase (C/D). Em (a) observamos as médias das diferenças entre as marcações de CPdp. Em (b) avaliamos as médias das diferenças entre as marcações de CPdd. Teste ANOVA One-Way. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas.

**Tabela 7 –** Médias percentuais das diferenças entre as marcações de CPdp e CPdd em relação ao método de isolamento por com Colagenase tipo I e Dispase (C/D). Teste ANOVA One-Way. As diferenças estatísticas ( $P < 0,05$ ) estão assinaladas com asterisco (\*).

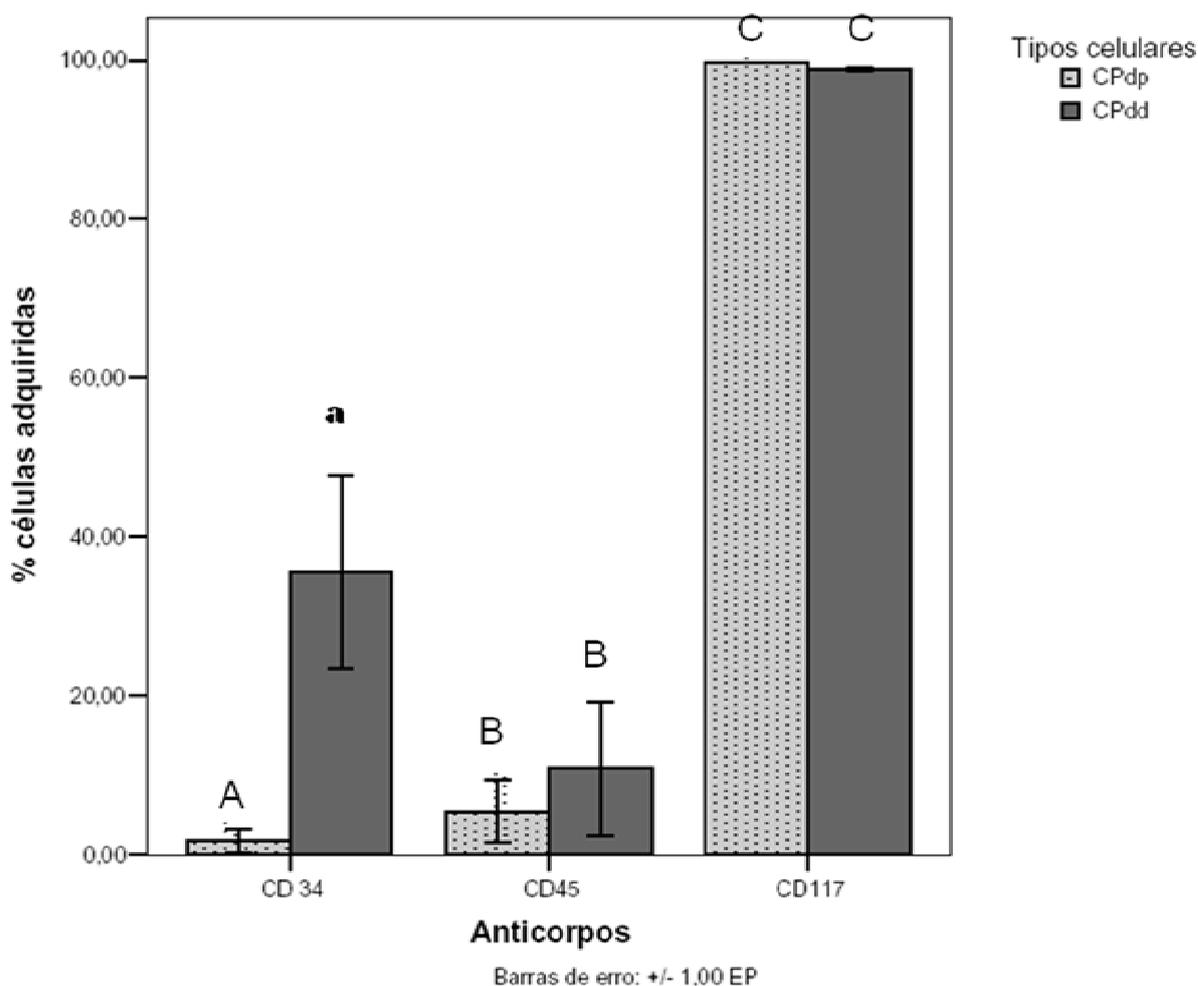
	CPdp				CPdd			
	Média	DP	EP	P(valor)	Média	DP	EP	P(valor)
CD34	1,35	1,16	0,39		55,24	9,54	3,20	
CD34xCD45				0,12				0,00*
CD45	4,63	3,85	1,28		12,80	11,25	3,75	
CD45xCD117				0,00*				0,00*
CD117	99,83	0,21	0,07		99,95	0,03	0,01	
CD117xCD34				0,00*				0,00*

### 5.3.4 - Perfil imunofenotípico das células em CPdp e CPdd adquiridas e marcadas com os diferentes anticorpos, para o método de isolamento OG

Os valores normalizados, estimados para a comparação das médias, desvios e erros padrões (teste T de *Student*) entre as marcações dos tipos celulares em CPdp e CPdd (figura 25), em relação ao método de isolamento OG, demonstraram que houve diferença estatística do marcador CD34 para CPdd ( $P < 0,05$ ), assim como foi observado no método de isolamento C/D. A média de caracterização para o marcador CD34 foi de 35,59% para CPdd contra 1,73% para CPdp (tabela 8). Em ambos os tipos celulares o marcador CD117 apresentou as maiores médias, em porcentagens, de expressão (99,69% para CPdp e 98,73% para CPdd).

**Tabela 8 - Médias das diferenças entre as marcações de CPdp e CPdd em relação ao método de isolamento por outgrowth. Valores normalizados. Percentual de células imunomarcadas. As diferenças estatísticas ( $P < 0,05$ ) estão assinaladas com asterisco (\*).**

	CPdp			CPdd			P(valor)
	Média	DP	EP	Média	DP	EP	
<b>CD34</b>	1,73	2,70	0,9	35,59	21,04	7,01	0,01*
<b>CD45</b>	5,43	6,84	2,28	10,70	14,64	4,88	0,6
<b>CD117</b>	99,69	0,08	0,03	98,73	0,31	0,10	0,05

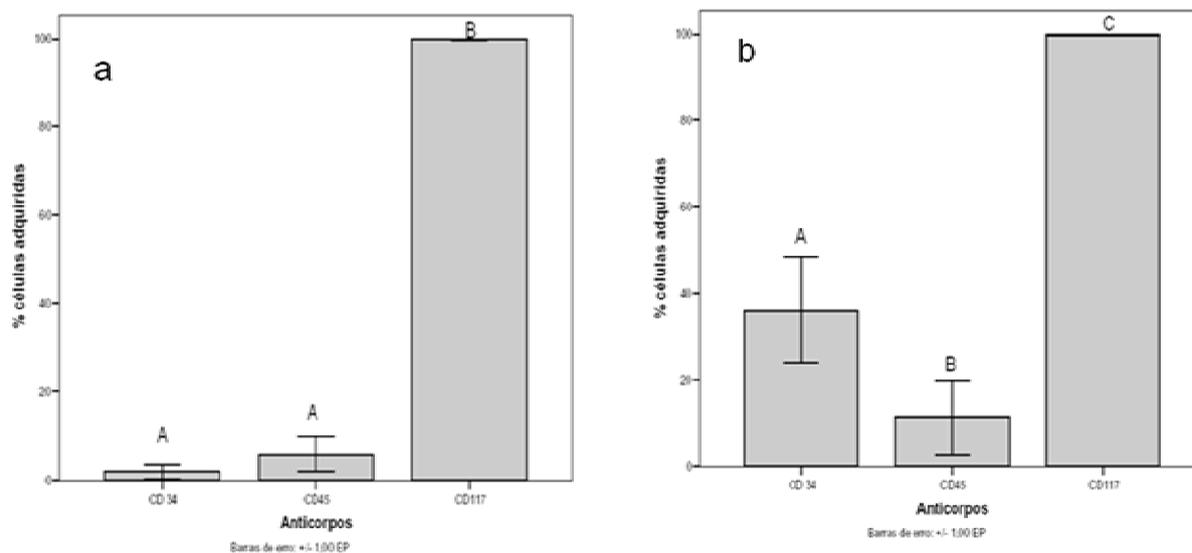


**Figura 25:** Médias das diferenças entre as marcações de CPdp e CPdd em relação ao método de isolamento por *outgrowth* (OG). Valores normalizados. Teste T de *Student*. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas.

Os gráficos apresentados na figura 26 ilustram as múltiplas comparações e as expressões dos marcadores, representados nos valores das médias, em porcentagem, de células positivamente marcadas (tabela 9).

Para os tipos celulares em CPdp-OG (figura 26a) houve diferença ( $P < 0,05$ ) entre os marcadores CD34 (1,88%) e CD45 (5,77%) em relação ao CD117, que foi o marcador mais expresso (99,84%), reforçando os resultados anteriores em que CPdp, independente do método de isolamento, apresentou perfil imunofenotípico positivo para CD117 e negativo para CD34 e CD45. Não houve diferença estatística relevante entre os CD34 e CD45 ( $P > 0,05$ ).

Para os tipos celulares em CPdd-OG (figura 26b) houve diferença entre os anticorpos ( $P < 0,05$ ), com maiores expressões dos marcadores CD117 (99,79%) e CD34 (36,13%), e baixa expressão para o CD45 (11,34%) (tabela 9).



**Figura 26: Médias das diferenças entre as marcações de CPdp e CPdd. Múltiplas comparações para o método de isolamento por *outgrowth*. Em (a) observamos as médias das diferenças entre as marcações de CPdp. Em (b) avaliamos as médias das diferenças entre as marcações de CPdd. Teste H de *Kruskall-Wallis*. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas.**

**Tabela 9 - Médias percentuais das diferenças entre as marcações de CPdp e CPdd em relação ao método de isolamento por *outgrowth* (OG). Teste H de *Kruskall-Wallis*. As diferenças estatísticas ( $P < 0,05$ ) estão assinaladas com asterisco (\*).**

	CPdp				CPdd			
	Média	DP	EP	P(valor)	Média	DP	EP	P(valor)
<b>CD34</b>	1,88	2,79	0,93		36,13	21,04	7,01	
<b>CD34xCD45</b>				0,66				0,04*
<b>CD45</b>	5,77	6,85	2,28		11,34	14,64	4,88	
<b>CD45xCD117</b>				0,00*				0,00*
<b>CD117</b>	99,84	0,9	0,3		99,79	0,31	0,10	
<b>CD117xCD34</b>				0,00*				0,00*

# *6. Discussão*

Os protocolos de isolamento e cultura desenvolvidos neste estudo foram eficientes. Com as condições de cultivo mantidas estáveis, o crescimento celular foi bastante favorecido, os tipos celulares apresentaram bons resultados proliferativos, cujo crescimento exponencial pode ser avaliado nos resultados das curvas de crescimento e nos tempos de dobramento (figuras 10 a 14 e tabela 1).

A maioria dos protocolos destinados ao isolamento, cultura e caracterização das células do tecido pulpar segue o método de cultura estabelecido por Gronthos et al. (2000-2002), reforçado por Freshney et al. (2007). Na maioria dos protocolos que seguem esta metodologia, as células foram obtidas pela associação das enzimas colagenase tipo I (3mg/mL) e dispase (4mg/mL), cultivadas no meio  $\alpha$ -MEM (formulação  $\alpha$  do meio essencial mínimo) com diferentes concentrações de soro fetal bovino (do inglês: *fetal bovine serum*), e com suplementação sugerida de 2mM de glutamina e 100 $\mu$ M ácido L – ascórbico.

Geralmente os meios  $\alpha$ -MEM e DMEM são os mais utilizados para o cultivo de células aderentes (Peres e Curi, 2005; Novakovic et al., 2006; Freshney et al., 2007).

O meio de cultura utilizado nesta pesquisa foi o DMEM acrescido de 20% do soro fetal bovino, sem a suplementação comumente citada de 2mM de glutamina e 100 $\mu$ M de ácido L – ascórbico (Novakovic et al., 2006; Freshney et al., 2007).

Não houve nenhuma limitação metodológica que pudesse comprometer a consecução dos objetivos do trabalho, nem sinais de deterioração morfológica das células cultivadas (figuras 4c, 4d, 8a e 8b).

Não foram observadas diferenças no perfil morfológico entre os tipos celulares oriundos das polpas de dentes decíduos e permanentes, nem entre os dois métodos de isolamento, nas avaliações por microscopia óptica no microscópio de luz invertida, antes e após a coloração com corante Giemsa (figuras 4 a 9).

Esta constatação está alinhada com as observações de Gronthos et al. (2000-2002) e Miura et al. (2003) em relação aos tipos celulares por eles denominados de DPSCs e SHED, isolados por digestão enzimática (C/D).

No entanto, em um estudo comparando os dois métodos de isolamento de células da polpa dentária de dentes permanentes humanos, Huang et al. (2006a) concluíram que diferentes métodos de isolamento dão origem a diferentes linhagens de células pulpares *in*

*vitro*. Porém, em relação à diferenciação odontoblástica, ambos os métodos geraram células pulpareas contendo progenitores de odontoblastos.

Gronthos et al. (2000), e Batouli et al. (2003) verificaram esta diferenciação das células pulpareas, isoladas por digestão enzimática, em tipos semelhantes a odontoblastos e a produção de dentina *in vivo*.

A maior vantagem do método de isolamento por *outgrowth* é sua conveniência em relação às etapas de processamento no laboratório e o baixo custo. No entanto, observou-se ser necessário mais tempo para que as células pudessem começar a migrar do tecido e constituíssem uma cultura. Esta constatação também fora abordada por Huang et al (2006a). As análises de curva de crescimento deste estudo comprovaram a referida observação (figuras 10 a 14).

Kerkis et al. (2006) acreditaram que culturas de fragmento do tecido pulpar, antes da primeira passagem com tripsinização da cultura, provavelmente previnem que as células-tronco passem a se diferenciar prematuramente. Em condições normais, estas células permanecem em estado quiescente e se dividem muito lentamente, mas em casos de injúria do tecido pulpar estas células migram para o sítio da lesão e rapidamente proliferam para participarem do processo de regeneração. Estes autores sugeriram que, no método de isolamento e cultura tipo *outgrowth*, estas células-tronco imaturas de polpa dental (do inglês: *immature dental pulp stem cells* - IDPSCs) predominantemente e seletivamente proliferam. Eles inferiram que os gradientes entre a peça do tecido dental e o meio de cultura servem como um vetor que estimula e dirige a migração destas IDPSCs (presentes tanto em SHED como em DPSC), pois elas perceberiam esta situação como um sítio de injúria do tecido.

Nas avaliações morfológicas em microscopia óptica de luz, no início das culturas de CPdd e CPdp, independente do tipo de isolamento, foram observadas culturas heterogêneas com algumas células apresentando-se mais esféricas e outras alongadas (figuras 4a, 4b, 5a, 5b). Após um período que variou de 7 a 15 dias, as células aderiram à superfície de poliestireno da placa de cultura, apresentando formas mais alongadas e irregulares. Esta constatação está de acordo com as avaliações dos estudos morfológicos descritos por Stanislawski et al. (1997) e Couble et al. (2000).

À medida que a população celular foi proliferando, as células foram adquirindo formas poligonais, com expansão do citoplasma e o núcleo mais polarizado (figuras 5 e 8).

Células com morfologia esférica têm sido relacionadas como células precursoras endoteliais e epiteliais (Kikuchi et al., 2004; Huang et al., 2006). No entanto, segundo Freshney et al. (2007), estas populações celulares são consideradas contaminações no cultivo de células-tronco mesenquimais, quando não se realiza a purificação prévia (separação imunomagnética) das células logo após a digestão enzimática do tecido. Geralmente, estas células desaparecem da cultura após as sucessivas passagens.

Células polarizadas têm sido observadas em culturas de polpa dental (Couple et al., 2000) e são consideradas como células precursoras de odontoblastos, (Gronthos et al., 2000-2002) ou pulpoblastos (Stanislowski et al., 1997; Goldberg e Smith, 2004).

Após as avaliações da mobilidade e morfologia das células que migraram do fragmento do tecido pulpar (*outgrowth*), Stanislowski et al. (1997) relataram que estas células são de origem mesenquimais relacionadas com fagócitos e histiócitos mononucleares. Tem sido reportado que os fibroblastos são os tipos celulares que mais migram do tecido pulpar para a cultura celular (Huang et al., 2006a).

Desta forma, assim como sugeriram Huang et al. (2006a), para garantir o máximo de migração dos tipos celulares do tecido pulpar de CPdp e CPdd, foram realizadas várias transferências do fragmento de tecido para os poços das placas de cultura (figura 6) até que não fossem mais constatadas migrações celulares para a cultura (aproximadamente 4 a 5 transferências).

Após o primeiro subcultivo, as células proliferaram até atingir uma confluência em monocamadas. Com o avanço da cultura, após o terceiro subcultivo as células cresceram exibindo dobras com formação de um tecido de células (figuras 5c, 5d, 9a, 9b).

Uma observação relevante deste estudo morfológico foi a identificação de aglomerados (do inglês: *clusters*) celulares formando núcleos de colônias esparsos na placa de cultura (figura 7a, 7b, 7c, 7d). Esses aglomerados foram descritos nas observações de vários autores (Castro-Malasprina et al., 1980; Couple et al., 2000; Huang et al., 2006a, Yamada et al., 2006).

Em culturas de células pulpares isoladas por dissociação enzimática, tem sido demonstrado que estas formações de nódulos ou agregados celulares, algumas vezes em multicamadas, constituem pré-requisito para diferenciação de células semelhantes a

odontoblastos e formação de matriz mineralizada (Couble et al., 2000, Yamada et al., 2006; Otaki et al., 2007).

Huang et al. (2006b) alegaram que destes grupos centrais de células emergem células em diferentes ângulos, alterando sua morfologia à medida que interagem com células de outros aglomerados, e sugere que devam ser mais investigadas.

Os resultados das avaliações morfológicas deste estudo igualmente revelaram estas colônias interagindo com células de vários aglomerados (figuras 7a, 7b, 7c, 7d). Na literatura, essas unidades celulares têm sido relacionadas como pré-requisito para a diferenciação odontoblástica (Huang et al., 2006b).

De acordo com os dados bibliográficos levantados, alguns estudos evidenciaram a eficiência de formação de colônias formadoras de fibroblastos, as UFC-F, pelas BMSSCs e DPSCs como característica que potencializa a habilidade de diferenciação clonogênica de células precursoras (Castro-Malaspina et al., 1980; Bianco et al., 2000; Goldberg, 2004; Huang et al., 2006b; Otaki et al., 2007).

Muitos estudos demonstraram que uma população minoritária de células-tronco existe dentro do tecido pulpar. Porém, mesmo em minoria, estas células apresentaram maiores índices de proliferação *in vitro*, quando comparadas com as BMSSCs. Isto se deve ao fato de que o tecido pulpar é mais fibroso, gerando conseqüentemente mais UFU-F em contraste com o fluido de matriz óssea aspirada da medula, que é compreendido predominantemente por células hematopoiéticas, incluindo proporções variadas de contaminantes de células sangüíneas periféricas. Os dentes permanentes extraídos por indicação ortodôntica ou recém-erupcionados ainda se apresentam com tecido pulpar jovem, recentemente formado, onde se supõe haver mais células mesenquimais indiferenciadas ou células-tronco (Bianco et al., 2000; Gronthos et al., 2000-2002; Goldberg, 2004).

Interessante observar que muitos estudos têm mostrado que os clones individuais expandidos de BMSSCs, DPSCs, SHED e PDLSCs, derivados de clones de UFU-F, apresentam grande variabilidade em sua capacidade de diferenciação, independente da fonte doadora. Estas constatações sustentam que UFU-F contém uma mistura de população de células progenitoras mesenquimais, em vários estágios de desenvolvimento, mantidas por uma minoria de populações multipotentes de células que apresentam a capacidade de se auto-renovarem. (Shi et al., 2005; Otaki et al., 2007).

Tem sido provado que células-tronco mesenquimais (CTM), mesmo tendo a aparência de fibroblastos, diferem dos fibroblastos maduros da pele ou de outros tecidos que não apresentam capacidade de auto-renovação e diferenciação em multi-linhagem. No entanto, esta plasticidade (transdiferenciação) tem sido demonstrada nas células-tronco semelhantes morfológicamente a fibroblastos isolados na medula óssea e mais recentemente na polpa dental, uma vez que se diferenciam em osteócitos, odontoblastos, adipócitos, condrócitos e células neurais (Gronthos et al., 2002; Kerkis et al., 2006; Zago e Covas 2006; Novakovic et al., 2006; Freshney et al., 2007).

Em relação aos resultados obtidos para a comparação das médias de crescimento e proliferação dos tipos celulares CPdd e CPdp, para cada método de isolamento, as análises demonstraram que os tipos celulares isolados da polpa de dentes decíduos (CPdd) apresentaram as maiores médias de crescimento e proliferação quando comparados com as células de polpa de dentes permanentes (CPdp) para os dois métodos de isolamento (figuras 10, 11, 12, 13 e 14), principalmente para o isolamento por digestão enzimática do tecido pulpar.

Não houve diferença significativa entre os tipos celulares em CPdp obtidos para os dois métodos de isolamento (figura 11 e 14).

Vale ressaltar que as células oriundas do fragmento do tecido pulpar (*outgrowth*), para os dois grupos celulares (CPdd e CPdp), levaram mais tempo para migrarem do tecido e para formarem colônias aderentes, em relação ao grupo obtido por digestão enzimática. Esta constatação confirma as observações de Hunag et al. (2006b) e é demonstrada nos resultados estatísticos e gráficos das curvas de crescimento deste estudo. No entanto, à medida que as culturas atingiram mais confluência e se iniciaram as passagens para os subcultivos, as diferenças das médias de crescimento foram se nivelando principalmente para as células de dentes permanentes (figura 14).

Considerando os valores obtidos para o aumento do número de colônias, foi constatado que os resultados dos tempos de dobramento foram semelhantes aos tempos encontrados nos estudos para células de dentes permanentes humanos (do inglês: *human dental pulp cells* – hDPCs), entre 12 a 24 horas (Huang et al., 2006; Suchánek et al., 2007).

Em relação ao perfil imunofenotípico, os resultados demonstraram que as células do grupo CPdp marcadas com anticorpos anti-CD34, anti-CD45 e anti-CD117, independente

do método de isolamento, apresentaram-se expressivamente positivas para o marcador CD117 (figura 15), com 100% das células adquiridas marcadas para C/D e 99,69% para OG (nas análises com os valores normalizados da tabela 2).

Os gráficos contidos na figura 16 ilustram os dados das análises das múltiplas comparações dos anticorpos com os respectivos grupos controle de células não marcadas, representados na tabela 3.

O CD117 foi o único marcador que apresentou diferença em relação ao grupo controle de células não marcadas ( $P < 0,05$ ). Não houve expressão significativa dos marcadores para células progenitoras hematopoiéticas (CD34), nem para células diferenciadas da linhagem hematopoiética (CD45), como demonstrado nas tabelas 2 e 3. Estes dados foram confirmados nos cálculos apresentados nas tabelas 6 e 8, quando se comparou este grupo celular com CPdd (figuras 23, 24, 25 e 26).

Concluimos que as células CPdp, de acordo com nosso protocolo para caracterização, apresentaram imunofenótipo semelhantes aos de células-tronco, sendo positivas para CD117 e negativas para CD34 e CD45.

No entanto, em relação à marcação com o anticorpo anti-CD34, os resultados apresentados neste estudo diferem parcialmente dos resultados realizados por Laino et al. (2005 - 2006), Pappacio et al. (2006) e D'Aquino et al. (2007) para o método de isolamento por digestão enzimática, em células oriundas de dentes permanentes. Estes autores as apresentaram em seus trabalhos como sendo positivas para o CD34.

Na discussão dos resultados descritos por Laino et al. (2006b), os autores comentaram que o antígeno de superfície CD34 apresenta muita variabilidade de expressão em CTM murinas e em polpa dentária de dentes humanos. São detectadas não mais que 3% da progenia de células hematopoiéticas para DPSCs. STRO-1 (marcador de célula-tronco estromais) identifica apenas 5% das frações de células CD34 positivas. Mesmo assim, baseados nestas constatações, os autores inferiram que as células-tronco pulpare por serem STRO-1 positivas apresentariam a característica de expressarem a marcação positiva para CD34.

Porém, os resultados da imunomarcação deste estudo, para CPdp, estão mais afinados com os resultados apresentados por Gronthos et al. (2000-2002), Shi et al. (2001-2003-2005), por Yamada et al. (2006); Ikeda et al. (2006) e Wei et al. (2007), cujos trabalhos

demonstraram as DPSCs como CD34 negativas, para o método de isolamento por digestão enzimática.

Segundo Miura et al. (2003), as células-tronco oriundas de dentes decíduos seriam imaturas e muito heterogêneas. Kerkis et al. (2006), em um estudo visando o isolamento e caracterização de população de células-tronco de polpa dental de dentes decíduos que expressaram marcadores embriogênicos de células-tronco, alegaram que, pelas análises de diversos padrões fenotípicos e de expressão gênica, esta população de células-tronco imaturas apresentam importantes características embrionárias, pois apresentam forte expressão de marcadores de células-tronco embrionárias como a proteína OCT-4, o gene Nanog, SSEA (do inglês: *Stage-Specific Smbryonic Antigen*), CD105 (SH2), SH-3/SH-4 (CD73), TRA-1-60 e TRA-1-81 (do inglês: *Tumor Recognition Antigens*).

Os autores afirmaram que esta população imatura de células-tronco não está presente somente em SHED, mas se encontra em tecidos pulpare de dentes permanentes jovens. A característica de imaturidade seria relacionada a um estágio bem precoce do estado indiferenciado destas células (do inglês: *stemness*). Em relação à diferenciação em multilinhagens, as células de dentes decíduos apresentaram diferenciação neurogênica, osteogênica, muscular, condrogênica, de forma induzida e espontânea.

Na caracterização imunofenotípica do estado indiferenciado, estas células foram negativas para CD34, CD45 e CD43, mas foram positivas para o CD13, que é um marcador expresso em células precursoras hematopoiéticas e endoteliais. Estes autores concluem que o perfil de expressão gênica de IDPSCs de dentes decíduos coincidem com o de células-tronco embrionárias (Kerkis et al., 2006). Os autores ressaltaram que as IDPSCs isoladas de dentes decíduos apresentaram habilidade de proliferação indefinida, sem apresentarem diferenciação terminal durante 25 passagens. Não identificaram alteração do cariótipo nem do nível de expressão gênica do estado indiferenciado durante os sucessivos subcultivos.

Esta constatação de Kerkis et al. (2006) constrata, em parte, com as afirmações de Fresheny et al. (2007) sobre a caracterização de DPSCs e SHED. Estes últimos pesquisadores relataram que as células destes grupos celulares perdem gradualmente as características do estado indiferenciado com as sucessivas passagens, principalmente DPSCs, que se diferenciam em odontoblastos entre a quarta e quinta passagem sem qualquer indução específica.

De acordo com os trabalhos envolvendo caracterização de células-tronco mesenquimais (CTM) mais reportados a dentes permanentes, vários autores têm afirmado como protocolo de caracterização fenotípica destas células, a requisição de um conjunto de anticorpos.

Comumente, as CTM expressam os antígenos de superfície para os anticorpos anti-CD117, anti-STRO-1, anti-CD105 (SH-2), anti-CD73 (SH3/SH4), anti-CD90 (Thy-1), mas não expressam os marcadores de células hematopoiéticas CD34, CD45, CD14, assim como os marcadores de células endoteliais (KDR e VE-caderina) e antígenos do complexo de histocompatibilidade principal da classe II (HLA-DR) (Gronthos et al., 2000-2002; Laino et al., 2005-2006; Pierdomenico et al., 2005; Gagari et al. 2006; Yamada et al., 2006; Wei et al., 2007; Pappacio et al., 2006; Shi et al., 2005; Zago e Covas, 2006).

Estabelecendo uma comparação ainda não apresentada na literatura, para células oriundas de dentes decíduos em relação aos métodos de isolamento mais utilizados para dispersão celular de células pulpares em cultura (C/D e OG), no experimento desenvolvido neste estudo, as células do grupo CPdd, independente do método de isolamento, apresentaram-se positivas para CD117 (com 98,95% em C/D e 98,73% para OG) e para CD34 (com 53,91% em C/D e 35,59% em OG), conforme as análises dos valores normalizados na tabela 4 e a ilustração dos gráficos na figura 20. Não houve expressão significativa para linhagem hematopoiética com diferenciação terminal (CD45). Comparando com as análises de CPdp, estes dados foram confirmados nos cálculos apresentados nas tabelas 6 e 8, ilustrados nas figuras 23, 24, 25 e 26.

Os gráficos contidos na figura 20 ilustram os dados das nossas análises das múltiplas comparações dos anticorpos utilizados para a imunomarcagem das células em CPdd. Representados na tabela 5 ressaltamos que os marcadores CD34 e CD117 apresentaram diferença significativa em relação aos respectivos grupos controle de células não marcadas ( $P < 0,05$ ), nos dois métodos de isolamento.

Se considerarmos as conclusões de Huang et al., (2006-b) em que diferentes métodos de isolamento dão origem a diferentes linhagens de células pulpares *in vitro*, no presente estudo não foi constatada esta diferença na caracterização imunofenotípica entre cada tipo celular em relação aos dois métodos de isolamento. Somente após a indução de

diferenciação em diferentes linhagens é que se pode estabelecer esta comparação em relação aos métodos de isolamento.

As células CPdd isoladas e cultivadas de acordo com nosso protocolo apresentaram imunofenótipo semelhante aos de células-tronco, sendo expressivamente positivas para CD117, apresentando características de células progenitoras hematopoiéticas (CD34<sup>+</sup>), mas não apresentaram fenótipo de células da linhagem hematopoiética com diferenciação terminal (CD45<sup>-</sup>).

Descartamos a hipótese de contaminação, uma vez que os trabalhos foram realizados com tecido pulpar de três pacientes distintos e para os dois métodos de isolamento, apresentando o mesmo resultado.

As representações gráficas das análises em citometria nos histogramas (figuras 17, 18, 21 e 22) ilustram as intensidades de fluorescência das células positivamente marcadas em CPdp e CPdd com os diferentes anticorpos, demonstrando não haver diferença de perfil imunofenotípico em relação aos métodos de isolamento.

Duas constatações podemos inferir destes resultados em relação à CPdd:

1- São expressivamente positivas para o marcador de células-tronco c-kit (CD117) a exemplo das células adquiridas em CPdp, ou seja, apresentam imunofenótipo compatível aos de células-tronco;

2- Podem ser consideradas como progenitores multipotentes de células da hierarquia do sistema hematopoiético.

Segundo os protocolos de caracterizações para células-tronco hematopoiéticas (CTH), este grupo celular expressa positivamente os marcadores CD117, e CD34, além de serem definidas como CD38<sup>-</sup>, CD33<sup>-</sup>, Thy-1<sup>-</sup>, CD45 *low* e CD71<sup>-</sup>. O antígeno de superfície CD34 é expresso nas diversas CTH provenientes da medula óssea, do sangue periférico do cordão umbilical, do sangue placentário e do fígado fetal (Zago e Covas, 2006). Vale ressaltar que o CD117/SCF exercem importante função como fator de crescimento hematopoiético, sendo expresso igualmente em células CD34 positivas.

Por outro lado, alguns autores alegam que geralmente células de origem mesenquimais apresentam o perfil de CD34<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup> (D'Aquino et al., 2007).

O CD34 tem sido demonstrado na função de regulador da adesão, diferenciação e proliferação de CTH e também para outras células-tronco progenitoras, e que a expressão tanto de CD117 como de CD34 reforçam o perfil imunofenotípico de células com características de células-tronco (Gangenahalli et al., 2005; Gagari et al., 2006; Zago e Covas, 2006).

As conclusões extraídas do presente estudo conferem maior especialidade e melhores características imunofenotípicas de CPdd em comparação com CPdp, mas devem ser testadas as possibilidades de diferenciação em tipos celulares hematopoiéticos para que se possa confirmar esta plasticidade. Nesse sentido, outras abordagens experimentais poderiam esclarecer as diferenças encontradas, aplicando-se outros marcadores como, por exemplo: STRO-1, CD90, CD13 e o marcador negativo para linhagens (Lin-).

Os resultados para imunomarcção de CPdd, em relação ao marcador CD34, se aproximaram mais dos protocolos estabelecidos por Laino et al. (2005-2006), Papaccio et al., (2006) e D'Aquino et al. (2007), porém para polpas obtidas de dentes permanentes impactados (DPSCs).

Finalmente, cabe ressaltar que as avaliações morfológicas, proliferativas e imunofenotípicas realizadas nesta pesquisa para os tipos celulares em CPdd e CPdp estão alinhadas com as atuais pesquisas que afirmam as características de células-tronco mesenquimais somáticas para as células isoladas a partir do tecido pulpar de dentes humanos, por apresentarem grandes expressões do marcador c-Kit ou CD117 (Gronthos et al., 2000-2002; Laino et al., 2005-2006; Pierdormenico et al., 2005; Shi et al., 2005; Gagari et al. 2006; ; Kerkis et al., 2006; Pappacio et al., 2006; Wei et al., 2007; Zago e Covas, 2006; Freshney et al., 2007), apesar da controvérsia a respeito da expressão da marcação com CD34.

# *7. Conclusões*

Diante dos resultados e discussão expostos, podemos concluir:

- Os protocolos desenvolvidos para a obtenção das células pulpares de dentes humanos foram eficientes;
- Não houve diferença morfológica entre os tipos celulares nem entre os métodos de isolamento;
- Foram identificados os aglomerados de unidades formadoras de colônias semelhantes a fibroblastos (UFC-F), característica de células com habilidades clonogênicas (precursoras de multilinhagens);
- CPdd e CPdp apresentam grande potencial de proliferação representado pelos cálculos das curvas de crescimento, com tempos de dobramentos semelhantes aos mesmos parâmetros descritos na literatura para os tipos celulares do tecido pulpar
- CPdd apresentaram as maiores médias de crescimento exponencial, principalmente para o método de isolamento por digestão enzimática C/D;
- Nos resultados apresentados, diferentes métodos de isolamento não geraram diferenças nos perfis imunofenotípicos dos tipos celulares caracterizados em CPdd e CPdp;
- CPdd e CPdp apresentaram perfil imunofenotípico compatível com os de células-tronco, sendo expressivamente positivas para o marcador CD117, independente do método de isolamento;
- Não foi identificado fenótipo de células da linhagem hematopoiética com diferenciação terminal. Os grupos foram negativos para CD45;
- Houve diferença na expressão do marcador CD34 entre os grupos estudados. Os tipos celulares em CPdd apresentaram expressão positiva deste marcador.
- As análises fenotípicas globais finais demonstraram que CPdp apresentaram-se CD117<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup> e CD45<sup>-</sup>, e as CPdd apresentaram-se CD117<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup> e CD45<sup>-</sup>.

# *8. Referências*

1. ABBAS, A.K. **Imunologia básica: funções e distúrbios do sistema imunológico**. 2. ed. Elsevier Ltda, 2007. 354p.
2. ABOUT I.; MITISIADIS, T.A. Molecular aspects of tooth pathogenesis and repair: in vivo and in vitro models. **Adv Dent Res**, v.15, n.1, p. 59-62, 2001.
3. ABOUT I. et al. Human dentin production in vitro. **Exp Cell Res**, v. 258, p. 33-41, 2000.
4. ALHADLAQ A.; MAO J.J. Mesenquimal stem cells: isolation and therapeutics. **Stem Cells Dev**, v. 13, n. 4, p. 436-48, Aug. 2004.
5. ALMUSHAYT, A.; ZAKI, A. E.; GEORGE, A. Dentin matrix protein-1 induces cytodifferentiation of dental pulp stem cells into odontoblasts. **Gene Ther**, v. 13, n. 7, p. 611-20, Apr. 2006.
6. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação – referências – elaboração. Rio de Janeiro: ago. 2002. 24 f.
7. BALIC A.; MINA M. Analysis of developmental potentials of dental pulp in vitro using GFP transgens. **Orthod Craniofacial Res**, v. 8, p. 252-58, 2005.
8. BATOULI, S. et al. Comparison of stem cells-mediated osteogenesis and dentinogenesis. **J. Dent. Res**, v.12, p. 976-81, 2003.
9. BIANCO, P. et al. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. **Stem Cells**, v. 19, n. 3, p. 180-192, 2001.
10. BLEICHER F. et al. New genes involved in odontoblast differentiation. **Adv Dent Res**, v.33, p. 30-33, 2001.
11. BOWEN, A. et al. Isolation and preliminary characterization of stem cells from human dental pulp. **European Cell and Materials**, v. 11, p. 58. suppl. 3, 2006.
12. BUURMA, B.; GU, K.; RUTHERFORD, R.B. Transplantation of human pulpal and gingival fibroblast attached to synthetic scaffolds. **Eur. J. Oral Sci**, v. 4, n. 107, p. 282-89, 1999.
13. CASTRO-MALASPINA, H. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. **Blood**, v.56, n.2, p. 289-300, 1980.
14. CHEN S.C. et al. Location of putative stem cells in human periodontal ligament. **J. Periodontal Res**, v. 41, p. 547-53, 2006.
15. COUBLE, M.L. et al. Odontoblast differentiation of human dental pulp cells in explants cultures. **Calcified Tissue International**, v. 66, p. 129-38, 2000.

16. D'AQUINO, R. et al. Human postnatal dental pulp cells co-differentiate into osteoblasts and endotheliocytes: a pivotal synergy leading to adult bone tissue formation. **Cell Death Differ**, v. 14, n.6, p. 1162-71, Jun. 2007.
17. DUAILIBI, M.T. et al. Bioengineered teeth from cultured rat tooth bud cells. **J. Dent. Res**, v. 83, n. 7, p. 523-528, 2004.
18. FRESHNEY, I.R.; STACEY, G.N.; AUREBACH, J.M. **Culture of human stem cells: culture of specialized cells**. New York: Wiley, 2007. 343 p.
19. GAGARI, E. et al. Expression of stem cell factor and its receptor, c-kit, in human oral mesenchymal cells. **Eur J Oral Sci**, v. 114, p. 409-15, 2006.
20. GANGENAHALLI, G.U. et al. Three-dimensional structure prediction of the interaction of CD34 with the SH3 domain of CRK-L. **Stem Cell and Development**, v. 14, n. 5, p. 470-47, Oct. 2005.
21. GARCIA-GODOY F.; MURRAY P.E. Status and potential Commercial impact of stem cell-based treatments on dental and craniofacial regeneration. **Stem Cell and Development**, v. 15, p. 881-7, 2006.
22. GOLDBERG, M.; SMITH, A. J. Cells and extracellular matrices of dentin and pulp: a biological basis for repair and tissue engineering. **Critical Review in Oral Biol Med**, v. 15, n. 1, p. 13-27, 2004.
23. GRONTHOS, S. et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. **PNAS**, v. 97, n. 25, p. 13625-630, 2000.
24. GRONTHOS, S. et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. **J. Dent. Res**, v. 81, n. 8, p. 531-35, 2002.
25. HARADA, H. et al. Epithelial stem cells in teeth. **Odontology**, p. 901-6, 2002.
26. HARADA, H. et al. Localization of putative stem cells in dental epithelium and their association with notch and FGF signaling. **Journal of Cell Biology**, v. 147, n. 1, p. 105-20, 1999.
27. HIROSHI, K. et al. Odontoblasts induced from mesenchymal cells of murine dental papillae in three-dimensional cell culture. **Cell Tissue Res**, v. 317, p. 173-85, 2004.
28. HUOJIA, M. et al. TGF- $\beta$ 3 induces ectopic mineralization in fetal mouse dental pulp during tooth germ development. **Develop. Growth Differ**, v. 47, p. 141-52, 2005.
29. HUANG, G.T-J; SHAGRAMANOVA, K.; CHAN, S.W. Formation of odontoblast-like cells from cultured human dental pulp cells on dentin *in vitro*. **J. Endod**, v. 32, p. 1066-673, 2006b.

30. HUANG, G.T-J. et al. In vitro characterization of human dental pulp cells: various isolation methods and culturing environments. **Cell Tissue Res**, v. 324, p. 225-36, 2006a.
31. IKEDA, E. et al. Osteogenic differentiation of human dental papilla mesenchymal cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 342, p. 1257-1262, 2006.
32. IOHARA, K. et al. Dentin regeneration by Dental Pul Stem Cell Therapy with recombinant Human Bone Morphogenetic Protein 2. **J. Dent. Res**, v. 83, n. 8, p. 590-98, 2004.
33. IOHARA, K. et al. The side population cells isolated from porcine dental pulp tissue with self-renewal in multipotency for dentinogenesis, chondrogenesis, adipogenesis and neurogenesis. **Stem Cells**, PMID, v. 24, n. 11, p. 2493-503, 2006.
34. KAMATA, N. et al. Immortalization of human dental papilla, dental pulp, periodontal ligament cells and gingival fibroblasts by telomerase reverse transcriptase. **J Oral Pathol Med**, v. 33, p. 417-23, 2004.
35. KATCHBURIAN, E.; ARANA, V. **Histologia e embriologia oral: texto-atlas-correlações clínicas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 388 p.
36. KERKIS, H. et al. 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.
37. KIKUCHI, H. et al. Odontoblasts induced from mesenchymal cells of murine dental papillae in three-dimensional cell culture. **Cell Tissue Res**, v. 317, p. 173-85, 2004.
38. KRAMER, P.R. et al. Mesenchymal stem cells acquire characteristics of cells in the periodontal ligament *in vitro*. **J. Dent. Res**, v. 83, n. 1, p. 27-34, 2004.
39. KREBSBACH, P.H.; ROBEY, P.G. Dental and skeletal stem cells: potential cellular therapeutics for craniofacial regeneration. **J. Dental Education**, v. 66, n. 6, p. 766-73, 2002.
40. LAINO, G. et al. A new population of human adult dental pulp stem cells: a useful source of living autologous fibrous bone tissue. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 20, n. 8, p. 1394-402, Mar. 2005.
41. LAINO, G. et al. In vitro bone production using stem cells derived from human dental pulp. **The Journal of Craniofacial Surgery**, v. 17, n. 3, p. 511-16, 2006.
42. LIU, J. et al. In vitro differentiation and mineralization of human dental pulp cells induced by dentin extract. **In Vitro Cell Dev Biol-Animal**, v. 41, p. 232-38, 2005.

43. LIU, H. et al. Dentonin, a fragment of MEPE, enhanced dental pulp stem cell proliferation. **J Dent Res**, v. 83, n.6, p. 496-99, 2004.
44. MAO, J.J. et al. Craniofacial tissue engineering by stem cells. **J Dent Res**, v. 85, n. 11, p. 996-79, 2006.
45. MARIA, O.M.; KHOSRAVI, R.; MESEY, E. Tran SD. Cells from bone marrow that evolve into oral tissues and their clinical applications. **Oral Diseases**, v. 13, p.11-16, 2007.
46. MINA, M.; BALIC, A. Analysis of developmental potentials of dental pulp in vitro using GFP transgenes. **Orthod Craniofacial Res**, v. 8p. 252-58, 2005.
47. MIURA, M. et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **PNAS**. **0937635100**, v. 100, n. 10, p. 5807-12, 2003.
48. MITSIADIS, T.A.; RAHIOTIS, C. Parallels between tooth development and repair: conserved molecular mechanisms following carious and dental injury. **Journal of Dental Research**, v. 83, n. 12, p. 896-902, 2004.
49. MODINO, S.A.C.; SHARPE P.T. Tissue engineering of teeth using adult stem cells. **Archives of Oral Biology**, v. 50, p. 255-58, 2005.
50. MOONEY D.J. et al. Engineering dental pulp-like tissue in vitro. **Biotechnol**, v. 12, p. 865-68, 1996.
51. MOROTOMI, T. et al. In vitro differentiation of dental epithelial progenitor cells through epithelial-mesenchymal interactions. **Archives of Oral Biology**, v. 50, p. 695-705, 2005.
52. MORSCZECK, C. Gene expression of *runx2*, *osterix*, *c-fox*, *DLX-3*, *DLX-5* and *MSX-2* in dental follicle cells during osteogenic differentiation *in vitro*. **Calcif Tissue Int**, v. 78, p. 98-102, 2006.
53. MURRAY, P.E.; GARCIA-GODOY, F.; HARGREAVES, K.M. Regenerative endodontics: a review of current status and a call for action. **JOE**, v. 33, n. 4, p. 377-89, Apr. 2007.
54. MURRAY, P.E. et al. Analysis of pulpal reactions to restorative procedures, materials pulp capping, and future therapies. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 13, n. 6, p. 509-20, 2002.
55. NAKAO, K. et al. The development of bioengineered organ germ method. **Nature Methods**, v. 4, p. 227-230, 2007.
56. NAKASHIMA, M. Tissue engineering in endodontics. Review article. **Australian Endodontic Journal**, v. 31, n.3, p.111-13.

57. NAKASHIMA, M.; AKAMINE, A. The application of tissue engineering to regeneration of pulp and dentin in endodontics. **J. Endod**, v. 31, n. 10, p. 711-18, 2005.
58. NAKASHIMA, M. et al. Stimulation of reparative dentin formation by ex vivo gene therapy using dental pulp stem cells electrotransferred with growth/differentiation factor 11 (Gdf11). **Human Gene Therapy**, v. 15, n. 11, p. 1045-53, 2004.
59. NOVAKOVIC, G.V.; FRESHNEY, R.I. **Culture of cells for tissue engineering**. Wiley- Interscience, 2006. 352 p. ISBN 0471741809.
60. ONISHI, T. et al. Stimulation of proliferation and differentiation of dog dental pulp cells in serum-free culture medium by insulin-like growth factor. **Arch Oral Biol**, v. 44, n. 4, p. 361-71, 1999.
61. OTAKI, S. et al. Mesenchymal progenitor cells in adult human dental pulp and their ability to form bone when transplanted into immunocompromised mice. **Cell Biology International**, v. 31, p. 1191-97, 2007.
62. PAPACCIO, G. et al. Long-Term cryopreservation of dental pulp stem cells (SBP-DPSCs) and their differentiated osteoblasts: a cell source for tissue repair. **Journal of Cellular Physiology**, v. 208, p. 319-25, 2006.
63. PERES, C.M.; CURI, R. **Como cultivar células**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. 304 p.
64. PIERDOMENICO, L. et al. Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. **Transplantation**, v. 80, p. 836-42, 2005.
65. PRIAM, F. et al. Nouveaux modèles cellulaires permettant d'identifier le phénotype odontoblastique. **Les Cahiers de L'ADF**, n. 18-19, p. 28-33, 2005.
66. RENARD, E. et al. Les cellules souches de la pulpe dentaire. **C.R. Biologies**, v. 330, p. 635-43, 2007.
67. REYNOLDS, A.J.; JOHADA, C.A.B. Cultures human and rat tooth papilla cells induce hair follicle regeneration and fiber growth. **Differentiation**, v. 72, p. 566-75, 2004.
68. SAITO, T. et al. Acceleration effect of human recombinant bone morphogenetic protein -2 on differentiation of human pulp cells into odontoblasts. **J. Endod**, v. 30, n. 4, p. 205-8, 2004.
69. SANTOS, A.P. et al. O papel da proteína morfogenética óssea na reparação do tecido ósseo. **ACTA Ortop Bras**, v. 13, n. 4, p. 194-95, 2005.

70. SEO, B. et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. **Lancet**, v. 364, p. 149-55, 2004.
71. SHAMBLOTT, M.J. et al. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human cells. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 95, n. 23, p. 13726-731, 1998.
72. SHI, S.; GRONTHOS, S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 18, p. 696-704, 2003.
73. SHI, S.; ROBEY, P.G.; GRONTHOS, S. Comparasion of human dental pulp and bone marrow stromal stem cells by cDNA microarray analisys. **Bone**, v. 29, n. 6, p. 532-39, 2001.
74. SHI, S. et al. The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. **Orthod Craniofacial Res**, v. 8, n. 3, p. 191-9, 2005.
75. SMITH, A.J.; LESOT, H. Induction and regulation on crown dentinogenesis: Embryonic events as a template for dental tissue repair? **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 12, n. 5, p. 425-37, 2001.
76. SLOAN, A.J.; SMITH, A.J. Stem cells and the dental pulp: potential roles in dentine regeneration and repair. **Oral diseases**, v. 13, p. 151-57, 2007.
77. SLOAN, A.J. et al. An in vitro approach for the study of dentinogenesis by organ culture of dentine-pulp complex from rat incisor teeth. **Archives of Oral Biology**, v. 43, p.421-30, 1998.
78. SOARES, A.P. et al. Células-tronco em odontologia. **R Dental Press Orthodon Orthop Facial**, v 12, p 33-40, 2007.
79. STANISLAWSKI, L. et al. In vitro culture of human dental pulp cells: some aspects of cells emerging early from the explants. **Cllin Oral Invest**, v. 1, p. 131-40, 1997.
80. SRISUWAN, T. et al. Molecular aspects of tissue engineering in the dental field. **Periodontology**, v. 41, p.88-108, 2000.
81. SUCHÁNEK, J. et al. Human dental pulp stem cells: isolation and long term cultivation. **Acta Medica (Hradec Kralove)**, v. 50, n. 3, p. 195-201, 2007.
82. TECLES, O. et al. Activation of human dental pulp progenitor/stem cells in response to odontoblast injury. **Arch Oral Biol**, v. 50, n. 2, p. 103-8, 2005.
83. THESLEFF, I.; SHARPE, P. Signalling networks regulating dental development. **Merch Dev**, v. 67, p. 111-23, Oct. 1997.
84. THOMSON, J.A. et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science**, v 282, n 5391, p. 1145-147, 1998.

85. TJÄDERHANE, L. et al. Human odontoblast culture method: the expression of collagen and matrix metalloproteinases (MMPs). **Adv Dent Res**, v. 15, p. 55-8, 2001.
86. TOYONO, T. et al. Expression of TGF- $\beta$  superfamily receptors in dental pulp. **J Dent Res**, v. 76, n. 9, p. 1555-560, Sept. 1997.
87. TZIAFAS, D. The future role of a molecular approach to pulp-dentinal regeneration. **Caries Research**, v 38, p. 314-320, 2004).
88. WEI, X. et al. Expression of mineralization markers in dental pulp cells. **J Endod**, v. 33, p. 703-08, 2007.
89. YAMADA, Y. et al. Cluster analysis and gene expression profiles: a cDNA microarray system-based comparison between human dental pulp stem cells (hDPSCs) and human mesenchymal stem cells (hMSCs) for tissue engineering cell therapy. **Biomaterials**, v. 27, n. 3766-781, 2006.
90. YOUNG, C. S. et al. Tissue-Engineered hybrid tooth and bone. **Tissue Engineering**, v.11, n. 9-10, p. 1599-610, 2005.
91. YU, J. et al. Odontogenic capability: bone marrow stromal stem cells versus dental pulp stem cells. **Biol Cell**, v. 99, n. 8, p. 465-74, 2007.
92. ZAGO, M. A.; COVAS, D. M. **Células-tronco: a nova fronteira da medicina**. São Paulo: Atheneu, 2006. 264 p.
93. ZANG, W. et al. Differentiation ability of rat adult dental pulp stem cells *in vitro*. **Tissue Engineering**, v. 11, n. 3-4, p. 357-68, 2005.

# *9. Anexo 1*

**Aprovação do Projeto de Pesquisa pelo Comitê de Ética em  
Pesquisa da Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília**



Universidade de Brasília  
Faculdade de Medicina  
Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos

Campus Universitário, Asa Norte – CEP 70910-9000 – Brasília, DF - Tel.: (061) 3307-2520 / 3273-4069

### ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

**Registro de projeto:** CEP-FM 034/2007

**Título:** "Identificação das células-tronco de polpa dental. Avaliação do potencial de crescimento entre células-tronco de dentes deciduos e permanentes. Estudo morfológico e imunocitoquímico in vitro"

**Pesquisador responsável:** Leliane Macedo de Souza

**Documentos analisados:** Folha de rosto, carta de encaminhamento, declaração de Responsabilidade, protocolo de pesquisa, termo de consentimento livre e esclarecido, cronograma, bibliografia pertinente e currículo(s) de pesquisador(es)

**Data de entrada:** 08/06/2007

Proposição do(a) relator(a)

( x ) Aprovação

( ) Não aprovação

**Data da primeira análise pelo CEP-FM/UnB:** 27/06/2007

**Data do parecer final do projeto pelo CEP-FM/UnB:** 05/09/2007

### PARECER

Com base na Resolução CNS/MS Nº 196/96, que regulamenta a matéria, a Coordenação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília decidiu **APROVAR** *ad referendum*, conforme parecer do(a) relator(a), o projeto de pesquisa acima especificado, quanto aos seus aspectos éticos.

- 1 – Modificações no protocolo devem ser submetidas ao CEP, assim como a notificação imediata de eventos adversos graves;
- 2 – O(s) pesquisador(es) deve(m) apresentar relatórios periódicos do andamento da pesquisa ao CEP-FM.

Brasília, 20 de setembro de 2007.

  
Prof. Elaine Maria de Oliveira Alves  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa  
Faculdade de Medicina-UnB

# *10. Apêndices*

**Apêndice 1: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).**

Convido \_\_\_\_\_ a participar da pesquisa “Identificação das células-tronco de polpa dental. Avaliação do potencial de crescimento entre células-tronco de dentes decíduos e permanentes. Estudo morfológico e imunocitoquímico”, que será desenvolvida por mim, Leliane Macedo de Souza, cirurgia-dentista e aluna de mestrado da Universidade de Brasília, pela Faculdade de Ciências da Saúde.

A pesquisa tem por objetivo isolar e identificar células da polpa ou nervo dos dentes permanentes e “de leite” (decíduos), que quando cultivadas e tratadas em laboratório podem dar origem a diversos outros tipos de células, cujos benefícios para a ciência são as utilizações destas células na reconstrução de dentes, de outros tecidos ou órgãos do corpo humano danificados por diversas doenças degenerativas e traumáticas.

O (a) paciente foi informado (a) que não há risco de prejuízo de sua saúde geral e bucal, porque serão coletados nervos de dentes que já têm indicação de extração solicitada por seu dentista, por estarem inclusos, retidos e/ou impactados, e que serão de qualquer forma descartados após a remoção cirúrgica.

As etapas de extração serão executadas pelo seu dentista de escolha, no Instituto Maxilo-Facial e que a pesquisadora apenas irá coletar o (s) nervo (s) do (s) dente (s) depois de removido (s). A cirurgia para retirada do (s) dente (s) envolve anestesia e o risco cirúrgico é baixo, e que os controles antes e depois da cirurgia são da responsabilidade do dentista que o paciente escolheu.

Foi esclarecido que a doação do(s) dentes(s) é um ato de sua livre e consciente vontade, do qual o paciente pode desistir deste consentimento sem punição ou prejuízo pessoal, antecipadamente, pelos contatos diretos da pesquisadora nos telefones: (61) 9985-0188 e (61) 3366-4837, e por e-mail: [lelianesouza@gmail.com](mailto:lelianesouza@gmail.com).

A pesquisadora firma o compromisso de garantir o sigilo e a privacidade da participação do doador nesta pesquisa, onde não será mencionado nenhum dado pertinente à sua ficha clínica e pessoal.

Diante do exposto, o paciente abaixo assinado concorda de forma livre e esclarecida que o (s) dentes (s) doado (s) seja (sejam) utilizado (s) na pesquisa descrita acima.

Brasília, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Assinatura do paciente doador

\_\_\_\_\_

Assinatura da pesquisadora Leliane Macedo de Souza.

**Apêndice 2** – Tabela dos dados estatísticos referentes à curva de crescimento dos tipos celulares de **CPdd** em relação aos dois métodos de isolamento.

Tempo (horas)	Método de isolamento	Média (Desvio Padrão)	P (valor)	Intervalo de Confiança
48	C/D	113867 (23129)	0,017	(43420; 158897)
	OG	12708 (2292)		
96	C/D	500483 (53100)	0,006	(262108; 536559)
	OG	101150 (15228)		
144	C/D	896700 (71201,3)	0,001	(438589; 749078)
	OG	302867 (45489)		
192	C/D	1027817 (109928)	0,009	(225026; 713341)
	OG	558633 (74658)		
240	C/D	1406700 (130880)	0,029	(94997; 890403)
	OG	914000 (172398)		
288	C/D	1347967 (191481)	0,016	(231890; 1092977)
	OG	685533 (135066)		
336	C/D	1075367 (101863)	0,149	(-144088; 587555)
	OG	853633 (171068)		

**Apêndice 3** – Tabela dos dados estatísticos referentes à curva de crescimento dos tipos celulares de **CPdp** em relação aos dois métodos de isolamento.

Tempo (horas)	Método de isolamento	Média (Desvio Padrão)	P (valor)	Intervalo de Confiança
48	C/D	39233 (4618)	0,956	(-21218,63; 5151,97)
	OG	47267 (5493)		
96	C/D	46133 (9435)	0,026	(-71804,4; -9262,3)
	OG	86667 (14165)		
144	C/D	196100 (65678)	0,438	(-134189,9; 211256,5)
	OG	157567 (22822)		
192	C/D	234500 (125243)	0,301	(-402320; 175853)
	OG	347733 (95231)		
240	C/D	100333 (10855)	0,007	(-394259; -181274)
	OG	388100 (41472)		
288	C/D	369333 (110459)	0,584	(-239950,2; 354150,2)
	OG	312233 (118051)		
336	C/D	336300 (65213)	0,064	(-16020; 301753)
	OG	193433 (56790)		

**Apêndice 4** – Tabela dos dados estatísticos referentes à curva de crescimento dos tipos celulares de **CPdp** e **CPdd** em relação ao método de isolamento **C/D** (digestão enzimática por colagenase tipo I e dispase).

Tempo (horas)	Tipo celular	Média (Desvio Padrão)	P (valor)	Intervalo de Confiança
48	CPdp	39233 (4618)	0,032	(-133224,1; -16042,6)
	CPdd	113867 (23129)		
96	CPdp	46133 (9435)	0,001	(-588324;320376)
	CPdd	500483 (53100)		
144	CPdp	196100 (65678)	0,001	(-878583; -522617)
	CPdd	896700 (71201)		
192	CPdp	234500 (125243)	0,004	(-1099504; -487130)
	CPdd	1027817 (109928)		
240	CPdp	100333 (10855)	0,003	(-1632608; -980126)
	CPdd	1406700 (130880)		
288	CPdp	369333 (110459)	0,005	(-1384800; -572467)
	CPdd	1347967 (191481)		
336	CPdp	336300 (65213)	0,002	(-961298; -516835)
	CPdd	1075367 (101863)		

**Apêndice 5** – Tabela dos dados estatísticos referentes à curva de crescimento dos tipos celulares de **CPdp** e **CPdd** em relação ao método de isolamento **OG** (cultra do fragmento do tecido pulpar ou do inglês: *outgrowth*).

Tempo (horas)	Método de isolamento	Média (Desvio Padrão)	P (valor)	Intervalo de Confiança
48	CPdp	47267 (5493)	0,010	(19772,3; 49344,4)
	CPdd	12708 (2292)		
96	CPdp	86667 (14165)	0,314	(52696,4; 23729,7)
	CPdd	101150 (15228)		
144	CPdp	157567 (22822)	0,039	(-271726; -18874)
	CPdd	302867 (45489)		
192	CPdp	347733 (95231)	0,057	(-433236;11436)
	CPdd	558633 (74658)		
240	CPdp	388100 (41472)	0,036	(-966377; -85423)
	CPdd	914000 (172398)		
288	CPdp	312233 (118051)	0,034	(-702899; -43701)
	CPdd	685533 (135066)		
336	CPdp	193433 (56790)	0,024	(-1107961; -212439)
	CPdd	853633 (171068)		