

KARLA MAYRA PINTO E CARVALHO REZENDE

**Células-tronco da polpa e papila apical dental humanas: Análise morfológica,
funcional e por microfluorescência de raios X**

São Paulo

2014

KARLA MAYRA PINTO E CARVALHO REZENDE

**Células-tronco da polpa e papila apical dental humanas: Análise morfológica,
funcional e por microfluorescência de raios X**

Versão Original

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Doutor, pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Odontológicas.

Área de Concentração: Odontopediatria

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Bönecker
Co-orientadora: Prof. Dra. Andrea Mantesso Pobocik

São Paulo

2014

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Rezende, Karla Mayra Pinto e Carvalho.

Células-tronco da polpa e papila apical dental humanas: análise morfológica, funcional e por microfluorescência de raios X / Karla Mayra Pinto e Carvalho Rezende; orientador Marcelo Bönecker, co-orientadora Andrea Mantesso Pobocik.- São Paulo, 2014.

118 p. : il. : fig. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Odontopediatria. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão original.

1. Células-tronco – Polpa dentária. 2. Células-tronco – Papila dentária. 3. Morfologia dentária. 4. Marcadores moleculares. 5. Fluorescência - Raios X. I. Bönecker, Marcelo. II. Pobocik, Andrea Mantesso. III. Título

Rezende KMPC. Células-tronco da polpa e papila apical dental humanas: Análise morfológica, funcional e por microfluorescência de raios X. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências Odontológicas.

Aprovado em: / /2014

Banca Examinadora

Prof(a)e. Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

A minha família amada, dedico este trabalho

Meus pais,

Não apenas por terem me transmitidos o dom da vida, mas também os fundamentos essenciais para vivê-las, também pelo amor, compreensão e carinho a mim dedicados.

Vocês são os maiores idealizadores dos meus sonhos, sempre acreditando em mim, muitas vezes até mais do que eu mesma.

Sempre me apoiando em todas as retas e curvas da minha estrada, ajudando-me a concretizar cada um dos meus sonhos mesmo quando eu achava impossível. Me espelho no exemplo de trabalho e dedicação à família, incansáveis e íntegros, que sempre

Mãe e pai, só estou aqui hoje porque me senti amparada por vocês, demonstram um amor incondicional sempre torcendo pelo meu sucesso e felicidade. Sei que muitos sacrifícios vocês passaram e até mesmo abdicaram dos seus projetos por mim.

Amo vocês infinitamente

Vovô José Ferreira (in memoriam)

Você partiu antes que este mesmo da minha aprovação no vestibular para Odontologia. Nós deixou uma imensa saudade e um vazio as vezes sufocante.

Como eu gostaria que o senhor estivesse na aqui, como eu gostaria de continuar te vendo, e de te abraçar...Eu acredito que de alguma forma você está sempre comigo..me guiando. Por isso, sentirei sua presença e então poderia dizer tanta coisa, mas prefiro o silêncio, ele poderá dizer o que sinto...um amor enorme e muita saudade.

Vovó Dalíla (in memoriam)

Que nunca deixou de me abençoar em todos os momentos da minha vida, fortalecendo-me com seu imenso carinho e amor.

Aos meus Tios José Antônio (in memorian), Maria Aparecida (in memorian) e Maria Célia (Yayá)

Pelo exemplos de vida, amor e pela dádiva de ter sempre a família como exemplo e apoio.

Por estarem sempre ao meu lado repletos de carinho, amor e incentivos. Tudo que sou e que realizo são respostas ao cuidado e paciência que vocês tiveram comigo.

Vovó Filhinha (in memorian), Tia Mara e Raffinha

Não preciso dizer da importância na minha vida. Mesmo distantes sempre me transmitiram boas vibrações e mensagens positivas. Torcendo, aconselhando e acreditando em mim.

Aos meus irmãos Carolina e Roberto

Que acompanham cada passo da minha vida, compartilham meus sentimentos e vibram a cada conquista. Vocês são motivos de imensa alegria para mim.

Agradeço à Deus,

Que sempre esteve presente nos sorrisos, abraços, carinhos que encontrei em cada pessoa presente ou passada na minha vida.

Cada um tem seu caminho, seu destino e acredito que existem coisas reservadas pra gente que fogem da nossa explicação mas que lá na frente a gente vai entender perfeitamente e agradecer muito.

Nas vezes que eu tentei fazer vários planos, Deus na sua sabedoria me mostrou que não era exatamente por aquele caminho que eu deveria seguir. E eu sempre me deixei ser flexível para aceitar sua vontade e sem questionar o porquê.

Obrigada pela minha família, amigos, professores, colegas e por todos outros tantos fizeram e fazem parte dessa minha história.

À *Nossa Senhora*, a quem eu recorri em todos os momentos.

Ninguém faz nada sozinho! E nem vive!

Agradecer é admitir que houve um momento em que se precisou de alguém. É reconhecer que ninguém, jamais poderá conseguir para si o dom de ser auto suficiente. Ninguém é nada e cresce sozinho, sempre é preciso um olhar de apoio, uma palavra de incentivo, um gesto de compreensão, uma atitude de amor.

Tudo isso que consegui foi através de muitas pessoas que me ajudaram a ver e ratificar essas palavras. Algumas por seu exemplo de capacidade e correção profissional que foram e estão sendo importantes para minha formação, outras pelo apoio direto na execução de trabalho e tantas outras pelo simples fato de emprestarem seu convívio e amizade incentivando-me cada vez mais a encarar os desafios.

Apesar deste trabalho levar o meu nome, ele só foi concretizado porque pessoas especiais estiveram comigo direta e indiretamente, e esta é minha oportunidade que tenho de agradecer a todos que deixaram sua marca na minha vida. Meus sinceros agradecimentos aos profissionais com os quais tive a honra de trabalhar e conviver:

Agradecimentos Especiais

Ao meu querido orientador Prof. Dr. Marcelo Bönecker.

Dear Boss,

Eis o fruto de longos e prazerosos 5 anos de convivência.

Foi um presente de Deus trabalhar com você, a nossa história não foi por acaso.

Você não apenas me auxiliou na entrada da pós graduação, como resgatou em mim uma força que, em um determinado momento da minha vida, eu pensei ter perdido.

O convívio diário com você só aumentou minha admiração.

Admiro sua capacidade científica e seu incessante busca pelo conhecimento

Aprendi com você a ser prática, pois a vida é complicada demais...e também ser paciente...

Obrigada por transformar cada obstáculo meu em aprendizagem, cada angustia em lição de vida e cada dúvida em oportunidade de amadurecimento. Obrigada pela amizade acima de tudo, pelas conversas, orientação, paciência, viagens, oportunidades e de me ajudar a crescer e na realização desse sonho. E por ter-me

viabilizado escolher os meus próprios caminhos e neles ter trilhado comigo de mãos dadas.

Me sinto honrada e feliz por ser sua orientada.

Toda energia positiva que Universo possa te oferecer, todo meu carinho e minha gratidão eterna por você.

Muito obrigada

Prof. Andrea Mantesso Pobocik

Difícil encontrar palavras para te agradecer.

Você que com muito carinho me acolheu e mesmo sem me conhecer direito, se entregou junto comigo na realização deste trabalho. Isso tudo graças as suas ideias inovadoras, sua criatividade e seu dinamismo.

Todos nós sabemos que eu não teria nada conseguido sem você, sua amizade, atenção, competência, confiança e preocupação.

Foi uma honra e um grande aprendizado ter sua confiança e poder dividir e participar com você na criação do laboratório de células tronco. Todo projeto desde da planta, elaboração, acompanhamento da obra, alegrias nas concessões de verba e inauguração do Labitron.

Agradeço pelo alto nível de exigência, por buscar sempre o meu aperfeiçoamento e orientação firme e incondicional e acima de tudo com atenção e carinho transmitida no desenvolvimento desta pesquisa.

Meu eterno agradecimento.

MEUS QUERIDOS PROFESSORES DA DISCIPLINA DE ODONTOPEDIATRIA

Se é verdade que a gente só recebe o que merece eu agradeço a Deus por merecer o que recebo diariamente.

Durante toda minha pós graduação...e aqui incluo desde a época de estagiária, convivi não apenas uma equipe de trabalho fantástica mas sim conquistei amigos fantásticos. A união e o entusiasmo dessa turma é que transformou essa minha realidade em sonhos.

Eu tenho orgulho de ter conquistado esse amor de vocês..meus amigos..

Prof. Dra. Maria Salete Nahás Pires Côrrea

Querida professora Salete!!!!

Se eu achava que tinha sorte em apenas ter te conhecido, imagina hoje fazer parte da sua equipe...A senhora desde do inicio acreditou em mim, quando eu timidamente cheguei em São Paulo para fazer o seu curso na primeira infância, sempre com tanta doçura, carinho desejando não apenas o meu bem, mas de todos a sua volta. Pensei..pensei..pensei e não consigo escrever tudo o que eu gostaria, poderia e deveria falar o que a senhora representa para mim.

Não teve um momento bom..foram todos bons momentos. Você transforma o dia comum, em um dia especial. O que posso então deixar aqui é primeiro agradecer a Deus por permitir que a senhora esteja fazendo parte da minha vida e da minha história. E tudo meu respeito, profissionalismo, amor à Odontopediatria eu devo à senhora e agradecer é muito pouco por tudo que você tem me proporcionado.

Quero continuar para sempre junta da senhora..seja trabalhando...seja viajando..seja apenas passeando e conversando.

Que Deus continue sempre te guiando e iluminando como ele sempre fez.

Prof. Dr. Fausto Medeiros Mendes (F A R A F A F Á A A).

Pessoa impar e iluminada! Você mudou minha vida e acredito que eu também sua, principalmente as segundas feiras. Como eu ficava feliz quando acordava segunda de manhã e dizia puxa que bom! Mais um dia e corria animada e feliz para USP e você aparecia! Tá certo que as vezes você arregalava os olhos e colocava as mãos nos ouvidos quando me via..mas sei de todo carinho, afeto e bons desejos que você tem por mim...

Mesmo na minha época ausente, você compartilhou comigo seu momento mais feliz que foi a chegada do lindo e fofo filho JP. Sempre atencioso no zapzap, e-mails e telefone.

Você, Maria e JP são pessoas especiais que levarei para sempre no meu coração. A gente se diverte em qualquer lugar, seja na Grécia..seja em Foz de Iguaçu.

Obrigada pelos ensinamentos nos seminários, por me deixar sempre falar a verdade por tentar fazer eu entender as estatísticas. Mas óbvio, obrigada pela terapia que você e a Sassá tem comigo diariamente..seus conselhos (mesmo eu fazendo o contrário), suas ideias ou simplesmente ficar sentada na sua sala (na qual hoje me orgulho de ter minha própria mesa de trabalho ou será um divã???)..

Mais que MB (mente brilhante) você é ser iluminado de espírito nobre.

É uma honra ter conquistado sua amizade ser sua amiga..obrigada..obrigada..obrigada..obrigada..obrigada...obrigada...obrigada

Prof. Dra. Mariana Minatel Braga Fraga

Jolie... você é um ser iluminado e admirado. Eu não tenho palavras para expressar meu agradecimento e admiração por você. Você tem um coração enorme e tem me ensinado a ser uma pessoa melhor. Ser sua amiga foi a melhor coisa que me aconteceu. Agradeço a Deus diariamente por essa oportunidade de te conhecer, de ter você como amiga, professora e sei que qualquer dia, qualquer hora, em qualquer lugar do mundo eu posso contar com você. Você sempre estará comigo, com um sorriso largo, uma palavra de carinho e conforto. Mesmo quando demoro para responder as mensagens no zapzap ou quando não escuto as ligações..

Tudo isso que você tem, tudo isso que você passa para nós é um dom de Deus.

Receba minha amizade para quem sempre soube fazer amizades.

Todo mundo sabe, mas não custa repetir o quanto você é importante para nós. Te adoro e quero você sempre do meu lado, minha amiga e sua fã.

Prof. Dra. Daniela Prócida Raggio

Como te agradecer por todo seu apoio e por contar com você em todos os momentos! Mesmo quando não estava bem, lá tinha um seu zapzap de bom dia! Como você está? Mesmo quando precisei ficar um período afastada, você nunca se afastou ou esqueceu de mim. Tenho orgulho quando me falam que sou sua reencarnação (by Mendes, F.M.)! Você é uma pessoa iluminada, contagiante, uma pessoa do bem por quem eu tenho uma profunda admiração. Dentre suas inúmeras virtudes o seu amor ilumina todo o mundo! Tipo assim, vaga lume mesmo! Meu carinho e amor eterno por você.

Prof. Dra. Ana Lídia Cíamponi

Muitíssimo obrigada por toda atenção, preocupação, carinho, amizade. Aprendi com você enxergar sempre a luz azul e ter a paz em qualquer situação. É uma delícia trabalhar com pessoas iluminadas e do bem. Adoro-te!

Prof. Dra. Márcia Turolla Wanderley

Aprendi que a transparência e seriedade na vida acadêmica é o segredo para o sucesso. Obrigada por se preocupar sempre comigo desde emprestando blusa quando tempo esfriava até momentos descontraídos até quando você deixava o trabalho mais divertindo com pipocas. Meu carinho eterno

Prof. Dr. Jose Carlos Imparato

Estimado Chefe. Você é referência de verdadeiro profissional. Obrigada por abrir o caminho da docência através de convites que tanto enriquece minha vida profissional. Hoje sou muito feliz por fazer parte da sua equipe. Muito obrigada sempre.

Prof. Dra. Ana Estela Haddad

Pela forma carinhosa com que sempre me atendeu e pela alegre convivência que só me enriqueceu. Minha admiração.

Prof. Cláudia Perez Trindade

Jamais esquecerei os bons momentos em que convivi com você na clinica da graduação do noturno. Guardo com carinho seus ensinamentos e bate papos.

Prof. António Carlos Guedes Pinto (in memoriam)

Por me mostrar sua filosofia de trabalho, sua forma de enxergar a Odontopediatria. Meus sinceros agradecimentos.

AOS FUNCIONÁRIOS DA DISCIPLINA DE ODONTOPEDIATRIA

Julio: Juju, obrigada pelo carinho que sempre teve por mim. Receber seu abraço todo dia de manhã bem cedinho, seus conselhos, risadas e sua energia sempre positiva faz toda a diferença. Obrigada por me acolher, chacoalhar nos momentos que precisei. Você é especial para mim!

Maríze: Sem palavras para agradecer todo carinho..Ahhh nossa “mãezona”. Você é muito querida, uma pessoa sensível e doce.

Fátima: Fafá!! Obrigada pela forma atenciosa, conselhos, risadas com que sempre me atendeu.

Anne: Obrigada pela maneira delicadas e carinhosa com que sempre me tratou.

Antonio: Obrigada pela forma que sempre atencioso com que sempre me atendeu e me ajudou sempre prontamente.

AOS MEUS QUERIDOS amigos da turma DA DISCIPLINA DE ODONTOPEDIATRIA

Tati Novaes, Ale Reyes, Camilinha Guglielmi, Dani Bittar, Chaiana Piovesan, Jana Aldrigui, Nadinha Jabbar, Tuquinha Matos, Vanessinha, Tathi Lenzi, Jenny Abanto, Chris Murakami, Cassio Alencar, Babou, Thiago Saads, Paulinha Celiberti, Tamara, Juan, Thaizinha Gimenez, Isa Cadioli.

Como é bom fazer parte da melhor turma da pós graduação!!

É muito bom acordar com a certeza que estaria com vocês, afinal, quando a gente tem certeza que é amado, os milagres acontecem. Eu e vocês temos vividos pequenos milagres todos esses anos. Nós, nos respeitamos e confiamos nos nossos sentimentos. Quero muito agradecer as amizades, companhias, confidências e que nos raros momentos de angústias e sofrimento diluíram-se entre tantas

demonstrações espontâneas de carinho, amor e generosidade. Os muitos momentos de alegrias e realizações ficarão para sempre em minha memória e me lembrarão o quanto sou grata aos que me proporcionaram isso.

Tatí Novaes, me espelho em você. Linda Mãe da linda, educada, fofoíssima Dudinha, pesquisadora, professora. Você tem tanta maturidade, sabedoria, qualidades, sempre com tempinho para me escutar e dar ótimos conselhos. Não tenho palavras para agradecer tamanho carinho, preocupação, zelo por mim. Tenho certeza que nossa amizade nos acompanhará para sempre. Você é dona do melhor abraço do mundo!!! *Ale Reyes*, que sorte tenho! minha amigona, vizinha, terapeuta. Você emana uma luz especial, e torna especial qualquer momento, seja a volta para casa, seja um café, seja estar presente com você. Quero estar sempre com você. *Dani Bittar*, minha vizinha, mãe da linda Isa. Tenho um carinho especial por você. Sua energia, sua alegria, sua amizade. Quero estar mais presente na sua vida. Obrigada por todo carinho e energias positivas quando mais precisei. *Camílinha Gulglíelmi*, vizinha, te admiro por ser essa pessoa linda que você é. Uma doce pesquisadora, professora, dentista mas acima de tudo amiga. Obrigada pela preocupação, visitas, ligações e linda amizade que cultivamos. Hoje uma senhora casada, torço muito pela sua felicidade. Espero que tenhamos mais tempo para almoços ou simplesmente conversar. Te adoro. *Jana* você é muito especial para mim. Mãe de dois filhos mais lindos que já vi, o Lucca e Gi..gostaria de estar mais presente com você, ainda bem que há redes sociais né? Você me traz muita alegria! *Tathí Lenzi*, Descobrimos muitas coisas juntas e compartilhamos momentos de alegria e conquistas. Obrigada pelo carinho, torcida, e pelos momentos que levarei por toda minha vida! *Ana Flávia*, você é uma pessoa excepcional. Além da sua experiência clínica admiro sua calma e capacidade de transmitir o que sabe de forma tão simples. Obrigada por estar sempre presente comigo. *Dani Hesse*, obrigada por toda sua generosidade e cuidado comigo. Amiga para todas as horas, com coração lindo. *Nadínha Salem*, nossa amizade me fez perceber as suas inúmeras virtudes. É muito bom ser amiga de uma pessoa tão divertida e alegre.

Vanessinha sempre querida e preocupada comigo. Admiro sua força, confiança, sinceridade. Ter sua amizade é um presente de Deus. *Levy ahhh Star Davi!* Você é sensacional, amigão mesmo, dono de um bom humor e suas tiradas rápidas. Como a gente se diverte! Você um menino de ouro e não quero perder nem me afastar de você. *Rafael Celestino*, impossível não gostar e nem se divertir com você!! Sua empatia, alegria e amizade com certeza tornaram minha caminhada mais alegre. Que nossa amizade continue assim!

Aos atuais colegas da Pós-Graduação em Odontopediatria Gustavo, Gabriela, Caleb, Ju Mattos, Ju Kimura, Heleninha, Patty, Evelyn, Renatinha, Isa, Camilina, Carol, Edu, Carmela, Laysa, Bel, Muri, Dayse, pela convivência não apenas nas atividades científicas como nos bons momentos sociais. Cada um com potencial e luz, tenho certeza que a vida dará para vocês sucessos e surpresas boas.

Meu carinho especial à *Lucila, Dri Ortega, Fernanda Nahás* pela preocupação, carinho, amor e torcida e amizade. Gostaria de conviver mais com vocês!

AOS QUERIDOS PROFESSORES DA DISCIPLINA DE PATOLOGIA BUCAL

Aquelas pessoas que quando deveriam ser simplesmente professores, foram mestre. Que quando deveriam ser mestres, foram amigos e em sua amizade pude compreender e me incentivar a seguir esse caminho.

Luciana Côrrea

Você me acolheu quando eu mais precisava. Me ajudou de tal forma que mais uma vez pude acreditar que Deus só coloca boas pessoas na minha vida. Te agradeço não apenas pela valiosa contribuição na minha formação, mas pela oportunidade de poder desfrutar de seus conhecimentos, experiências e grande amizade. Ainda preciso aprender muito com você. Você é um exemplo de mãe, profissional e linda. Obrigada!

Décio Pinto dos Santos

Pelo convívio tão essencial e enriquecedor. Obrigada por sempre estar na minha torcida, pelas conversas no corredor e por ensinar a ver as auras das pessoas. Minha admiração. *Fabíio Daumas Nunes* Por toda sua gentileza, amizade e confiança. Sem questionar sempre deixou meu livre acesso no laboratório. Aprendi muito com nossas conversas. Meu muito obrigada. *Suzana Cantanhede Orsini Machado de Sousa*, pela doçura com qual sempre me tratou e me ensinava. *Marina Helena Cury Gallottini* por sempre está disposta quando precisava, sempre me tratando com carinho e sorriso. *Marília Trierveiler Martins* pela amizade, conversas e torcida por mim e *Karem Lopes Ortega* pela qual tenho enorme carinho.

À todos que me proporcionaram um convívio tão essencial e enriquecedor mesmo sendo de outro programa. Obrigada pelo livre acesso em todas as dependências do departamento e por todo carinho que me acolheram. Vocês me fizeram sentir que também sou um pouco patologista.

Elisa dos Santos

Quem diria que esse dia ia chegar né? Você me acompanha desde da minha época de estagiária..você é uma mulher de fibra, uma guerreira, mesmo com mundo caindo, você estava lá firme. Obrigada pelo carinho, por toda ajuda, por rezar e torcer por mim, sempre.

Adriana, Juvaní, Bía, Nas tantas vezes que precisei vocês me ajudaram com maior boa vontade e dedicação.

Meus amigos da bancada laboratorial

Fernanda Yamamoto (Fefe), Brunno Silva, Lourdes, Flávia (Flavitcha), Cibeli, Marina, Lucyene, Felipe (fefe), Lília, Gabizinha.

Obrigada por me fazerem tão feliz quando estou com vocês! É muito bom trabalhar com vocês, nas alegrias, discussões de pesquisas, nos desesperos. Com certeza o trabalho no laboratório se tornou mais especial.

Funcionárias, *Zilda, Néia, Nair* por sempre me tratarem com carinho e confiança me ajudando e rezando sempre por mim.

Prof. Dr. Miguel Angel Castillo Salgado

Por me orientar desde a época da monitoria em Histologia e Embriologia durante toda minha graduação e continuando na pós graduação, me mostrando de forma correta, meticulosa e disciplinada de conduzir os trabalhos, sendo um grande incentivador a que eu seguisse a carreira acadêmica.

Com você aprendi mais que conhecimentos técnicos e científicos, você me ensinou sobre a vida.

Com sua extrema sensibilidade foi capaz de perceber meus momentos de dificuldades e seus conselhos foram fundamentais para mim. Simon Bolívar já dizia que “o grande educador deve ser não um sábio, mas sim um homem diferenciado por sua educação, pela força de seus costumes, pela naturalidade de seus modos, jovial, dócil, acessível e franco, enfim, em quem se encontre muito que imitar e pouco que corrigir”.

Muito obrigada não só por ser meu tutor, mas por ser meu grande amigo.

Prof. Dr. Jarbas Arruda Bauer

Meu padrinho!! Tio Bauer!!

Esse é um caso à parte..

Sem palavras para agradecer todo!

Você é imprescindível na minha vida, mais que isso, você é muito importante para mim.

Incrível como temos sintonias é um pensar para outro ligar, mandar email, zapzap ou simplesmente aparecer para um café.

Agradeço pelo conhecimento que me transmite e por ter me estimulado em todos os meus projetos. Aprendo sempre muito com você.

Os seus valiosos ensinamentos serão lembrados e repassados durante toda a minha carreira. A verdadeira ciência perdura pelo exemplo de pessoas como você.

Pela solidariedades nas horas difíceis, por ser sempre prestativo, com amizade, respeito e admiração, agradeço-lhe.

Prof. Dr. Víctor Elías Arana-Chavez

Obrigada por me aceitar e me possibilitar a estagiar no seu prestigiado Laboratório de Biologia de Tecidos Mineralizados (L.B.T.M). Foram 4 anos que marcaram uma etapa muito importante na minha vida e a quem associo tempos inesquecíveis de aprendizagem e no qual fui muito feliz. Muito obrigada.

Prof. Giancarlo Britto (I.F) por acreditar, apoiar e ajudar nas minhas idéias.

Obrigada pela parceria, sua dedicação e preocupação de sempre.

Carlos Alberto Perez (LNLS), Por crer nessa pesquisa, por se preocupar, se interessar e assim estudar junto comigo. Além da confiança em me deixar sozinha nos microscópios, pela amizade e por me chacoalhar quando eu tinha algum “tilt”.

Prof. Dra Marínlce Fagundé Santos, por ser uma pessoa generosa e sempre disposta a ajudar. Meu carinho e meu muito obrigada.

Técnico Sr. *Gaspar Ferreira de Lima e Fernanda Ângela Correia Barrence* do I.C.B da USP por estarem sempre presentes. Sempre cuidadosos comigo. Obrigada por oferecerem ajuda e apoio, atenção ou simplesmente uma conversa.

À querida *Soninha Alves*, do Departamento de Dentística por disponibilizar seu tempo me ajudando em várias etapas não só da tese sempre com muita alegria e disposição.

As secretarias do departamento de Biologia Oral *Elídamar Guimarães (Ely)* e *Rosa Cristina Nogueira (Rosinha)* bem como *Prof. Dr. Fernando Nogueira (fefe)* pela amizade, carinho e preocupação.

À todos os funcionários do SDO pela estruturação, formatação, correção das referências e pela elaboração da Ficha Catalográfica. Em especial a querida *Vanía, Claudía e Suelly* que sempre me trataram com carinho e me socorreram nesta tese.

A querida professora *Marilda* pela revisão do texto.

A todos os funcionários da Pós-Graduação com especial atenção à *Cátia* e

Alessandra por todos os momentos meio desesperadores nos quais foram resolvidos com calma, atenção e acima de tudo com carinho

A querida *Juliana Pereira Zuim*, a melhor aluna de iC. Ju, você além de querida, é talentosa, estudiosa e pró-ativa. Tenho certeza que você será uma profissional de grande sucesso. Obrigada por confiar em mim e na minha orientação.

As lindas *Eva* e *Ken*, funcionárias do departamento que sempre me trataram com carinho, preocupação. Vocês são sensacionais!!

A *Nalvinha*, *Edina* e *Vivi*, funcionárias do Departamento de Ortodontia, por todo carinho, alegria, ajuda e torcida. Vocês são demais!

À equipe de segurança da FOU SP que guardaram e protegeram as minhas entradas e saída nas faculdades. Com especial atenção ao *Seu Luiz*, *Seu Zilson* e *Seu Alfredo* por me escoltarem sempre que eu saia depois das 3 da manhã do laboratório e por me aguentarem nos finais de semana até tarde.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, representado pelo Diretor Prof. Waldyr Jorge, minha segunda casa por me acolher e me inspirar diariamente.

A Instituição de fomento Capes, pela concessão da bolsa nesses anos que estive matriculada no curso de Pós-Graduação.

Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron pela disponibilidade do uso dos equipamentos, laboratórios e microscópios.

*Senhor, eu sei que me conheces e sabes dos meus problemas
Eu sei que me acompanhas mesmo quando eu me perco
Eu sei que quando tudo me falta, o Senhor está comigo
Eu sei que Tu me destes uma mãe Maria
A Tua mãe é a minha mãe*

*Maria na simplicidade de sua presença nunca esteve ausente
Nos momentos em que a angústia atormentava as celebrações da vida
ela soube reconhecer e interceder*

Por isso eu peço a mãe:

Intercede por mim

Quando o vinho acabar, intercede por mim

Quando alguma coisa faltar, intercede por mim

Quando eu me perder, intercede por mim

Quando eu pecar, intercede por mim

Quando eu deixar de amar, intercede por mim

Senhor amado,

obrigado pela mãe que nos destes

É mais uma prova de Teu imenso amor, Ágape

Cuida de nós,

Amém.

*Não poderia deixar de expressar os meus profundos e mais sinceros
agradecimentos, amor e gratidão para as “Marías da minha vida”. Apenas
uma singela recordação, afinal não cabe tudo em um papel porque é grande
demais, o amor que sinto por vocês “Marías”.*

Mamãe **M**aria Helena,

Mãe obrigada por existir e ter me dado a oportunidade de ser sua filha!

A senhora é sinônimo de mulher forte, batalhadora, como se não bastasse fazer meus irmãos e eu felizes, ainda é maravilhosa e exemplo de dedicação e respeito à família.

Minha rainha, minha estrela encantada, minha fada mãe, a senhora é iluminada pelos raios da paixão, nos teus olhos se adivinha o que diz teu coração

Você é meu tudo e te amo infinitamente!!

Maria Célia (Yayá)

Exemplo de trabalho e dedicação à família, guerreira, incansável e íntegra, que sempre me incentivou a lutar pelos meus sonhos, apoiar minhas escolhas e dar força para enfrentar os desafios. Escrevi seu nome num papel junto com meu para mostrar que você nunca estará sozinha.

Yayá sem você eu nada seria...

Maria Aparecida (titia)

Sinônimo de mulher forte e batalhadora.

Você se foi antes mesmo deste dia chegar....mesmo com as peças da vida, você sempre estava lá comigo passando por tudo.

Nossa família teve a sorte de conviver com uma Santa, pois não tem outra explicação! E você sempre com rosto escondido, vejo a firmeza no lugar da dor.

Hoje eu sei que posso voar, mais alto que uma águia, porque tenho certeza que você é o vento sobre as minhas asas.

Agradeço a Deus, por você existir na minha vida!

María Salete Nahás Pires Córrea

A Sassá é demais..Por mim ficarias horas escutando sua história, suas lições, seus conselhos. Cada dia mais amada, tenho certeza que Deus a selou e separou você como ser especial. Foi com a senhora que aprendi que tudo o que eu sonhar, o meu sonho mais feliz, qualquer dia vai virar realidade e quando eu precisar nos momentos mais difíceis de enfrentar terei sempre seu ombro amigo para eu me aconchegar.

*É uma honra, um orgulho ter conquistado seu amor..sou sua fã!
Uma chuva de bença e prosperidade e que Deus continue sempre abençoando sua vida, minha
amiga.*

María Stella Amorim da Costa Zöllner

Minha mammy científica! Me acompanha desde a graduação e sempre acreditou no meu potencial. quando uma tímida aluna do segundo ano de Odontologia queria fazer algum trabalho. Seu apoio, amizade e orientação sempre constantes desde início.

Você foi minha primeira orientadora e hoje o que eu sei, foi a semente que você plantou em mim..Agradeço todas as palavras de encorajamento sempre carregadas de otimismo.

Obrigada pelo carinho, amizade e confiança, e por todas as oportunidades que me foram concedidas. Meu eterno carinho e gratidão.

“Aqui, no entanto, nós não olhamos para trás por muito tempo. Nós continuamos seguindo em frente, abrindo novas portas e fazendo coisas novas. Porque somos curiosos... e a curiosidade continua nos conduzindo por novos caminhos”

Walt Disney

“Tenham coragem.
Não tenham medo de sonhar coisas
grandes!”

Papa Francisco.

RESUMO

Células-tronco da polpa e papila apical dental humanas Análise morfológica, funcional e por microfluorescência de raios x [Tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2014. Versão Original.

A proposta desse projeto de pesquisa foi analisar e caracterizar células-tronco encontradas na polpa dentária e papila apical de um mesmo doador tratadas sob as mesmas condições de cultivo utilizando abordagens que permitem análises de componentes intracelulares que nunca antes haviam sido analisados nessas células. Para tanto, populações enriquecidas pela expressão CD146, STRO-1 e CD90 foram isoladas de terceiros molares inclusos indicados para exodontia, totalizando 16 pacientes e 16 dentes. Como controles negativos, foram utilizadas as células negativas para esses marcadores. Células positivas e negativas para cada marcador foram comparadas entre si e com os resultados dos outros marcadores. Para cada um dos marcadores e respectivos controles foram realizadas análises de cinética celular, ensaios morfológicos e ensaios subcelulares utilizando microscopia de luz síncrotron. Os dados obtidos foram submetidos à teste ANOVA e teste de Tukey ($\alpha=0,05$) quando pertinente e/ou a análises descritivas. As células isoladas da polpa dentária e papila apical se comportaram diferentemente uma das outras. Nos ensaios de cinética celular, as células enriquecidas (positivas) apresentaram crescimento mais lento quanto comparados com as células não enriquecidas (negativas), independente do marcador em questão. Nos ensaios morfológicos, células CD 90+ da polpa dentária exibiram a menor área e menor perímetro quando comparadas com as CD 146+ e STRO-1+. A presença de compostos iônicos vistos por luz síncrotron mostraram maior fração de massa nas células positivas da polpa dentária. Dentre os elementos traços estatisticamente mais prevalentes foram o fósforo, cobre, zinco, potássio, estrôncio, cálcio e cloro, sendo este último presente na polpa e papila nos 3 marcadores estudados. Concluímos que tanto da polpa dentária quanto na papila apical de dentes humanos, há presença de células tronco multipotentes expressados pelos três marcadores e que apesar de serem obtidos do mesmo dente e doador e cultivados de forma iguais ela tem comportamentos diferentes. As alterações bioquímicas celulares estudadas pelos elementos traços em células separadas por diferentes marcadores foi o primeiro passo para

possibilitar os conhecimentos mecanicistas vitais celulares que não são observadas em microscopia padrão. Porém, novos estudos como permitir a visualização da localização espacial de biomarcadores espectrais caracterizados, pode ajudar a consolidar os resultados aqui encontrados. Assim, a análise e classificação desse método de estudo pode ser refinado em pesquisas futuras, incluindo no uso de outros tipos de tecidos dentais para caracterizar as células tronco dentais.

Palavras-chave: Células-tronco. Microfluorêscencia de raio x. Morfologia celular. Marcadores.

ABSTRACT

Rezende KMPC. Stem cells from human dental pulp and apical papilla: morphological, functional and x-ray microfluorescence analysis [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2014. Versão Original.

The purpose of this research project was to analyze and characterize stem cells found in dental pulp and apical papilla from the same donor treated under the same culture conditions using approaches that allow analysis of intracellular components that had never before been analyzed in these cells. Therefore, populations enriched for CD146 expression, STRO-1 and CD90 were isolated from third molars indicated for extraction, totaling 16 patients and 16 teeth. As negative controls, cells negative for these markers were used. Positive and negative cells for each marker were compared and the results of other markers. For each of the markers and their controls were carried out analysis of cell kinetics, morphological tests and subcellular assays using synchrotron light microscopy. The data were submitted to ANOVA and Tukey's test ($\alpha = 0.05$) where relevant and / or descriptive analyzes. Cells isolated from the apical papilla and dental pulp behaved differently from each other. In cell kinetics assays, enriched cells (positive) showed slower growth as compared with non-enriched cells (negative), regardless of the marker in question. In morphological studies, CD 90+ cells in the dental pulp exhibited a smaller area and lower perimeter compared to CD 146+ and STRO-1 +. The presence of ionic compounds seen by synchrotron light showed higher mass fraction of positive cells in the dental pulp. Among the most prevalent statistical trace elements are phosphorous, copper, zinc, potassium, strontium, calcium and chlorine, the latter being present in the pulp, and the papilla 3 markers studied. We conclude that both the dental pulp as the apical papilla of human teeth, there is presence of multipotent stem cells expressed the three markers and that although they are obtained from the same tooth and donor and grown in the same way it has different behaviors. The biochemical cellular changes studied by trace elements in separate cells with different markers was the first step to allow mechanistic cellular vital knowledge that is not observed in standard microscopy. However, new studies as to visualize the spatial location characterized spectral biomarkers can help consolidate the present results. Thus, the

analysis and classification of the study method can be refined in future research including the use of other types of dental tissues to characterize the dental stem cell.

Keywords: Stem cells. x-ray microfluorescence. Cell morphology. Markers.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1 - Desenho representativa com os 10 estágios de mineralização dentária humana descrita por Nolla. 1. presença de cripta; 2. calcificação inicial; 3. um terço de coroa completo; 4. dois terços de coroa completos; 5. coroa quase completa; 6. coroa completa; 7. um terço de raiz completo; 8. dois terços de raiz completos; 9. raiz quase completa e ápice aberto; 10. ápice radicular completo (Nolla 1960). 47
- Figura 4.1 - Ilustração da técnica de obtenção dos tecidos dentais. Painel A - Separação da polpa dental e Painel B - Separação da papila dentária.....64
- Figura 4.2 - Obtenção dos tecidos dentais (papila apical e polpa). Em seguida, foi realizada a técnica de explante para o início da cultura celular.....64
- Figura 4.3 - Após a confluência, as células foram separadas por magnetos usando 3 marcadores: STRO-1; CD 90 e CD 146 e plaqueadas para os estudos posteriores.....66
- Figura 4.4 – Fotografia da placa Nunc utilizada nos ensaios do estudo morfológico. As áreas marcadas (1,2,3 e 4) fora utilizadas para as análises.....68
- Figura 4.5 - Preparação das amostras para análise de microfluorescência. Em A temos os materiais necessários para preparar as amostras. Em B o aspecto final do filme ultralene arrumados no porta amostra. Em C colocação das células no ultralene (c). Aspecto final para medição das amostras (d).....69
- Figura 5.1- Início da saída das células dos tecidos *in vitro*. Em A, células da polpa dentária e em B células da papila apical..... 71
- Figura 5.2 - Média do número de células da polpa, positivas e negativas, para os marcadores analisados 72
- Figura 5.3 – Média do número de células da papila apical, positivas e negativas, para os marcadores analisados 73
- Figura 5.4 – Média do número de células enriquecidas dos marcadores analisados, comparando-se o crescimento na polpa e na papila apical.....74
- Figura 5.5 – Número de unidades formadoras de colônias a partir dos tecidos isolados com os diferentes marcadores utilizados.....75

Figura 5.6 - Ilustração da habilidade de formação de colônias da papila apical de acordo com cada marcador.....	77
Figura 5.7 - Ilustração da habilidade de formação de colônias da polpa dentária de acordo com cada marcador.....	78
Figura 5.8 - Média da área (μm^2) das células da polpa.....	79
Figura 5.9 - Média do perímetro (μm) das células da polpa.....	80
Figura 5.10 - Média do fator de forma para as células da polpa.....	81
Figura 5.11 - Média da área (μm^2) das células da papila apical.....	81
Figura 5.12 - Média do perímetro (mm) das células da papila apical.....	82
Figura 5.13 - Média do fator de forma para as células da papila apical.....	83
Figura 5.14 - Média da área (μm^2) das células da polpa e da papila dentária.....	83
Figura 5.15 - Média do perímetro (μm) das células da polpa e da papila dentária....	84
Figura 5.16 - Média do fator de forma para as células da polpa e da papila dentária.....	85
Figura 5.17 - Imagens ilustrativas das morfologias encontradas na polpa dentária. Em A e B - marcador CD 90 sendo A positivo e B negativo; C e D marcador CD 146 sendo C positivo e D negativo; E e F marcador STRO-1 sendo E positivo e F negativo.....	86
Figura 5.18 - Imagens ilustrativas das morfologias encontradas na papila dentária. Em A e B - marcador CD 90 sendo A positivo e B negativo; C e D marcador CD 146 sendo C positivo e D negativo; E e F marcador STRO-1 sendo E positivo e F negativo.....	87
Figura 5.19 - Amostras no microscópio (a;b). Visualização da região (c). Local onde foi injetada a radiação (d).....	88
Figura 5.20 – Fração de massa média dos elementos mais abundantes e menos abundantes presentes nas células da polpa quando analisado o marcador CD90.....	89
Figura 5.21 – Fração de massa média dos elementos mais abundantes e menos abundantes presentes nas células da papila dentária quando analisado o marcador CD90.....	90
Figura 5.22 – Fração de massa média dos elementos mais abundantes e menos abundantes presentes nas células da polpa dentária quando analisado o marcador CD146.....	90

- Figura 5.23 - Fração de massa média dos elementos mais abundantes e menos abundantes presentes nas células da papila dentária quando analisado o marcador CD146.....91
- Figura 5.24 - Fração de massa média dos elementos mais abundantes e menos abundantes presentes nas células da polpa dentária quando analisado o marcador STRO1.....92
- Figura 5.25 - Fração de massa média dos elementos mais abundantes e menos abundantes presentes nas células da papila dentária quando analisado o marcador STRO1.....93
- Figura 5.26 – Fração de massa média dos elementos químicos mais abundantes presentes significativamente nas células positivas para os diferentes marcadores, oriundas tanto da polpa e quanto da papila.....94
- Figura 5.27 – Fração de massa média dos elementos químicos menos abundantes presentes significativamente nas células positivas para os diferentes marcadores, oriundas tanto da polpa quanto da papila.....96

LISTA DE QUADROS

Quadro 5.3 – Resumo dos principais achados para a polpa dentária, a papila apical e a comparação entre esses dois tecidos, considerando as variáveis “crescimento celular”, “morfologia celular” e “fração de massa dos elementos químicos.....	97
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CFU	Colony-forming unit
CT	Célula-tronco
CTM	Célula-tronco mesenquimal
DPSC	Dental pulp stem cell
min	Minutos
h	Horas
PBS	Do inglês <i>Phosphate Buffered Saline</i> , traduzido como Tampão Fosfato Salino
pH	Potencial Hidrogeniônico
SHED	Stem cells from human exfoliated deciduous teeth
UI	Unidades internacionais de medida
U	Unidades
mg	Miligramas
µg	Microgramas
ng	Nanogramas
µm	Micrômetros
µFRX	Microfluorescência de raios x
ml	Mililitros
MSC	Mesenchymal stem cells
cm²	Centímetros quadrados

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
$^{\circ}\text{C}$	Graus centígrados
®	Registro de marca
μ	Micrômetro
#	Número de catálogo
%	Porcentagem
CO_2	Dióxido de carbônico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	37
2 REVISÃO DE LITERATURA	39
2.1 CÉLULAS-TRONCO.....	39
2.1.1 Definições e Propriedades	39
2.1.2 Características e fontes celulares.....	40
2.1.3 Populações Dentais	42
2.1.4 Células-Tronco da Polpa Dentária	43
2.1.5 Células-tronco da Papila Apical	45
2.2 MARCADORES MOLECULARES.....	47
2.2.1 STRO-1	48
2.2.2 CD146	49
2.2.3 CD 90	49
2.3.1 Isolamento de Populações Enriquecidas em Células-tronco	50
2.4 RADIAÇÃO SÍNCOTRON-microfluorescência de raios x e células tronco	51
2.5 NOÇÕES BÁSICAS DA ESTRUTURA CELULAR.....	54
2.5.1 Forma e Tamanho Celulares.....	54
2.5.2 Papel dos Íons nas Funções Biológicas	55

3 PROPOSIÇÃO	62
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	62
4 MATERIAL E MÉTODOS	63
4.1 OBTENÇÃO DAS LINHAGENS CELULARES	63
4.2 ISOLAMENTO DE POPULAÇÕES ENRIQUECIDAS EM CÉLULAS TRONCO PELA TÉCNICA DE MACS (MAGNETIC-ACTIVATED CELL SORTING)	65
4.3 TESTE DE CRESCIMENTO CELULAR.....	66
4.4 ENSAIO DE EFICIÊNCIA DE FORMAÇÃO DE COLÔNIAS (COLONY FORMING UNITS).....	67
4.5 ESTUDO DAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS	67
4.6 ANÁLISE POR RADIAÇÃO SÍNCROTRON.....	68
5 RESULTADOS	71
5.1 ENSAIOS FUNCIONAIS.....	71
5.2 CRESCIMENTO CELULAR.....	72
5.2.1 Polpa	72
5.2.2 Papila Apical	73
5.2.3 Polpa versus Papila Apical	74
5.2.4 Ensaio de CFU (Colony Forming Units)	75
5.3 ANÁLISE MORFOMÉTRICA CELULAR	79
5.3.1 Polpa	79
5.3.2 Papila Apical	81
5.4 POLPA VERSUS PAPILA	83
5.5 ANÁLISE POR MICROFLUORESCÊNCIA DE RAIOS-X	88
5.6 QUANTIFICAÇÃO DOS ELEMENTOS QUÍMICOS PREDOMINANTES NAS DIFERENTES POPULAÇÕES CELULARES.....	88
5.6.1 CD90	89

5.6.2 CD146	90
5.6.3 STRO 1	92
5.6.4 Comparação entre os Marcadores em Relação a Alguns Elementos Químicos	93
5.7 Resumo dos resultados mais relevantes	97
6 DISCUSSÃO	100
7 CONCLUSÕES	107
REFERÊNCIAS	108
ANEXO	118

1 INTRODUÇÃO

As células presentes nos tecidos do seres humanos apresentam heterogeneidade morfológica e possuem meia vida curta sendo incapazes de se auto renovarem. Assim, a manutenção e a reparação tecidual são realizadas por células tronco capazes de se auto renovar e de gerar células filhas com potencial de multidiferenciação (Kawashima 2012).

Nos últimos 10 anos, as células tronco pós natais (ou adultas) têm sido isoladas de vários tecidos principalmente na medula óssea e cordão umbilical. Essas células também têm sido estudadas extensivamente como uma fonte para o desenvolvimento da engenharia tecidual com aplicabilidade clínica futura (Fuchs and Segre 2000; Lin, et al. 2008).

No ano de 2000 a equipe de Gronthos foram os precursores nas pesquisas de células-tronco na área de Odontologia. Eles encontraram uma população de células indiferenciadas na polpa dental humana (DPSCs) e observaram que essas células tinham capacidade de regenerar o complexo dentino pulpar injuriado in vivo dando origem a um tipo de matriz mineralizada com túbulos, odontoblastos e o tecido conjuntivo contendo vasos sanguíneos similar ao encontrado no dente humano (Gronthos, et al. 2000) .

Atualmente, a literatura relata que não só as células da polpa dentária de dentes permanentes e decíduos possuem capacidade de auto-renovação e de diferenciação em linhagens variadas, mas também, células derivadas da papila apical, ligamento periodontal e folículo dentário apresentam as mesmas propriedades (Gronthos, et al. 2002; Gronthos, et al. 2000; Miura, et al. 2003; Sonoyama, et al. 2006; Yao, et al. 2008).

Mesmo sabendo que todas as células do organismo apresentam um conjunto de marcadores que caracterizam sua singularidade biológica, pouco se sabe sobre as características subcelulares das células que expressam esses marcadores e adicionalmente, sabe-se que esses marcadores não são específicos para uma única sub população e podem ser expressos em diferentes subtipos celulares (Alhadlaq and Mao 2004; da Silva Meirelles, et al. 2006).

Portanto, para isolar e caracterizar células tronco foi estabelecido a identificação de um perfil contendo uma combinação de marcadores celulares. No entanto, não existe um consenso na literatura pertinente a respeito da “assinatura”

molecular das populações de células tronco e grupos distintos de investigadores usam diferentes combinações de marcadores, nenhum deles específico ou exclusivo (da Silva Meirelles, et al. 2006).

Além das análises fenotípicas, ensaios de cinética e de capacidade de diferenciação variam de acordo com método de isolamento/expansão empregado no cultivo das células o que torna a comparação de resultados de diversos grupos de pesquisa imprecisa ou até mesmo impossível. Ademais, discrepâncias entre os níveis de detecção dos diferentes marcadores de células-tronco também têm sido observados na literatura (Keefer, et al. 2007).

Essa complexidade e falta de previsibilidade no isolamento e caracterização das células tronco trás implicações clínicas e terapêuticas de suma importância. Sem uma forma segura para isolar e controlar as populações desejadas, os tratamentos serão imprevisíveis variando de paciente para paciente, funcionando em alguns casos e falhando em outros e podendo ainda causar danos ou fugir do controle em alguns casos.

Em resumo, existe a necessidade de melhor compreensão da biologia da célula tronco e também da homogeneização das condições de pesquisa para garantir a correta comparação dos resultados.

Nesse sentido, esse projeto de pesquisa visou analisar as células tronco utilizando metodologias ou pouco exploradas ou ainda inéditas em pesquisa nessa área. Para garantir melhores condições de comparação, células de um mesmo doador foram mantidas nas mesmas condições de cultivo. Essas populações celulares foram submetidas a análises de cinética celular comumente utilizadas e também a análises inéditas de parâmetros morfológicos estabelecidos pelo nosso grupo de pesquisa, além de análises de microscopia de RX por luz síncrotron. Dentre as variáveis técnicas de microscopias eletrônicas, a microfluorescência de raios x pela luz síncrotron é uma ferramenta moderna para estudos de composição de elementos traços de vários tipos de amostras, dentre elas na célula. Uma vantagem importante dessa técnica é que o feixe primário pode ser focalizado até um tamanho muito pequeno, e assim permitir analisar estruturas de ordem de 10^{-6} m (Cardoso, et al. 2011). O uso dessa técnica nos permitiu analisar as características iônicas das nossas células. Esse tipo de análise até o momento é inédito na área de células tronco de origem dental, permitindo assim, aumento do conhecimento nessa área.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CÉLULAS TRONCO

2.2.1 DEFINIÇÕES E PROPRIEDADES

É indiscutível que a Odontologia vêm passando por um momento único, onde busca-se mais do que materiais restauradores. Com advento da filosofia minimamente invasiva, almeja-se eventualmente o uso de células adequadas para regenerar o tecido danificado ao invés de preenche-lo com um material artificial. A revascularização da polpa dentaria, a formação de uma nova dentina, reconstruções ósseas de áreas extensas e regeneração do periodonto de proteção e sustentação são os exemplos mais notórios de como as células tronco podem ser utilizadas para esse fim (Gronthos, et al. 2002; Miura, et al. 2003).

Todos os tecidos do corpo humano são originários de uma pequena população de células tronco que desempenham um papel vital tanto no desenvolvimento embrionário, como na regeneração tecidual (Winkler, et al. 2005). Essas células consideradas imaturas são capazes de auto-renovação, ou seja, tem a capacidade de passar por vários ciclos de divisão celular sem sofrer diferenciação e também são capazes de gerar células progenitoras que podem se diferenciar nas mais diferentes linhagens celulares o que as definem como multipotentes (Friedlander, et al. 2009; Gronthos, et al. 2002)

As células tronco são encarregadas de manter a estrutura e função dos tecidos do corpo humano através da substituição de células defeituosas. Células tronco adulta multipotentes, como as mesenquimais, estão presentes na maioria dos tecidos do corpo humano e residem em áreas específicas mantendo seu estado quiescentes até serem ativadas por alguma lesão ou doença (Tirino, et al. 2011)

Existem inúmeras classificações para as CT. Entretanto, uma das mais utilizadas baseia-se na capacidade de diferenciação. Essa habilidade também é conhecida como plasticidade, sendo essa, a principal diferença entre células tronco embrionárias e adultas (Martin-Rendon and Watt 2003; Smith 2001) De acordo com a plasticidade as células-tronco podem ser classificadas em totipotentes, pluripotentes e multipotentes.

As células tronco totipotentes são derivadas de células germinativas e são capazes de se diferenciar em qualquer uma das três camadas embrionárias e formar todos os tecidos humanos incluindo a placenta. Ou seja, trata-se de uma célula

indiferenciada com capacidade ilimitada e com grande poder de multiplicação e especialização *in vitro* (Thomson, et al. 1998; Yao, et al. 2008)

As células tronco pluripotentes são derivadas da camada interna do blastocisto entre o quarto e quinto dia pós fertilização, são denominadas de células-tronco embrionárias e podem se diferenciar em todos os tipos de células que estão presentes no ser humano adulto exceto em células que foram os tecidos extraembrionários como a placenta. Portanto, elas têm enorme poder de diferenciação (Czyz, et al. 2003)

As células tronco multipotentes têm a aptidão de gerar um número limitado de células especializadas. Este tipo de células, são encontradas virtualmente em todos os órgãos porque são responsáveis pela manutenção da homeostase e pela reparação após o dano tecidual (Martin-Rendon and Watt 2003; Prella, et al. 2002; Thomson, et al. 1998). Elas são raras e dispersas nos vários tecidos e geralmente, já expressam genes que determinam seus destinos (genes marcadores) conforme os tecidos em que estão localizadas. Por esse conceito, as células multipotentes também são conceituadas como células tronco adultas ou pós natal (Anderson, et al. 2001) Assim, essas células apresentam um potencial de diferenciação bem mais reduzido quando comparado ao das células tronco pluripotentes. A diferenciação das células tronco recapitula em menor escala, nos tecidos de um organismo adulto, a restrição de diferenciação que ocorre na embriogênese dele.

2.2.2 CARACTERÍSTICAS E FONTES CELULARES

Dentre as células tronco adultas multipotentes, podemos encontrar as células-tronco de origem epitelial, que revestem a pele, mucosas e o tubo digestivo; as de origem hematopoiética, amplamente estudadas na medula óssea; e as de origem mesenquimal que também podem ser derivadas da medula óssea ou encontradas em lugares específicos (nichos) (Luo, et al. 2010; Mao, et al. 2006) onde permanecem quiescentes por muitos anos até serem ativadas (Tirino, et al. 2011).

As células tronco mesenquimais (CTM), que são objeto desse estudo, apresentam características, que as diferem de outras células do organismo, a saber: facilidade de crescimento em monocamadas, secreção de matriz extracelular que permite sua adesão à superfície de crescimento e a capacidade de

multidiferenciação por várias passagens. Após um período inicial, as células tronco mesenquimais se dividem rapidamente e se plaqueadas em baixa densidade, formam colônias (sendo portanto unidades formadoras de colônias ou CFU).

Estas células apresentam inibição de crescimento ao atingir confluência, e a necessidade de várias passagens sucessivas para se obter grandes quantidades de células pode alterar a qualidade das CTM (Blau, et al. 2001; Fodor 2003).

É bem estabelecido que os tecidos do corpo humano são compostos por variados tipos de células organizadas numa rede precisa e funcional junto aos componentes de matriz extra celular (Rosso, et al. 2004). A interação coordenada entre células, ciclos de proliferação celular e apoptose, síntese e secreção de matriz extracelular, sinalização das moléculas intra e extra celulares e diferenciação, ocorre em um ambiente de constante dinamismo (Kirouac, et al. 2009).

Tradicionalmente, a medula óssea é a fonte mais estudada de células tronco, tanto para as populações hematopoiéticas (responsáveis pela renovação dos elementos sanguíneos circulantes) quanto para as populações células mesenquimais (Panepucci, et al. 2004). As células presentes neste local, são facilmente isoladas de aspirados obtidos da crista íliaca superior, da tíbia, do fêmur e da coluna vertebral lombar e torácica de humanos e de grades mamíferos (D'Ippolito, et al. 1999; Digirolamo, et al. 1999) e expressam por vezes marcadores de pluripotencia como Nanog, fosfatase alcalina e SSEA-4 (Riekstina, et al. 2009). Apesar de ter resultados bastante satisfatórios na pesquisa com células tronco de medula óssea, para sua obtenção é necessário ambiente hospitalar com uso de anestesia geral. Isso normalmente acarreta custo adicional e grande desconforto como dor e cicatrização no pós operatório (Neo, et al. 2000).

Outras fontes bastante exploradas para obtenção de células tronco incluem o sangue do cordão umbilical, placenta e fluido amniótico. Essas células expressam por vezes além das proteínas descritas acima, a proteína Oct-4, fator de transcrição expresso em células tronco embrionárias e células germinativas, o que implica um alto potencial de proliferação e de diferenciação (Mareschi, et al. 2009). Atualmente, outros tecidos adultos como tecido adiposo, tecido muscular e derme também tem demonstrado a presença de células tronco (Fuchs and Segre 2000; Lin, et al. 2008).

A partir desse conhecimento, muitas pesquisas com células-tronco adultas mesenquimais têm sido feitas com objetivo de testar sua efetividade em recuperar

tecidos danificados por doenças e trauma (Gronthos, et al. 2000; Lin, et al. 2008; Mao, et al. 2006; Miura, et al. 2003).

2.1.3 POPULAÇÕES DENTAIS

Com exceção dos ameloblastos, todas as células tronco envolvidas na odontogênese são originadas do mesenquima. Até a terceira semana de desenvolvimento, o mesenquima da região da boca e da face são originados quase que exclusivamente do tecido mesodermico. Na quarta semana, células da crista neural do ectoderma migram para arco hióides, passando então a chamar células de origem ectomesenquimal (Ulmer, et al. 2010).

O principal potencial de diferenciação das CTMs dentárias recai sobre a formação de dentina e dos tecidos derivados do periodonto, independentes de essas células serem derivadas da polpa, do ligamento periodontal ou do folículo dentário. As células nesses tecidos ficam quiescentes e podem ser ativadas a qualquer momento para regeneração em resposta ao uso ou reparação frente ao dano tecidual (Gronthos, et al. 2000; Harada, et al. 2008; Shi and Gronthos 2003) .

Um exemplo natural regeneração e reparação que acontece no corpo humano ocorre no órgão dentário, mais especificamente no complexo dentino-pulpar, pois há formação de dentina secundária durante a vida do indivíduo e sabe-se que quando há um dano a um desses tecidos, ocorre formação de dentina terciária (Ishikawa, et al. 2010; Sloan and Waddington 2009).

Na Odontologia, Gronthos et al. (2000) foram os precursores nessa área ao verificarem a existência de uma população de células-tronco na polpa dental humana (DPSCs). Os pesquisadores observaram que essas células tinham capacidade de regenerar o complexo dentino pulpar injuriado dando origem a um tipo de matriz mineralizada com túbulos, odontoblastos e o tecido conjuntivo contendo vasos sanguíneos similar ao encontrado no dente humano.

Atualmente, a literatura relata que não só as células da polpa dentária de dentes permanentes e decíduos possuem capacidade de auto-renovação e de diferenciação em linhagens variadas semelhante ao que ocorre com as células da medula óssea, mas também células derivadas da papila apical, ligamento periodontal e folículo dentário apresentam as mesmas propriedades caracterizando

outras populações de células-tronco dentais (Gronthos, et al. 2002; Gronthos, et al. 2000; Klionsky, et al. 2012; Miura, et al. 2003; Morsczech, et al. 2010; Seo, et al. 2004). Todas essas populações apresentam características similares como: morfologia semelhante ao fibroblastos, alta eficiência na formação de colônias e alto potencial de proliferação *in vitro* e características distintas como expressão de marcadores de células tronco e potencial de diferenciação (Kerkis and Caplan 2012; Miura, et al. 2003).

A terapia celular e engenharia tecidual tem se tornado promissoras quando se fala em reparação do complexo dentino-pulpar. Os estudos de células tronco dentais apesar de recentes (aproximadamente 14 anos), estão bastante avançados. Isso porque as células tronco dentais apresentam vantagens de obtenção como fácil acesso e pouca morbidade, além de alta eficiência celular, extensiva capacidade de proliferação e interatividade com biomateriais (Sun, et al. 2011; Ulmer, et al. 2010; Yamamura 1985).

2.1.4 CÉLULAS TRONCO DA POLPA DENTÁRIA

A polpa dentária é um tecido conjuntivo frouxo, constituindo, junto com a dentina, o complexo dentino-pulpar. Ela é derivada da papila dentária, sendo então de origem ectomesenquimal, e inicia sua diferenciação na fase de campânula, quando as células ectomesenquimais se diferenciam em odontoblastos. Histologicamente, encontramos na polpa diversos componentes celulares como odontoblastos, fibroblastos, macrófagos, células imunocompetentes, vasos sanguíneos e linfáticos e fibras nervosas em meio a matriz extracelular. Diversas funções como formação da dentina e funções secundárias relacionadas à sensibilidade, hidratação e defesa são desempenhadas pela polpa (Ten Cate, 2001).

As células-tronco permanecem quiescentes e só são ativadas frente a uma resposta estimulada por dano no complexo dentino-pulpar, onde novos odontoblastos são recrutados e diferenciados no local da injúria para sintetizar dentina reparativa. A dentina reacional promove uma ponte de tecido mineralizado imediatamente ao local danificado, a fim de preservar a vitalidade da polpa dentária (Sloan and Waddington 2009). Assim, o potencial para utilização células-tronco da

polpa dentária para terapia celular no tratamento endodôntico e em lesões de cárie é imenso (Iohara, et al. 2006).

Os primeiros pesquisadores que encontraram populações de células-tronco em polpa de dente permanente (DPSC- Dental Pulp Stem Cells) foram Gronthos et al. no ano 2000 e mais tarde em polpa de dentes decíduos em 2003 (SHED- Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth) (Miura, et al. 2003).

Estas células, tanto da polpa de dentes decíduos (SHED) como de dentes permanentes (DPSC) mostraram-se capazes de originar um tecido semelhante ao complexo dentino-pulpar, composto de matriz mineralizada e túbulos delimitados por células semelhantes a odontoblastos (Gronthos, et al. 2000; Miura, et al. 2003). No entanto, pesquisas realizadas por Miura, Gronthos et al., 2003, verificaram que as células-tronco dos dentes decíduos (SHED) são diferentes das DPSCs pois as SHEDs apresentam maior taxa de proliferação, maior capacidade de formar colônias e capacidade de osteoindução *in vivo*. Isto pode ocorrer pois as SHEDs hipoteticamente representam uma população de células multipotentes que talvez sejam mais imaturas do que as DPSCs. Após o transplante *in vivo* as SHEDs são capaz de induzir a formação óssea, gerar dentina, e sobreviver em cérebro de rato junto com a expressão de marcadores neurais (Miura, et al. 2003)

Numerosos trabalhos da literatura, mostram que além de restituir o complexo dentino-pulpar, as células-tronco de polpa dental são capazes também de se diferenciar em osso, cartilagem e células neurais (Gronthos, et al. 2000; Miura, et al. 2003). No entanto, as populações descritas até o momento não são homogêneas, sendo que alguns estudos mostram células mais proliferativas, formando também outros tecidos além dos previamente citados e outros mostram até características funcionais como proliferação e capacidade de formação de colônias divergentes entre as populações obtidas (Kerkis and Caplan 2012; Waddington, et al. 2009).

Estudos anteriores já demonstravam que os osteoblastos e células pulpares expressam marcadores de osso tal como sialoproteínas, fosfatase alcalina (ALP) e marcadores para osteo/odontoblastos, como colágenos tipo I e osteocalcina (Kuo, et al. 1992). Essa diferenciação é controlada por vários reguladores da formação óssea que são os mesmos genes encontrados nas DPSCs (Shi, et al. 2001; Wei, et al. 2007).

Além disso, as SHEDs são capazes de produzir fatores neurotróficos e ainda resgatar neurônios motores após injúria da medula espinhal (Nosrat, et al. 2001).

Estes estudos mostraram que células-tronco de tecidos não neurais podem se diferenciar em células neurais oferecendo a possibilidade de tratamento para injúrias ou ainda para doenças degenerativas (Wang, et al. 2010).

Dentre os marcadores expressos nas células-tronco mesenquimais de polpa encontra-se o STRO-1. Porém, esse marcador não é exclusivo de células-tronco e sua expressão é gradativamente perdida durante a expansão em cultura, limitando seu uso no isolamento ou em identificação nas passagens iniciais. Por isso, segundo alguns autores, combinações de STRO-1 com outros marcadores poderiam ser utilizados para a identificação das células mesenquimais humanas (Kolf, et al. 2007).

Para pesquisas em cultura de células-tronco da polpa de dentes humanos, pode-se utilizar vários dentes, como terceiros molares inclusos de pacientes adultos, com idade entre 19-29 anos, dentes supranumerários, dentes decíduos esfoliados ou quaisquer outros indicados para remoção (Govindasamy, et al. 2010; Wei, et al. 2007).

2.1.5 CÉLULAS TRONCO DA PAPILA APICAL

A papila apical contribui na formação da raiz dentária, que continua seu desenvolvimento depois da fase de campânula da odontogênese. A exata localização anatômica das células-tronco desse tecido é desconhecida, podendo ser mais central ou apical na futura polpa. Sua função biológica é a formação da dentina e polpa radiculares atuando também na remodelação da forma da coroa do futuro dente (Huang, et al. 2009; Sonoyama, et al. 2008). Didaticamente, a papila apical pode ser representada como um tecido localizado no exterior do forame apical e existe enquanto o ápice dentário ainda encontra-se aberto durante o processo de desenvolvimento radicular até a completa erupção do dente na cavidade oral (Ding, et al. 2010b).

A papila apical é considerada hoje, pelos histologistas, como polpa imatura. Isso porque a distinção entre a polpa dentária e papila apical é que esta última representa o precursor do tecido da polpa radicular (Rodriguez-Lozano, et al. 2011).

A descoberta da existência de células tronco da papila apical ocorreu no ano de 2006 pela equipe de Sonoyama et al. (Sonoyama, et al. 2006). Atualmente, as células tronco da papila apical representam uma nova população de células tronco multipotentes que demonstram a capacidade de formar odontoblastos e adipócitos e

expressam altos níveis de survivina (proteína com função de inibir a apoptose) e telomerase (enzima com função adicionar sequencias específicas e repetitivas de DNA à extremidade 3'dos cromossomos), ou seja, tanto a survivina quanto a telomerase desenvolvem um papel crítico na proliferação e sobrevivência celular (Ding, et al. 2010b).

As células-tronco da papila apical (SCAP) são altamente proliferativas, clonogênicas e capazes de diferenciação em diferentes tecidos. As SCAPs apresentam características semelhantes às células-tronco da polpa dental (DPSCs), mas parecem ser uma fonte primária de odontoblastos (dentina primária), já as DPSCs são fontes de substituição de odontoblastos (dentina reparativa) (Lei, et al. 2011) (Sonoyama, et al. 2006; Sonoyama, et al. 2008).

Para o isolamento das células da papila dentária de humanos, utilizam-se dentes inclusos como terceiros molares que estejam na fase de formação de raiz de pacientes que apresentem idade entre 16-24 anos (Abe, et al. 2008; Sonoyama, et al. 2008) ou 18-20 (Ding, et al. 2010a). No entanto, por se tratar de um tecido embrionário, que se torna também a polpa dental, suas células podem ser isoladas apenas em um determinado período de desenvolvimento dentária, enquanto a raiz está ainda aberta (Huang, et al. 2008). Para isso, a análise do grau do desenvolvimento dentário pelo método radiográfico é considerado mais fiel, porque se baseia na calcificação do elemento dentário. Para o estabelecimento do estágio de formação da coroa e raiz dentária, a radiografia é comparada com o desenho idealizado por Nolla (Nolla 1960) onde a cada dente é determinado um valor de desenvolvimento do qual se aproxima. A evolução dentária foi graduada numa escala de 0 a 10 (figura 1). Para estudo de células tronco não há evidencia sobre qual melhor fase é a melhor. O que se sabe é que a competência das células tronco mesenquimais de se formar dentina radicular diminui, enquanto que o seu potencial osteogênico aumenta após a maturação da raiz do dente. Depois do estágio 8, já existe uma evolução na formação da dentina radicular, ou seja, já há presença de células diferenciadas em odontoblastos (Lei, et al. 2011). De acordo com Yagyuu et al. 2010, o estudo de células tronco da papila apical foi na fase de coroa completa que se refere ao estágio 6 (Yagyuu, et al. 2010).

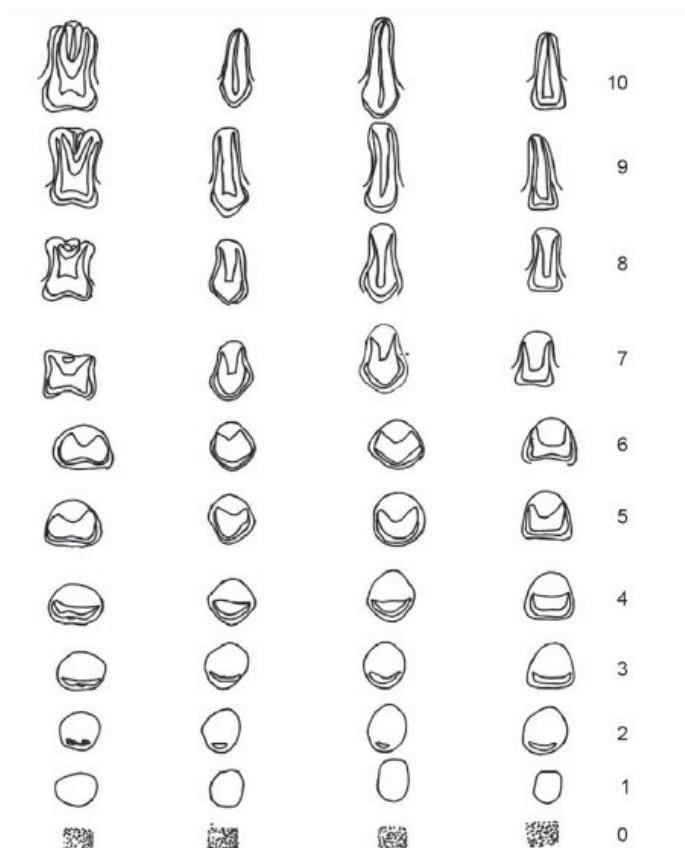


Figura 2.1- Figura representativa com os 10 estágios de mineralização dentária humana descrita por Nolla. 1. presença de cripta; 2. calcificação inicial; 3. um terço de coroa completo; 4. dois terços de coroa completos; 5. coroa quase completa; 6. coroa completa; 7. um terço de raiz completo; 8. dois terços de raiz completos; 9. raiz quase completa e ápice aberto; 10. ápice radicular completo (Nolla 1960)

A literatura relata que as células da papila apical podem se diferenciar *in vitro* em tecido ósseo, adiposo e cartilaginoso bem como células neurais (Abe, et al. 2008; Huang, et al. 2009; Sonoyama, et al. 2008; Tziafas and Kodonas 2010). *In vivo*, essas células formaram osso e dentina após serem transplantados em camundongos imunocomprometidos (Abe, et al. 2008). Porém, o potencial de diferenciação e caracterização das células da papila apical ainda não está totalmente estabelecido necessitando, portanto, mais pesquisas.

2.2 MARCADORES MOLECULARES

As células possuem receptores e moléculas de superfície que as ligam entre si e ao meio externo, possibilitando a sua comunicação e a execução das suas

funções no organismo (Bianco, et al. 2006; Gronthos, et al. 2003; Riekstina, et al. 2009).

Essas moléculas de superfície celular podem ser usadas como marcadores celulares para sua identificação. Como ainda não é possível isolar as CTM e caracterizá-las em um estado não manipulado, sua definição está baseada em uma combinação de propriedades morfológicas, fenóticas e funcionais. Tais propriedades variam de acordo com método de isolamento/expansão empregado para seu cultivo, e não há uma combinação exata de marcadores para sua identificação *in vitro* ou *in vivo* (Kolf, et al. 2007; Zizkova, et al. 2014).

Como já exposto, a ausência de especificidade torna a comparação de resultados entre os diversos grupos de pesquisa difícil e retarda o progresso nessa área de pesquisa. Ademais, níveis variáveis de expressão dos muitos dos marcadores de linhagem podem ocorrer não somente em virtude dos diferentes métodos de isolamento celular e características da cultura, mas também em resposta a variação na origem do tecidos e diferentes espécies (da Silva Meirelles, et al. 2008; Dominici, et al. 2006).

2.2.1 STRO-1

STRO-1 é uma proteína de superfície celular expressada pelas células precursoras do estroma da medula óssea e também para identificar populações de células tronco (Kawashima 2012; Simmons and Torok-Storb 1991). Assim, considera-se células positiva para STRO-1, uma população enriquecida em CTM (Kaneko, et al. 2009)(Kolf, et al. 2007).

Além de não ser um marcador exclusivo de CTM ele ainda tem sua expressão gradualmente perdida de acordo com sua expansão realizada em laboratório. Por isso, utilização do STRO-1 para o isolamento de CTMs e / ou a sua identificação está restrito às primeira passagens (Simmons and Torok-Storb 1991).

O STRO-1 é usado para isolar e purificar células tronco da medula óssea, também verificou que é expressado por células dentais quando separado pela técnica magnética (Shi, et al. 2005), na separação e seleção células tronco mesenquimais pela técnica de fluorescência ativada e, em menor extensão na técnica de imunocitoquímica (Lin, et al. 2011). Esse marcador, também foi localizado em células endoteliais e perivascular em paredes de vasos sanguíneos (Lin, et al.

2011; Shi and Gronthos 2003) Essa informação é interessante já que historicamente, já foi mencionado que os percussores dos odontoblastos eram pericitos (Fitzgerald 1979; Yamamura 1985). No tecido pulpar, a area perivascular também é considerado como nicho das células tronco dentais (Kawashima 2012). A co-expressão do STRO-1 com marcadores da dentina/ osteogenico tal como sialoproteína óssea, osteocalcina em cultura da papila apical e a propensão das células tronco da polpa dentária de se diferenciarem em células semelhantes aos odontoblastos e osteoblastos sugerem que esse anticorpo pode ser uma ferramenta também para identificação dessas células quando há formação de tecidos duros (Kawashima 2012).

2.2.2 CD 146

CD146 é um gene de cópia única localizado no braço longo do cromossomo humano 11 e é composto por 16 éxons abrangendo mais de uma região cromossômica de aproximadamente 14 kilobases (Sers, et al. 1993). CD146 é altamente glicosilado e cerca de 35 por cento da sua massa molecular é composto de carboidratos, incluindo o ácido siálico e outras porções de hidrato de carbono (Shih, et al. 1994).

O CD146 é usado como marcador de células perivasculares e também é conhecido como molécula de adesão de células de melanoma (menanoma cell adhesion molecule – MCAM ou Mel-Cam). É uma molécula de superfície de células pertencentes à superfamília das imunoglobulinas e expresso em todos os tipos de células endoteliais humanas (Bardin, et al. 2001) e células de músculo liso (Tormin, et al. 2011). Outros estudos revelaram que células tronco da medula óssea, células tronco da polpa dentária de dentes decíduos e permanentes e do ligamento periodontal também expressam o CD 146 (Crisan, et al. 2008). Além de ser marcador de CTM já foi evidenciado que ele também é usado na identificação de tumores de vasos sanguíneos (Yan, et al. 2003) e que é importante na migração de células endoteliais e de angiogênese (Bu, et al. 2006).

Entretanto, não se contesta que a separação magnética à base CD146 raramente fornece uma fração absolutamente pura de células tronco e que o

processo inclui uma etapa de reconhecimento visual feita sob o microscópio (Woywodt, et al. 2006).

2.3.3 CD 90

CD 90 (*Cluster* de Diferenciação 90) é também denominado como Thy-1. Trata-se de uma glicoproteína de superfície originalmente identificado em timócitos de camundongos. Embora a CD90 foi identificada em uma variedade de células-tronco e em níveis variáveis em tecidos não linfóides, tais como em fibroblastos, células do cérebro e células endoteliais ativadas, o conhecimento sobre os níveis de expressão de CD90 em diferentes tipos de células é limitado (Kisselbach, et al. 2009).

A CD 90 participa do processo de inflamação e cicatrização e esse é só um exemplo de como o CD 90 está envolvido em processos no corpo humano. Além disso, a CD90 desempenha papel na adesão célula-matriz e célula-célula e entre mediadores inflamatórios da resposta imune (Woywodt, et al. 2006), na inibição do crescimento em astrócitos maduros (células não-neuronais) e pode desempenhar um papel no crescimento e diferenciação de células tronco (Woywodt, et al. 2006).

Nas células tronco do tecido humano, o CD 90 já foi evidenciado nas células de origem mesenquimal incluindo as de tecidos derivados do órgão dental (Horwitz, et al. 2005; Huang, et al. 2009; Karaoz, et al. 2010), células tronco hematopoiéticas e células tronco de queratinócitos e em diferentes níveis em tecidos não linfóides (Kawashima 2012; Nakamura, et al. 2006).

2.3 ISOLAMENTO DE POPULAÇÕES ENRIQUECIDAS EM CÉLULAS TRONCO

Devido à facilidade de isolamento, expansão *in vitro* e a capacidade de produção de fatores biologicamente ativos, as CTM são atualmente consideradas as células tronco de maior potencial terapêutico (Hilkens, et al. 2013; Struys, et al. 2011)

Os tecidos são formadores por um misto de diferentes tipo de células e em diferentes estágio de diferenciação. Para se isolar as células tronco existem técnicas já preconizadas na literatura e as mais utilizadas se baseiam em:

1. Nas diferenças entre as densidade de células (peso específico);
2. Na afinidade de anticorpos para epitopos de superfície celular;
3. No tamanho da célula;
4. Na dispersão de luz ou de emissão fluorescente como classificados através de citometria de fluxo.

As separações mais eficazes geralmente empregam dois ou mais parâmetros para obter um elevado nível de pureza (Waddington, et al. 2009).

A escolha de um método de separação se faz necessário quando se quer trabalhar com células tronco. Isso porque o corpo humano compreende mais de 200 tipos diferentes de células que estão organizados em tecidos e órgãos. As CTM constituem uma fração pequena de células nucleadas que compõe aproximadamente 0,001%-0,01% das células encontradas nos tecidos. As técnicas de separação magnética e separação por fluorescência ativada são as mais utilizadas e se baseiam na expressão de marcadores de superfície (Pountos, et al. 2007).

A técnica de separação através de colunas magnéticas (MACS - *magnetic activated cell sorting*) baseia-se no uso microesferas magnéticas revestidas com um anticorpo. Um campo magnético externo é aplicado separando as células positivas das negativas para aquele marcador. Apesar de ser uma técnica demorada e não permitir dupla marcação, ela é bastante usada por ser relativamente simples, efetiva e barata (Miltenyi, et al. 1990).

A separação celular pela técnica de FACS (*fluorescence-activated cell sorting*) é feita com base na emissão de intensidade fluorescente. O citômetro de fluxo tem a capacidade de detectar e isolar as células marcadas com um ou vários fluorocromos. Os fluorocromos são ligados a população específica de células que se quer trabalhar com o uso de marcadores e a dispersão de luz ocorre de acordo com o parâmetros definidos pelo usuário. As células positivas e negativas que passam pelo equipamento são coletadas em tubos específicos (Herzenberg, et al. 2002).

2.4 RADIAÇÃO SÍNCROTRON – MICROFLUORESCENCIA DE RX E CÉLULAS TRONCO

A descoberta dos raios X é atribuída ao físico alemão Wilhelm Conrad Röntgen no de 1895. Porém, somente por volta de 1940 as aplicações voltaram-se

para a química, quando o primeiro equipamento de espectrometria de fluorescência de raio x (XRF) tornou-se comercialmente viável (Puumalainen and Lahtinen 1977).

A fluorescência de raios X (XRF) dos elementos presentes numa amostra ocorre quando esta é atingida por raios originados de um tubo de raios X. Estes, ao incidirem nos átomos da amostra, projetam elétrons das camadas próximas do núcleo que por sua vez, também produzem vários efeitos. Deles, o mais relevante é a capacidade de caracterizar os elementos presentes. Essa é uma técnica analítica multielementar e não destrutiva usada para obter informações qualitativas e quantitativas da composição elementar das amostras (Cardoso, et al. 2011; de Souza Guerra, et al. 2010).

Nos dias atuais pesquisas e terapias celulares utilizam populações de milhares células. Já foi verificado que no interior de uma população, pode existir uma variedade de estados fenotípicos e propriedades diferentes que podem influenciar o destino de toda população (Golebiewska, et al. 2011; Sandt, et al. 2013; Szotek, et al. 2006). Essa heterogeneidade molecular das células pode influenciar o compromisso da linhagem, o potencial de diferenciação e até a tumorigenicidade dentro de uma população de células isogênicas (Hough, et al. 2009; Narsinh, et al. 2011).

Assim o estudo das células através radiação tem se mostrado valioso por ter a capacidade de identificar de forma abrangente componentes celulares em alta resolução. Isso acontece porque o feixe de radiação consegue excitar mesmo pequenos elementos. A absorvância da radiação eletromagnética tem comprimento de onda entre 2-20 μm (Walsh, et al. 2008; Walsh, et al. 2007). Para se ter uma idéia, células-tronco hematopoiéticas tem em média 6 μm de diâmetro (Allaire and Yang 2011; Sandt, et al. 2013).

A luz síncrotron é radiação eletromagnética muito intensa emitida tangencialmente à trajetória dos elétrons ou pósitrons que experimentam uma aceleração centrípeta ao atravessar um campo magnético. Esta radiação emitida tem propriedades especiais e produz fótons numa ampla faixa espectral de energia, indo desde o infravermelho até raios-X. Esta radiação é canalizada até as estações experimentais de trabalho onde são realizados diversos tipos de experimentos científicos (Brown et al., 1991). Basicamente uma fonte de luz síncrotron funciona como um grande tubo em formato de anel onde os elétrons circulam em seu interior num ambiente de ultra alto vácuo. O feixe de elétrons é forçado a descrever uma

trajetória circular usando diversos magnetos distribuídos ao longo da trajetória dos elétrons. Comparada com o brilho de fontes de raios-X convencionais existentes em clínicas e hospitais, a fonte de luz síncrotron possui um brilho 10^{10} vezes maior, abrindo dessa forma à possibilidade para a criação de microsondas de raios-X eficientes (Kelly, et al. 2010a; Kelly, et al. 2010b).

Poucos autores utilizaram a radiação síncrotron para o estudo de células-tronco. No entanto, a análise celular utilizando essa radiação tem se mostrado de abordagem simples e não destrutiva pois pode proporcionar ótima efetividade além de boa capacidade de identificar e caracterizar células-tronco (Hughes et al. 2010; Pijanka et al. 2010; Kelly et al. 2010).

É recente a importância da identificação e de classificação das células-tronco, particularmente na busca da identificação e localização de seus nichos e da capacidade de regeneração de tecidos (Jordan, et al. 2006; Li and Xie 2005). A identificação mecanicista da sub-população dessas células dentro de uma amostra heterogênea pode permitir terapias mais adequadas e específicas (Kelly, et al. 2010b).

Em 2011, Thumanu et al., verificaram através da análise (FTIR-Fourier Transform Infrared) com radiação síncrotron, o estado molecular de hepatócitos diferenciados a partir de células-tronco mesenquimais. Os autores concluíram que é possível fazer um controle de qualidade da diferenciação celular, permitindo um melhor entendimento do processo de diferenciação. Também usando FTIR com luz síncrotron, Chonant et al 2011 demonstraram que foi possível analisar com eficiência o estágio de diferenciação de células-tronco mesenquimais humanas em condrócitos.

Em relação ao raios-X Síncrotron, desde 2009 sabe-se que se trata de uma técnica inovadora, promissora e avançada para realização de pesquisas na área biomédica (Komlev et al. 2009). Em 2010, essa técnica foi utilizada para evidenciar uma linhagem de células-tronco obtidas de um carcinoma localizado na córnea. Para isso, os pesquisadores estudaram se a luz síncrotron baseado na radiação de luz infravermelha (FTIR-Fourier Transform Infrared), juntamente com análise multivariada, poderiam identificar e localizar fenótipos de biomarcadores de células-tronco normais e células-tronco cancerígenas localizados na córnea. Para isso, os autores utilizaram amostras de tecidos normais e cancerígenos obtidos da córnea, adquiridos em um banco de olhos em Seattle-EUA. Os materiais foram

armazenados a 4⁰C durante 5 dias em um meio próprio de preservação. Mapas de imagem espectral (tamanho de 8 mm, no modo de varredura) foram obtidos utilizando espectrofotômetro, com as medições de fundo tiradas a cada 30 minutos para levar em conta as alterações atmosféricas e alterações na corrente de feixe. Através do rastreamento das alterações bioquímicas das linhagens celulares foi possível identificá-las e com isso tornar o tratamento oncológico mais preciso o que melhora a sobrevivência do indivíduo e reduz a recorrência e metástase da doença (Fogarty, et al. 2013).

No ano seguinte, Cardoso et al. 2011, utilizaram a análise por microfluorescência de Raios-X com luz síncrotron (SR-microXRF) para estudar a presença e distribuição de alguns elementos presentes em células-tronco pluripotentes induzidas ou não, durante o processo de diferenciação neural. Os autores afirmam que a SR-XRF foi considerada uma ferramenta valiosa para avaliar e comparar a dinâmica das células, além de ser um poderoso método para investigar elementos celulares em alta sensibilidade e resolução.

É importante salientar que até o momento, não há na literatura nenhuma pesquisa envolvendo células-tronco mesenquimais de origem dental e radiação síncrotron.

2.5 NOÇÕES BÁSICAS DA ESTRUTURA CELULAR

Compreender a estrutura total da célula e de todo o seu funcionamento vem sendo motivo de pesquisa nas mais diferentes áreas de conhecimento. Isso se deve, principalmente, a crescente importância da biologia molecular e a necessidade de um entendimento interativo da estrutura dinâmica, fisiológica, organizada e funcional. Para isso, o saber e entendimento dos constituintes químicos, especialmente sua organização macromolecular e que exercem papéis fundamentais na sua estrutura e funcionamento

2.5.1 FORMA E TAMANHO CELULARES

Muitas células tem forma irregular como as células nervosas, que tem prolongamentos muitos longos. Por outro lado, núcleo, organelas, vesículas de

secreção e outros componentes celulares tem localização definida quase sempre constante, conforme o tipo celular. Assim, podemos entender que as células podem apresentar estruturas e formas variadas de acordo com sua especialização funcional. De um modo geral, as formas celulares dependem da tensão superficial, da viscosidade do protoplasma, da ação mecânica que exercem as células contíguas, da rigidez da membrana plasmática e da especialização funcional da célula. Desse modo, o conhecimento dos aspectos celulares morfológicos são importantes como suporte ao uso de marcadores moleculares em pesquisa de citopatologia (Diaz-Cano 2008).

Os mamíferos são espécies com fenótipo e tamanhos extensivamente diferentes. Apesar de os órgãos serem dimensionados na proporção do tamanho do animal, as células e tecidos não refletem essa diferença. Por exemplo, em todos os mamíferos os capilares variam de 5 a 10 μm , o que permite uma excelente troca de oxigênio. Ratos e baleias têm visivelmente diferentes tamanhos de corpo, mas suas células-tronco mesenquimais têm a mesma morfologia e tamanho em cultura (Hoogduijn, et al. 2013).

Células-tronco mesenquimais são caracterizados morfológicamente por um corpo pequeno com alguns processos celulares que são longos e finos. O corpo da célula contém um núcleo grande e redondo com nucléolo proeminente rodeado por partículas finamente dispersas de cromatina, dando ao núcleo uma aparência clara. O restante do corpo da célula contém pequenas quantidades organelas, como complexo de Golgi, retículo endoplasmático rugoso, mitocôndrias e polirribossomas (Brighton and Hunt 1991).

Outra característica morfológica das células tronco é que estas apresentam-se bem integradas na estrutura do tecido e são morfológicamente indistinguíveis de suas vizinhas. Quando uma célula tronco migra e chega ao seu destino final, ela incorpora a estrutura desse novo tecido, tornando-se morfológicamente semelhante às demais células e expressando novas proteínas típicas do novo microambiente, uma forte evidência de conversão (Blau, et al. 2001).

2.5.2 PAPEL DOS ÍONS NAS FUNÇÕES BIOLÓGICAS

O conhecimento da distribuição dos elementos químicos nas células e mesmo em organelas pode ajudar a revelar a sua função e seu funcionamento em uma

variedade de processos celulares (Roudeau, et al. 2014). O estudo da concentração de elementos traço têm desempenhado um papel importante na compreensão de diferentes processos celulares. A instabilidade desses elementos iônicos nas células (abundância ou deficiência) foi reconhecida como essencial na homeostase normal das células eucarióticas e o acúmulo seria potencialmente tóxico podendo desencadear diversas doenças (Banas, et al. 2010a; Tan and Chen 2011).

A análise química elementar da matéria viva nos diz que apenas 22 dos mais de 100 elementos químicos são essenciais aos seres vivos e destes, apenas 16 podem ser encontrados em todas as espécies. Estes 16 elementos encontram-se nos seres vivos em proporções muito diferentes das do meio físico, sendo 99% da massa das células composta por carbono, hidrogênio e oxigênio. O sódio, potássio, magnésio, cálcio, enxofre, fósforo e cloro representam entre 1 a 2% da massa total das células. Os restantes elementos surgem em quantidades inferiores a 0,01% e são, por isso, designados oligoelementos. De todos os compostos, a água é o mais abundante na célula, atingindo 95% da sua massa total, servindo de meio de dispersão para as moléculas restantes e ajudando na sua interação. Os compostos orgânicos caracterizam as células pois não existem no meio físico, sendo por isso, chamados biomoléculas que incluem os glícídios os lípidios, os prótidos e os ácidos nucleicos (Zhang, et al. 2014).

Fósforo (P)

O P é considerado um elemento essencial para a constituição de macromoléculas estruturais, bem como para o metabolismo energético (produção de ATP) e em funções mecânicas celulares (Sternner, Elser, 2002). Está associado a uma ampla gama de moléculas, dentre elas glicerofosfolípidios, proteínas fosforiladas e DNA/RNA (Blank 2012). O fósforo participa também da estrutura dos ossos e dentes, dando-lhes maior solidez e também atua na contração muscular. Recentemente, tem sido abordado de forma freqüente em análises estequiométricas biológicas, ou seja, em estudos acerca do balanço energético e dos múltiplos elementos químicos em interações biológicas. Um dos modelos de análise dessas relações, aplicado em células tumorais e em microorganismos, diz respeito à chamada “hipótese de taxa de crescimento”, que afirma haver associações próximas e positivas entre taxa de crescimento tumoral, quantidade de RNA (fração de massa

seca) e quantidade de P. Essa associação é explicada pelo fato de que células em proliferação geralmente exibem aumento na quantidade de RNA ribossomal rico em P, o qual é destinado à demanda de maior síntese protéica durante o crescimento. Estudo comparando a quantidade de P relativamente à quantidade de RNA em células normais e cancerígenas demonstrou que as células cancerígenas exibem significativamente maior quantidade de P do que as normais, bem como maior quantidade de RNA. A presença de altos níveis de P foi correlacionada aos altos níveis de RNA, bem como a maior proliferação celular, sugerindo que, quanto maior a presença de P intracelularmente, maior a taxa de crescimento celular (Elser, et al. 2007).

Cobre (Cu)

Em condições normais, o cobre é encontrado em todas células vivas. Esse elemento auxilia na produção de hemoglobina e na formação da melanina. Esse elemento é essencial para vários processos bioquímicos como participação na molécula da enzima SOD (Superóxido Dismutase), no citocromo oxidase, na tirosinase e na dopamina B-hidroxilase. Além de ajudar na absorção do ferro e da vitamina C. O Cobre tb possui também grande importância na conversão da tirosina em melanina, agindo como fator de pigmentação do cabelo e da pele e participa da síntese da elastina e do colágeno, assim como nos hormônios T3, T4. Mas, o Cobre também pode ser potencialmente tóxico se estiver presente em elevadas concentrações nas células como observado em tecidos com processos tumorais e hiperplásicos (Banas, et al. 2010a). Acredita-se que isso ocorre, porque o Cu pode ser a chave que desencadeia a angiogênese em células tumorais (Hu 1998). Isso porque esse elemento pode alterar seu estado de oxidação, causando efeitos nocivos sobre o funcionamento da célula, através da produção de espécies de oxigênio altamente reativas, que produzem radicais hidroxila que modificam de forma adversa as proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos (Armendariz, et al. 2004).

Zinco (Zn)

O Zn é um metal vital na nutrição no ser humano, animais e plantas (Banas, et al. 2010b).

Este elemento está presente em grandes quantidades em todos os tecidos, especialmente na musculatura esquelética (57%), ossos (29%), pele (6%) e fígado (5%), além de estar presente também em secreções e fluidos corporais. O zinco é considerado um íon intracelular (cerca de 80% se encontra no citosol e o restante no núcleo) que, ao contrário do ferro e do cobre, não sofre alteração na sua valência pois não está envolvido em reações de óxido-redução. Isso permite que ele seja transportado e utilizado de forma mais rápida, além de não submeter o organismo a ações oxidativas prejudiciais (DUTRA-DE-OLIVEIRA; MARCHINI, 1998; HAMBIDGE, 1992). O Zn também é considerado como elemento essencial no sistema imunológico. A sua concentração tem de ser equilibrada para um correto funcionamento do sistema imunitário, uma vez que o aumento ou diminuição da quantidade deste elemento resulta numa função imunológica perturbada. Alteração no sistema imune pode aumentar o risco de várias doenças, incluindo cancer (Rink and Gabriel 2000). Porém, ainda não há evidências sobre o papel do Zn na carcinogênese. Alguns estudos enfatizam o fato de que a deficiência de Zn causa de câncer, enquanto outros (Beck, et al. 1997; Margalioth, et al. 1983) destacam que Zn está envolvido no crescimento tumoral e desenvolvimento de transformação neoplásica. Estas observações sugerem que existe um conflito do papel de Zn e que este elemento pode agir de formas diferentes de acordo com cada tipo celular.

Potássio (K)

O íon K está presente nos telômeros estabilizando sua estrutura. Mas sua maior participação está na osmorregulação nas células. Está presente na conformação dos fosfolipídios da membrana plasmática, bem como na transmissão dos impulsos nervosos. Este elemento serve para manter o potencial elétrico das células para que elas possam desenvolver suas funções de forma correta. Geralmente está associado com o sódio, agindo no balanço hídrico do organismo, transportando corrente elétrica, atuando na transmissão de impulsos nervosos, mantendo a frequência cardíaca e pressão arterial normais (Otsu, et al. 2014).

O acoplamento é gerenciado, por meio de rede de comunicação biológica rápida, que compreende células nervosas. Essas têm extensões longas e finas cilíndricas capazes de conduzir correntes iônicas de despolarização, de forma eficaz. Desta forma, os organismos biológicos são habilitados para fazer de forma

rápida mesmo que a longa distância, conexões eletrolíticas com base nos últimos íons móveis de Na, K e Cl. As correntes surgem principalmente a partir do movimento para dentro de Na, em troca de K (Williams 2007). Ao contrário dos íons de sódio, as concentrações de íons potássio (K) são mais altas dentro da célula do que no seu exterior, para possibilitar a transmissão do impulso nervoso.

Na área biologia molecular, a expressão de K foi verificada durante a diferenciação de células-tronco neurais. Isso pode ser indicativo de que essas propriedades eletrofisiológicas de canais de íons de potássio são considerados como um índice básico para determinar a diferenciação funcional das células-tronco neurais (Bai, et al. 2013).

Cloro (Cl)

O principal anion na células é o cloro, que é transportado tanto pela membrana plasmática quanto pela membranas de organelas intracelulares por meio dos canais de íons. Estes canais têm duas funções principais. Primeiro, eles carregam carga e, assim, contribuem para a regulação do potencial de membrana e, portanto, excitabilidade das células. Em segundo lugar, o fluxo de massa de Cl contribui para a regulação do volume celular de íons e água através de transporte epitelial. Outras funções, complementam as funções fisiológicas e celulares do Cl que incluem regulação do pH, o volume de homeostase, transporte de solutos orgânicos, migração celular, proliferação e diferenciação celular (Singh 2010).

Canais de cloreto são importantes para definir o potencial de repouso da membrana celular e manter o volume celular adequado. A estrutura destes canais não são como os outros canais conhecidos. Subunidades do canal de cloreto contém entre 1 e 12 segmentos transmembrana. Alguns membros desta família são ativados por voltagem, enquanto outros são ativados por Ca^{2+} , ligantes extracelulares, e pH entre outros moduladores. Um método de classificação de canais de Cl foi baseado nas suas funções *in vivo*: (i) a transmissão na membrana pós-sináptica, (ii) a estabilização do potencial de repouso da membrana no músculo (esquelético), (iii) despolarização das células do músculo liso ou, eventualmente, epitélio pigmentar da retina, (iv) a regulação do volume celular em várias células, (v) de transporte de fluido no epitélio e (v) a neutralização de íons H^+ nas vesículas de lisossomos (Suzuki, et al. 2006).

Cálcio (Ca)

Ca tem um papel essencial na fisiologia e bioquímica dos organismos e na célula. Ele desempenha um papel importante nas vias de transdução de sinal, agindo como um segundo mensageiro, na libertação de neurotransmissores a partir de neurônios, e na contração de todos os tipos de células muscular (Jaimovich and Carrasco 2002). Muitas enzimas usam o Ca como um co-factor, na cascata de coagulação do sangue (Clapham 2007). O cálcio extracelular é também importante para manter a diferença de potencial através das membranas de células excitáveis, bem como a formação óssea apropriada. Organelas como a mitocôndria e retículo endoplasmático armazenam o Ca e fazem sua liberação no organismo de forma controlada e constante para corrente sanguínea, dissolvido ou ligado a proteínas, tais como albumina do soro (Pacher, et al. 2008). Essa cuidadosa regulação serve para manter uma concentração de Ca no estado estacionário em torno de 100-200 nM , e pequenas alterações têm impacto sobre a transcrição genética, o crescimento celular, diferenciação, sobrevivência e morte bem como sobre a organização do citoesqueleto e tráfego de vesículas (Contreras-Ferrat, et al. 2014).

Enxofre (S)

O enxofre representa 0,25% do corpo humano e está em praticamente em toda célula animal e vegetal. Esse elemento age como um antioxidante natural, protegendo as células do envelhecimento (Williams 2007).

As pontes de enxofre formam ligações flexíveis entre as células e os tecidos conjuntivos circundantes. Isto permite que as células conservem a sua elasticidade. Teste *in vitro* mostraram que o S aumentam a viabilidade e a capacidade proliferativa de diversos tipos de células (Toohey 1975) Quando o enxofre é escasso, a parede celular endurece, e as células perdem a sua elasticidade. O transporte de proteínas da membrana fica bloqueado, e as membranas tornam-se menos permeáveis. Isto resulta num transporte reduzido de oxigênio e nutrientes para as células, bem como a reduzida excreção de produtos residuais (toxinas) a partir de dentro das células. Isso causa a falta de oxigênio e nutrientes, e um acúmulo de produtos metabólicos tóxicos no interior das células

podendo eventualmente, causar algum tipo de doença degenerativa, ou tumores (Laxman, et al. 2013; Roos and Messens 2011) .

Resumidamente, o S apresenta funções importantes nas células sendo que grande diversidade de efeitos sugere que as suas funções são gerais e não específicas para qualquer tecido ou qualquer outro processo. Não podemos considera-lo "agente de sinalização", já que não há nenhuma evidência de que ele atua em uma ascensão e queda em padrão controlado (como acontece com neurotransmissores ou hormônios). Pelo contrário, parece ser um fator essencial que deve estar disponível em baixa concentração e constante. O efeito geral é manter todas as células em um estado ótimo de saúde no que diz respeito à viabilidade, vigor, longevidade e capacidade proliferativa. Entre os mecanismos pelos quais S podem ter este efeito nas células humanas, incluem manutenção de cofatores contendo enxofre (clusters MoCo, Fe-S), o controle da síntese de proteínas via modificação do RNAt, a regulação das atividades de enzimas, e a manutenção da capacidade de redução das células (Toohey and Cooper 2014)

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo principal dessa pesquisa foi analisar as características fisiológicas, morfológicas e o perfil iônico de populações enriquecidas em células-tronco, derivadas da papila apical e polpa de dentes permanentes, isoladas através da expressão de 3 diferentes marcadores, logo após o isolamento (p0).

Objetivos Específicos:

1. Isolar diferentes populações através da expressão de marcadores amplamente utilizados na literatura (STRO-1, CD146 e CD90).
2. Estudar as características funcionais básicas (crescimento celular e formação de colônias) de cada população.
3. Estudar as características morfológicas de cada população através de medições celulares com parâmetros controlados.
4. Estudar a presença e distribuição iônica de elementos químicos intracelulares usando a técnica analítica de microXRF com luz síncrotron.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O procedimento cirúrgico foi realizado na clínica odontológica da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP) após a aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa desta Universidade sob número 06/11 (Anexo A)

4.1 OBTENÇÃO DAS LINHAGENS CELULARES

Foram utilizado 16 dentes terceiros molares inclusos, todos com rizogênese incompleta com indicação de exodontia após a assinatura do Termo do Consentimento Livre e Esclarecido do paciente ou responsável.

Imediatamente após a cirurgia, o dente (com polpa e papila apical) foi armazenado em meio de transporte composto por 3 mL α MEM (*Minimum Essential Medium Eagle* – α modification, Sigma[®]) com 2% de solução antibiótica-antimicótica (Gibco[®]), e colocado em um isopor com gelo e levado ao laboratório de cultivo celular da Disciplina de Patologia Bucal onde todos os procedimentos de cultivo foram realizados.

Para o início do procedimento de cultura primária, o dente foi lavado 5 vezes com PBS a 2% de antibiótico e antimicótico (Sigma[®]). Primeiramente, foi retirada a papila apical utilizando pinça clínica (Figura 4.1). A remoção da polpa dentária foi através do forame apical utilizando lima Kerr número 15 (Figura 4.2).

Os tecidos foram fragmentados em pedaços menores que 1 mm² e colocados em placa Petri. As placas foram monitoradas diariamente. Os explantes ficaram no meio de cultura de manutenção que foi constituído de α MEM (*Minimum Essential Medium Eagle* – α modification) com 1% de solução antibiótica-antimicótica, 1% β -mercaptoetanol e 10% de soro fetal bovino (FBS), 100 μ M de ácido ascórbico e 2 mM de L-Glutamina (Glutamax[®]Gibco).

Após as células migrarem e se aderirem à placa, o meio de cultura foi trocado, de acordo com a necessidade do metabolismo celular (analisado visualmente pela cor do meio). O monitoramento do crescimento celular foi feito

através de microscópio invertido de fase e aspectos como vitalidade celular, coloração e aspecto do meio foram analisados.

Após atingirem 75% de confluência na placa, as células foram subcultivadas. Para tanto, a monocamada celular foi lavada com PBS, sem cálcio e magnésio pH 7,2 e as células foram separadas com 2 mL de solução de tryple E (Invitrogen) em temperatura de 37°C. As células em suspensão são centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos à temperatura ambiente. O precipitado celular foi ressuspenso em meio de cultura fresco, tanto para aquisição de alíquotas para novo crescimento celular quanto para congelamento quando necessário.

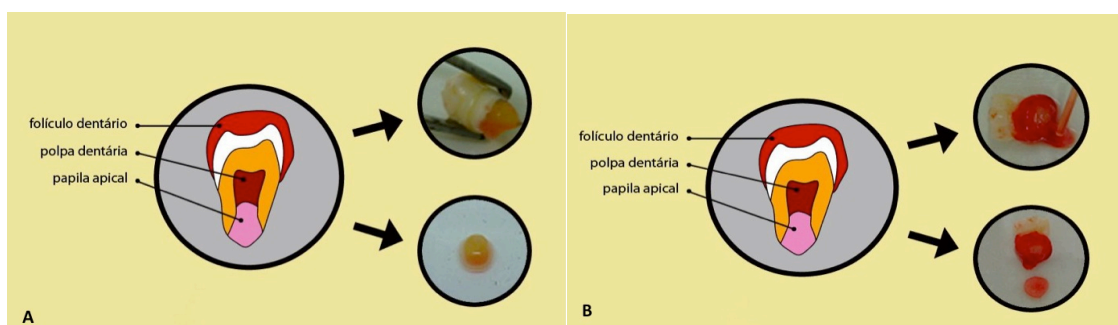


Figura 4.1 - Ilustração da técnica de obtenção dos tecidos dentais. Painel A - Separação da polpa dental e Painel B - Separação da papila dentária.

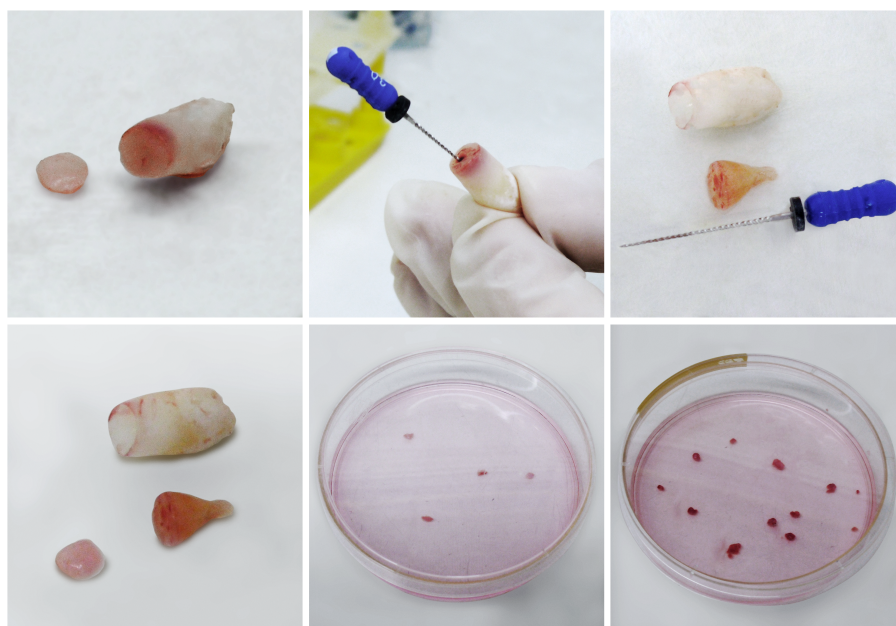


Figura 4.2 - Obtenção dos tecidos dentais (papila apical e polpa). Em seguida, foi realizada a técnica de explante para o início da cultura celular.

4.2 ISOLAMENTO DE POPULAÇÕES ENRIQUECIDAS EM CÉLULAS TRONCO PELA TÉCNICA DE MACS (MAGNETIC-ACTIVATED CELL SORTING)

As células foram expandidas até atingirem o marco 1×10^7 quando, então, foram isoladas através do uso de magneto (MACS R, Miltenyi Biotec), de acordo com especificações do fabricante. O protocolo da seleção positiva consiste em realizar a marcação da fração das células com anticorpos conjugados a microesferas magnéticas. Assim, cada linhagem da polpa e papila foram separadas com seguintes marcadores: STRO-1, CD 90 e CD 146.

Para cada um dos anticorpos supracitados, primeiramente foi preparada uma solução homogênea de células em suspensão. Para formar uma solução de células isoladas, estas passaram por um filtro de *nylon* com 70 μm de poro (BD Falcon™, ref. 352350), a fim de prevenir a obstrução da coluna.

A quantidade de 10^7 células foi transferida para tubo Falcon de 15 ml, centrifugado a 1500 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi aspirado e, posteriormente, as células foram ressuspensas em 80 μl em solução tampão, 10 μl de bloqueador com 10 μl do anticorpo e incubadas durante uma hora. Após esse tempo, a solução contendo células e reagentes foi homogeneizada sob refrigeração durante 10 minutos e, posteriormente, centrifugada a 1500 rpm por 10 minutos.

O sobrenadante foi aspirado e as células foram ressuspensas em 500 μl de solução tampão ao qual foi adicionados 10 μl de bloqueador e 20 μl de anticorpo secundário associado a *microbeads* de isolamento. A solução contendo as células foi passada através de coluna magnética, já montada no separador.

Tanto as células negativas (grupo controle) para os anticorpos primários quanto as positivas dos grupos experimentais (STRO-1+ ou CD90+ ou CD146+) foram coletadas para os experimentos subsequentes.

Todas as populações foram utilizadas nos experimentos subsequentes e estes foram realizados em triplicata até a passagem 4.

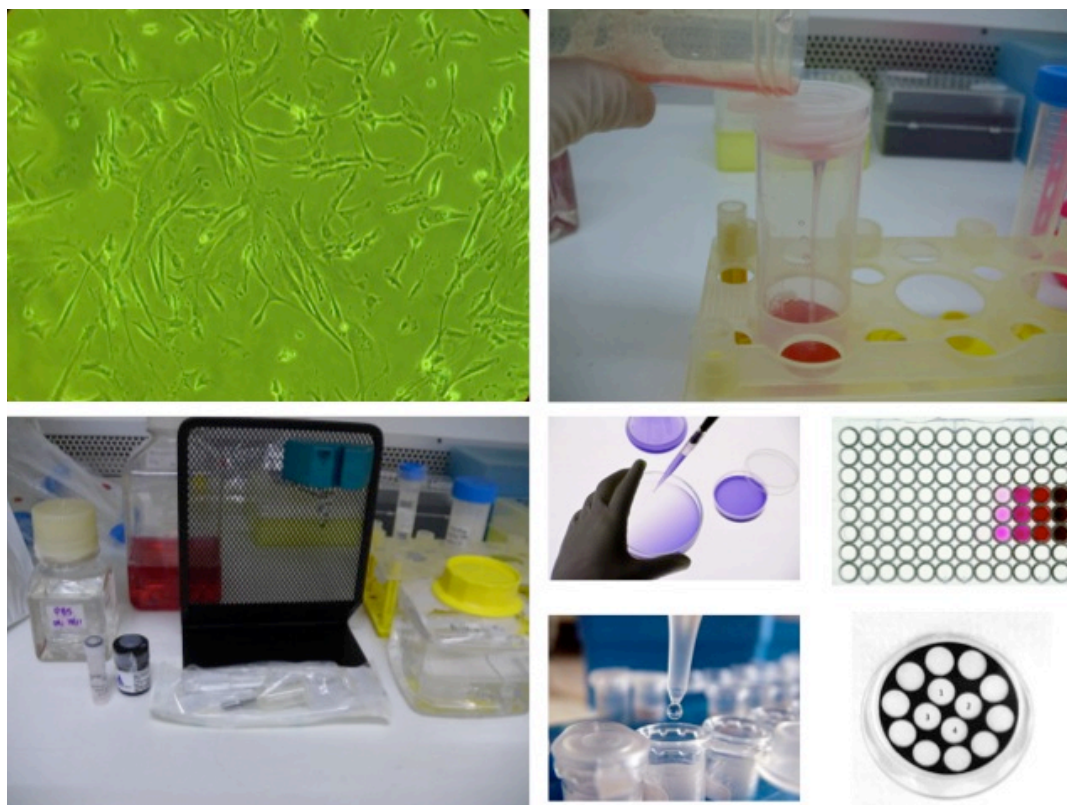


Figura 4.3 - Após a confluência, as células foram separadas por magnetos usando 3 marcadores: STRO-1; CD 90 e CD 146 e plaqueadas para os estudos posteriores.

4.3 TESTE DE CRESCIMENTO CELULAR

1×10^4 células/ml foram plaqueadas em placas de 12 poços e após 3, 6, 9 e 12 dias as mesmas foram removidas de 3 poços a cada vez (experimento em triplicata) por meio da ação do reagente TrypLE™ (Gibco, #12563) e contadas com câmara de Neubauer. Os dados foram tabulados e a média do número de células e o desvio padrão foram calculados.

Todos os experimentos de crescimento foram realizados em triplicata. Os resultados das contagens foram arquivados, a média foi calculada e um gráfico comparado as várias populações foi construído.

4.4 ENSAIO DE EFICIÊNCIA DE FORMAÇÃO DE COLÔNIAS (COLONY FORMING UNITS)

Para a análise da capacidade de formação de colônias, 10^4 células foram plaqueadas em placas de Petri de 10 cm^2 de diâmetro. A troca do meio era realizada a cada 2 dias. Após um período de 8 dias, as mesmas foram fixadas com metanol a 4°C e coradas em solução de azul de toluidina a 0,5%, por 5 minutos, posteriormente as colônias formadas foram contadas. Foram consideradas colônias, agregados celulares contendo mais de 50 células. As células foram fotografadas em aumento de 10 vezes e as placas, escaneadas para análise morfológica.

4.5 ESTUDO DAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

Para este estudo foi utilizado uma placa de cultivo celular contendo fundo opaco com aberturas para luz (Figura 4.4). Esse fundo contém esferas vazadas de 6mm cada uma. Nessa placa foram plaqueadas as células positivas e negativas para cada um dos marcadores acima citados de forma que somente a área estabelecida pelas esferas vazadas podia ser fotografada. Foram utilizadas as 4 esferas centrais para as fotografias. Assim, todas as placas foram fotografadas nas mesmas regiões e as aberturas para a luz tinham a mesma dimensão. As características da tomada fotográfica como distância do foco e intensidade de luz, tempo de exposição e ganho foram padronizadas e controladas. Todas as fotografias foram obtidas em aumento de 10x.

A análise morfológica, foi realizada de duas formas:

- a) Análise de tamanho celular e nuclear
- b) Análise de formato celular

A análise do tamanho celular foi realizada através da ferramenta de medição de área (área irregular) do programa image J. Com essa ferramenta foram desenhados os núcleos e os formatos externos das células. As áreas foram medidas e os dados tabulados.

A análise do formato celular foi realizada utilizando a ferramenta para medir distâncias. Foram medidas a maior e a menor distância entre os lados visíveis da membrana celular.

É importante salientar que essas análises foram realizadas nos grupos acima especificados 24 horas após a separação celular.

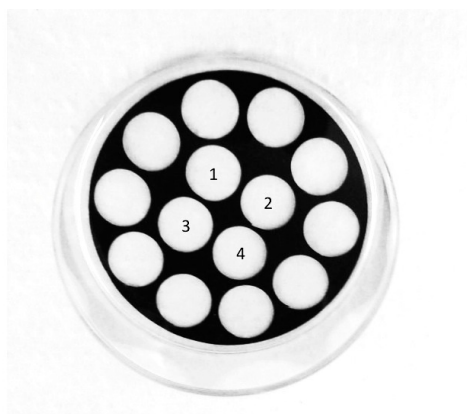


Figura 4.4 - Fotografia da placa Nunc utilizada nos ensaios do estudo morfológico. As áreas marcadas (1, 2, 3 e 4) foram utilizadas para as análises.

4.6 ANÁLISE POR RADIAÇÃO SÍNCROTRON

Após a separação celular, 1×10^7 foram ressuspensas em meio de cultura. Em seguida, as células foram centrifugadas a 1500rpm por 5 minutos à temperatura ambiente. Foi retirado o sobrenadante e as amostras foram então fixadas em solução de paraformaldeído a 4% preparada com solução PBS (pH 7.4) durante 15 minutos na geladeira. Após esse tempo, o material foi centrifugado novamente e ressuspensado em água milliq e mantidos a 4°C até à análise (Figura 4.5).

Para as medições, 10 ul das amostras foram cuidadosamente colocadas em filme ultralene (transparente ao raio X) e deixado em capela com fluxo contínuo para o material secar. Após a secagem, foi adicionado mais 10 ul a fim de formar uma segunda camada. Esse procedimento foi repetido 3 vezes e em seguida foi levado para o microscópio.

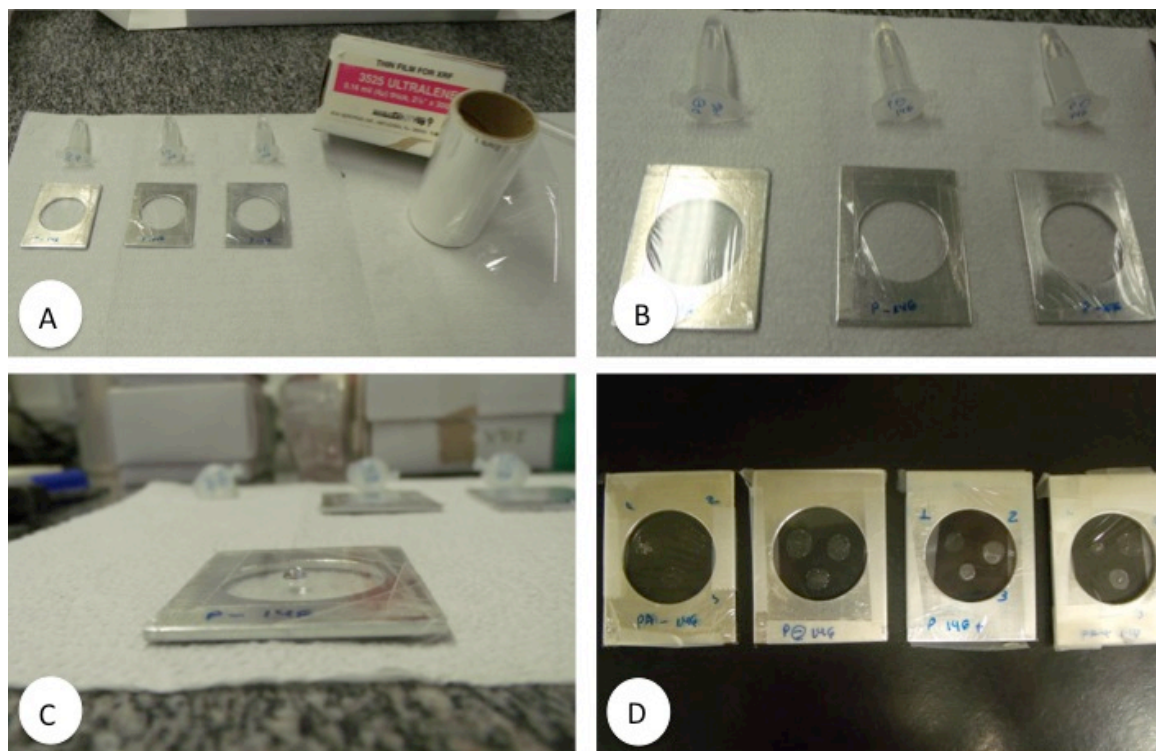


Figura 4.5 - Preparação das amostras para análise de microfluorescência. Em A temos os materiais necessários para preparar as amostras. Em B o aspecto final do filme ultralene arrumados no porta amostra. Em C colocação das células no ultralene (c). Aspecto final para medição das amostras (d).

As análises por Fluorescência de Raios-X (FRX) foram realizadas no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) localizado no campus do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), na cidade de Campinas-SP. mantido pelo Ministério da Ciência e Tecnologia.

A radiação policromática emitida pelo dipolo magnético do anel foi condensada por um fino monocapilar cônico até uma área de 20 microns de diâmetro. Uma área típica de 200 x 200 mm² foi irradiado com 150 segundos de tempo de medida por ponto.

A Fluorescência de raios-X emitida pelos os elementos presentes foi coletada com detector de Si(Li) (resolução de 165 eV a 5.9 keV) colocado a 90° do feixe incidente e perto da amostra.

Todos os espectros obtidos foram processados com programas específicos de análise quantitativa de espectros de XRF. A correlação espacial entre os elementos foi realizada utilizando o programa de análise de espectro XRF PyMca (Solé 2007).

Radiação detectada por área analisada

Elementos contidos nas células-tronco da papila dental e polpa dental foram relacionados após serem submetidos a radiação. Resumidamente, as matrizes numéricas foram analisadas pelo conteúdo elementar total por área irradiada, gerando um valor médio que pode ser utilizado para comparar as células das diferentes amostras. Gráficos de barras foram gerados e o teste T pareado e foi aplicado para esses valores (Software Prisma).

5 RESULTADOS

A proposta deste trabalho foi analisar as características das células tronco obtidas da polpa e papila apical de dentes humanos de um mesmo doador. Essas células foram obtidas de dentes terceiros molares de indivíduos jovens e saudáveis que tinham indicação para extração dos mesmos totalizando 16 doadores. A obtenção das células foi realizada a partir da técnica de explante como ilustra na figura abaixo.

As primeiras células iniciaram sua saída do explante por volta do quarto dia de cultivo para polpa e quinto para papila apical. Morfologicamente essas células se assemelhavam a fibroblastos, ou seja, eram alongadas e fusiformes (figura 5.1).

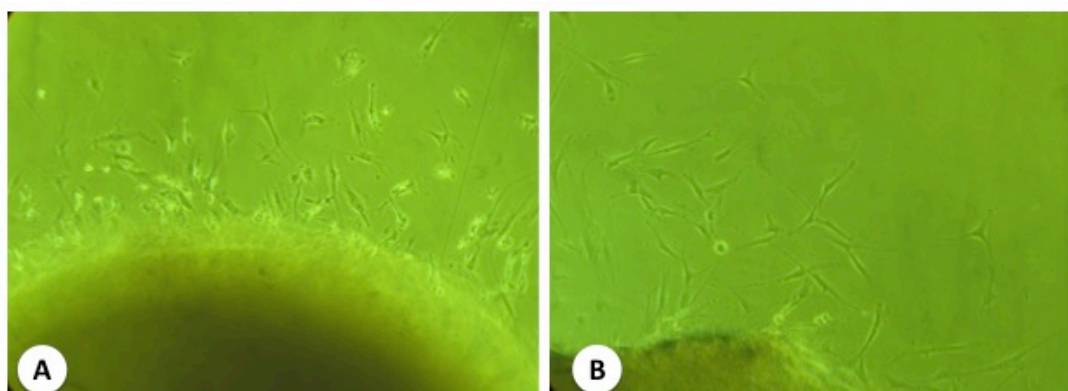


Figura 5.1 - Início da saída das células dos tecidos *in vitro*. Em A, células da polpa dentária e em B células da papila apical.

5.1 ENSAIOS FUNCIONAIS

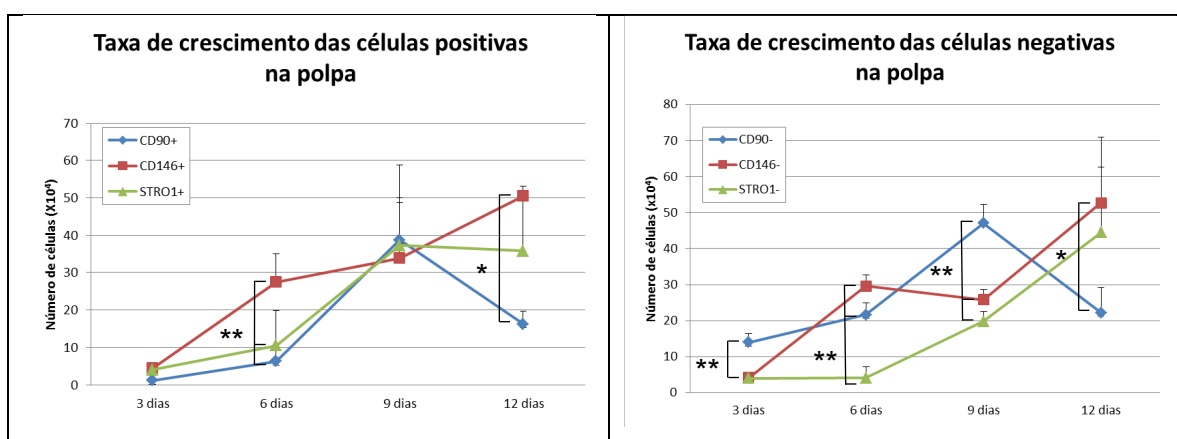
Apesar de amplamente empregado, o critério de identificação das células-tronco por seus marcadores de superfície não é considerado definitivo. A população de células foi muito heterogênea, portanto, ensaios funcionais são muito úteis na investigação a presença e frequência de células-tronco em uma amostra. Os resultados desses ensaios estão descritos a seguir.

5.2 CRESCIMENTO CELULAR

As células tronco tiveram capacidade de proliferar extensivamente. Neste sentido, a realização e delineamento dos ensaio de crescimento celular é foi muito importante. Os resultados encontrados então descritos abaixo.

5.2.1 Polpa

A figura 5.2 mostra a curva de crescimento para as células da polpa, considerando-se isoladamente as células enriquecidas (positivas) e não enriquecidas (negativas) para cada marcador. Nota-se que as células enriquecidas do marcador CD146 (CD146+) exibiram maior taxa de crescimento após 6 dias de cultivo, a qual foi estatisticamente diferente da taxa de crescimento das células CD90+ e STRO1+. Essa relação manteve-se após 12 dias, contudo as diferenças foram significativas apenas em relação às células CD90+ nesse período. Considerando agora as células negativas, observa-se que as populações não enriquecidas de CD90 (CD90-) exibiram crescimento significativamente maior em relação às CD146- e STRO1- após 3 dias de cultivo, relação que se manteve após 9 dias. Após 12 dias, contudo, essa relação inverteu-se; as células CD90- nesse período exibiram crescimento significativamente menor do que as CD146-.



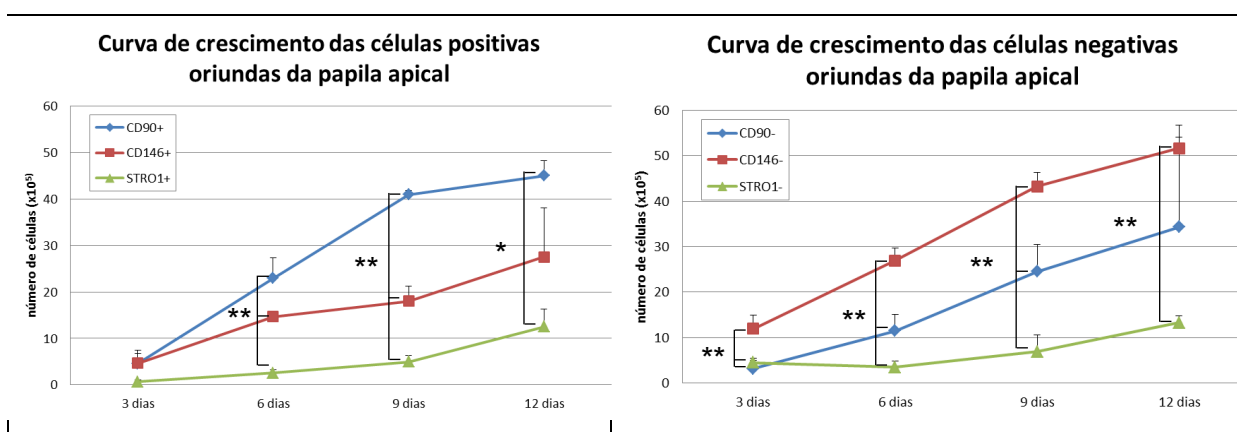
Teste de ANOVA e de Tukey. As barras verticais indicam o desvio-padrão obtido do teste em triplicata. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$.

Figura 5.2 – Média do número de células da polpa, positivas e negativas, para os marcadores analisados.

Na comparação entre as células positivas e negativas para cada marcador, as células CD90+ exibiram uma taxa de crescimento significativamente menor em relação às CD90- em 3 e 6 dias de cultivo. Para os marcadores CD146 e STRO1, não houve diferenças estatisticamente significativas comparando-se as células positivas e negativas.

5.2.2 Papila Apical

A figura 5.3 mostra a curva de crescimento para as células da papila apical, considerando-se isoladamente as células enriquecidas e não enriquecidas para cada marcador. Nota-se que as células CD90+ exibiram maior taxa de crescimento a partir de 6 dias, a qual foi significativamente maior do que as CD146+ e STRO1+ até o período de 9 dias. No período de 12 dias, as células CD90+ exibiram crescimento significativamente maior do que as células STRO1+, mas não em relação às células CD146+. Considerando agora as células negativas, as células CD146- exibiram maior crescimento, o qual foi significativamente maior em relação às CD90- e STRO1- nos períodos de 3, 6 e 9 dias. Em 12 dias, foi maior somente em relação às células STRO1-.



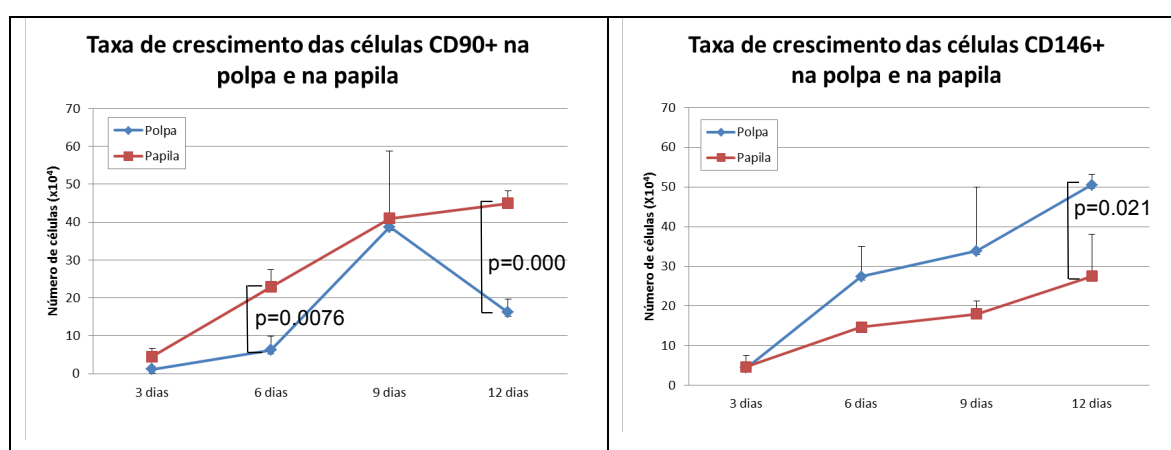
Teste de ANOVA e de Tukey. As barras verticais indicam o desvio-padrão obtido do teste em triplicata. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$.

Figura 5.3 – Média do número de células da papila apical, positivas e negativas, para os marcadores analisados.

Na comparação das células positivas e negativas entre si, as células CD90+ cresceram significativamente mais do que as CD90- nos períodos de 6 e 9 dias ($p < 0,05$). Já as células CD146+ exibiram crescimento significativamente menor do que as células CD146- nos períodos de 3 a 9 dias ($p < 0,01$). Por fim, as células STRO1+ exibiram crescimento significativamente menor do que as STRO1- no período de 3 dias; nos demais períodos não houve diferenças entre as duas populações celulares. Em 12 dias, também não houve diferenças comparando-se as células enriquecidas ou não para o mesmo marcador.

5.2.3 Polpa versus Papila Apical

A figura 5.4 exibe a curva de crescimento para as populações celulares enriquecidas com os marcadores analisados, comparando-se agora o crescimento na polpa e na papila apical de forma conjunta para cada marcador. Nota-se que as células CD90+ da papila exibem uma taxa de crescimento maior do que as da polpa, com diferenças significativas nos períodos de 6 e 12 dias. Já as células CD146+ da polpa exibem maior taxa de crescimento do que as da papila, mas com diferenças significativas apenas no período de 12 dias. Por fim, as células STRO1+ da polpa exibem maior crescimento do que as da papila, com diferenças significativas nos períodos de 3 e 9 dias.



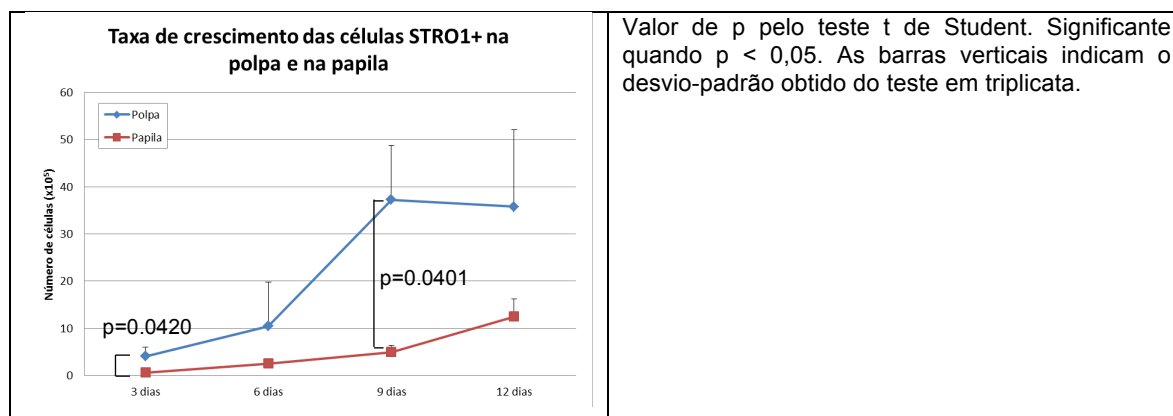


Figura 5.4 – Média do número de células enriquecidas dos marcadores analisados, comparando-se o crescimento na polpa e na papila apical.

Esses resultados mostraram que as células CD 90+ da papila apical exibiram um maior crescimento quanto comparadas com as células da polpa com mesmo marcador. O inverso foi observado com marcador + STRO-1 onde a polpa dentária apresentou um crescimento maior às células positivas da papila apical. Já o CD 146+ não apresentou diferenças estatísticas da polpa com a papila apical.

5.2.4 Ensaio de eficiência de formação de colônias (CFU - Colony Forming Units)

Nesse ensaio, foi possível verificar a habilidade de formação de colônias nos dois tecidos com os diferentes marcadores nas populações enriquecidas e não enriquecidas. Os resultados estão ilustrados na figura 5.5. É importante salientar que o número de células plaqueadas no início do experimento era o mesmo para todas as populações, tanto positivas quanto negativas independentemente do marcador usado para a separação.

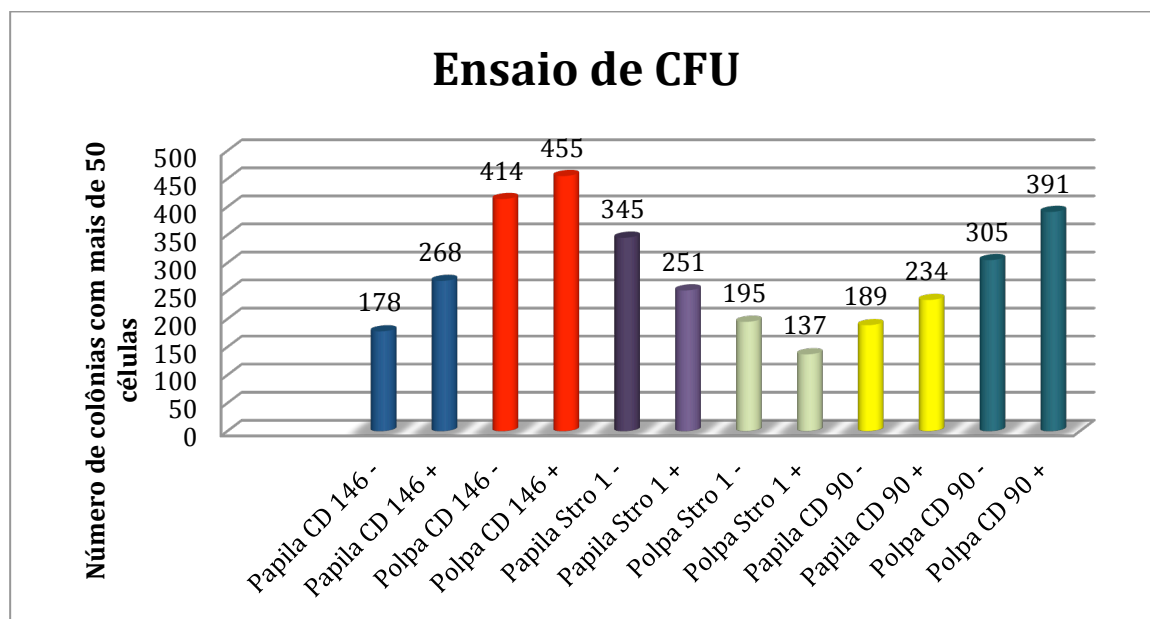


Figura 5.5 – Número de unidades formadoras de colônias a partir dos tecidos isolados com os diferentes marcadores utilizados.

A habilidade de células individuais de gerar colônias dentro de culturas células quando plaqueadas em baixa densidade, reflete diretamente seu potencial clonogênico.

As análises clonais mostraram que de um modo geral, as populações CD146 (positiva e negativa) da polpa apresentou maior eficiência na formação de colônias e a população STRO-1 positiva de polpa apresentou a menor eficiência na formação de colônias.

Quando comparamos polpa e papila, pode-se verificar que a eficiência de formação de colônias é maior na polpa do que na papila para as populações CD146 e CD90, mas para a população STRO-1, as células da papila apical, formam mais colônias do que as células da polpa.

Ademais, o comportamento das populações positivas e negativas CD146 e CD90 quando comparadas entre si mostra o mesmo padrão, de forma que as populações negativas, tanto de polpa quanto de papila, formam menos colônias que as populações positivas. Novamente, as populações separadas por STRO-1 mostram comportamento oposto, sendo que, tanto para polpa quanto para papila, as populações negativas foram mais colônias que as positivas.

As figuras 5.6 e 5.7 ilustram as formações de colônias nos tecidos e de acordo com o marcadores utilizados.

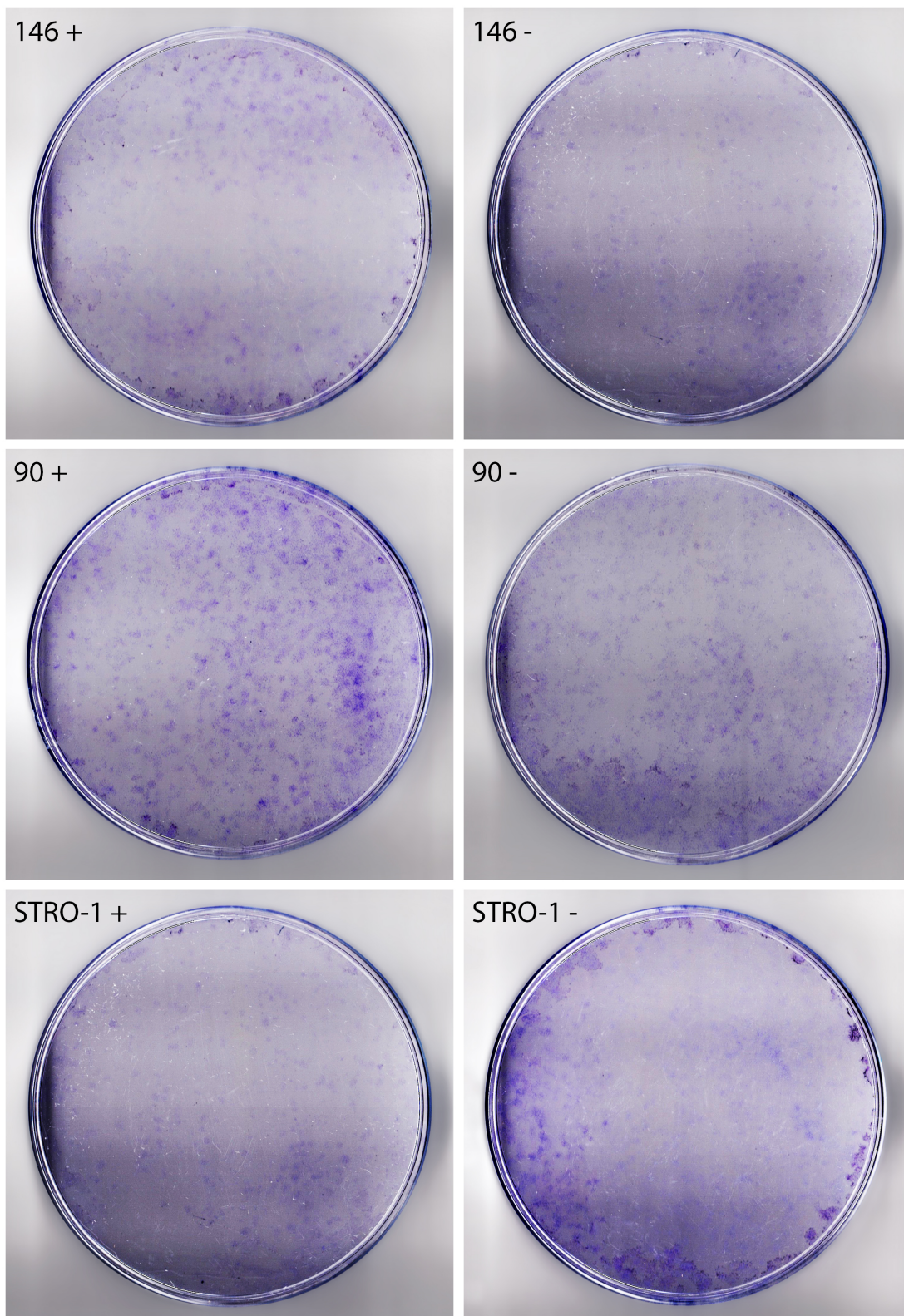


Figura 5.6 - Ilustração da habilidade de formação de colônias da papila apical de acordo com cada marcador.

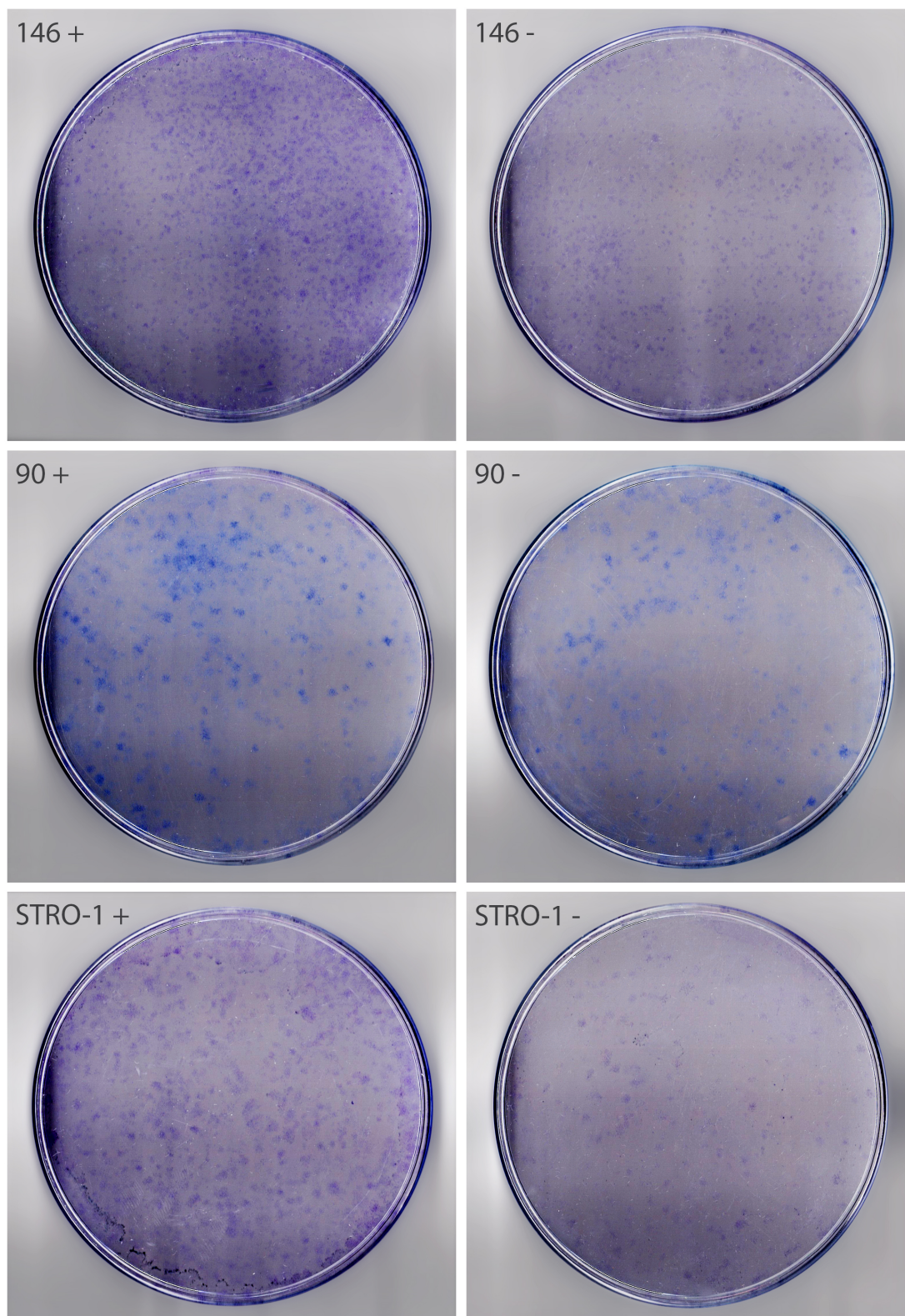


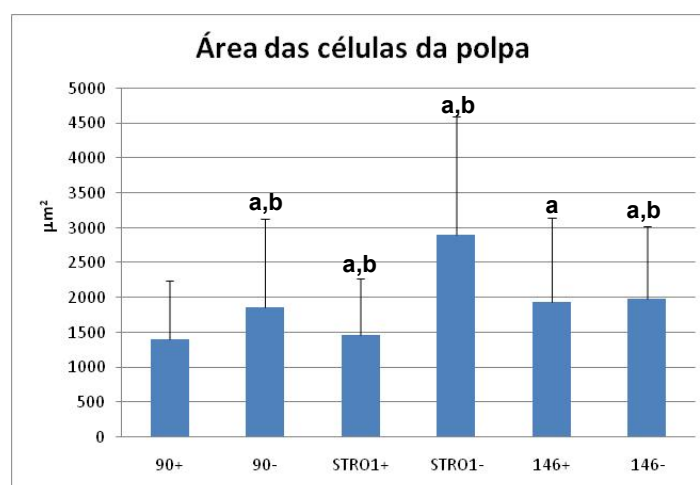
Figura 5.7 - Ilustração da habilidade de formação de colônias da polpa dentária de acordo com cada marcador.

5.3 ANÁLISE MORFOMÉTRICA CELULAR

Esse tipo de análise é realizado principalmente na patologia com objetivo de detectar algum tipo de doença, bem como se apresenta com características malignas ou benignas. A metodologia realizada nesse trabalho se mostrou uma ferramenta útil e de baixo custo e importante na caracterização morfológica das células enriquecidas com as não enriquecidas. As ilustrações dos tipos celulares são vistos nas figuras 5.17 e 5.18 .

5.3.1 Polpa

A figura 5.8 exibe a média da área das células da polpa. As células que exibiram a menor área foram as enriquecidas do marcador CD90 (CD90+), diferindo estatisticamente das CD146+ e das STRO1+. Comparando as células enriquecidas do marcador com as não enriquecidas (positivas *versus* negativas) em geral as populações enriquecidas exibiram área menor, havendo diferenças significativas entre as células CD90+ e CD90-; e entre STRO1+ e STRO1-. As células CD146+ e CD146- exibiram área bem semelhante.



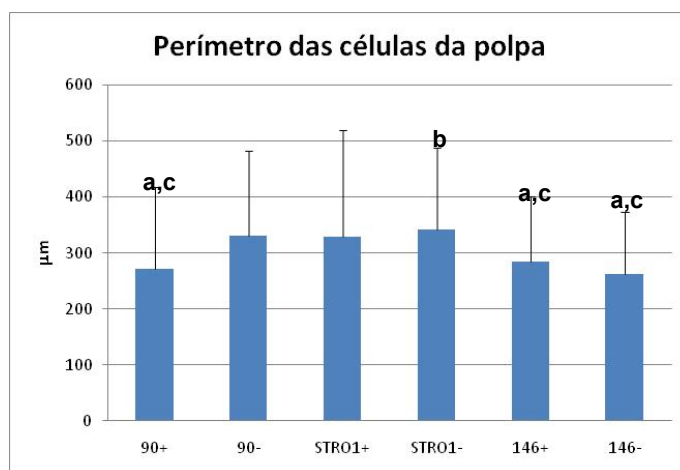
Teste de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Significante quando $p < 0.05$. As barras verticais indicam o desvio-padrão.

a = estatisticamente diferente em relação a CD90+.

b = estatisticamente diferente em relação a STRO1-.

Figura 5.8 - Média da área (μm^2) das células da polpa.

A figura 5.9 mostra a média do perímetro das células da polpa. Nota-se que as células CD90+ exibiram perímetro significativamente menor do que as células CD90-. Com exceção do CD90, na comparação entre os demais marcadores, não houve diferenças significativas entre os perímetros celulares.



Teste de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Significante quando $p < 0,05$. As barras verticais indicam o desvio-padrão.

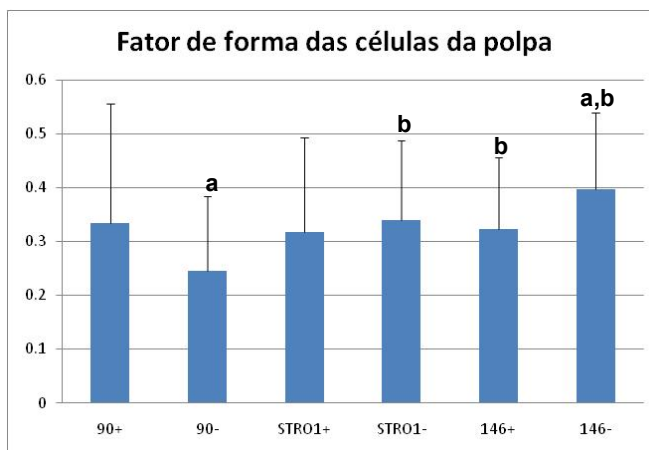
a = estatisticamente diferente em relação a CD90-.

b = estatisticamente diferente em relação a CD90+.

c = estatisticamente diferente em relação a STRO1-.

Figura 5.9 - Média do perímetro (μm) das células da polpa.

A figura 5.10 mostra a média do fator de forma das células da polpa. O fator de forma é um índice de circularidade que relaciona a área com o perímetro. Em geral, todas as células tenderam a exibir um formato mais irregular, distante do formato esférico ou circular, cujo índice seria próximo de 1. Dentre as células enriquecidas para os marcadores analisados, as células CD90+ exibiram formato menos irregular que as demais, sendo estatisticamente diferente das células CD90- e CD146-. As células CD90- foram as com formato mais irregular, com diferenças significativas em relação às células STRO1-, CD146+ e CD146-.



Teste de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Significante quando $p < 0,05$. As barras verticais indicam o desvio-padrão.

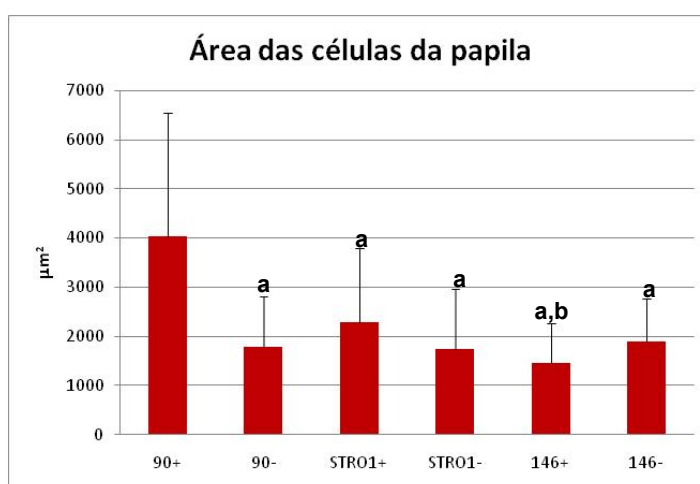
a = estatisticamente diferente em relação a CD90+.

b = estatisticamente diferente em relação a CD90-.

Figura 5.10 - Média do fator de forma para as células da polpa.

5.3.2 Papila Apical

A figura 5.11 mostra a média da área das células da papila. Observa-se que as células enriquecidas de CD90 (CD90+) exibiram a maior área, a qual foi estatisticamente diferente em relação às demais células enriquecidas ou não dos demais marcadores. Destaca-se também que as células STRO1+ exibiram área significativamente maior do que as células CD146+.



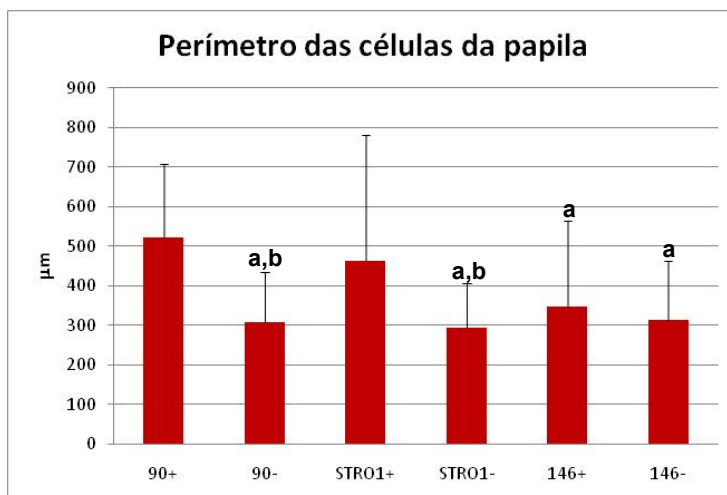
Teste de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Significante quando $p < 0,05$. As barras verticais indicam o desvio-padrão.

a = estatisticamente diferente em relação a CD90+.

b = estatisticamente diferente em relação a STRO1+.

Figura 5.11 - Média da área (μm^2) das células da papila apical.

A figura 5.12 ilustra a média do perímetro das células da papila apical. As células CD90+ exibiram o maior perímetro, o qual foi estatisticamente diferente em relação às células CD90- e às demais células, com exceção das STRO1+. As células STRO1+ exibiram, por sua vez, perímetro significativamente maior do que as células STRO1- e CD90-. Entre as células CD146+ e CD146- não houve diferenças significativas.



Teste de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Significante quando $p < 0,05$. As barras verticais indicam o desvio-padrão.

a = estatisticamente diferente em relação a CD90+.

b = estatisticamente diferente em relação a STRO1+.

Figura 5.12 - Média do perímetro (mm) das células da papila apical.

A figura 5.13 mostra a média do fator de forma para as células da papila apical. Em geral, as células tenderam a exibir formato mais irregular, distante do formato esférico. As células CD90+ exibiram o menor fator de forma, ou seja, formato mais irregular, o qual diferiu estatisticamente das células CD90-, CD146+ e CD146-. Na comparação entre os demais marcadores, não houve diferenças significativas.

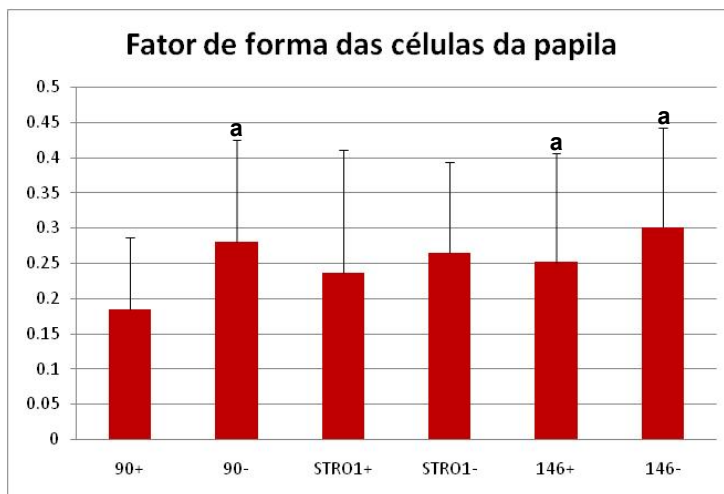
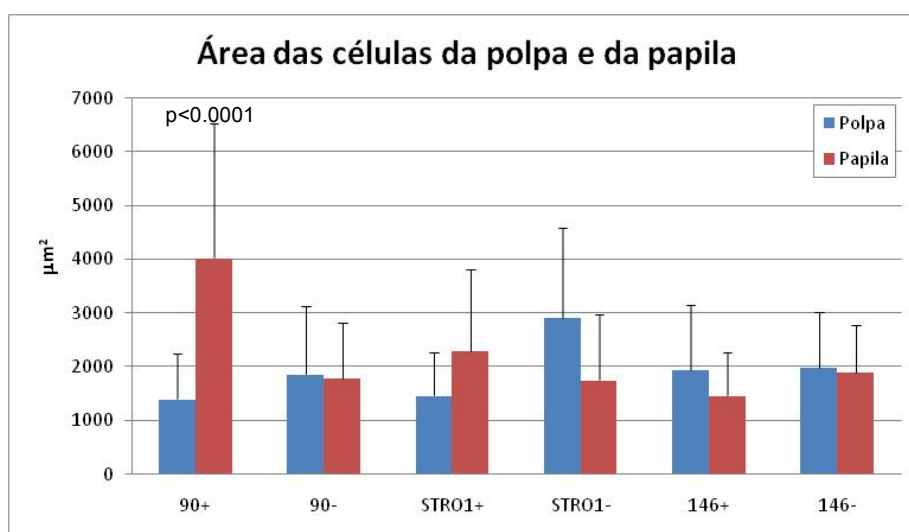


Figura 5.13 - Média do fator de forma para as células da papila apical.

5.4 POLPA *VERSUS* PAPILA

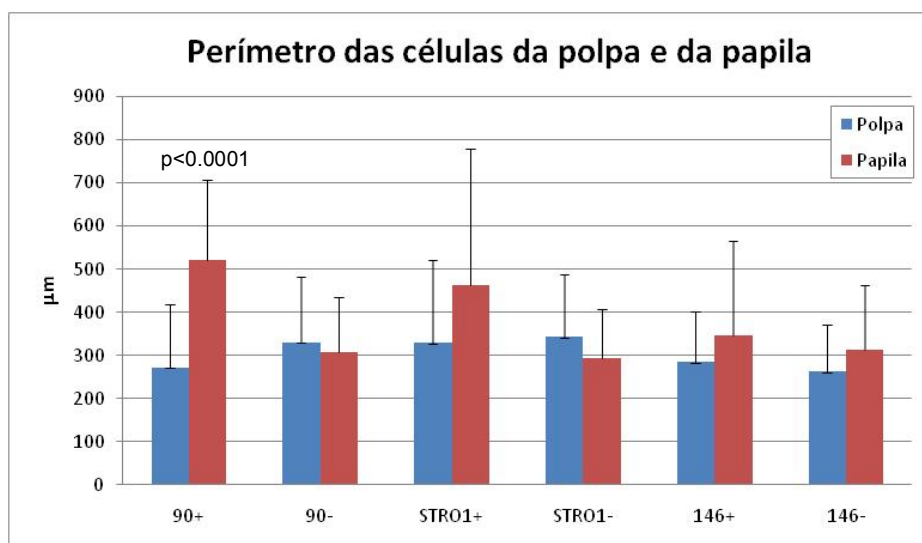
A figura 5.14 exibe a média da área das células da polpa e da papila. Nota-se que as células CD90+ e STRO1+ da papila exibiram área maior do que as células da polpa enriquecidas dos mesmos marcadores. Essa diferença foi estatisticamente significativa somente para as células CD90+. Já a área das células CD146+ da polpa foi ligeiramente maior do que a das CD146+ da papila dentária, porém essa diferença não foi significativa.



Teste de Mann-Whitney. Significante quando $p < 0,05$. As barras verticais indicam o desvio-padrão.

Figura 5.14 - Média da área (μm^2) das células da polpa e da papila dentária.

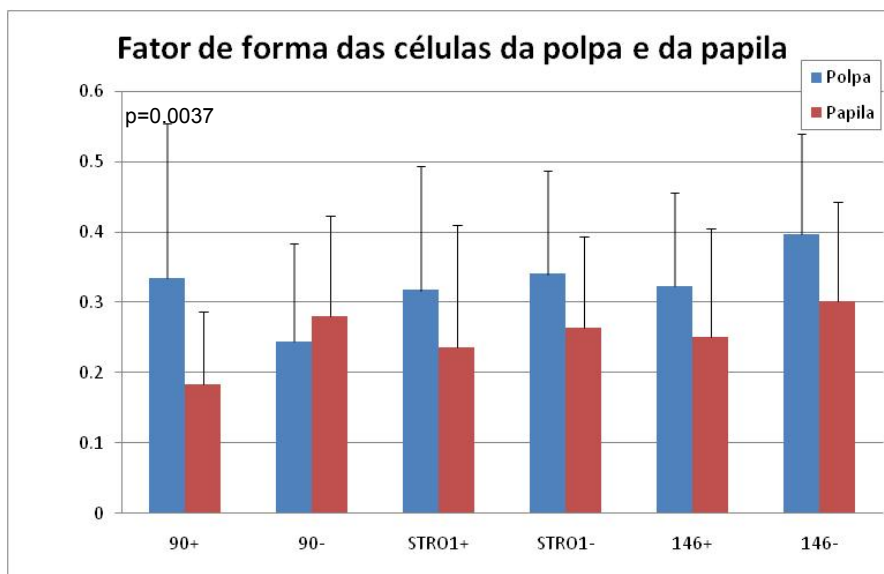
A figura 5.15 exibe a média do perímetro das células da polpa e da papila dentária. Tal qual foi observado para a área, para o perímetro também as células CD90+ da papila exibiram maior perímetro do que as CD90+ da polpa, e essa diferença foi significativa. As células CD146+ e STRO1+ da papila também exibiram perímetro maior do que as da polpa, mas as diferenças não foram significativas.



Teste de Mann-Whitney. Significante quando $p < 0,05$. As barras verticais indicam o desvio-padrão.

Figura 5.15 - Média do perímetro (μm) das células da polpa e da papila dentária.

A figura 5.16 exibe a média do fator de forma para as células da polpa e da papila. Nota-se que as células positivas da polpa para todos os marcadores exibe formato menos irregular do que as células positivas oriundas da papila dentária. Houve diferenças significativas apenas para as células CD90+, comparando a polpa com a papila.



Teste de Mann-Whitney. Significante quando $p < 0,05$. As barras verticais indicam o desvio-padrão.

Figura 5.16 - Média do fator de forma para as células da polpa e da papila dentária

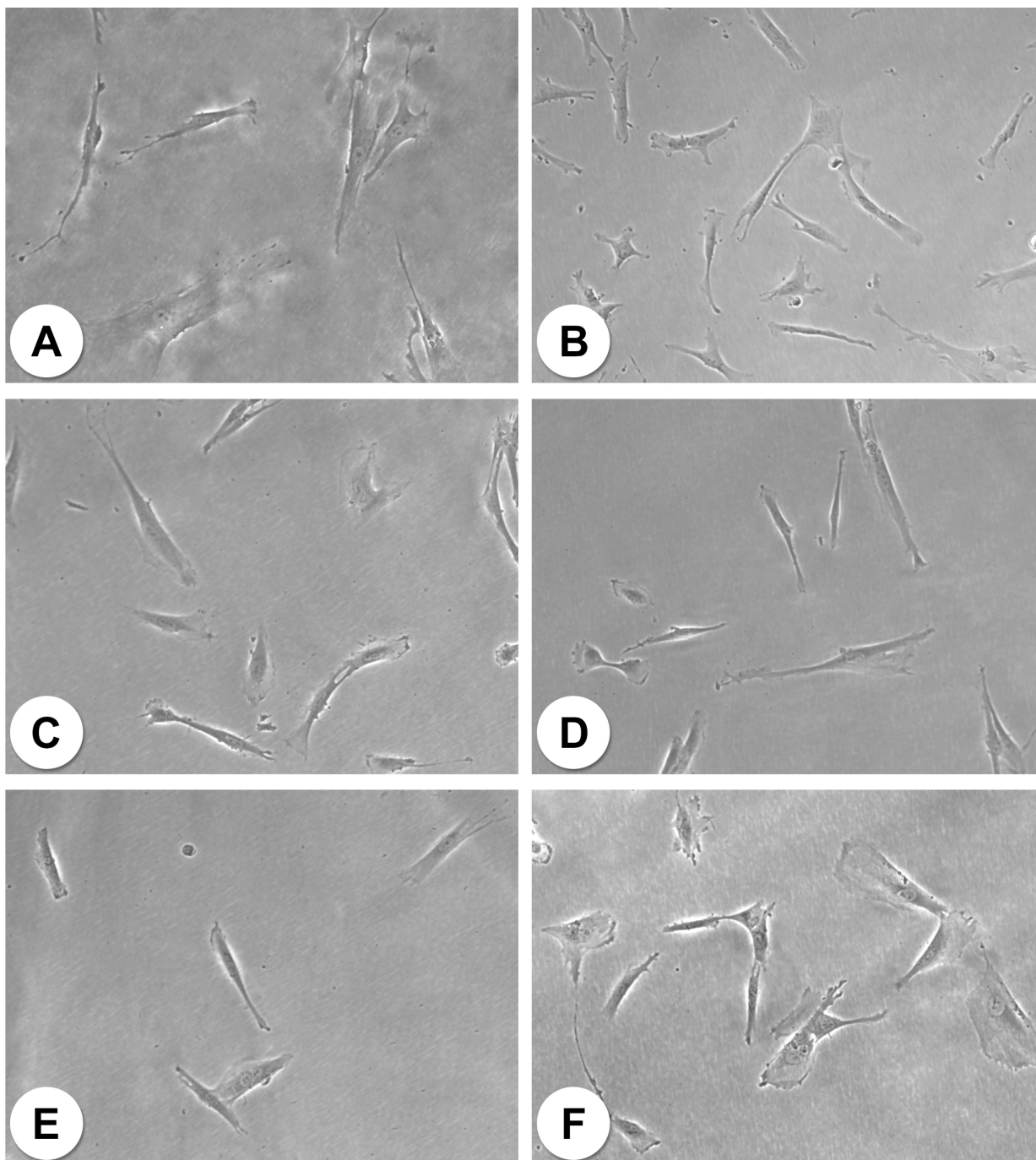


Figura 5.17 - Imagens ilustrativas das morfologias encontradas na polpa dentária. Em A e B - marcador CD 90 sendo A positivo e B negativo; C e D marcador CD 146 sendo C positivo e D negativo; E e F marcador STRO-1 sendo E positivo e F negativo.

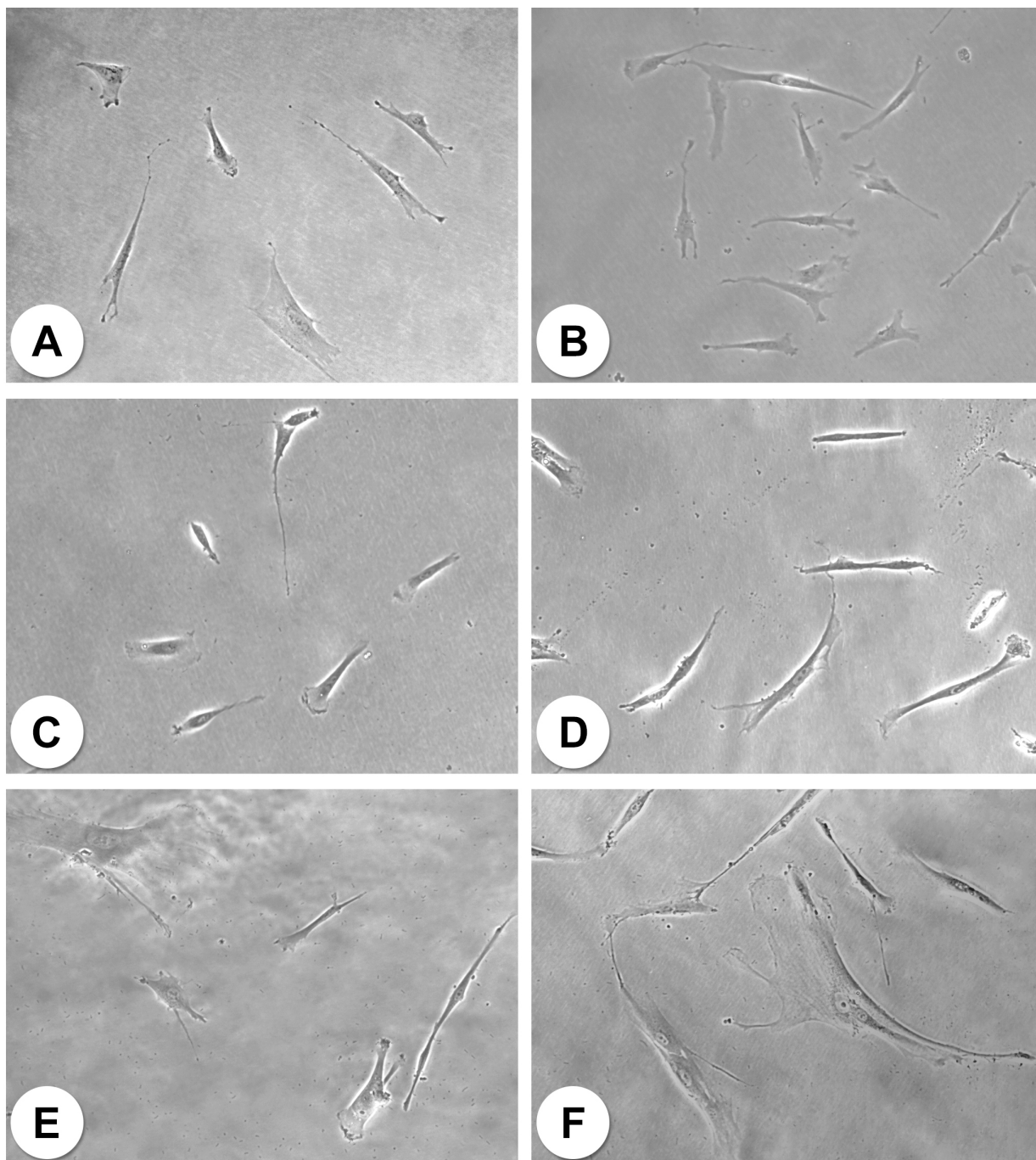


Figura 5.18 - Imagens ilustrativas das morfologias encontradas na papila dentária. Em A e B - marcador CD 90 sendo A positivo e B negativo; C e D marcador CD 146 sendo C positivo e D negativo; E e F marcador STRO-1 sendo E positivo e F negativo.

5.5 ANÁLISE POR MICROFLUORESCÊNCIA DE RAIOS X

As medidas de microfluorescência de raios X foram realizadas na linha XRF do laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS). Esta linha analisa a composição química multielementar.

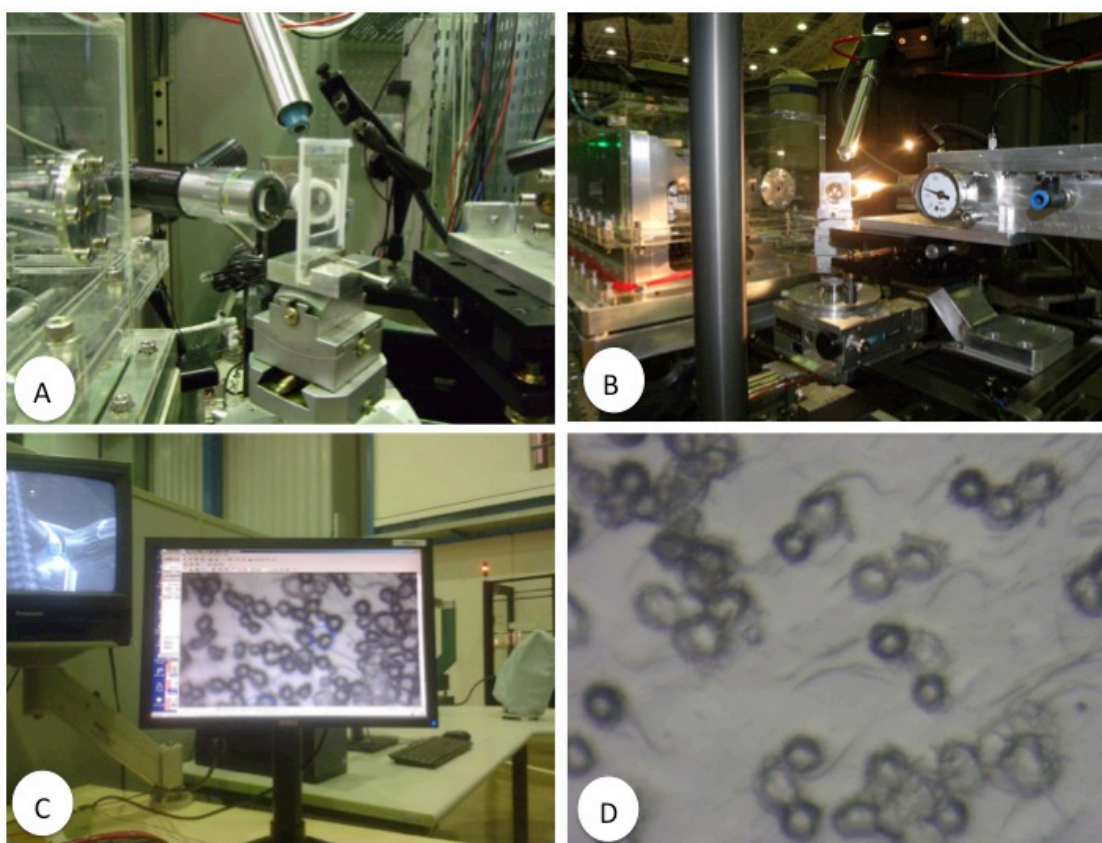


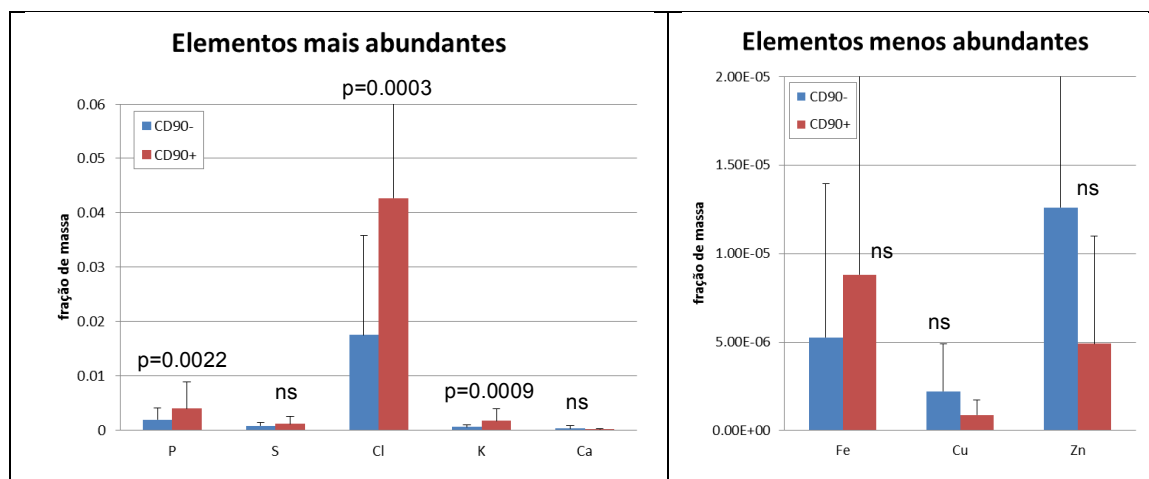
Figura 5.19 - Amostras no microscópio (a;b). Visualização da região (c). Local onde foi injetada a radiação (d).

5.6 QUANTIFICAÇÃO DOS ELEMENTOS QUÍMICOS PREDOMINANTES NAS DIFERENTES POPULAÇÕES CELULARES

Os micros e macros elementos são nutrientes essenciais para funcionamento e do metabolismo celular. O objetivo aqui foi saber se há influência da composição iônica nas células enriquecidas e não enriquecidas de acordo com cada marcadores.

5.6.1 CD90

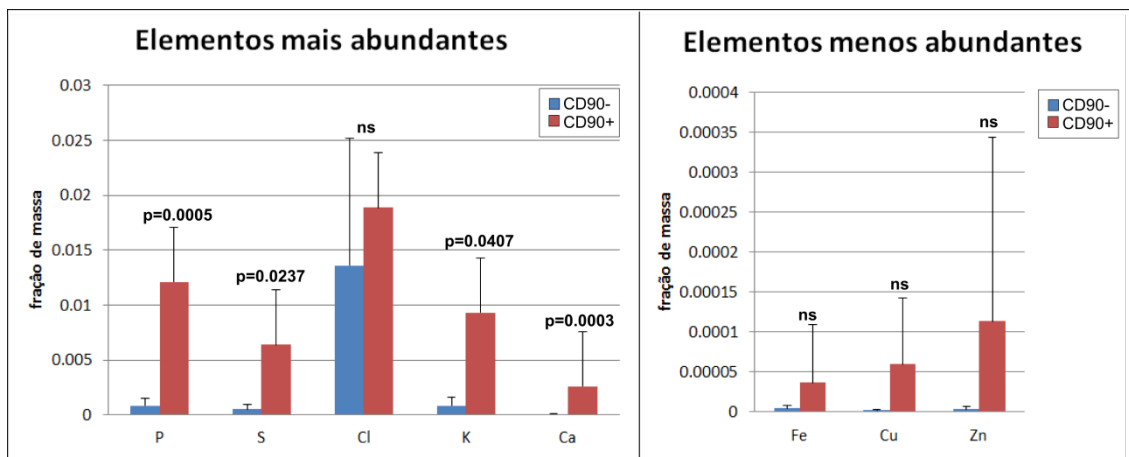
A figura 5.20 mostra a fração de massa média dos elementos químicos mais abundantes e menos abundantes nas populações celulares da polpa dentária exibindo ou não o marcador CD90. Observa-se que as células enriquecidas de CD90 (CD90+) exibiram significativamente maior quantidade de P, Cl, K do que as células nãoenriquecidas de CD90 (CD90-). Na análise dos elementos menos abundantes, não houve diferenças significativas entre as células CD90+ e CD90-.



Valor de p pelo teste de Mann-Whitney. ns = não significante. As barras verticais indicam o desvio-padrão.

Figura 5.20 – Fração de massa média dos elementos mais abundantes e menos abundantes presentes nas células da polpa quando analisado o marcador CD90.

A figura 5.21 ilustra a fração de massa média das células da papila dentária enriquecidas ou não do marcador CD90. Tal qual na polpa, na papila também as células enriquecidas com CD90 (CD90+) exibiram significativamente maior quantidade de P e K do que as células não enriquecidas desse marcador (CD90-). As células CD90+ exibiram também maior quantidade de S e Ca do que as CD90-. Não houve diferenças entre as duas populações celulares em relação aos elementos menos abundantes.

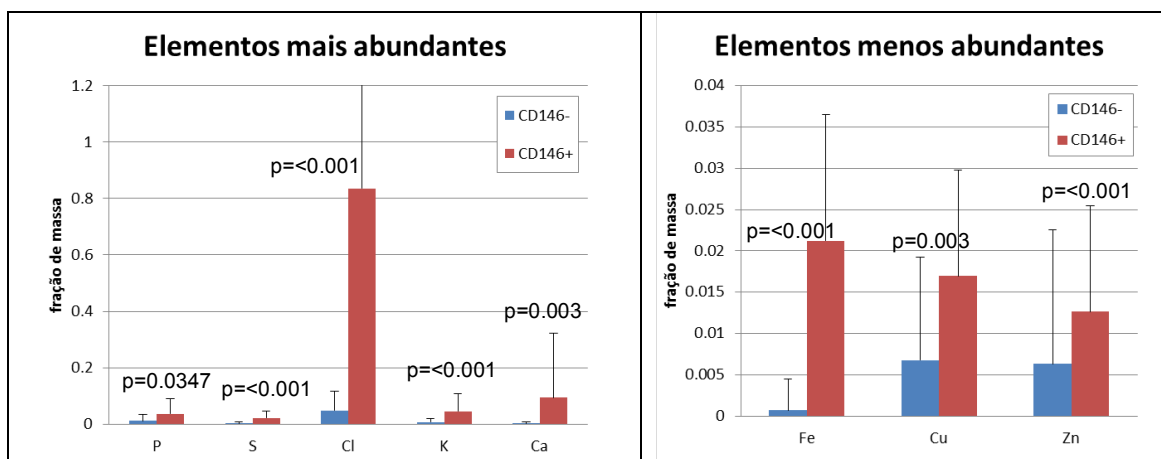


Valor de p pelo teste de Mann-Whitney. ns = não significante. As barras verticais indicam o desvio-padrão.
 Figura 5.21 – Fração de massa média dos elementos mais abundantes e menos abundantes presentes nas células da papila dentária quando analisado o marcador CD90.

Na comparação entre a polpa e a papila dentárias, as células CD90+ da polpa exibiram significativamente mais Cl do que as células CD90+ da papila ($p = 0,0041$). Já as células CD90+ da papila exibiram significativamente mais Ca do que as células CD90+ da polpa ($p = 0,0036$).

5.6.2 CD146

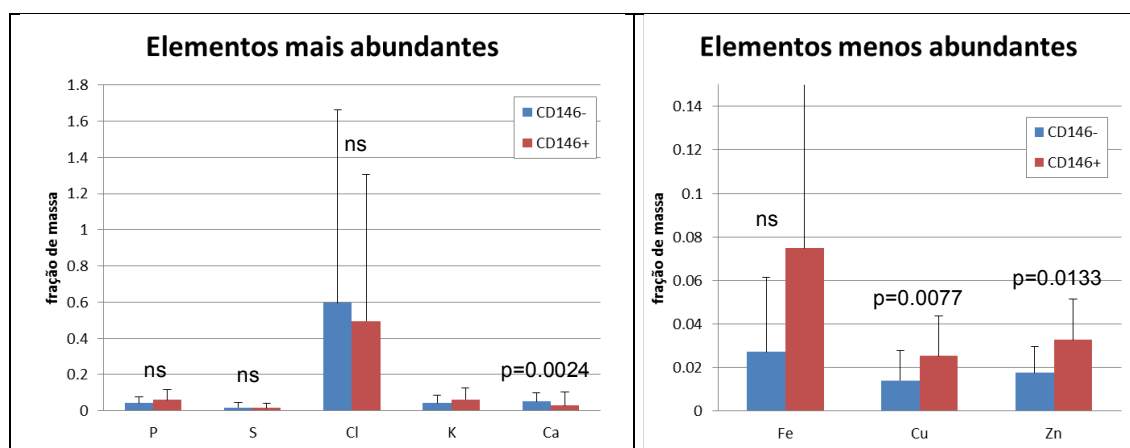
Na figura 5.22 tem-se a fração de massa média para os elementos químicos analisados na polpa dentária, nas células positivas e negativas para CD146. Observa-se que as células CD146+ exibiram fração de massa significativamente maior do que as células CD146- para todos os elementos químicos.



Valor de p pelo teste de Mann-Whitney. ns = não significante. As barras verticais indicam o desvio-padrão.

Figura 5.22 – Fração de massa média dos elementos mais abundantes e menos abundantes presentes nas células da polpa dentária quando analisado o marcador CD146.

Na figura 5.23 tem-se a fração de massa média para os elementos químicos analisados na papila apical, nas células positivas e negativas para CD146. Diferentemente do que ocorreu na polpa, em que todos os elementos estavam mais abundantes nas células CD146+, na papila essas diferenças foram observadas somente para os elementos Cu e Zn. Em relação ao elemento Ca, as células CD146- exibiram fração de massa significativamente maior do que as células CD146+.



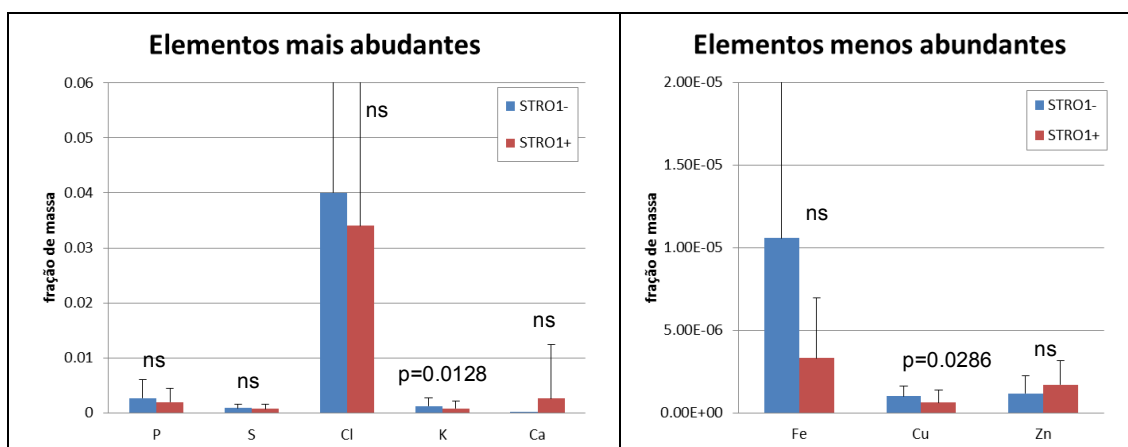
Valor de p pelo teste de Mann-Whitney. ns = não significante. As barras verticais indicam o desvio-padrão.

Figura 5.23 - Fração de massa média dos elementos mais abundantes e menos abundantes presentes nas células da papila dentária quando analisado o marcador CD146.

Comparando os resultados entre polpa e papila dentárias para as células CD146+, houve significativamente mais P ($p = 0,0169$) e Zn ($p = 0,0009$) nas células oriundas da papila. As células CD146+ da polpa significativamente exibiram mais S ($p = 0,0283$) e Cl ($p = 0,0441$).

5.6.3 STRO1

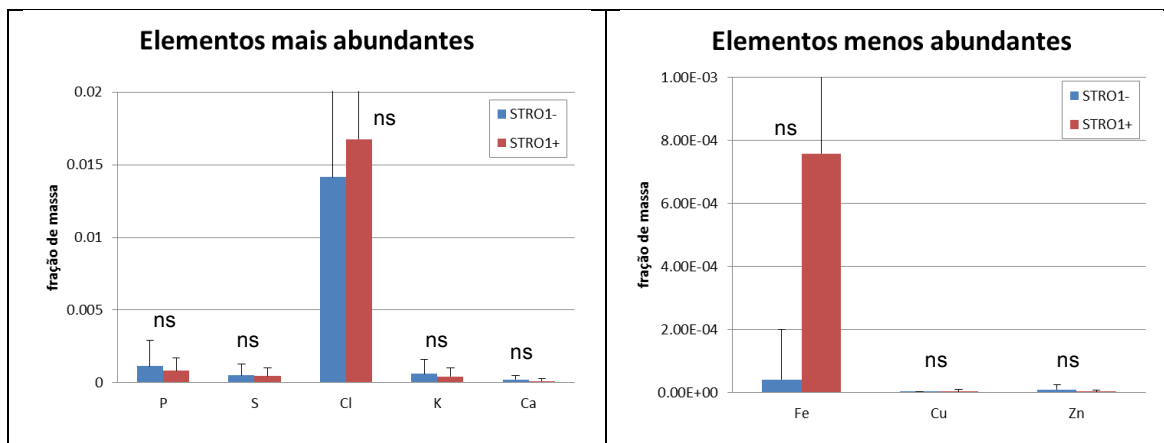
A figura 5.24 mostra a fração média dos elementos mais abundantes e menos abundantes presentes nas células da polpa dentária, enriquecidas ou não do marcador STRO1. Observa-se que as células STRO1+ exibem significativamente menos K do que as células STRO1-. Também se observa que as células positivas para esse marcador exibem significativamente menos Cu do que as negativas.



Valor de p pelo teste de Mann-Whitney. ns = não significante. As barras verticais indicam o desvio-padrão.

Figura 5.24 - Fração de massa média dos elementos mais abundantes e menos abundantes presentes nas células da polpa dentária quando analisado o marcador STRO1.

A figura 5.25 mostra a fração média dos elementos mais abundantes e menos abundantes presentes nas células da papila dentária, enriquecidas ou não do marcador STRO1. Não houve diferenças entre as células positivas e negativas para esse marcador, para nenhum dos elementos químicos analisados.



Teste de Mann-Whitney. ns = não significante. As barras verticais indicam o desvio-padrão.

Figura 5.25 - Fração de massa média dos elementos mais abundantes e menos abundantes presentes nas células da papila dentária quando analisado o marcador STRO1.

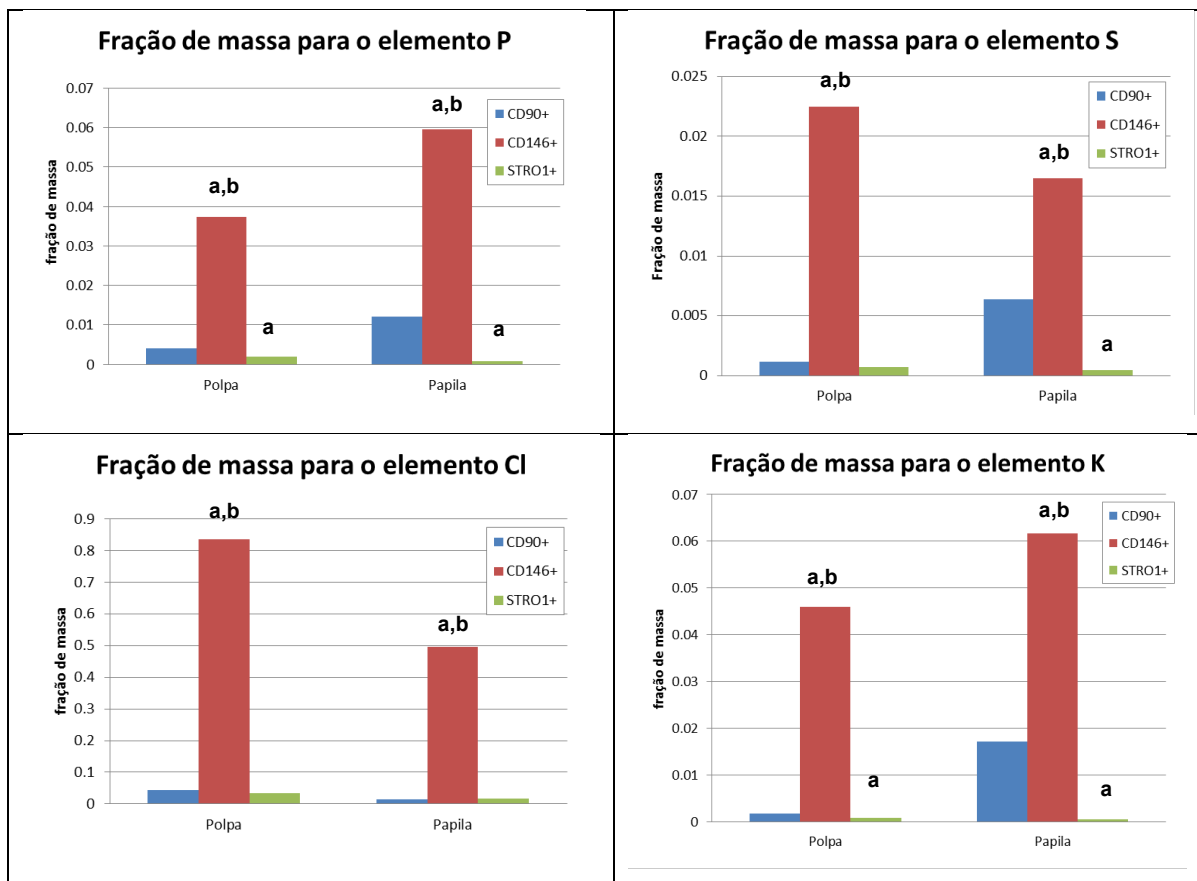
Comparando as células STRO1+ da polpa com as da papila, as células da polpa exibiram significativamente mais P ($p = 0,0024$) e Cl ($p = 0,0021$), porém exibiram menos S ($p = 0,0330$) do que as da papila. Em relação aos demais elementos químicos, não houve diferenças estatisticamente significativas..

5.6.4 Comparação entre os Marcadores em Relação a Alguns Elementos Químicos

Com base nos resultados anteriores, verifica-se que os elementos que exibiram fração de massa significativamente maior nas células positivas (sem distinção de origem polpa/papila) foram P, S, Cl, K, Ca (nas células CD90+) e Cu e Zn (nas células CD146+). Para nenhum elemento, as células STRO1+ exibiram fração de massa significativamente maior em relação às STRO1-. Com base nisso, decidiu-se comparar a fração de massa desses elementos em relação aos marcadores.

A figura 5.26 exibe a fração de massas dos elementos mais abundantes, presentes de forma significativa nas células positivas para os diferentes marcadores. Nota-se que as células CD146+ exibem significativamente maior quantidade de P, S, Cl e K do que as células CD90+ e STRO1+, tanto quando oriundas da polpa quanto

da papila. Um ponto importante quanto a esses elementos foi que as células CD90+ exibiram significativamente mais P e K do que as STRO1+ tanto quando oriundas da polpa quanto da papila, e mais S quando derivadas da papila.



Foi realizado teste estatístico de Kruskal-Wallis seguido de Mann-Whitney para cada elemento químico de forma separada para polpa e papila. As barras verticais indicando o desvio-padrão foram omitidas para melhor visualização.

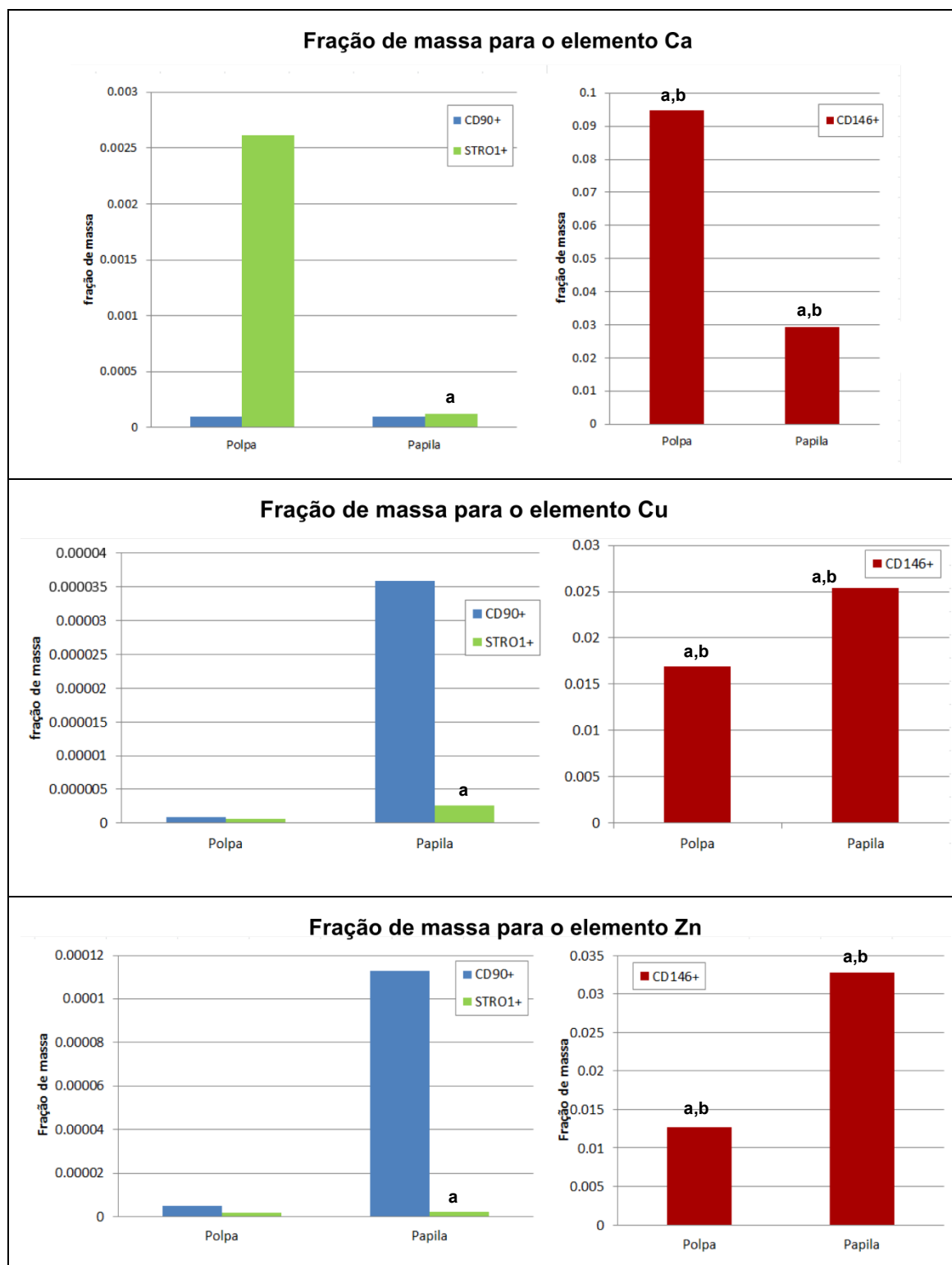
a = estatisticamente significativo quando comparado com CD90+.

B = estatisticamente significativo quando comparado com STRO1+.

Figura 5.26 – Fração de massa média dos elementos químicos mais abundantes presentes significativamente nas células positivas para os diferentes marcadores, oriundas tanto da polpa e quanto da papila.

A figura 5.27 exibe a fração de massas dos elementos menos abundantes, presentes de forma significativa nas células positivas para os diferentes marcadores. Nota-se que também aqui as células CD146+ exibiram maior fração média de massa de Ca, Cu e Zn do que as células CD90+ e STRO1+, tanto oriundas da polpa quanto da papila. Na comparação entre as células CD90+ e STRO1+, as CD90+ exibiram significativamente maior fração de massa de Cu e Zn quando oriundas da papila, e menor fração média de massa de Ca, também quando oriundas da papila. Pelo

gráfico nota-se que as células CD90+ oriundas da polpa exibem fração de massa de Ca bem menor do que as STRO1+, mas essa diferença não foi significativa em função da grande variação dos dados.



Foi realizado teste estatístico de Kruskal-Wallis seguido de Mann-Whitney para cada elemento químico de forma separada para polpa e papila. As barras verticais indicando o desvio-padrão foram omitidas para melhor visualização.

a = estatisticamente significativo quando comparado com CD90+.

b = estatisticamente significativo quando comparado com STRO1+.

Figura 5.27 – Fração de massa média dos elementos químicos menos abundantes presentes significativamente nas células positivas para os diferentes marcadores, oriundas tanto da polpa quanto da papila

5.7 Resumo dos resultados mais relevantes

Um resumo dos principais achados encontra-se no quadro 5.3.

Variável	Polpa dentária	Papila apical	Polpa versus papila
Crescimento celular	<ul style="list-style-type: none"> • Na população enriquecida dos marcadores, em geral, <u>o maior crescimento celular foi para as células CD146+</u>, porém essas células não diferiram em relação às CD146-. • As células CD90+ exibiram um crescimento menor em relação às CD90-. • Não houve diferenças entre as células STRO1 positivas e negativas. 	<ul style="list-style-type: none"> • Na população enriquecida dos marcadores, em geral, <u>o maior crescimento celular foi para as células CD90+</u>, a qual foi maior também em relação às CD90-. • As células CD146+ tiveram crescimento menor do que as CD146-. • As células STRO1+ exibiram menor crescimento do que as STRO1- somente no período de 3 dias. 	<ul style="list-style-type: none"> • Em geral, as células CD90+ derivadas da papila exibem crescimento maior do que as CD90+ oriundas da polpa. • As células STRO1+ da papila exibem menor crescimento do que as STRO1+ da polpa. • O crescimento das células CD146+ da papila não diferiu do das CD146+ oriundas da polpa na maioria dos períodos analisados.

Continua

Continuação

Variável	Polpa dentária	Papila apical	Polpa <i>versus</i> papila
Morfologia celular	<ul style="list-style-type: none"> • As células <u>CD90+</u> exibiram a <u>menor área</u> comparando com as CD146+ e STRO1+, bem como <u>menor perímetro</u>. • As células CD90+ tiveram área e perímetro menores do que as CD90-; as células STRO1+ também tiveram área menor do que as STRO1-. • As células CD146+ e CD146- tiveram áreas semelhantes. • <u>As células CD90+ exibiram formato menos irregular.</u> 	<ul style="list-style-type: none"> • As células <u>CD90+</u> exibiram a <u>maior área</u>, comparando com as demais células, bem como <u>maior perímetro</u>. • As células STRO1+ exibiram área maior do que as CD146+ e perímetro maior do que as STRO1-. • As células CD146+ e CD146- tiveram áreas e perímetros semelhantes. • <u>As células CD90+ exibiram formato mais irregular.</u> 	<ul style="list-style-type: none"> • As células CD90+ derivadas da papila tiveram área e perímetro maior do que as CD90+ oriundas da polpa.

Continua

Conclusão

Variável	Polpa dentária	Papila apical	Polpa versus papila
Fração de massa dos elementos químicos	<ul style="list-style-type: none"> • As células CD90+ exibiram maior fração de massa de P, Cl e K em relação às CD90-. • As células CD90+ exibem mais P e K do que as STRO1+. • As células CD146+ exibiram maior fração de massa em relação à CD146- para todos os elementos químicos analisados. • As células CD146+ exibem mais P, S, Cl, K, Ca, Cu e Zn do que as células CD90+ e STRO1+. • As células STRO1+ exibiram menos K e Cu do que as STRO1-. 	<ul style="list-style-type: none"> • As células CD90+ exibiram maior fração de massa de P e K em relação às CD90-. • As células CD90+ exibem mais S, Cu e Zn e menos Ca do que as STRO1+. • As células CD146+ exibiram maior fração de massa de Cu e Zn do que as CD146-. • As células CD146+ exibem mais P, S, Cl, K, Ca, Cu e Zn do que as células CD90+ e STRO1+. • Não há diferenças entre as frações de massa analisadas comparando-se as células STRO1+ e STRO1-. 	<ul style="list-style-type: none"> • As células CD90+ da polpa exibiram mais Cl do que as CD90+ oriundas da papila. • As células CD146+ oriundas da polpa exibiram mais S e Cl e menos P e Zn em relação às CD146+ derivadas da papila. • As células STRO1+ da polpa exibem mais P e Cl e menos S do que as STRO1+ derivadas da papila.

Quadro 5.3 – Resumo dos principais achados para a polpa dentária, a papila apical e a comparação entre esses dois tecidos, considerando as variáveis “crescimento celular”, “morfologia celular” e “fração de massa dos elementos químicos”

6 DISCUSSÃO

O presente estudo teve com objetivo comparar linhagens enriquecidas em células tronco mesenquimais derivadas de polpa dentária e papila apical, isoladas utilizando marcadores amplamente utilizados na literatura e estudando parâmetros externos e internos nunca antes avaliados nessas populações. Adicionalmente, em todos os experimentos realizados tomou-se o cuidado de utilizar sempre o mesmo doador, evitando assim, possíveis distorções causadas por características peculiares individuais.

Existem numerosas abordagens utilizadas para purificar, enriquecer ou isolar populações de células tronco mesenquimais. Após esse procedimento inicial, em geral, se usa uma combinação de técnicas e somente o conjunto dos resultados nos permite caracterizar essas células. Nestas técnicas estão incluídas análises de propriedades funcionais, fenotípicas e físico-químicas.

Dentre as características físico-químicas, os ensaios de cinética são de longe os mais utilizados, uma vez que sabe-se que as células tronco proliferam extensivamente e são capazes de gerar colônias.

Em relação a proliferação, nossos resultados mostraram que na polpa, a população enriquecida pela expressão de CD146 prolifera mais que as outras, populações enriquecidas, enquanto na papila, a população enriquecida por CD90, prolifera mais. Interessantemente, a população enriquecida por STRO-1 prolifera nitidamente menos na população de papila e mostra essa mesma tendência na polpa, apesar de que nesse caso os resultados não são tão marcantes. Esse ultimo resultado chama a atenção pois vai de encontro ao que foi visto na análise de eficiência de formação de colônias, onde as populações STRO-1 também formaram menos colônias. Nesse sentido, fica claro que a população STRO-1 positiva que é constituída por um numero menor de células, é mais pura e provavelmente também mais homogênea. Além disso, a literatura também mostra que as populações isoladas por STRO-1 apresentam maior potencial de

multidiferenciação quando comparadas com outras populações enriquecidas (Lin, et al. 2011; Xu, et al. 2009).

Se proliferação extensiva e maior eficiência em formar colônias são propriedades de células tronco passíveis de serem estudadas por ensaios de cinética, seria esperado que a população STRO-1 mostrasse justamente o oposto do que encontramos. Nesse caso, nosso resultado estaria comprometido por algum artefato de técnica, como por exemplo, sofrimento celular em virtude do baixo número de células separadas ou mesmo a necessidade de alguma característica para cultura que pode não estar sendo atendida nas condições do nosso experimento.

No entanto, a literatura não compara populações isoladas de um mesmo doador, e essa pode ser a explicação para esse resultado inesperado. Em geral, é mostrado que as células enriquecidas por STRO-1 são mais proliferativas que as isoladas por CD146 por exemplo (Lin, et al. 2011), mas um pool de doadores costuma dar origem a essas populações (Shi and Gronthos 2003; Xu, et al. 2009). As diferenças entre os estudos aqui encontrados podem ser atribuídos a variações nos métodos de cultura ou mesmo a características peculiares como o estágio de diferenciação do tecido originário.

As células têm formas e tamanhos variados geralmente decorrentes da sua especialização e função. Os aspectos celulares morfológicos são considerados de grande valia como suporte ao uso de marcadores moleculares na citologia, bem como, a forma celular pode auxiliar no diagnóstico de uma gama variada de doenças (Diaz-Cano 2008). Uma peculiaridade das células tronco é que elas apresentam tamanho pequeno para facilitar sua locomoção para outro tecido (Tirino, et al. 2011) Um fibroblasto tem em média 10 a 15 μm , assim, espera-se que as células tronco sejam menores (Blau, et al. 2001; Hoogduijn, et al. 2013).

Analisando a variável da morfologia celular nas nossas populações, as células tanto da papila dentária quanto da polpa, enriquecidas pelo marcador CD 146, apresentaram área e perímetros semelhantes com suas populações negativas. Todavia, na polpa, as células CD90 + exibiram menor área e perímetro

e formato menos irregular, enquanto na papila, ocorreu o oposto (células CD90 + exibiram maior área e perímetro e formato mais irregular). As populações STRO-1 positivas, tanto na polpa quanto na papila, mostraram resultados intermediários, ora exibindo menor área e maior perímetro ou vice versa quando comparadas com as células enriquecidas pelos outros marcadores.

Com certeza, nesse ensaio o resultado que chama mais atenção foi o encontrado nas células isoladas pela expressão de CD90 pois mostra características diametralmente opostas quando comparamos a mesma população na polpa e na papila apical. Esse resultado sozinho nos mostra que o CD90 não é um bom marcador para o enriquecimento de uma população em células tronco considerando que as células tronco são sabidamente menores que os fibroblastos comuns e acredita-se que tenham um tamanho constante independentemente de sua origem (Bernardi, et al. 2011; Boyde and Maconnachie 1981; Diaz-Cano 2008). A literatura em diversos ensaios e usando diferentes técnicas também já questiona o papel do CD90 como marcador de células tronco (Hosoya, et al. 2012; Suchanek, et al. 2009)

Ainda considerando somente a avaliação morfológica, os resultados obtidos com o enriquecimento através da expressão de CD146 também se mostraram inadequados para a finalidade esperada uma vez que células positivas e negativas apresentam áreas e perímetros semelhantes independente da origem em polpa ou papila apical. Em outras palavras, o uso de CD146 não está selecionando uma população enriquecida pelo menos do ponto de vista morfológico.

Comparando os resultados da análise morfológica obtidos na polpa e na papila apical podemos afirmar que se esses marcadores de fato enriquecem uma população como demonstrado em diversos estudos (Rege and Hagood 2006; Sloan and Waddington 2009), com exceção da população enriquecida por CD146, essas populações são de fato diferentes de acordo com a origem tecidual. Isso é um ponto atualmente bastante estudado na área de células tronco mesenquimais. Essas células já foram isoladas de numerosos órgão e tecidos no corpo humano com uso dos mesmos marcadores, em especial, marcadores de pericitos, como

os usados em nosso estudo. Todavia, mesmo usando os mesmos marcadores, o potencial de diferenciação das células tronco obtidas é variado e em geral próximo da origem tecidual dessas células, que tendem a reter a assinatura do tecido em que residiam originalmente (Bardin, et al. 2001; Kawashima 2012; Shi, et al. 2005; Shi and Gronthos 2003).

Essa consideração trás implicações futuras e mostra a complexidade da pesquisa nessa área, de forma que para uso clínico futuro, deve-se não só entender melhor a biologia das células tronco mesenquimais, aprimorando técnicas de isolamento e caracterização, mas isso deve ser feito individualmente nos diferentes tecidos. Somente assim, saberemos qual o melhor tecido de origem das células de acordo com sua função esperada no tecido receptor.

Complementando essa informação, as pesquisas sobre células tronco tem avançado significativamente nestes últimos anos. Hoje, não basta apenas saber sobre o potencial de diferenciação. Novos estudos, com esses mesmos marcadores, porém aplicando-se técnicas moleculares mais sensíveis são de grande valia (Inanc and Elcin 2011).

Entender que as células-tronco podem expressar fenótipos distintos poderá ajudar na compreensão dos fatores que regulam a diferenciação celular. Adicionalmente, a possibilidade de que diferentes níveis de expressão de certos marcadores podem influenciar o destino dessas células, também deve ser considerada. Esse aspecto já foi levantado anteriormente no caso de diferenciação de tecidos mineralizados (Ponnaiyan 2014). No estágio atual da pesquisa nessa área ainda não podemos afirmar se níveis diferentes da expressão de um marcador nas mesmas células pode favorecer a mineralização óssea, dentinária ou periodontal, por exemplo.

Compreender todo o funcionamento celular tem sido objeto de pesquisa nas mais diversas áreas. O conhecimento da célula como estrutura dinâmica, fisiologicamente ativa, organizada e funcional, se inicia com seu estudo a partir de dos constituintes químicos, principalmente aqueles com organização macromolecular e que exercem papéis fundamentais na sua estrutura e funcionamento (Banas, et al. 2010a; Banas, et al. 2010b; Williams 2007).

Apesar do avanço recente, a capacidade de obter dados relativos ao teor de componentes subcelulares das células tronco continua a ser um desafio. Neste sentido, esse trabalho é o pioneiro ao analisar as populações enriquecidas por radiação sincrotron. Esse tipo de técnica é extremamente sensível, não destrutiva e possibilita investigar estruturas biológicas micrométricas ou submicrométricas mapeando ainda sua localização (Cardoso, et al. 2011; Kelly, et al. 2010b).

Os elementos químicos podem estar presentes em organelas em várias formas, tais como puramente inorgânicos, ou mesmo sendo transformados em compostos de coordenação após metabolização celular. Nesse sentido, a radiação de microfluorêscência de raios-x mostra-se promissora pois tem o potencial de evidenciar interações químicas ocorrendo em nível subcelular (Ortega, et al. 2009). Em outras palavras, a radiação de microfluorêscência de raios-x sincrotron pode mostrar os elementos subcelulares não importando se eles estão ativos, inativos, metabolizados ou mesmo interagindo com outros componentes.

A manutenção de íons na homeostase e nos processos de proliferação, diferenciação e apoptose é essencial para sustentação da vida (Ko, et al. 2014). Nas nossas populações, observamos que os íons estatisticamente mais prevalentes detectados pela radiação de microfluorêscência foram fósforo, cobre, zinco, potássio, estrôncio, cálcio e cloro. Mesmo na ausência de outras pesquisas relacionadas para comparar nossos resultados, sabemos que esses íons orgânicos participam ativamente nos seres vivos de múltiplos processos (Cardoso, et al. 2011).

Inicialmente salienta-se que para nenhum elemento, as células STRO1+ exibiram fração de massa significativamente maior em relação às STRO1-. Assim, as populações enriquecidas por STRO-1 são mais pobres em relação a presença de elementos iônicos. Isso significa dizer, que a seleção por STRO-1 de fato seleciona uma população ionicamente diferente em relação ao remanescente das células após o enriquecimento.

Sem considerar a origem tecidual, os elementos mais frequentes nas populações enriquecidas (positivas) foram P, S, Cl, K, Ca (nas populações CD90) e Cu e Zn (nas populações CD146) e nenhum elemento foi mais frequente na população STRO1+. Proporcionalmente, a população CD146 se mostrou a

mais rica nos elementos encontrados e a população STRO-1 a mais pobre. Nenhum dos elementos estudados foi encontrado exclusivamente em uma população positiva quando comparada com seu controle negativo.

Nossos resultados anteriores nas análises morfológicas já haviam mostrado que as populações CD146 (+ e -) apresentavam áreas e perímetros semelhantes e que, portanto, esse marcador não estava selecionando um tipo celular morfológicamente distinto. A maior presença de elementos químicos nessas células vai de encontro a esse resultado pois pode significar que elas estão envolvidas em processos celulares variados e assim, representar uma população heterogênea ao invés de uma população verdadeiramente enriquecida em células tronco e por isso mais homogênea.

Por outro lado, a presença diminuta desses elementos nas células STRO-1 positivas nos sinaliza que essas células devem ter funções mais limitadas. Nesse aspecto, sabe-se que as células tronco ficam quiescentes nos tecidos somente proliferando ou exercendo alguma função quando estimuladas (Kolf, et al. 2007; Lin, et al. 2011; Sloan and Waddington 2009).

Interessantemente, quando comparamos STRO-1 + na polpa e papila vemos que as células enriquecidas na polpa mostraram os níveis mais altos de Fosforo e Cloro e as da papila de enxofre. Sabe-se que em condições normais o Cloro é encontrado em todas as células vivas. Este elemento é fundamental para uma ampla gama de processos bioquímicos, mas, é também potencialmente tóxico. De acordo com Banas et. al, 2010, elevadas concentrações de Cl são observadas em tecidos cancerosos e hiperplásicos. Já o fósforo e o enxofre estão relacionados a proliferação celular. Além disso, o enxofre está relacionado ao envelhecimento celular uma vez que níveis menores desse íon podem causar acúmulo de toxinas e doenças. Nesse sentido, temos uma população de forma geral pobre em íons, mas que apresenta níveis discretos de íons ligados a proliferação, acúmulo de toxinas e envelhecimento. Coincidentemente, sabe-se que as células tronco apresentam bomba de fluxo (Bai, et al. 2013; Singh 2010; Suzuki, et al. 2006) capaz de eliminar substâncias nocivas sendo o exemplo mais conhecido a eliminação de quimioterápicos pelas células tronco cancerosas, que também são capazes de proliferar extensivamente sem encurtamento dos telômeros e que podem realizar auto-renovação (Otsu, et al. 2014).

A inexistência de propriedades uniformes e os achados deste estudo laboratorial não podem ser diretamente extrapolados para uma situação *in vivo* em razão das limitações metodológicas, mas permitem, todavia, mostrar um novo caminho que pode ser útil para a identificação de características celulares peculiares. Esse conhecimento pode eventualmente resultar em melhora nas técnicas de isolamento e/ou caracterização celular, que podem passar a ser, pelo menos em parte, baseadas na presença de multielementos. Esse estudo é apenas o primeiro nessa vertente, e o caminho a seguir é ainda obviamente longo

7 CONCLUSÕES

- As populações celulares mostram taxas de proliferações variáveis sendo de um modo geral, população STRO-1 é a menos proliferativa.
- O enriquecimento das populações com o uso de STRO-1, CD146 e CD90 não se mostrou efetivo do ponto de vista estritamente morfológico para se identificar uma população celular distinta.
- Não foi possível estabelecer uma assinatura iônica capaz de diferenciar uma população positiva de uma negativa para os marcadores estudados.
- O enriquecimento celular utilizando a expressão de STRO-1 resulta em uma população com níveis baixos dos íons celulares estudado

REFERÊNCIAS¹

- Abe, S., et al.
2008 Hard tissue regeneration capacity of apical pulp derived cells (APDCs) from human tooth with immature apex. *Biochem Biophys Res Commun* 371(1):90-3.
- Alhadlaq, A., and J. J. Mao
2004 Mesenchymal stem cells: isolation and therapeutics. *Stem Cells Dev* 13(4):436-48.
- Allaire, M., and L. Yang
2011 Biomolecular solution X-ray scattering at the National Synchrotron Light Source. *J Synchrotron Radiat* 18(1):41-4.
- Anderson, D. J., F. H. Gage, and I. L. Weissman
2001 Can stem cells cross lineage boundaries? *Nat Med* 7(4):393-5.
- Armendariz, A. D., et al.
2004 Gene expression profiling in chronic copper overload reveals upregulation of Prnp and App. *Physiol Genomics* 20(1):45-54.
- Bai, R., et al.
2013 Two outward potassium current types are expressed during the neural differentiation of neural stem cells. *Neural Regen Res* 8(28):2656-65.
- Banas, A., et al.
2010a Correlation of concentrations of selected trace elements with Gleason grade of prostate tissues. *J Biol Inorg Chem* 15(7):1147-55.
- Banas, K., et al.
2010b Multivariate analysis techniques in the forensics investigation of the postblast residues by means of Fourier transform-infrared spectroscopy. *Anal Chem* 82(7):3038-44.
- Bardin, N., et al.
2001 Identification of CD146 as a component of the endothelial junction involved in the control of cell-cell cohesion. *Blood* 98(13):3677-84.
- Beck, F. W., et al.
1997 Decreased expression of CD73 (ecto-5'-nucleotidase) in the CD8+ subset is associated with zinc deficiency in human patients. *J Lab Clin Med* 130(2):147-56.
- Bernardi, L., et al.
2011 The isolation of stem cells from human deciduous teeth pulp is related to the physiological process of resorption. *J Endod* 37(7):973-9.
- Bianco, P., et al.
2006 Postnatal skeletal stem cells. *Methods Enzymol* 419:117-48.
- Blank, L. M.
2012 The cell and P: from cellular function to biotechnological application. *Curr Opin Biotechnol* 23(6):846-51.
- Blau, H. M., T. R. Brazelton, and J. M. Weimann
2001 The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell* 105(7):829-41.
- Boyde, A., and E. Maconnachie

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

- 1981 Morphological correlations with dimensional change during SEM specimen preparation. *Scan Electron Microsc* 4:27-34.
- Brighton, C. T., and R. M. Hunt
1991 Early histological and ultrastructural changes in medullary fracture callus. *J Bone Joint Surg Am* 73(6):832-47.
- Bu, P., et al.
2006 Anti-CD146 monoclonal antibody AA98 inhibits angiogenesis via suppression of nuclear factor-kappaB activation. *Mol Cancer Ther* 5(11):2872-8.
- Cardoso, S. C., et al.
2011 Synchrotron radiation X-ray microfluorescence reveals polarized distribution of atomic elements during differentiation of pluripotent stem cells. *PLoS One* 6(12):e29244.
- Clapham, D. E.
2007 Calcium signaling. *Cell* 131(6):1047-58.
- Contreras-Ferrat, A., et al.
2014 Calcium signaling in insulin action on striated muscle. *Cell Calcium*.
- Crisan, M., et al.
2008 A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell* 3(3):301-13.
- Czyz, J., et al.
2003 Potential of embryonic and adult stem cells in vitro. *Biol Chem* 384(10-11):1391-409.
- D'Ippolito, G., et al.
1999 Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. *J Bone Miner Res* 14(7):1115-22.
- da Silva Meirelles, L., A. I. Caplan, and N. B. Nardi
2008 In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 26(9):2287-99.
- da Silva Meirelles, L., P. C. Chagastelles, and N. B. Nardi
2006 Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci* 119(Pt 11):2204-13.
- de Souza Guerra, C., et al.
2010 X-ray fluorescence with synchrotron radiation to elemental analysis of lead and calcium content of primary teeth. *Appl Radiat Isot* 68(1):71-5.
- Diaz-Cano, S. J.
2008 General morphological and biological features of neoplasms: integration of molecular findings. *Histopathology* 53(1):1-19.
- Digirolamo, C. M., et al.
1999 Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *Br J Haematol* 107(2):275-81.
- Ding, G., et al.
2010a Suppression of T cell proliferation by root apical papilla stem cells in vitro. *Cells Tissues Organs* 191(5):357-64.
- Ding, G., et al.
2010b Effect of cryopreservation on biological and immunological properties of stem cells from apical papilla. *J Cell Physiol* 223(2):415-22.
- Dominici, M., et al.

- 2006 Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8(4):315-7.
- Elser, J. J., et al.
2007 Biological stoichiometry in human cancer. *PLoS One* 2(10):e1028.
- Fitzgerald, M.
1979 Cellular mechanics of dentinal bridge repair using 3H-thymidine. *J Dent Res* 58(Spec Issue D):2198-206.
- Fodor, W. L.
2003 Tissue engineering and cell based therapies, from the bench to the clinic: the potential to replace, repair and regenerate. *Reprod Biol Endocrinol* 1:102.
- Fogarty, S. W., et al.
2013 Sub-cellular spectrochemical imaging of isolated human corneal cells employing synchrotron radiation-based Fourier-transform infrared microspectroscopy. *Analyst* 138(1):240-8.
- Friedlander, L. T., M. P. Cullinan, and R. M. Love
2009 Dental stem cells and their potential role in apexogenesis and apexification. *Int Endod J* 42(11):955-62.
- Fuchs, E., and J. A. Segre
2000 Stem cells: a new lease on life. *Cell* 100(1):143-55.
- Golebiewska, A., et al.
2011 Critical appraisal of the side population assay in stem cell and cancer stem cell research. *Cell Stem Cell* 8(2):136-47.
- Govindasamy, V., et al.
2010 Inherent differential propensity of dental pulp stem cells derived from human deciduous and permanent teeth. *J Endod* 36(9):1504-15.
- Gronthos, S., et al.
2002 Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res* 81(8):531-5.
- Gronthos, S., et al.
2000 Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(25):13625-30.
- Gronthos, S., et al.
2003 Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci* 116(Pt 9):1827-35.
- Harada, M., et al.
2008 Cell dynamics in the pulpal healing process following cavity preparation in rat molars. *Histochem Cell Biol* 130(4):773-83.
- Herzenberg, L. A., et al.
2002 The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from Stanford. *Clin Chem* 48(10):1819-27.
- Hilkens, P., et al.
2013 Effect of isolation methodology on stem cell properties and multilineage differentiation potential of human dental pulp stem cells. *Cell Tissue Res* 353(1):65-78.
- Hoogduijn, M. J., et al.
2013 Morphology and size of stem cells from mouse and whale: observational study. *BMJ* 347:f6833.

- Horwitz, E. M., et al.
2005 Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 7(5):393-5.
- Hosoya, A., et al.
2012 Thy-1-positive cells in the subodontoblastic layer possess high potential to differentiate into hard tissue-forming cells. *Histochem Cell Biol* 137(6):733-42.
- Hough, S. R., et al.
2009 A continuum of cell states spans pluripotency and lineage commitment in human embryonic stem cells. *PLoS One* 4(11):e7708.
- Hu, G. F.
1998 Copper stimulates proliferation of human endothelial cells under culture. *J Cell Biochem* 69(3):326-35.
- Huang, G. T., S. Gronthos, and S. Shi
2009 Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res* 88(9):792-806.
- Huang, G. T., et al.
2008 The hidden treasure in apical papilla: the potential role in pulp/dentin regeneration and bioroot engineering. *J Endod* 34(6):645-51.
- Inanc, B., and Y. M. Elcin
2011 Stem cells in tooth tissue regeneration--challenges and limitations. *Stem Cell Rev* 7(3):683-92.
- Iohara, K., et al.
2006 Side population cells isolated from porcine dental pulp tissue with self-renewal and multipotency for dentinogenesis, chondrogenesis, adipogenesis, and neurogenesis. *Stem Cells* 24(11):2493-503.
- Ishikawa, Y., et al.
2010 Mapping of BrdU label-retaining dental pulp cells in growing teeth and their regenerative capacity after injuries. *Histochem Cell Biol* 134(3):227-41.
- Jaimovich, E., and M. A. Carrasco
2002 IP3 dependent Ca²⁺ signals in muscle cells are involved in regulation of gene expression. *Biol Res* 35(2):195-202.
- Jordan, C. T., M. L. Guzman, and M. Noble
2006 Cancer stem cells. *N Engl J Med* 355(12):1253-61.
- Kaneko, R., et al.
2009 Immunohistochemical localization of the STRO-1 antigen in developing rat teeth by light microscopy and electron microscopy. *J Electron Microsc (Tokyo)* 58(6):363-73.
- Karaoz, E., et al.
2010 Isolation and in vitro characterisation of dental pulp stem cells from natal teeth. *Histochem Cell Biol* 133(1):95-112.
- Kawashima, N.
2012 Characterisation of dental pulp stem cells: a new horizon for tissue regeneration? *Arch Oral Biol* 57(11):1439-58.
- Keefer, C. L., et al.
2007 Challenges and prospects for the establishment of embryonic stem cell lines of domesticated ungulates. *Anim Reprod Sci* 98(1-2):147-68.

- Kelly, J. G., et al.
2010a A spectral phenotype of oncogenic human papillomavirus-infected exfoliative cervical cytology distinguishes women based on age. *Clin Chim Acta* 411(15-16):1027-33.
- Kelly, J. G., et al.
2010b Evidence for a stem-cell lineage in corneal squamous cell carcinoma using synchrotron-based Fourier-transform infrared microspectroscopy and multivariate analysis. *Analyst* 135(12):3120-5.
- Kerkis, I., and A. I. Caplan
2012 Stem cells in dental pulp of deciduous teeth. *Tissue Eng Part B Rev* 18(2):129-38.
- Kirouac, D. C., et al.
2009 Cell-cell interaction networks regulate blood stem and progenitor cell fate. *Mol Syst Biol* 5:293.
- Kisselbach, L., et al.
2009 CD90 Expression on human primary cells and elimination of contaminating fibroblasts from cell cultures. *Cytotechnology* 59(1):31-44.
- Klionsky, D. J., et al.
2012 Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* 8(4):445-544.
- Ko, S. K., et al.
2014 Synthetic ion transporters can induce apoptosis by facilitating chloride anion transport into cells. *Nat Chem* 6(10):885-92.
- Kolf, C. M., E. Cho, and R. S. Tuan
2007 Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res Ther* 9(1):204.
- Kuo, M. Y., et al.
1992 Collagen gene expression in human dental pulp cell cultures. *Arch Oral Biol* 37(11):945-52.
- Laxman, S., et al.
2013 Sulfur amino acids regulate translational capacity and metabolic homeostasis through modulation of tRNA thiolation. *Cell* 154(2):416-29.
- Lei, G., et al.
2011 Dentinogenic capacity: immature root papilla stem cells versus mature root pulp stem cells. *Biol Cell* 103(4):185-96.
- Li, L., and T. Xie
2005 Stem cell niche: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:605-31.
- Lin, G., et al.
2011 Tissue distribution of mesenchymal stem cell marker Stro-1. *Stem Cells Dev* 20(10):1747-52.
- Lin, N. H., S. Gronthos, and P. M. Bartold
2008 Stem cells and periodontal regeneration. *Aust Dent J* 53(2):108-21.
- Luo, Y., et al.
2010 Determinants of the epithelial-muscular axis on embryonic stem cell-derived gut-like structures. *Pathobiology* 77(5):253-9.
- Mao, J. J., et al.

- 2006 Craniofacial tissue engineering by stem cells. *J Dent Res* 85(11):966-79.
- Mareschi, K., et al.
2009 Multipotent mesenchymal stem cells from amniotic fluid originate neural precursors with functional voltage-gated sodium channels. *Cytotherapy* 11(5):534-47.
- Margalioth, E. J., J. G. Schenker, and M. Chevion
1983 Copper and zinc levels in normal and malignant tissues. *Cancer* 52(5):868-72.
- Martin-Rendon, E., and S. M. Watt
2003 Stem cell plasticity. *Br J Haematol* 122(6):877-91.
- Miltenyi, S., et al.
1990 High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* 11(2):231-8.
- Miura, M., et al.
2003 SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(10):5807-12.
- Morsczeck, C., et al.
2010 Comparison of human dental follicle cells (DFCs) and stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) after neural differentiation in vitro. *Clin Oral Investig* 14(4):433-40.
- Nakamura, Y., et al.
2006 Expression of CD90 on keratinocyte stem/progenitor cells. *Br J Dermatol* 154(6):1062-70.
- Narsinh, K. H., et al.
2011 Single cell transcriptional profiling reveals heterogeneity of human induced pluripotent stem cells. *J Clin Invest* 121(3):1217-21.
- Neo, M., et al.
2000 Pseudoaneurysm of the deep circumflex iliac artery: a rare complication at an anterior iliac bone graft donor site. *Spine (Phila Pa 1976)* 25(14):1848-51.
- Nolla, C. M.
1960 The development of permanent teeth. *J Dent Child (Chic)* 4:13.
- Nosrat, I. V., et al.
2001 Dental pulp cells produce neurotrophic factors, interact with trigeminal neurons in vitro, and rescue motoneurons after spinal cord injury. *Dev Biol* 238(1):120-32.
- Ortega, R., G. Deves, and A. Carmona
2009 Bio-metals imaging and speciation in cells using proton and synchrotron radiation X-ray microspectroscopy. *J R Soc Interface* 6 Suppl 5:S649-58.
- Otsu, Y., et al.
2014 Activity-Dependent Gating of Calcium Spikes by A-type K⁺ Channels Controls Climbing Fiber Signaling in Purkinje Cell Dendrites. *Neuron*.
- Pacher, P., et al.
2008 Uncoupling of ER-mitochondrial calcium communication by transforming growth factor-beta. *Am J Physiol Renal Physiol* 295(5):F1303-12.
- Panepucci, R. A., et al.

- 2004 Comparison of gene expression of umbilical cord vein and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 22(7):1263-78.
- Ponnaiyan, D.
2014 Do dental stem cells depict distinct characteristics? - Establishing their "phenotypic fingerprint". *Dent Res J (Isfahan)* 11(2):163-72.
- Pountos, I., et al.
2007 Mesenchymal stem cell tissue engineering: techniques for isolation, expansion and application. *Injury* 38 Suppl 4:S23-33.
- Prelle, K., N. Zink, and E. Wolf
2002 Pluripotent stem cells--model of embryonic development, tool for gene targeting, and basis of cell therapy. *Anat Histol Embryol* 31(3):169-86.
- Puumalainen, P., and T. Lahtinen
1977 Roentgen ray fluorescence method for determination of iodine in tissue. *Acta Radiol Ther Phys Biol* 16(6):529-37.
- Rege, T. A., and J. S. Hagood
2006 Thy-1 as a regulator of cell-cell and cell-matrix interactions in axon regeneration, apoptosis, adhesion, migration, cancer, and fibrosis. *FASEB J* 20(8):1045-54.
- Riekstina, U., et al.
2009 Embryonic stem cell marker expression pattern in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, heart and dermis. *Stem Cell Rev* 5(4):378-86.
- Rink, L., and P. Gabriel
2000 Zinc and the immune system. *Proc Nutr Soc* 59(4):541-52.
- Rodriguez-Lozano, F. J., et al.
2011 Mesenchymal stem cells derived from dental tissues. *Int Endod J* 44(9):800-6.
- Roos, G., and J. Messens
2011 Protein sulfenic acid formation: from cellular damage to redox regulation. *Free Radic Biol Med* 51(2):314-26.
- Rosso, F., et al.
2004 From cell-ECM interactions to tissue engineering. *J Cell Physiol* 199(2):174-80.
- Roudeau, S., et al.
2014 Correlative organelle fluorescence microscopy and synchrotron X-ray chemical element imaging in single cells. *Anal Bioanal Chem*.
- Sandt, C., J. Frederick, and P. Dumas
2013 Profiling pluripotent stem cells and organelles using synchrotron radiation infrared microspectroscopy. *J Biophotonics* 6(1):60-72.
- Seo, B. M., et al.
2004 Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 364(9429):149-55.
- Sers, C., et al.
1993 Genomic organization of the melanoma-associated glycoprotein MUC18: implications for the evolution of the immunoglobulin domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(18):8514-8.
- Shi, S., et al.
2005 The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. *Orthod Craniofac Res* 8(3):191-9.

- Shi, S., and S. Gronthos
2003 Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res* 18(4):696-704.
- Shi, S., P. G. Robey, and S. Gronthos
2001 Comparison of human dental pulp and bone marrow stromal stem cells by cDNA microarray analysis. *Bone* 29(6):532-9.
- Shih, I. M., et al.
1994 Isolation and functional characterization of the A32 melanoma-associated antigen. *Cancer Res* 54(9):2514-20.
- Simmons, P. J., and B. Torok-Storb
1991 Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood* 78(1):55-62.
- Singh, H.
2010 Two decades with dimorphic Chloride Intracellular Channels (CLICs). *FEBS Lett* 584(10):2112-21.
- Sloan, A. J., and R. J. Waddington
2009 Dental pulp stem cells: what, where, how? *Int J Paediatr Dent* 19(1):61-70.
- Smith, A. G.
2001 Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17:435-62.
- Solé, V.A., Papillon, E., Cotte, A., Walter, P.H., Susini, J.
2007 A multiplatform code for the analysis of energy-dispersive X-ray fluorescence spectra. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 62(1):63-68.
- Sonoyama, W., et al.
2006 Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PLoS One* 1:e79.
- Sonoyama, W., et al.
2008 Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *J Endod* 34(2):166-71.
- Struys, T., et al.
2011 Ultrastructural and immunocytochemical analysis of multilineage differentiated human dental pulp- and umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. *Cells Tissues Organs* 193(6):366-78.
- Suchanek, J., et al.
2009 Dental pulp stem cells and their characterization. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 153(1):31-5.
- Sun, H. H., et al.
2011 Biological approaches toward dental pulp regeneration by tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med* 5(4):e1-16.
- Suzuki, M., T. Morita, and T. Iwamoto
2006 Diversity of Cl(-) channels. *Cell Mol Life Sci* 63(1):12-24.
- Szotek, P. P., et al.
2006 Ovarian cancer side population defines cells with stem cell-like characteristics and Mullerian Inhibiting Substance responsiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(30):11154-9.
- Tan, C., and H. Chen

- 2011 Screening of prostate cancer by analyzing trace elements in hair and chemometrics. *Biol Trace Elem Res* 144(1-3):97-108.
- Thomson, J. A., et al.
1998 Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282(5391):1145-7.
- Tirino, V., et al.
2011 Methods for the identification, characterization and banking of human DPSCs: current strategies and perspectives. *Stem Cell Rev* 7(3):608-15.
- Toohey, J. I.
1975 Sulfhydryl dependence in primary explant hematopoietic cells. Inhibition of growth in vitro with vitamin B12 compounds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72(1):73-7.
- Toohey, J. I., and A. J. Cooper
2014 Thiosulfoxide (Sulfane) Sulfur: New Chemistry and New Regulatory Roles in Biology. *Molecules* 19(8):12789-12813.
- Tormin, A., et al.
2011 CD146 expression on primary nonhematopoietic bone marrow stem cells is correlated with in situ localization. *Blood* 117(19):5067-77.
- Tziafas, D., and K. Kodonas
2010 Differentiation potential of dental papilla, dental pulp, and apical papilla progenitor cells. *J Endod* 36(5):781-9.
- Ulmer, F. L., et al.
2010 Stem cells--prospects in dentistry. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 120(10):860-83.
- Waddington, R. J., et al.
2009 Isolation of distinct progenitor stem cell populations from dental pulp. *Cells Tissues Organs* 189(1-4):268-74.
- Walsh, M. J., et al.
2008 Fourier transform infrared microspectroscopy identifies symmetric PO(2)(-) modifications as a marker of the putative stem cell region of human intestinal crypts. *Stem Cells* 26(1):108-18.
- Walsh, M. J., et al.
2007 IR microspectroscopy: potential applications in cervical cancer screening. *Cancer Lett* 246(1-2):1-11.
- Wang, J., et al.
2010 Stem cells from human-exfoliated deciduous teeth can differentiate into dopaminergic neuron-like cells. *Stem Cells Dev* 19(9):1375-83.
- Wei, X., et al.
2007 Expression of mineralization markers in dental pulp cells. *J Endod* 33(6):703-8.
- Williams, R. J.
2007 A system's view of the evolution of life. *J R Soc Interface* 4(17):1049-70.
- Winkler, J., J. Hescheler, and A. Sachinidis
2005 Embryonic stem cells for basic research and potential clinical applications in cardiology. *Biochim Biophys Acta* 1740(2):240-8.
- Woywodt, A., et al.

- 2006 Isolation and enumeration of circulating endothelial cells by immunomagnetic isolation: proposal of a definition and a consensus protocol. *J Thromb Haemost* 4(3):671-7.
- Xu, J., et al.
2009 Multiple differentiation capacity of STRO-1+/CD146+ PDL mesenchymal progenitor cells. *Stem Cells Dev* 18(3):487-96.
- Yagyuu, T., et al.
2010 Hard tissue-forming potential of stem/progenitor cells in human dental follicle and dental papilla. *Arch Oral Biol* 55(1):68-76.
- Yamamura, T.
1985 Differentiation of pulpal cells and inductive influences of various matrices with reference to pulpal wound healing. *J Dent Res* 64 Spec No:530-40.
- Yan, X., et al.
2003 A novel anti-CD146 monoclonal antibody, AA98, inhibits angiogenesis and tumor growth. *Blood* 102(1):184-91.
- Yao, S., et al.
2008 Differentiation of stem cells in the dental follicle. *J Dent Res* 87(8):767-71.
- Zhang, J., C. Ding, and P. Shang
2014 Alterations of mineral elements in osteoblast during differentiation under hypo, moderate and high static magnetic fields. *Biol Trace Elem Res* 162(1-3):153-7.
- Zizkova, M., et al.
2014 Proteome-wide analysis of neural stem cell differentiation to facilitate transition to cell replacement therapies. *Expert Rev Proteomics*:1-13.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

PARECER DE APROVAÇÃO
Protocolo 06/11
CAAE 0007.0.017.000-11

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa **APROVOU** o protocolo de pesquisa “**Comparação entre células-tronco da polpa, papila apical e folículo dental de um único doador para engenharia tecidual em Odontologia**”, de responsabilidade do(a) Pesquisador(a) Karla Mayra Pinto e Carvalho Rezende sob orientação da Profa. Dra. Andrea Mantesso e do Prof. Dr. Marcelo Jose Strazzeri Bonecker.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em “cd”. Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 19 de abril de 2011.


Prof. Dra. Marcia Turolla Wanderley
Coordenadora do CEP-FOUSP