LUCYENE MIGUITA LUIZ

Células-tronco mesenquimais: Isolamento e caracterização de populações derivadas de alvéolo dental humano e identificação e caracterização de populações de polpas dentais de camundongos

São Paulo
2013

LUCYENE MIGUITA LUIZ

Células-tronco mesenquimais: Isolamento e caracterização de populações derivadas de alvéolo dental humano e identificação e caracterização de populações de polpas dentais de camundongos

Versão Corrigida

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

Área de concentração: Patologia e Estomatologia Básica e Aplicada

Orientadora: Profa. Dra. Andrea Mantesso Pobocik

Co-orientador: Professor Paul Thomas Sharpe

São Paulo
2013

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

Luiz, Lucyene Miguita

Células-tronco mesenquimais: isolamento e caracterização de populações derivadas de alvéolo dental humano e identificação e caracterização de populações de polpas dentais de camundongos/ Lucyene Miguita Luiz; orientador Andrea Mantesso Pobocik; co-orientador Paul Thomas Sharpe. -- São Paulo, 2013.

158 p.: il.: fig., tab., graf.; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Patologia e Estomatologia Básica e Aplicada. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida.

1. Células-tronco. 2. Polpa dentária. 3. Alvéolo dental. 4. Periodonto. I. Pobocik, Andrea Mantesso. II. Sharpe, Paul Thomas. III. Título.

Luiz LM. Células-tronco mesenquimais: isolamento e caracterização de populações derivadas de alvéolo dental humano e identificação e caracterização de populações de polpas dentais de camundongo. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências Odontológicas.

Aprovada em: / /2013

Banca Examinadora

Prof(a). 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: _____

Dedico esta tese ao meu marido *Sandro Coreno Luiz*, companheiro fiel, amigo e confidente de todas as horas, por todo sacrifício e suporte que fez para que eu pudesse realizar este feito. Meu amor, não sei o que seria de mim sem você como meu anjo da guarda!

Também dedico aos meus pais (Umberto Teruhico Miguita e Kiyoko Miguita) que me apoiaram e sustentaram, literalmente, para fazer um doutorado com parte do estudo no exterior. Vocês são exemplos de vida e dedicação.

Ao meu irmãozinho (Wylliam Miguita) que demonstrou que é um irmãozão e tem ajudado bastante no 'Nosso Lar'. Wy, valeu por tudo!!

Não posso esquecer de minha sogra (Maria de Lourdes Coreno) grande mãe que sempre me incentivou e ao meu cunhado Marcelo Coreno, que sempre mostrou que a vida é feita de oportunidades.

Dedico também aos meus orientadores do mestrado (Profa. Dra. Vera Cavalcanti de Araújo) e doutorado (Profa. Dra. Andrea Mantesso e Professor Paul Sharpe), que nada mais são grandes inspirações, exemplos de dedicação acadêmica e profissionais que almejo ser um dia.

A todos vocês sou eternamente grata por fazerem eu continuar em frente!

AGRADECIMENTOS

Sou imensamente grata a todos do Programa de Pós-Graduação em Patologia e Estomatologia Básica e Aplicada da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, do Departamento de Desenvolvimento Craniofacial e Pesquisa em Células-tronco do King`s College London, do Biotério do Instituto de Pesquisas de Energias Nucleares (IPEN) e do Centro de Pesquisa Biomédica do Instituto Nacional para Pesquisa em Saúde de Londres (BRC-NIHR), que me auxiliaram na realização deste trabalho.

Gostaria de agradecer também à minha orientadora, *Profa. Dra. Andrea Mantesso*, por me aceitar literalmente em sua casa, como sua aluna e praticamente filha, confiando tamanho projeto. Obrigada pela oportunidade de me apresentar um mundo diferente (“afinal eu saí do país para fazer esta tese graças a você”) e permitir que estudasse ao lado de renomados professores e que abordasse um assunto superinteressante que é o mundo das células-tronco. Agradeço infinitamente pela confiança que depositou em mim durante todo o doutorado e por me ajudar sempre quando precisei. Muito obrigada por me orientar para um novo mundo!! Muito obrigada mesmo por tudo!! E estendo este agradecimento à pequena *Olívia* e ao *Jake* por cederem o tempo de sua mãe e esposa querida, respectivamente, para que ela me orientasse nesta jornada!

Devo agradecer também ao *Professor Paul Sharpe*, que me aceitou carinhosamente em seu laboratório no King`s College London e mostrou que na pesquisa não há lógicas de raciocínio sem se basear em evidências. E que a ciência sempre terá muitos caminhos para nos mostrar a grandeza que é a vida dos seres que vivem em nosso planeta. *Thanks Professor! You are great!! I hope to be great like you someday!!*

À *Profa. Dra. Maria Cristina Zindel Deboni*, e aos amigos cirurgiões dentistas *Dr Cláudio Darcie* e *Dra. Gleice Murakami* por auxiliarem a coletar amostras para os experimentos de alvéolo dental. Sem este material não seria possível a realização desta tese, dos trabalhos publicados em congressos e prêmios recebidos, que foram frutos deste trabalho. Muito Obrigada!!

À *Profa. Dra. Suzana C. Orsini* e *Prof. Dr. Marcelo Bönecker* pelas considerações efetuadas ao meu projeto de pesquisa durante a minha qualificação e por serem exemplos de serenidade em pessoa. Muito obrigada pela atenção e carinho de vocês!!

Ao *Professor Agi Gregoriadis* pelas considerações feitas sobre meu projeto, as quais fizeram com que eu procurasse melhorar os resultados para uma boa publicação. *Thank you Professor for the honor to receive me with kindness and attention!!*

À *Professora Isabelle Miletich* pela oportunidade de permitir que eu trabalhasse ao seu lado e me ensinar as técnicas experimentais com minuciosidade e cuidado. *Thanks a lot!*

À *Professora Susan Heck* do BRC-NIHR por permitir utilizar o espaço e dar todo suporte para realização dos experimentos de citometria de fluxo. *Thank you very much!*

Ao *Prof. Dr. Fábio D'Almas Nunes e Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Jr.* Obrigada pela generosidade e permitirem que eu utilizasse seus laboratórios, confiando as chaves dos mesmos, para eu realizar boa parte de meus experimentos. Muitíssimo obrigada!

Aos professores da disciplina de Patologia da Universidade de São Paulo, *Profa. Dra. Marina H. C. G. Magalhães, Profa. Dra. Marília T. Martins e Profa. Dra. Luciana Corrêa*, agradeço pelos ensinamentos, exemplos de disciplina e ensino! Foi um grande prazer e honra conhecê-las pessoalmente. Muito obrigada!

À *Elisa, Adriana, Juvani, Alex Huhn, Livia, Susmitha, Christopher Healy, Alasdair, Ewa, PJ e Helen* por todo suporte técnico laboratorial que me deram durante todos os anos de realização dos experimentos e extendo o agradecimento à *Zilda, Néia, Nair, Angela e Sharon*, pela paciência em me auxiliar com a parte burocrática e por me receberem sempre com um lindo sorriso no rosto mesmo quando super-ultra-mega atarefados!! Sou imensamente agradecida a todos vocês, muito obrigada!

Aos seguranças e porteiros da Faculdade de Odontologia da USP, *Sr. Ney, Sr. Milton entre tantos outros* que gentilmente abriam e fechavam os portões da faculdade, sempre com um sorriso no rosto, quando eu chegava de madrugada ou saía tarde da noite dos laboratórios, durante a semana, finais de semana e feriados. Muito obrigada mesmo!!

À *Vânia M. B. O. Funaro, Gláucia e Maria Cláudia Pestana*, revisoras da biblioteca, as quais foram muito prestativas durante a normatização desta tese. Extendo também ao *Sr. Marcos Alipio Dantas Ramos e Bárbara Gomes Ramos* pela impressão e atenção dada a esta tese. Muito obrigada!

A todos os amigos que conheci da Universidade de São Paulo e do King`s College London (*Cibele Pelissari, Felipe Daltoé, Gabriela Berti, Karla M. Rezende, Lourdes Chiok, Marina Teixeira, Vitor Moreno, Ana Rita Barcessat, Michella Lima, Flávia Rosin, Gabizinha Nagata, Carina, Marco Tulio, Cauê, Carrrla, Gustavo, Karin, Karen Tiemi®, Douglas, Takashi Matsuura, Longlong Wang, Adam, Yvonne Pang, Jifan, Wenny, Anna, Dalea, Zikra entre tantos outros, desculpe se esqueci de citar alguém, desculpa mesmooo*). Agradeço

imensamente a vocês pela amizade, por me auxiliarem nos experimentos e trocarem informações de protocolos, pelos ombros amigos nas horas difíceis e de comemoração, e também por confiarem suas confidências a mim. Não esquecerei dos momentos de cafés, chás, bolos, companhia para os Centros Espíritas, pubs e festas regadas a maracatu e festivais de fim de semana. Muito obrigada amigos pela companhia e oportunidade de conhecer pessoas maravilhosas como vocês, de diversas partes do Brasil e do mundo! (*Thank you all, from many places of the world, for the friendship, company and opportunity to meet such wonderful people like you!*)

Um agradecimento especial aos pequenos animais que cederam suas vidas para que os experimentos fossem realizados! Muito Obrigada!

À FAPESP, CAPES e MRC pelo suporte financeiro para a realização de todos os experimentos contidos nesta tese. Sem o apoio financeiro nada disso seria possível.

E finalmente à minha família (mãe, pai, Wy, Sandro, sogrinha, cunhadinho), familiares, em especial Marcelo Hayashida, Clarice Sanehira e Roberto Miguita e amigos (Angela, Ana Cristina, Sandrinho Juliano, Érika Campos, Profa. Cristiane Loureiro Matni, à família Becci Silvério e Prof. Sérgio Maeda) que têm acompanhado toda esta minha jornada sempre com carinho, suporte moral e emocional!! Vocês são demais!! Amo vocês!!

"Aprende, humildemente. Ensina, praticando. Administra, educando.
Obedece, prestativo. Ama, edificando. Teme, a ti mesmo. Sofre,
aproveitando. Fala, construindo. Ouve, sem malícia. Ajuda, levantando.
Passa, servindo. Ora, serenamente. Pede, com juízo. Espera, trabalhando.
Crê, agindo. Confia, vigiando. Recebe, distribuindo. Atende, com gentileza.
Coopera, sem apego. Socorre, melhorando. Examina, salvando. Esclarece,
respeitoso. Semeia, sem aflição. Estuda, aperfeiçoando. Caminha, com
todos. Avança, auxiliando. Age, no bem geral. Corrige, com bondade.
Perdoa, sempre"

Francisco Cândido Xavier

RESUMO

Luiz LM. Células-tronco mesenquimais: Isolamento e caracterização de populações derivadas de alvéolo dental humano e identificação e caracterização de populações de polpas dentais de camundongos [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2013. Versão Corrigida.

Há um grande interesse no estudo de células-tronco em função de sua capacidade de auto-renovação e plasticidade. Estas características capacitam as células-tronco a produzirem células de diferentes linhagens que participam ativamente do processo de homeostase, da resposta à injúria e da regeneração e reparação tecidual. A polpa dental é o tecido mais estudado na Odontologia em relação a células-tronco, mas diversos estudos já mostraram a presença dessas células também na região periodontal. É importante salientar, que dependendo de sua origem, as células-tronco apresentam comportamentos diversos, especialmente no que tange ao transplante *in vivo*. Além disso, os microambientes onde as células-tronco residem (nichos), têm um papel fundamental no comportamento das mesmas, pois controlam aspectos essenciais como o estado de indiferenciação e a auto-renovação. Esse projeto de pesquisa teve como objetivos duas análises distintas. Na primeira, verificar se existem células-tronco mesenquimais derivadas da curetagem do alvéolo dental humano após extrações dentais. Na segunda, analisar o nicho de células-tronco nas polpas dentais de camundongos. Em comum, as duas análises se basearam no uso de marcadores previamente utilizados na literatura para o estudo de células-tronco. Como não existem marcadores únicos e específicos para a identificação dessas células, diferentes combinações desses marcadores entre si e de técnicas laboratoriais foram empregadas. No primeiro estudo, após o isolamento das células, deu-se especial atenção à sua caracterização, que foi realizada através de ensaios que avaliaram propriedades e comportamentos que sabidamente ocorrem em células-tronco. Já na segunda parte desse estudo, utilizamos a polpa dental de camundongos para a análise *in vivo* de nichos. Em camundongos, a localização do nicho responsável pelo crescimento contínuo dos incisivos é conhecida. De uma maneira geral, nossos resultados demonstram que: 1) É possível isolar células-tronco/progenitoras a partir de tecidos curetados de alvéolo dental após extrações dentárias. Esse fato é inédito e abre novas perspectivas em termos de oportunidade de coleta e futura aplicação clínica. 2) É possível observar a diversidade populacional nas células que formam o nicho de células-tronco em polpa dental de camundongos, e através de uma organização hierárquica, propusemos um modelo para este nicho. Esse modelo servirá de base para estudos subsequentes que visem avaliar o comportamento das células que formam o nicho, quando isoladas das demais, e abrirá possibilidade para análises em outros tecidos dentais e não dentais.

Palavras-chave: Células-tronco dentais. Osso alveolar. Polpa dental. Nicho de células-tronco

ABSTRACT

Luiz LM. Mesenchymal stem cells: Isolation and characterization of populations derived from human dental alveolus and identification and characterization of populations from mouse dental pulp [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2013. Corrected Version.

There is great interest in the study of stem cells due to their ability to produce mature cells of different lineages that participate actively in the process of homeostasis, injury response, regeneration and tissue repair. The dental pulp is the most studied tissue in dentistry, but several studies have shown the presence of these cells in the periodontal tissue region. It is important to note that depending on their origin, these cells exhibit different behaviours, especially in regard to *in vivo* transplantation. Furthermore, the microenvironment in which these cells are found (niches) have an essential role in their behaviour as they control important aspects such as differentiation and self-renewal. This research project aimed for two distinct analyses. The first was to verify if there are mesenchymal stem cells derived from human dental socket curettage after dental extractions. The second, to analyse the stem cell niche in mouse dental pulp. In common, the two analyses were based on the use of markers previously used in the literature for the study of stem cells. As there are no specific and unique markers to identify these cells, an extensive combination of these markers among themselves, and laboratory techniques were performed. In the first study, after the isolation of the cells, special attention was given to their characterization by combining assays to evaluate stem cells properties and behaviours. In the second part of this study, we used the mouse dental pulp model for *in vivo* analysis of stem cell niches. In mice, the location of the niche responsible for the incisors continuous growth is known. In general our results showed that: 1) It is possible to isolate progenitor/stem cells from tissue curettage of the alveolus after tooth extractions. This fact is unprecedented and opens new perspectives for the obtention of stem cells for future clinical applications. 2) It is possible to observe the cells population diversity of the mouse dental pulp niche and through a hierarchical organization, we proposed a model for this niche. This model will provide basis for further studies aimed at evaluating the behavior of cells that form the niche, when isolated from the others, and opens the possibility for the analysis of the niche structure in other dental and non-dental tissues.

Keywords: Dental stem cells. Alveolar bone. Dental pulp. Stem cells niche.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1 - Desenho ilustrativo da divisão assimétrica das células-tronco gerando células-filhas idênticas indiferenciadas (em azul) promovendo a auto-renovação celular e células progenitoras pouco diferenciadas (em cinza) que tornam-se em células diferenciadas (em verde).....26
- Figura 2.2 - Nicho de células-tronco mesenquimais (CTMs). CTMs em seu nicho perivascular interagindo com: 1) outras células através de moléculas de adesão, como caderinas, 2) outras CTMs, 3) matriz extracelular (MEC) e 4) moléculas sinalizadoras como neurotransmissores emitidos por neurônios, hormônios, fatores de crescimento, níveis de nutrientes, sinais de saturação de oxigênio transmitidos pelo sistema vascular e outros estímulos autócrinos e parácrinos produzidos dentro do nicho pelas células-tronco e células vizinhas (adaptado de Ghaime et al., 2013).....30
- Figura 2.3 - Ilustração de diversas fontes de células-tronco já isoladas de tecidos dentais humanas. SHED, células-tronco de polpa dental de dente decíduo, DPSC, células-tronco de polpa dental de dente permanente. GMPC, células progenitoras de gengiva. DFPC, células precursoras do folículo dental. SCAP, células-tronco da papila apical. PDLSC, células-tronco do ligamento periodontal. ABMMSC, células mesenquimais estromais da medula óssea alveolar. Abreviações baseadas na literatura inglesa.....33
- Figura 2.4 - Estruturas presentes nos dentes humanos e de camundongos. *, mostra área em que há exposição da dentina, sem proteção de esmalte. A seta preta mostra a imagem negativa da porção do esmalte desmineralizado durante o processo de descalcificação (adaptado de Treuting et al., 2012).....45
- Figura 2.5 - Odontogênese de incisivos de camundongos. A, espessamento do epitélio oral na idade embrionária de 11 dias (E11). B, fase de botão em E13, mostrando o órgão do esmalte (eo) rodeado pelo mesênquima condensado (cm) e início do crescimento da lâmina vestibular (vl). C, fase capuz, E14, apresentando a mudança de eixo de crescimento do órgão do esmalte e do cm. D, fase de sino inicial em E16, mostrando formação da papila dental (dp), da alça cervical (cl) e mesênquima condensado ao redor do órgão do esmalte. E, fase de sino tardia apresentando dente com esmalte (e), dentina (d), polpa (p) e alça cervical (cl), com molares na fase de sino tardia. Legenda em ordem alfabética (adaptado de Harada et al., 2002b).....51
- Figura 2.6 - Figura das estruturas que compõem os incisivos de camundongos. A, mostra estruturas que compõem este dente, apresentando um dente envolvido pelo mesênquima folicular (FM) constituído de esmalte na superfície labial e dentina na porção incisal, labial e lingual, revestidos pelo epitélio dental (EpD), apresentando em seu interior células derivadas da papila mesenquimal (PM) e em sua porção apical destaca-se as alças cervicais. B, mostra em detalhe a região apical constituída de células-tronco residentes no retículo estrelado (RE) da alça cervical, células transientes amplificadoras (TA), ameloblastos, odontoblastos e a

presença de epitélio externo (EpExt) e interno (EpInt) nas alças cervicais (adaptado de Wang et al., 2007).....52

Figura 4.1 -Radiografias de alguns dentes com variadas indicações de exodontia utilizados no estudo e respectivas nomenclaturas de linhagens estabelecidas. A, linhagem RO1, dente hígido semi-incluso; B, linhagem RO3, dente cariado; C, linhagem RO15, dente hígido incluído impactado; D, linhagem RO8, dente com cárie extensa com comprometimento de furca e polpa necrosada; E, linhagem RO9, raiz residual; e F, linhagem RO10, raiz residual com lesão periapical.....57

Figura 4.2 -Obtenção das amostras, cultura primária através da técnica de explante e separação magnética. A, foto do procedimento de curetagem para obtenção do material; B, material curetado; C, fragmentos de raspado alveolar em placa de cultivo celular; D, fotomicroscopia de células proliferando a partir do explante de material curetado do alvéolo dental; E, momento da separação magneticamente mediada.....61

Figura 4.3 -Aspecto da gota de 5 µl de células antes da indução condrogênica.....68

Figura 4.4 -Transplante de células Stro-1⁺, CD146⁺ e suas respectivas populações negativas derivadas de curetagem do alvéolo dental em dorso de camundongos imunocomprometidos. A. Pesagem da hidroxiapatita em balança de precisão, em ambiente limpo, dentro de fluxo laminar. B, detalhe da hidroxiapatita sem as células. C, detalhe das células associadas a hidroxiapatita. D, incisão no dorso do animal. E, colocação dos transplantes. F, pós-cirúrgico imediato com áreas de transplante suturadas. G, áreas de transplante no detalhe com seus respectivos enxertos após 30 dias de transplante.....70

Figura 5.1 -Tecido e células derivadas de curetagem do alvéolo dental. A, Aspecto histológico do tecido coletado apresentando fragmentos de osso alveolar maduro e tecido conjuntivo, H.E, aumento de 10x. B, morfologia das células derivadas do tecido coletado apresentando células alongadas de aspecto fusiforme, semelhantes a fibroblastos, 100x. C, células positivas para Vimentina, aumento de 200x. D, células negativas para AE1/AE3, aumento de 200x. E, células positivas para Stro-1, aumento de 200x. F, células positivas para CD146, aumento de 200x. G, H e I, Células com dupla marcação para Stro-1 e CD146, aumento de 200x.....81

Figura 5.2 -Expressão de marcadores de células-tronco presentes nas populações celulares isoladas Stro-1 positivas (Stro-1⁺), CD146 positivas (CD146⁺), Stro-1 negativas (Stro-1⁻) e CD146 negativas (CD146⁻) plaqueadas na 3ª Passagem. Aumento de 400x.....85

Figura 5.3 -Unidades Formadoras de Colônias de populações Stro-1⁺, CD146⁺ e seus respectivos controles negativos, derivadas de tecido alveolar humano curetado. A, B e C, colônias derivadas da população Stro-1⁺. D, E e F, colônias derivadas da população Stro-1⁻. G, H e I, colônias derivadas da população CD146⁺. J, K e L, colônias derivadas da população CD146⁻. A, D, G e J, colônias formadas a partir de populações derivadas do doador RO9. B, E, H e K, fotomicroscopia do centro

das colônias formadas em cada população, aumento de 100x. C, F, I e L, fotomicroscopia da borda das colônias formadas a partir de cada população, a seta vermelha indica onde se encontra a borda, aumento de 100x.....88

Figura 5.4 -Ensaio de migração celular. A, B, C e D fotomicrografia da fenda recém efetuada, considerado 1º dia, em destaque a área da fenda sem células contornada pela linha preta. E, F, G e H, área da fenda contendo células migratórias após 8 dias de cultivo. Em E observa-se células Stro-1⁺ com a fenda totalmente fechada, enquanto em F, G e H vê-se em destaque áreas sem células delineadas com linha preta. I e J, população Stro-1⁻ e CD146⁺, respectivamente, apresentando a fenda fechada no 10º dia de cultivo. K, população CD146⁻ ainda com área remanescente de fenda no 10º dia de cultivo. L, população CD146⁻ apresentando fenda totalmente fechada no 12º dia de cultivo.....90

Figura 5.5 -Indução osteogênica nas populações enriquecidas em Stro-1⁺ e CD146⁺ derivadas de curetagem de osso alveolar humano. A e C, respectivamente, populações Stro-1⁺ e CD146⁺ induzidas apresentando extensas áreas de mineralização com positividade para alizarina vermelha. B, população Stro-1⁻ apresentando poucas áreas de mineralização positivas para alizarina vermelha. D, população CD146⁻ apresentando raras áreas de mineralização positivas para alizarina vermelha. E-H, Controle negativo. Setas em azul indicando áreas de mineralização.....91

Figura 5.6 -Indução adipogênica nas populações enriquecidas em Stro-1⁺ e CD146⁺ derivadas de curetagem de osso alveolar humano. A e C, populações Stro-1⁺ e CD146⁺, respectivamente, apresentando células com vesículas adipogênicas positivas para óleo O vermelho. B, população Stro-1⁻ apresentando células negativas para o óleo O vermelho. D, população CD146⁻ apresentando células negativas para o óleo O vermelho. E-H, controle apresentando células negativas ao óleo O vermelho. A-H, fotos em aumento de 400x.....92

Figura 5.7 -Indução condrogênica nas populações enriquecidas em Stro-1⁺ e CD146⁺ derivadas de curetagem de osso alveolar humano. A-D, aspecto das células após 4 dias de indução condrogênica em placas de cultivo, aumento de 100x. E-H, aspecto das células após 14 dias de indução condrogênica coradas por azul de alciano, aumento de 100x. I-L, secções das esferas formadas por células diferenciadas após 14º dia de indução e coradas com azul de alciano, aumento de 1000x. M-J, secções das esferas formadas por células diferenciadas após 14º dia de indução e coradas com hematoxilina, aumento de 1000x. Q-T, controle negativo, células cultivadas em meio convencional e coradas com azul de alciano apresentando marcação negativa, aumento de 100x. U-X, controle negativo, células cultivadas em meio convencional e coradas com hematoxilina de Harris, aumento de 100x.....93

Figura 5.8 - Fotomicroscopia das colônias antes das células serem removidas e re-submetidas a diferenciação. Todas as células obtidas de colônias derivadas das diferentes populações estudadas apresentaram morfologia e arranjo celular semelhante. A, colônia de células Stro-1⁺. B, colônia de células Stro-1⁻. C, colônia de célula CD146⁺. D, colônia de células CD146⁻. Aumento de 100x.....94

Figura 5.9 -Diferenciação adipogênica e osteogênica em clones isolados das populações Stro-1⁺, Stro-1⁻, CD146⁺ e CD146⁻ na 3^o passagem. A- D, células induzidas para diferenciação adipogênica, coradas com óleo O vermelho. A, células derivadas de clones Stro-1⁺ apresentando vesículas adipogênicas positivas para óleo O vermelho. B, células clones da população Stro-1⁻ apresentando células com pequenas vesículas positivas para óleo O vermelho. C, células clones da população CD146⁺ negativas para óleo O vermelho. D, células clones da população CD146⁻ com vesículas adipogênicas positivas para óleo O vermelho, destacadas pelas setas em preto. A e D, as setas em preto destacam as vesículas de lipídeos. E-H, células induzidas para diferenciação osteogênica coradas com alizarina vermelha apresentando cristais de mineralização positivos para a coloração. E, células clones derivadas da população Stro-1⁺. F, células clones derivadas da população Stro-1⁻. G, células clones derivadas da população CD146⁺. H, células clones derivadas da população CD146⁻. E e F, as setas em azul destacam os grandes cristais de mineralização presentes nas populações positivas. Aumento de 400x.....95

Figura 5.10 -Imagens histológicas dos transplantes efetuados com as populações Stro-1⁺ e CD146⁺ após 20 e 30 dias em dorso de camundongos imunossuprimidos. A-E, aspectos histológicos dos transplantes após 30 dias de cirurgia. F-J aspectos histológicos dos transplantes após 20 dias de cirurgia. A, grupo controle, após 20 dias, apresenta material carreador envolto por tecido de granulação rico em fibroblastos jovens, vasos sanguíneos e presença de células multinucleadas (reação de corpo estranho). B Células Stro-1⁺ com hidroxiapatita/fosfato tricálcico, após 20 dias, apresenta quadro histológico semelhante com o grupo controle e pequenas áreas de formação de matriz óssea. C, células Stro-1 negativas com hidroxiapatita, após 20 dias, apresenta quadro semelhante ao grupo controle, apresenta reação de corpo estranho. D, células CD146⁺ com hidroxiapatita/fosfato tricálcico, após 20 dias, apresenta quadro igual ao controle negativo. E, células CD146 negativas com hidroxiapatita/fosfato tricálcico, após 20 dias, apresenta quadro semelhante ao controle negativo. F, grupo controle, após 30 dias, apresenta material carreador envolto por matriz óssea e tecido conjuntivo com vasos sanguíneos neoformados e presença de algumas células gigantes multinucleadas. G, células Stro-1⁺ com hidroxiapatita/fosfato tricálcico, apresenta quadro semelhante ao grupo controle, porém com mais exuberância de matriz óssea. H, células-Stro-1 negativas com fosfato tricálcico, apresenta pouca ou ausência de matriz óssea. I, células CD146⁺ com hidroxiapatita/fosfato tricálcico, apresenta um quadro semelhante ao grupo controle, porém com menos exuberância de matriz óssea. J, células CD146 negativas com hidroxiapatita/fosfato tricálcico, após 30 dias, apresenta pouca ou ausência de matriz óssea. Coloração de H.E., aumento de 200x.....98

Figura 5.11 - Distribuição das populações positivas para os marcadores de células-tronco mesenquimais CD90, CD105 e CD73 em polpa dental de incisivos de camundongos em diferentes idades. A, Distribuição das populações celulares presentes na idade PN10. B, Distribuição das populações celulares presentes na idade adulta. Valores em porcentagem.....102

Figura 5.12 - Localização de células de diferentes tempos de ciclagem e expressão de Patched e CD90 em incisivos de camundongos. A, células de ciclagem lenta positivas para BrdU em marrom localizadas na porção apical próximas às alças cervicais. B, células de ciclagem rápida positivas para o BrdU localizadas mais ao centro da polpa e abaixo da alça cervical labial. C, células fracamente positivas para o BrdU em região entre as células de ciclagem lenta e de ciclagem rápida. D, células positivas para Patched em vermelho localizadas na porção mais apical do dente e entre as alças cervicais em corte de incisivo. E, células positivas para o CD90 em verde, em maior número concentradas logo abaixo da alça cervical labial, por imunofluorescência em “whole mount”. F, desenho esquemático das populações encontradas pela incorporação de BrdU.....106

Figura 5.13 - Análise por citometria de fluxo de células CD90+ e BrdU+ em polpa de incisivos de camundongos nos grupos estudados. A, Grupo 1, células de ciclagem lenta (CCL) positivas para BrdU em azul e co-expressas com CD90 em vermelho; B, Grupo 2, células de ciclagem intermediária (CCI) positivas para BrdU em azul e co-expressas com CD90 em vermelho; C, Grupo 3, células de ciclagem rápida (CCR) positivas para BrdU em azul e co-expressas com CD90 em vermelho. D, gráficos representativos da análise por citometria de fluxo nos grupos estudados e seus respectivos controles IgG. Valores expressos em porcentagem.....107

Figura 5.14 - Porcentagem de células CD90+ na população BrdU+ e células BrdU+ na população de células CD90+.....108

Figura 5.15 - Resultados da análise por citometria de fluxo de células Patched+ e modelo de nicho de células-tronco em incisivos de camundongos. A, porcentagem das populações de diferentes ciclagens celulares em relação às células de polpa dental de acordo com a expressão de BrdU e CD90, B, porcentagem das diversas populações celulares encontradas na polpa dental para os marcadores moleculares CD90, CD105, CD73 e Patched. C, modelo esquemático das populações encontradas no nicho de células-tronco de incisivos de camundongos.....110

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Anticorpos primários utilizados e suas especificações.....	59
Tabela 4.2 - Anticorpos utilizados para quantificação de Stro-1 e CD146 por citometria de fluxo e suas especificações.....	63
Tabela 4.3 - Anticorpos primários utilizados e suas especificações.....	65
Tabela 4.4 - Anticorpos secundário utilizados e suas especificações.....	65
Tabela 4.5 - Anticorpos utilizados na análise por citometria de fluxo.....	74
Tabela 5.1 - Linhagens estabelecidas de acordo com a idade e sexo do paciente, dente relacionado ao alvéolo e sua condição e sucesso de obtenção de células.....	79
Tabela 5.2 - Número de células expressando Stro-1 e CD146 isoladas por MACS.....	82
Tabela 5.3 - Número de células expressando Stro-1 e CD146 por Citometria de Fluxo.....	82
Tabela 5.4 - Anticorpos primários utilizados para caracterização das linhagens celulares enriquecidas e sua expressão em cada linhagem.....	84
Tabela 5.5 - Porcentagem de células positivas para os marcadores de superfície CD90, CD105 e CD73 em polpa de incisivos de camundongos na idade PN5, PN10 e adultos.....	100
Tabela 5.6 - Porcentagem de células positivas para os marcadores de superfície CD90, CD105 e CD73 em polpa de molares de camundongos na idade PN5, PN10.....	103
Tabela 5.7 - Expressão de células positivas para CD90, CD105 e CD73 na polpa dental de incisivos e molares de camundongos em diferentes idades.....	104

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 5.1 - Curva de crescimento das populações isoladas de curetagem de alvéolo dental humano na passagem 3.....	86
Gráfico 5.2 - Número de unidades formadoras de colônias formadas a partir das populações isoladas dos doadores RO8, RO9, RO10 e RO16 plaqueadas na passagem 1.....	88
Gráfico 5.3 - Porcentagem da área de fenda coberta por células migratórias de acordo com os dias de cultivo.....	89
Gráfico 5.4 - Co-expressão de marcadores de células-tronco mesenquimais em polpa dental de incisivos de camundongos na idade P10 e adulta. Valores em porcentagem.....	101
Gráfico 5.5 - Distribuição de populações CD90+, CD105+ e CD73+ em polpa dental de incisivos e molares de camundongos em diferentes idades. Valores em porcentagem.....	104

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABMMSCs	Alveolar Bone marrow-derived mesenchymal stem cells
AM	Ameloblastos
BMP4	proteína morfogenética óssea-4
BrdU	5-bromo-2'-deoxyuridine
BSA	Bovine serum albumin
CCI	Células de ciclagem intermediária
CCL	Células de ciclagem lenta
CCR	Células de ciclagem rápida
CD	Cluster of Differentiation
cl ou CL	alça cervical
cm	mesênquima condensado
CTE(s)	Célula(s)-tronco embrionária(s)
CTH(s)	Célula(s)-tronco hematopoiética(s)
CTM(s)	Célula(s)-tronco mesenquimal(ais)
DAB	3,3'-Diaminobenzidina tetrahydroclorido
De	dentina
DFPCs	Dental follicle precursor cells
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimetil sulfóxido
dp	papila dental
DPSCs	Dental pulp stem cells
DPSCs	do inglês dental pulp stem cells
EDTA	Etilenodiaminatetraacetica ácida
eo	órgão do esmalte
ep. oral	epitélio oral
FGF-2	fator de crescimento de fibroblastos-2
GMPC	Gingival multipotent progenitor cell
IdU	5-Iodo-2'-deoxyuridina
IHE	Hematoxilina e eosina
IPEN	Instituto de pesquisas energéticas e nucleares
K14	Keratin 14

Kb	Kilobase
KCL	King's College London
m	molar
M	Molar (de peso molar)
MCAM	Melanoma Cell Adhesion Molecule
Micro-CT	Micro Computerised Tomography
MRC	Medical Research Council
MSCs	Mesenchymal stem cells
NG2	Neural/Glial Antigen 2
p	polpa
PcG	Polycomb group
PDGFR- β	Platelet-derived growth factor beta-receptor
PDL	do inglês, Periodontal ligament, ligamento periodontal
PDLSCs	Periodontal ligament stem cells
Sca-1	Stem cell antigen-1
SCAP	Stem cells from apical papilla
SFB	Soro Fetal Bovino
SHED	Stem cells from human exfoliated deciduous teeth.
Shh	Sonic hedgehog
Skp1	S-phase kinase-associated protein 1
Spry	Sprouty genes
TGF β	Transforming growth factor beta
UFC	Unidades formadoras de colônias
UFCs-F	Unidades formadoras de colônias-fibroblastos
USP	Universidade de São Paulo
vl	lâmina vestibular
VSEL	abreviação do inglês <i>very small embryonic-like stem cell</i>
vWF	von Willebrand factor
α AML	Alfa-actina de músculo liso
α MEM	Alfa- minimum essential medium

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	21
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	24
2.1 Células-tronco.....	24
2.1.1 Células-tronco mesenquimais.....	26
2.1.2 Células-tronco e nicho perivascular.....	29
2.1.3 Células-tronco em tecidos dentais humanos.....	32
2.1.3.1 Células-tronco de ossos gnáticos (medula e tábua óssea).....	35
2.1.4 Marcadores moleculares de células-tronco mesenquimais dentais.....	37
2.2 Tecidos dentais de humanos e de roedores.....	44
2.2.1 Periodonto.....	47
2.2.2 Odontogênese em dentes humanos e molares de camundongos.....	48
2.2.3 Incisivos de camundongos – Presença e regulação do nicho de células-tronco da alça cervical.....	50
3 PROPOSIÇÃO.....	55
3.1 Proposições específicas.....	55
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	56
4.1 Análises em tecidos derivados de curetagem alveolar após extração de dentes humanos.....	56
4.1.1 Obtenção das amostras.....	56
4.1.2 Cultivo das células do raspado de osso alveolar.....	57
4.1.3 Perfil de imunexpressão das linhagens antes da separação celular.....	58
4.1.4 Isolamento de populações enriquecidas em células-tronco.....	59
4.1.5 Quantificação de células por citometria de fluxo.....	61
4.1.6 Ensaio de proliferação celular.....	63
4.1.7 Capacidade de formação de colônias.....	64
4.1.8 Ensaio de migração celular.....	64
4.1.9 Perfil de imunexpressão das linhagens enriquecidas em células-tronco.....	64
4.1.10 Potencial de multidiferenciação in vitro.....	66
4.1.11 Estudo da diferenciação in vivo: transplante em animal imunocomprometido.....	69
4.2 Análises em polpas dentais de camundongos.....	70
4.2.1 Obtenção das amostras.....	71
4.2.2 Ensaios de citometria de fluxo.....	72
4.2.3 Ensaios de incorporação de BrdU.....	74

4.2.4 Detecção imuno-histoquímica.....	75
5 RESULTADOS.....	78
5.1 Isolamento e caracterização de células-tronco/progenitoras derivadas de curetagem de alvéolo dental humano após extração dentária.....	78
5.1.1 Linhagens celulares isoladas através de curetagem do osso alveolar.....	78
5.1.2 Caracterização inicial das células obtidas: análises das populações mistas antes do isolamento.....	80
5.1.3 Caracterização das células isoladas Stro-1 ⁺ , CD146 ⁺ e controles negativos.....	83
5.1.3.1 análise do perfil de expressão de marcadores de células-tronco.....	83
5.1.3.2 ensaio de proliferação.....	86
5.1.3.3 capacidade de formação de colônias.....	86
5.1.3.4 ensaio de migração.....	89
5.1.3.5 diferenciação <i>in vitro</i>	91
5.1.3.6 diferenciação de células re-expandidas a partir de colônias.....	94
5.1.3.7 ensaios <i>in vivo</i>	95
5.2 Polpa dental de camundongos e marcadores de células-tronco mesenquimais.....	99
5.2.1 Co-expressão de marcadores de células-tronco em polpas de camundongo - Análise quantitativa em diferentes fases do desenvolvimento dental de incisivos de molares.....	99
5.2.2 Células de ciclagem lenta – Localização e co-expressão com marcadores de células-tronco mesenquimais em incisivos.....	104
6 DISCUSSÃO.....	111
6.1 É possível isolar células-tronco/progenitoras através da curetagem do alvéolo dental após extração dental.....	111
6.2 Polpas dentais de camundongos apresentam uma diversidade de populações de células que se modificam conforme a idade e compõe o nicho de células-tronco mesenquimais.....	118
7 CONCLUSÕES.....	125
REFERÊNCIAS.....	126
ANEXOS	153

1 INTRODUÇÃO

Não existe um marcador único e exclusivo para células-tronco mesenquimais (CTMs). Consequentemente, não existe uma maneira simples para a identificação e para o isolamento dessas células (Horwitz et al., 2005; Dominici et al., 2006; Orbay et al., 2012; Crisan et al., 2012; Park et al., 2013). Assim, para se trabalhar com CTMs é necessário fazer seu isolamento através do uso de marcadores que também estão expressos em outros tipos celulares. Como não há um marcador específico, não há também uma assinatura exclusiva para células-tronco e portanto, sua caracterização se dá através da combinação de ensaios que evidenciam propriedades que sabidamente existem nessas células.

Entre os marcadores mais utilizados na literatura pertinente estão CD90, CD105, CD73, CD146, e Stro-1. Esses marcadores são utilizados para a identificação, isolamento e caracterização de CTMs em variados tecidos de diferentes espécies (Barry et al., 2001; Horwitz et al., 2005; Dominici et al., 2006; Lorenz et al., 2008; Boneberg et al., 2009; Xu et al., 2009; Alt et al., 2011; Iohara et al., 2011; Liu et al., 2011; Mafi et al., 2011; Karamzadeh et al., 2012; Mitterberger et al., 2012; Crisan et al., 2012; El- Sayed et al., 2012; Orbay et al., 2012; Park et al., 2012, 2013; Wang et al., 2013). No entanto, o marcador Stro-1 apresenta especificidade controversa em tecidos de camundongos e é portanto, evitado nesses animais (Kemoun et al., 2007; Ishikawa et al., 2012; James et al., 2012; Rizk et al., 2013). Boa parte dos marcadores moleculares utilizados para caracterizar populações de células-tronco o fazem em células sob condições de cultivo e são pobremente estudados *in vivo* (Horwitz et al., 2005; Dominici et al., 2006; Park et al., 2013).

Estudos prévios de nosso grupo mostraram que células de ciclagem lenta e capazes de migrar em resposta a injúria, propriedades sabidamente encontradas em células-tronco (Feng et al., 2011), se localizam no interior da polpa dental na região da alça cervical (Feng et al., 2011; Seidel et al., 2010) e na região do periodonto adjacente à raiz (dados não publicados explicitados no Anexo C). Esses estudos serviram de base para o presente trabalho que será apresentado em duas partes, sendo a primeira a respeito de células-tronco em região de periodonto e a segunda a respeito de células-tronco em polpa.

Uma fonte pouco estudada de CTMs no periodonto, é representada pela população derivada do osso alveolar. Esse tecido é bem celularizado e está em constante remodelação sob forças fisiológicas (Iliopoulos et al., 2010; Gili et al., 2012). As CTMs do alvéolo dental já foram obtidas em casos de extração de terceiros molares impactados (Matsubara et al.,

2005; El Sayed et al., 2012), cirurgias paraendodônticas (Matsubara et al., 2005) e remoção de dentes supranumerários (Han et al., 2009). Em comum, em todos esses casos foi aspirada a medula óssea do osso alveolar (Matsubara et al., 2005; Han et al., 2009) ou necessária a remoção de um fragmento do osso (El-Sayed et al., 2012). Todavia, após as extrações dentais, o procedimento de curetagem óssea é rotineiro e tem por objetivo a limpeza do alvéolo, (principalmente infectado), o estímulo ao sangramento para cicatrização e a remoção de espículas ósseas remanescentes caso presentes (Jofre et al., 2012; Chrcanovic et al., 2013).

Considerando o acima exposto, a primeira parte desse estudo visa utilizar a curetagem alveolar após extração dentária para isolar populações de células positivas para marcadores de células-tronco previamente descritos na literatura. Os marcadores escolhidos para esse fim são o Stro-1 e CD146. A curetagem do alvéolo dental foi escolhida pois é de fácil realização, possui baixa morbidade e ainda aponta para a possibilidade de obtenção de células-tronco em um momento onde acreditava-se não ser mais possível o isolamento das mesmas. Após o isolamento as populações foram submetidas a uma combinação de diferentes ensaios para a sua caracterização.

A segunda parte desse trabalho visa utilizar a polpa dental de camundongos para estudos *in vivo*. Esse modelo foi escolhido pois os incisivos de roedores apresentam crescimento contínuo em resposta ao desgaste que ocorre na sua porção incisal (Thesleff; Sharpe, 1997; Tucker; Sharpe, 2004). Esse crescimento deve-se a existência de células-tronco presentes na alça cervical localizada no ápice da raiz (Harada et al., 1999; Harada et al., 2002a; 2002b; Ohazama et al., 2010; Tummers et al., 2007; Tummers; Thesleff, 2008; Seidel et al., 2010; Feng et al., 2010; Lapthanasupkul et al., 2012). A alça não se fecha e portanto, o incisivo de camundongo mimetiza um dente humano no início da rizogênese. Essas características nos permitem estudar um dente que apresenta um nicho de células-tronco em local conhecido e em constante atividade.

Os nichos de CTMs são constituídos por células-tronco propriamente ditas, células progenitoras e células de suporte. É esse microambiente que controla o destino das células-tronco sinalizando para a auto-renovação ou para a diferenciação. Nos nichos, essas células permanecem quiescentes, somente replicando se forem estimuladas (Scadden, 2006). Segundo a literatura pertinente, a estrutura celular do nicho provavelmente é mantida em diferentes localizações e espécies multicelulares (Mitsiadis et al., 2007; Disher et al., 2009; Meirelles et al., 2006; Feng et al., 2010; Feng et al., 2011; Ghaemi et al., 2013).

Embora o nicho de células-tronco em incisivos de camundongos já tenha sido identificado na região da alça cervical (Harada et al., 1999; Harada et al., 2002a; 2002b;

Tummers et al., 2007; Tummers; Thesleff, 2008; Ohazama et al., 2010; Seidel et al., 2010; Feng et al., 2010; Lapthanasupkul et al., 2012), pouco se sabe sobre sua composição celular. Assim, fica claro que a identificação e caracterização dos tipos celulares constituintes desse nicho é de suma importância para o entendimento da biologia das células-tronco.

Assim, na segunda parte desse trabalho, nosso objetivo é estudar a expressão de marcadores de células-tronco mesenquimais em incisivos e molares de camundongos em diferentes fases do desenvolvimento dental. Os marcadores utilizados para tanto são CD90, CD73 e CD105. Além disso, também utilizamos a incorporação de BrdU para localização de células com tempos de ciclagem diferentes e análises imuno-histoquímicas para as proteínas CD90, Patched e Ring 2/1B/RNF para a identificação de subgrupos populacionais na polpa dental de incisivos de camundongos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Abaixo segue uma breve revisão da literatura sobre células-tronco, tecidos dentais e em seguida os resultados obtidos pelo nosso grupo a fim de esclarecer um pouco mais sobre este assunto tão interessante que é o mundo das células-tronco.

2.1 Células-tronco

Células-tronco são definidas como células indiferenciadas, com potencial clonogênico, capazes de auto-renovação e de diferenciação multi-linhagem (Bianco et al., 2008).

Certos conceitos, são utilizados para definir as células-tronco de acordo com seu comportamento ou tecido de origem. De acordo com a capacidade de diferenciação, também conhecida como plasticidade, as células-tronco são comumente subdivididas em (Bianco et al., 2008; Martin-Rendon; Watt, 2003; Alison; Islam, 2009):

- totipotentes: são células-tronco capazes de gerar todos tipos de tecidos existentes em um organismo, um exemplo é o zigoto.

- pluripotentes: são células-tronco capazes de formar qualquer tecido derivado dos três folhetos embrionários (ectoderme, endoderme e mesoderme), porém não são capazes de formar os tecidos extra-embrionários como a placenta, exemplo são as células-tronco embrionárias e células iPS.

- multipotentes: são células-tronco que apresentam capacidade de diferenciação mais limitada, não sendo capazes de se diferenciar em todos tipos de tecidos. Exemplo: células-tronco mesenquimais, que diferenciam-se em diversos tecidos, porém limitam-se a tecidos mesenquimais.

Segundo o tecido de origem, as células-tronco podem ser subdivididas em:

-Células-tronco embrionárias (CTEs) - obtidas a partir das células da massa interna de embriões na fase de blastocisto. Essas células são capazes de todos os tecidos embrionários e são, portanto, pluripotentes (Evans; Kaufman, 1981; Martin, 1981; Thomson et al., 1998).

-Células-tronco pluripotentes-induzidas (iPSCs, do inglês *induced pluripotent stem cells*), possuem propriedades semelhantes às CTEs, porém são originadas a partir de células adultas geneticamente alteradas em laboratório (Takahashi; Yamada, 2006).

-Células-tronco adultas (CTAs) - encontradas em diversos tecidos, são responsáveis pelo crescimento, manutenção da homeostase e reparação dos tecidos adultos, porém, possuem capacidade de diferenciação multi-linhagem limitada. Neste grupo encontram-se as células-tronco mesenquimais (onde se enquadra a maior parte de células-tronco derivadas de tecidos dentais), epiteliais e hematopoiéticas (Alison; Islam; 2009). As células-tronco adultas são geralmente multipotentes.

As células-tronco são capazes de proliferar através da divisão assimétrica (Figura 2.1). Assim, durante a divisão, as células-tronco podem gerar duas filhas idênticas ou uma célula-filha idêntica à célula mãe (célula-tronco) e outra pouco diferenciada, denominada também como célula transiente-amplificada (TA) (Bianco et al., 2008; Sarugaser et al., 2009; Yadlapalli; Yamashita, 2013).

As células que são geradas durante a divisão assimétrica são conhecidas por suas propriedades migratórias e podem originar outras células progenitoras intermediárias e células mais diferenciadas, que vão constituir tecidos ou órgãos (Bianco et al., 2008; Sarugaser et al., 2009; Yadlapalli; Yamashita, 2013).

Figura 2.1- Desenho ilustrativo da divisão assimétrica das células-tronco gerando células-filhas idênticas indiferenciadas (em azul) promovendo a auto-renovação celular e células progenitoras pouco diferenciadas (em cinza) que tornam-se em células diferenciadas (em verde)

2.1.1 Células-tronco mesenquimais

O primeiro a postular a existência de uma única célula progenitora no mesênquima, capaz de originar outros tipos de células (todas as células sanguíneas) foi o histologista e embriologista russo Alexandre Alexandrowitsch Maximow (Maximov, 1909). Entretanto, somente a partir dos anos 1960s é que houve o reconhecimento de sua pesquisa através de achados demonstrados por estudiosos como Friedenstein e colaboradores, Ernest A. McCulloch e James E Till, (Maximow, 1909; Till; McCulloch, 1961; Friedenstein et al., 1970a; 1970b; Friedenstein et al., 1968; Latsinik et al., 1970; Friedenstein, 1980; Friedenshtein; Lurija, 1980; Friedenstein et al., 1974; Friedenstein et al., 1987; Luria et al., 1987).

Till e McCulloch (1961) foram capazes de demonstrar que células da medula óssea removidas de um camundongo saudável, quando transplantadas em um camundongo

irradiado/imunossuprimido, eram capazes de repopular a medula do animal receptor e apresentar capacidade clonal (Till; McCulloch, 1961).

Posteriormente, Friedenstein e colaboradores, reconhecendo os postulados de Maximow, foram os primeiros a isolar essas células da medula óssea (Friedenstein et al., 1970a e b; Friedenstein et al., 1968; Latsinik et al., 1970; Friedenstein, 1980; Friedenshtein; Lurija, 1980; Friedenstein et al., 1974; Friedenstein et al., 1987; Luria et al., 1987; Owen; Friedenstein, 1988). Esses autores demonstraram que essas células apresentavam morfologia semelhante a fibroblastos, aderência à placa de cultivo e capacidade clonogênica, ou seja, capacidade de formar unidades formadoras de colônias-fibroblastos (UFCs-F). Ao expandirem células derivadas das UFCs-F e induzirem a diferenciação, essas células apresentaram capacidade de se transformar em osteoblastos, condrócitos e adipócitos e de reconstituir um estroma hematopoiético a partir de uma única célula clonal transplantada em modelo *in vivo* (Friedenstein et al., 1970a e b; Friedenstein et al., 1968; Latsinik et al., 1970; Friedenstein, 1980; Friedenshtein; Lurija, 1980; Friedenstein et al., 1974; Friedenstein et al., 1987; Luria et al., 1987; Owen; Friedenstein, 1988). A estas células foi dado o nome de células-tronco estromais (do inglês *stromal stem cells*) por Owen e Friedenstein (1988) e esse nome foi posteriormente adaptado, por Caplan (1991), para células-tronco mesenquimais (CTMs) (MSC, do inglês *mesenchymal stem cells*), (Caplan, 1991; Pittenger et al., 1999).

Além das propriedades de células-tronco acima citadas (capacidade de diferenciação multilinhagem e auto-renovação), as CTMs também possuem capacidade imunomodulatória (Tomic et al., 2011; Zhao et al., 2012; Li et al., 2013). Em 2002, Bartholomew et al. observaram que CTMs da medula de babuínos inibiam a proliferação de linfócitos *in vitro* e prolongavam a sobrevida de enxertos de pele *in vivo* (Bartholomew et al., 2002). Estudos subsequentes com células humanas têm demonstrado que além de causar diminuição da resposta inflamatória no local de enxertia, as CTMs também são capazes de proporcionar uma matriz extracelular mais organizada (Sorrell; Caplan, 2010). Nesse sentido, enxertos autólogos de CTMs de medula óssea foram realizados em feridas extensas na cauda de camundongos diabéticos não imunossuprimidos. As lesões onde as CTMs foram aplicadas em camundongos foram curadas mais rapidamente de forma significativa. Isso também foi observado em enxertos autólogos de CTMs associados a spray de fibrina no tratamento de feridas crônicas e feridas extensas de indivíduos que sofreram tratamento cirúrgico de câncer de pele em humanos (Falanga et al., 2007). Sabe-se que o efeito imunossupressor e imunorregulador das CTMs não se limita aos linfócitos, mas também influencia outras células do sistema imune inibindo a maturação das células dendríticas, células natural killer e

macrófagos, de forma a mediar tanto a imunidade inata quanto a adaptativa (Yañez et al., 2006; Yoo et al., 2009).

Populações de CTMs são encontradas em diferentes tecidos adultos como o tecido adiposo (Mizuno et al., 2012) e tecidos dentais (Gronthos et al., 2000; Handa et al., 2002a; 2002b; Shi; Gronthos, 2003; Miura et al., 2003; Matsubara et al., 2005; Seo et al., 2004, 2009; Sonayama et al., 2008; Han et al., 2009; Zhang et al., 2009; Fournier et al., 2010; Huang et al., 2010; El-Sayed et al., 2012).

Mediante ao grande crescimento de estudos sobre as células-tronco encontradas em diversos tecidos, em 2006 foi estabelecido pelo Comitê de Células-tronco Mesenquimais e Teciduais da Sociedade Internacional de Terapia Celular os seguintes critérios mínimos para caracterização das células-tronco mesenquimais (Dominici et al., 2006). Segundo esses critérios, as células-tronco mesenquimais devem:

1) Apresentar capacidade de aderência ao plástico em condições de cultivo celular;

2) Apresentar o seguinte painel de marcadores moleculares:

-Expressar em mais de 95% da população celular os marcadores CD73 (ecto-5'-nucleotidase), CD90 (Thy1) e CD105 (endoglin);

-Expressar em menos de 2% da população antígenos hematopoiéticos como o CD45 (marcador pan-leucócitos), CD34 (marcador de células progenitoras hematopoiéticas e endotheliais), CD14 ou CD11b (marcador de monócitos e macrófagos), CD79 α ou CD19 (marcador de células B) e moléculas de superfície HLA-DR;

3) Ter capacidade de diferenciação *in vitro* para tecidos osteogênicos, condrogênicos e adipogênicos.

Este comitê também adotou um novo nome às CTMs chamando-as de células mesenquimais estromais. No inglês a abreviação deste termo 'mesenchymal stromal cells' (MSC) é o mesmo do termo células-tronco mesenquimais (do inglês 'mesenchymal stem cells', MSC) (Horwitz et al., 2005). Logo, encontramos trabalhos com ambas terminologias.

Porém, alguns estudos demonstraram que considerar apenas os critérios acima não definem as células-tronco mesenquimais. Quando linhagens comerciais de fibroblastos de pele são comparadas às CTMs de tecido adiposo, ambas apresentam os mesmos marcadores moleculares, possuem morfologia fibroblástica, capacidade de aderência ao plástico e capacidade de diferenciação nos tecidos ósseo, cartilaginoso e adiposo (Alt et al., 2011; Hematti, 2012).

Deve-se salientar que estas características das CTMs são baseadas em condições de cultivo celular e pouco se sabe sobre quanto tempo estas células mantêm suas características naturais após serem removidas de seu microambiente natural (Uccelli et al., 2008).

2.1.2 Células-tronco e nicho perivascular

As células-tronco em tecidos adultos servem como um reservatório para manter o crescimento e reparo. *In vivo*, essas células são mantidas em um microambiente denominado nicho (Schofield, 1978), que é responsável por manter a população de células-tronco controlando a diferenciação ou auto-renovação (Scadden, 2006).

O nicho é constituído pelas células-tronco propriamente ditas, por células progenitoras e células diferenciadas. Esse microambiente é controlado através de fatores liberados na matriz extracelular, estimulação parácrina, fatores de crescimento, além de aspectos mecânicos como adesão célula-célula ou contato célula-matriz extracelular (Figura 2.2) (Disher et al., 2009; Ghaemi et al., 2013).

Figura 2.2 - Nicho de células-tronco mesenquimais (CTMs). CTMs em seu nicho perivascular interagindo com: 1) outras células através de moléculas de adesão, como caderinas, 2) outras CTMs, 3) matriz extracelular (MEC) e 4) moléculas sinalizadoras como neurotransmissores emitidos por neurônios, hormônios, fatores de crescimento, níveis de nutrientes, sinais de saturação de oxigênio transmitidos pelo sistema vascular e outros estímulos autócrinos e parácrinos produzidos dentro do nicho pelas células-tronco e células vizinhas (adaptado de Ghaime et al., 2013)

As células-tronco mesenquimais são distribuídas nos tecidos adultos e sob certas condições patológicas e fisiológicas essas células podem migrar para outros tecidos mais distantes (Meirelles et al., 2006). Primeiramente acreditava-se que as células-tronco mesenquimais, assim como as células-tronco hematopoiéticas, migravam da medula óssea para repor os tecidos distantes via circulação sanguínea (Caplan 1994). Porém, a variável quantidade de células-tronco mesenquimais encontrada na circulação sanguínea e a falha da comprovação dessa capacidade de migração fez com que estudiosos procurassem outra origem para essas células (Karp et al., 2009). Uma fonte sugerida foi a parede de vasos sanguíneos (Bianco et al., 2008; Shi; Gronthos, 2003; Caplan, 2009; Feng et al., 2010).

Songtao Shi e Stan Gronthos (Shi; Gronthos, 2003) ao analisarem células-tronco Stro-1⁺ derivadas de polpa dental e medula óssea humana, observaram que as ambas populações isoladas co-expressavam marcadores relacionados a vasos sanguíneos, como o CD146, α -actina de músculo liso (α -AML) e 3G5. Também observaram a co-expressão de Stro-1 e CD146 nos tecidos estudados e encontraram células positivas em íntimo contato com vasos sanguíneos, sugerindo que essas duas populações, derivadas de fontes distintas (polpa dental e medula óssea), estavam associadas a células perivasculares (Shi; Gronthos, 2003).

Outra evidência de origem perivascular está relacionada a densidade vascular dos tecidos e a quantidade de células-tronco obtidas a partir deles. Indivíduos com mais idade que apresentam densidade vascular reduzida, quando comparados com indivíduos mais jovens, apresentam células com capacidade clonal em menor quantidade (Caplan, 2009). Este achado foi também observado em estudo analisando a quantidade de vascularização presente em tecido adiposo equino e o número de células-tronco obtidas a partir deste tecido. O tecido adiposo pouco vascularizado apresentava um menor número de células-tronco (Meirelles et al., 2008).

Em camundongos, células-tronco mesenquimais foram isoladas de diferentes órgãos e tecidos (cérebro, fígado, baço, rim, pulmão, medula óssea, timo e pâncreas) com uso de marcadores de pericitos, e comparadas com células derivadas de grandes vasos como artéria aorta e veia cava, e de pequenos vasos do glomérulo renal. As células isoladas de todas as origens apresentavam capacidade de proliferação extensa e compartilham marcadores em comum como o CD44, CD29, CD49a e α AML. De forma interessante, as células derivadas de vasos sanguíneos também foram capazes de apresentar capacidade de diferenciação em osso e tecido adiposo, apesar dos diferentes graus de diferenciação encontrados entre os tecidos estudados (Meirelles et al., 2006). Baseado nestes resultados os autores concluem que as células-tronco mesenquimais apresentam localização perivascular e virtualmente se encontram em todos os tecidos do organismo (Meirelles et al., 2006).

Entre os marcadores encontrados em pericitos estão o FGF-2 (do inglês, fibroblast growth factor-2), PDGFR- β (do inglês, platelet-derived growth factor receptor-beta), NG2 (um proteoglicano, do inglês Neural/Glial Antigen-2), moléculas de adesão CD166 e CD146, integrina- α -5 e outras moléculas como CD73 (proteína de adesão vascular-linfocítica-2), α -actina de músculo liso (α -AML) e 3G5 (revisado por Díaz-Flores et al., 2009). Todos esses marcadores já foram encontrados também em células-tronco mesenquimais (Shi; Gronthos, 2003; Meirelles et al., 2006; Schwab; Gargett, 2007; Sacchetti et al., 2007; Feng et al., 2010; Feng et al., 2011; Crisan et al., 2012).

Estudos mostraram que células CD146⁺ isoladas de diferentes tecidos humanos como medula óssea (Sacchetti et al., 2007; Crisan et al., 2008), cordão umbilical (Baksh et al., 2007; Iwasaki et al., 2012; Kouroupis et al., 2013), tecido adiposo (Zannettino et al., 2008; James et al., 2012), endométrio (Schwab; Gargett, 2007) e tecidos dentais como papila apical (Bakopoulou et al., 2013) e ligamento periodontal (Xu et al., 2009; Hidaka et al., 2012) apresentam capacidade clonogênica, potencial de diferenciação multilinhagem para tecido

osteogênico, condrogênico e adipogênico, e apresentam expressão de marcadores previamente encontrados em células mesenquimais estromais (Schwab; Gargett, 2007; Baksh et al., 2007, Zannettino et al., 2008; Nombela-Arrieta et al., 2011; James et al., 2012; Crisan et al., 2012),

Recentemente foi comprovado por nosso grupo que células-tronco mesenquimais de origem perivascular são capazes de migrar e promover o reparo tecidual *in vivo* (Feng et al., 2011) Isto foi observado em animais transgênicos NG2cre/Rosa26, que ao receberem uma dose específica de tamoxifeno apresentavam células Neural/Glial Antigen-2 (NG2) (pericitos) positivas que podiam ser detectadas com beta-galactosidase. Desta forma essas células puderam ser rastreadas e sua progenia pôde ser acompanhada. Após a indução de injúria na polpa dental desses animais transgênicos, as células NG2 positivas migravam e eram capazes de formar novos odontoblastos. No entanto, também ficou claro que nem todas as células que se diferenciavam eram provenientes dos pericitos NG2 positivos. Esse resultado claramente mostrou que existem pelo menos duas origens para as células-tronco mesenquimais em polpa dental e uma dessas origens é nitidamente a partir de pericitos locais (Feng et al., 2011).

2.1.3 Células-tronco em tecidos dentais humanos

A descoberta de células-tronco em tecidos dentais teve início com Gronthos et al. em 2000. Esses autores constataram que células de polpa de dentes permanentes humanos apresentavam características de células-tronco (Gronthos et al., 2000; Shi et al., 2001; Gronthos et al., 2002). A partir deste momento, as células-tronco foram encontradas em diversos tecidos dentais humanos (Figura 2.3). Estas células são classificadas como células mesenquimais adultas sendo citadas na literatura da seguinte forma:

DPSCs (do inglês Dental Pulp Stem Cells), células derivadas de polpa de dente permanente (Gronthos et al., 2000; Shi et al., 2001; Gronthos et al., 2002).

SHED (do inglês Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous teeth), são as células-tronco originadas de polpa de dente decíduo humano exfoliado (Miura et al., 2003).

PDLSCs (do inglês Periodontal Ligament Stem Cells), células-tronco derivadas do ligamento periodontal (Seo et al., 2004).

SCAP (do inglês Stem Cell from Apical Papilla), células-tronco derivadas da papila apical (Sonoyama et al., 2006).

DFPCs (do inglês, Dental Follicle Precursor Cells), células-tronco precursoras do folículo dental (Handa et al., 2002a; 2002b, Morsczeck et al., 2005, 2006).

GMPC (do inglês Gingival Multipotent Progenitor Cell), células progenitoras multipotentes da gengiva (Zhang et al., 2009; Fournier et al., 2010).

ABMMSC (do inglês Alveolar Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells), células mesenquimais estromais derivadas da medula óssea de ossos gnáticos (Han et al., 2009; Lee et al., 2011).

Figura 2.3 - Ilustração de diversas fontes de células-tronco já isoladas de tecidos dentais humanas. SHED, células-tronco de polpa dental de dente decíduo, DPSC, células-tronco de polpa dental de dente permanente. GMPC, células progenitoras de gengiva. DFPC, células precursoras do folículo dental. SCAP, células-tronco da papila apical. PDLSC, células-tronco do ligamento periodontal. ABMMSC, células mesenquimais estromais da medula óssea alveolar. Abreviações baseadas na literatura inglesa

Estas diferentes populações apresentam características peculiares. Sabe-se que células-tronco isoladas da polpa de dente permanente humano (DPSCs, do inglês Dental Pulp Stem Cells), são capazes de gerar um tecido semelhante ao complexo dentino-pulpar (osteodentina), composto de matriz mineralizada apresentando túbulos alinhados com odontoblastos e tecido fibroso contendo vasos sanguíneos em um arranjo semelhante ao encontrado em dentes humanos normais. Isto ocorre quando estas células são transplantadas no dorso de camundongos imunocomprometidos, misturadas ao pó cerâmico de hidroxiapatita/fosfato tricalcico (Gronthos et al., 2000; 2002).

Já as células-tronco isoladas de polpa de dente decíduo, as SHEDs, também formam osteodentina, mas esse tecido é mais imaturo e essas células formam mais facilmente tecido neural (Miura et al., 2003).

As células-tronco derivadas do ligamento periodontal (PDLSCs) são boas candidatas na recuperação de tecidos periodontais e até mesmo na medicina estética. PDLSCs derivadas de humanos, quando transplantadas em roedores imunossuprimidos são capazes de formar estruturas semelhantes ao ligamento periodontal e cimento (Seo et al., 2004; Hasegawa et al., 2005). Estas células produzem uma proteína conhecida como scleraxis que é identificada em tendões (Shi et al., 2005; Seo et al., 2004) e quando transplantadas subcutaneamente, em camundongos, foram capazes de produzir colágeno reduzindo rugas (Fang et al., 2007).

As células-tronco da papila apical (SCAPs), estão presentes no ápice radicular de dentes com rizogênese incompleta. Estas células têm capacidade de formar dentina primária e são consideradas células derivadas de um tecido embrionário, de fácil acesso, em indivíduos adultos (Sonoyama et al., 2006). Quando aplicadas em dentes humanos desvitalizados, os quais foram transplantados no dorso de camundongos imunossuprimidos, essas células foram capazes de formar um tecido vascularizado com estrutura semelhante à polpa dental e com presença de células semelhante aos odontoblastos. Além disso, elas também produziram tecido dentinário sobre as paredes dos dentes pré-existentes, assim como sobre a superfície de cimento endodôntico Agregado Mineral Trióxido, comercialmente conhecido como MTA (Huang et al., 2010).

As células derivadas de gengiva (Zhang et al., 2009; Fournier et al., 2010) são as mais recentemente isoladas e pouco se sabe a respeito do seu comportamento e potencial, mas elas já demonstram acelerar a reparação intestinal e cutânea em modelo animal (Zhang et al., 2009). Elas também podem ser isoladas de tecido gengival hiperplásico e são capazes de aumentar a regulação de células-T reguladoras e regenerar o tecido colagenoso de forma mais robusta que as células derivadas de tecido normal, quando transplantadas *in vivo* (Tang et al., 2011).

2.1.3.1 células-tronco de ossos gnáticos (medula e tábua óssea)

Apesar da grande variedade de células existentes no osso alveolar, poucos relatos falam sobre a existência de células-tronco nesse tecido. Isso ocorre devido a grande quantidade de tecido mineralizado com pouca quantidade de tecido celularizado (Ten Cate, 1998; Katchburian; Arana, 1999; Wise; King, 2008), em comparação aos demais tecidos dentais. Além disso, há também a dificuldade de recuperação deste tecido frente a doenças periodontais apesar das inovadoras técnicas de enxertia (Chambrone et al., 2010; Reynolds et al., 2010).

A possibilidade de existir células osteoprogenitoras derivadas deste tecido foi descrita inicialmente por Roberts et al. (1987) em experimentos em ratos. Eles observaram que células perivasculares se moviam pelo ligamento periodontal a partir da parede de vasos sanguíneos do osso alveolar em direção à raiz do dente. Durante a migração, estas células aumentaram de tamanho e se diferenciam em pré-osteoblastos. Após mitose, elas migraram através da superfície óssea, e geraram osteoblastos com potencial para formar um novo tecido (Roberts et al., 1987).

No entanto, apenas no ano 2000, estudos demonstraram de fato a existência de células osteoprogenitoras derivadas de células perivasculares (Bartold et al., 2000; Shimono et al., 2003; Seo et al., 2004; Shi; Gronthos, 2003; Meirelles et al., 2006; Schwab; Gargett, 2007; Sacchetti et al., 2007; Feng et al., 2010; 2011; Crisan et al., 2012), confirmando os achados de Roberts et al. (1987). E mais recentemente, estudos isolando estas células da medula óssea de ossos gnáticos foi demonstrada a existência de células multipotentes bem semelhantes às células de medula óssea do íliaco (Matsubara et al., 2005; Han et al., 2009; Lee et al., 2011).

Os estudos que isolaram células mesenquimais estromais de medula óssea de ossos gnáticos (ABMMSC) utilizam a fração mesenquimal existente neste tecido, ou seja, utilizam uma população mesenquimal mista (Matsubara et al., 2005; Han et al., 2009; Lee et al., 2011).

Matsubara et al. (2005) coletaram material aspirado da medula de mandíbula e maxila de humanos. Para tanto, amostras de 41 indivíduos entre 6 e 66 anos, após serem submetidos a cirurgias de remoção de cisto ou de terceiro molar impactado, tiveram o osso cortical do local cirúrgico removido com uma broca para que houvesse o acesso à medula óssea do osso alveolar (medula alveolar). A medula alveolar foi puncionada por uma agulha de 18 gauges e as células obtidas foram então cultivadas. Os autores observaram que as células de medula de osso alveolar, quando comparadas às células derivadas de medula óssea de íliaco,

apresentaram diferenciação osteogênica, fenótipo, capacidade de proliferação e expansão bem semelhantes, porém menor capacidade de diferenciação condrogênica e adipogênica. Quando transplantadas em camundongos imunossuprimidos as células dos ossos gnáticos formaram osso (Matsubara et al., 2005).

Posteriormente, Han et al. (2009), observaram que as ABMMSC, quando coletadas durante procedimentos cirúrgicos de colocação de implantes, são facilmente obtidas de indivíduos entre as idades de 57 e 62 anos, quando cultivadas no meio de cultivo α -Minimum Essential Medium (α MEM) (Han et al., 2009).

Outro trabalho comparou as células derivadas do íliaco e do osso de mandíbula do mesmo doador, e comprovou que apesar de as células derivarem de sítios diferentes, elas apresentaram características similares quanto a capacidade de proliferação, diferenciação nas três linhagens (osso, cartilagem e gordura) e expressão positiva para os marcadores CD29, CD44, CD73, CD105 e CD166 (Lee et al., 2011).

Uma população presente no alvéolo dental após remoção de dentes é constituída por células do ligamento periodontal presas no alvéolo dental. A fração mesenquimal, não enriquecida, de células derivadas do ligamento periodontal de cachorros, remanescentes no alvéolo dental, também foi cultivada e apresentou potencial de regeneração óssea e periodontal, alta capacidade de proliferação e clonogenicidade apresentando melhores resultados que as células do ligamento periodontal removidas da superfície dos dentes ou de células aspiradas da medula de alvéolo dental (Wang et al., 2012b).

O único relato de células enriquecidas derivadas do osso alveolar dental humano, foi de células Stro-1⁺ expandidas a partir de pedaços de osso trabecular preso em raízes de terceiros molares impactados após a extração (El-Sayed et al., 2012). El-Sayed et al. (2012) observaram que estas células possuem maior capacidade clonogênica, e de diferenciação osteo-, condro- e adipogênica, que as células Stro-1 negativas em estudos *in vitro*.

2.1.4 Marcadores moleculares de células-tronco mesenquimais dentais

Uma forma de identificar células-tronco mesenquimais é através da utilização de marcadores moleculares. Diversos marcadores moleculares já foram descritos nessas células como um todo (Kolf et al., 2007; Hombach-Klonisch et al., 2008; Mafi et al., 2011; Orbay et al., 2012; Wang et al., 2012a; Park et al., 2013), mas é importante considerar que geralmente os marcadores são utilizados para caracterizar populações de células em condições de cultivo, e nessas condições pode haver tanto a perda da expressão de algumas proteínas já após a segunda passagem (Liu et al., 2011), quanto o ganho de outras. De uma forma geral, esses marcadores são pobremente estudados *in vivo* (Horwitz et al., 2005; Dominici et al., 2006; Park et al., 2013).

Uma ferramenta para detectar células-tronco em tecidos *in vivo* é a utilização de nucleosídeos sintéticos, como BrdU e IdU, utilizados para rastrear células-tronco putativas de ciclagem lenta em tecidos adultos (Harada et al., 1999; Taylor et al., 2000; Oshima et al., 2001; Fuchs et al., 2004; Seidel et al., 2010; Ishikawa et al., 2012; Laphthanasupkul et al., 2012). Porém, os nucleosídeos são marcadores nucleares e este fato impossibilita o isolamento das células sem que elas sofram processo de permeabilização da membrana celular. Esse processo leva à morte celular (Darzynkiewicz et al., 1992; Jamur; Oliver 2010; Willingham, 2010), inviabilizando a utilização das células para cultivo, transplantes ou regeneração tecidual.

Assim, pelas técnicas de identificação e isolamento atuais (Cho et al., 2010; Hawley; Hawley, 2011; Wang et al., 2011; Jeye et al., 2012; Kalina et al., 2012; Zhu; Murphy, 2013) é necessário utilizar marcadores de superfície e muito do que se usa em tecidos dentais, é baseado em achados em células-tronco de medula óssea (Simmons; Torok-Storb, 1991; Reyes et al., 2001; Dennis et al., 2002; Zuk et al., 2002; Gronthos et al., 2003, Shi; Gronthos, 2003; Tuli et al., 2003; Etheridge et al., 2004; Baddoo et al., 2003; Peister et al., 2004; Kolf et al., 2007; Hombach-Klonisch et al., 2008; Tormin et al., 2011; Jones et al., 2013). A seguir são apresentados alguns dos marcadores mais utilizados na literatura pertinente atual.

Stro-1

O Stro-1 é conhecido como marcador de antígeno de superfície de células precursoras de medula óssea, primeiramente identificado em células estromais (Simmons; Torok-Storb, 1991; Gronthos; Simmons, 1995), a partir da constatação de que células Stro-1 positivas de medula óssea apresentavam maior capacidade clonal que o total de células monucleares (Simmons; Torok-Storb, 1991; Colter et al., 2001; Gronthos et al., 2003) e demonstram ser claramente uma população distinta de células hematopoiéticas (Zannettino et al., 2007). As células Stro-1⁺ são capazes de sustentar o microambiente de células progenitoras hematopoiéticas CD34⁺ (Dennis et al., 2002; Bensidhoum et al., 2004) e quando isoladas da medula óssea e de outros tecidos são capazes de proliferar extensivamente e formar tecidos mineralizados, condrogênicos, adipogênicos e células neurais (Gronthos et al., 2000; Reyes et al., 2001; Dennis et al., 2002; Gronthos et al., 2002; Miura et al., 2003; Handa et al., 2002a; 2002b; Seo et al., 2004; Sonoyama et al., 2006, 2008). O Stro-1 é frequentemente utilizado para isolar CTM humanas (Kolf et al., 2007; Lin et al., 2011; Schipani; Kronenberg, 2009), porém sua função exata ainda é desconhecida e tecidos de camundongos têm apresentado especificidade controversa para esse marcador (Kemoun et al., 2007; Ishikawa et al., 2012; James et al., 2012; Rizk et al., 2013).

Entre os marcadores de células-tronco mesenquimais o Stro-1 é amplamente utilizado em tecidos dentais (Gronthos et al., 2000; Dennis et al., 2002; Gronthos et al., 2002; Miura et al., 2003; Handa et al., 2002a; 2002b; Seo et al., 2004; Sonoyama et al., 2006, 2008; Seo et al., 2009; El-Sayed et al., 2012; Park et al., 2013). Em diversos tecidos *in vivo*, incluindo tecidos dentais, a localização de células Stro-1⁺ se encontra em torno de vasos, em células endoteliais, ao redor de fibras neurais (Shi; Gronthos, 2003; Seo et al., 2004; Lin et al., 2011; Yoshida et al., 2012) e em pequenos agregados celulares na região extravascular de ligamentos periodontais (Seo et al., 2004). Na polpa dental já foram encontradas células co-expressando Stro-1 e o marcador CD146. Essas células estavam localizadas em regiões perivasculares (Shi; Gronthos, 2003), no endotélio e perineuro (Yoshida et al., 2012).

CD146

Outro marcador bastante utilizado para caracterizar células-tronco mesenquimais é o CD146 (Shi; Gronthos, 2003; Meirelles et al., 2006; Sacchetti et al., 2007; Schwab; Gargett, 2007; Feng et al., 2010; 2011; Crisan et al., 2012). Este marcador é conhecido como molécula de adesão de melanoma (do inglês *melanoma cell adhesion molecule* - MCAM ou Mel-CAM), MUC18 ou S-Endo1 (Lehmann et al., 1989; Shih, 1999). Ele é uma glicoproteína de superfície associada a pericitos e células de músculo liso (Tormin et al., 2011; Crisan et al., 2012). O CD146 foi originalmente utilizado como um marcador tumoral de melanomas devido sua alta expressividade nestes tumores. Recentes evidências indicam que o CD146 está envolvido em processos variados como desenvolvimento, transdução de sinais, migração celular (Kang et al., 2006), diferenciação de células-tronco mesenquimais, angiogênese e resposta imune (Boneberg et al., 2009; Wang et al., 2013).

A ausência deste marcador em zebrafish inibe a formação de capilares, evitando o estabelecimento do fluxo sanguíneo e causando deformações no sistema vascular destes animais (Chan et al., 2005). Em medula óssea humana, células que expressam o CD146 são identificadas na região perivascular e essas, por apresentarem capacidade clonogênica, são capazes de restaurar o compartimento perivascular e de se comportar como osteoprogenitoras (Sacchetti et al., 2007).

Assim como o Stro-1, o CD146 também já foi utilizado no isolamento e caracterização de células-tronco de origem dental (Shi; Gronthos, 2003; Seo et al., 2004; Iwasaki et al., 2012; James et al., 2012; Bakopoulou et al., 2013). Estas células não expressam marcadores hematopoiéticos como o CD34, o CD31, o fator vWF (do inglês von Willebrand factor) e o CD45 (Crisan et al., 2012) e também apresentam alta capacidade clonogênica e alto potencial de diferenciação multilinhagem (Russel et al., 2010; Iwasaki et al., 2012; Crisan et al., 2012).

CD90

Na literatura o CD90 é também conhecido como Thy-1 e citado como marcador de timócitos e mioblastos pouco diferenciados, células neurais, células endoteliais, além de ser um marcador pan-linfócitos T (Sumikuma et al., 2002; Bradley et al., 2009; Wisniewski et al., 2011; Alt et al., 2011, Lin et al., 2013). Este marcador também é encontrado em células epiteliais progenitoras (Nakamura et al., 2006), fibroblastos (Alt et al., 2012) e CTMs (Dominici et al., 2006; Alt et al., 2011; Karamzadeh et al., 2012; Orbay et al., 2012).

Acredita-se que o CD90 está envolvido em vários processos celulares como proliferação, diferenciação, apoptose, adesão, e migração (Wen et al., 2013). O CD90 é expresso durante os processos de angiogênese fisiológica e patológica, mas não durante o desenvolvimento embrionário (Lee et al., 1998). O aumento da expressão de CD90 em células endoteliais em cultivo inibe a adesão, migração e formação de tubos capilares, enquanto o bloqueio da expressão endógena de CD90 ocasiona a migração destas células (Wen et al., 2013).

O CD90 também é encontrado em células-tronco embrionárias (International Stem Cell Initiative, 2007), células-tronco hematopoiéticas (Bradley et al., 2009; Karaöz et al., 2010; Orbay et al., 2012), assim como em células-tronco mesenquimais derivadas de tecidos dentais (Horwitz et al., 2005; Dominici et al., 2006; Lorenz et al., 2008; Xu et al., 2009; Pivoriunas et al., 2010; Iohara et al., 2011; Lee et al., 2011; Mitterberger et al., 2012; Orbay et al., 2012; Mafi et al., 2011; Lee et al., 2011; Lin et al., 2011; El-Syed et al., 2012; Hidaka et al., 2012; Bakopoulou et al., 2013).

CD105

CD105 (endoglina) é uma glicoproteína transmembrana homodimérica de 180kDa, também conhecida como endoglina. Atua como receptor acessório do tipo III do fator de crescimento transformante-beta ($TGF-\beta$, do inglês, *transforming growth factor-beta*), participando ativamente da angiogênese e homeostase vascular (Kapur et al., 2013). O CD105 age na superfície deste fator de crescimento, suprimindo a ativação de Smad1, e desta forma

impedindo que aconteçam defeitos de desenvolvimento e portanto, efetuando a manutenção da vascularização (Pece-Barbara et al., 2005).

Como marcador celular, o CD105 é utilizado para identificar células endoteliais em vasos sanguíneos, e está presente de forma aumentada durante a angiogênese. A expressão de CD105 já foi descrita em endocárdio, células estromais de medula óssea, células de músculo liso, placenta, pré-eritroblastos, e monócitos sanguíneos ativados (Gougos et al., 1992; Adam et al., 1998; Bourdeau et al., 1999; Bernabeu et al., 2007; Kapur et al., 2013).

Na medicina, a expressão de CD105 é utilizada para diagnóstico, prognóstico e acompanhamento de tratamento de tumores sólidos (Nassiri et al., 2011) e durante a injúria e inflamação, a expressão de CD105 é aumentada (Pece-Barbara et al., 2005).

Diversos autores já utilizaram o CD105 para identificar, isolar ou caracterizar células-tronco mesenquimais de diferentes órgãos (Horwitz et al., 2005; Dominici et al., 2006; Lorenz et al., 2008; Mafi et al., 2011; Mitterberger et al., 2012; Orbay et al., 2012; Xu et al., 2009, Lee et al., 2011) e também de tecidos dentais (Miura et al., 2003; Sonoyama et al., 2006, 2008; Iohara et al., 2011; Liu et al., 2011; Park et al., 2012, 2013)

CD73

O marcador CD73 (do inglês, Cluster of Differentiation 73), também conhecido como 5'-nucleotidase ou ecto-5'-nucleotidase, L-VAP-2 (proteína de adesão vascular-linfocítica-2), NT5E (E5NT, NTE) (ecto-5'-nucleotidase, 5'-nucleotidase), SH-3 ou SH-4 (Barry et al., 2001). A proteína CD73 é uma enzima codificada em humanos pelo gene NT5E e utilizada como marcador de diferenciação de linfócitos (Airas et al., 1997; Peola et al., 1996; Yamashita et al., 1998; Thompson et al., 2004; Yang et al., 2005), células endoteliais (Airas et al., 1997; Narravula et al., 2000; Kas-Deelen et al., 2001), pericitos (Feng et al., 2011), células dendríticas foliculares (Airas, 1998), células epiteliais de intestino (Strohmeier et al., 1997), fibroblastos (Hashikawa et al., 2003; Nemoto et al., 2013), neurônios (Maienschein; Zimmermann, 1996), osteoblastos (Jiang et al., 2005), oligodendrócitos (Maienschein; Zimmermann, 1996) e CTMs (Barry et al., 2001; Dominic et al., 2006; Karamzadeh et al., 2012; Orbay et al., 2012).

Esta enzima, ligada à membrana celular, catalisa a conversão de AMP para ativar a adenosina. Desta forma, a adenosina influencia a permeabilidade de células endoteliais e

adesão de neutrófilos e linfócitos à matriz extracelular (Ode et al., 2013). A sua ausência no desenvolvimento pode causar retorno irregular no sistema túbulo-glomerular em rins de camundongos com deleção deste gene, não alterando o sistema imune, porém aumentando a permeabilidade vascular em múltiplos órgãos em condições de hipóxia. (Castrop et al., 2004; Thompson et al., 2004). A CD73 também pode atuar como molécula de adesão de linfócitos em células endoteliais e entre células B com células dendríticas (Airas et al., 1997)

O marcador CD73 já foi utilizado por diversos autores no isolamento, identificação e caracterização de células-tronco mesenquimais em diversos tecidos do corpo humano (Díaz-Flores et al., 2009; Barry et al., 2001; Dominic et al., 2006; Karamzadeh et al., 2012; Orbay et al., 2012; Crizan et al., 2013), inclusive tecidos dentais (Miura et al., 2003; Gronthos et al., 2002; Sonoyama et al., 2006, 2008; Iohara et al., 2011; Liu et al., 2011; Park et al., 2012, 2013).

Outros marcadores

Entre outros marcadores transmembrânicos relacionados às células-tronco mesenquimais também foram descritos os PDGFR- β e NG2 (Díaz-Flores et al., 2009; Crizan et al., 2013).

O PDGFR- β (receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas-beta) é um receptor transmembrana que media a ativação de processos celulares pelo ligante PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas) (Alvarez et al., 2006), atuando na ativação de vias de sinalização envolvidas na angiogênese, neovascularização e crescimento celular (Aguilera et al., 2013).

A inibição de produção do ligante pelas células endoteliais ocasiona o desprendimento de pericitos de vasos sanguíneos em ratos recém nascidos (Benjamin et al., 1998). Este ligante é capaz de recrutar pericitos durante a formação de vasos sanguíneos em camundongos (Hellstrom et al., 1999). Camundongos com deleção do PDGFR- β apresentam quantidade reduzida de células perivasculares (desmina positivas e alfa actina de músculo lisa positivas) e na deficiência do ligante estas células são incapazes de migrar e proliferar. (Hellstrom et al., 1999, Ball et al., 2007).

O PDGFR- β atua também na diferenciação de CTMs (Ng et al., 2008). As CTMs expressam abundantemente os receptores de PDGF, e esses são responsáveis pela sua morfologia celular, controlando diretamente a reorganização do citoesqueleto de actina e a contractibilidade mediada por actomiosina (Ball et al., 2007).

O NG2 (do inglês, Neural/Glial antigen 2) é uma glicoproteína transmembranica do tipo-1, presente em células neurais (Mallon et al., 2002; Trotter et al., 2010). Esta proteína também é expressa em pericitos e co-expressa em algumas células de músculo liso em capilares, arteríolas e grandes vasos (Díaz-Flores et al., 2009; Crizan et al., 2013). As células NG2⁺ apresentam uma distribuição nos vasos bem semelhante às células CD146⁺ (Crizan et al., 2013). O NG2 já foi relacionado às células progenitoras neurais (Trotter et al., 2010) e a pericitos na polpa dental de camundongos (Feng et al., 2011). Estas células são capazes de migrar e diferenciar em odontoblastos em resposta á injúria (Feng et al., 2011) ou gerar oligodendrócitos (Mallon et al., 2002), mas o mecanismo pelo qual isto ocorre ainda é pouco esclarecido.

Além destes marcadores outros marcadores também são descritos em células-tronco mesenquimais dentais como o CD271, CD28, CD44, o FGF-2 (do inglês, fibroblast growth factor-2), molécula de adesão CD166, a integrina- α -5 e outras moléculas como α -actina de músculo liso (α -AML) e 3G5, os quais são encontrados também em pericitos (Shi; Gronthos, 2003; Meirelles et al., 2006; Schwab; Gargett, 2007; Sacchetti et al., 2007; Diaz-Flores et al., 2009; Feng et al., 2010, 2011; Crisan et al., 2012; Park et al., 2013).

Alguns fatores de transcrição encontrados em células pluripotentes já foram relatados em células-tronco mesenquimais e inclusive de polpa dental como o Sox-2, NANOG, Oct4 e cMyc. (Kerkis et al., 2006, Roche et al., 2007; Ramirez et al., 2011; Alvarez et al., 2012; Liu et al., 2011, Pierantozzi et al., 2011).

Entre estes marcadores o Sox-2, também conhecido como SRY-box2 (do inglês, sex determining region Y-box 2), possui importante papel em manter a pluripotência de células embrionárias. A sua ausência na fase de mórula causa falha da sobrevivência do embrião (Arnold et al., 2011). Este fator de transcrição mantém a auto-renovação de células-tronco embrionárias quando associado ao Oct3/4 (Masui et al., 2007). Também é importante na diferenciação celular de células progenitoras neurais (Brazel et al., 2005; Maucksch et al., 2013), de botões sensoriais de papila gustativa lingual (Okubo et al., 2006; Okubo et al., 2009), queratinócitos de palato (Okubo et al., 2009) e de epitélio glandular de esôfago e estômago (Que et al., 2007). O Sox2 também participa da odontogênese de diferentes espécies

(Zhang et al., 2012; Juuri et al., 2013), inclusive de humanos (da Cunha et al., 2013). Também está presente no nicho de células-tronco de dentes com crescimento contínuo de mamíferos, como camundongos (Zhang et al., 2012; Juuri et al., 2013), como também de répteis (Juuri et al., 2013), sugerindo seu importante papel na auto-renovação celular deste órgão.

Apesar do grande número de marcadores existentes para identificar as células-tronco mesenquimais, a ausência de um marcador de superfície específico, capaz de identificar apenas uma população pura de células-tronco é amplamente conhecida e discutida na literatura pertinente (Horwitz et al., 2005; Dominici et al., 2006; Crisan et al., 2012; Orbay et al., 2012; Lin et al., 2013; Park et al., 2013). Assim estudos para melhor esclarecer este assunto, ainda são necessários.

2.2 Tecidos dentais de humanos e de roedores

Os dentes de roedores apresentam estruturas iguais aos de humanos (Figura 2.4) como polpa dental, presente na porção central; a dentina recobrindo a polpa dental; o esmalte, localizado na parte externa recobrindo a dentina na sua porção coronária; o cemento, que também recobre a dentina presente na porção radicular de dentes humanos e de molares de camundongos e o periodonto que é constituído basicamente de osso alveolar e ligamento periodontal (Katchburian; Arana, 1999; Wise; King, 2008; Treuting et al., 2012).

Os molares de camundongos são dentes que compartilham maior similaridade com dentes humanos, desde sua formação até a fase adulta. Na fase adulta de ambas as espécies os dentes molares apresentam-se posicionados axialmente em relação ao longo eixo da mandíbula e apresentam um estreitamento do canal radicular no ápice das raízes (Tummers; Thesleff, 2003; Tucker; Sharpe, 2004; Yen; Sharpe, 2008). Fatos estes, que não ocorrem nos incisivos de camundongos.

Figura 2.4 - Estruturas presentes nos dentes humanos e de camundongos. *, mostra área em que há exposição da dentina, sem proteção de esmalte. A seta preta mostra a imagem negativa da porção do esmalte desmineralizado durante o processo de descalcificação (adaptado de Treuting et al., 2012)

Entre as diferenças existentes entre a dentição de ambas espécies podemos citar o número e os tipos de dentes existentes, a disposição destes dentes nas arcadas, o desenvolvimento dos incisivos, a ausência da dentição decídua nos camundongos, coloração dos dentes entre outras descritas no Quadro 2.1 (Tucker; Sharpe; 2004; Yen; Sharpe, 2008; Treuting et al., 2012).

	Camundongos	Humanos
Cor	Incisivos com coloração amarela devido a presença de ferro na dentina e esmalte	Coroas brancas
Nº e tipo de dentes	4 Incisivos e 12 Molares =16 dentes	4 Incisivos centrais, 4 Incisivos laterais, 4 Caninos, 8 Pré-molares, 12 Molares = 32 dentes
Disposição dentária	Apresenta diastema entre os incisivos e molares	Não apresenta diastema
Posição dos incisivos	Ficam dispostos longitudinalmente ao longo eixo da maxila e mandíbula	Ficam dispostos transversalmente ao longo eixo da mandíbula.
Dentição decídua	Não possui	Possui 4 incisivos centrais, 4 incisivos laterais, 4 caninos, 8 molares = 20 dentes
Aspecto Incisivos	Apresenta crescimento contínuo, sem troca de dentição	Os incisivos decíduos são trocados pelos permanentes e não crescem continuamente
Aspecto Molares	Não há substituição destes dentes	Os molares decíduos são substituídos por pré-molares e mais 12 molares se desenvolvem
Osso alveolar	Cresce durante o desenvolvimento e erupção dos dentes e regride com a perda dos dentes adultos	Idem
Morfologia Incisivos	Possui apenas a porção coronária	Possui coroa e raiz bem delimitadas
Morfologia Molares	Coroa e raiz	Idem
Tecido dos Incivos	Dente com ápice da raiz aberta, superfície coronária com esmalte apenas na porção labial e cimento na porção lingual sobre uma camada de dentina	Presença de esmalte recobrindo toda a superfície coronária da dentina e de cimento recobrindo toda superfície radicular
Tecidos dos Molars	Apresenta coroa, margem cervical e raiz, porém as cúspides apresentam áreas sem esmalte e com exposição pulpar	Apresenta coroa toda recoberta por esmalte e dentina, margem cervical com junção amelo-cementária e raiz
Periodonto	É constituído de epitélio juncional e cimento presente na junção amelo-cementária, e na porção radicular de ligamento periodontal ligando o osso ao cimento	Idem

Adaptado de Treuting et al. (2012)

Quadro 2.1 - Diferenças e semelhanças entre as dentições de humanos e camundongos

Apesar das diferenças existentes entre as espécies, os tecidos pulpare e do periodonto são bem semelhantes quanto a sua constituição. A polpa dental, um dos objetos de nosso estudo, é composta por tecido conjuntivo frouxo ricamente celularizado que apresenta diversidade celular constituída por odontoblastos, fibroblastos, macrófagos, células imunomodulatórias, bem como, vasos sanguíneos e linfáticos, fibras nervosas, células mesenquimais permeadas por substância fundamental amorfa (Gronthos et al., 2000; Ten Cate, 1998; Gronthos et al., 2002; Miura et al., 2003; Katchburian; Arana, 1999; Martinez;

Araújo, 2004; Martinez et al., 2007; Iohara et al., 2011). Entre suas funções, a polpa dental tem a capacidade de manter a vitalidade dos dentes trabalhando juntamente com a dentina para formar o complexo dentino-pulpar, onde há presença de células colunares localizadas na periferia da câmara pulpar denominadas odontoblastos. Estas células são capazes de depositar matriz dentinária durante a odontogênese ou em resposta à injúria (Goldberg; Lasfargues, 1995; Tucker; Sharpe, 2004; Nanci et al., 2007; Sloan; Waddington, 2009). Quando ocorre uma injúria capaz de eliminar os odontoblastos, novos odontoblastos são recrutados para o local da lesão. Estes são produtos de células-tronco que se diferenciam em odontoblastos com a finalidade de repor o tecido danificado, produzindo então a dentina reacional (osteodentina) para preservar a vitalidade da polpa dentária (Arana-Chavez; Massa, 2004; Sloan; Waddington, 2009).

2.2.1 Periodonto

Diferente da polpa, o periodonto é constituído por um conjunto de tecidos dentais e tecidos de sustentação. O periodonto têm como função sustentar os dentes, promovendo suporte contra forças mastigatórias. Ele é formado por ligamento periodontal, cemento, osso alveolar e dentina radicular (Ten Cate, 1998; Nanci; Bosshardt, 2006). O ligamento periodontal é formado por um tecido conjuntivo fibro-elástico rico em colágeno que une os dentes ao osso alveolar, através da inserção das fibras periodontais e de Sharpey (Dewey, 1926; Nanci; Bosshardt, 2006).

O osso alveolar é composto por uma porção mineralizada, constituída de cristais de hidroxiapatita e matriz orgânica (Katchburian; Arana, 1999). A matriz orgânica é responsável pela constante formação e reabsorção óssea durante o desenvolvimento dental e em resposta a forças externas (Iliopoulous et al., 2010; Gili et al., 2012; Naveh et al., 2012). Dentre os componentes celulares encontram-se fibroblastos, células inflamatórias, vasos sanguíneos, osteoblastos (promotores de mineralização), osteócitos e osteoclastos (responsáveis pela reabsorção óssea) (Wise; King, 2008).

Externamente, o osso alveolar é constituído por osso, lamelar denso que apresenta linhas de aposição, principalmente em áreas adjacentes ao ligamento periodontal. Internamente, sua porção medular consiste de trabéculas ósseas apresentando lamelas irregulares que podem apresentar linhas de aposição e osteócitos aprisionados em seu interior.

Estas trabéculas ósseas circundam áreas medulares de morfologia irregular, constituídas de tecido conjuntivo fibroso com presença de fibroblastos, vasos sanguíneos além de osteoclastos e osteoblastos delineando as regiões periféricas (Katchburian; Arana, 1999).

2.2.2 Odontogênese em dentes humanos e molares de camundongos

O desenvolvimento dental (odontogênese) de humanos e camundongos apresenta semelhanças de acordo com o padrão e a formação do órgão dental, porém em humanos este processo é um pouco mais complexo devido a existência de duas dentições e presença de mais dentes com morfologias variadas (Thesleff; Sharpe, 1997; Thesleff; Tummers, 2008-2009; Thesleff, 2003). Os camundongos apresentam ausência de incisivos laterais, caninos e pré-molares, apresentando uma área de anodontia entre seus molares e incisivos, chamada de diastema. Nesta área de diastema dos camundongos ocorre a formação de botões dentais rudimentares, porém estes falham em gerar um dente (Keranen et al., 1999; Yen; Sharpe, 2008).

Nos camundongos a ordem cronológica de desenvolvimento dental ocorre primeiro com o desenvolvimento dos primórdios de incisivos e primeiros molares, um em cada quadrante, seguidos da formação dos segundos molares e depois dos terceiros molares (Yen; Sharpe, 2008).

Nos humanos, o desenvolvimento da dentição decídua e de alguns dentes permanentes se inicia no período gestacional terminando apenas na idade adulta dos indivíduos (AlQahtani et al., 2010). Sabe-se que, como demais órgãos do corpo humano, o desenvolvimento dental depende da interação entre células epiteliais, originadas do epitélio oral (também chamado de lâmina dental), e células ectomesenquimais, derivadas da crista-neural cranial (Thesleff; Sharpe, 1997; Thesleff, 2003).

O desenvolvimento dental é dividido em fases. Os primeiros sinais de formação do dente inicia-se a partir do espessamento do epitélio oral, originando a lâmina dental. A partir deste momento ocorre a multiplicação e invaginação das células epiteliais da lâmina dental em direção ao mesênquima subjacente originando uma estrutura de morfologia arredondada chamada 'botão', rodeada por células condensadas do mesênquima (fase de botão) (Thesleff; Sharpe, 1997; Chai et al., 2000; Tucker; Sharpe, 2004; Zhang et al., 2005; Yen; Sharpe, 2008). As células epiteliais presentes nas laterais do botão se expandem envolvendo o

mesênquima condensado subjacente, formando um ‘capuz’ (Fase de capuz) (Nanci, 2007; Thesleff; Tummers, 2008-2009).

A partir desta fase, as células epiteliais continuam a se proliferar de forma mais lenta e a papila dentária (derivada do mesênquima condensado) se torna mais robusta originando um germe dental com morfologia semelhante a um sino (fase de Sino). O germe começa a se desprender da lâmina dental e ocorrem os primeiros eventos de diferenciação celular e definição da morfologia do germe (Tucker; Sharpe, 2004; Gaete et al., 2004; Zhang et al., 2005; Thesleff; Tummers, 2008-2009). O germe dental é facilmente identificado e é constituído de órgão do esmalte, papila dental e folículo dental bem definidos. O órgão do esmalte é composto de epitélio externo, epitélio interno, retículo estrelado e estrato intermediário, (Gaete et al., 2004; Yen; Sharpe, 2008). A partir de então células da papila dental diferenciam-se em odontoblastos que começam a produzir pré-dentina e dentina (Gaete et al., 2004). E as células do órgão do esmalte se diferenciam originando ameloblastos produtores de esmalte. A papila apical também apresenta-se bem definida e com vascularização aumentada. E ao final desta fase o germe já se encontra envolto por osso alveolar e separado totalmente da lâmina dental (Avery, 2001; Nanci, 2007).

Desta forma, chega-se a fase de coroa onde ocorre completa deposição de matriz do esmalte e dentina, formando uma coroa completa com porções mineralizadas (Nanci, 2007). Com a coroa formada ocorre o início da rizogênese (após o 4º dia pós-natal em camundongos) (Yen; Sharpe, 2008; Lungová et al., 2011), que se dá na porção cervical da coroa formada, região chamada de bainha epitelial de Hertwig (Yen; Sharpe, 2008). A bainha de Hertwig continua a crescer em direção apical delineando o formato da raiz a ser formada (Diekwisch, 2001; Lungová et al., 2011) e simultaneamente ocorre a reabsorção óssea ao redor do germe dental seguida de erupção dental (Lungová et al., 2011). Este processo em humanos é seguida pela reabsorção radicular de dentes decíduos, com simultânea formação dos dentes permanentes que recomeçam todo o processo descrito anteriormente de forma dinâmica.

Dentre os genes relacionados ao controle do desenvolvimento dental na lâmina dental encontram-se o gene sonic hedgehog (Shh) extensivamente estudado em várias espécies (Cobourne; Sharpe, 2002; Keranen et al., 1999; Buchtova et al., 2008; Cobourne et al., 2009; Ohazama et al., 2009)

Estudos em camundongos na fase embrionária demonstram que o Shh é necessário para iniciar a formação dental, participando na regulação da morfologia dos dentes e formação de ameloblastos (Miletich et al., 2005; Cobourne et al., 2009). Ele é regulado por vias de sinalização distintas em molares e incisivos (Miletich et al., 2005) e quando super-

expresso pode induzir a formação de dentes ectópicos nas áreas de diastema de camundongos (Ohazama et al., 2009). A expressão de Shh no epitélio odontogênico impede o crescimento dental na fase botão, sendo assim, sua participação na formação dental dependente de regulação apropriada (Keränen et al., 1999; Cobourne et al., 2009).

Outros genes também relacionados à odontogênese são Gli1, Msx1, PAX9, Prx1. A supressão da função destes fatores de transcrição resulta no estacionamento completo do desenvolvimento dental ou na interrupção da progressão da fase botão para capuz (Thesleff, 2003; Miletich; Sharpe, 2003; Duverger; Morasso, 2008).

2.2.3 Incisivos de camundongos - Presença e regulação do nicho de células-tronco da alça cervical

Entre os mamíferos que apresentam dentes com crescimento contínuo encontramos os roedores. A exemplo temos incisivos de camundongos, incisivos e molares de ratos e porquinhos-da-índia e dentes de toupeiras africanas (Ohshima et al., 2005; Ishikawa et al., 2010; Seidel et al., 2010; Rodrigues et al., 2011; Ishikawa et al., 2012). Nestes animais ocorre a constante reposição de tecidos dentais e até mesmo múltiplas trocas de dentição, como no caso das toupeiras africanas (Ohshima et al., 2005; Ishikawa et al., 2010; Seidel et al., 2010; Rodrigues et al., 2011; Ishikawa et al., 2012).

A formação dos incisivos de camundongos começa com o espessamento do epitélio oral (Figura 2.5 A), evolui para fase botão de forma semelhante ao que ocorre nos molares (Figura 2.5 B). As diferenças iniciam ao formar o capuz. Nesta fase os botões sofrem uma rotação antero-posterior, acompanhando o longo eixo da mandíbula (Figura 2.5 C). Outra diferença ocorre na fase seguinte, a fase de sino inicial (Figura 2.5 D). Ao formar o ‘sino’ o epitélio labial cresce mais que o epitélio lingual em comprimento e em sua extremidade surge uma estrutura constituída de células do retículo estrelário dispostas centralmente de forma reticular e rodeada por células epiteliais. O nome dado a esta estrutura é alça cervical. Esta estrutura apresenta uma população de células-tronco epiteliais já conhecida (Harada et al., 1999; Thesleff; Tummers, 2008-2009).

Na fase de sino tardia observa-se a formação de dentina depositada no ápice da cúspide e formando a parede lingual e labial. Ocorre também a deposição de esmalte apenas na superfície labial desse dente e a alça cervical persiste. Após esta fase o dente apresenta um

crescimento contínuo e erupciona. A erupção ocorre da mesma forma que os molares, porém sem formar uma raiz (Harada et al., 1999; Harada et al., 2002a; 2002b). Desta forma os incisivos de camundongos se assemelham aos molares na fase de transição coroa-raiz, porém os incisivos se mantêm desta forma durante todo o tempo de vida do animal.

Os incisivos de camundongos crescem em média de 1mm por semana e a cada 50 dias todo o tecido dental é repostado (Coady et al., 1967).

Os incisivos apresentam uma coroa constituída de polpa e dentina revestida por tecidos distintos na face labial e lingual. A superfície labial é revestida por ameloblastos em ativa produção de esmalte na sua superfície, enquanto a superfície lingual apresenta-se coberta por cementoblastos produtores de cemento (Harada et al., 2002b; Ohshima et al., 2005; Wang et al., 2007) (Figura 2.6). Assim, a alça cervical lingual apresenta-se como a bainha de Hertwig responsável pela formação de raízes nos molares (Ohshima et al., 2005; Tummers; Thesleff, 2008).

Figura 2.5 - Odontogênese de incisivos de camundongos. A, espessamento do epitélio oral na idade embrionária de 11 dias (E11). B, fase de botão em E13, mostrando o órgão do esmalte (eo) rodeado pelo mesênquima condensado (cm) e início do crescimento da lâmina vestibular (vl). C, fase capuz, E14, apresentando a mudança de eixo de crescimento do órgão do esmalte e do cm. D, fase de sino inicial em E16, mostrando formação da papila dental (dp), da alça cervical (cl) e mesênquima condensado ao redor do órgão do esmalte. E, fase de sino tardia apresentando dente com esmalte (e), dentina (d), polpa (p) e alça cervical (cl), com molares na fase de sino tardia. Legenda em ordem alfabética (adaptado de Harada et al., 2002b)

Figura 2.6 - Figura das estruturas que compõem os incisivos de camundongos. A, mostra estruturas que compõem este dente, apresentando um dente envolvido pelo mesênquima folicular (FM) constituído de esmalte na superfície labial e dentina na porção incisal, labial e lingual, revestidos pelo epitélio dental (EpD), apresentando em seu interior células derivadas da papila mesenquimal (PM) e em sua porção apical destaca-se as alças cervicais. B, mostra em detalhe a região apical constituída de células-tronco residentes no retículo estrelado (RE) da alça cervical, células transientes amplificadoras (TA), ameloblastos, odontoblastos e a presença de epitélio externo (EpExt) e interno (EpInt) nas alças cervicais (adaptado de Wang et al., 2007)

No nicho as células-tronco respondem através de estímulos como resposta a injúria. Na ausência de injúria ou de necessidade de reposição tecidual, as células-tronco se mantêm quiescentes (Fuchs et al., 2004). O estado que quiescência das células-tronco têm sido demonstrado através da análise da frequência da síntese de DNA através de trabalhos utilizando nucleosídeos sintéticos como o BrdU (5-Bromo-2'deoxiuridina) ou IdU (Iododeoxiirudina). Após aplicações de nucleosídeos por períodos específicos, é possível detectar células que apresentam rápida divisão celular e que perdem expressão do nucleosídeo conforme proliferam e também células de ciclagem lenta que retém estas substâncias por mais tempo. (Taylor et al., 2000; Oshima et al., 2001; Fuchs et al., 2004).

Assim, em incisivos de camundongos, experimentos utilizando a incorporação de BrdU evidenciaram células lábeis que proliferavam lentamente e residiam no retículo estrelado. Essas células foram interpretadas como células-tronco epiteliais (Harada et al., 1999). Acredita-se que células progenitoras derivadas dessas células-tronco invadem a camada basal epitelial existente na alça cervical labial e se diferenciam em ameloblastos ou epitélio radicular, dependendo do microambiente regulatório (Thesleff; Tummers, 2008-2009).

Este nicho de células-tronco epiteliais dentais se comporta de forma semelhante aos outros nichos descritos em outros órgãos como nos folículos pilosos e na cripta do intestino (Moore; Lemischka, 2006). O nicho de células-tronco epiteliais é circundado por tecido mesenquimal que promove regulação sobre o epitélio. Essa regulação é necessária para

manter a auto-renovação e diferenciação das células epiteliais (Seidel et al., 2010; Lapthanasupkul et al., 2012).

O estudo do nicho em incisivos de camundongo apresenta uma vantagem sobre os outros modelos de nicho, um vez que o dente é experimentalmente maleável, de forma que é possível analisar células em cultivo ou espécimes inteiros coletados por dissecação permitindo o monitoramento da proliferação e diferenciação em resposta a sinais externos (Thesleff; Tummers, 2008-2009).

O nicho presente no mesênquima da região da alça cervical é menos conhecido. Estudos sugerem que sinais derivados do mesênquima adjacente ao nicho de células-tronco epiteliais são essenciais para sua manutenção. Fatores de crescimento encontrados no mesênquima que rodeia esta área, como o FGF3 e FGF10 parecem estar relacionados à proliferação e sobrevivência das células epiteliais do nicho (Harada et al., 1999; Harada et al., 2002a; 2002b).

A alça cervical lingual recebe apenas sinais do FGF10, enquanto a alça labial recebe sinais de ambos fatores. Esta expressão assimétrica do FGF3 nos incisivos pode contribuir para as diferenças existentes em ambas alças cervicais através de uma rede de controle deste fator (Wang et al., 2007). A proteína morfogenética óssea – 4 (BMP4) e a Activina também são expressas no mesênquima dental da região da alça cervical (Wang et al., 2007). A inibição da expressão do FGF3 parece ser promovida pela existência da proteína morfogenética óssea – 4 (BMP4) e a activina por sua vez reprime a ação da BMP4.

A Activina é antagonizada pela folistatina, um inibidor do fator de crescimento transformante-beta (TGF- β). Sabe-se que a folistatina limita a quantidade de células-tronco/progenitoras na porção lingual do nicho de células epiteliais por efeitos antagonistas da activina (Wang et al., 2007). Assim, a activina pode inibir a formação de esmalte na zona de diferenciação por impedir a diferenciação de ameloblastos induzida por BMP4 (Thesleff; Tummers, 2009).

A proteína produto do gene Sprouty (Spry) também está relacionada à assimetria encontrada nas alças cervicais. Essa proteína é antagonista da via de sinalização de FGF e é essencial para manter ameloblastos produtores de esmalte em apenas uma das faces destes dentes. Isto ocorre devido ao não estabelecimento de troca de sinalizações mediadas por FGF entre o epitélio e mesênquima presentes no sítio lingual, inibindo assim a formação de ameloblastos derivados de células-tronco nesta região (Klein et al., 2006).

Reguladores expressos no nicho de células-tronco das alças cervicais são pouco expressos em dentes com crescimento não-contínuo e quando expressos ectopicamente podem

podem promover a formação de uma estrutura semelhante a alça cervical. A adição de FGF10 em molares de camundongos cultivados na fase de transição de coroa para fase de raiz apresentaram inibição da bainha de Hertwig e nesse lugar passam a apresentar estrutura semelhante às alças cervicais (Yokohama-Tamaki et al., 2006). Além disso, camundongos transgênicos com deficiência de FGF10 apresentam incisivos com defeitos no compartimento de células-tronco epiteliais (Yokohama-Tamaki et al., 2006; Tummers et al., 2007).

Assim pode-se ver que existem muitos estudos sobre o nicho de células-tronco no epitélio dental, porém pouco se sabe a respeito do nicho de células-tronco no mesênquima.

O controle de células-tronco mesenquimais e epiteliais parece responder ao Sonic hedgehog (Shh) (Seidel et al., 2010). Este gene é também relacionado a outras células-tronco e participa do crescimento e morfogênese dental (Hardcastle et al., 1998; Dassule et al., 2000; Cobourne et al., 2001; Gritli-Linde et al., 2002). O Shh é expresso, em pré-ameloblastos presentes na porção da alça cervical labial e no mesênquima subjacente a esta área em incisivos de camundongo (Seidel et al., 2010). O produto do gene Shh produzido pelos ameloblastos progenitores ativa células de ciclagem lenta que expressam Gli e Patched (Seidel et al., 2010). As células de ciclagem lenta Gli⁺ e Patched⁺ estão presentes na porção mais apical da polpa dental, localizadas entre as alças cervicais e em células epiteliais na extremidade mais apical das alças cervicais labial e lingual. Camundongos com deficiência de Gli apresentam dentes com mal formação de esmalte. O bloqueio do receptor Smoothed (SMO) da via Hedgehog, causa diminuição da expressão de Gli1 e Patched, resultando em redução de esmalte na região proximal dos incisivos e severa alteração morfológica e secreção de dentina anormal, levando a não formação de esmalte. (Seidel et al., 2010). Estas células de ciclagem lenta demonstram responder ao Shh através da presença de Gli1 (efetor de transcrição do Shh) e Patched (Receptor de Shh), atuando na amelogênese (Seidel et al., 2010).

Durante o desenvolvimento dos incisivos de camundongos, foi demonstrado que genes membros do complexo repressivo Polycomb-1 (PRC1) são fortemente expressos no mesênquima apical onde são encontradas células que apresentam alta proliferatividade (Lapthanasupkul et al., 2012). Entre estes genes encontram-se Ring1a, Ring1b, Nspc1/Pcgf1 e Skp1. A ausência de Ring1a/b ocasiona incisivos com defeitos no esmalte e dentina, defeitos morfológicos nas alças cervicais e redução da expressão de FGF3, FGF10 (Lapthanasupkul et al., 2012) sugerindo que o complexo Polycomb regula células transientes-amplificadoras presentes no nicho de células-tronco mesenquimais dos incisivos.

3 PROPOSIÇÃO

Estudar populações de células-tronco em tecidos curetados de alvéolos dentais humanos e em polpas dentais de camundongos.

3.1 Proposições específicas

Em tecidos derivados de alvéolos dentais humanos:

- a) Isolar populações celulares Stro-1⁺ e CD146⁺ derivadas de fragmentos obtidos de tecido curetado de lojas cirúrgicas após extração de dentes permanentes.
- b) Verificar se estas populações celulares comportam-se como células-tronco, através de análises e caracterização por experimentos *in vitro* e *in vivo*.

Em tecidos derivados de camundongos:

- a) Estudar as populações celulares positivas para os marcadores de células-tronco mesenquimais CD90, CD73 e CD105 sozinhos e quando combinados em polpa dental *in vivo*.
- b) Comparar essas populações em incisivos e molares em diferentes fases do desenvolvimento dental.
- c) Estudar a localização das células de ciclagem lenta e a co-expressão das mesmas com a proteína Patched (previamente associada a células de ciclagem lenta) e com a proteína Ring 2/1B/RNF (previamente associada a células de ciclagem rápida).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Esse projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo sob o número 01/09 (Anexo A) e pelo comitê de ética do Reino Unido a partir de registro do King's College London sob a licença nº 70/6870. O financiamento foi obtido através do auxílio regular à pesquisa recebido da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (processo nº2009/00041-3) e bolsa de doutorado processo FAPESP nº2010/06936-0. A parte realizada no King's College London foi financiado pelo Medical Research Council do Reino Unido.

Esta tese foi concebida em um acordo de duplo diploma entre as Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (USP) e do King's College London (KCL). Por este motivo, ele foi planejado para conter capítulos abordando grupos diversos de resultados respeitando também o modelo de tese do KCL. Porém, recentemente, o duplo diploma foi cancelado e o trabalho foi então re-escrito em português respeitando o modelo de tese da USP.

4.1 Análises em tecidos derivados de curetagem alveolar após extração de dentes humanos

A metodologia a seguir refere-se a primeira parte onde foi feito o isolamento e caracterização de células derivadas da curetagem do alvéolo dental humano após extrações dentais.

4.1.1 Obtenção das amostras

Após a remoção de dentes extraídos por indicações variadas (cáries dentárias extensas, raízes residuais, indicações ortodônticas), foi realizada a curetagem da loja cirúrgica com uso de cureta angulada tipo Lucas nº 85. Este procedimento foi realizado na Clínica de Cirurgia e

Traumatologia da FOUSP pelo profissional responsável pelo caso clínico presente no momento da cirurgia. Não houve nenhuma calibração dos profissionais que realizaram a curetagem e os mesmos foram instruídos a realizar esse procedimento da mesma forma que realizam rotineiramente. A única diferença foi que o tecido removido foi colocado em meio de transporte (explicitado abaixo) ao invés de ser descartado.

Todos os participantes foram esclarecidos sobre a pesquisa e somente participaram mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo B).

Os dados clínicos como idade, sexo do paciente e estado do dente no momento da remoção cirúrgica foram coletados. Imagens radiográficas representativas dos dentes que originaram algumas linhagens celulares estão apresentadas na Figura 3.1. O restante do procedimento, desde a obtenção dos tecidos até a separação, encontra-se explicitado na figura 4.1.

Figura 4.1 - Radiografias de alguns dentes com variadas indicações de exodontia utilizados no estudo e respectivas nomenclaturas de linhagens estabelecidas. A, linhagem RO1, dente hígido semi-incluso; B, linhagem RO3, dente cariado; C, linhagem RO15, dente hígido incluso impactado; D, linhagem RO8, dente com cárie extensa com comprometimento de furca e polpa necrosada; E, linhagem RO9, raiz residual; e F, linhagem RO10, raiz residual com lesão periapical

4.1.2 Cultivo das células do raspado de osso alveolar

Todos os procedimentos foram efetuados em capela de fluxo laminar, seguindo os protocolos para manutenção de esterilidade dos materiais, suplementos e meios de cultura utilizados.

A técnica utilizada para o estabelecimento das linhagens foi o método de Explante de acordo com protocolo previamente estabelecido (Freshney, 2000).

O meio de transporte era constituído de 3 mL α MEM (Minimum Essential Medium Eagle – α modification, Sigma®, M4526) com 2% de solução antibiótica-antimicótica (Gibco®, A5955), 10% de soro fetal bovino (Fetal Bovine Serum, Gibco®, 10437028) e 2mM L-Glutamina (GlutaMAX™, Gibco®, 35050061) (Figura 4.2). O meio para expansão foi constituído de α MEM (Sigma®, M4526) com 1% de solução antibiótica-antimicótica (Gibco®, A5955) e 10% de soro fetal bovino (FetalClone® III, Hyclone®, SH 30109.03) e 100 μ M de ácido ascórbico e 2mM L-glutamina (GlutaMAX™, Gibco®, 35050061) (adaptado de Gronthos et al., 2000; 2002; Miura et al., 2003).

Para promover a saída de células dos explantes, os fragmentos do raspado foram posicionados em placa de cultura celular e após o posicionamento correto foi gotejado entre os mesmos, o meio de expansão celular. Após as células migrarem e aderirem à placa, o meio de cultura foi trocado, de acordo com a necessidade do metabolismo celular, em média a cada 48 horas. O monitoramento do crescimento celular foi efetuado através de microscópio de contraste de fase (Nikon Eclipse TS100-F inverted microscope, Nikon). Os conjuntos explantes/células e posteriormente somente as células foram mantidos em estufa a 37°C, em atmosfera úmida, contendo 5% de CO₂.

Após atingirem 80% de confluência na placa, as células foram sub-cultivadas de acordo com a necessidade de novas placas. Para tanto, a monocamada celular foi lavada com PBS 1X, sem cálcio e magnésio pH 7,4 (Gibco®, código 70011-044) e as células foram separadas com solução Tryple® Express (Gibco®, código 12604021), em temperatura de 37°C por no máximo 5 minutos. As células em suspensão foram centrifugadas a 1300 rpm por 5 minutos em temperatura ambiente. O precipitado de células foi ressuspensão em meio de expansão fresco para aquisição de alíquotas para novo crescimento celular. Uma parte das células também foi congelada para que, caso necessário, posteriormente elas fossem utilizadas para repetição dos experimentos.

Para expansão das células as mesmas foram sub-cultivadas nas concentrações de 5×10^3 células/cm².

4.1.3 Perfil de imunexpressão das linhagens antes da separação celular

A caracterização de imunexpressão das linhagens antes da separação celular foi realizada nas células derivadas das linhagens RO3, RO4, RO8, RO9, RO10 e RO16 através da técnica de imunofluorescência para os anticorpos Vimentina, AE1/AE3, Stro-1 e CD146. As especificações e diluições dos anticorpos primários utilizados estão descritos na tabela 4.1 e anticorpos secundários na tabela 4.4.

Brevemente, as células plaqueadas em lamínulas de vidro, foram fixadas em metanol a 20°C negativos por 10 minutos, e lavadas em PBS 1X. Para o bloqueio da marcação inespecífica, as células foram incubadas em solução de PBS1X com 1% de BSA, por 30 minutos em temperatura ambiente. Os anticorpos primários foram incubados durante 60 minutos em câmara úmida e temperatura refrigerada (2 a 8°C). Para controle negativo, as amostras foram incubadas em solução de PBS1X com 1% de BSA, sem presença de anticorpo primário. Após incubação, as lamínulas foram lavadas e incubadas com seus respectivos anticorpos secundários durante 30 minutos. As montagens das lâminulas sobre as lâminas de vidro foram realizadas utilizando-se meio de montagem Vectashield (Vector®) conjugado ao DAPI (4', 6-diamino-2-fenilindole, dihidroclorido). As observações e fotomicrografias foram realizadas em epi-iluminação em microscópio de fluorescência Zeiss Axiophoto, usando objetivas Plan Neofluor de 20x e 40x e abertura numérica de 1,4.

Tabela 4.1 - Anticorpos primários utilizados e suas especificações

Anticorpo	Clone	Diluição do anticorpo primário	Hospedeiro
Anti-CD 146 ¹	EPR3208	1:80	Coelho
Anti-Stro-1 ²	Stro-1	1:50	Camundongo
Anti-citoqueratina ³	AE1/AE3	1:50	Camundongo
Anti-vimentina ³	V9	1:500	Camundongo

1 Epitomics

2 Invitrogen

3 Dako

4.1.4 Isolamento de populações enriquecidas em células-tronco

Foi utilizada a separação celular através do uso de magneto (MACS®, Miltenyi Biotec) de acordo com especificações do fabricante. Foram isoladas populações distintas utilizando a expressão das proteínas CD146 e Stro-1.

As linhagens celulares ressuspensas (como descrito anteriormente) foram passadas em filtro celular de nylon com 70µm de poro (BD Falcon™, ref 352350) antes da separação celular para evitar agregados celulares durante o procedimento de separação.

Para o marcador CD146, amostras celulares na concentração total de 10×10^6 células das linhagens RO4, RO8, RO9, RO10 e RO16, na passagem 3, foram ressuspensas em 100 µl de solução tampão de separação (PBS 1X com 2mM de EDTA e BSA a 0,5%) e incubadas por 15 minutos sob refrigeração (2 a 8°C) com 10 µl de microbeads conjugados ao anticorpo CD146 (MACS, Miltenyi Biotec, código 130-093-596), 10 µl de reagente bloqueador (FcR Blocking Reagente, incluso no kit Miltenyi Biotec, código 130-093-596) diluído em 80µl de solução tampão de separação. Após centrifugação e lavagem, as amostras foram ressuspensas na solução tampão e passadas na coluna de separação celular magnética. As células CD146⁺ foram coletadas e expandidas. O restante das células (CD146 negativas) também foi coletado e expandido para utilização como controle negativo da população enriquecida CD146⁺.

Para o marcador Stro-1, as amostras celulares utilizadas também foram provenientes das linhagens RO3, RO8, RO9, RO10 e RO16 na passagem 3. Nesse caso, foi utilizado o anticorpo primário anti-Stro-1 (Invitrogen, código 39-8401) e microbeads anti-camundongo IgM (MACS, Miltenyi Biotec, código 130-047-301). Amostras celulares na concentração de 10×10^6 células foram ressuspensas e incubadas por 30 minutos com solução de PBS1X com 10% de soro fetal bovino e 1% de BSA para bloqueio de marcação inespecífica, depois incubadas com o anticorpo primário anti-Stro-1 diluído em BSA com PBS 1%, na concentração de 1:50, durante 1 hora sob refrigeração (2 a 8°C). Após centrifugação e lavagem utilizando a solução tampão de separação, as células foram incubadas por 15 minutos com os microbeads (10 µl de beads diluídos em 90µl de solução tampão de separação). Após esse período as células foram novamente lavadas, ressuspensas na solução tampão de separação e passadas na coluna de separação celular. Da mesma forma que as células CD146⁺, as células Stro-1⁺ foram coletadas e expandidas. As demais células foram também coletadas para utilização como controle negativo.

Durante a separação as células positivas ficam retidas na coluna (Miltenyi Biotec, código 130-042-201), enquanto as células negativas são coletadas no tubo de ensaio que fica

logo abaixo das colunas (Figura 4.2 E). As células positivas são removidas através da adição de 2 ml de solução tampão 1 (descrito no Kit de separação) na parte superior da coluna, a coluna é retirada do magneto para possibilitar que as células se soltem da coluna, com o auxílio de um êmbolo, e coletadas em um novo tubo.

Figura 4.2 - Obtenção das amostras, cultura primária através da técnica de explante e separação magnética. A, foto do procedimento de curetagem para obtenção do material; B, material curetado; C, fragmentos de raspado alveolar em placa de cultivo celular; D, fotomicroscopia de células proliferando a partir do explante de material curetado do alvéolo dental; E, momento da separação magneticamente mediada

Logo após a separação celular, o número de células viáveis positivas e negativas foi contado utilizando Câmara de Neubauer. A partir do total de células obtidas de cada população separada, foi possível calcular a porcentagem de células positivas e negativas existentes a partir de 1×10^7 células (número de células utilizado em cada separação).

Para tanto, foram contados os quatro quadrantes externos da câmara de Neubauer. O valor da soma dos quadrantes foi dividido por 4 e multiplicado pelo fator de diluição. Esse valor final multiplicado por 10^4 resultou no número total de células obtidas por ml.

As populações separadas foram subcultivadas nas concentrações de 5×10^3 células/cm² para expansão até a passagem 3 para os demais experimentos serem efetuados.

Nos ensaios subseqüentes, com exceção da contagem por citometria de fluxo, foram utilizadas tanto as populações positivas (Stro-1⁺ e CD146⁺) quanto as negativas (Stro-1⁻ e CD146⁻).

4.1.5 Quantificação de células por citometria de fluxo

Cada análise de citometria de fluxo foi efetuada em triplicata em amostras das linhagens RO3 e RO8.

Para efetuar a compensação do aparelho de detecção, foram utilizados “beads” (micropartículas) próprios para detecção por citometria de fluxo, sensíveis aos isotipos utilizados nos anticorpos primários conjugados. Para ambos anticorpos Stro-1 e CD146 com isotipo camundongo foi utilizado o kit beads anti-mouse Ig (BD™ CompBeads, código 552843). Foi considerado marcação positiva, o nível de fluorescência $\geq 99\%$ para o isotipo correspondente ao anticorpo a ser detectado.

Cada população foi removida da placa de cultivo utilizando Tryple® Express (Gibco®, código 12604021) e as células ressuspensas foram passadas em filtro celular de nylon com 70µm de poro (BD Falcon™, ref 352350). As mesmas foram então contadas e aliquoteadas na concentração de $0,5 \times 10^6$ células/tubo em tubos Falcon™ de 15ml para as seguintes amostras:

- a. Células sem anticorpo (controle negativo)
- b. Células coradas apenas com 1 anticorpo conjugado
- c. Células coradas com 2 anticorpos conjugados
- f. Células com Controle isotipo IgG para cada ‘cor’
- g. Controle positivo com Beads (kit beads anti-mouse Ig, BD™ CompBeads, código 552843) incubados com anticorpos conjugados (Tabela 4.2).

Essa quantidade de amostras é necessária para a compensação do aparelho de citometria de fluxo. Desta forma é possível remover qualquer ruído de detecção por marcação inespecífica entre os anticorpos e do tecido.

As amostras foram subsequentemente analisadas nos aparelhos FACSCanto I e II e os dados analisados pelo software BD FACSDiva versão 6.1.3. Os anticorpos utilizados nas análises estão descritos na Tabela 4.2.

Para a detecção da expressão isolada e da co-expressão de Stro-1 e CD146, o anticorpo Stro-1 foi incubado em temperatura ambiente de refrigerada (2 a 8°C) durante 1h, enquanto o CD146 foi incubado durante 15min em temperatura ambiente, ambos diluídos em PBS1X com 2% de soro fetal bovino (SFB). O bloqueio de marcação inespecífica foi realizado com solução de PBS1X com 2% de SFB. Seguiu-se a incubação, lavagem com PBS1X e fixação em paraformaldeído 2% por 5 min. As amostras foram então deixadas em PBS1X até o momento da análise.

Tabela 4.2 - Anticorpos utilizados para quantificação de Stro-1 e CD146 por citometria de fluxo e suas especificações

Anticorpo	Clone	Diluição do anticorpo primário	Hospedeiro
Anti-CD 146 conjugado FITC ¹	P1H12	1:80	Camundongo
Anti-Stro-1 conjugado PE ²	Sc-47733	1:50	Camundongo
Controle Isotípico Camundongo IgG FITC ³	P3.6.2.8.1	1:80	Camundongo
Controle Isotípico Camundongo IgM PE ³	11E10	1:50	Camundongo

1 Abcam

2 Snata Cruz Biotechnology

3 e-Bioscience

4.1.6 Ensaio de proliferação celular

Para a realização desse ensaio foi utilizada a técnica descrita anteriormente com câmara de Neubauer. As células foram plaqueadas em placas de 12 poços na concentração de 5×10^3 células/ml. Foram plaqueados 3 poços para cada dia de contagem e para cada linhagem a ser contada, sendo que de cada poço foram efetuadas 2 contagens independentes. As contagens ocorreram no 3°, 6°, 9°, 12° e 15° dia após plaqueamento. As populações avaliadas foram:

- ✓ Células Stro-1⁺ derivadas de RO3, RO8, RO9
- ✓ Células Stro-1⁻ derivadas de RO3, RO8, RO9
- ✓ Células CD146⁺ derivadas de RO4, RO8, RO9 e RO10
- ✓ Células CD146⁻ derivadas de RO4, RO8, RO9 e RO10

O número de células contados a cada dia para cada amostra foi somado e a média $\pm$ desvio padrão foi calculada.

4.1.7 Capacidade de formação de colônias

Cada população celular magneticamente separada, derivada das linhagens RO8, RO9, RO10 e RO16, foi plaqueada na passagem 1, em placas Petri de 10 cm de diâmetro na concentração de 10^4 células/placa. Após 7 dias, quando existia a formação de agregados celulares contendo mais de 50 células, as placas foram fixadas com álcool metílico 100% por 5 minutos e coradas com azul de toluidina a 0,5%.

Os agregados celulares com mais de 50 células foram considerados colônias e essas foram contadas utilizando programa ImageJ versão 1.6.0. (Collins, 2007).

4.1.8 Ensaio de migração celular

Para observar a capacidade de migração celular, as células foram cultivadas em placas de 12 poços na concentração de 10^4 células/ml por poço. Após atingirem a confluência, foi efetuada uma fenda no centro dos poços de cultivo utilizando um raspador celular de 13mm (TTP®, código 99002). Imediatamente, as placas foram lavadas exaustivamente em solução tampão de PBS 1X (Gibco®, código 70011-044) para remoção das células suspensas.

A mesma área da placa (onde a fenda estava presente) foi analisada a cada 24h e nesse momento, a área da fenda remanescente sem cobertura celular era calculada utilizando o software ImageJ versão 1.6.0. (Collins, 2007). Assim, o valor da área obtido era subtraído da área inicial, e a porcentagem da área contendo as células que migravam para fechar a fenda foi calculada.

4.1.9 Perfil de imunoexpressão das linhagens enriquecidas em células-tronco

As populações derivadas das linhagens RO3, RO4, RO8, RO9, RO10 e RO16 foram submetidas a um painel de anticorpos primários (Tabela 4.3) e secundários (Tabela 4.4), através da técnica de imunofluorescência.

A técnica utilizada para realização da marcação antígeno anticorpo é a mesma descrita anteriormente no item 4.1.3.

Tabela 4.3 - Anticorpos primários utilizados e suas especificações

Anticorpo	Clone	Diluição do anticorpo primário	Hospedeiro
Anti-CD 146 ¹	EPR3208	1:80	Coelho
Anti-Stro-1 ²	Stro-1	1:50	Camundongo
Anti-citoqueratina ³	AE1/AE3	1:50	Camundongo
Anti-vimentina ³	V9	1:500	Camundongo
Anti CD90 ⁴	CBL415	1:50	Camundongo
Anti-AML ³	1A4	1:100	Camundongo
Anti-NG2 ⁵	AB50009-100	1:100	Camundongo
Anti-PDGFr-β ⁵	Y92	1:100	Coelho
Anti-SOX-2 ⁵	57CT23.3.4	1:100	Camundongo

1 Epitomics

2 Invitrogen

3 Dako

4 CHemicon Europe

5 ABCAM

Tabela 4.4 - Anticorpos secundário utilizados e suas especificações

Anticorpo	Clone	Diluição do anticorpo primário	Hospedeiro
Anti-camundongo IgG Alexa488 ¹	A-11001	1:100	Cabra
Anti-coelho IgG ¹	A-111-095-144	1:100	Cabra
Anti-rato IgG +IgM Cy3 ²	112-165-044	1:100	Cabra

1 Invitrogen Lifetechnology

2 Jackson ImmunoResearch

4.1.10 Potencial de multidiferenciação *in vitro*

Os experimentos de multidiferenciação foram sempre realizados na passagem 3 após separação celular nas populações derivadas das linhagens RO8, RO9, RO10 e RO16. De cada uma delas foi realizada indução da diferenciação osteogênica, condrogênica e adipogênica.

A análise de multidiferenciação também foi realizada na passagem 3 a partir de células derivadas de colônias obtidas da linhagem RO16. Foram coletadas cinco colônias de cada população que se encontravam na passagem 1 quando coletadas. As células das colônias escolhidas foram transferidas para uma nova placa para serem novamente expandidas. Nesse caso, efetuamos apenas a diferenciação osteogênica e adipogênica de cada população (Stro-1⁺, CD146⁺ e populações negativas), pois o subcultivo a partir de uma única colônia não foi capaz de originar células suficientes para os experimentos de diferenciação condrogênica.

Cada experimento foi efetuado em triplicata e como controle negativo foram cultivadas células nas mesmas concentrações e períodos, porém utilizando meio de cultura convencional.

A seguir descrevemos cada ensaio de diferenciação *in vitro*.

- **Diferenciação Osteogênica**

As células foram semeadas na concentração de 1×10^4 cel/cm² em placas de 12 poços e cultivadas em meio convencional até confluência (5 dias) e depois deste período o meio foi trocado pelo meio de cultivo para promover a diferenciação osteogênica utilizando kits de diferenciação osteogênica (StemPRO Osteogenesis Differentiation Kit, Gibco, código A10072-01). O meio de cultivo foi trocado a cada 2 dias e a indução efetuada durante 21 dias.

Após 21 dias, as células foram coradas por alizarina vermelha para detecção de depósitos de cálcio. Para tanto as amostras foram lavadas com PBS1X, fixadas com paraformaldeído a 4%, lavadas gentilmente com água destilada e coradas com solução de alizarina vermelha a 2% (2g Alizarina vermelha CI 58005, diluída em 100ml de água deionizada) pH 4.2 durante 16 horas. Após a lavagem exaustiva com água destilada as placas

foram analisadas para a detecção de depósitos de cálcio que apresentavam coloração laranja-avermelhado.

- **Diferenciação Adipogênica**

Utilizando os mesmos parâmetros de plaqueamento da diferenciação osteogênica, procedeu-se a diferenciação adipogênica, com a diferença de que nesse caso, o meio convencional foi trocado pelo meio de indução adipogênica (StemPRO Adipogenesis Differentiation Kit Gibco, código A10070-01), sendo este trocado a cada 2 dias. A diferenciação adipogênica também foi realizada durante 21 dias.

Após a indução as células foram coradas com solução de óleo O vermelho para verificar a presença de depósitos lipídicos. As amostras foram lavadas com PBS1X, fixadas com paraformaldeído a 4%, lavadas gentilmente com água destilada, mergulhadas em álcool isopropílico a 60% por 10 min e coradas com solução de trabalho óleo O vermelho (Oil O Red, Sigma-Aldrich, código O0625) (solução de estoque= 0,5g de Oil O Red diluído em 100ml de álcool isopropílico 100%, solução de trabalho= 30ml da solução estoque diluída em 20ml de água destilada) durante aproximadamente 16 horas. Posteriormente, as amostras foram lavadas com álcool isopropílico 60% e deixadas com água destilada para captura das imagens.

- **Diferenciação Condrogênica**

Dois tipos de plaqueamento foram efetuados para este ensaio:

- 1) Células cultivadas em placas de cultivo

Para este experimento 5 μ l de células na concentração de $1,6 \times 10^7$ células/ml (Figura 4.3), foram plaqueadas em placas de 12 poços, deixadas na estufa durante 2 horas e posteriormente cultivadas com meio de diferenciação condrogênica (StemPRO

Chondrogenesis Differentiation Kit, Gibco, cat. nº A10071-01) durante 14 dias. O meio foi trocado a cada 2 dias.

Após a indução as células foram fixadas com paraformaldeído a 4% e coradas com solução de azul de alciano (1g de Alcian Blue, 8GX, diluído em 100ml de solução de ácido acético a 3%, com pH 2,5) durante 16h e lavadas com água destilada para verificar a síntese de proteoglicanos, produto de condrócitos, corados em azul.

Figura 4.3 - Aspecto da gota de 5 µl de células antes da indução condrogênica

2) Células cultivadas em tubo Falcon™ de 15ml

Para este ensaio as células foram colocadas em tubos Falcon™ de 15ml (Corning Falcon™, código 14-959-49D) na concentração de 10^6 células e cultivadas em 1ml de meio de cultivo condrogênico (StemPRO Chondrogenesis Differentiation Kit, Gibco, cat. nº A10071-01). O meio foi trocado a cada 2 dias e as células induzidas durante 14 dias.

Após a indução as células foram fixadas com paraformaldeído a 4%, incluídas em gel de agarose a 2%, e processadas para inclusão em parafina. A partir do material histológico emblocado em parafina, foram obtidos cortes histológicos com 3µm de espessura em micrótomo da marca Leica (modelo RM 2045). Após a colocação dos cortes sobre lâminas de vidro, as amostras seguiram para uma estufa a 60°C onde permaneceram por um tempo aproximado de 24h para secagem e aderência dos cortes sendo em seguida, coradas com azul de alciano obedecendo a seguinte sequência de processamento: 1) Xilol 100% (I) por 10 min, 2) Xilol 100%(II) por 10 min, 3) Álcool absoluto por 5 min, 4) Álcool 95% por 5 min, 5) Álcool 90% por 5 min, 6) Álcool 80% por 5 min, 7) Água destilada corrente por 5 min, 8) Solução de Azul de alciano por 16 horas, 9) Água destilada corrente por 5 min, 10) Álcool 80% por 30 segundos, 11) Álcool 80% por 3 min, 12) Álcool 90% por 3 min, 13) Álcool 95% por 3 min, 14) Álcool absoluto por 3 min, 15) Álcool/Xilol (1:1) por 5 min, 16) Xilol (III) por

5 min, 17) Xilol (VI) por 5 min, montadas com meio de montagem PermOUNT™ (Fisher Scientific).

4.1.11 Estudo da diferenciação *in vivo*: transplante em animal imunocomprometido

Para esse ensaio foram feitos transplantes no dorso de 5 camundongos Balb/C do tipo nude, adquiridos do Biotério do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN).

Foram transplantados 5 enxertos por camundongo, sendo cada enxerto pertencente a 1 amostra de cada grupo (especificados abaixo) contendo aproximadamente 10^6 células misturadas com 40 mg de hidroxiapatita/fosfato tricálcico (HA/TCP, OSGP 5 [100:200], Osteosynth®) pó cerâmico (Figura 4.4). Desta forma 5 grupos foram analisados em dois tempos pós transplante:

- 1) Grupo controle: enxertos constituídos com apenas 40mg de partículas de hidroxiapatita/fosfato tricálcico.
- 2) Grupo Stro-1⁺: enxertos contendo 10^6 células Stro-1⁺ com 40mg de partículas de hidroxiapatita/fosfato tricálcico.
- 3) Grupo Stro-1⁻: enxertos constituídos de 10^6 células Stro-1 negativas com 40mg de partículas de hidroxiapatita/fosfato tricálcico.
- 4) Grupo CD146⁺: enxertos de 10^6 células CD146⁺ com 40mg de partículas de hidroxiapatita/fosfato tricálcico.
- 5) Grupo CD146⁻: enxertos com 10^6 células CD146 negativas com 40mg de partículas de hidroxiapatita/fosfato tricálcico.

Antes de transplantadas as células foram deixadas em contato com o material de enxertia em meio de cultivo a 37°C durante 12 horas. O grupo controle também ficou nas mesmas condições, apenas em meio de cultivo.

Os animais foram eutanaziados após de 20 e 30 dias do transplante. O material transplantado foi dissecado, fixado com paraformaldeído a 4%, descalcificado com EDTA 4,13% pH 7,4 e depois embebido em parafina. Secções de 3µm foram coradas com hematoxilina-eosina (HE) para análise morfológica.

Figura 4.4 - Transplante de células Stro-1⁺, CD146⁺ e suas respectivas populações negativas derivadas de curetagem do alvéolo dental em dorso de camundongos imunocomprometidos. A. Pesagem da hidroxiapatita em balança de precisão, em ambiente limpo, dentro de fluxo laminar. B, detalhe da hidroxiapatita sem as células. C, detalhe das células associadas a hidroxiapatita. D, incisão no dorso do animal. E, colocação dos transplantes. F, pós-cirúrgico imediato com áreas de transplante suturadas. G, áreas de transplante no detalhe com seus respectivos enxertos após 30 dias de transplante

4.2 Análises em polpas dentais de camundongos

A metodologia a seguir refere-se a segunda parte, onde foram efetuados os experimento de análise em polpas dentais de camundongos *in vivo*.

Nas polpas dentais de camundongos foram analisados:

- 1) A expressão dos marcadores CD90, CD105 e CD73 em polpas dentais de incisivos e molares de animais em diferentes idades utilizando a técnica de citometria de fluxo.
- 2) A expressão isolada e co-expressão dos marcadores CD90 e BrdU em incisivos de animais adultos que receberam administração de BrdU nos parâmetros descritos

abaixo, pela técnica de citometria de fluxo. E em separado foi analisada a expressão de CD90 e BrdU pelas técnicas de imunofluorescência “whole mount” e imunohistoquímica (peroxidase), respectivamente.

- 3) A co-expressão de CD90 e Ring 2/1B/RNF em incisivos de camundongos adultos, utilizando a técnica de citometria de fluxo.
- 4) A co-expressão da proteína Patched e demais marcadores de células-tronco CD90, CD105 e CD73 em incisivos de camundongos adultos, pela técnica de citometria de fluxo. Em separado foi analisada a expressão de Patched pela técnica de imunofluorescência.

4.2.1 Obtenção das amostras

Para a análise da expressão dos marcadores CD90, CD105 e CD73 por citometria de fluxo foram utilizados 60 camundongos na idade pós-natal de 5 dias dos quais foram coletadas 240 polpas de incisivos e 240 polpas de 1ºs molares, 60 camundongos na idade pós-natal 10 dias dos quais foram coletadas 240 polpas de incisivos e 240 polpas de 1ºs molares e 40 camundongos adultos (entre 6 semanas e 12 semanas de vida) dos quais foram coletadas 160 polpas de incisivos.

Para as análises de CD90 e BrdU foram utilizados: 120 camundongos adultos, sendo estes divididos em três grupos (explicitados no experimento de Incorporação de BrdU) contendo 40 animais cada grupo, dos quais foram coletados os incisivos superiores e inferiores, resultando um total de 102 polpas para análise por citometria de fluxo de CD90 e BrdU e 18 polpas para análises imuno-histoquímicas do BrdU.

Para as análises de CD90 e Ring 2/1B/RNF foram utilizados 30 camundongos adultos e analisadas um total de 120 polpas por citometria de fluxo.

Para as análises da expressão de Patched foram utilizados 40 camundongos adultos sendo analisadas, 148 polpas de dentes incisivos por citometria de fluxo e 12 polpas para a análise por imunofluorescência do Patched e CD90.

4.2.2 Ensaios de citometria de fluxo

A análise por citometria de fluxo em polpa dental de camundongos foi realizada a partir de “pool” de células obtido de tecidos frescos de camundongos Swiss (CD1®, Charles River, código 482). Durante a extirpação da polpa dental, os tecidos foram mantidos submersos em solução tampão de PBS1X (Sigma-Aldrich) estéril e manipulados em capela de fluxo laminar. Esse pool de células foi preparado para a análise por citometria de fluxo da seguinte forma:

Primeiramente, as polpas foram lavadas em PBS1X, cortadas em pequenos pedaços, menores que 1mm, utilizando lâminas de bisturi nº23 ou 27 e processadas para digestão enzimática utilizando Tryple® Express (Gibco®, código 12604021) por 1 hora a 37°C, sob agitação a cada 30 minutos. Após digestão enzimática, as células foram passadas em filtro celular de nylon com 70µm de poro (BD Falcon™, ref 352350), contadas e aliqüotadas na concentração de $0,5 \times 10^6$ células/tubo em tubos Falcon™ de 15ml para as seguintes amostras:

- a. Células sem anticorpo (controle negativo)
- b. Células coradas apenas com 1 anticorpo
- c. Células coradas com 2 anticorpos
- d. Células coradas com 3 anticorpos (quando pertinente)
- e. Células coradas com 4 anticorpos (quando pertinente)
- f. Células com Controle isotipo IgG ou secundário
- g. Controle positivo com Beads (kit beads anti-mouse Ig, BD™ CompBeads, código 552843 e kit beads anti-rat Ig, BD™ CompBeads, código 552844) incubados com anticorpos (tabela 4.5) conjugados ou apenas incubados com secundário com mesmo espectro a ser detectado do anticorpo primário.

O grande número de amostras foi necessário para a compensação do aparelho de citometria de fluxo, de forma que foi possível remover ruídos de detecção por marcação inespecífica entre os anticorpos e do tecido.

Após aliqüotadas, as amostras foram processadas para incubação com anticorpos e analisadas nos aparelhos FACSCanto I e II e os dados analisados pelo software BD FACSDiva versão 6.1.3. Os anticorpos utilizados nas análises estão descritos na Tabela 4.5.

Cada análise de citometria de fluxo foi efetuada em triplicata para cada duas amostras de pool de células e acompanhada por controles positivos e negativos para cada “cor” de anticorpo utilizado.

Para a detecção da co-expressão de CD90, CD105 e CD73 em incisivos e molares as amostras foram incubadas com os anticorpos em temperatura ambiente durante 15min, lavadas com PBS1X, fixadas posteriormente em paraformaldeído 2% por 5 min e deixadas em PBS1x para análise.

Para a detecção da co-expressão de CD90 e BrdU em incisivos de camundongos as amostras com dupla marcação foram coradas primeiro com o CD90 por 15 min, lavadas com PBS1X, fixadas e permeabilizadas utilizando o kit de fixação e permeabilização para fatores de transcrição (BD PharmingenTM, código 5600098). Em seguida as mesmas foram ressuspensas e incubadas com anticorpo primário anti-BrdU por 30 min na temperatura ambiente, lavadas com a solução tampão do kit e incubadas por mais 30 min com o anticorpo secundário anti-rato Alexa 594. Por fim, as amostras foram novamente lavadas duas vezes com a solução tampão do kit e ressuspensas em PBS1x para serem submetidas à análise. As amostras com marcação simples para BrdU foram previamente tratadas com o kit de fixação e permeabilização para a incubação do anticorpo primário e posterior incubação do secundário. Depois lavadas e deixadas em PBS1x para análise.

Para a detecção da co-expressão de CD90 e Ring2/1B/RNF em incisivos de camundongos as amostras foram processadas como descrito acima, sendo o BrdU substituído pelo Ring2/1B/RNF e seu respectivo anticorpo secundário (Tabela 4.5).

Para a análise da co-expressão de Patched (PTC) e demais anticorpos (CD90, CD73 e CD105) em incisivos, as amostras foram incubadas primeiro com o anticorpo anti-PTC por 16 horas a 4°C em câmara úmida e depois coradas com secundário por 30 min. Posteriormente houve a incubação com os demais anticorpos conjugados por apenas 15 min. Por fim, as amostras foram fixadas com paraformaldeído a 2% e deixadas em PBS1X até o momento da análise

Tabela 4.5 - Anticorpos utilizados na análise por citometria de fluxo

Anticorpo	Diluição	Localização	Clone	Hospedeiro
CD 90 conjugado com FITC ¹	1:100	Membrana	1.BB.730	Camundongo
CD73 conjugado com PerCP-Cy5.5 ²	1:100	Membrana	TY/11.8	Rato
CD105 conjugado com PE-Cy7 ²	1:25	Membrana	MJ7/18	Rato
Patched/ PTC ¹	1:100	Membrana	39266	Coelho
Ring2/1B/RNF ¹	1:50	Núcleo	3832	Cabra
Anti-BrdU ¹	1:50	Núcleo		Rato
Anti-rato Alexa Fluor 594 ²	1:100	BrdU e controle negativo BrdU	A212009	Macaco
Anti-cabra Alexa 594 ³	1:100	Ring e controle negativo Ring	A-11058	Macaco
Controle Isotípico Camundongo IgG FITC ⁴	1:100	controle negativo para FITC	P3.6.2.8.1	Camundongo
Controle Isotípico Rato IgG1 PerCP-Cy5.5 ²	1:100	controle negativo para PerCP-Cy5.5	RTK2071	Rato
Controle Isotípico Rato IgG1 PE-Cy7 ²	1:25	controle negativo para PE-Cy7	RTK2758	Rato

1 Abcam

2 Biolegend

3 Invitrogen

4 e-Bioscience

4.2.3 Ensaios de incorporação de BrdU

Inicialmente foi realizada a incorporação de BrdU em camundongos CD1 com 6 semanas de vida que foram submetidos a injeções peridurais contendo 0,6 mls de solução de BrdU. A Solução de BrdU era composta por 10mg de BrdU (5-Bromo-2'- deoxiuridina, Sigma, código B5002-5G) diluído em 1 ml de solução de cloreto de sódio a 0,9% (9g de cloreto de sódio 99,9% (Fisher Scientific, código S/3160/60) diluído em 1litro de água destilada).

Os animais foram divididos em três grupos:

- Grupo 1: Animais para detecção de células de ciclagem lenta. Neste grupo os animais receberam aplicações de uma injeção por dia durante 16 dias e foram eutanaziados somente 32 dias após a última injeção.
- Grupo 2: Animais para detecção de células de ciclagem intermediária. Neste grupo os animais receberam aplicações de uma injeção por dia durante 13 dias e foram eutanaziados 1 semana após o último dia de aplicação da substância.
- Grupo 3: Animais para detecção de células de ciclagem rápida. Para tanto, os animais foram submetidos a uma única aplicação de BrdU e eutanaziados após 24h.

Esse modelo de aplicação de BrdU foi previamente definido em ensaios piloto (dados não apresentados). Nesses ensaios prévios foram efetuadas avaliações em diferentes tempos: 1 hora, 8 horas, 16 horas e 24 horas após única aplicação de BrdU (injeções de BrdU de curto tempo de retenção) e 1 dia, 2 dias, 7 dias, 32 dias e 64 dias após consecutivas aplicações de BrdU (injeções de BrdU de longo tempo de retenção).

Como descrito anteriormente, 18 polpas dentais de animais de cada grupo (1, 2 e 3) foram submetidos a análise imuno-histoquímica para a localização de células BrdU positivas e 6 polpas dentais de animais foram submetidos à análise por imunofluorescência para localização de células Patched e 6 polpas dentais para a localização de células CD90 positivas, enquanto o restante dos animais foram submetidos à análise por citometria de fluxo.

4.2.4 Detecção imuno-histoquímica

Para a detecção de BrdU mandíbulas foram dissecadas e previamente fixadas em paraformaldeído 4% a 4°C, descalcificadas em EDTA 12,5% pH 8 para posteriormente serem incluídas em parafina. O método da estreptavidina-biotina foi utilizado para a reação imuno-histoquímica. Para tanto, cortes de 4µm de espessura foram colocados sobre lâminas de microscopia Superfrost™ Plus (Thermo Scientific™, código 4951PLUS) e submetidos a desparafinização em dois banhos de Histoclear (15 minutos cada), seguidos de hidratação em banhos de etanol em concentrações decrescentes (3 vezes em etanol 100%, 1 vez em etanol 90%, 70% e 50%, todos banhos com 5 minutos de duração cada), recuperação antigênica com EDTA (pH9.0, em banho-maria, a 95°C por 30 min), bloqueio da peroxidase endógena tecidual com solução de peróxido de hidrogênio a 3% (solução de peróxido de hidrogênio 30 volumes diluído em álcool metílico 100% na proporção 1:9, - 2 banhos de 5 minutos),

bloqueio de marcação inespecífica (PBS1X com 1% de BSA e 10% de SFB, durante 1 hora), incubação do anticorpo primário BrdU (Abcam, clone BU1/70(ICR1)) (concentração 1:100, durante 16 horas a 4°C, em câmara úmida), incubação durante 30 minutos do anticorpo secundário (anti-rat IgG (H+L) biotinilado (BA- 9400, 1:100, Vector Laboratories), incubação do anticorpo terciário (estreptavidina-biotina, LSAB kit peroxidase, Dako, código K0690), revelação com cromógeno 3,3'-diaminobenzindina (DAB Puls, Dako, código K0690), e finalmente, os cortes foram contra corados com hematoxilina de mayer, desidratados e montados com meio de montagem DePeX (Gurr®, código 361252B). As imagens foram analisadas utilizando um microscópio Zeiss (Axioskope 2 plus) e capturadas com câmera AxioCam HRC (Zeiss) usando software Axiovision.

Para a detecção do Patched, as polpas foram cuidadosamente dissecadas, depois fixadas em paraformaldeído 4% a 4°C e processadas para inclusão em parafina. Cortes de 4µm de espessura foram colocados sobre lâminas de microscopia Superfrost™ Plus (Thermo Scientific™, código 4951PLUS) e submetidos a desparafinização em dois banhos de Histoclear (15 minutos cada), seguidos de hidratação em banhos de etanol em concentrações decrescentes (etanol 100%, 95%, 90%, 80%, 60% e 30%, todos banhos com 5 minutos de duração cada), recuperação antigênica com Tris/EDTA pH9.0 (10mM Tris Base, 1mMEDTA, 0,05% de Tween®20 diluídos em água destilada) em micro-ondas (5 ciclos de 5 minutos na potência máxima), bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio a 3%, bloqueio de marcação inespecífica (PBS1X com 1% de BSA e 10% de SFB, durante 1 hora), incubação do anticorpo primário Patched (Abcam, clone 39266) (durante 16 horas, em câmara úmida), seguida de 3 banhos de 10 minutos em solução tampão TNT (180ml de Tris-HCL a 1M pH7.5 em 54ml de NaCl 5M e 0,9ml de Tween®20 diluídos em água destilada para 1 litro de solução), e de incubação do anticorpo secundário Anti-coelho Alexa Fluor 594 (Invitrogen™, código A11012) por 30 minutos. Os cortes foram então, lavados em 3 banhos de 10 minutos em solução TNT, montados com meio de montagem Vectashield® com DAPI (Vector, código H-1200), analisados com microscópio Zeiss (Axioskope 2 plus) e as imagens capturadas com uma câmera AxioCam HRC (Zeiss) usando software Axiovision.

Para a detecção do CD90, dentes incisivos inteiros (técnica do “whole mount” ou montagem do todo) foram cuidadosamente dissecados, fixados em paraformaldeído 4% a 4°C e descalcificados em EDTA a 4,13% pH 7,4. Posteriormente, os dentes foram lavados 3 vezes por 30 minutos em PBS 0,5X com 1% de Triton. Foi então efetuado o bloqueio da peroxidase endógena, seguido de bloqueio de marcação inespecífica por 2 horas (com solução de PBS1X, 1% de BSA e 10% SFB) trocando a solução após a primeira hora. Procedeu-se com a

incubação com anticorpo conjugado FITC anti-CD90 (Abcam, clone 1.BB.730) (concentração 1:100, durante 2 dias a 4°C, protegido da luz). Após essa incubação, os dentes foram lavados com solução tampão TNT em 6 ciclos de 1 hora, trocando a solução entre cada ciclo. Todos os passos foram feitos sob agitação. As imagens foram visualizadas com microscópio Leica Stereo-Fluorescence System (Leica, MZFLIII) e capturadas utilizando câmera Leica DFC300FX.

5 RESULTADOS

A seguir seguem os resultados dos experimentos em células derivadas de curetagem de alvéolo dental humano (Seção 5.1) e em polpa dental de camundongos (Seção 5.2).

5.1 Isolamento e caracterização de células-tronco/progenitoras derivadas de curetagem de alvéolo dental humano após extração dentária

Os resultados abaixo, contidos nesta seção, descrevem as linhagens celulares obtidas a partir da curetagem do osso alveolar humano, a caracterização inicial da linhagem obtida a partir deste tecido e as análises de caracterização *in vitro* e *in vivo* das populações enriquecidas em células Stro-1+ e CD146+ isoladas a partir destas linhagens, com finalidade de verificar se estas populações se comportam como células-tronco/progenitoras.

5.1.1 Linhagens celulares isoladas através de curetagem do osso alveolar

Foram coletados tecido de osso alveolar de 14 doadores com idade média de 30,7 anos (de 17 a 48), 9 mulheres e 6 homens. Nove linhagens celulares foram obtidas com sucesso através do tecido curetado do osso alveolar. Duas linhagens celulares apresentaram contaminação bacteriana. Houve maior dificuldade de crescer células a partir de tecido coletado de alvéolos provenientes de dentes hígidos comparado ao tecido coletado de dentes que apresentavam pulpíte ou polpa necrosada ou cárie extensa. As informações sobre os dados do paciente e dos dentes extraídos estão descritos na tabela 5.1.

Tabela 5.1 - Linhagens estabelecidas de acordo com a idade e sexo do paciente, dente relacionado ao alvéolo e sua condição e sucesso de obtenção de células

Linhagem	Idade doador (anos)	Sexo	Dente e sua condição	Sucesso
RO1	22	Feminino	38/ saudável semi-ncluso	+
RO2	23	Masculino	38/semi-incluso, cariado com pulpíte	+
RO3	23	Masculino	38/ semi-incluso, cariado com pulpíte	+
RO4	37	Masculino	26/ cariado com pulpíte	+
RO5	34	Masculino	38/ saudável semi-incluso	*
RO6	34	Masculino	48/ pulpíte	*
RO8	17	Feminino	17/ necrose pulpar	+
RO9	34	Feminino	15/raiz residual sem tratamento endodôntico	+
RO10	38	Feminino	35/ raiz residual sem tratamento endodôntico	+
RO11	48	Feminino	24 e 25/ raízes residuais sem tratamento endodôntico	+
RO12	18	Feminino	18/ hígido com rizogênese incompleta	**
RO13	28	Masculino	28/ hígido com rizogênese incompleta	**
RO14	?	Feminino	28/ hígido incluso	***
RO15	?	Feminino	43/ hígido incluso impactado	***
RO16	43	Feminino	38/ hígido incluso impactado	+

*Células descartadas devido contaminação por bactéria.

** Depois de 30 dias em meio de cultivo, sem células proliferando do tecido, foram consideradas não viáveis.

***Tecido descartado após 1 semana de cultivo, devido a problemas técnicos ocorridos no Laboratório.

? Dado não fornecido

(+) Linhagem celular obtida com sucesso

5.1.2 Caracterização inicial das células obtidas: análises das populações mistas antes do isolamento

Os tecidos obtidos por curetagem alveolar eram friáveis e sanguinolentos. Devido ao tamanho bastante reduzido dos tecidos obtidos após a curetagem, para a expansão celular, foi escolhida a técnica de explante (Freshney, 2000). A maior parte dos fragmentos foram colocados diretamente na placa, enquanto um pequeno fragmento foi fixado para análise histológica. A análise histológica demonstrou que os fragmentos obtidos pela curetagem eram formados por tecido ósseo maduro e por tecido conjuntivo apresentando grau variado de inflamação (Figura 5.1 A).

As células que cresceram a partir dos explantes apresentaram morfologia semelhante a fibroblastos, sendo alongadas e fusiformes (Figura 5.1B). A caracterização inicial das populações mistas (heterogêneas) foi realizada através da técnica de imunofluorescência em momento anterior ao isolamento das populações de células-tronco (passagem 3 após o explante). O objetivo era apenas saber se as células eram de origem mesenquimal, se não havia contaminação de células epiteliais da mucosa oral e se haviam células que expressavam os marcadores que foram escolhidos para o isolamento. Assim, utilizamos os seguintes anticorpos: Vimentina, AE1- AE3, Stro-1 e CD146.

Em todos os casos testados (RO8, RO9, RO10, RO3, RO16) as células foram amplamente positivas para vimentina e negativas para AE1-AE3. Algumas células foram também positivas para Stro-1 (Figura 5.1E) e para CD146 (Figura 5.1F). Algumas raras células apresentaram-se duplamente positivas (Stro-1⁺/ CD146⁺) (Figura 5.1G, H e I).

Figura 5.1 - Tecido e células derivadas de curetagem do alvéolo dental. A, Aspecto histológico do tecido coletado apresentando fragmentos de osso alveolar maduro e tecido conjuntivo, H.E, aumento de 10x. B, morfologia das células derivadas do tecido coletado apresentando células alongadas de aspecto fusiforme, semelhantes a fibroblastos, 100x. C, células positivas para Vimentina, aumento de 200x. D, células negativas para AE1/AE3, aumento de 200x. E, células positivas para Stro-1, aumento de 200x. F, células positivas para CD146, aumento de 200x. G, H e I, Células com dupla marcação para Stro-1 e CD146, aumento de 200x

Após a caracterização inicial, foi feita a separação celular através do uso da força magnética (técnica de MACS – do inglês Magnetic Activated Cell Sorting). A quantidade de células das populações obtidas (em números de células positivas para o marcador utilizado para a separação) estão apresentadas na tabela 5.2.

Tabela 5.2 - Número de células expressando Stro-1 e CD146 isoladas por MACS

	Linhagens Celulares	Stro-1⁺ (%)	CD146⁺ (%)
MACS	RO3	2.1	23.9
	RO8	2.0	17.3
	RO9	1.5	6.8
	RO10	2.2	3.3
	RO16	2.19	9.45
	Média	2.0(±0.7)	15.5 (±9.0)

Para a confirmação dos números de células que foram encontradas no isolamento das células pela técnica de MACS, fizemos em seguida a análise, em triplicata, por Citometria de Fluxo (FACS) nas populações mista derivadas de duas linhagens obtidas (RO3 e RO8) a partir da curetagem alveolar. Os resultados confirmaram os números que havíamos obtidos por MACS. Adicionalmente, nessas linhagens também foi feita a análise do número de células que apresentavam os dois marcadores concomitantemente (Tabela 5.3).

Tabela 5.3 - Número de células expressando Stro-1 e CD146 por Citometria de Fluxo

	Linhagens Celulares	Stro-1⁺ (%)	CD146⁺ (%)	Stro-1⁺/CD146⁺ (%)
FACS	RO3	2.4(±0.2)	18.4(±2.7)	1.1(±0.1)
	RO8	2.3(±1.5)	9.2(±2.8)	1(±0.6)
	Média	2.3 (±1.5)	13.9(±6.4)	1.1(±0.6)

Observando a porcentagem de células positivas para os marcadores Stro-1 e CD146 nas populações separadas por MACS e FACS (Tabelas 5.2 e 5.3) podemos verificar que as populações formadas por células CD146 positivas correspondem a aproximadamente a 15%

do total de células, enquanto as populações isoladas utilizando o marcador Stro-1 correspondem a aproximadamente 2% das células. Consequentemente, as populações formadas por células Stro-1 positivas é mais rara do que as populações formadas por células CD146 positivas. O resultado da dupla marcação nos mostra que quase metade das células Stro-1 positivas também é positiva para CD146.

5.1.3 Caracterização das células isoladas Stro-1⁺, CD146⁺ e controles negativos

Os ensaios a seguir foram efetuados para verificar se as populações separadas por magnetos se comportam como células-tronco e as mesmas foram comparadas com suas respectivas populações negativas (células Stro-1⁻ e células CD146⁻).

5.1.3.1 análise do perfil de expressão de marcadores de células-tronco

Com as células já isoladas, foi efetuada a análise do perfil de imunoexpressão de marcadores previamente associados a células-tronco tanto nas populações positivas quanto nas negativas para Stro-1 e CD146. Essa análise foi realizada na Passagem 3 das células isoladas das linhagens RO3, RO4, RO8, RO9, RO10. Para esse perfil de imunoexpressão foram escolhidos os seguintes marcadores: Stro1, CD146, CD90, α AML, NG-2, PDGFR β , SOX-2 e vimentina.

Cada população analisada mostrou diferentes perfis de expressão de marcadores de células-tronco. Foi observado apenas se as populações apresentavam células positivas ou não para os marcadores estudados, mesmo que as células positivas fossem raras nas populações analisadas. Os resultados obtidos encontram-se sumarizados na Tabela 5.4 e na Figura 5.2.

A população Stro-1⁺ apresentou perfil de imunoexpressão de marcadores previamente associados a células-tronco mais amplo quando comparada com as demais populações estudadas. Não houve diferença no perfil de expressão das populações (positivas e negativas) separadas por CD146 e a população menos rica em expressão de marcadores de células-tronco é aquela constituída por células Stro-1 negativas (Tabela 5.4).

Tabela 5.4 - Anticorpos primários utilizados para caracterização das linhagens celulares enriquecidas e sua expressão em cada linhagem

Anticorpo	STRO-1 ⁺	CD146 ⁺	STRO-1 ⁻	CD146 ⁻
Stro-1	+	+	-	+
CD146	+	+	+	-
CD90	+	-	-	-
α AML	+	+	-	+
CD105	-	-	-	-
NG2	+	+	+	+
PDGFR- β	+	+	+	+
SOX-2	+	-	-	-
Vimentina	+	+	+	+

+ marcação positiva

- ausência de marcação

Figura 5.2 - Expressão de marcadores de células-tronco presentes nas populações celulares isoladas Stro-1 positivas (Stro-1⁺), CD146 positivas (CD146⁺), Stro-1 negativas (Stro-1⁻) e CD146 negativas (CD146⁻) plaqueadas na 3ª Passagem. Aumento de 400x

5.1.3.2 ensaio de proliferação

Sabe-se que células-tronco apresentam capacidade de proliferação extensa *in vitro*, em virtude de seu estado indiferenciado. Nesse sentido, delineamos ensaios de proliferação celular. O gráfico 5.1 mostra os resultados obtidos.

Ao comparar a curva de crescimento das populações positivas com as negativas observamos que a replicação das populações positivas é maior e se mantém ascendente depois de 12 dias de cultivo quando comparadas com suas respectivas populações negativas. E ainda, a população Stro-1 positiva apresenta maior proliferação que todas as outras.

Gráfico 5.1 - Curva de crescimento das populações isoladas de curetagem de alvéolo dental humano na passagem 3

5.1.3.3 capacidade de formação de colônias

A capacidade de formar colônias é amplamente conhecida e discutida em células-tronco (Friedenstein et al., 1974; Caplan, 1991; Pittenger et al., 1999). Essa capacidade é resultado da divisão assimétrica característica, visto que uma célula-tronco ao se dividir pode gerar duas

células idênticas à célula mãe e assim, em divisões sucessivas, formam-se clones (Bianco et al., 2008; Sarugaser et al., 2009; Yadlapalli; Yamashita, 2013).

A capacidade de formar colônias foi observada em linhagens obtidas de quatro doadores diferentes (RO8, RO9, RO10 e RO16). O número de colônias formadas em cada população foi contada a partir de agregados de células com mais de 50 células. O resultado está ilustrado no gráfico 5.2.

Foi possível observar que a população Stro-1⁺ (derivadas de RO10 e RO16) apresenta maior número de formação de colônias, quando comparada com as demais populações. Apesar de a população CD146⁺ (derivada das 4 linhagens estudadas) apresentar de forma significativa um maior número de colônias quando comparada ao seu controle negativo (população CD146⁻), a população CD146⁺ produz menor número de colônias quando comparada a população positiva e negativa para o Stro-1 em populações derivadas de 3 doadores do total de 4 doadores estudadas.

O aspecto morfológico das colônias foi bem semelhante nas populações Stro-1⁺, CD146⁺ e CD146⁻ as quais apresentaram células uniformes dispostas de forma bem concentrada de aspecto estoriforme, enquanto as populações Stro-1⁻ apresentaram células mais dispersas (Figuras 5.3.B, E, H, K). Um achado interessante foi observado periferia das colônias (Figuras 5.3.C, F, I, L setas), onde encontramos células dispersas e algumas com aspecto diferenciado apresentando citoplasma e núcleo aumentado.

Gráfico 5.2 - Número de unidades formadoras de colônias formadas a partir das populações isoladas dos doadores RO8, RO9, RO10 e RO16 plaqueadas na passagem 1

Figura 5.3 - Unidades Formadoras de Colônias de populações Stro-1⁺, CD146⁺ e seus respectivos controles negativos, derivadas de tecido alveolar humano curetado. A, B e C, colônias derivadas da população Stro-1⁺. D, E e F, colônias derivadas da população Stro-1⁻. G, H e I, colônias derivadas da população CD146⁺. J, K e L, colônias derivadas da população CD146⁻. A, D, G e J, colônias formadas a partir de populações derivadas do doador RO9. B, E, H e K, fotomicroscopia do centro das colônias formadas em cada população, aumento de 100x. C, F, I e L, fotomicroscopia da borda das colônias formadas a partir de cada população, a seta vermelha indica onde se encontra a borda, aumento de 100x

5.1.3.4 ensaio de migração

A mobilidade celular (cell homing) é também uma propriedade bastante enfatizada na literatura a respeito de células-tronco (Whetton; Graham, 1999; Feng et al., 2011) e portanto, essa propriedade também foi avaliada em nossas linhagens celulares.

Para observar a capacidade migratória de cada população estudada foi efetuado o ensaio de “scratch” (traduzido do inglês riscar). Para tanto foi realizada uma fenda na placa que continha células em confluência e a área da fenda foi observada e fotografada diariamente.

No período de 24h foi possível observar que as células Stro-1⁺ e CD146⁺ apresentavam respectivamente 56,1% e 57,9% da área da fenda fechada, enquanto as células negativas para Stro-1 e CD146 estavam apenas com 21,5% e 40,8% da área fechada respectivamente. A população Stro-1⁺ apresentou 100% da fenda fechada no 8º dia de cultivo, enquanto as populações CD146⁺ e Stro-1⁻ fecharam a fenda no 10º dia e a população CD146⁻ foi a última a fechar a fenda no 12º dia de cultivo (Gráfico 5.3 e Figura 5.4).

Gráfico 5.3 - Porcentagem da área de fenda coberta por células migratórias de acordo com os dias de cultivo

Figura 5.4 - Ensaio de migração celular. A, B, C e D fotomicrografia da fenda recém efetuada, considerado 1º dia, em destaque a área da fenda sem células contornada pela linha preta. E, F, G e H, área da fenda contendo células migratórias após 8 dias de cultivo. Em E observa-se células Stro-1⁺ com a fenda totalmente fechada, enquanto em F, G e H vê-se em destaque áreas sem células delineadas com linha preta. I e J, população Stro-1⁻ e CD146⁺, respectivamente, apresentando a fenda fechada no 10º dia de cultivo. K, população CD146⁻ ainda com área remanescente de fenda no 10º dia de cultivo. L, população CD146⁻ apresentando fenda totalmente fechada no 12º dia de cultivo

5.1.3.5 diferenciação *in vitro*

Uma das características mais amplamente conhecidas e divulgadas a respeito de células-tronco, é sua capacidade de multidiferenciação. Nesse sentido, células de uma determinada origem tecidual são capazes de formar outros tipos celulares.

A diferenciação osteogênica foi efetuada durante 21 dias e como resultado foi possível observar que as células Stro-1⁺ e CD146⁺ apresentaram maior quantidade de material mineralizado, positivo para alizarina vermelha (Figura 5.5), quando comparadas às populações negativas. Porém ainda é possível ver pequenas mineralizações nas populações negativas induzidas com meio osteogênico (Figuras 5.5.B e D).

Figura 5.5 - Indução osteogênica nas populações enriquecidas em Stro-1⁺ e CD146⁺ derivadas de curetagem de osso alveolar humano. A e C, respectivamente, populações Stro-1⁺ e CD146⁺ induzidas apresentando extensas áreas de mineralização com positividade para alizarina vermelha. B, população Stro-1⁻ apresentando poucas áreas de mineralização positivas para alizarina vermelha. D, população CD146⁻ apresentando raras áreas de mineralização positivas para alizarina vermelha. E-H, Controle negativo. Setas em azul indicando áreas de mineralização.

A diferenciação adipogênica foi efetuada durante 21 dias de indução e novamente as populações Stro-1⁺ e CD146⁺ apresentaram maior capacidade de diferenciação apresentando vesículas adipogênicas, no interior das células, positivas para a coloração com óleo O vermelho (Figura 5.6 A e C). As populações negativas, assim como o controles da reação não apresentaram a diferenciação adipogênica.

Figura 5.6 - Indução adipogênica nas populações enriquecidas em Stro-1⁺ e CD146⁺ derivadas de curetagem de osso alveolar humano. A e C, populações Stro-1⁺ e CD146⁺, respectivamente, apresentando células com vesículas adipogênicas positivas para óleo O vermelho. B, população Stro-1⁻ apresentando células negativas para o óleo O vermelho. D, população CD146⁻ apresentando células negativas para o óleo O vermelho. E-H, controle apresentando células negativas ao óleo O vermelho. A-H, fotos em aumento de 400x

No ensaio de diferenciação condrogênica utilizando populações plaqueadas, já no 4º dia foi possível observar formação de nódulos nas populações Stro-1⁺, CD146⁺ e CD146⁻ plaqueadas (Figuras 5.7 A, C e D). O mesmo não ocorria na população Stro-1⁻ (Figura 5.7 B). Ao 14º dia de cultivo as populações plaqueadas Stro-1⁺ e CD146⁺ apresentaram nódulos condrogênicos bem definidos (Figuras 5.7 E e G), enquanto as populações negativas apresentaram nódulos irregulares (Figuras 5.7 F e H). Porém todas as populações (inclusive as negativas) foram levemente coradas pelo azul de alciano. Os controles negativos cultivados em meio convencional foram negativos para o azul de alciano (Figura 5.7 M até P). Quando as populações cultivadas em meio convencional foram coradas somente com hematoxilina de Harris, as células apresentaram morfologia fusiforme e alongada (Figuras 5.7 U até V).

Para confirmarmos a diferenciação condrogênica nos nódulos, foi efetuado o experimento de diferenciação em tubos falcon para que os agregados celulares pudessem ser seccionados para melhor visualização dos resultados. Após 14º dia de indução as amostras foram processadas para serem seccionadas e coradas com azul de alciano e hematoxilina de Harris. Todas as populações foram positivas para o azul de alciano, com exceção da população CD146 negativa (Figuras 5.7 I até L). E ao visualizarmos as estruturas formadas em cada população com hematoxilina de Harris observamos que as células Stro-1⁺ apresentaram morfologia semelhante a condrócitos (Figura 5.7 M). A população CD146⁺ apresentou células com grande quantidade de material intercelular amorfo, interpretado como

glicosaminoglicanas, devido a positividade para o azul de alciano. Ambas populações negativas apresentaram agregados de células de arranjo fusiforme.

Figura 5.7 - Indução condrogênica nas populações enriquecidas em Stro-1⁺ e CD146⁺ derivadas de curetagem de osso alveolar humano. A-D, aspecto das células após 4 dias de indução condrogênica em placas de cultivo, aumento de 100x. E-H, aspecto das células após 14 dias de indução condrogênica coradas por azul de alciano, aumento de 100x. I-L, secções das esferas formadas por células diferenciadas após 14° dia de indução e coradas com azul de alciano, aumento de 1000x. M-P, secções das esferas formadas por células diferenciadas após 14° dia de indução e coradas com hematoxilina, aumento de 1000x. Q-T, controle negativo, células cultivadas em meio convencional e coradas com azul de alciano apresentando marcação negativa, aumento de 100x. U-X, controle negativo, células cultivadas em meio convencional e coradas com hematoxilina de Harris, aumento de 100x

5.1.3.6. diferenciação de células re-expandidas a partir de colônias

Para saber se era possível re-cultivar as células a partir das colônias e diferenciá-las novamente, foram coletadas cinco colônias de cada população da linhagem RO16. Foi possível expandir 3 linhagens clonais da população Stro-1⁺, 3 da população Stro-1 negativa, 1 da população CD146⁺ e 2 da população CD146 negativa. As colônias da população CD146⁺ foram as que mais demoraram para expandir células. As colônias da população Stro-1⁺ e Stro-1⁻ foram as que resultaram em células expandidas mais rapidamente.

As colônias escolhidas para coleta apresentavam-se constituídas de células fusiformes e de arranjos celulares de forma bem semelhante como pode-se ver na Figura 5.8.

Figura 5.8 - Fotomicroscopia das colônias antes das células serem removidas e re-submetidas a diferenciação. Todas as células obtidas de colônias derivadas das diferentes populações estudadas apresentaram morfologia e arranjo celular semelhante. A, colônia de células Stro-1⁺. B, colônia de células Stro-1⁻. C, colônia de célula CD146⁺. D, colônia de células CD146⁻. Aumento de 100x

Após a indução da diferenciação nos mesmos parâmetros descritos acima, foi possível observar que os clones derivados da população Stro-1 positiva apresentaram robusta capacidade de diferenciação adipogênica, exibindo numerosas células com grandes vesículas adiposas positivas para óleo O vermelho (Figura 5.9A). A população clonal CD146 negativa e Stro-1 negativa apresentou menor grau de diferenciação adipogênica observado através da presença de vesículas adiposas menores também positivas para o óleo O vermelho (Figura 5.9B, D). Não foi possível observar a diferenciação adipogênica na população CD146⁺.

Foi possível observar a diferenciação osteogênica em todos os clones isolados, tanto das populações positivas como para as negativas através da observação de cristais de mineralização positivos para a alizarina vermelha (Figura 5.9 E-G). Foi também possível observar que os clones das populações Stro-1⁺ e CD146⁺ formaram cristais de mineralização maiores (destacados pelas setas) quando comparados aos vistos nas populações negativas que apresentavam cristais com aspecto mais granular.

Figura 5.9 - Diferenciação adipogênica e osteogênica em clones isolados das populações Stro-1⁺, Stro-1⁻, CD146⁺ e CD146⁻ na 3^o passagem. A- D, células induzidas para diferenciação adipogênica, coradas com óleo O vermelho. A, células derivadas de clones Stro-1⁺ apresentando vesículas adipogênicas positivas para óleo O vermelho. B, células clones da população Stro-1⁻ apresentando células com pequenas vesículas positivas para óleo O vermelho. C, células clones da população CD146⁺ negativas para óleo O vermelho. D, células clones da população CD146⁻ com vesículas adipogênicas positivas para óleo O vermelho, destacadas pelas setas em preto. A e D, as setas em preto destacam as vesículas de lipídeos. E-H, células induzidas para diferenciação osteogênica coradas com alizarina vermelha apresentando cristais de mineralização positivos para a coloração. E, células clones derivadas da população Stro-1⁺. F, células clones derivadas da população Stro-1⁻. G, células clones derivadas da população CD146⁺. H, células clones derivadas da população CD146⁻. E e F, as setas em azul destacam os grandes cristais de mineralização presentes nas populações positivas. Aumento de 400x

5.1.3.7 ensaios *in vivo*

Por fim, sabe-se que células-tronco são capazes de sobreviver após transplante reconhecendo o ambiente em que estão e respondendo de forma a se diferenciar naquilo necessário para o tecido (Gronthos et al., 2000; Miura et al., 2003).

Assim, as populações Stro-1⁺, CD146⁺, Stro-1⁻ e CD146⁻, foram transplantadas (por 20 ou 30 dias) no dorso de camundongos imunossuprimidos tipo *Nude* utilizando como material carreador hidroxiapatita/fosfato tricálcico (Quadros 5.1 e 5.2). Como controle também foi efetuado o transplante contendo apenas o material carreador.

Aos 20 dias pós-cirúrgico (Figura 5.10 A-E) foi possível observar histologicamente:

Grupo	20 dias
Grupo Controle (Somente hidroxiapatita sem células)	O material carreador apresentava-se envolto por tecido de granulação rico em fibroblastos jovens, vasos sanguíneos e presença de células gigantes multinucleadas (reação de corpo estranho)
Células Stro-1 ⁺ com hidroxiapatita/fosfato tricálcico	Além do descrito no grupo controle, também foi possível encontrar pequenas áreas de formação de matriz óssea.
Células Stro-1 ⁻ com hidroxiapatita/fosfato tricálcico	Idem ao controle negativo
Células CD146 ⁺ com hidroxiapatita/fosfato tricálcico	Idem ao controle negativo
Células CD146 ⁻ com hidroxiapatita/fosfato tricálcico	Idem ao controle negativo

Quadro 5.1 - Descrição histológica dos transplantes em dorso de camundongos com células Stro-1⁺, CD146⁺ e seus respectivos controles com 20 dias pós-cirúrgico

Aos 30 dias pós-cirúrgico (Figura 5.10 F-J) foi possível observar histologicamente:

Grupo	30 dias
Grupo Controle (Somente hidroxiapatita sem células)	O material carreador apresentava-se envolto por matriz óssea e tecido conjuntivo com vasos sanguíneos neoformados. Algumas células gigantes multinucleadas ainda podiam ser observadas
Células Stro-1 ⁺ com hidroxiapatita/fosfato tricálcico	Idem ao controle negativo, mas com mais exuberância de matriz óssea
Células Stro-1 ⁻ com hidroxiapatita/fosfato tricálcico	Pouca ou ausência de matriz óssea
Células CD146 ⁺ com hidroxiapatita/fosfato tricálcico	Idem ao controle negativo com menos exuberância de matriz óssea
Células CD146 ⁻ com hidroxiapatita/fosfato tricálcico	Pouca ou ausência de matriz óssea

Quadro 5.2 - Descrição histológica dos transplantes em dorso de camundongos com células Stro-1⁺, CD146⁺ e seus respectivos controles com 30 dias pós-cirúrgico

A seguir seguem as imagens histológicas dos transplantes efetuados e coletados em 20 e 30 dias após o procedimento cirúrgico (Figura 5.10 A até J).

Figura 5.10 - Imagens histológicas dos transplantes efetuados com as populações Stro-1⁺ e CD146⁺ após 20 e 30 dias em dorso de camundongos imunossuprimidos. A-E, aspectos histológicos dos transplantes após 20 dias de cirurgia. F-J aspectos histológicos dos transplantes após 30 dias de cirurgia. A, grupo controle, após 20 dias, apresenta material carreador envolto por tecido de granulação rico em fibroblastos jovens, vasos sanguíneos e presença de células multinucleadas (reação de corpo

estranho). B Células Stro-1⁺ com hidroxiapatita/fosfato tricálcico, após 20 dias, apresenta quadro histológico semelhante com o grupo controle e pequenas áreas de formação de matriz óssea. C, células Stro-1 negativas com hidroxiapatita, após 20 dias, apresenta quadro semelhante ao grupo controle, apresenta reação de corpo estranho. D, células CD146⁺ com hidroxiapatita/fosfato tricálcico, após 20 dias, apresenta quadro igual ao controle negativo. E, células CD146 negativas com hidroxiapatita/fosfato tricálcico, após 20 dias, apresenta quadro semelhante ao controle negativo. F, grupo controle, após 30 dias, apresenta material carreador envolto por matriz óssea e tecido conjuntivo com vasos sanguíneos neoformados e presença de algumas células gigantes multinucleadas. G, células Stro-1⁺ com hidroxiapatita/fosfato tricálcico, apresenta quadro semelhante ao grupo controle, porém com mais exuberância de matriz óssea. H, células-Stro-1 negativas com fosfato tricálcico, apresenta pouca ou ausência de matriz óssea. I, células CD146⁺ com hidroxiapatita/fosfato tricálcico, apresenta um quadro semelhante ao grupo controle, porém com menos exuberância de matriz óssea. J, células CD146 negativas com hidroxiapatita/fosfato tricálcico, após 30 dias, apresenta pouca ou ausência de matriz óssea. Coloração de H.E., aumento de 200x

5.2 Polpa dental de camundongos e marcadores de células-tronco mesenquimais

Os resultados apresentados a seguir são referentes a segunda parte deste trabalho, os quais foram efetuados em tecido fresco, não cultivado, de polpas dentais de camundongos.

5.2.1 Co-expressão de marcadores de células-tronco em polpas de camundongo - Análise quantitativa em diferentes fases do desenvolvimento dental de incisivos de molares

Os resultados obtidos referem-se a análise de amostras contendo um “pool” de células de polpas dentais como descrito no material de métodos, através da técnica de citometria de fluxo.

Inicialmente analisamos o número de células da polpa de incisivos positivas para cada marcador nas diferentes idades experimentais. Foi possível observar que ocorre um decréscimo do número de células positivas para CD73 e CD105 conforme a idade aumenta, porém, o número de células CD90⁺ não apresenta diferença entre as idades estudadas.

A porcentagem de células positivas para cada marcador nas diferentes idades dos camundongos está apresentada na tabela 5.5.

Tabela 5.5 - Porcentagem de células positivas para os marcadores de superfície CD90, CD105 e CD73 em polpa de incisivos de camundongos na idade PN5, PN10 e adultos

Marcadores	PN5 (%)	PN10 (%)	Adulto (%)
CD90	11.0±1.5	8.4±0.3	9.2±0.2
CD105	42.2±1.4	34.3±2.7	21.1±0.5
CD73	7.9±0.4	4.3±0.5	1.9±0.1

Entre os três marcadores estudados, o CD105 apresentou-se presente no maior número de células, quando comparado com os outros dois marcadores, enquanto o marcador CD73 apresentou-se em menor número em todas as idades analisadas.

Baseado nesse resultado, onde encontramos uma população celular CD90⁺ que apresenta-se em número constante na polpa de incisivos de camundongos, resolvemos analisar a co-expressão desta população com os outros marcadores, CD105 e CD73 em camundongos nas idades P10 e adulta.

Foi possível observar uma variedade de populações apresentando diferentes padrões de expressão para os três marcadores estudados. Também observamos que ocorre um decréscimo no número de células positivas para os marcadores CD73 e CD105 na idade adulta, exceto as células positivas apenas para o marcador CD90 (células **CD90+**/CD105-/CD73-) as quais aumentam de 3.2% para 6.1% na fase adulta.

As demais populações encontradas decrescem na idade adulta: as células **CD73+**/CD90-/CD105- decrescem de 3.6% para 1.6%; enquanto as células **CD105+**/CD90-/CD73- decrescem de 29.5% para 18.1%; as células **CD90+**/**CD73+**/CD105- de 0.4% para 0.2%; as células **CD90+**/CD73-/CD105+ de 4.5% para 2.9% e as triplamente positivas de diminuem de 0.3% para 0.1%.

Os resultados obtidos estão apresentados no gráfico 5.4 e figura 5.11.

Gráfico 5.4 - Co-expressão de marcadores de células-tronco mesenquimais em polpa dental de incisivos de camundongos na idade P10 e adulta. Valores em porcentagem

Na figura 5.11 consegue-se visualizar de forma mais fácil o decréscimo de células positivas para os marcadores de células-tronco mesenquimais conforme o avanço da idade. A população negativa para esses 3 marcadores (em azul) representa 53% do total de células da polpa na idade PN10 e na idade adulta há um aumento para 67.9% do total de células.

Figura 5.11 - Distribuição das populações positivas para os marcadores de células-tronco mesenquimais CD90, CD105 e CD73 em polpa dental de incisivos de camundongos em diferentes idades. A, Distribuição das populações celulares presentes na idade PN10. B, Distribuição das populações celulares presentes na idade adulta. Valores em porcentagem

Ao analisarmos os mesmos parâmetros anteriores, mas agora em dentes molares, observamos um aumento no número de células positivas para os marcadores CD73 e CD105 na idade PN10 e as células CD90+ não apresentaram diferença entre as idades estudadas. Os valores encontrados estão apresentados na tabela 5.6.

Tabela 5.6 - Porcentagem de células positivas para os marcadores de superfície CD90, CD105 e CD73 em polpa de molares de camundongos na idade PN5, PN10

Marcador	PN5 (%)	PN10 (%)
CD90	10.0±0.9	11.1±1.5
CD105	17.9±3.7	34.1±5.5
CD73	2.9±0.3	6.0±0.3

Quando comparamos os resultados de incisivos e molares (Gráfico 5.5 e tabela 5.7) observamos que o número de células CD90+ é bem similar em ambos dentes e idades, variando entre 8.4% (± 0.3) e 11.1% (± 1.5). Essa manutenção do número de células também ocorre em relação ao CD105 em ambos dentes na idade PN10 (34.3% (± 2.7)) na polpa de incisivo e 34.1% (± 5.5) na polpa de molar). No entanto, na idade PN5 ocorre uma enorme diferença no número de células positivas para CD105. Nesse caso, os incisivos expressam CD105 em torno de 42.2% (± 1.4) do total de suas células, enquanto os molares expressam em 17.9% (± 3.7) das células, um valor próximo ao número de células CD105+ nos incisivos de camundongos adultos (21.1% (± 0.5)).

Apesar de a população CD73+ aumentar na polpa de molares na idade PN10, este valor não foi muito superior aos números de células CD73+ presentes em na polpa de incisivos. Os molares apresentaram em torno de 6.0% (± 0.3), enquanto nos incisivos foi observada a positividade para o CD73 em 4.3% (± 0.5) das células. Na idade PN5 os molares apresentaram um baixo número de células positivas para o CD73, apenas 2.9% (± 0.3) das células da polpa. Interessantemente, nessa idade, o número de células positivas para CD73 se aproxima do número encontrado em incisivos adultos (1,9% (± 0.1)) e é bem menor do que o encontrado nessa idade (PN5) nos incisivos 7.9% (± 0.4).

Gráfico 5.5 - Distribuição de populações CD90+, CD105+ e CD73+ em polpa dental de incisivos e molares de camundongos em diferentes idades. Valores em porcentagem

Tabela 5.7 - Expressão de células positivas para CD90, CD105 e CD73 na polpa dental de incisivos e molares de camundongos em diferentes idades

Marcadores	INCISIVOS			MOLARES	
	PN5(%)	PN10 (%)	Adulto(%)	PN5(%)	PN10(%)
CD90	11.0±1.5	8.4±0.3	9.2±0.2	10.0±0.9	11.1±1.5
CD105	42.2±1.4	34.3±2.7	21.1±0.5	17.9±3.7	34.1±5.5
CD73	7.9±0.4	4.3±0.5	1.9±0.1	2.9±0.3	6.0±0.3

5.2.2 Células de ciclagem lenta – Localização e co-expressão com marcadores de células-tronco mesenquimais em incisivos

Inicialmente foi realizada a incorporação de BrdU em camundongos CD1 com 6 semanas de vida que foram submetidos a injeções peridurais contendo 200mg/kg de BrdU em diferentes regimes pré-estabelecidos (descritos no material e métodos) de forma que foi possível estabelecer grupos de animais divididos de acordo com os diferentes tempos de

ciclagem (lenta, intermediária e rápida – Figura 5.12 A, B e C). Esses grupos foram posteriormente submetidos à análise imuno-histoquímica para a co-localização de células que expressavam BrdU, Patched e CD90.

A análise imuno-histoquímica revelou que no grupo de células de ciclagem lenta, as células BrdU+ presentes na polpa dental estavam localizadas mais próximas à porção mais apical do dente na região entre as alças cervicais (Figura 5.12 A), enquanto as células de ciclagem rápida BrdU+ foram observadas em áreas mais centrais da polpa em torno de vasos sanguíneos, indo em direção à região incisal e concentradas logo abaixo da alça cervical labial (Figura 5.12 C). As células de ciclagem intermediária por sua vez, foram observadas por entre as células de ciclagem lenta e rápida e também espalhadas pela polpa dental, apresentando uma marcação mais fraca quando comparada com os outros grupos celulares (Figura 5.12 C). Desta forma, pudemos delinear um desenho esquemático da disposição das células de diferentes tempos de ciclagem presentes na polpa de incisivos de camundongos apresentado na figura 5.12F.

A expressão de Patched, através da técnica de imunofluorescência em secções parafinadas de incisivos, foi encontrada em células localizadas na porção apical do dente, entre as alças cervicais (Figura 5.12 D), ou seja, situadas na mesma região onde foram encontradas as células de ciclagem lenta (Figura 5.12 A). É importante lembrar que esse grupo é o que contém as células-tronco.

A expressão de CD90 (Figura 5.12 E) foi observada através de imunofluorescência em montagem do todo (do inglês “whole mount” – técnica onde o dente inteiro é submetido à reação de imunofluorescência sem a confecção de cortes), sendo possível observar uma imagem fotográfica tirada a partir de imagem 3D apresentando área com forte expressão de CD90 na região logo abaixo da alça cervical labial, de forma bem semelhante à área onde foram encontradas grande parte das células de ciclagem rápida (Figura 5.12 B).

Figura 5.12 - Localização de células de diferentes tempos de ciclagem e expressão de Patched e CD90 em incisivos de camundongos. A, células de ciclagem lenta positivas para BrdU em marrom localizadas na porção apical próximas às alças cervicais. B, células de ciclagem rápida positivas para o BrdU localizadas mais ao centro da polpa e abaixo da alça cervical labial. C, células fracamente positivas para o BrdU em região entre as células de ciclagem lenta e de ciclagem rápida. D, células positivas para Patched em vermelho localizadas na porção mais apical do dente e entre as alças cervicais em corte de incisivo. E, células positivas para o CD90 em verde, em maior número concentradas logo abaixo da alça cervical labial, por imunofluorescência em “whole mount”. F, desenho esquemático das populações encontradas pela incorporação de BrdU

Em seguida, análises por citometria de fluxo foram realizadas nas amostras com o intuito de quantificação das células de diferentes tempos de ciclagem. Nessas análises pode-se observar que a polpa dental é constituída de aproximadamente 4,9% de células de ciclagem lenta BrdU+; 2,3% de células de ciclagem rápida BrdU+; e 89,1% de células de ciclagem intermediária BrdU+ (Figura 5.13).

Ao analisarmos 100% das células BrdU+ em cada grupo, vimos que as células CD90+ estavam presentes em 3% das células de ciclagem lenta, 22% das células de ciclagem rápida e 11% das células de ciclagem intermediária. Isso nos mostra que a população CD90+ é heterogênea e apresenta populações com diferentes tempos de ciclagem celular (Figura 5.14).

No entanto, ao analisarmos as células CD90+ em cada grupo observamos que aproximadamente 2% das células CD90+ eram células de ciclagem lenta, 96% das células CD90+ eram células de ciclagem intermediária e 16% das células CD90+ eram células de ciclagem rápida. (Figura 5.14).

Figura 5.13 - Análise por citometria de fluxo de células CD90+ e BrdU+ em polpa de incisivos de camundongos nos grupos estudados. A, Grupo 1, células de ciclagem lenta (CCL) positivas para BrdU em azul e co-expressas com CD90 em vermelho; B, Grupo 2, células de ciclagem intermediária (CCI) positivas para BrdU em azul e co-expressas com CD90 em vermelho; C, Grupo 3, células de ciclagem rápida (CCR) positivas para BrdU em azul e co-expressas com CD90 em vermelho. D, gráficos representativos da análise por citometria de fluxo nos grupos estudados e seus respectivos controles IgG. Valores expressos em porcentagem

Figura 5.14 - Porcentagem de células CD90+ na população BrdU+ e células BrdU+ na população de células CD90+

Restrições técnicas inviabilizam a análise por citometria de fluxo da co-expressão de BrdU com outros marcadores pois é necessário a permeabilização da membrana celular para verificar a expressão de BrdU, uma vez que este é um marcador nuclear. Após a permeabilização celular ocorre a internalização ou até mesmo a destruição dos marcadores de membrana, interferindo na detecção por citometria de fluxo. Assim, para as análises subsequentes a proteína Patched (PTC) foi utilizada como o marcador das células de ciclagem lenta (Figura 5.15A e B).

Dessa forma, primeiramente observamos o número de células PTC+, CD90+ e PTC+/CD90+ na polpa dental. Observamos que 7%(±2,2) das células da polpa eram somente PTC+, 11%(±1,3) somente CD90+ e 3%(±0,3) PTC+/CD90+ (Figura 5.15A). Interessantemente, na análise prévia verificamos que a população de células de ciclagem lenta BrdU + que co-expressa CD90 também corresponde a 3% das células da polpa.

Considerando que a literatura mostra que as células-tronco mesenquimais possivelmente apresentam os três marcadores celulares CD90, CD73 e CD105, e que apresentam ciclagem lenta *in vivo*, analisamos a co-expressão de CD73 e CD105 na população CD90+/PTC+. Assim, obtivemos os valores apresentados na figura 5.4 B referente às populações celulares encontradas em 100% das células CD90+/PTC+ da polpa de incisivos (correspondentes a 3% das células totais da polpa dental):

- 1% ($\pm 0,9\%$) de células eram **CD90⁺/PTC⁺/CD105⁺/CD73⁻** (correspondendo à aproximadamente 0,03% de células da polpa),
- 27% ($\pm 3,8$) de células eram **CD90⁺/PTC⁺/CD105⁻/CD73⁺** (correspondendo à aproximadamente 0,81% de células da polpa),
- 16% ($\pm 2,6\%$) de células eram **CD90⁺/CD105⁺/CD73⁺/Patched⁺** (correspondendo à aproximadamente 0,48% de células da polpa), e
- 56% ($\pm 3,4$) eram células **CD90⁺/PTC⁺/CD105⁻/CD73⁻** (correspondendo à aproximadamente 1,68% de células da polpa)

As células de ciclagem rápida (consideradas assim pela expressão de Ring2/1B/RNF – segundo resultados prévios de nosso grupo (Lapthanasupkul et al., 2012) foram estudadas apenas em relação ao CD90, visto que não faz sentido a análise de marcadores de células-tronco em uma população que sabidamente não é constituída por células-tronco *in vivo*. A co-expressão de CD90⁺/Ring2/1B/RNF⁺ foi encontrada em 6% ($\pm 0,7$) das células da polpa.

A análise de todos esses resultados em conjunto, tendo como parâmetros associação entre a expressão dos marcadores e a velocidade de ciclagem celular nos capacitou criar um modelo hipotético de hierarquia entre as populações por nós estudadas. E consequentemente, esse modelo nos capacitou a apresentar um esquema de caracterização celular para o nicho de células-tronco mesenquimais existente na polpa dental de incisivos de camundongos (Figura 5.15B).

Figura 5.15 - Resultados da análise por citometria de fluxo de células Patched+ e modelo de nicho de células-tronco em incisivos de camundongos. A, porcentagem das populações de diferentes ciclagens celulares em relação às células de polpa dental de acordo com a expressão de BrdU e CD90, B, porcentagem das diversas populações celulares encontradas na polpa dental para os marcadores moleculares CD90, CD105, CD73 e Patched. C, modelo esquemático das populações encontradas no nicho de células-tronco de incisivos de camundongos

6 DISCUSSÃO

6.1 É possível isolar células-tronco/progenitoras através da curetagem do alvéolo após extração dental

Foi possível obter diversas populações de células coletadas através de um procedimento simples e rotineiro que é a curetagem do alvéolo dental após remoção cirúrgica de um dente. As populações obtidas foram submetidas a análises de cinética celular (capacidade de proliferação, migração e formação de colônias), caracterização do perfil de imunoexpressão e análises funcionais *in vitro* (indução de diferenciação condrogênica, osteogênica e adipogênica) e *in vivo* (transplantes em animais imunocomprometidos).

Os resultados nos mostram que populações com características de células-tronco foram isoladas utilizando os marcadores Stro-1 e CD146, visto que as populações positivas para esses marcadores mostraram capacidade de proliferação extensa, clonalidade, multidiferenciação e sobrevivem e se diferenciam após transplante.

Quando comparamos os resultados obtidos através do isolamento celular com Stro-1 aos obtidos com o CD146, podemos afirmar que as células Stro-1 positivas apresentam ganhos de função importantes em relação às propriedades analisadas em nosso estudo. A população Stro-1 é a que mais prolifera, é a mais clonogênica, fecha a fenda mais rápido nos ensaios de migração, co-expressa um maior número de marcadores previamente associados a células-tronco, tem o melhor potencial de multidiferenciação em tecidos osteogênicos, condrogênicos e adipogênicos, gera colônias com maior potencial de diferenciação e forma mais rapidamente e efetivamente matriz óssea nos ensaios de transplante *in vivo*.

Inicialmente já verificamos que a população Stro-1 positiva é mais pura que a população CD146 positiva. Essa afirmação baseia-se em números absolutos e nos ensaios de dupla marcação por citometria de fluxo. Se considerarmos apenas os números, vemos que em média 15,5% das células totais são positivas para CD146, enquanto apenas 2% das células são positivas para Stro-1. Quando consideramos a dupla marcação, vemos que aproximadamente 50% da população Stro-1 positiva é também positiva para CD146. Comparando esses resultados com a literatura vemos que em geral na medula óssea de 0,01% para 0,001% das

células da fração mesenquimal são consideradas células-tronco (Campagnoli et al., 2001; Xu et al., 2009; Lin et al., 2011). E em tecidos dentais esse número é de 6% na polpa de dentes permanentes (Shi; Gronthos, 2003) e 2,6% no ligamento periodontal (Xu et al., 2009). Assim sendo, podemos afirmar que em termos numéricos a população isolada por Stro-1 está mais próxima do que afirma a literatura para populações dentais.

Ainda nesse sentido, clones derivados da população CD146⁺ submetidos a ensaios de diferenciação apresentaram menor capacidade de diferenciação e expansão celular quando comparados aos demais clones isolados das outras populações (Stro-1⁺, Stro-1⁻, CD146⁻), o que também mostra que a população separada por CD146 é mais heterogênea e menos potente.

Células duplamente positivas para Stro-1 e CD146 derivadas da papila apical demonstraram possuir alta capacidade clonogênica e alto potencial de diferenciação odontogênica. Neste mesmo estudo, em papila apical, os resultados obtidos com a população Stro-1⁻/CD146⁺ foram considerados totalmente insatisfatórios, evidenciando a importância da expressão de Stro-1 na identificação de células-tronco dentais humanas (Bakopoulou et al., 2013). Provavelmente em estudos subsequentes nossa estratégia será comparar as propriedades das células duplamente marcadas com as isoladas somente com Stro-1, e assim verificar se conseguiremos uma população ainda mais potente.

A fração de células Stro-1⁺ derivadas de medula óssea é conhecida por muitos anos como precursora de células osteogênicas (Gronthos et al., 1994) e estudos recentes já isolaram células-tronco Stro-1⁺ de tecidos dentais como a polpa (Gronthos et al., 2001; Gronthos et al., 2003; Seo et al., 2009), o ligamento periodontal (Seo et al., 2004), papila apical (Sonoyama et al., 2008) e o alvéolo dental propriamente dito (El-Sayed et al., 2012). Deve-se salientar que as células isoladas por El-Sayed et al. (2012) foram derivadas de fragmentos de osso alveolar remanescentes grudados em raízes de terceiros molares extraídos enquanto nosso estudo conseguiu isolar células de tecido coletado apenas através da curetagem do alvéolo dental após a remoção do dente. Porém, não podemos excluir a possibilidade de que ambas populações sejam similares em virtude da origem tecidual.

Ainda nesse sentido, o material curetado mostra-se histologicamente composto de pequenas trabéculas ósseas, tecido conjuntivo e sangue. Sendo assim, não sabemos ao certo qual desses tecidos originou as células que migraram dos explantes e assim existe a possibilidade das linhagens serem derivadas de ligamento periodontal ou mesmo do coágulo. Gostaríamos de salientar que não foi foco deste estudo verificar a exata origem destas células, e apenas verificar se a partir de um pequeno tecido é possível obter células com propriedades

de células-tronco/progenitoras. Nossos resultados sugerem que sejam células derivadas do periósteo, visto a sua natural capacidade de formação de tecido ósseo *in vivo*. Porém mais experimentos são necessários para inferir tal afirmativa e estudos sobre qual tecido originam-se as células isoladas serão foco de futuro estudo.

Células CD146⁺ já foram isoladas de diferentes tecidos como medula óssea (Crisan et al., 2008), o cordão umbilical (Baksh et al., 2007), tecido adiposo (Zannettino et al., 2008; James et al., 2012), endométrio (Schwab; Gargett, 2007) e também de tecidos dentais como a polpa (Shi; Gronthos, 2003), papila apical (Bakopoulou et al., 2013) e o ligamento periodontal (Xu et al., 2009, Hidaka et al., 2012). Estas populações são caracterizadas pela proliferação, capacidade clonogênica e potencial de diferenciação multilinhagem e é dessa forma que têm sido consideradas células-tronco mesenquimais (Schwab; Gargett, 2007; Baksh et al., 2007; Zannettino et al., 2008; Crisan et al., 2012; James et al., 2012). Em nossos achados a população CD146⁺ demonstrou apresentar essas propriedades de células-tronco, sendo capaz de proliferar mais e formar maior número de colônias quando comparada à população CD146 negativa, além de se diferenciar em osso, cartilagem e gordura.

Estudos prévios (Matsubara et al., 2005; Han et al., 2009; El-Sayed et al., 2012) já haviam isolado células de osso alveolar de maxila e mandíbula, porém a coleta do material ocorreu durante procedimentos cirúrgico de implantes (Matsubara et al., 2005; Han et al., 2009) ou de remoção de cistos (Matsubara et al., 2005) ou de terceiros molares (Matsubara et al., 2005; El-Sayed et al., 2012). Outra diferença foi que estes estudos não isolaram populações específicas para marcadores de células-tronco (com exceção de El-Sayed et al., 2012), ou seja, utilizaram um “pool” de células mistas. Nesse sentido, nosso estudo é único e apresenta na literatura uma nova fonte celular que pode ser obtida de forma mais simples e com baixa morbidade ao paciente.

Obtivemos uma média alta de sucesso no cultivo celular e estabelecimento de linhagens enriquecidas nos casos coletados, o que evidencia a facilidade no estabelecimento das linhagens primárias mesmo considerando que o tecido de origem (curetado do alvéolo dental) apresenta tamanho bastante reduzido e aspecto friável. Interessantemente, notamos a facilidade de estabelecer linhagens provenientes de alvéolos onde haviam dentes com processos inflamatórios pré-existent. Relatos anteriores evidenciam a presença de células mesenquimais progenitoras em populações derivadas de lesões periapicais coletadas em procedimentos cirúrgicos endodônticos (cirurgias parendodonticas). Segundo os autores, essas células devem existir em virtude da resposta reparativa do osso alveolar e do ligamento periodontal existente no local (Liao et al., 2011).

Sabe-se que injúrias patogênicas em tecidos, como a pulpíte, envolvem a atração de células inflamatórias e imunológicas que liberam citocinas, fatores de crescimento e recrutamento de células-tronco mesenquimais (CTMs) com finalidade de reparar o sítio injuriado (Feng et al., 2011; Shi et al., 2012). Feng et al. (2011) demonstrou claramente que células-tronco mesenquimais existentes em polpa dental podem migrar para o sítio de injúria e promover a reparação tecidual.

A presença do processo inflamatório, com consequente aumento de vascularização, pode explicar a facilidade na obtenção das células após a curetagem de alvéolos relacionados a processos inflamatórios pois a região perivascular é considerada um dos nichos de células-tronco mesenquimais em todo o organismo humano, inclusive em tecidos dentais (Shi; Gronthos, 2003; Fuchs et al., 2004; Diaz-Flores et al., 2009; Krueger; Bechmann, 2010; Feng et al., 2010; 2011; Hidaka et al., 2012; Maxson et al., 2012; Blocki et al., 2013).

No entanto, em nosso estudo também mostramos que quando as células são isoladas de dentes sem a presença de inflamação (hígidos), os ensaios de cinética mostram que o seu crescimento é mais robusto.

Outros fatores que não foram objeto de análise nesse estudo, como a idade dos pacientes, os substratos utilizados no cultivo ou a quantidade de tecido coletado, talvez influenciem o comportamento das células. Assim, estudos subsequentes são necessários para um melhor delineamento do papel da inflamação tanto no estabelecimento quanto no comportamento das linhagens celulares. Por exemplo, o meio de cultura parece influenciar o comportamento celular quando o fator idade é avaliado em células de aspirado alveolar. Quando as células de pacientes com diferentes idades foram cultivadas em diferentes meios de cultivos, o α MEM (do inglês, α Minimum Essential Medium) se mostrou mais apropriado para a utilização de pacientes com mais idade, visto que utilizando o DMEM (do inglês, Dulbecco Modified Essential Medium) são necessários mais que o dobro de dias (36 dias) para expandir as células e as células obtidas apresentam morfologia mais largas e flácidas, enquanto em α MEM as células expandem em 15 dias e apresentaram tamanho reduzido e aspecto límpido (Han et al., 2009).

Atualmente a utilização de substratos adicionados ao meio de cultivo como fatores de crescimento é frequente para manter a proliferação de CTMs em cultivo celular. Porém, ainda é necessário a padronização das técnicas para a futura aplicação clínica dessas células após cultivo (Hagmann et al., 2013a; 2013b). Um cuidado que tivemos em nosso estudo foi a não utilização de fatores de crescimento (com excessão do soro fetal bovino) durante a expansão das populações estudadas, visto que a influência destes substratos sobre a caracterização

destas células *in vitro* é controversa na literatura. Estudos utilizando fatores de crescimento adicionados ao meio de cultivo convencional, como o fator de crescimento de fibroblastos-2 (do inglês, *fibroblast growth factor*, FGF-2), fator de crescimento derivado de plaquetas-BB (do inglês, *platelet-derived growth factor*, PDGF-BB) e fator de crescimento epidermal (do inglês, *epidermal growth factor*, EGF), apesar de aumentarem consideravelmente o tempo de proliferação e replicabilidade das CTMs (Gharibi; Hughes, 2012) quando comparados aos grupos cultivado apenas com α MEM (Gharibi; Hughes, 2012) ou DMEM (Hagmann et al., 2013a), causaram a perda da capacidade de diferenciação osteogênica e adipogênica, (Gharibi; Hughes, 2012). O FGF-2 também ocasiona redução da expressão da fosfatase alcalina e de CD146 (Gharibi; Hughes, 2012), independentemente do meio de cultivo utilizado (Hagmann et al., 2013a).

Após a expansão do “pool” de células obtidas a partir do tecido curetado verificamos se esta população apresentava apenas células mesenquimais (positivas para a vimentina) e não estavam “contaminadas” por células epiteliais de gengiva (positivas para AE-1/AE3). Em nenhum dos casos onde foi feita a curetagem alveolar houve a presença de células epiteliais. E na placa de cultivo, as células obtidas a partir do explante exibiam sempre morfologia fibroblastóide, apresentando citoplasma alongado e fusiforme e aderência ao plástico.

Após separação celular por MACS foi possível observar, pela técnica de imunofluorescência, que essas populações apresentaram diferentes perfis imunológicos para o painel de marcadores de células-tronco utilizado. Assim, de um modo geral, todas as populações Stro-1⁺, CD146⁺ apresentaram maior número de marcadores que as populações negativas. As células Stro-1⁺ apresentaram células positivas para CD146, CD90, α AML, Sox-2, PDGFR- β e NG2. As células CD146⁺ apresentaram um menor número de marcadores de células-tronco, sendo positivas para Stro-1, α AML, PDGFR- β e NG2. As células CD146 negativas também apresentaram alguns marcadores como o NG2, PDGFR- β e α AML, e as células Stro-1 negativas apresentaram apenas o NG2. Todas as populações estudadas expressaram em comum o marcador NG2, que é encontrado em células pericitos de vários tecidos (Díaz-Flores et al., 2009; Feng et al., 2011; Crizan et al., 2013). Porém o perfil de cada população demonstrou que existe uma diversidade de células que apresentam-se positivas para outros marcadores de células-tronco quando derivadas de curetagem de alvéolo dental humano e estes diferentes perfis parecem refletir no comportamento destas quatro populações como possíveis células-tronco/progenitoras ou não.

Um marcador específico para isolar e identificar as CTM ainda é desconhecido e os marcadores moleculares utilizados para identificar essas células não são marcadores exclusivos de células-tronco. Um exemplo é a α AML que está presente também em uma gama variada de tipos celulares como miofibroblastos (Mifflin et al., 2011), células mioepiteliais (Araújo et al., 1994; 2000; 2006; Furuse et al., 2005), células musculares e perivasculares (Feng et al., 2011). Outros marcadores de células-tronco como o CD73 e CD105 são também expressos em fibroblastos de pele humana (Alt et al., 2011).

Para uma possível aplicação em terapias regenerativas e reparativas, os resultados dos ensaios de diferenciação *in vitro* e *in vivo* são os mais interessantes. Foi demonstrado em nossos achados que as populações Stro-1⁺ e CD146⁺ apresentam capacidade de formar tecido osteogênico *in vitro* e são capazes de formar tecido mineralizado semelhante ao osso *in vivo*. Um estudo recente utilizando células perivasculares CD146⁺/CD45⁻/CD34⁻ de lipoaspirados, demonstrou que estas células apresentam propriedades de CTMs e aparentam ser boa fonte para aplicação na medicina regenerativa para reparar áreas extensas de injúria em calvária de camundongos. Este estudo também comparou os resultados com as células CD146⁻ e os autores observaram que estas não se comportam tão bem como a população CD146⁺ (James et al., 2012). De forma similar, células Stro-1⁺ derivadas de polpa dental de dentes decíduos também foram aplicadas para reparar defeitos ósseos extensos na calvária de camundongos, quando associados a hidroxiapatita/fosfato tricálcico e foram capazes de reparar o defeito mais rapidamente e apresentar maior quantidade de tecido ósseo quando comparadas com células-tronco derivadas de medula óssea (Seo et al., 2009).

Interessantemente, após associação com hidroxiapatita e transplante em condições bastante semelhantes as nossas, células-tronco de polpa de dentes decíduos (Miura et al., 2003) e dentes permanentes (Gronthos et al., 2000, Gronthos et al., 2003) demonstraram a capacidade de formar osteodentina e um tecido semelhante ao complexo dentino-pulpar (Gronthos et al., 2000, Gronthos et al., 2003; Miura et al., 2003) e células isoladas do ligamento periodontal formaram um tecido rico em colágeno com fibras paralelas e um tecido semelhante ao cimento (Seo et al., 2004).

Portanto, fica claro que a origem das células-tronco, independente de sua capacidade de multidiferenciação, tem forte influência sobre o comportamento futuro dessas células. Esse fato torna-se especialmente importante quando no futuro tivermos que selecionar células para uma determinada função. Nesse sentido, células de determinada origem irão provavelmente ter aplicações mais específicas para uma dada finalidade do que células de outras origens. Nesse contexto, nossas células isoladas tanto com Stro-1 quanto com CD146 mostraram

capacidade de formação de matriz óssea sem a presença de túbulos dentinários (osteodentina) como ocorre com células de polpa dental. Esse fato por si só já sinaliza para uma possível função futura na regeneração óssea, embora sejam necessários estudos específicos sobre diferenciação utilizando abordagens diversas para então podermos concluir com melhor propriedade sobre a utilidade clínica de linhagens derivadas de curetagem alveolar.

Ainda nesse sentido, foi possível observar que ambas populações positivas foram capazes de formar *in vitro* tecido cartilaginoso e adiposo. Estudos em modelos animais têm demonstrado que CTMs associadas a materiais sintéticos são capazes de facilitar a regeneração cartilaginosa (Wakitani et al., 2004; Liu et al., 2006). Em traumas na parte intra-articular da patela de coelhos, quando CTMs autólogas são associadas ao ácido hialurônico modificado e injetadas no local de injúria, é possível visualizar a formação de cartilagem hialina com aspecto elástico, firme e translúcido (Liu et al., 2006). Em defeitos extensos causados na espessura total da cartilagem do fêmur de cavalos, as CTMs autólogas, quando associadas a microfaturas, foram capazes de reparar os defeitos de forma mais eficaz que o grupo controle, tratado apenas com microfatura (Wakitani et al., 2004; Fortier et al., 2010). Estudos em humanos também têm demonstrado que estas células embebidas em gel de colágeno, quando transplantadas em defeitos de cartilagem de joelhos produzem melhora clínica significativa quando comparadas com os casos sem a aplicação das células. No entanto, não se sabe se ocorre realmente a diferenciação das CTMs em tecidos condrogênicos ou se a formação do tecido regenerado ocorre devido a diferenciação de células pré-existentes em resposta a produção de fatores solúveis liberados pelas CTMs (Wakitani et al., 2002; 2004; 2007; Kuroda et al., 2007). Mas, independente do mecanismo de ação, o uso de CTMs de diferentes origens certamente terá um papel importante na medicina regenerativa em várias frentes.

De forma interessante foi possível observar a diferenciação osteogênica e adipogênica nas células derivadas de clones isolados das populações Stro-1⁺ e CD146⁺. A pureza da separação celular por MACS é em torno de 75% (Bauer, 1999; Gothard et al., 2011; Zhu; Murphy, 2013), e desta forma esse tipo de separação permite que células positivas passem pela coluna sem serem retidas pelo magneto. Desta forma sugerimos que esta diferenciação celular nas populações negativas pode ocorrer devido a pequena contaminação de células positivas presentes nas populações negativas durante a separação celular e que o fato de selecionarmos as colônias mais robustas para os ensaios de diferenciação nos faz selecionar justamente as células mais potentes.

Assim, de uma maneira simplificada, concluímos que foi possível isolar populações de células-tronco/progenitoras através de um simples procedimento clínico como a curetagem do alvéolo dental. Sugerimos que populações isoladas tanto com Stro-1, quanto com CD146 podem ter boa aplicação em regeneração óssea tecidual, e no caso da odontologia, talvez serem aplicadas para regeneração/recuperação de perdas ósseas alveolares e quem sabe até mesmo serem aplicadas na medicina regenerativa, visto a facilidade de acesso para coleta deste material.

6.2 Polpas dentais de camundongos apresentam uma diversidade de populações de células que se modificam conforme a idade e compõe o nicho de células-tronco mesenquimais

O nosso objetivo inicial em polpas de camundongos, foi verificar se através de análises por citometria de fluxo, poderíamos melhor compreender o padrão de expressão de alguns dos marcadores de células-tronco mais utilizados na literatura. Essa análise foi realizada em diferentes fases do desenvolvimento dental dando especial ênfase ao modelo de incisivos de roedores em virtude do seu crescimento contínuo e do conhecimento a respeito da presença de um nicho de células-tronco na região da alça cervical (Harada et al., 1999; Tummers; Thesleff, 2003, 2008; Seidel et al., 2010; Feng et al., 2011; Laphthanasupkul et al., 2012).

Se observarmos a cronologia da erupção dos dentes incisivos de camundongos, a fase de erupção dental inicia-se aos 5 dias de vida pós natal e estes dentes rompem o tecido gengival aos 10 dias de vida do animal (Luukko et al., 1998; Balic et al., 2010; Erlandsen et al., 2012). Sabemos que há uma diferença entre o crescimento de incisivos e molares de camundongos, sendo o crescimento dos molares bem semelhante ao de dentes humanos. Nesses roedores, durante a idade PN5, os molares iniciam a fase de formação da raiz, e na idade PN10 ocorre o alongamento das raízes com consequente aumento da polpa dental, reabsorção de osso alveolar na região em torno da coroa e considerável mineralização do dente (Lungová et al., 2011). Mediante a estes fatos, a escolha dessas faixas etárias para o estudo da expressão de marcadores de CTMs nas polpas, permitiu a análise numa situação de formação e maturação constante de forma a se equiparar, na medida do possível, incisivos e molares. Já na vida adulta dos camundongos, ocorre a reposição constante do tecido dental perdido em incisivos devido ao desgaste natural. Essa reposição é robusta e se dá a partir de proliferação de células da região da alça cervical. Em molares, essa reposição é mínima e

ocorre somente em resposta a alguma injúria (Harada et al., 1999; Nakakura-Ohshima et al., 2003; Ohshima et al., 2003; Thesleff, 2003; Tummers; Thesleff, 2008; Seidel et al., 2010; Feng et al., 2011; Lapthanasupkul et al., 2012).

De um modo geral, percebemos que em incisivos e molares o número de células CD90+ é constante enquanto o número de células CD105+ e CD73+ decresce em incisivos e aumenta em molares nas diferentes idades avaliadas. No entanto, percebemos também que esse número se equilibra de forma que ao compararmos as idades PN10 em incisivos e molares, temos números semelhantes para incisivos e molares tanto para CD105 (34,3%(±2,7) e 34,1%(±5,5), respectivamente) quanto para CD73 (4,3%(±0,5) e 6,0%(±0,3) respectivamente). Interessantemente, os números encontrados na idade PN5 em molares se assemelha aos encontrados em incisivos adultos (17,9%(±3,7) para CD105 e 2,9%(±0,3) para CD73 respectivamente), enquanto em incisivos PN5, o número de células CD105+ e CD73+ é muito maior (42,2%(±1,4) para o CD105 e 7,9%(±0,4) para o CD73) do que o encontrado em qualquer idade nos molares. Dessa forma, apesar da aparente discrepância inicial desse resultado, considerando que em incisivos há decréscimo e em molares acréscimo, fica claro que há um ponto de equilíbrio de forma que os incisivos adultos (proliferando por causa do crescimento contínuo) e molares em PN10 (proliferando para alongar a raiz) são semelhantes em termos das atividades que essas populações de células podem estar desempenhando.

Esse resultado também nos chama a atenção para o fato de que as populações de células-tronco nos diversos tecidos sabidamente apresentam-se em números constantes (e diminutos) que somente mudam após algum estímulo como a ocorrência de uma injúria local por exemplo (Smith; Lesot, 2001; Smith, 2002; Lovschall et al., 2007; Arthur et al., 2009; Voog; Jones, 2010; Mitsiadis et al., 2011; Guo et al., 2013). Em camundongos, é impossível comparar molares adultos com incisivos adultos em virtude da natureza diversa desses dois dentes, mas é de se esperar que em dentes humanos, os números de células CD105 e CD73 positivas sejam equiparados na idade adulta. Essa investigação será realizada em breve, obviamente respeitando-se a dificuldade ética de coleta desses dentes ainda hígidos.

É imperioso lembrar que o fator idade mesmo após o término da formação e maturação dental também é importante uma vez que o número de células-tronco mesenquimais em humanos, apresenta redução conforme o avançar da idade. Em indivíduos com 3 anos de idade, a porcentagem de células multipotentes encontradas na medula óssea é de 0,01%, enquanto em adultos com 45 anos ou mais, é em torno de 0,0018% (D'Ippolito et al., 2006; Orbay et al., 2012). Tudo isso é consequência, entre outros fatores, do envelhecimento e do encurtamento dos telômeros, fenômeno natural existente nas células e

indicador de senescência celular (Saeed; Iqtedar, 2013). Além disso, células-tronco mesenquimais apresentam com o passar da idade, um decréscimo da sua capacidade clonogênica (Campagnoli et al., 2001; Wagner et al., 2010), assim como apresentam baixa eficiência de reparo tecidual, menor angiogênese, capacidade de proliferação reduzida (Choudhery et al., 2012), além de capacidade de diferenciação diminuída e a alta probabilidade de danos no DNA (D'Ippolito et al., 2006; Roobrouck et al., 2008; Saeed; Iqtedar, 2013).

O marcador CD105, tem um importante papel na via de sinalização do TGF- β , é relacionado à proliferação e homeostase tecidual e, também é um marcador utilizado para identificar células endoteliais presentes na angiogênese de tumores e na angiogênese fisiológica (Pece-Barbara et al., 2005; Nassiri et al., 2011; Kapur et al., 2013). Durante o avançar da idade ocorre uma redução de CD105 de células de vasos neoformados (Rivard et al., 1999), logo observa-se usualmente a redução da expressão de CD105 conforme a idade aumenta.

O marcador CD73 também é utilizado como marcador de diferenciação de linfócitos (Airas et al., 1997; Peola et al., 1996; Yamashita et al., 1998; Yang et al., 2005), células endoteliais (Airas et al., 1997; Narravula et al., 2000; Kas-Deelen et al., 2001), pericitos (Feng et al., 2011), células dendríticas foliculares (Airas, 1998), células epiteliais intestinais (Strohmeier et al., 1997), fibroblastos (Hashikawa et al., 2003; Nemoto et al., 2013), neurônios (Maienschein; Zimmermann, 1996), osteoblastos (Jiang et al., 2005), oligodendrócitos (Maienschein; Zimmermann, 1996), inclusive em células-tronco mesenquimais (Barry et al., 2001; Dominici et al., 2006; Karamzadeh et al., 2012; Orbay et al., 2012). Devido a essa abrangência de expressão, a interpretação da função de células CD73+ e seu papel na população de células-tronco é complexa. No entanto, em decorrência da expressão em células endoteliais e pericitos, também podemos esperar um decréscimo de células CD73 positivas com o passar do tempo.

Balic et al. (2010) observando, por citometria de fluxo, células positivas para os marcadores CD90, CD117 e Sca-1 e negativas para o CD45, em tecido fresco de incisivos erupcionados (entre as idades PN18 e PN21) e não erupcionados (entre as idades PN5 e PN7), observaram um menor número de células positivas para CD117 e Sca-1 nos animais com mais idade (dentes já erupcionados), quando essas eram comparadas às células de dentes não erupcionados (animais mais jovens). Diferente de nossos resultados, Balic et al. (2010) encontraram uma enorme quantidade de células positivas para o CD90 na polpa de incisivos, sendo a expressão para este marcador, presente em quase totalidade populacional de células

pulpares em camundongos jovens. E, de forma interessante, ao cultivarem estas células a fim de induzi-las à diferenciação osteogênica, condrogênica e adipogênica, os autores verificaram potencial osteo-dentinogênico, porém elas foram incapazes de se diferenciar em tecidos condrogênico ou adipogênico, sugerindo que se tratavam de células precursoras não multipotentes (Balic et al., 2010).

Em nosso estudo, a quantidade de células CD90⁺ apresentou-se semelhante em todas as idade analisadas na polpa de incisivos e molares. Este marcador foi descrito como um dos marcadores encontrados em linhagens de células-tronco embrionárias humanas pela *International Stem Cell Initiative*, a qual juntou resultados de 17 laboratórios e 59 linhagens de células-tronco embrionárias humanas (International Stem Cell Initiative, 2007). O CD90 também é encontrado em células-tronco hematopoiéticas (Sumikuma et al., 2002; Wisniewski et al., 2011), está entre os requisitos mínimos de caracterização de CTMs segundo a *International Society for Cellular Therapy* (Horwitz et al., 2005; Dominici et al., 2006), e é um dos marcadores utilizados na literatura para caracterização dessas células (Liao et al., 2011; Karamzadeh et al., 2012; Lin et al., 2013; Park et al., 2013).

Porém, o CD90 também é encontrado em células pouco diferenciadas como timócitos e células diferenciadas como mioblastos, células neurais, células endoteliais e fibroblastos, além de ser um marcador pan-linfócitos T (Sumikuma et al., 2002; Bradley et al., 2009; Wisniewski et al., 2011; Alt et al., 2011; Lin et al., 2013).

Os resultados da expressão individual dos marcadores CD73, CD90 e CD105 não nos forneceu informações importantes sobre a identidade das células-tronco tanto em incisivos quanto em molares de camundongo. Esse fato nos levou a estudar a co-expressão dos 3 marcadores tendo por base a população de células CD90 positivas, visto que essa era constante. Foi possível observar que existe uma diversidade populacional constituída por diferentes combinações. Encontramos assim, quatro populações distintas de células: 1) CD90⁺/CD105⁻/CD73⁻, 2) CD90⁺/CD105⁺/CD73⁻, 3) CD90⁺/CD105⁻/CD73⁺ e 4) CD90⁺/CD105⁺/CD73⁺.

A possibilidade de identificar células-tronco através da combinação de marcadores é controversa uma vez que não se sabe ao certo quais combinações são mais efetivas e nem quantos marcadores devem ser utilizados para essa função. Como exemplos, Alt et al. (2011) mostraram que a combinação de apenas 2 marcadores parece não ser suficiente, visto que células CD73⁺/CD105⁺ foram encontradas em linhagens celulares de fibroblastos de pele e de pulmão embrionário humano (esta última também conhecida como WI38). Estas linhagens se comportaram diferentemente ao serem submetidas a ensaios de caracterização, sendo que a

linhagem WI38 apresentou capacidade limitada de diferenciação e não foi capaz de formar colônias.

Diferentemente, Sasikala et al. (2011) isolaram em sangue periférico de indivíduos saudáveis e com cirrose hepática, uma população constituída por células CD90⁺/CD73⁺/CD45⁻. Esta população demonstrou possuir grande capacidade proliferativa e foi encontrada em maior quantidade na circulação periférica de indivíduos com cirrose. Os autores acreditam que isto se deve ao fato dessas células serem provenientes da medula óssea dos indivíduos e estarem sendo recrutadas para o tecido lesionado, no caso o fígado, através da capacidade migratória e de reparo (propriedades sabidamente de células-tronco mesenquimais). Porém, este estudo não mostrou ensaios de multidiferenciação tecidual e, portanto, o papel desta população como células-tronco mesenquimais deve ser melhor investigado.

Estudos prévios do nosso grupo já haviam demonstrado que células de ciclagem lenta que são capazes de mobilização e resposta a injúria e estão presentes na região da alça cervical de incisivos de camundongos (Feng et al., 2011). Com isso em mente, decidimos verificar se as populações que expressam CD90, CD105 e CD73 correspondem às células de ciclagem lenta na polpa dental de incisivos de camundongos adultos.

Para tanto, delineamos ensaios de incorporação de BrdU. Quando quantificamos as populações de ciclagem lenta, rápida e intermediária apenas pelo número de células BrdU⁺ em cada grupo, foram identificadas populações formadas por: poucas células de ciclagem lenta (4,9% CCL - células-tronco putativas), poucas células de ciclagem rápida (2,3% CCR - células amplificadoras transientes) e quase a totalidade (89,1%) de células de ciclagem intermediária (CCI - células de suporte).

A localização das células de ciclagem lenta, através marcação imuno-histoquímica, revelou células positivas ao BrdU na região mais apical da polpa situada entre as alças cervicais. Essa localização coincidia com a localização da expressão de Patched (PTC) previamente apresentada por Seidel et al. (2010) e com nossos resultados obtidos pela técnica de imunofluorescência para essa proteína.

Nos incisivos de camundongos a existência de células-tronco epiteliais na região de alça cervical (onde há o encontro do epitélio interno e epitélio externo do esmalte) é amplamente conhecida (Harada et al., 1999; Tummers; Thesleff, 2003, 2008). No tecido mesenquimal, acredita-se que essas células também encontram-se na porção mais apical da raiz próximo às alças cervicais (Seidel et al., 2010; Feng et al., 2011). Além disso, sabe-se que células progenitoras proliferam e se diferenciam a partir da porção apical em direção a região

incisal desses dentes (Tummers; Thesleff, 2003). Dessa forma, a localização de células de ciclagem lenta na porção apical da alça cervical associada à co-localização da expressão de Patched sugere que se trata da população de células-tronco mesenquimais.

Quando avaliamos a co-expressão de BrdU com CD90, pudemos observar que somente 3% das células de ciclagem lenta expressa CD90, essa co-expressão acontece em 11% das células de ciclagem intermediárias e em 22% das células de ciclagem rápida, evidenciando que estas três populações encontradas são populações mistas que apresentam células CD90 positivas e negativas. Mas, quando mudamos o parâmetro de avaliação e a análise é feita de forma que a população total positiva para CD90 é avaliada, observamos que 96% das células pertence ao grupo de células intermediárias, enquanto as demais se dividem entre ciclagem lenta e rápida. Com esse resultado pudemos inferir que o CD90 é principalmente um marcador de células de ciclagem intermediária, apesar de não exclusivo, por estar presente nas células de ciclagem lenta e rápida. Interessantemente, a marcação imuno-histoquímica para CD90 evidencia células mais concentradas na região de células de ciclagem rápida, mostrando que de fato existe um grupo de células CD90 positivas de ciclagem rápida que provavelmente dá suporte ao epitélio da alça cervical labial. Essa região sabidamente abriga células-tronco epiteliais que dão origem a odontoblastos e ameloblastos necessários para o crescimento contínuo do incisivo de camundongos (Harada et al., 1999; Harada et al., 2002a; 2002b).

As células de ciclagem rápida positivas para o BrdU foram encontradas em áreas mais centrais da polpa, indo em direção a região incisal e logo abaixo da alça cervical labial. Deve-se lembrar de que neste grupo houve apenas uma dose de aplicação de BrdU, sendo assim, o BrdU foi incorporado às células em proliferação do momento da aplicação ao momento em que as amostras foram coletadas (24 horas após aplicação) quando foi possível observar a localização de suas células-filhas. O único relato de localização de células de ciclagem rápida presentes no mesênquima de incisivos de camundongos foi de Lapthanasupkul et al. (2012) que observaram células positivas para o genes do complexo polcomb nessa mesma localização, incluindo o Ring1b.

Assim, na tentativa de quantificar os diferentes grupos populacionais na polpa de incisivos por citometria de fluxo, mas agora utilizando uma abordagem de co-expressão com o CD90 que está expresso em todas as populações, utilizamos o Patched como marcador de células de ciclagem lenta e o Ring2/1b/RNF para as células de ciclagem rápida.

Desta forma, primeiramente observamos o número de células Patched (PTC)⁺/CD90⁻, CD90⁺/PTC⁻ e PTC⁺/CD90⁺ na polpa dental. Observamos que 7% das células da polpa eram

somente PTC⁺/CD90⁻, 11% CD90⁺/PTC⁻ e 3% PTC⁺/CD90⁺. Considerando que as CTM apresentam como propriedades ciclagem lenta e expressão dos três marcadores, CD90, CD73 e CD105 (Harada et al., 1999; Harada et al., 2002a; 2002b; Dominici et al., 2006; Scadden, 2006; Seidel et al., 2010; Feng et al., 2011; Mafi et al., 2011; Orbay et al., 2012) e nossos resultados também mostraram a presença da proteína Patched, realizamos então análises para a combinação entre CD90, Patched (PTC), CD105 e CD73.

Utilizando esses parâmetros, foi possível identificar cinco populações distintas de ciclagem lenta (células CD90⁺/Patched⁺/CD105⁺/CD73⁺, células CD90⁺/PTC⁺/CD105⁺/CD73⁺, células CD90⁺/PTC⁺/CD105⁻/CD73⁺, células CD90⁺/PTC⁺/CD105⁻/CD73⁻ e células CD90⁻/PTC⁺/CD105⁻/CD73⁻) e três populações distintas de células CD90⁺ de ciclagem intermediária (CD90⁺/PTC⁻/CD105⁻/CD73⁻, CD90⁺/PTC⁻/CD105⁺/CD73⁻ e CD90⁺/PTC⁻/CD105⁻/CD73⁺) e uma população de ciclagem rápida CD90⁺/Ring2/1B/RNF⁺ em 6% das células da polpa.

Dentre as populações de ciclagem lenta, identificamos um pequeno número de células positivas para todos os marcadores avaliados (CD90⁺/PTC⁺/CD73⁺/CD105⁺). Essa população corresponde a 0,125% do total de células da polpa. Sabe-se que este número varia de acordo com a idade e tecido de origem. Em tecidos humanos as células-tronco encontradas na medula óssea são de 0,01% em indivíduos com 3 anos de idade e 0,0018% em indivíduos adultos (D'Ippolito et al., 2006; Orbay et al., 2012), e em tecidos dentais a quantidade de células-tronco mesenquimais é de 2,6% na papila apical e 6% em polpa dental (Gronthos et al., 2000; Shi; Gronthos, 2003; Xu et al., 2009).

A abordagem que utilizamos para identificar as células de ciclagem lenta, intermediária e rápida através da incorporação de BrdU e da combinação de marcadores não cobre a totalidade de células da polpa e não identifica todas as células que por ventura sejam de fato de ciclagem lenta, intermediária ou rápida. Além disso, sabe-se que a população de ciclagem lenta não apresenta somente células-tronco, mas também compreende células terminalmente diferenciadas e células em senescência (Young et al., 2003; Klein; Simons, 2011). Portanto, os resultados que apresentamos são apenas aproximados da realidade mas ainda assim, apontam para um quadro onde há uma complexa combinação populações celulares no microambiente das células-tronco.

Dessa forma, utilizamos nossos resultados como um todo para delinear um modelo hipotético de nicho para as células-tronco na polpa dental de incisivos de camundongos e observar a diversidade populacional deste microambiente. Esse modelo foi criado de forma hierárquica de acordo com a expressão dos marcadores por nós estudados. Assim, a população

CD90⁺/PTC⁺/CD73⁺/CD105⁺ (positiva para os quatro marcadores) está no topo e abaixo são colocadas as outras populações de acordo com a não expressão de um ou mais marcadores.

Esse modelo servirá de base para estudos subsequentes visando analisar o comportamento das diferentes populações formadoras desse microambiente quando isoladas das demais, e o papel de cada uma delas *in vivo* em funções específicas como na manutenção da homeostase tecidual e na resposta a injúria. Adicionalmente, abre-se também a possibilidade do estudo desse modelo de nicho em outros tecidos dentais bem como em outros tecidos do corpo humano.

7 CONCLUSÕES

- 1) Foi possível isolar células-tronco/progenitoras a partir de tecidos curetados de alvéolo dental humano com base na expressão de Stro-1 e CD146.
- 2) A população isolada pela expressão de Stro-1 é mais pura e potente do que a população isolada por CD146.
- 3) A análise combinada de CD90, CD73 e CD105 mostrou que existe uma diversidade populacional que varia em números em polpa dental de incisivos e molares de camundongos.
- 4) O número de células CD90⁺ é constante em incisivos e molares, enquanto a quantidade de células CD73 e CD105 positivas varia de acordo com a atividade tecidual, mas tendendo a se equiparar nesses dois dentes.
- 5) A localização das células de ciclagem lenta coincide com a localização das células que expressam Patched na alça cervical de camundongos.
- 6) Foi possível delinear um modelo de nicho de células-tronco mesenquimais em polpa dental de camundongos, no qual a população CD90⁺/Patched⁺/CD105⁺/CD73⁺ apresenta-se encabeçando outras populações com expressões diversificadas desses marcadores e expressão de outros marcadores.

REFERÊNCIAS¹

Adam PJ, Clesham GJ, Weissberg PL. Expression of endoglin mRNA and protein in human vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;247(1):33–7.

Aguilera KY, Brekken RA. Recruitment and retention: factors that affect pericyte migration. *Cell Mol Life Sci*. 2013 Aug 4. [Epub ahead of print]

Airas L, Niemelä J, Salmi M, et al. Differential regulation and function of CD73, a glycosyl-phosphatidylinositol-linked 70-kD adhesion molecule, on lymphocytes and endothelial cells. *J Cell Biol*. 1997 Jan 27;136(2):421-31.

Airas L. CD73 and adhesion of B-cells to follicular dendritic cells. *Leuk Lymphoma*. 1998 Mar;29(1-2):37-47

Alison MR, Islam S. Attributes of adult stem cells. *J Pathol*. 2009; 217:144-60.

AlQahtani SJ, Hector MP, Liversidge HM. Brief communication: The London atlas of human tooth development and eruption. *Am J Phys Anthropol*. 2010 Jul;142(3):481-90.

Alt E, Yan Y, Gehmert S, et al. Fibroblasts share mesenchymal phenotypes with stem cells, but lack their differentiation and colony-forming potential. *Biol Cell*. 2011 Apr;103(4):197-208.

Alvarez CV, Garcia-Lavandeira M, Garcia-Rendueles ME, et al. Defining stem cell types: understanding the therapeutic potential of ESCs, ASCs, and iPS cells. *J Mol Endocrinol*. 2012 Aug 30;49(2):R89-111.

Alvarez RH, Kantarjian HM, Cortes JE. Biology of platelet-derived growth factor and its involvement in disease. *Mayo Clin Proc*. 2006;81(9):1241-57.

Arana-Chavez VE, Massa LF. Odontoblasts: the cells forming and maintaining dentine. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004 Aug;36(8):1367-73.

Araújo VC, Altemani A, Furuse C, et al. Immunoprofile of reactive salivary myoepithelial

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

cells in intraductal areas of carcinoma ex-pleomorphic adenoma. *Oral Oncol.* 2006; 42:1011-6.

Araujo VC, Carvalho YR, Araújo NS. Actin versus vimentin in myoepithelial cells of salivary gland tumors: a comparative study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994;77:387-91.

Araújo VC, de Sousa SOM, Carvalho YR, et al. Application of immunohistochemistry to the diagnosis of salivary gland tumors. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2000;8(3):195-202.

Arnold K, Sarkar A, Yram MA, et al. Sox2(+) adult stem and progenitor cells are important for tissue regeneration and survival of mice. *Cell Stem Cell.* 2011 Oct 4;9(4):317-29.

Arthur A, Koblar S, Shi S, Gronthos S. Eph/ephrinB mediate dental pulp stem cell mobilization and function. *J Dent Res.* 2009;88: 829-34.

Avery J. *Oral Development and Histology.* 3. ed. Stuttgart: Thieme; 2001.

Baddoo M, Hill K, Wilkinson R, et al. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection. *J Cell Biochem.* 2003; 89:1235-49.

Bakopoulou A, Leyhausen G, Volk J, et al. Comparative characterization of STRO-1neg/CD146pos and STRO-1pos/CD146pos apical papilla stem cells enriched with flow cytometry. *Arch Oral Biol.* 2013 Jul 17; pii:S0003-9969(13)00213-6. doi:10.1016/j.archoralbio.2013.06.018. [Epub ahead of print]

Baksh D, Yao R, Tuan RS. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem Cells.* 2007 Jun;25(6):1384-92.

Balic A, Aguila HL, Caimano MJ, Francone VP, Mina M. Characterization of stem and progenitor cells in the dental pulp of erupted and unerupted murine molars. *Bone.* 2010 Jun;46(6):1639-51

Ball SG, Shuttleworth CA, Kielty CM. Platelet-derived growth factor receptor-alpha is a key determinant of smooth muscle alpha-actin filaments in bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(2):379-91.

Barry F, Boynton R, Murphy M, et al. The SH-3 and SH-4 antibodies recognize distinct

epitopes on CD73 from human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001 Nov 30;289(2):519-24.

Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, et al.. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol.* 2002; 30:42-8.

Bartold PM, McCulloch CA, Narayanan AS, et al. Tissue engineering: a new paradigm for periodontal regeneration based on molecular and cell biology. *Periodontol.* 2000;24:253-69.

Bauer J. Advances in cell separation: recent developments in counterflow centrifugal elutriation and continuous flow cell separation. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1999 Feb 5;722(1-2):55-69.

Benjamin LE, Hemo I, Keshet E. A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. *Development.* 1998;125:1591-8

Bensidhoum M, Chapel A, Francois S, et al. Homing of in vitro expanded Stro-1⁻ or Stro-1⁺ human mesenchymal stem cells into the NOD/SCID mouse and their role in supporting human CD34 cell engraftment. *Blood.* 2004;103:3313-9.

Bernabeu C, Conley BA, Vary CP. Novel biochemical pathways of endoglin in vascular cell physiology. *J Cell Biochem.* 2007;102(6):1375–88.

Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell.* 2008;2:313-9.

Blocki A, Wang Y, Koch M, et al. Not All MSCs Can Act as Pericytes: Functional In Vitro Assays to Distinguish Pericytes from Other Mesenchymal Stem Cells in Angiogenesis. *Stem Cells Dev.* 2013 Sep 1;22(17):2347-55.

Boneberg EM, Illges H, Legler DF, et al. Soluble CD146 is generated by ectodomain shedding of membrane CD146 in a calcium-induced, matrix metalloprotease-dependent process. *Microvasc Res.* 2009 Dec;78(3):325-31.

Bourdeau A, Dumont DJ, Letarte M. A murine model of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Clin Invest.* 1999;104(10):1343–51, 21.

Bradley JE, Ramirez G, Hagood JS. Roles and regulation of Thy-1, a context-dependent modulator of cell phenotype. *Biofactors*. 2009 May-Jun;35(3):258-65.

Brazel CY, Limke TL, Osborne JK, et al. Sox2 expression defines a heterogeneous population of neurosphere-forming cells in the adult murine brain. *Aging Cell*. 2005 Aug;4(4):197-207.

Buchtová M, Handrigan GR, Tucker AS, et al. Initiation and patterning of the snake dentition are dependent on Sonic hedgehog signaling. *Dev Biol*. 2008 Jul 1;319(1):132-45.

Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, et al. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood*. 2001 Oct 15;98(8):2396-402.

Caplan A. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *J Pathol*. 2009;217:318-24.

Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 1991;9:641-50.

Caplan AI. The mesengenic process. *Clin Plast Surg*. 1994; 21:429-35.

Castrop H, Huang Y, Hashimoto S, et al. Impairment of tubuloglomerular feedback regulation of GFR in ecto-5'-nucleotidase/CD73-deficient mice. *J Clin Invest*. 2004 Sep;114(5):634-42.

Chai Y, Jiang X, Ito Y, et al. Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. *Development*. 2000;127(8):1671-9.

Chambrone L, Sukekava F, Araújo MG, et al. Root-coverage procedures for the treatment of localized recession-type defects: a Cochrane systematic review. *J Periodontol* 2010;81:452-8.

Chan B, Sinha S, Cho D, et al. Critical roles of CD146 in zebrafish vascular development. *Dev Dyn*. 2005;232:232-44.

Chen XD, Qian HY, Neff L, et al. Thy-1 antigen expression by cells in the osteoblast lineage. *J Bone Miner Res*. 1999;14:362-75.

Cho SH, Godin JM, Chen CH, Qiao W, Lee H, Lo YH. Review Article: Recent advancements in optofluidic flow cytometer. *Biomicrofluidics*. 2010 Dec 30;4(4):43001. doi: 10.1063/1.3511706.

Choudhery MS, Khan M, Mahmood R, Mehmood A, Khan SN, Riazuddin S. Bone marrow derived mesenchymal stem cells from aged mice have reduced wound healing, angiogenesis, proliferation and anti-apoptosis capabilities. *Cell Biol. Int.* 2012;36: 747–53.

Chrcanovic BR, Martins MD, Wennerberg A. Immediate placement of Implants into Infected Sites: A Systematic Review. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2013 Jul 2. doi: 10.1111/cid.12098. [Epub ahead of print]

Coady JM, Toto PD, Santangelo MV. Histology of the mouse incisor. *J Dent Res.* 1967 Mar-Apr;46(2):384-8.

Cobourne MT, Hardcastle Z, Sharpe PT. Sonic hedgehog regulates epithelial proliferation and cell survival in the developing tooth germ. *J Dent Res.* 2001 Nov; 80(11):1974-9.

Cobourne MT, Sharpe PT. Expression and regulation of hedgehog-interacting protein during early tooth development. *Connect Tissue Res.* 2002;43(2-3):143-7.

Cobourne MT, Xavier GM, Depew M, et al. Sonic hedgehog signalling inhibits palatogenesis and arrests tooth development in a mouse model of the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Dev Biol.* 2009 Jul 1;331(1):38-49.

Collins TJ. ImageJ for microscopy. *Biotechn.* 2007;43(1 Suppl):25–30.

Colter DC, Sekiya I, Prockop DJ. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98:7841-5.

Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell.* 2008 Sep 11;3(3):301-13.

Crisan M, Corsellib M, Chen WCW, et al. Perivascular cells for regenerative medicine. *J Cell Mol Med.* 2012 Dec;16(12):2851-60.

da Cunha JM, da Costa-Neves A, Kerkis I, et al. Pluripotent stem cell transcription factors during human odontogenesis. *Cell Tissue Res.* 2013 Sep;353(3):435-41.

Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, et al. Features of apoptotic cells measured by flow

cytometry. *Cytometry*. 1992;13(8):795-808.

Dassule HR, Lewis P, Bei M, et al. Sonic hedgehog regulates growth and morphogenesis of the tooth. *Development*. 2000 Nov; 127(22):4775-85.

Dennis JE, Carbillet JP, Caplan AI, et al. The STRO-1⁺ marrow cell population is multipotential. *Cells Tissues Organs*. 2002; 170:73-82.

Dewey KW. Normal and pathological cementum formation. *Dent Cosmos*. 1926;68:560–85.
Diaz-Flores L, Gutiérrez R, Madrid JF, et al. Pericytes. Morphofunction, interactions and pathology in a quiescent and activated mesenchymal cell niche. *Histol Histopathol*. 2009;24:909-69.

Diekwisch TG. 2001. The developmental biology of cementum. *Int J Dev Biol*. 2001;45:695-706.

D'Ippolito G, Howard GA, Roos BA, et al. Sustained stromal stem cell self-renewal and osteoblastic differentiation during aging. *Rejuvenation Res*. 2006 Spring;9(1):10-9.

Disher DE, Mooney DJ, Zandstra PW. Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. *Science*. 2009; 324:1673-7.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.

Duverger O, Morasso MI. Role of homeobox genes in the patterning, specification, and differentiation of ectodermal appendages in mammals. *J Cell Physiol*. 2008 Aug;216(2):337-46.

El-Sayed KMF, Paris S, Becjer S, et al. Isolation and characterization of multipotent postnatal stem/progenitor cells from human alveolar bone proper. *J Cranio-Maxillo-Facial Surg*. 2012;40:735-42.

Erlandsen H, Ames JE, Tamkenath A, et al. Pleiotrophin expression during odontogenesis. *J Histochem Cytochem*. 2012 May;60(5):366-75.

Etheridge SL, Spencer GJ, Heath DJ, et al. Expression profiling and functional analysis of wnt signaling mechanisms in mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2004; 22:849-60.

Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981;292:154-6.

Falanga V, Iwamoto S, Chartier M, et al. Autologous bone marrow–derived cultured mesenchymal stem cells delivered in a fibrin spray accelerate healing in murine and human cutaneous wounds. *Tissue Eng*. 2007;13(6):1299-312.

Fang D, Seo BM, Liu Y, Sonoyama W, Yamaza T, Zhang C, Wang S, Shi S. Transplantation of mesenchymal stem cells is an optimal approach for plastic surgery. *Stem Cells*. 2007 Apr;25(4):1021-8.

Feng J, Mantesso A, Sharpe PT. Perivascular cells as mesenchymal stem cells. *Expert Opin Biol Ther*. 2010;10(10):1441-51.

Feng J, Mantesso A, De Bari C, et al. Dual origin of mesenchymal stem cells contributing to organ growth and repair. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011 Apr 19;108(16):6503-8.

Fortier LA, Potter HG, Rickey EJ, et al. Concentrated bone marrow aspirate improves full-thickness cartilage repair compared with microfracture in the equine model. *J Bone Joint Surg Am*. 2010;92(10):1927-37.

Fournier BP, Ferre FC, Couty L, et al. Multipotent progenitor cells in gingival connective tissue. *Tissue Eng Part A*. 2010 Sep; 16(9):2891-9

Freshney RI. *Culture of animal cells: a manual of basic technique*. New York: Willey; 2000.

Friedenstein AJ. Stromal mechanisms of bone marrow: cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Haematol Blood Transfus*. 1980;25:19-29.

Friedenshtein AJ, Luriia EA. Kletochnye osnovy krovetvornogo mikrookruzheniya [Cell basis of hematopoietic microenvironment]. *Ter Arkh*. 1980;52(9):67-71. Review. Russian.

Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Gerasimov UV. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tissue Kinet*. 1987;20:263-72.

Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in

monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.* 1970a;3:393-403.

Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Vasiliev AV. Clonoobrasovanie v monosloinich kulturach kostnogo mozga (Formation of clone in monolayer of bone marrow cultures). *Bull Exp Biolog Med.* 1970b;2:94-6.

Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, et al. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol.* 1974;2(2):83-92.

Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, et al. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation.* 1968;6:230-47.

Fuchs E, Tumbar T, Guasch G. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell.* 2004 Mar 18;116(6):769-78.

Furuse C, Souza AOM, Nunes FD, et al. Myoepithelial cell markers in salivary gland neoplasms. *Int J Surg Pathol.* 2005;13(1):57-65.

Gaete M, Lobos N, Torres-Quintana MA. Mouse tooth development time sequence determination for the ICR/Jcl strain. *J Oral Sci.* 2004;46(3):135-41.

Ghaemi SR, Harding FJ, Delalat B, et al. Exploring the mesenchymal stem cell niche using high throughput screening. *Biomaterials.* 2013 Oct;34(31):7601-15.

Gharibi B, Hughes FJ. Effects of medium supplements on proliferation, differentiation potential, and in vitro expansion of mesenchymal stem cells. *Stem Cells Transl Med.* 2012;1:771-82.

Gili RS, Naveha CNL, Zaslansky P, et al. Tooth-PDL-bone complex: Response to compressive loads encountered during mastication – A review. *Arch Oral Biol.* 2012;57(12):1575-84.

Gougos A, St Jacques S, Greaves A, et al. Identification of distinct epitopes of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of endothelial cells, leukemic cells, and syncytiotrophoblasts. *Int Immunol.* 1992;4(1):83-92.

Gothard D, Tare RS, Mitchell PD, Dawson JI, Oreffo RO. In search of the skeletal stem cell:

isolation and separation strategies at the macro/micro scale for skeletal regeneration. *Lab Chip*. 2011 Apr 7;11(7):1206-20. doi: 10.1039/c0lc00575d. Epub 2011 Feb 25.

Gritli-Linde A, Bei M, Maas R, Zhang XM, et al. Shh signaling within the dental epithelium is necessary for cell proliferation, growth and polarization. *Development*. 2002 Dec;129(23):5323-37.

Gronthos S, Simmons PJ. The growth factor requirements of STRO-1- positive human bone marrow precursors under serum-deprived conditions in vitro. *Blood*. 1995;85(4):929-40.

Gronthos S, Akintoye SO, Wang CY, et al. Bone marrow stromal stem cells for tissue engineering. *Periodontol*. 2000;41:188-95.

Gronthos S, Brahimi J, Li W, et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res*. 2002;81(8): 531-5.

Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, et al. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol*. 2001;189:54-63.

Gronthos S, Graves SE, Ohta S, et al. The STRO-1⁺ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors. *Blood*. 1994;84(12):4164-73.

Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97(25):13625-30.

Gronthos S, Zannettino AC, Hay SJ, et al. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci*. 2003;116:1827-35.

Guo Z, Driver I, Ohlstein B. Injury-induced BMP signaling negatively regulates *Drosophila* midgut homeostasis. *J Cell Biol*. 2013 Jun 10;201(6):945-61.

Hagmann S, Moradi B, Frank S, et al. FGF-2 addition during expansion of human bone marrow-derived stromal cells alters MSC surface marker distribution and chondrogenic differentiation potential. *Cell Prolif*. 2013a Aug;46(4):396-407.

Hagmann S, Moradi B, Frank S, et al. Different culture media affect growth characteristics, surface marker distribution and chondrogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *BMC Musculoskelet Disord*. 2013b Jul 30;14:223.

Han J, Okada H, Takai H, et al. Collection and culture of alveolar bone marrow multipotent stromal cells from older individuals. *J Cell Biochem*. 2009;107:1198-204.

Handa K, Saito M, Tsunoda A, et al. Progenitor cells from dental follicle are able to form cementum matrix in vivo. *Connect Tissue Res*. 2002a;43(2-3):406-8.

Handa K, Saito M, Yamauchi M, et al. Cementum matrix formation in vivo by cultured dental follicle cells. *Bone*. 2002b;31(5):606-11.

Harada H., Kettunen P, Jung HS, et al. Localization of putative stem cells in dental epithelium and their association with Notch and FGF signaling. *J Cell Biol*. 1999;147(1):105-20.

Harada H, Mitsuyasu T, Toyono T, et al. Epithelial stem cells in teeth. *Odontology*. 2002a;90(1):1-6.

Harada H, Toyono T, Toyoshima K, et al. FGF10 maintains stem cell compartment in developing mouse incisors. *Development*. 2002b;129:1533-41.

Hardcastle Z, Mo R, Hui CC, et al. The Shh signalling pathway in tooth development: defects in Gli2 and Gli3 mutants. *Development*. 1998 Aug;125(15):2803-11.

Hashikawa T, Takedachi M, Terakura M, et al. Involvement of CD73 (ecto-5'-nucleotidase) in adenosine generation by human gingival fibroblasts. *J Dent Res*. 2003 Nov;82(11):888-92.

Hawley TS, Hawley RG, editors. Flow cytometry protocols. [place unknown]: Springer Science+Business Media, LLC; 2011. (Methods in Molecular Biology, vol. 699).DOI 10.1007/978-1-61737-950-5_1

Hellström M, Kalén M, Lindahl P, et al. Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development*. 1999;126:3047-55.

Hematti P. Mesenchymal stromal cells and fibroblasts: a case of mistaken identity? *Cytotherapy*. 2012 May;14(5):516-21.

Hidaka T, Nagasawa T, Shirai K, et al. FGF-2 induces proliferation of human periodontal ligament cells and maintains differentiation potentials of STRO-1(+)/CD146(+) periodontal ligament cells. *Arch Oral Biol*. 2012 Jun;57(6):830-40.

Hombach-Klonisch S, Panigrahi S, Rashedi I, et al. Adult stem cells and their trans-differentiation potential--perspectives and therapeutic applications. *J Mol Med (Berl)*. 2008 Dec;86(12):1301-14.

Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2005;7(5):393-5.

Huang GT, Yamaza T, Shea LD, et al. Stem/Progenitor cell-mediated de novo regeneration of dental pulp with newly deposited continuous layer of dentin in an in vivo model. *Tissue Eng Part A* 2010;16(2):605-15.

Iliopoulos Ch, Zouloumis L, Lazaridou M. Physiology of bone turnover and its application in contemporary maxillofacial surgery. A review. *Hippokratia* 2010;14(4):244-8.

International Stem Cell Initiative. Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. *Nature Biotech*. 2007;25: 803-16.

Iohara K, Imabayashi K, Ishizaka R, et al. Complete pulp regeneration after pulpectomy by transplantation of CD105+ stem cells with stromal cell-derived factor-1. *Tissue Eng Part A*. 2011 Aug;17(15-16):1911-20.

Ishikawa Y, Ida-Yonemochi H, Nakakura-Ohshima K, et al. The relationship between cell proliferation and differentiation and mapping of putative dental pulp stem/progenitor cells during mouse molar development by chasing BrdU-labeling. *Cell Tissue Res*. 2012 Apr;348(1):95-107.

Ishikawa Y, Ida-Yonemochi H, Suzuki H, et al. Mapping of BrdU label-retaining dental pulp cells in growing teeth and their regenerative capacity after injuries. *Histochem Cell Biol*. 2010 Sep;134(3):227-41.

Iwasaki K, Komaki M, Yokoyama N, et al. Periodontal ligament stem cells possess the characteristics of pericytes. *J Periodontol*. 2012 Dec 14. doi:10.1902/jop.2012.120547.

James AW, Zara JN, Corselli M, et al. An abundant perivascular source of stem cells for bone tissue engineering. *Stem Cells Transl Med*. 2012 Sep;1(9):673-84.

Jamur MC, Oliver C. Permeabilization of cell membranes. *Methods Mol Biol*. 2010;588:63-6.

Jofre J, Valenzuela D, Quintana P, et al. Protocol for immediate implant replacement of infected teeth. *Implant Dent.* 2012 Aug;21(4):287-94.

Jones E, Giannoudis P, Yang X, et al. *Mesenchymal stem cells and skeletal regeneration.* London: Elsevier; 2013.

Juuri E, Jussila M, Seidel K, et al. Sox2 marks epithelial competence to generate teeth in mammals and reptiles. *Development.* 2013 Apr;140(7):1424-32

Kang Y, Wang F, Feng J, et al. Knockdown of CD146 reduces the migration and proliferation of human endothelial cells. *Cell Res.* 2006 Mar;16(3):313-8.

Kapur NK, Morine KJ, Letarte M. Endoglin: a critical mediator of cardiovascular health. *Vasc Health Risk Manag.* 2013;9:195-206. doi: 10.2147/VHRM.S29144. Epub 2013 May 6.

Karamzadeh R, Eslaminejad MB, Aflatoonian R. Isolation, characterization and comparative differentiation of human dental pulp stem cells derived from permanent teeth by using two different methods. *J Vis Exp.* 2012 Nov 24;(69). pii: 4372. doi: 10.3791/4372.

Karaöz, E., Doğan, B., Aksoy, A. et al. Isolation and in vitro characterisation of dental pulp stem cells from natal teeth. *Histochem Cell Biol.* 2010;133: 95-112.

Karp JM, Leng Teo GS. Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. *Cell Stem Cell.* 2009;4:206-16.

Kas-Deelen AM, Bakker WW, Olinga P, Visser J, de Maar EF, van Son WJ, The TH, Harmsen MC. Cytomegalovirus infection increases the expression and activity of ecto-ATPase (CD39) and ecto-5'nucleotidase (CD73) on endothelial cells. *FEBS Lett.* 2001 Feb 23;491(1-2):21-5.

Katchburian E, Arana V. *Histologia e embriologia oral.* São Paulo: Panamericana; 1999.

Kémoun P, Laurencin-Dalicieux S, Rue J, et al. Localization of STRO-1, BMP-2/-3/-7, BMP receptors and phosphorylated Smad-1 during the formation of mouse periodontium. *Tissue Cell.* 2007;39:257-66.

Keränen SV, Kettunen P, Aberg T, et al. Gene expression patterns associated with suppression of odontogenesis in mouse and vole diastema regions. *Dev Genes Evol.* 1999

Aug;209(8):495-506.

Kerkis I, Kerkis A, Dozortsev D, et al. Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. *Cells Tissues Organs*. 2006;184(3-4):105-16.

Klein AM, Simons BD. Universal patterns of stem cell fate in cycling adult tissues. *Development*. 2011 Aug;138(15):3103-11

Klein OD, Minowada G, Peterkova R, et al. Sprouty genes control diastema tooth development via bidirectional antagonism of epithelial-mesenchymal FGF signaling. *Dev Cell*. 2006 Aug;11(2):181-90.

Kolf CM, Cho E, Tuan RS. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res Ther*. 2007; 9(1):204-14.

Kouroupis D, Churchman SM, English A, et al. Assessment of umbilical cord tissue as a source of mesenchymal stem cell/endothelial cell mixtures for bone regeneration. *Regen Med*. 2013 Sep;8(5):569-81.

Krueger M, Bechmann I. CNS pericytes: concepts, misconceptions, and a way out. *Glia*. 2010 Jan 1;58(1):1-10

Kuroda R, Ishida K, Matsumoto T, et al. Treatment of a full-thickness articular cartilage defect in the femoral condyle of an athlete with autologous bone-marrow stromal cells. *Osteoarthritis Cartilage*. 2007;15:226–31.

Lapthanasupkul P, Feng J, Mantesso A, et al. Ring1a/b polycomb proteins regulate the mesenchymal stem cell niche in continuously growing incisors. *Development*. 2012;367:140-53.

Latsinik NV, Luria EA, Friedenstein AJ, et al. Colony-forming cells in organ cultures of embryonal liver. *J Cell Physiol*. 1970;75:163-5.

Lee BK, Choi SJ, Mack D, et al. Isolation of mesenchymal stem cells from the mandibular marrow aspirates. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2011 Dec;112(6):e86-93.

Lee DH, Joo SD, Han SB, et al. Isolation and expansion of synovial CD34(-)CD44(+)CD90(+)

mesenchymal stem cells: comparison of an enzymatic method and a direct explant technique. *Connect Tissue Res.* 2011 Jun;52(3):226-34.

Lee WS, Jain MK, Arkonac BM, et al. Thy-1, a novel marker for angiogenesis upregulated by inflammatory cytokines. *Circ Res.* 1998 May 4;82(8):845-51.

Lehmann JM, Riethmuler G, Johnson JP. MUC18, a marker of tumor progression in human melanoma, shows sequence similarity to the neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989;86:9891-5.

Li Z, Jiang CM, An S, et al. Immunomodulatory properties of dental tissue-derived mesenchymal stem cells. *Oral Dis.* 2013 Feb 15. doi: 10.1111/odi.12086. [Epub ahead of print]

Liao J, Al Shahrani M, Al-Habib M, et al. Cells isolated from inflamed periapical tissue express mesenchymal stem cell markers and are highly osteogenic. *J Endod.* 2011 Sep;37(9):1217-24.

Lin CS, Xin ZC, Dai J, Lue TF. Commonly used mesenchymal stem cell markers and tracking labels: Limitations and challenges. *Histol Histopathol.* 2013 Sep;28(9):1109-16.

Lin G, Liu G, Banie L, et al. Tissue distribution of mesenchymal stem cell marker Stro-1. *Stem Cells Dev.* 2011 Oct;20(10):1747-52.

Liu Y, Shu XZ, Prestwich GD. Osteochondral defect repair with autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells in an injectable, in situ, cross-linked synthetic extracellular matrix. *Tissue Eng.* 2006;12(12):3405-16.

Liu L, Wei X, Ling J, Wu L, Xiao Y. Expression pattern of Oct-4, Sox2, and c-Myc in the primary culture of human dental pulp derived cells. *J Endod.* 2011 Apr;37(4):466-72.

Lorenz K, Sicker M, Schmelzer E, et al. Multilineage differentiation potential of human dermal skin-derived fibroblasts. *Exp Dermatol.* 2008 Nov;17(11):925-32.

Lovschall H, Mitsiadis TA, Poulsen K, et al. Coexpression of Notch3 and Rgs5 in the pericyte-vascular smooth muscle cell axis in response to pulp injury. *Int J Dev Biol.* 2007;51:715-21.

Lungová V, Radlanski RJ, Tucker AS, et al. Tooth-bone morphogenesis during postnatal

stages of mouse first molar development. *J Anat.* 2011 Jun;218(6):699-716

Luria EA, Owen ME, Friedenstein AJ, et al. Bone formation in organ cultures of bone marrow. *Cell Tissue Res.* 1987;248:449-54.

Luukko K, Saarma M, Thesleff I. Neurturin mRNA expression suggests roles in trigeminal innervation of the first branchial arch and in tooth formation. *Dev Dyn.* 1998 Oct;213(2):207-19.

Mafi P, Hindocha S, Mafi R, et al. Adult mesenchymal stem cells and cell surface characterization- a systematic review of the literature. *Open Orthop J.* 2011;5(Suppl 2):253-60.

Maienschein V, Zimmermann H. Immunocytochemical localization of ecto-5'-nucleotidase in cultures of cerebellar granule cells. *Neuroscience.* 1996 Jan;70(2):429-38.

Mallon BS, Shick HE, Kidd GJ, et al. Proteolipid promoter activity distinguishes two populations of NG2-positive cells throughout neonatal cortical development. *J Neurosci.* 2002;22:876-85.

Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1981;78:7634-8.

Martinez EF, Araújo VC. In vitro immunoexpression of extracellular matrix proteins in dental pulpal and gingival human fibroblasts. *Int Endod J.* 2004 Nov;37(11):749-55.

Martinez EF, Araújo VC, Sousa SO, et al. TGF-beta1 enhances the expression of alpha-smooth muscle actin in cultured human pulpal fibroblasts: immunochemical and ultrastructural analyses. *J Endod.* 2007 Nov;33(11):1313-8.

Martin-Rendon E, Watt SM. Stem cell plasticity. *Br J Haematol.* 2003;122(6):877-91.

Masui S, Nakatake Y, Toyooka Y, et al. Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat Cell Biol.* 2007 Jun;9(6):625-35.

Matsubara T, Suardita K, Ishii M, et al. Alveolar bone marrow as a cell source for regenerative medicine: differences between alveolar and iliac bone marrow stromal cells. *J Bone Miner Res.* 2005;20(3):399-409.

Maucksch C, Jones KS, Connor B. Concise review: the involvement of SOX2 in direct reprogramming of induced neural stem/precursor cells. *Stem Cells Transl Med.* 2013 Aug;2(8):579-83.

Maximow A. Der Lymphozyt als gemeinsame Stammzelle der verschiedenen Blutelemente in der embryonalen Entwicklung und im postfetalen Leben der Säugetiere. (Demonstrationsvortrag, gehalten in der ausserordentlichen Sitzung der Berliner Hämatologischen Gesellschaft am 1. Juni 1909). *Folia Haematol.* 1909;8:125-34.

Maxson S, Lopez EA, Yoo D, et al. Concise review: role of mesenchymal stem cells in wound repair. *Stem Cells Transl Med.* 2012 Feb;1(2):142-9.

Meirelles LS, Caplan AI, Nardi NB. In Search of the In Vivo Identity of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells* 2008;26: 2287-99.

Meirelles LS, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci.* 2006;119:2204-13.

Mifflin RC, Pinchuk IV, Saada JI, et al. Intestinal myofibroblasts: targets for stem cell therapy. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2011 May;300(5):G684-96.

Miletich I, Sharpe PT. Normal and abnormal dental development. *Hum Mol Genet.* 2003;12 (Spec No 1):R69-73.

Miletich I, Cobourne MT, Abdeen M, et al. Expression of the Hedgehog antagonists Rab23 and Slimb/betaTrCP during mouse tooth development. *Arch Oral Biol.* 2005 Feb;50(2):147-51.

Mitsiadis TA, Barrandon O, Rochat A, et al. Stem cell niches in mammals. *Exp Cell Res.* 2007 Oct 1;313(16):3377-85.

Mitsiadis TA, Feki A, Papaccio G, et al. Dental pulp stem cells, niches, and notch signaling in tooth injury. *Adv Dent Res.* 2011;23:275-9.

Mitterberger MC, Lechner S, Mattesich M, et al. DLK1(PREF1) is a negative regulator of adipogenesis in CD105⁺/CD90⁺/CD34⁺/CD31⁻/FABP4⁻ adipose-derived stromal cells from subcutaneous abdominal fat pats of adult women. *Stem Cell Res.* 2012 Jul;9(1):35-48.

Miura M, Gronthos S, Zhao M, et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(10):5807-12.

Mizuno H, Tobita M, Uysal AC. Concise review: Adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine. *Stem Cells*. 2012 May;30(5):804-10. doi: 10.1002/stem.1076.

Moore KA, Lemischka IR. Stem cells and their niches. *Science*. 2006 Mar 31;311(5769):1880-5

Morsczeck C. Gene expression of runx2, Osterix, c-fos, DLX-3, DLX-5, and MSX-2 in dental follicle cells during osteogenic differentiation in vitro. *Calcif Tissue Int*. 2006;78(2):98-102.

Morsczeck C, Götz W, Schierholz J, et al. Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth.. *Matrix Biol*. 2005;24(2):155-65.

Nakamura Y, Muguruma Y, Yahata T, et al. Expression of CD90 on keratinocyte stem/progenitor cells. *Br J Dermatol*. 2006;154:1062-70.

Nakakura-Ohshima K, Watanabe J, Kenmotsu S, et al. Possible role of immunocompetent cells and the expression of heat shock protein-25 in the process of pulpal regeneration after tooth injury in rat molars. *J Electron Microsc (Tokyo)*. 2003;52:581–91

Nanci A, Bosshardt DD. Structure of periodontal tissues in health and disease. *Periodontol* 2000. 2006;40:11–28.

Nanci A. Ten Cate's oral histology: development, structure, and function. St. Louis: Mosby; 2007.

Narravula S, Lennon PF, Mueller BU, et al. Regulation of endothelial CD73 by adenosine: paracrine pathway for enhanced endothelial barrier function. *J Immunol*. 2000 Nov 1;165(9):5262-8.

Nassiri F, Cusimano MD, Scheithauer BW, et al. Endoglin (CD105): a review of its role in angiogenesis and tumor diagnosis, progression and therapy. *Anticancer Res*. 2011 Jun;31(6):2283-90.

Nemoto E, Gotoh K, Tsuchiya M, et al. Extracellular ATP inhibits IL-1-induced MMP-1 expression through the action of CD39/nucleotidase triphosphate dephosphorylase-1 on

human gingival fibroblasts. *Int Immunopharmacol*. 2013 Aug 11;17(3):513-518

Ng F, Boucher S, Koh S, et al. PDGF, TGF-beta, and FGF signaling is important for differentiation and growth of mesenchymal stem cells (MSCs): transcriptional profiling can identify markers and signaling pathways important in differentiation of MSCs into adipogenic, chondrogenic, and osteogenic lineages. *Blood*. 2008 Jul 15;112(2):295-307.

Nombela-Arrieta C, Ritz J, Silberstein LE. The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011 Feb;12(2):126-31.

Ode A, Schoon J, Kurtz A, et al. CD73/5'-ecto-nucleotidase acts as a regulatory factor in osteo-/chondrogenic differentiation of mechanically stimulated mesenchymal stromal cells. *Eur Cell Mater*. 2013 Jan 8;25:37-47.

Ohazama A, Blackburn J, Porntaveetus T, et al. A role for suppressed incisor cuspal morphogenesis in the evolution of mammalian heterodont dentition. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010 Jan 5;107(1):92-7.

Ohazama A, Haycraft CJ, Seppala M, et al. Primary cilia regulate Shh activity in the control of molar tooth number. *Development*. 2009 Mar 1;36(6):897-903.

Ohshima H, Nakakura-Ohshima K, Takeuchi K, et al. Pulpal regeneration after cavity preparation, with special reference to close spatio-relationships between odontoblasts and immunocompetent cells. *Microsc Res Tech*. 2003;60:483-90.

Ohshima H, Nakasone N, Hashimoto E, et al. The eternal tooth germ is formed at the apical end of continuously growing teeth. *Arch Oral Biol*. 2005 Feb;50(2):153-7.

Okubo T, Clark C, Hogan BL. Cell lineage mapping of taste bud cells and keratinocytes in the mouse tongue and soft palate. *Stem Cells*. 2009 Feb;27(2):442-50.

Okubo T, Pevny LH, Hogan BL. Sox2 is required for development of taste bud sensory cells. *Genes Dev*. 2006 Oct 1;20(19):2654-9.

Orbay H, Tobita M, Mizuno H. Mesenchymal stem cells isolated from adipose and other tissues: basic biological properties and clinical applications. *Stem Cells Int*. 2012;2012:461718. doi: 10.1155/2012/461718.

Oshima H, Rochat A, Kedzia C, et al. Morphogenesis and renewal of hair follicles from adult multipotent stem cells. *Cell*. 2001;104:233–45.

Owen M, Friedenstein AJ. Stromal stem cells: marrow derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp*. 1988;136:42-60.

Park BW, Kang EJ, Byun JH, et al. In vitro and in vivo osteogenesis of human mesenchymal stem cells derived from skin, bone marrow and dental follicle tissues. *Differentiation*. 2012 Jun;83(5):249-59.

Park JY, Jeon HJ, Kim TY, et al. Comparative analysis of mesenchymal stem cell surface marker expression for human dental mesenchymal stem cells. *Regen Med*. 2013 Jul;8(4):453-66.

Que J, Okubo T, Goldenring JR, et al. Multiple dose-dependent roles for Sox2 in the patterning and differentiation of anterior foregut endoderm. *Development*. 2007 Jul;134(13):2521-31.

Pece-Barbara N, Vera S, Kathirkamathamby K, et al. Endoglin null endothelial cells proliferate faster and are more responsive to transforming growth factor beta1 with higher affinity receptors and an activated Alk1 pathway. *J Biol Chem*. 2005 Jul 29;280(30):27800-8.

Peister A, Mellad JA, Larson BL, et al. Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. *Blood*. 2004;103:1662-8.

Peola S, Borriore P, Matera L, Malavasi F, Pileri A, Massaia M. Selective induction of CD73 expression in human lymphocytes by CD38 ligation: a novel pathway linking signal transducers with ecto-enzyme activities. *J Immunol*. 1996 Nov 15;157(10):4354-62.

Pierantozzi E, Gava B, Manini I, et al. Pluripotency regulators in human mesenchymal stem cells: expression of NANOG but not of OCT-4 and SOX-2. *Stem Cells Dev*. 2011 May;20(5):915-23.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284:143-7.

Pivoriunas A, Surovas A, Borutinskaite V, et al. 2010. Proteomic analysis of stromal cells derived from the dental pulp of human exfoliated deciduous teeth. *Stem Cells & Dev*. 2010;19:1081-93.

Naveh GR, Shahar R, Brumfeld V, et al. Tooth movements are guided by specific contact areas between the tooth root and the jaw bone: A dynamic 3D microCT study of the rat molar. *J Structural Biol.* 2012;177(2):477–83.

Ramirez JM, Gerbal-Chaloin S, Milhavet O, et al. Brief report: benchmarking human pluripotent stem cell markers during differentiation into the three germ layers unveils a striking heterogeneity: all markers are not equal. *Stem Cells.* 2011 Sep;29(9):1469-74.

Reyes M, Lund T, Lenvik T, et al. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood.* 2001;98:2615-25.

Reynolds MA, Aichelmann-Reidy ME, Branch-Mays GL. Regeneration of periodontal tissue: bone replacement grafts. *Dent Clin North Am.* 2010;54(1):55-71.

Rizk A, Rabie AB. Human dental pulp stem cells expressing transforming growth factor β 3 transgene for cartilage-like tissue engineering. *Cytotherapy.* 2013 Jun;15(6):712-25.

Rivard A, Fabre J-E, Silver Marcy, et al. Age-Dependent impairment of angiogenesis. *Circulation.* 1999; 99:111-20.

Roberts WE, Wood HB, Chambers DW, et al. Vascularly oriented differentiation gradient of osteoblast precursor cells in rat periodontal ligament: implications for osteoblast histogenesis and periodontal bone loss. *J Periodontal Res.* 1987 Nov;22(6):461-7.

Roche S, Richard MJ, Favrot MC. Oct-4, Rex-1, and Gata-4 expression in human MSC increase the differentiation efficiency but not hTERT expression. *J Cell Biochem.* 2007 May 15;101(2):271-80.

Rodrigues HG, Marangoni P, Šumbera R, et al. Continuous dental replacement in a hyper-chisel tooth digging rodent. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011 Oct 18;108(42):17355–9.

Roobrouck VD, Ulloa-Montoya F, Verfaillie CM. Self-renewal and differentiation capacity of young and aged stem cells. *Exp Cell Res.* 2008 Jun 10;314(9):1937-44.

Ruch JV. Odontoblast commitment and differentiation. *Biochem Cell Biol.* 1998;76(6):923-38.

Russell KC, Phinney DG, Lacey MR, et al. In vitro high-capacity assay to quantify the clonal

heterogeneity in trilineage potential of mesenchymal stem cells reveals a complex hierarchy of lineage commitment. *Stem Cells*. 2010;28:788-98.

Saeed H, Iqtedar M. Stem cell function and maintenance - ends that matter: Role of telomeres and telomerase. *J Biosci*. 2013 Sep;38(3):641-9.

Sasikala M, Surya P, Radhika G, et al. Identification of circulating CD90 CD73 cells in cirrhosis of liver. *World J Stem Cells*. 2011 Jul 26;3(7):63-9.

Sarugaser R, Hanoun L, Keating A, et al. Human mesenchymal stem cells self-renew and differentiate according to a deterministic hierarchy. *PLoS ONE*. 2009;4(8):e6498. doi:10.1371/journal.pone.0006498

Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, et al. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell*. 2007 Oct 19;131(2):324-36.

Scadden DT. The stem-cell niche as an entity of action. *Nature*. 2006 Jun 29;441:1075-9.

Schipani E, Kronenberg HM. Adult mesenchymal stem cells. [Cambridge]: StemBook; 2009. (The Stem Cell Research Community, StemBook).doi/10.3824/stembook.1.38.1.

Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and hematopoietic stem cell. *Blood Cells*. 1978;4:7-25.

Schwab KE, Gargett CE. Co-expression of two perivascular cell markers isolates mesenchymal stem-like cells from human endometrium. *Hum Reprod*. 2007 Nov;22(11):2903-11.

Seidel K, Ahn CP, Lyons D, et al. Hedgehog signaling regulates the generation of ameloblast progenitors in the continuously growing mouse incisor. *Development*. 2010;137(22):3753-61.

Seo BM, Miura M, Gronthos S, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*. 2004;364:149-55.

Seo BM, Sonoyama W, Yamaza T, et al. SHED repair critical-size calvarial defects in mice. *Oral Dis*. 2009;15(4):428-34.

Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone

marrow and dental pulp. *J Bone Mineral Res.* 2003;18(4):696-704.

Shi S, Robey PG, Gronthos S. Comparison of human dental pulp and bone marrow stromal stem cells by cDNA microarray analysis. *Bone.* 2001;29(6):532-9.

Shi S, Bartold PM, Miura M, et al. The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. *Orthod Craniofac Res.* 2005 Aug;8(3):191-9.

Shi Y, Su J, Roberts AI, et al. How mesenchymal stem cells interact with tissue immune responses. *Trends Immunol.* 2012 Mar;33(3):136–43.

Shih IM. The role of CD146 (Mel-CAM) in biology and pathology. *J Pathol.* 1999 Sep;189(1):4-11.

Shimono M, Ishikawa T, Ishikawa H, et al. Regulatory mechanisms of periodontal regeneration. *Microsc Res Tech.* 2003;60(5):491-502.

Sloan AJ, Waddington RJ. Dental pulp stem cells: what, where, how? *Int J Paediatr Dent.* 2009 Jan;19(1):61-70.

Simmons PJ, Torok-Storb B. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood.* 1991;78:55–62.

Smith AJ. Pulpal responses to caries and dental repair. *Caries Res.* 2002;36:223-32.

Smith AJ, Lesot H. Induction and regulation of crown dentinogenesis: embryonic events as a template for dental tissue repair. *Crit. Rev Oral Biol Med.* 2001; 12:425-37.

Sonoyama W, Liu Y, Fang D, et al. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PLoS One.* 2006 Dec 20;1:e79.

Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, et al. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *J Endod.* 2008;34(2):166-71.

Sorrell JM, Caplan AI. Topical delivery of mesenchymal stem cells and their function in wounds. *Stem Cell Res Ther.* 2010;1(4):30.

Strohmeier GR, Lencer WI, Patapoff TW, et al. Surface expression, polarization, and functional significance of CD73 in human intestinal epithelia. *J Clin Invest*. 1997 Jun 1;99(11):2588-601.

Sumikuma T, Shimazaki C, Inaba T, et al. CD34+/CD90+ cells infused best predict late haematopoietic reconstitution following autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Br J Haematol*. 2002 Apr;117(1):238-44.

Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126:663-6.

Tang L, Li N, Xie H, et al. Characterization of mesenchymal stem cells from human normal and hyperplastic gingiva. *J Cell Physiol*. 2011 Mar;226(3):832-42.

Taylor G, Lehrer MS, Jensen PJ, et al. Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis. *Cell*. 2000;102:451-61.

Ten Cate R. Oral histology: development, structure, and function. St. Louis: Mosby-Year Book; 1998.

Thesleff I. Developmental biology and building a tooth. *Quintessence Int*. 2003;34(8):613-20.

Thesleff I, Tummers M. Tooth organogenesis and regeneration. *StemBook* [Internet]. Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute; 2008-.2009 [cited 2013]. Available from: <http://www.stembook.org/node/551>.

Thesleff I, Sharpe P. Signalling networks regulating dental development. *Mech Dev*. 1997 Oct;67(2):111-23.

Thompson LF, Eltzschig HK, Ibla JC, et al. Crucial role for ecto-5'-nucleotidase (CD73) in vascular leakage during hypoxia. *J Exp Med*. 2004 Dec 6;200(11):1395-405.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998;282:1145-7.

Till JE, McCulloch EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res*. 1961;14:213-22.

Tomic S, Djokic J, Vasilijic S, et al. Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells derived from dental pulp and dental follicle are susceptible to activation by toll-like receptor agonists. *Stem Cells Dev.* 2011 Apr;20(4):695-708.

Tormin A, Li O, Brune JC, Walsh S, et al. CD146 expression on primary nonhematopoietic bone marrow stem cells is correlated with in situ localization. *Blood.* 2011;117(19):5067-77.

Treuting PM, Dintzis S, Liggitt D, et al. Comparative anatomy and histology: a mouse and human atlas. 1a. ed. Londres: Elsevier; 2012.

Trotter J, Karraam K, Nishiyama A. NG2 cells: Properties, progeny and origin. *Brain Res Rev.* 2010 May;63(1-2):72-82.

Tucker A, Sharpe P. The cutting-edge of mammalian development; how the embryo makes teeth. *Nat Rev Genet.* 2004;5:499-508.

Tuli R, Tuli S, Nandi S, et al. Characterization of multipotential mesenchymal progenitor cells derived from human trabecular bone. *Stem Cells.* 2003;21:681-93.

Tummers M, Thesleff I. Observations on continuously growing roots of the sloth and the K14-Eda transgenic mice indicate that epithelial stem cells can give rise to both the ameloblast and root epithelium cell line age creating distinct toothpatterns. *Evol Dev.* 2008;10:187-95.

Tummers M, Thesleff I. Root or crown: a developmental choice orchestrated by the differential regulation of the epithelial stem cell niche in the tooth of two rodent species. *Development.* 2003;130:1049-57.

Tummers M, Yamashiro T, Thesleff, I. Modulation of epithelial cell fate of the root in vitro. *J Dent Res.* 2007;86:1063-7.

Uccelli A, Moretta L, Pistola V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2008;8:726-36.

Voog J, Jones DL. Stem cells and the niche: a dynamic duo. *Cell Stem Cell.* 2010 Feb 5;6(2):103-15.

Wagner W, Ho AD, Zenke M. Different facets of aging in human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part B Rev*. 2010 Aug;16(4):445-53.

Wakitani S, Imoto K, Yamamoto T, et al. Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees. *Osteoarthr Cartil*. 2002;10(3):199-206.

Wakitani S, Mitsuoka T, Nakamura N, et al. Autologous bone marrow stromal cell transplantation for repair of full-thickness articular cartilage defects in human patellae: two case reports. *Cell Transplant*. 2004;13:595–600.

Wakitani S, Nawata M, Tensho K, et al. Repair of articular cartilage defects in the patello-femoral joint with autologous bone marrow mesenchymal cell transplantation: three case reports involving nine defects in five knees. *J Tissue Eng Regen Med*. 2007;1:74–9.

Wang L, Gaigalas AK, Yan M. Quantitative fluorescence measurements with multicolor flow cytometry. *Methods Mol Biol*. 2011;699:53-65.

Wang S, Qu X, Zhao RC. Clinical applications of mesenchymal stem cells. *J Hematol Oncol*. 2012a Apr 30;5:19.

Wang WJ, Zhao YM, Lin BC, et al. Identification of multipotent stem cells from adult dog periodontal ligament. *Eur J Oral Sci*. 2012b Aug;120(4):303-10.

Wang XP, Suomalainen M, Felszeghy S, et al. An integrated gene regulatory network controls stem cell proliferation in teeth. *PLoS Biol*. 2007 Jun;5(6):e159.

Wang Z, Yan X. CD146, a multi-functional molecule beyond adhesion. *Cancer Lett*. 2013 Apr 28;330(2):150-62. doi: 10.1016/j.canlet.2012.11.049. Epub 2012 Dec 21.

Wen HC, Kao C, Hsu RC, et al. Thy-1-induced migration inhibition in vascular endothelial cells through reducing the RhoA activity. *PLoS One*. 2013 Apr 17;8(4):e61506.

Whetton AD, Graham GJ. Homing and mobilization in the stem cell niche. *Trends Cell Biol*. 1999;9:233–38.

Willingham MC. Fluorescence labeling of intracellular antigens of attached or suspended tissue-culture cells. *Methods Mol Biol*. 2010;588:153-64.

Wise GE, King GJ. Mechanisms of tooth eruption and orthodontic tooth movement. *J Dent Res*. 2008 May;87(5):414-34.

Wisniewski D, Affer M, Willshire J, et al. Further phenotypic characterization of the primitive lineage- CD34⁺CD38⁻CD90⁺CD45RA⁻ hematopoietic stem cell/progenitor cell sub-population isolated from cord blood, mobilized peripheral blood and patients with chronic myelogenous leukemia. *Blood Cancer J*. 2011 Sep;1(9):e36.

Xu J, Wang W, Kapila Y, et al. Multiple differentiation capacity of STRO-1⁺/CD146⁺ PDL mesenchymal progenitor cells. *Stem Cells Dev*. 2009 Apr;18(3):487-96.

Yadlapalli S, Yamashita YM. Chromosome-specific nonrandom sister chromatid segregation during stem-cell division. *Nature*. 2013 Jun 13;498(7453):251-4.

Yamashita Y, Hooker SW, Jiang H, et al. CD73 expression and fyn-dependent signaling on murine lymphocytes. *Eur J Immunol*. 1998 Oct;28(10):2981-90

Yañez R, Lamana ML, García-Castro J, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease. *Stem Cells*. 2006;24:2582–91.

Yang L, Kobie JJ, Mosmann TR. CD73 and Ly-6A/E distinguish in vivo primed but uncommitted mouse CD4 T cells from type 1 or type 2 effector cells. *J Immunol*. 2005 Nov 15;175(10):6458-64.

Yokohama-Tamaki T, Ohshima H, Fujiwara N, et al. Cessation of Fgf10 signaling, resulting in a defective dental epithelial stem cell compartment, leads to the transition from crown to root formation. *Development*. 2006 Apr;133(7):1359-66.

Yoo KH, Jang IK, Lee MW, et al. Comparison of immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells derived from adult human tissues. *Cell Immunol*. 2009;259:150-6.

Yoshihara N, Yoshihara K, Ohkura N, et al. Immunohistochemical analysis of two stem cell markers of α -smooth muscle actin and STRO-1 during wound healing of human dental pulp. *Histochem Cell Biol*. 2012 Oct;138(4):583-92.

Young AT, Lakey JR, Murray AG, Mullen JC, Moore RB. In vitro senescence occurring in normal human endothelial cells can be rescued by ectopic telomerase activity. *Transplant Proc*. 2003 Nov;35(7):2483-5.

Zannettino AC, Paton S, Arthur A, et al. Multipotential human adipose-derived stromal stem cells exhibit a perivascular phenotype in vitro and in vivo. *J Cell Physiol.* 2008 Feb;214(2):413-21.

Zannettino AC, Paton S, Kortessidis A, et al. Human multipotential mesenchymal/stromal stem cells are derived from a discrete subpopulation of STRO-1^{bright}/CD34⁺/CD45⁻/glycophorin-A⁻ bone marrow cells. *Haematologica.* 2007 Dec;92(12):1707-8.

Zhang L, Yuan G, Liu H, Lin H, Wan C, Chen Z. Expression pattern of Sox2 during mouse tooth development. *Gene Expr Patterns.* 2012 Aug-Sep;12(7-8):273-81.

Zhang Q, Shi S, Liu Y, et al. Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Gingiva Are Capable of Immunomodulatory Functions and Ameliorate Inflammation-Related Tissue Destruction in Experimental Colitis. *J Immunol.* 2009 Dec 15;183(12):7787–98 1.

Zhang YD, Chen Z, Song YQ, Liu C, Chen YP. Making a tooth: growth factors, transcription factors, and stem cells. *Cell Res.* 2005 May;15(5):301-16

Zhao Y, Wang L, Jin Y, et al. Fas ligand regulates the immunomodulatory properties of dental pulp stem cells. *J Dent Res.* 2012 Oct; 91(10):948-54.

Zhu B, Murthy SK. Stem Cell Separation Technologies. *Curr Opin Chem Eng.* 2013 Feb 1;2(1):3-7.

Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell.* 2002;13:4279-95.

ANEXO A- Aprovação do Comitê de Ética

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

PARECER DE APROVAÇÃO
PROTOCOLO nº 01/09

Com base em parecer da relator, o Comitê de Ética em Pesquisa – Subcomissão de Bioética de Animais da FOU SP, **APROVOU** o protocolo de pesquisa "Isolamento e caracterização de linhagem de células-tronco retiradas da raspado de osso alveolar", de responsabilidade da pesquisadora **Juliana Noguti**, sob orientação do Professora Doutora **Andrea Mantesso**.

Cabe ao responsável enviar relatórios referentes ao andamento da pesquisa após 06 (seis) meses e 01(um) ano desta data, bem como cópia do trabalho em "cd" ou "disquete" ao finalizá-lo, conforme legislação vigente.

São Paulo, 02 de março de 2009

Prof. Dr. CELSO LÚCIO CALDEIRA
PRESIDENTE DA SUBCOMISSÃO DE BIOÉTICA DE ANIMAIS DA FOU SP

Prof. Dr. Celso Lúcio Caldera, 2227 – Cidade Universitária – Aracaju de Itaipu Paulista – FOU SP 13500-000
São Paulo – SP – Distrito Telefônico: (011) 3091-1000/1001-2011/3091-1002 – Correo 01111-4001/1001
www.fou.sp.br

ANEXO B – Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE)

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Odontologia

Programa de Pós-Graduação em Odontologia
Área de Concentração em Patologia Bucal

Título do Estudo: Isolamento e caracterização de linhagem de célulastronco retiradas de raspado de osso alveolar.

Pesquisador(es) responsável(is): Profa. Dra. Andrea Mantesso Pobocik

Instituição/ Departamento: Departamento de Estomatologia da faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Local da coleta de material: Clínica de Cirurgia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo- USP.

Prezado(a) Senhor(a):

- Você está sendo convidado(a) a participar desta pesquisa de forma totalmente **voluntária**.
- Antes de concordar em participar desta pesquisa, é muito importante que você compreenda as informações e instruções contidas neste documento.
- Os pesquisadores deverão responder todas as suas dúvidas antes que você decida participar.
- Você tem o direito de **desistir** de participar da pesquisa a qualquer momento, sem nenhuma penalidade.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Odontologia

Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Área de Concentração em Patologia Bucal

Objetivos do Estudo: O objetivo deste estudo é pesquisar e estudar as células-tronco na região em que está localizado seu dente.

Procedimentos: Sua participação nesta pesquisa é voluntária e consistirá da sua aprovação para a retirada de material proveniente da raspagem de seu osso no momento da extração do(s) dentes indicados. Em nenhum momento haverá, por parte dos pesquisadores, qualquer tipo de remuneração ou ajuda financeira para participar desta pesquisa. É importante lembrar que o pesquisador responsável estará acompanhando você durante e após a evolução do procedimento. Durante a cirurgia, a raspagem de seu osso é um procedimento normal em remoções de dentes, é sempre realizada e a única diferença é que vamos crescer as células no laboratório ao invés de descartar esse material. É bom lembrar que seus dentes estão sendo extraídos por indicação diversa de acordo com as orientações do seu cirurgião-dentista e que você estará anestesiado e, portanto, não sentirá dor alguma durante o procedimento.

Benefícios: Os benefícios da pesquisa estão relacionados com o avanço da Odontologia e para futuras pesquisas que poderão trazer descobertas e benefícios para inúmeras patologias e disfunções do organismo humano, no entanto, não trarão nenhum benefício direto para você.

Riscos: Como se trata de um procedimento cirúrgico, o senhor(a) como paciente deve estar ciente dos riscos que serão mencionados pelo seu cirurgião dentista antes do procedimento. Após o procedimento, o senhor(a) deve tomar os devidos cuidados e seguir as orientações do seu dentista. A pesquisa em questão oferece os mesmos riscos inerentes a um procedimento cirúrgico que já seria realizado, mas não acrescenta nenhum outro risco além dos que já existiam previamente. A anatomia e integridade da superfície do osso alveolar serão totalmente preservadas. O material será utilizado somente para esta pesquisa e depois será descartado em lixo apropriado.

Sigilo: O material retirado não será em hipótese alguma identificado com o seu nome e todas as informações serão confidenciais, mas você pode ser informado de seus resultados se quiser. Você não será identificado em nenhum momento, mesmo quando os resultados desta pesquisa forem divulgados sob qualquer forma. Tenha ciência de que sua identificação só será constada junto a este termo.

Telefone para contato: qualquer questão, dúvida, esclarecimento ou reclamação sobre aspectos éticos desta pesquisa, favor entrar em contato com comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo localizado na Av. Lineu Prestes, 2227, Butantã.

CEP: 050008-000. São Paulo/SP pelo telefone: 3091-7960, ou pela internet: <http://www.fo.usp.br/portal/cep>.

Este termo está sendo emitido em duas vias de forma que uma cópia ficará em seu poder.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Odontologia
 Programa de Pós-Graduação em Odontologia
 Área de Concentração em Patologia Bucal

Estando certo de que o Sr(a) leu todo o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e não tem nenhuma dúvida do mesmo, peço-lhe agora para que leia e assine a seguinte declaração:

DECLARAÇÃO:

Eu _____ declaro que, tendo lido o termo de informação e consentimento para a pesquisa clínica, concordo em participar voluntariamente deste estudo e autorizo a utilização dos dados obtidos pelos pesquisadores para a publicação em revistas científicas e apresentações em Congressos. Declaro ainda ter recebido uma cópia do termo de informação e autorização para participar da pesquisa e estar ciente de que a minha participação pode ser interrompida a qualquer momento sem que isso acarrete em nenhuma penalidade para mim.

 Assinatura do Paciente/Responsável legal

**DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL
 LEGAL:**

Nome: _____
 Identidade no: _____
 Data de Nascimento: ____/____/____ Sexo: () M () F
 Endereço: _____
 Bairro: _____ Cidade: _____ CEP: _____
 Telefones: _____

Orientadora: Profa. Dra. Andrea Matesso Pobocik
 RG: 20522258-4 N° USP: 148158

Pesquisadora: Dra. Lucyene Miguita Luiz
 RG: 30436962-7 N° USP: 7109212

ANEXO C – Localização de células de ciclagem lenta e capazes de mobilização via sistema circulatório encontradas em dentes formados no rim de camundongos hospedeiros após transplante de primórdios de mandíbula

Primórdios de mandíbulas de camundongos CD1 (*wild type*) na idade embrionária E10.5 ou E14.5 foram transplantadas sob cápsula renal de camundongos pericitos (*pericytes*) que haviam recebido o nucleosídeo (IdU) por longo período para detecção de células de ciclagem lenta. Após 3 ou 2 semanas respectivamente, esses animais foram eutanaziados, as mandíbulas foram dissecadas, os dentes formados foram isolados e processados para as análises histológicas, imunoistoquímica e coloração citoquímica.

Os camundongos pericitos são transgênicos e quando na idade adulta é possível identificar seus pericitos através da detecção da atividade da enzima β galactosidase (coloração por LacZ). Como esses animais receberam o nucleosídeo, as células de ciclagem lenta também puderam ser identificadas através da reação imunoistoquímica, utilizando o anticorpo anti-IdU.

É importante salientar que em virtude dos camundongos pericitos serem utilizados como hospedeiros das mandíbulas doadas pelos camundongos CD1, as células LacZ⁺ e as células IdU⁺ que forem encontradas nos dentes formados dentro das mandíbulas são obrigatoriamente provenientes dos hospedeiros e portanto, tiveram que migrar através do sistema circulatório.

A, a região do ligamento periodontal dente molar formado no rim de camundongo mostra células co-expressando os dois marcadores utilizados (IdU+/LacZ+) e portanto, são células que migraram do hospedeiro e são de ciclagem lenta ao mesmo tempo. Nota-se que essas células são mais comuns na região do ligamento periodontal (PDL) externamente ao dente, enquanto nenhuma célula positiva foi encontrada no interior da polpa dental nessa amostra. B, dente incisivo formado no rim de camundongo mostrando novamente células co-expressando os dois marcadores na região externa do dente próxima ao loop cervical que é uma região conhecida como nicho de células-tronco em camundongos devido ao crescimento contínuo desses dentes em animais roedores. Células vermelhas – Células de ciclagem lenta IdU+. Células azuis – Células que migraram do animal hospedeiro via circulação sanguínea (LacZ+). Legenda: De, dentina; Dental pulp, polpa dental; CL, alça cervical; setas vermelhas destacam as células de ciclagem lenta.