CIBELE PELISSARI DOS SANTOS

**Mobilização de células da papila apical por G-CSF para enriquecimento de
populações de células-tronco**

São Paulo

2018

CIBELE PELISSARI DOS SANTOS

Mobilização de células da papila apical por C-GSF para enriquecimento de populações de células-tronco

Versão Corrigida

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

Área de concentração: Patologia Oral e Maxilofacial e Pacientes Especiais

Orientador: Profa. Dra. Marília Trierveiler Martins

São Paulo

2018

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-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Santos, Cibele Pelissari dos.

Mobilização de células da papila apical por C-GSF para enriquecimento de populações de células-tronco / Cibele Pelissari dos Santos; orientador Marília Trierveiler Martins. -- São Paulo, 2018.

96 p. : fig., tab., graf.; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Patologia Oral e Maxilofacial e Pacientes Especiais. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida

1. Papila dentária. 2. Células-tronco. 3. Mobilização. 4. Fator estimulador de colônias de granulócitos. I. Martins, Marília Trierveiler. II. Título.

Santos, Cibele Pelissari dos. Mobilização de células da papila apical por G-CSF para enriquecimento de populações de células-tronco. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: 20 / 03 / 2018

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). Flávia Cristina Perillo Rosin

Instituição: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Julgamento: Aprovada

Prof(a). Dr(a). Ivana Márcia Alves Diniz

Instituição: Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais

Julgamento: Aprovada

Prof(a). Dr(a). Carla Renata Sipert

Instituição: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Julgamento: Aprovada

Dedico essa obra aos meus pais por sempre estarem ao meu lado, em todos os momentos, e por apoiarem incondicionalmente minhas decisões.

Dedico à minha irmã Gisele, meu cunhado Claudio, e às minhas duas sobrinhas Yasmin e Isis. A presença de vocês na minha vida sempre fez com que tudo ficasse muito mais leve e alegre.

Dedico aos meus amigos da Patologia pelo aprendizado e pela convivência. Vivi momentos muito felizes com vocês, mesmo nos dias mais difíceis.

Dedico à querida Marília, por sempre me mostrar os caminhos para crescer como profissional e como indivíduo, por sempre acreditar nas minhas ideias e por toda confiança depositada em mim. Soma-se tudo isso ao fato de você ser um exemplo de profissional e de pessoa, ao qual eu admiro e me espelho.

Dedico com carinho à minha querida amiga Flávia, a pessoa mais doce, meiga e prestativa que existe neste mundo. Sua amizade foi um dos melhores presentes que eu ganhei na Pós-Graduação.

Ao querido Franco, pela paciência e companheirismo. Ter seu apoio foi essencial durante todo esse processo.

Dedico à querida Chiara, que talvez nem saiba o quanto ela foi importante nessa minha conquista.

Dedico esta tese a todos os pesquisadores brasileiros que lutam diariamente para desenvolver uma pesquisa de qualidade e formar bons profissionais, mesmo diante das adversidades e falta de incentivo.

Dedico a todos os pacientes que gentilmente doaram seus dentes para esta pesquisa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha querida orientadora, Marília Trierveiler Martins, por ter acreditado neste projeto. Seu apoio foi determinante para que esta tese fosse realizada e concluída.

Agradeço à professora Andrea Mantesso Pobocik por ter sido uma precursora das ideias nos projetos de células-tronco, sendo uma delas a construção do LABITRON, laboratório da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo onde este projeto foi desenvolvido. Além disso ela foi pessoalmente responsável por boa parte da minha formação como pesquisadora.

Agradeço à professora Luciana Corrêa pelo apoio técnico e laboratorial para que esse projeto fosse desenvolvido.

Agradeço aos técnicos de laboratório, Elisa, Juvani, Elizangêla e Douglas por toda ajuda laboratorial

Agradeço à Adriana por toda a ajuda durante o desenvolvimento deste trabalho. Você um exemplo de dedicação profissional a ser seguido.

Agradeço às alunas de iniciação científica, Aline e Mariana, por terem colaborado com esse projeto.

Agradeço aos professores da Patologia Oral e Maxilofacial, Marina, Suzana, Fábio, Karem e Décio, por todos os ensinamentos durante meu doutorado.

Agradeço ao Professor Victor Arana-Chavez por facilitar o acesso de permitir a realização do experimento *in vivo* nas dependências do Biotério do Laboratório de Biologia Oral da FOU SP.

Agradeço a todos os funcionários da Pós-Graduação da FOU SP, em especial à Catia e à Alessandra, por sempre estarem dispostas a ajudar, independente das circunstâncias.

Agradeço à Bruna, técnica em citometria de fluxo do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (ICB), pelo apoio técnico, que foi determinante para que fossem feitas as análises de citometria.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro concedido a mim durante o período de doutoramento.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro destinado ao Programa Ciências Odontológicas no qual faço parte e

pelo qual pleito o título de Doutora. Além disso, agradeço à CAPES pela concessão da bolsa de Doutorado-Sanduiche, que possibilitou minha ida à Universidade de Birmingham (Reino Unido).

Agradeço à Universidade de São Paulo pela minha formação profissional desde a graduação até o doutorado.

“Vamos pegar nossos livros e canetas. Eles são nossas armas mais poderosas. Uma criança, um professor, uma caneta e um livro podem mudar o mundo. A educação é a única solução”.

Malala Yousafzai.

RESUMO

Santos, Cibele Pelissari dos. Mobilização de células da papila apical por G-CSF para enriquecimento de populações de células-tronco [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2018. Versão corrigida.

O termo mobilização está relacionado com mecanismos intrínsecos das células em responder a estímulos quimiotáticos promovidos por moléculas sinalizadoras. Diante da versatilidade quanto aos possíveis uso dessas moléculas, existe a possibilidade de serem utilizadas *in vitro* para enriquecer populações celulares com melhores propriedades terapêuticas. Isso posto, foi proposto um estudo utilizando o enriquecimento de células-tronco de papila apical a partir da mobilização induzida pelo fator estimulador de colônias de granulócitos G-CSF (do inglês *granulocyte-colony stimulating factor*), substância que possui aprovação para uso em humanos pela *food and drug administration (FDA)*. As células mobilizadas da papila apical foram avaliadas *in vitro* quanto as suas propriedades cinéticas de diferenciação, proliferação, clonogenicidade, e por imunofenotipagem. Para ensaio funcional *in vivo* as células mobilizadas foram transplantadas em animais normorreativos, com o intuito de observar a interação com o sistema imunológico. O que foi visto é que as células mobilizadas apresentam uma melhor eficiência clonogênica, ou seja, formam mais colônias. Também foi visto que as células mobilizadas perdem expressão para CD44, o que pode estar relacionado com a alteração em moléculas de adesão para adquirir um fenótipo que possibilite a mobilização. As populações estudadas de papila apical, de uma forma geral foram negativas para STRO-1, porém positivas para CD34. O que se conclui é que o G-CSF seleciona populações de papila apical *in vitro* mais eficientes para formar unidades de colônias. Adicionalmente foi visto que as células da papila apical não sofrem diferenciação osteo/dentinogênica quando transplantadas em camundongos imunocompetentes.

Palavras-chave: Papila Apical. Células-tronco. Mobilização. G-CSF.

ABSTRACT

Santos, Cibele Pelissari dos. Apical papilla cell mobilization by G-CSF for enrichment of stem cell populations [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2018. Versão corrigida.

The term mobilization is related to intrinsic cells mechanisms in response to chemotactic stimulations promoted by signalling molecules. These molecules are highly versatile with one potential use being enrichment of *in vitro* cell populations to increase therapeutic properties. This research investigates the enrichment of apical papilla stem cells populations using granulocyte stimulating factor (G-CSF) as a mobilization factor - a substance approved by the Food and Drug Administration (FDA) for use in humans. Mobilized cells of the apical papilla were evaluated *in vitro* for their kinetic properties of differentiation, proliferation, clonogenicity, and immunophenotyping. An *in vivo* functional assay where mobilized cells were transplanted into normoreactive animals, was conducted to observe interactions with the immune system. It was found that mobilized cells had better abilities in clonogenic efficiency. Additionally, mobilized cells appeared to down regulate expression of CD44, which could be attributed to changes in adhesion molecules necessary for a mobilized phenotype. Furthermore the studied apical papilla cells populations were overall negative for STRO-1, but positive for CD34. In conclusion G-CSF selects more clonogenic apical papilla populations *in vitro*. Additionally, apical papilla cells do not undergo osteogenic/dentinogenic differentiation when transplanted into immunocompetent mice.

Keywords: Apical papilla. Mesenchymal stem cells. Mobilization. G-CSF.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALP	do inglês <i>Alkaline phosphatase</i>
BMP	do inglês <i>Bone Morphogenetic Protein</i>
BMSSC	do inglês <i>Bone Marrow Stromal Stem Cell</i>
BrdU	do inglês <i>Bromodeoxyuridine</i>
DFPC	do inglês <i>Dental Follicle Precursor Cell</i>
DMP	do inglês <i>Dentin Matriz Protein</i>
dNC-PC	do inglês <i>dental neural crest-derived progenitor cells</i>
DPSC	do inglês <i>Dental Pulp Stem Cell</i>
DSP	do inglês <i>Dentin Sialo Protein</i>
DSPP	do inglês <i>Dentin Sialophosphoprotein</i>
EDTA	do inglês <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
ES	do inglês <i>Embryonic Stem Cells</i>
FDA	<i>food and drug administration</i>
G-CSF	do inglês <i>granulocyte-colony stimulating factor</i>
GSK-3	do inglês <i>glycogen synthase kinase</i>
HE	coloração de hematoxilina e eosina
HPSC	do inglês <i>Hematopoietic progenitors stem cells</i>
iPS	do inglês <i>induced Pluripotent Stem Cell</i>
MDPSC	do inglês <i>Mobilized Dental Pulp Stem Cells</i>
MSC	do inglês <i>Mesenchymal stem cells</i>
NK	do inglês <i>Natural Killer</i>
PBS	do inglês <i>Phosphate buffered saline</i>
PDLSC	do inglês <i>Periodontal Ligament stem cell</i>
RPM	rotações por minuto
SCAP	do inglês <i>Stem Cells From Apical Papilla</i>
SDF	do inglês <i>Stromal cell-derived fator</i>
SHED	do inglês <i>Stem Cell from human exfoliated deciduous teeth</i>
TGF- β 1	do inglês <i>Transforming growth factor β-1</i>
VGF	do inglês <i>Nerve Growth Factor Inducible</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
°C	graus Celsius
mg	miligrama
ml	mililitro
μl	microlitro
nº	número
mM	milimolar
μM	micromolar
mm ²	milímetro quadrado
μm	micrometro
kg	quilograma
pH	potencial hidrogeniônico
log	função logaritmo decimal
kDa	kilodalton
nm	nanometros

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	21
2.	REVISÃO DA LITERATURA.....	23
2.1.	Células-tronco: conceitos gerais	23
2.2.	Células-tronco de origem dental	29
2.3.	Princípio de mobilização e moléculas bioativas	38
3.	PROPOSIÇÃO	41
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	43
4.1.	Desenho geral do estudo	43
4.2.	Cultura primária das populações de células da papila apical	43
4.3.	Mobilização das células da papila apical por G-CSF.....	45
4.4.	Imunofenotipagem por Citometria de fluxo.....	47
4.5.	Potencial de multidiferenciação <i>in vitro</i>	48
4.6.	Unidade formadora da colônia	49
4.7.	Ensaio de proliferação por contagem celular, <i>population doubling</i> e viabilidade celular.....	49
4.8.	Avaliação do potencial <i>in vivo</i> : estudo piloto	51
4.9.	Método de análise dos resultados	54
5.	RESULTADOS	55
5.1.	Expressão de marcadores por citometria de Fluxo.....	55
5.2.	Potencial de Multidiferenciação	58
5.3.	Eficiência na formação de colônias	61
5.4.	Avaliação de proliferação por contagem celular, <i>population doubling</i> e MTS	62
5.5.	Ensaio <i>in vivo</i>	67
6.	DISCUSSÃO	71
7.	CONCLUSÃO.....	77
	REFERÊNCIAS.....	79
	ANEXOS	88

1. INTRODUÇÃO

Os recentes avanços em tecnologias laboratoriais e de biologia molecular impulsionaram os estudos com células-tronco, proporcionando um melhor entendimento de suas características e propriedades. Mecanismos previamente desconhecidos foram sendo evidenciados e as células derivadas de tecidos mesenquimais hoje representam uma importante ferramenta para uso em terapias de condições patológicas diversas, e para engenharia tecidual. É preponderante ressaltar que, apesar dos avanços, ainda é preciso aprimorar protocolos de isolamento, manipulação, cultivo celular e congelamento, a fim de garantir a segurança dessas células para uso em humanos.

Além de seguros, os métodos de obtenção, isolamento e expansão das culturas de células precisam ser eficientes. Nesse contexto, acredita-se que populações derivadas dos tecidos mesenquimais, quando enriquecidas exibem melhores propriedades *in vitro* e *in vivo*. Frente a isso, parece apropriado estabelecer formas de enriquecimento baseadas em propriedades que sejam exclusivas de células-tronco e utilizando substâncias apropriadas para uso em humanos.

Uma das propriedades das células-tronco mesenquimais é a capacidade de migrar entre os tecidos, diante de estímulos promovidos por moléculas sinalizadoras. Dentre as moléculas que são conhecidas por induzirem a migração celular está o fator estimulador de granulócitos (G-CSF, do inglês *granulocyte-colony stimulating factor*). O G-CSF já é amplamente usado como tratamento adjuvante em pacientes transplantados de medula óssea. O mecanismo de ação ainda não está totalmente elucidado, mas já se sabe que o G-CSF induz a migração de células-tronco hematopoiéticas residentes da medula óssea para o sangue periférico, o que se traduz em um aumento na produção de células de linhagem mieloide no sangue(1) . Outra consequência do uso do G-CSF é o expressivo aumento de células mesenquimais da medula óssea presentes no sangue periférico, de forma a serem facilmente detectadas. Denomina-se esse fenômeno migratório de mobilização (2,3) (2,3).

Um possível uso para o G-CSF seria utilizar esse princípio de mobilização para enriquecer populações celulares *in vitro*. Desta forma, utilizando membranas semi-permeáveis, foi possível desenvolver uma metodologia para mobilizar células da polpa dental. As denominadas MDPSCs (do inglês *Mobilized Dental Pulp Stem Cells*)

possuem alto potencial proliferativo e de multidiferenciação *in vitro*, e são capazes de regenerar o tecido pulpar *in vivo* (4,5). A vantagem da utilização do G-CSF é que este já é aprovado para uso em humanos pela respeitada entidade do departamento americano de saúde, a FDA (*food and drug administration*). Recentemente o mesmo grupo que desenvolveu a técnica deu início a um estudo clínico fase I para uso das MDPSCs para regeneração pulpar em dentes com indicação endodôntica (6).

Outra possível utilização de moléculas sinalizadoras de mobilização seria na sua utilização na confecção de biomateriais restauradores. O dente possui um mecanismo intrínseco de reparo perante a um dano no tecido pulpar. O que já se sabe é que as células-tronco residentes de nichos perivasculares são mobilizadas até a área na qual ocorreu o dano, a fim de substituir as células perdidas no processo. Seguindo esse princípio, verificou-se que ao utilizar esponja de colágeno associada a molécula antagonista de GSK-3 (do inglês *glycogen synthase kinase*), em área de capeamento pulpar, era possível promover regeneração a tecidual pela mobilização de células-tronco residentes (7).

Até o momento, apenas células de polpa dental humanas foram mobilizadas e caracterizadas. Por meio desta técnica, outras fontes de células-tronco dentais podem ser testadas. Portanto, em um contexto pré-clínico, o G-CSF poderia ser utilizado, para enriquecer populações de células papila apical *in vitro*. Diante desta possibilidade, também poderia ser cotado como molécula ativa em arcabouço para biomateriais visando regenerar tecidos do complexo dentino-pulpar.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Células-tronco: conceitos gerais

Por definição as células-tronco são células indiferenciadas, com capacidade de autorrenovação e multidiferenciação. São classificadas quanto à plasticidade (ou potência), em totipotentes, pluripotentes e multipotentes. Podem ser isoladas a partir de tecidos embrionários, sendo denominadas células-tronco embrionárias (ES do inglês *embryonic stem cells*), ou de tecidos já formados, sendo denominadas então de células-tronco adultas ou somáticas (8–10).

A fase embrionária de um indivíduo tem início a partir de uma célula-tronco, que se forma após a fecundação. Esta, por sua vez, é considerada como sendo totipotente pois é responsável pela formação do indivíduo e tem capacidade de formar qualquer tipo celular, seja dos três folhetos embrionários (ectoderma, endoderma e mesoderma) ou de tecidos extra-embrionários. Na fase embrionária de blastocisto é possível isolar células-tronco pluripotentes, com a capacidade de gerar células derivadas dos três folhetos embrionários. Finalmente, as multipotentes são caracterizadas pela capacidade de diferenciação, de uma forma geral, em células do mesmo folheto embrionário (11,12).

A primeira linhagem de células-tronco embrionária humana, foi isolada em 1998 da camada interna do blastocisto. São caracterizadas por proliferam extensivamente e por se manterem indiferenciadas *in vitro*. São capazes de formar tumores do tipo teratomas ao serem transplantadas em animais imunodeficientes (13). Para manter as características de pluripotência as células-tronco embrionárias possuem um metabolismo respiratório altamente glicolítico, com grande produção de ATP e redução de metabolismo mitocondrial (14–16). Apesar do grande potencial para uso terapêutico, as ESs apresentam importantes limitações. Uma delas se relaciona às variabilidades genéticas entre indivíduos, o que poderiam gerar reações do hospedeiro contra enxertos. Outra importante limitação está no fato do seu isolamento a partir de embriões esbarrar em questões éticas primordiais.

A partir de mecanismo de reprogramação celular é possível fazer com que células somáticas adquiram características de pluripotência. Um grupo de pesquisadores

japoneses verificou que a partir de incorporação de somente quatro fatores de transcrição específicos no DNA de fibroblastos, utilizando um lentivírus como vetor, essas células eram reprogramadas para o fenótipo embrionário. As então denominadas iPS (do inglês *induced pluripotent stem cells*) apresentavam um comportamento *in vitro* semelhante ao das ESs, como serem altamente proliferativas e apresentarem amplo potencial de diferenciação. Além disso, expressavam marcadores de ES e, quando transplantadas em camundongos imunodeficientes formavam teratomas (17). As iPS foram amplamente caracterizadas, porém ainda não são conhecidos os mecanismos que levam uma célula em diferenciação terminal sofrer uma “desdiferenciação”. O processo de reprogramação não induz mudanças nas sequências genômicas entre as células originais e as reprogramadas, o que faz com que se acredite na possibilidade de alterações epigenéticas (18).

As iPS representaram uma revolução para o uso de células pluripotentes, ampliando significativamente as possibilidades em pesquisas e terapias. Teoricamente seria possível produzir qualquer tipo celular a partir das células adultas de pacientes. Além disso as técnicas de reprogramação potencialmente poderiam corrigir erros em genes relacionados a desordens genéticas (19). Contudo, as técnicas iniciais de reprogramação celular apresentavam características intrínsecas que geraram preocupação, principalmente relacionados com a possível indução de tumorigênese. Essas preocupações se justificam pela possibilidade dos vetores virais causarem instabilidade genética (20), e pelas características relacionadas aos “fatores de Yamanaka”, mais especificamente o caso do C-Myc e do SOX2, estarem relacionados com processo de tumorigênese em diversos tipos de câncer. Entretanto, após dez anos de pesquisas, já foram desenvolvidos métodos mais eficientes e seguros para geração das iPS, possibilitando inclusive que tenham início os testes clínicos (21).

As células-tronco adultas multipotentes residem nos tecidos e são as responsáveis por promover a reparação e manter a homeostase. Estas podem ser de origem hematopoiética, epitelial ou mesenquimal (10,22,23). Nos tecidos, as células residem em um microambiente tridimensional denominado nicho, onde ficam quiescentes. O nicho é composto por tipos celulares heterogêneos, que formam uma estrutura tridimensional permeada por uma matriz extracelular. Esses componentes são responsáveis por regular e modular as funções dessas células (24,25). Essas células, de uma forma geral, sofrem modificações e adquirem limitações funcionais quando são removidas do nicho. Um exemplo disso é o que acontece com as

populações celulares que são isoladas para cultivo celular e, ao longo das passagens, perdem características e passam por rearranjo fenotípico e alteração na expressão de marcadores de superfície (25).

As células-tronco ou progenitoras hematopoiéticas HPSCs (do inglês *Hematopoietic progenitors stem cells*) foram as primeiras a serem identificadas e caracterizadas a partir de uma observação feita por Jacobson e colaboradores em 1951 (26), que constatou que camundongos conseguiam sobreviver a doses letais de irradiação somente protegendo o baço. Em seguida, utilizando o mesmo princípio, Ford e colaboradores em 1956 (27), a partir da mesma condição experimental, verificaram que camundongos irradiados que recebiam transplante de medula, adquiriram características genéticas oriundas do doador, demonstrando que essas células repopulavam a medula óssea do animal transplantado (26,27). Como qualquer célula-tronco, elas se caracterizam pela autorrenovação e capacidade clonogênica, e encabeçam hierarquicamente o complexo mecanismo de hematopoese nos mamíferos (28,29). Podem ser isoladas a partir da medula óssea, do cordão umbilical e do sangue periférico, sendo o tipo de células-tronco mais utilizado atualmente em pacientes. A aplicação clínica mais comum para essas células é para o tratamento de alterações de medula óssea, como Anemia de Falconi e tumores de origem hematopoiética como leucemia mieloide aguda (30). São conhecidas por expressar o marcador CD34, que inclusive é utilizado para enriquecer populações em transplante de medula. O marcador CD34 é uma fosfoglicoprotéina transmembrânica de peso molecular de 115 kDa. No que se relaciona às células de origem hematopoiética o CD34 parece promover adesão celular e regular diferenciação e proliferação nessas células (31). Apesar do transplante de HSPCs ser bem estabelecido clinicamente, ainda não se entende totalmente o que acontece com as células transplantadas em longo prazo e nem como ocorre a reconstituição e dinâmica clonal em humanos (32).

O epitélio é o tecido de recobrimento das superfícies do corpo humano, e que tem função de proteção, regulação da absorção de nutrientes e hídrica, além do controle da secreção glandular (33). O tecido epitelial humano é formado por células poliédricas justapostas, que podem se organizar em apenas uma camada celular (simples) ou em múltiplas camadas (estratificado). É caracterizado por estar em constante renovação, e esse processo contínuo, conhecido como homeostase, é promovido pelas células-tronco residentes na camada basal (34,35). Conhecidas pela capacidade clonogênica, elas possuem um ciclo de vida mais longo, se mantendo por

mais tempo no epitélio (36). O processo de maturação do epitélio também se dá a partir das células-tronco. Essas, mais indiferenciadas dão origem às células amplificadoras transientes, ou progenitoras, que são altamente proliferativas. As células progenitoras, por sua vez, expandem-se e diferenciam-se para compor as demais camadas (34,37).

As células-tronco mesenquimais, foco deste trabalho, serão abordadas em detalhes no próximo tópico desta revisão.

Principais características das células-tronco mesenquimais

As células-tronco mesenquimais são células multipotentes que podem ser isoladas a partir de diversos tecidos como da medula óssea (38), tecido adiposo (39), cordão umbilical (40) e membrana amniótica (41), sangue periférico (42), polpa dental (43,44) entre outros. De uma forma geral, as células derivadas de tecidos mesenquimais são morfologicamente semelhantes a fibroblastos, são aderentes ao plástico quando em cultura, tem capacidade de formar colônias e, de diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica (8,45), além de terem propriedades imunomodulatórias (46).

A primeira descrição de células de origem mesenquimal foi feita em 1976 por Friedenstein e colaboradores (38), que constataram a existência de uma subpopulação celular de aspecto semelhante a fibroblastos oriundos da medula óssea, com capacidade de formar colônias. Anos depois, em 1991, Caplan e colaboradores (45) demonstraram que essas células, quando induzidas *in vitro*, eram capazes de se diferenciarem em múltiplas linhagens, sendo então chamadas de células-tronco mesenquimais (MSCs do inglês *Mesenchymal Stem Cells*) (45). Como forma de constatar a capacidade de autorrenovação, essas células foram previamente caracterizadas e em seguida transplantadas em camundongos imunodeficientes. A partir do tecido formado no animal, as células foram novamente cultivadas e caracterizadas, mantendo as características prévias ao transplante (8).

Ainda não se identificou um marcador de superfície que seja específico para essas células. Em 2005 e 2006 a Sociedade Internacional de Terapia Celular definiu alguns critérios mínimos para o isolamento da MSCs, sendo, dentre outros critérios

estipulados nesta ocasião, que essas células deveriam de expressar os marcadores CD105, CD90 (Thy-1) e CD73, e ter expressão negativa para CD34, CD45, CD14, CD11b, CD79 α e CD19 (47,48). Basta salientar que esses critérios foram baseados nas células-tronco da medula óssea, servindo exclusivamente para diferencia-las das células-tronco hematopoiéticas. Já é aceito conceitualmente que células isoladas de diferentes tecidos podem ter padrões variados de expressão de marcadores, podem exibir fenótipos heterogêneos e ter variações nos índices de proliferação (49). De fato existe uma variação biológica que se relaciona a mecanismos específicos de regulação da homeostase e regeneração próprias de cada tecido, fazendo com as células tenham propriedades que dependem da origem tecidual da qual são isoladas (50,51).

Acredita-se que as células-tronco mesenquimais possuem uma origem comum em todos os tecidos conhecido como nicho perivascular. Desta forma, estas células seriam ativadas frente a um dano tecidual ou a uma resposta inflamatória, se desprendendo da membrana basal que circunda os vasos a fim de promover uma regeneração tecidual específica (52–54). Portanto, não é de se estranhar que as células-tronco mesenquimais co-expressam marcadores moleculares de pericitos, como o 3GS, NG2, Sca-1, Stro-1, α -SMA, Thy-1, V-CAM e PDGF β (55).

Outra propriedade amplamente estudada das MSC é a capacidade de migrar entre os tecidos. Já se sabe que essas células podem modular a resposta inflamatória local, além de estimular outras células pela liberação de fatores parácrinos. Os efeitos terapêuticos das MSCs são resultantes das funções de imunomodulação associadas a mecanismos do processo inflamatório. Desta forma, já se entende que elas, em resposta a mediadores de inflamação produzirão fatores imunoregulatórios, fatores mobilizadores e fatores de crescimento, com finalidade de promover o reparo tecidual (56). Um estudo pioneiro explorou essa propriedade ao utilizar células de medula óssea transfectadas com marcadores fluorescentes. Essas células foram injetadas pela corrente sanguínea (através da artéria caudal) em ratos com lesão cardíaca. Desta forma, foi possível rastrear essas células, e o que se viu foi que elas migraram em direção ao coração e promoveram reparo tecidual local (57). A partir de estímulos quimiotáticos verificou-se que associar a bliominicina, um fármaco quimioterápico conhecido por ser tóxico ao pulmão, com aplicação intravenosa de células-tronco de medula óssea, evita a formação de uma reação inflamatória aguda induzida pela droga, além modular a resposta inflamatória local (58). Em outros estudos essas

mesmas propriedades foram exploradas com o intuito de observar a capacidade de promover o reparo em órgãos como cérebro (59) musculatura esquelética (51) entre outros tecidos.

As propriedades imunomodulatórias das MSCs deram grande notoriedade para o uso terapêutico dessas células. Um dos principais aspectos é possibilidade do uso alogênico ou xenogênico. Uma das situações clínicas mais interessantes é que MSCs alogênicas apresentam potencial curativo para a doença do enxerto contra o hospedeiro (54). Em um estudo feito em babuínos, atribui-se às BMSSCs (do inglês *Bone Marrow Stromal Stem Cell*) a propriedade de prolongar a viabilidade de enxerto alogênico de pele, principalmente por inibir uma resposta imune mediada por linfócitos T. O que foi observado é que o efeito inibitório não era por indução de vias apoptóticas e sim por supressão de mecanismos de divisão celular (60). Isso também foi observado em um experimento *in vitro*, no qual as BMSSCs quando co-cultivadas com linfócitos T CD2 foram capazes de inibir a sua proliferação (61). Outros estudos demonstraram que as células-tronco podem modular a função de células do sistema imune, incluindo linfócitos T, linfócitos B e linfócitos NK, células dendríticas e neutrófilos, além de estimular de células T-regulatórias (46).

Todas essas características exibem um amplo espectro para o uso das MSCs, tanto para bioengenharia de tecidos, quanto em terapias baseadas no uso de células. Isso se soma ao fato de sua utilização não envolver problemas éticos primordiais, como já citado que corre para as células-tronco embrionárias. Dentro desse panorama, os tecidos dentais aparecem como fontes confiáveis de células-tronco adultas para uso autólogo.

2.2. Células-tronco de origem dental

A fase embrionária da formação dental, conhecida como odontogênese tem início a partir da interação do epitélio oral primitivo com o ectomesênquima, tecido que se forma pela migração de células da crista neural (62). As células-tronco estão presentes durante a formação do dente e elas permanecem no tecido com função de promover homeostase e reparação. De uma forma geral as células mesenquimais de origem dental são clonogênicas e têm capacidade de diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica. Os tecidos dentais apresentam uma fonte acessível de células-tronco, por vezes podendo ser isoladas a partir de tecidos comumente descartados durante a prática clínica, fazendo dos tecidos dentais uma relevante fonte de células para serem utilizadas em terapias (63,64).

A partir da constatação de que a polpa dental tinha capacidade de substituir odontoblastos perdidos por estímulos danosos na dentina, formou-se a hipótese de que células-tronco residentes eram responsáveis por promover essa reparação. Desta forma, a célula-tronco da polpa dental (DPSC do inglês *Dental pulp stem cell*) foi a primeira população a ser isolada a partir de tecidos dentais (43,44). Desde então, outros tecidos se apresentaram como fontes para células-tronco, como a polpa dental de dentes decíduos (SHED do inglês *Stem cell from human exfoliated deciduous teeth*) (65), o ligamento periodontal (PDLSC do inglês *Periodontal ligament stem cell*) (66), a papila apical (SCAP do inglês *Stem cell from apical papilla*) (67,68) os fibroblastos gengivais (69,70) e o folículo dental (71). Os principais tecidos dentais serão brevemente descritos a seguir, e eles estão resumidos esquematicamente na Figura 2.1.

Figura 2.1 - Principais tecidos dentais que são fontes de células-tronco (64)

Polpa dental

A partir da dentinogênese, fase da odontogênese em que se forma o complexo dentino-pulpar, o ectomênse quima forma um tecido denominado papila dental, do qual serão originados odontoblastos que vão secretar matriz de dentina primária (62). Pesquisas de desenvolvimento dental especulavam sobre a existência de células especializadas precursoras dos tecidos dentais, porém pouco se entendia sobre as propriedades destas células. O primeiro grupo de pesquisadores que isolou células-tronco na polpa dental era liderado por Songtao Shi em 2000 (43), onde foi identificada uma subpopulação de células que apresentam *in vitro* comportamento semelhante às já caracterizadas células estromais derivadas da medula óssea. Quando induzidas as células derivadas da polpa dental tinham capacidade de diferenciação osteogênica, condrogênica e adipogênica. Essas células quando transplantadas em camundongos imunodeficientes imersas em hidroxiapatita formavam um tecido semelhante a dentina, composto de matriz mineralizada tubular apresentando prolongamentos de odontoblastos, além de um tecido conjuntivo contendo vasos sanguíneos em arranjo similar ao encontrado no dente humano (43). Foram primeiramente denominadas

como progenitoras mesenquimais. Em estudos subsequentes verificou-se células isoladas a partir do tecido formado em transplante de dorso e re-transplantadas formavam um tecido similar ao complexo dentino-pulpar que expressava DSPP (do inglês *dentin sialophosphoprotein*) sem prévia indução. Ainda constataram que essas células eram capazes de se diferenciar em adipócitos e células neurais. Os autores descreveram que se tratavam de uma população celular com propriedades clonogênicas e altamente proliferativas (44).

As células-tronco da polpa dental foram comparadas às BMSSCs quanto ao padrão de expressão genética. Utilizando técnica de *microarray*, o RNA foi extraído das populações, transformados em cDNA e em seguida analisados. Verificou-se desta forma que ambas populações apresentavam padrão semelhante de expressão genética para mais de 4.000 genes humanos conhecidos (72).

Quanto ao padrão de expressão para marcadores de superfície, no estudo inicial constatou-se que tanto as DPSCs quanto as BMSSCs expressavam os marcadores MUC-18 (CD146) e o STRO-1, conhecidos marcador células endoteliais e pericitos nos nichos de medula óssea (43). Com o intuito de investigar uma possível origem perivascular, as BMSSCs e as DPSCs foram isoladas de tecidos frescos e pré-selecionadas para o marcador STRO-1. Essas subpopulações foram testadas pela técnica de citometria de fluxo para a expressão de marcadores endoteliais como o CD146 e a actina de músculo liso e para o marcador de pericito 3G5. Também foi realizada a marcação *in situ* nos tecidos por imuno-histoquímica, e foi constatado que, tanto o CD146 quanto o STRO-1 são expressos em região perivascular, sendo que o STRO-1 também era expresso em regiões perineurais. Ainda no mesmo estudo, as DPSCs foram enriquecidas para CD146 e STRO-1 e notou-se que essas populações enriquecidas apresentavam maior potencial de formação de colônia, em comparação às populações não enriquecidas (73).

Ao ser constatado o potencial de diferenciação neural *in vitro*, características possivelmente relacionadas à origem ectomesenquimal, foi possível comprovar que as DPSCs têm capacidade de regenerar tecidos neurais *in vivo*. As células foram isoladas, previamente induzidas *in vitro* e, em seguida transplantadas em meio ao líquido cefalorraquidiano de ratos adultos com lesão cortical. Notou-se que as DPSCs migraram para a região lesionada, integrando o tecido e mostrando propriedades neuronais, como expressão de marcadores específicos e exibindo canais de voltagem dependentes de sódio e potássio (74).

Com o propósito de investigar as propriedades osteogênicas das DPSCs, um grupo de pesquisadores transplantou-as imersas em hidrogel de ácido hialurônico, em região de defeito crítico em calota craniana de camundongos. Foi possível notar, que comparativamente ao grupo controle composto somente do biomaterial, houve uma maior deposição de matriz óssea (75). As DPSCs, isoladamente possuem potencial de diferenciação osteogênica, porém, quando co-cultivadas com células endoteliais, elas potencializam a capacidades de deposição mineral, por quantificação da atividade das ALP (do inglês *Alkaline phosphatase*) das BSPs (do inglês *bone sialoprotein*) e DSPPs (do inglês *dentin sialophosphoprotein*) (76).

As DPSC também podem ser isoladas a partir de tecido pulpar inflamado e possuem características semelhantes às células isoladas de tecido sadio, porém com menor potencial de diferenciação. Contudo, essas células produzem tecido semelhante a dentina quando transplantadas em animais imunodeficientes, demonstrando possuir potencial de regeneração tecidual (77).

Célula-tronco de dente exfoliado

Além da polpa de dentes permanentes, também é possível isolar células com propriedades tronco a partir da polpa de dentes exfoliados. As células-tronco de dentes decíduos, denominadas SHEDs (do inglês *stem cells from exfoliated deciduous teeth*) ao serem comparadas com as DPSCs exibem uma maior taxa de proliferação, maior capacidade de formar colônias, capacidade de osteoindução *in vitro*, porém não formam dentina ectópica madura quando transplantadas *in vivo*. Contudo possuem amplo potencial de diferenciação celulares incluindo potencial neurogênico, osteogênico e adipogênico. A partir das propriedades previamente descritas, se acredita que as SHEDs representam uma população de células multipotentes mais indiferenciadas do que DPSCs (65).

As SHEDs são caracterizadas por expressar marcadores de células neurais e células da glia sem a necessidade de prévia indução. Acredita-se que essa característica está relaciona à origem tecidual de células da crista neural que formam a polpa dental (78). Outra propriedade atribuída as células da polpa de decíduos é a capacidade de secretar fatores neurotróficos, demonstrando que essas células

representam uma possível fonte para tratamento de danos do tecido neural ou ainda de doenças degenerativas (65,79).

Ligamento periodontal:

O ligamento periodontal é um tecido que se interpõe entre a raiz dental e osso alveolar. É formado por fibras colágenas que se interconectam entre o cemento e o osso, e têm a função de suporte, função sensorial e imunoprotetora. Além disso é o responsável por absorver as forças da carga mastigatória. Estruturalmente é constituído por componentes celulares, sendo eles os osteoblastos, os osteoclastos, os fibroblastos, os cementoblastos, restos epiteliais de Malassez, os macrófagos e células mesenquimais indiferenciadas, além de componentes extracelulares como colágeno e proteínas não colágenas (80). O ligamento periodontal também tem a função de promover a homeostase e reparação tecidual local (81).

Foram isoladas de células do ligamento periodontal com características de multipotência, as então denominadas PDLSCs (do inglês *Periodontal Ligament Cells*). Essas células apresentavam altas taxas proliferativas *in vitro*, formavam colônias, e sob indução tinham capacidade de diferenciação osteogênica/cementogênica e adipogênica. Assim como as DPSCs e as BMSSCs, as PDLSCs expressam marcadores perivasculares como o CD146 e o STRO-1, mas, também expressam o scleraxis que é um marcador exclusivo de células de tendões. Ao serem transplantadas em animais imunocompetentes, as PDLSCs formavam um tecido semelhante ao complexo periodontal e também tinham capacidade de regenerar o tecido periodontal quando transplantadas em regiões previamente lesionadas (66).

Para avaliar o potencial regenerativo das PDLSCs *in vivo*, foi elaborado um construto composto somente por células cultivadas formando camadas *in vitro* (*cell sheet*), com prévia indução osteogênica. Esse construto foi transplantado em região de defeito ósseo de ratos atímicos. Passado o tempo de espera de 5 semanas, houve a regeneração do defeito, com a formação tecido semelhante a cemento além de fibras colágenas (82).

Em um modelo de defeito ósseo ao redor de implantes, feito em cães, foi possível observar que as PDLSCs são capazes de regenerar tecido ósseo *in vivo*.

Para tanto foi utilizado um scaffold de cerâmica porosa de hidroxiapatita contendo PDLSCs autólogas, para construir um construto. Este construto foi enxertado na região do defeito ósseo e após os tempos de espera de 8 e 16 semanas, houve a formação de um tecido ósseo significativamente mais abundante do que observado no grupo controle sem células (83).

Células-tronco da papila apical

A papila apical é um tecido de origem ectomesenquimal, que pode ser encontrado na região apical de dentes com rizogenêse incompleta (Figura 2.2 A). Ao que tudo indica é o remanescente embrionário da papila dental, tecido responsável por formar o complexo dentino-pulpar. Histologicamente é separada da polpa em formação por uma zona de intersecção rica em células (68,84). Quanto a aspectos morfológicos, em comparação ao tecido da polpa, apresenta menor densidade celular e menor vascularização, além de exibir um estroma composto por abundante substância fundamental. Macroscopicamente, essa separação histológica pode ser observada, visto que a papila apical é facilmente destacada do ápice radicular (Figura 2.2).

Figura 2.2 - (A) Dente terceiro molar com rizogênese incompleta mostrando tecido da papila apical; (B) e (C) mostrando aspecto histológico com área rica em células e diferenças entre tecido da polpa e da papila apical (84)

Estudos clínicos indicam ser possível dar continuidade à formação da raiz em dentes com rizogênese incompleta que tenham sofrido necrose pulpar, apenas pela estimulação do sangramento no ápice. Perante ao estímulo, a papila apical ainda presente seria a responsável pela diferenciação de odontoblastos primários, que secretam dentina primária e secundária durante a formação da raiz, dando continuidade ao processo de rizogênese. Isso demonstra que as células da papila apical e as DPSCs cumprem diferentes funções teciduais. As DPSCs reparam a polpa frente a um dano, sendo as responsáveis pela diferenciação de odontoblastos que secretam dentina terciária ou reparativa. Já a papila apical participa do processo de formação do dente, o que indica uma população celular de um tecido mais indiferenciado (68,85).

As SCAPs também apresentam maior potencial proliferativo que as DPSCs, quando cultivadas utilizando o BrdU (análogo sintético da timina, que se incorpora no DNA de células em proliferação). Quanto a capacidade de diferenciação, ambas as populações (SCAPs e DPSCs) apresentaram potencial semelhante de diferenciação osteogênica e adipogênica. Quando ao perfil imunofenotípico as SCAPs foram

descritas por apresentar marcação positiva para os marcadores CD146 e STRO-1, reconhecidos marcadores de pericito, além de expressarem marcadores neurais, como β III tubulina, GAD, Neu N, neurofilamentos M e Nestin. Expressam, ainda, outros marcadores de células-tronco mesenquimais, como CD90, CD73 e CD105. Neste mesmo trabalho constatou-se que as SCAPs expressavam o CD24. Visto que esse padrão imunofenotípico não é característico de outros tipos celulares, o CD24 foi então considerado um possível marcador biológico específico para as SCAPs (67,68).

Em populações de SCAPs enriquecidas para CD146+/STRO-1+, foi notada que essa subpopulação apresenta uma maior eficiência clonogênica (formam mais colônias), além de exibir melhor potencial de diferenciação osteogênica. Ainda foi visto que essa subpopulação expressa marcadores de células-tronco embrionárias (86).

Mesmo com vários estudos que tentam delinear as características imunofenotípicas das SCAPs, ainda não existe um consenso na literatura quanto a esses parâmetros. O único consenso para células de origem dental é que essas populações coexpressam CD146 e STRO-1, tendo por base o trabalho de Gronthos (44). Isso foi afirmado para as SHEDs (65), para as PDL (66) e para as SCAPs (68). Muito embora a classificação de 2006 utilize como base as células mesenquimais da medula óssea, os trabalhos ainda tentam seguir os critérios para marcadores CD90, CD73 e CD105.

Num estudo de caracterização de uma linhagem de papila apical, por análise imuno-histoquímica foi visto que essas células expressam CD105 pontualmente em região vascular (87). Ainda no mesmo estudo, nos ensaios de citometria de fluxo, não foi observada a marcação para CD105, enquanto que para CD90 e CD73 essa marcação se mostrou expressiva. Em outro estudo, o mesmo padrão de marcação tecidual foi visto em análise imuno-histoquímica, ou seja, o CD105 foi expresso focalmente em região perivascular (88). Contudo, no ensaio de citometria a marcação para CD105 foi quase toda a totalidade da população estudada (99.5%). No mesmo trabalho também foi visto uma marcação expressiva para o CD90 e CD73.

Acredita-se que as características das células isoladas da papila apical possam estar relacionadas ao estágio de formação do dente a partir do qual são obtidas. Uma população celular, denominadas de progenitores dentais derivadas da crista neural dNC-PCs (do inglês *dental neural crest-derived progenitor cells*), foi isolada a partir de terceiros molares não erupcionados utilizando a técnica de explantes. O que se viu foi que essas células apresentam morfologia semelhante a

fibroblastos e proliferavam extensivamente. Essa população expressava genes relacionados a origem da crista neural como SOX9, Snail1, Snail2, Twist1, Msx2 e Dlx6. Quanto à expressão de marcadores, essas células eram positivas para CD49d (integrina alfa), CD56 (NCAM) e PDGRF alfa, porém negativas para STRO-1, CD31, CD34 e CD45 (89).

Em um outro estudo de imunofenotipagem viu-se que as dNC-PCs expressam CD44, CD105 (em baixos níveis) e Nestin, sendo mais uma vez negativas para STRO-1. Quanto ao potencial de diferenciação osteogênico *in vitro*, foi visto uma intensa deposição de minerais após 28 dias de indução, além disso essas células passavam a expressar genes relacionados a odontoblastos, como OCS, DSPP e DMP1, mostrando potencial de regenerar dentina (90).

Apesar de manter características de populações indiferenciadas, verificou-se que taxa de proliferação, diferenciação e de expressão para marcadores está relacionada ao doador. Isso foi visto ao se comparar populações de SCAPs isoladas a partir de diferentes doadores. No estudo em questão as populações foram negativas para STRO-1 e a marcação para CD146 foi bem variável quanto à frequência (91).

As SCAPs sofrem alterações fenotípicas quando cultivadas por longas passagens, pois sofrem alterações nas expressões de marcadores, e foi observado que genes relacionados a diferenciação são reprimidos (87). Também verificou se que as populações de SCAPs sofrem um decréscimo de expressão para alguns marcadores com o aumento das passagens. Em passagem 2 verificou-se que o marcador CD24 estava expresso em 3,9% da população, sendo que na passagem 10 não foi mais identificado. Já para o marcador CD146 a diminuição da expressão é menos drástica, visto que em passagem 2 está presente em 73,2% das células e em passagem 10 chega a 60% (87).

Em condições de hipóxia, as SCAPs não sofrem alteração na proliferação, porém ocorre uma indução espontânea para diferenciação neurogênica e osteogênica, além da manutenção da liberação de fatores pró-angiogênicos (92). Essas características destacam o potencial que essas células possuem para o uso em endodontia regenerativa, visto que o ambiente pulpar é propício para situações com ausência de oxigênio.

2.3. Princípio de mobilização e moléculas bioativas

As células hematopoiéticas foram as primeiras estudadas quanto ao potencial de mobilização. De uma forma geral, as HSPCs residem nos nichos da medula óssea, porém já se sabe que elas podem estar circulantes no sangue periférico. As células progenitoras hematopoiéticas podem ser mobilizadas da medula óssea mediante a estímulos quimiotáticos promovidos por fatores de crescimento citocinas e até por quimioterápicos. Esse princípio tem sido bastante utilizado para se mobilizar células da medula óssea em pacientes que passaram por mieloablação terapêutica (1).

Para entrar na circulação as HPSC precisam ultrapassar a barreira vascular composta por endotélio e membrana basal. Esse mecanismo é dependente da expressão de moléculas de adesão e liberação de enzimas (93). Um fator de crescimento amplamente utilizado para estimular a mobilização das HPSCs é o fator estimulador de colônias de granulócitos, G-CSF (do inglês *granulocyte-colony stimulating factor*). Em pacientes transplantados de medula óssea o G-CSF auxilia o aumento da produção de células da linhagem mieloide promovendo a mobilização destas células para o sangue periférico. O que se sabe é que o G-CSF age diretamente nas células-tronco da medula óssea por ativação das células alvo, promovendo a liberação de protease seguida da regulação da expressão de SDF-1 (do inglês *stromal-derived factor-1*) (94).

Além de mobilizar células de origem hematopoiética, o G-CSF também possui a capacidade de mobilizar a célula mesenquimal da medula óssea para o sangue periférico. Geralmente as BMSSCs circulantes estão em quantidades tão reduzidas no sangue periférico que são indetectáveis pelas técnicas laboratoriais conhecidas. O que se observou foi que utilizando o G-CSF como fator de mobilização esses níveis aumentavam e foi possível inclusive isolar e caracterizar as células mesenquimais mobilizadas (3). Em um outro experimento o G-CSF foi utilizado para mobilizar células mesenquimais da medula óssea em ratos com lesão traumática de córtex (2).

Assim como nas células hematopoiéticas, a regulação de SDF-1 e ativação de receptores de CXCR-4 (do inglês *chemokine receptor*) parecem ser determinantes para a mobilização de células mesenquimais da medula óssea. Além disso, outras moléculas podem estar associadas, entre elas moléculas de adesão como o CD44 e

o HGF (do inglês *hepatocyte growth fator*). De forma coordenada essas moléculas participam da ativação das MSCs, adesão e migração trans-endotelial (95).

A partir desses princípios de mobilização tem se recentemente o termo “*cell homing*” para determinar o recrutamento de células por meio de moléculas bioativas para promover o reparo e regeneração tecidual. Já se discute que técnicas de “*homing*” seriam mais facilmente aplicadas na prática clínica, por não envolver a expansão de células em ambiente de cultivo (96) .

Esse conceito de “*homing*” foi visto por Neves e colaboradores (7), que desenvolveram um modelo de capeamento pulpar *in vivo*, a partir da indução de lesão em nível de dentina, porém sem levar a um processo de necrose pulpar. Na área lesionada foi adicionada uma esponja de colágeno associada a molécula antagonista de GSK-3. O que se viu é que o GSK-3 mobilizou células da polpa dental, principalmente das oriundas de região perivascular, e essas células foram capazes de promover uma regeneração local, com deposição de dentina tubular (7).

Visando propor o *homing* de células da papila apical endógenas, em modelo de regeneração para dentes com rizogênese incompleta, foi testado *in vitro* a transmigração de populações SCAP utilizando o SDF-1 α . Foi constatado que as células estimuladas por SDF-1 α expressam o receptor de quimiocina CXCR-4, e possuem melhores propriedades migratórias(97). Em outro trabalho, viu-se que as SCAPs estimuladas por G-CSF e FGF-2 (do inglês *fibroblast growth fator-2*) migram mais, e, nas populações estimuladas por G-CSF e TGF- β 1 (do inglês *transforming growth factor β -1*), além melhorar a capacidade migratória, houve uma melhora na capacidade de diferenciação osteo/dentinogênica (98).

O uso de biomoléculas para confecção de biomateriais vem ganhando bastante notoriedade para pesquisas em odontologia, demonstrando ser uma importante ferramenta para pesquisas em regeneração tecidual.

3. PROPOSIÇÃO

Tendo perspectivas para uso das células-tronco mesenquimais em humanos num futuro próximo, é determinante propor métodos efetivos para melhorar a qualidade das culturas celulares. Para as células-tronco dentais, a partir da expectativa de regenerar tecidos orofaciais, foi proposta a mobilização de células da papila apical por G-CSF, com o intuito de caracterizar *in vitro* e *in vivo* populações com melhores propriedades terapêuticas e regenerativas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Desenho geral do estudo

Para este estudo foram obtidas culturas primárias de células humanas de papila apical isoladas a partir terceiros molares de pacientes jovens (16 a 20 anos de idade). A critério metodológico as culturas primárias foram agrupadas em três populações mistas, para que todo o estudo fosse realizado em triplicata experimental. Para cada população realizou-se um ensaio de mobilização por C-GSF e um de migração, gerando duas subpopulações (estas estão detalhadamente descritas no próximo tópico). As populações e subpopulações celulares foram caracterizadas quanto à imunofenotipagem por citometria de fluxo. A cinética celular foi avaliada quanto ao potencial de diferenciação, proliferação e formação de colônia. A população com melhores características foi selecionada para ensaio funcional, *in vivo*, utilizando modelo de transplante em dorso de camundongo normorreativos.

4.2. Cultura primária das populações de células da papila apical

Este estudo seguiu as normativas éticas para pesquisas que envolvem seres humanos previstas pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (CAAE: 48114915.2.0000.0075).

Foram utilizados neste estudo dentes de pacientes com indicação de extração pelo cirurgião-dentista responsável pelo atendimento. A coleta das amostras foi realizada com o prévio consentimento do paciente ou responsável legal, e somente mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Os dentes foram coletados na clínica odontológica da FFO-FUNDECTO, no curso de Aperfeiçoamento em Cirurgia, sob coordenação do Prof. Dr. Waldyr Antonio Jorge. Previamente ao momento cirúrgico foram selecionados terceiros molares que, radiograficamente, aparentavam rizogênese incompleta (máximo de 2/3 de raiz

formada), e que após a extração dental, a papila apical se manteve intacta. Os dentes coletados foram processados para obtenção das células nas dependências do Laboratório de Biologia de Células-Tronco em Odontologia (LABITRON), do Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP).

Foram coletados um ou mais dentes de cada paciente para obtenção de culturas primárias. Após a extração, as amostras foram imediatamente armazenadas em meio de cultivo mínimo essencial de Eagle α -modificado (α -MEM #M0200 Sigma) com 2% de solução antibióticos/antimicótico (Gibco® #15240), seguindo para ambiente de fluxo laminar. O tecido da papila apical foi cuidadosamente destacado do ápice dental com a ajuda de uma cureta e lavado 3 vezes em PBS 1X com 2% de antibióticos/antimicótico com trocas a cada 5 minutos. Após as lavagens, o tecido foi cortado utilizando-se lâminas de bisturi nº 15 até obtenção de pequenos fragmentos. A estes foram adicionadas solução para digestão enzimática de colagenase tipo I (3 mg/ml) e dispase (4 mg/ml), a 37°C por 45 minutos. Ao final do processo, foi adicionado meio de cultivo suplementado com soro fetal bovino (Gibco® #12657) para diluição da solução, seguida de centrifugação e descarte do sobrenadante. O *pellet* com as células foi ressuspensas passado em filtro com poro de 70 μ m (Falcon® 70 μ m cell strainer #352350) para desagregação.

As células foram então plaqueadas e mantidas em meio de cultivo suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 μ M de ácido ascórbico (Sigma #A8960) e 2mM L-glutamina (GlutaMax™ Gibco® #35050), solução antibióticas/antimicótica e em ambiente de estufa a 37°C, com atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Após aderirem à placa, o meio de cultura foi trocado, de acordo com o metabolismo celular.

As células foram monitoradas com o uso de microscópio invertido de fases. Foram subcultivadas ao atingirem 80% de confluência na placa, usando como reagente de dissociação solução enzimática de protease recombinante humana com EDTA, sem adição de corante fenólico (TrypLE™ Gibco® #12604).

Como citado previamente, a critério metodológico, as populações oriundas dos doadores foram agrupadas com o intuito de gerar três populações mistas de papila apical, como pode ser visto na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 - Populações de papila apical isoladas e os grupos de estudo

Populações	PAP*1			PAP2		PAP3	
Paciente	1	2	3	4	5	6	7
Sexo	Feminino	Masculino	Masculino	Masculino	Masculino	Feminino	Masculino
Idade	20 anos	17 anos	16 anos	16 anos	18 anos	17 anos	18 anos
Dentes	28	18,48	28,38	28,38	28,38	18,28,38	38

(*) Foi utilizada a sigla PAP para papila

4.3. Mobilização das células da papila apical por G-CSF

Para a mobilização $2 \cdot 10^4$ células das populações mistas de papila apical em passagem 2 foram colocadas em insertos sobre membranas semi-permeáveis de policarbonato (6,5mm Transwell® #3421) com poro de 5 μ m, em placa de 24 poços. Na câmara superior foram adicionadas as células em meio de cultivo sem soro. Na câmara inferior foi adicionado 500 μ l de meio, com fator estimulador de colônias de granulócitos humano (#G0407 SIGMA), na concentração de 100 ng/ml. A membrana de policarbonato utilizada neste estudo possui tratamento de superfície que possibilita a aderência celular. Após incubação de 36 horas, as células remanescentes na câmara superior foram removidas e descartadas. As células aderidas na câmara inferior foram tratadas com TrypLE™ e subcultivadas em meio α -MEM com 10% de soro fetal bovino. Os ensaios de caracterização foram realizados em passagem 3 após a mobilização. A população não mobilizada foi subcultivada para servir como controle. O processo de mobilização está esquematizado na figura 4.1.

Figura 4.1 - Esquema de mobilização de células *in vitro*

A título de controle da membrana, o ensaio de migração foi realizado sem a utilização do G-CSF. Desta forma, as células foram inseridas com meio sem soro na parte superior, sendo que na câmara inferior foi adicionado meio suplementado com 10% de soro fetal bovino. As populações derivadas da migração também foram caracterizadas neste estudo.

Foram então obtidas seis diferentes subpopulações, nomeadas de acordo com o grupo experimental e com a população celular de origem. Desta forma as subpopulações foram categorizadas da seguinte forma: as subpopulações mobilizadas por G-CSF foram denominadas de M (mobilização); as subpopulações de controle da membrana foram denominadas C (controle) e as populações mistas (não mobilizadas) mantiveram os nomes iniciais. Os grupos podem ser observados na tabela 4.2.

Tabela 4.2 - Populações de papila apical isoladas e grupos de estudo

Mistas	Mobilizadas G-CSF	Controle membrana
PAP1	PAP1 M	PAP1 C
PAP2	PAP2 M	PAP2 C
PAP3	PAP3 M	PAP3 C

4.4. Imunofenotipagem por Citometria de fluxo

Preparo das amostras

Previamente ao experimento, as células foram mantidas em meio de cultivo com soro para serem expandidas. Ao atingirem 90% de confluência o meio de cultivo foi removido, seguido de lavagem com PBS 1%. Como reagente de dissociação utilizou-se a Accutase (StemPro™ Accutase™ #A1110501), por 5 minutos. As células foram ressuspensas em solução tampão (PBS 1x com 5% de soro fetal bovino), seguida de centrifugação. Após passarem por filtro com poro de 70 µm (Falcon® 70 µm cell strainer #352350) para desagregação, as células foram contadas e aliqüotadas na concentração de $5 \cdot 10^5/100 \mu\text{l}$. O receptor Fc da família das imunoglobulinas foi bloqueado utilizando solução de Fc-block (Human BD Fc Block™ # 564219) na concentração de 1:20, em temperatura ambiente por 10 minutos (seguindo especificações do fabricante). Em seguida as amostras foram incubadas com os anticorpos primários por 30 minutos à 4°C. As características dos anticorpos primários usados e as respectivas concentrações estão resumidas na tabela 4.3. Ao final da incubação do anticorpo primário, as amostras foram lavadas com solução tampão, centrifugadas, seguida pela incubação do anticorpo secundário, na concentração de 1:100, por 30 minutos. Todas as reações foram realizadas em duplicata experimental por amostra.

Tabela 4.3 - Características dos anticorpos utilizados para imunofenotipagem

Anticorpo	Feito em	Clonalidade	Origem	Concentração
CD 34	Camundongo	Monoclonal [QBEND-10]	Abcam 8536	1:100
CD 44	Camundongo	Monoclonal [156-3C11]	Cell Signaling	1:100
CD105	Camundongo	Monoclonal [3A9]	Abcam 114052	1:100
CD146	Coelho	Monoclonal [EPR3208]	Abcam 75769	1:50
STRO-1	Camundongo	Monoclonal	R&D System MAB 1038	1:50

Análise das amostras

As amostras foram analisadas em citômetro BD FACSCanto II™ utilizando histogramas em escala logarítmica (avaliação de população positiva e negativa) por meio nos filtros ópticos nos espectros azul (488nm) para fluoróforo Fluorescein Anti-Mouse IgG Antibody (# FI-2000 Vector) e Fluorescein Anti-Rabbit IgG Antibody (#FI-1000Vector) (canal FITC máxima excitação: 490nm-500nm e emissão 510nm-520nm) e espectro vermelho (633nm) para fluoróforo Texas Red® Horse Anti-Mouse IgG Antibody (canal APC excitação 595nm e emissão 615nm), com canal de compensação R-PE. Para todas as amostras foi utilizado um controle da reação, ou seja, células não incubadas com o anticorpo primário (controle isotípico ou branco), para ajustes de parâmetros. Após os ajustes, foram adquiridos 50.000 eventos. Os dados foram analisados utilizando software FlowJo® e tabulados no programa Microsoft® Excel® e analisados quanto à frequência (% de células que expressavam o marcador). Foram consideradas positivas para os marcadores as amostras expressavam acima de 3%, sendo, portanto, consideradas negativas as amostras com frequência abaixo de 3%.

4.5. Potencial de multidiferenciação *in vitro*

As populações celulares foram plaqueadas, na quantidade de 10^4 por poço, em placa de 24 poços em meio de cultivo suplementado com 10% de soro fetal bovino. Após 24 horas o meio foi trocado e adicionado meio de indução para diferenciação osteogênica (StemPro™ Osteogenesis Differentiation Kit #A1007201) e adipogênica (StemPro™ Adipogenesis Differentiation Kit #A1007001). Os meios de indução foram trocados a cada 2 dias por 21 dias. Passado o período de espera, as amostras foram fixadas em paraformaldeído 4% por 30 minutos. Para avaliação qualitativa foram utilizadas colorações específicas para cada indução estudada (alizarina vermelha para osteogênica e *oil red* para adipogênica). As imagens foram adquiridas utilizando microscópio de inversão de fases. A partir das imagens foi realizado escore para análise semi-quantitativa das amostras. Para diferenciação osteogênica foi analisado

a partir da quantidade de deposição de cristais minerais e para análise de diferenciação adipogênica pela quantidade de esferas presentes.

4.6. Unidade formadora da colônia

As populações estudadas foram plaqueadas em baixa densidade, na quantidade de 10^3 na placa petri 60 cm², em triplicata, com meio suplementado com soro fetal bovino. Após 12 dias as placas foram fixadas em paraformaldeído a 4% por 20 minutos. Após a fixação as placas foram coradas com azul de toluidina por 40 minutos, para a contagem das colônias formadas. Foi considerada uma unidade de colônia um conjunto de 50 células. As placas foram fotografadas, e as imagens foram analisadas utilizando o programa ImageJ versão FIJI. Para homogeneização das contagens, o maior e menor valor foi descartado.

Para a avaliação da eficiência de formação de colônias calculou-se a porcentagem de células plaqueadas que geraram colônias.

4.7. Ensaio de proliferação por contagem celular, *population doubling* e viabilidade celular

Proliferação por contagem celular e *population doubling*

As populações estudadas foram plaqueadas na quantidade de 10^4 em placa petri de 60 cm², em triplicata, com meio α -MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino. Após 24, 48, e 72 horas as células foram dissociadas e contadas utilizando câmara de Neubauer. Foi utilizado o corante azul de tripan para evidenciar as células viáveis. As contagens foram feitas em duplicatas por placa. O número de células presentes nas placas foi dado utilizando a Equação 4.11

$$\text{Número de células} = \frac{\text{nº total nos quadrantes}}{\text{nº de quadrantes contados}} \times \text{fator de diluição} \times 10^4 \quad \text{Equação 4.1}$$

Os dados foram tabulados no programa Microsoft® Excel® para análise quantitativa

Para avaliar a proliferação relativa ao número vezes que as populações dobraram numericamente durante o cultivo (*population doubling*), as contagens das populações por tempo foram adicionadas à Equação 4.24.2

$$\text{Populationdoubling} = \frac{1}{\log(2)} \times \log\left(\frac{C_x(t)}{C_x(0)}\right) \quad \text{Equação 4.2}$$

em que:

- $C_x(t)$ = contagem final;
- $C_x(0)$ = número inicial de células plaqueadas (para esse experimento foi 10^4).

Proliferação por viabilidade celular (MTS)

Para avaliar a proliferação celular por meio de células viáveis, foi utilizado método colorimétrico a base de tetrazolio (CellTiter 96 Aqueous One Solution cell proliferation assay #TB245 Promega). O princípio do ensaio se dá pela formação de produto de formazam que acontece a partir da produção de NADPH ou NADH por enzimas desidrogenases em células metabolicamente ativas. Desta forma, as populações de células estudadas foram plaqueadas, na quantidade de 10^3 por poço de placa de 96, com meio α -MEM com 10% de soro fetal bovino. Os ensaios foram realizados em sextuplicata, e pelos períodos de 24, 48 e 72 horas. Passados os tempos de espera, foi adicionado 20 μ l da solução de MTS em 100 μ l de meio de cultivo, e incubado à 37°C por 3 horas. As placas foram por analisadas em espectrofotômetro utilizando filtro de 490nm. Os dados foram tabulados e analisados utilizando o programa Microsoft® Excel®.

4.8. Avaliação do potencial *in vivo*: estudo piloto

Todos os procedimentos para estudos *in vivo* adotados nesta pesquisa seguiram os preceitos éticos previamente estabelecidos pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (protocolo 030/2015). Os animais utilizados nos experimentos foram adquiridos no biotério da Faculdade de Medicina da USP e armazenados no biotério de camundongos da FOUSP. Os procedimentos cirúrgicos, assim como a dissecação do material removido, foram realizados nas dependências do biotério da FOUSP. As demais etapas deste projeto se desenvolveram nas dependências do LABITRON. Os experimentos *in vivo* foram realizados para avaliação das células mobilizadas *in vivo*, por experimento funcional em dorso murino. Foram utilizados 4 animais por grupo de estudo (mistos, mobilizadas e controle membrana), além de 3 animais para controle do biomaterial (Matrigel® sem células). Foram utilizados camundongos normorreativos do tipo balb-c. O tempo de espera utilizado foi de 28 dias

Preparo das amostras

Previamente ao transplante as populações celulares PAP1, PAP1M e PAP1C foram dissociadas e contadas. Foi utilizado como biomaterial o Matrigel® (Corning® Matrigel® Basement Membrane Matrix #354234). O matrigel é um material solúvel derivado de matriz extracelular de sarcoma murino, esta rica em diversas proteínas, como laminina, TGF- β , EGF (do inglês *epidermal growth factor*), FGF (*fibroblast growth factor*), entre outros relacionados ao tumor. O biomaterial possibilita a adesão e diferenciação celular, e é líquido à 4°C, adquirindo consistência gelatinosa à 37°C (temperatura corporal), com formação de estruturas tridimensionais. As células na quantidade de $10^6/100 \mu\text{l}$ do biomaterial à 4°C. Em seguida as amostras foram incubadas à 37°C por 30 minutos.

Procedimento cirúrgico

Para a realização das cirurgias de transplante, camundongos adultos balb-c, machos, foram anestesiados por via intramuscular com solução do anestésico cloridrato de xilazina (Anasedan®) e de relaxante muscular à base de cloridrato de ketamina (Dopalen®), em solução com 100mg/kg do anestésico e 50mg/kg do relaxante muscular.

Para acessar a camada de pele no dorso dos animais, foi realizada tricotomização com lâminas de barbear e desinfecção da área com solução antisséptica iodada. Uma incisão de 2 cm foi feita sob a linha mediana do dorso, em sentido sagital (Figura 4.2 A), seguida de divulsão dos tecidos em sentido lateral para formar uma “bolsa” (Figura 4.2 B). O material, contendo ou não células, foi cuidadosamente inserido na região entre a pele e a camada muscular interna (Figura 4.2 C). A pele foi reposicionada e suturada com fio de sutura de nylon 3.0 com agulha de 20 mm (Procure®), de modo que as duas bordas se coaptavam, promovendo uma cicatrização por primeira intenção (Figura 4.2 D).

Após 28 dias, os animais sofreram eutanásia por técnica de deslocamento cervical e o tecido formado no dorso foi dissecado. O material seguiu para processamento histológico, e foram realizadas as análises morfológicas.

Figura 4.2 - Cirurgia de dorso em camundongo balb-c. Após a tricotomização, foi realizada incisão (A), seguida da divulsão do tecido (B), inserção do material, contendo ou não células (C), e finalmente a sutura (D)

Processamento das amostras:

Após os tempos de espera, os animais foram eutanasiados por pré-anestesia com solução de anestésico (Anasedan®) e relaxante muscular (Dopalen®) aplicados por via intramuscular em nas doses de 100mg/kg e 50mg/kg, respectivamente, seguido por deslocamento cervical. As amostras foram dissecadas para processamento histológico convencional e posterior análise morfológica. As amostras dissecadas foram fixadas em paraformaldeído 4% por 24 horas em temperatura ambiente, e em seguida processadas por tratamento histológico convencional: desidratação em cadeias crescentes em concentração de álcool, diafanização em xilol, inclusão em parafina. Foram realizados cortes de 4µm, e coloração em hematoxilina e eosina (HE) para realização de análise histológica.

Avaliação morfológica:

Após processamento histológico convencional, as amostras foram seccionadas na espessura de 5 µm e colocadas em lâminas de vidro. Essas lâminas foram coradas por hematoxilina e eosina e analisadas em microscopia de luz. Os parâmetros avaliados foram: tipo de tecido formado, componentes celulares presentes, nível de celularidade e vascularização, presença de infiltrado inflamatório.

4.9. Método de análise dos resultados

Os resultados obtidos nos experimentos *in vitro* foram analisados em dados absolutos e de frequência (%). Os resultados foram tabulados no programa Microsoft® Excel® para avaliação quantitativa. Para análise de variância foi utilizado o teste *one way* ANOVA seguido de Tukey para os dados paramétricos, e o teste Kruskal-Wallis seguido de Dunn para os dados não-paramétricos. Os níveis de significância foram considerados em 5% ($p \leq 0.05$). Os testes estatísticos foram realizados utilizando o programa BioEstat ® 5.0 (Para, Brazil).

5. RESULTADOS

5.1. Expressão de marcadores por citometria de Fluxo

A partir da análise dos dados de padrão de imunofenotipagem a partir de um único parâmetro de expressão (marcação simples) das amostras estudadas foi possível constatar que em todas as situações experimentais as populações e subpopulações de células da papila apical expressam CD34. Em análise comparativa notou-se que o grupo controle de membrana possui uma menor frequência de expressão quando comparado ao grupo de células mobilizadas ($p=0.03$).

O marcador CD44 também foi considerado positivo em todas as situações de estudo, sendo constatado uma menor frequência de expressão no grupo de células mobilizadas, em comparação às células mistas ($p=0.04$).

Para o marcador CD105 a média da frequência entre os grupos foi considerada baixa em todos os grupos estudados. Analisando as populações e subpopulações individualmente, por vezes essa expressão foi considerada negativa. Na comparação entre os grupos, não houve diferença na frequência ($p=0.97$).

O marcador CD146 foi positivo em todas as subpopulações de células mobilizadas, sendo considerado negativo em duas subpopulações controle. Na comparação da frequência entre os grupos, foi constatado que o grupo controle expressa menos CD146 que as células mistas e mobilizadas ($p=0.004$).

Quanto a frequência de expressão para STRO-1, apenas uma população foi considerada positiva (PAP2). Essa característica alterou a homogeneidade dentro do grupo de células mistas, sendo os dados apresentados quanto a mediana, e sendo utilizado o teste para amostras não paramétricas, Kruskal-Wallis. Não houve diferença estatística entre os grupos estudados ($p=0.37$).

Figura 5.1 – Análise representativa de histograma em escala logarítmica para a porcentagem de expressão dos marcadores CD34, CD44 e CD105, CD146 e STRO-1 nos grupos de células mistas, mobilizadas e controle

Figura 5.2 – (A) Representação gráfica das análises quantitativas das frequências de expressão para os marcadores CD34, CD44, CD105, CD146 e STRO-1 as células mistas, mobilizadas e controle. As diferenças foram consideradas significantes para $p \leq 0.05$. (B) tabela apresentando as maiores e menores frequências para esses marcadores nos grupos estudados

B

	CD 34		CD 44		CD 105		CD 146		STRO-1	
	mín	máx	mín	máx	mín	máx	mín	máx	mín	máx
Mistas	7	9.9	73.4	92.4	0.5	13.1	5.8	13	0.5	4.7
Mobilizadas	7.3	10.8	46.3	84	1	7.9	4.2	10.6	0.4	1.3
Controle	3.7	9.1	58.8	80.1	0.8	6.2	1.3	4.2	0.5	1

5.2. Potencial de Multidiferenciação

Diferenciação osteogênica

Nos resultados obtidos para o potencial de diferenciação osteogênica foi visto que em todas as condições experimentais as células apresentaram potencial de diferenciação osteogênico com deposição mineral, com evidênciação pela coloração de vermelho de Alizarina (Figura 5.3). A partir de uma análise semi-quantitativa, foi notada variações entres as populações e subpopulações estudadas quanto a quantidade mineral depositada. Os dados da análise por tipo e subtipo populacional estão sumarizados na tabela 5.1

Diferenciação adipogênica

Para a diferenciação adipogênica, em uma análise semi-quantitativa, em todas as condições experimentais as células apresentaram capacidade de diferenciação adipogênica, que se caracteriza pela alteração da morfologia celular e formação de vacúolos de gordura citoplasmática. Os vacúolos de gordura podem ser evidenciados pela coloração *oil red* (Figura 5.3). Dentro das populações e subpopulações estudadas, somente a PAP3C não sofreu diferenciação. Notou-se também variações dentro dos tipos e subtipos celulares, sendo que a avaliação semi-quantitativa está sumarizada na tabela 5.1.

Figura 5.3 - Imagens capturadas em microscópio de inversão de fases em aumento de 100X para evidenciar depósito mineral para os grupos de estudo de células de papila apical quando são induzidas para diferenciação osteogênica (depósitos evidenciados por coloração de vermelhos de Alizarina), e formação de vacúolos de gordura citoplasmática quando são induzidas para diferenciação adipogênica (vacúolos de gordura evidenciados por colocação de *oil red*)

A análise semi-quantitativa do potencial de diferenciação das populações e subpopulações estudadas está sumarizada na tabela a seguir:

Tabela 5.1 - Potencial de diferenciação adipogênico e osteogênico das populações e subpopulações celulares estudadas

	Diferenciação Osteogênica	Diferenciação Adipogênica
PAP1	+++	++
PAP1M	++	++
PAP1C	++	++
PAP2	+	++
PAP2M	++	++
PAP2C	++	++
PAP3	++	++
PAP3M	+++	+
PAP3C	+	-

ESCORE: (+) pouco, (++) moderado, (+++) intenso (-) negativo

5.3. Eficiência na formação de colônias

A partir da análise dos dados avaliou-se que as subpopulações mobilizadas formavam mais colônias quando comparadas, tanto com as populações mistas ($p < 0.05$) quanto com as populações controle ($p < 0.01$). Os resultados estão apresentados quando à média e desvio padrão na figura 5.4.

Figura 5.4 – Gráficos de eficiência de formação de colônias das populações de papila apical estudadas, além de imagem representativa das placas coradas mostrando as colônias formadas nas populações mistas, mobilizadas e controle

(**) $p \leq 0.05$

5.4. Avaliação de proliferação por contagem celular, *population doubling* e MTS

Contagem celular e para curva de crescimento e *population doubling*

Nas amostras estudadas quanto ao potencial de proliferação por espaço de tempo, a partir da contagem do número de células, notou-se um padrão de proliferação semelhante em todas as condições estudadas. Não houve diferença estatística entre os grupos de estudo nos tempos de 24 horas ($p=0.82$), 48 horas ($p=0.73$) e 72 horas ($p=0.47$). Os dados estão apresentados em média e desvio padrão nos tempos de 24 e 72 horas visto que os dados foram homogêneos. No tempo de 48 horas foi observada variáveis não homogêneas, sendo apresentados, desta forma, quanto à mediana. Os resultados estão sumarizados na figura 5.7.

Na análise por *population doubling* foi possível observar, de uma forma geral que dentro dos grupos estudados verificou-se um padrão crescimento que segue uma tendência linear (Figura 5.8). Em todas as populações o crescimento em 24 horas costuma ser mais lento, porém em 72 horas as populações apresentam um aumento exponencial, dobrando a população em 1,5- 2 vezes.

Figura 5.5 - Gráficos representando proliferação das populações de células da papila apical. Os pontos nos gráficos representam os valores individuais das amostras nos grupos estudados

Figura 5.6 - Gráficos representando características de *population doubling* das populações de papila apical. Os pontos nos gráficos representam os valores individuais das amostras nos grupos estudados

Proliferação por MTS

No ensaio de proliferação por MTS, assim como observado na curva de crescimento e *population doubling*, não foi possível relacionar um maior potencial proliferativo das células a mobilização por G-CSF. Não houve diferença estatística para os tempos de 24 horas ($p=0.06$) e 48 horas ($p=0.152$) nos grupos de estudo. Para esses dois períodos os dados não foram homogêneos, sendo desta forma apresentados quanto à mediana e intervalo interquartis. Para o tempo de 72 horas os dados amostrais foram homogêneos, sendo desta forma apresentados quanto à média e desvio padrão, porém não foi constatada diferença estatística entre os grupos ($p=0.182$). Os resultados obtidos foram sumarizados nos gráficos da Figura 5.7:

Figura 5.7 - Gráficos representativos do potencial de proliferação por ensaio de MTS das populações de papila apical. Os pontos nos gráficos representam os valores individuais das amostras nos grupos estudados

5.5. Ensaio *in vivo*

Transplante de células mistas

Nas secções histológicas das amostras transplantadas com população mista de células da papila apical (PAP1), em 50% dos indivíduos (2/4) foi possível notar a formação de estrutura composta por matriz amorfa de aspecto eosinofílico envolta por tecido de granulação, em região de derme profunda. Notou-se que o material é permeado por células fusiformes, de núcleo por vezes alongado e por vezes arredondado, com presença focal de células formando espaços vasculares. O tecido de granulação que circunda a região é formado por fibroblastos jovens, vasos neoformados, por vezes congestos, moderado infiltrado inflamatório, predominantemente crônico, porém nota-se coleções neutrofílicas esparsas ao longo do tecido (Figura 5.8 A, B e C). Células gigantes multinucleadas estão presentes focalmente.

Transplante de células mobilizadas

Nos cortes histológicos dos animais em que foram transplantadas as amostras com células mobilizadas da papila apical, por meio de coloração de H&E, não foi possível identificar a presença de tecido formado pelas células transplantadas. Era esperado que, na região entre a pele (representada pelo revestimento epitelial que constitui a epiderme e o tecido conjuntivo que compõe a derme) e a camada muscular adjacente fosse visto ao menos conjunto de células mesenquimais imersas no biomaterial. Não foi notada a presença de infiltrado inflamatório e nos cortes analisados (Figura 5.8 I e J).

Transplante de células migratórias (Controle de membrana C)

Nas secções histológicas das amostras transplantadas com subpopulação controle de membrana (PAP1C), viu-se que de 2/4 dos indivíduos foi possível notar a presença de matriz eosinofílica amorfa circundada por tecido de granulação e localizada na região entre a pele e a fáscia muscular. Foi vista a presença de células fusiformes permeando o material, por vezes formando espaços vasculares. O tecido de granulação que circundante se caracteriza pela presença de fibroblastos jovens, vasos neoformados e moderado infiltrado inflamatório, predominantemente linfoplasmocitário. Focalmente nota-se a presença de neutrófilos e células-gigantes multinucleadas (Figura 5.8 A, B e C).

Transplante de Matrigel (controle sem células)

Nas amostras de controle sem célula, onde somente foi transplantado o biomaterial, notou-se nas secções histológicas a presença de material amorfo, aspecto eosinofílico, em região subcutânea. Nota-se que o material é circundado por tecido conjuntivo frouxo, sem presença de infiltrado inflamatório. Ainda é possível constatar a presença de células fusiformes permeando o material, células essas oriundas do hospedeiro (Figura 5.8 K e L).

Figura 5.8 - Cortes histológicos de transplante da população mista, mostrando em menor aumento estrutura eosinofílica circundada por tecido de granulação em região intra-dérmica (A). Em aumento de 100 x é visível a derme e epiderme (B) e em aumento de 400x é visto tecido de granulação com presença focal de células gigantes (C), além de material eosinofílico amorfo, com presença de células e formação de espaços vasculares (D). Nas secções histológicas do grupo controle de membrana, PAP1C também foi observada a formação de estrutura intra-dérmica (E) circundada por tecido de granulação (F e G) com presença de células povoando região eosinofílica amorfa (H). Nas secções histológicas do grupo de células mobilizadas não foi observada a presença de estrutura em região intra-dérmica (I). Em aumento de 100X é evidenciada a epiderme e derme, seguida da camada de adipócitos, com ausência do material e de inflamação (J). Em K é evidenciado o controle matrigel, sem a presença de células, em aumento de 100x em região intra-dermica e em maior aumento (400x) evidenciando o biomaterial (L). Cortes histológicos em coloração de hematoxilina e eosina (H&E)

6. DISCUSSÃO

Neste estudo foram caracterizadas subpopulações de papila apical mobilizadas por G-CSF, e comparadas com populações mistas e com subpopulações que migravam por gradiente de concentração de soro fetal bovino. Foi possível relacionar o uso do quimiotático na seleção de subpopulação com melhores propriedades clonogênicas, característica determinante de populações enriquecidas de células-tronco. Também foi possível relacionar a mobilização por G-CSF a um imunofenótipo de células que expressam menos CD44.

O presente trabalho foi baseado na metodologia proposta por Murakami em 2013 (4), trabalho pioneiro em que foi desenvolvida a metodologia para mobilização *in vitro*. No estudo em questão, utilizou-se uma população de células da polpa dental. Para a mobilização foi utilizado um transwell de membrana com poro de 8,0 µm que recebeu um tratamento de superfície para inibir a aderência celular. O esperado era que as células quimiotaticamente induzidas passassem livremente pela membrana (4,5). Visto que a membrana foi confeccionada exclusivamente para o estudo, não sendo revelados detalhes quanto ao tratamento de superfície, detalhes protegidos por segredo de patente, não foi possível reproduzir a metodologia em sua plenitude. Em nossa pesquisa optamos pelo uso de membranas de marcas comerciais, que possibilitam a adesão celular. O método foi então adaptado, de forma que as células mobilizadas foram removidas da membrana por meio de tratamento enzimático.

Ao se realizar um tratamento que permita que a célula passe pela membrana livremente, aspectos relacionados a adesão no processo de migração celular são desconsiderados. As células mesenquimais se movimentam entre os tecidos utilizando mecanismos de adesão, alteração no citoesqueleto e formação de prolongamentos citoplasmáticos, características essenciais para o processo de migração, e que induzem modificações fenotípicas (99,100).

Sabe-se que as populações de papila apical apresentam características fenotípicas diferentes das DPSCs, sendo por vezes morfologicamente diferentes no tamanho e granulometria do citoplasma. Nos dados obtidos pela análise de citometria de fluxo (não apresentados), observou-se que as populações de papila apical são heterogêneas nesses aspectos. Desta forma, o tamanho do poro da membrana pode ser relevante. Escolhemos o poro de 5,0 µm por acreditar que o poro de 8,0 µm fosse

muito grande e possibilitaria a passagem de células pequenas independentemente da quimiotaxia (101).

Outro aspecto relacionado a metodologia se trata do tempo de incubação das células para a mobilização. No protocolo desenvolvido por Murakami o tempo de incubação proposto foi de 48 horas, considerado longo tendo por base ensaios de migração e invasão (102). Pela aplicabilidade de princípios básicos de equilíbrio osmótico em membranas se sabe que tempos prolongados de podem afetar o gradiente osmótico entre as câmaras, interferindo na quimiotaxia (103). Portanto, reduzimos o tempo de incubação para 36 horas.

No trabalho realizado por Murakami não foi descrito o controle da membrana. A partir dos nossos resultados observamos que células que migram por indução do soro fetal bovino apresentaram aspectos distintos aos das células mobilizadas pelo G-CSF. Esses aspectos reforçam a hipótese que moléculas bioativas como o G-CSF possuem efeitos seletivos de migração nas células.

Nas caracterizações das amostras por imunofenotipagem foi possível constatar a expressão, mesmo que em baixos índices, para o CD34. O marcador foi adicionado no estudo pois, pela classificação de 2006 (48), é considerado um marcador negativo para populações de MSCs. Desta forma, a expressão positiva para esse marcador não era esperada nas amostras de papila apical. Vale ressaltar que a classificação de 2006 foi a primeira que estipulou critérios mínimos para o uso das MSCs, mas baseados somente em estudos de populações de células mesenquimais da medula óssea e do tecido adiposo. Desta forma, já é de conhecimento comum que as células mesenquimais apresentam diferentes fenótipos, que correspondem aos tecidos das quais elas foram isoladas. Em se tratando das células de origem dentais, que possuem especificidades pela origem na crista neural, talvez seja necessário que sejam estipulados critérios mais direcionados para essas populações, e que estejam atualizados com a literatura vigente.

Um aspecto abordado na classificação de 2006 é a justificativa para afirmar que as populações mesenquimais devem ser negativas para o CD34, e é a possível contaminação por células de origem hematopoiéticas. Para células isoladas da medula óssea isso se torna relevante, visto que as populações hematopoiéticas e mesenquimais compartilham o mesmo nicho. Já para populações celulares de diferentes origens, essa contaminação parece ser improvável. Recentes estudos vêm tentando quebrar esse conceito, provando que pode haver subpopulações CD34+

dentre as MSCs. Em 1991, bem previamente a classificação, foi feito um estudo em que se estabelecia que células da medula óssea CD34 positivas formavam mais colônias, tinham melhor potencial de diferenciação e ainda co-expressavam STRO-1, marcador amplamente reconhecido como marcador mesenquimal (104). Nos nossos experimentos não foi possível fazer uma associação quanto à expressão do CD34 e características de indiferenciação, contudo, em todas as nossas amostras, não foi possível observar uma co-expressão para do STRO-1, que foi considerado negativo nas populações de papila apical estudadas.

Foi possível observar uma relação entre células mobilizadas e diminuição na expressão para CD44. Apesar da expressão de CD44 pareça ser determinante para adesão celular no processo de migração (95), já se sabe que essa molécula está associada a adesão de células mesenquimais por mecanismos de interação com componentes da matriz extra-celular, como o Hyaluronan (105). Desta forma, pode haver uma relação na perda de molécula de adesão para que a célula adquira um fenótipo que possibilite a migração entre os tecidos.

Os estudos progressos de imunofenotipagem das células da papila apical se mostram variáveis quanto à expressão para o CD105. Nos nossos resultados também foi observada uma variação entre as populações nas diferentes condições experimentais, sendo por vezes consideradas negativas, e, quando positivas, correspondendo ao máximo de 13% da frequência. Nossos achados parecem ser consistentes com o que é visto nos tecidos, ou seja, uma expressão pontual em região perivascular (87,88). Desta forma, é difícil acreditar que essa expressão chegue em 90% das células de um tecido, como visto em alguns trabalhos em citometria de fluxo. Isso pode ocorrer devido a alterações fenotípicas que as células sofrem em ambiente de cultura.

Desde que foram descritas por Sonoyama e colaboradores em 2006, as SCAPs são caracterizadas como positivas para a expressão de STRO-1, que reconhecidamente caracteriza populações de MSCs mais indiferenciadas e com características mais clonogênicas (106). Porém, dentro da nossa amostra, apenas uma população foi considerada positiva para o STRO-1 (população mista PAP2). O que precisa ser considerado é que todos as populações mistas obtidas para esse estudo foram isoladas de terceiros molares não erupcionados. O fato das populações serem negativas para STRO-1 nos leva a crer que se tratam de populações imaturas de papila, semelhantes as dNC-OCs que foram previamente descritas. Assim como

as dNC-OCs, as populações de papila apical estudadas nesta pesquisa foram positivas para CD44 e se mostraram altamente proliferativas (89,90).

Um aspecto importante observado nos resultados foi a variabilidade entre as populações. Ao se trabalhar com populações mistas, o que se espera é uma abordagem mais abrangente quando aos aspectos de variabilidade, porém é perceptível que existe diferenças intrínsecas, e que estas são doadores-dependentes. Entender e estudar populações de MSCs, considerando aspectos de variabilidade tem ganhado cada vez mais notoriedade a partir da iniciação de testes clínicos, onde a caracterizações das populações celulares serão feitas a partir de aspectos individualizados.

Que as células-tronco mesenquimais possuem propriedades heterogêneas já é bem entendido. Desta forma, cada vez mais tem se tentado criar padrões mais homogêneos que facilitem a obtenção de protocolos para estudos clínicos. O que se observa é que as técnicas laboratoriais estabelecidas para estudos com as células-tronco não conseguiram gerar protocolos que gerem resultados semelhantes sempre. Além disso a heterogeneidade gera cada vez mais dificuldades de reprodutibilidade (107). Dentro das amostras de papila apical estudadas foi possível notar uma grande variabilidade quando aos resultados obtidos. Essas características de variabilidade de populações de papila apical já foram descritas, onde por vezes foi visto variações de populações de diferentes dentes do mesmo doador (91).

Quanto à proliferação, não foi possível neste estudo encontrar uma relação entre mobilização por G-CSF e aumento no potencial de proliferação. Porém, o que foi possível notar é que em todas as condições experimentais as células de papila apical apresentaram um padrão de crescimento semelhante, com uma tendência linear, mesmo variando entre as taxas de proliferação. Mais uma vez, neste quesito, as características do doador parecem ser determinantes. Foi interessante notar que as populações de papila apical mostram um intenso aumento da taxa de proliferação entre 48h e 72 horas. Acreditamos que isso possa estar relacionado a uma maior interação célula-célula além de um aumento na produção de liberação de fatores de crescimento.

Classicamente os estudos funcionais para as MSCs *in vivo* utilizam modelo de transplante xenotípico, geralmente colocando células humanas em camundongos imunodeficientes. O camundongo mais comumente utilizado é o *nude*, que sofreu alteração para os órgãos linfóides não serem capazes de maturar linfócitos. Desta

forma, esses animais não seriam capazes de produzir uma reação de rejeição aos enxertos. Esse modelo tem se mostrado eficiente para estudos exclusivos de caracterização celular. Mecanismos relacionados com características imunomodulatórias das MSCs já foram descritos, porém ainda não estão completamente entendidos. Portanto, modelos de transplante xenotípicos em animais imunocompetentes podem representar uma ferramenta útil na compreensão da interação das células com o sistema imune do hospedeiro.

No nosso estudo *in vivo* foi observado que, quando as células da papila apical foram transplantadas em animais imunorreativos, o tecido neoformado não tinha aspecto de diferenciação osteo/dentinogênica, como observado nos modelos imunodeficientes. Algo semelhante também foi observado quando células humanas foram injetadas em modelo de defeito ósseo em animais imunocompetentes (108). O que se viu foi as mesmas células que não foram capazes de promover a regeneração óssea nos animais com a imunidade plena, formaram osso no mesmo modelo em animal *nude* (108).

Neste trabalho nos propusemos a mobilizar células da papila apical por G-CSF com o intuito de selecionar células com melhores propriedades terapêuticas. O que foi visto é que as células mobilizadas são mais eficientes para formar unidades de colônias. As células mobilizadas não se mostram mais proliferativas, porém, a diminuição da expressão para CD44 pode indicar melhores propriedades migratórias. Este aspecto ainda precisa ser melhor investigado. Adicionalmente, no estudo *in vivo*, foi visto que, nos grupos em que células da papila apical foram transplantadas, e se tratando de um xenotransplante, essas células não induziram uma resposta inflamatória do tipo corpo estranho, podendo este modelo ser utilizado para estudos de interação das MSCs com o sistema imunológico.

7. CONCLUSÃO

Para as células da papila apical a mobilização por G-CSF selecionou subpopulações mais clonogênicas e que expressam menos CD44. Adicionalmente, as células da papila apical transplantadas em animais imunorreativos não sofrem diferenciação e não induzem reação de corpo estranho.

REFERÊNCIAS¹

1. Shpall EJ. The utilization of cytokines in stem cell mobilization strategies. *Bone Marrow Transplant.* 1999 May;23 Suppl 2:S13-19.
2. Deng J, Zou Z, Zhou T, Su Y, Ai G, Wang J, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells can be mobilized into peripheral blood by G-CSF in vivo and integrate into traumatically injured cerebral tissue. *Neurol Sci Off J Ital Neurol Soc Ital Soc Clin Neurophysiol.* 2011 Aug;32(4):641–51.
3. Kassis I, Zangi L, Rivkin R, Levdansky L, Samuel S, Marx G, et al. Isolation of mesenchymal stem cells from G-CSF-mobilized human peripheral blood using fibrin microbeads. *Bone Marrow Transplant.* 2006 May;37(10):967–76.
4. Murakami M, Horibe H, Iohara K, Hayashi Y, Osako Y, Takei Y, et al. The use of granulocyte-colony stimulating factor induced mobilization for isolation of dental pulp stem cells with high regenerative potential. *Biomaterials.* 2013 Dec 1;34(36):9036–47.
5. Nakashima M, Iohara K. Mobilized dental pulp stem cells for pulp regeneration: initiation of clinical trial. *J Endod.* 2014 Apr;40(4 Suppl):S26-32.
6. Nakashima M, Iohara K, Murakami M, Nakamura H, Sato Y, Aiji Y, et al. Pulp regeneration by transplantation of dental pulp stem cells in pulpitis: a pilot clinical study. *Stem Cell Res Ther.* 2017 Mar 9;8(1):61.
7. Neves VCM, Babb R, Chandrasekaran D, Sharpe PT. Promotion of natural tooth repair by small molecule GSK3 antagonists. *Sci Rep.* 2017 Jan 9;7:39654.
8. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999 Apr 2;284(5411):143–7.
9. Mimeault M, Batra SK. Concise review: recent advances on the significance of stem cells in tissue regeneration and cancer therapies. *Stem Cells Dayt Ohio.* 2006 Nov;24(11):2319–45.
10. Alison MR, Islam S. Attributes of adult stem cells. *J Pathol.* 2009 Jan;217(2):144–60.
11. Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells Dayt Ohio.* 2001;19(3):180–92.
12. Estrov Z. Stem cells and somatic cells: reprogramming and plasticity. *Clin Lymphoma Myeloma.* 2009;9 Suppl 3:S319-328.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

13. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998 Nov 6;282(5391):1145–7.
14. Chung S, Dzeja PP, Faustino RS, Perez-Terzic C, Behfar A, Terzic A. Mitochondrial oxidative metabolism is required for the cardiac differentiation of stem cells. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2007 Feb;4 Suppl 1:S60-67.
15. Folmes CDL, Nelson TJ, Martinez-Fernandez A, Arrell DK, Lindor JZ, Dzeja PP, et al. Somatic oxidative bioenergetics transitions into pluripotency-dependent glycolysis to facilitate nuclear reprogramming. *Cell Metab*. 2011 Aug 3;14(2):264–71.
16. Wu J, Ocampo A, Belmonte JCI. Cellular Metabolism and Induced Pluripotency. *Cell*. 2016 Sep 8;166(6):1371–85.
17. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006 Aug 25;126(4):663–76.
18. Takahashi K. Cellular Reprogramming. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. 2014 Feb [cited 2018 Feb 26];6(2). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3941237/>
19. Simara P, Motl JA, Kaufman DS. Pluripotent stem cells and gene therapy. *Transl Res J Lab Clin Med*. 2013 Apr;161(4):284–92.
20. Mayshar Y, Ben-David U, Lavon N, Biancotti J-C, Yakir B, Clark AT, et al. Identification and classification of chromosomal aberrations in human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 2010 Oct 8;7(4):521–31.
21. Takahashi K, Yamanaka S. A decade of transcription factor-mediated reprogramming to pluripotency. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2016 Mar;17(3):183–93.
22. Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):157–68.
23. Wagers AJ, Weissman IL. Plasticity of adult stem cells. *Cell*. 2004 Mar 5;116(5):639–48.
24. Scadden DT. The stem-cell niche as an entity of action [Internet]. *Nature*. 2006 [cited 2018 Feb 26]. Available from: <https://www.nature.com/articles/nature04957>
25. Jones DL, Wagers AJ. No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 Jan;9(1):11–21.
26. Jacobson LO, Simmons EL, Marks EK, Eldredge JH. Recovery from radiation injury. *Science*. 1951 May 4;113(2940):510–1.
27. Ford CE, Hamerton JL, Barnes DWH, Loutit JF. Cytological Identification of Radiation-Chimæras. *Nature*. 1956 Mar;177(4506):452–4.

28. Becker AJ, McCULLOCH EA, Till JE. Cytological Demonstration of the Clonal Nature of Spleen Colonies Derived from Transplanted Mouse Marrow Cells. *Nature*. 1963 Feb;197(4866):452–4.
29. Till JE, McCULLOCH EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res*. 1961 Feb;14:213–22.
30. Crane GM, Jeffery E, Morrison SJ. Adult haematopoietic stem cell niches. *Nat Rev Immunol*. 2017 Sep;17(9):573–90.
31. Gangenahalli GU, Singh VK, Verma YK, Gupta P, Sharma RK, Chandra R, et al. Hematopoietic stem cell antigen CD34: role in adhesion or homing. *Stem Cells Dev*. 2006 Jun;15(3):305–13.
32. Biasco L, Pellin D, Scala S, Dionisio F, Basso-Ricci L, Leonardelli L, et al. In Vivo Tracking of Human Hematopoiesis Reveals Patterns of Clonal Dynamics during Early and Steady-State Reconstitution Phases. *Cell Stem Cell*. 2016 Jul 7;19(1):107–19.
33. Jones PH. Epithelial stem cells. *BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol*. 1997 Aug;19(8):683–90.
34. Potten CS, Morris RJ. Epithelial stem cells in vivo. *J Cell Sci Suppl*. 1988;10:45–62.
35. Watt FM, Jensen KB. Epidermal stem cell diversity and quiescence. *EMBO Mol Med*. 2009 Aug;1(5):260–7.
36. Clayton E, Doupé DP, Klein AM, Winton DJ, Simons BD, Jones PH. A single type of progenitor cell maintains normal epidermis. *Nature*. 2007 Mar;446(7132):185–9.
37. Klein AM, Nakagawa T, Ichikawa R, Yoshida S, Simons BD. Mouse germ line stem cells undergo rapid and stochastic turnover. *Cell Stem Cell*. 2010 Aug 6;7(2):214–24.
38. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*. 1976 Sep;4(5):267–74.
39. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*. 2002 Dec;13(12):4279–95.
40. Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol*. 2000 Apr;109(1):235–42.
41. Insausti CL, Blanquer M, Bleda P, Iniesta P, Majado MJ, Castellanos G, et al. The amniotic membrane as a source of stem cells. *Histol Histopathol*. 2010;25(1):91–8.
42. Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, Edwards CJ, Moss J, Burger JA, et al. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res*. 2000;2(6):477–88.

43. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Dec 5;97(25):13625–30.
44. Gronthos S, Brahimi J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res*. 2002 Aug;81(8):531–5.
45. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc*. 1991 Sep;9(5):641–50.
46. Wada N, Gronthos S, Bartold PM. Immunomodulatory effects of stem cells. *Periodontol 2000*. 2013 Oct;63(1):198–216.
47. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2005;7(5):393–5.
48. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315–7.
49. 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 Dayt Ohio*. 2007 Jun;25(6):1384–92.
50. Moore KA, Lemischka IR. Stem cells and their niches. *Science*. 2006 Mar 31;311(5769):1880–5.
51. De Bari C, Dell’Accio F, Vandenabeele F, Vermeesch JR, Raymackers J-M, Luyten FP. Skeletal muscle repair by adult human mesenchymal stem cells from synovial membrane. *J Cell Biol*. 2003 Mar 17;160(6):909–18.
52. Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen C-W, Corselli M, Park TS, et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell*. 2008 Sep 11;3(3):301–13.
53. Pang YW, Feng J, Daltoe F, Fatscher R, Gentleman E, Gentleman MM, et al. Perivascular Stem Cells at the Tip of Mouse Incisors Regulate Tissue Regeneration. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 2016 Mar;31(3):514–23.
54. Caplan AI, Sorrell JM. The MSC curtain that stops the immune system. *Immunol Lett*. 2015 Dec;168(2):136–9.
55. da Silva Meirelles L, Caplan AI, Nardi NB. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dayt Ohio*. 2008 Sep;26(9):2287–99.
56. Wang Y, Chen X, Cao W, Shi Y. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. *Nat Immunol*. 2014 Nov;15(11):1009–16.
57. Barbash IM, Chouraqui P, Baron J, Feinberg MS, Etzion S, Tessone A, et al. Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted

myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution. *Circulation*. 2003 Aug 19;108(7):863–8.

58. Xu J, Woods CR, Mora AL, Joodi R, Brigham KL, Iyer S, et al. Prevention of endotoxin-induced systemic response by bone marrow-derived mesenchymal stem cells in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007 Jul;293(1):L131-141.

59. Ji JF, He BP, Dheen ST, Tay SSW. Interactions of chemokines and chemokine receptors mediate the migration of mesenchymal stem cells to the impaired site in the brain after hypoglossal nerve injury. *Stem Cells Dayt Ohio*. 2004;22(3):415–27.

60. Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol*. 2002 Jan;30(1):42–8.

61. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*. 2002 May 15;99(10):3838–43.

62. Katchburian E, Arana-Chavez, V. *Histologia e Embriologia Oral: Texto- Atlas- Correlações Clínicas*. 2a edição. São Paulo: Guanabara Koogan/ Panamericana; 2004.

63. Volponi AA, Sharpe PT. The tooth -- a treasure chest of stem cells. *Br Dent J*. 2013 Oct;215(7):353–8.

64. Sharpe PT. Dental mesenchymal stem cells. *Dev Camb Engl*. 2016 01;143(13):2273–80.

65. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 May 13;100(10):5807–12.

66. Seo B-M, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahimi J, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet Lond Engl*. 2004 Jul 10;364(9429):149–55.

67. Sonoyama W, Liu Y, Fang D, Yamaza T, Seo B-M, Zhang C, et al. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PloS One*. 2006 Dec 20;1:e79.

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

69. Tomar GB, Srivastava RK, Gupta N, Barhanpurkar AP, Pote ST, Jhaveri HM, et al. Human gingiva-derived mesenchymal stem cells are superior to bone marrow-derived mesenchymal stem cells for cell therapy in regenerative medicine. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Mar 12;393(3):377–83.

70. Wang F, Yu M, Yan X, Wen Y, Zeng Q, Yue W, et al. Gingiva-derived mesenchymal stem cell-mediated therapeutic approach for bone tissue regeneration. *Stem Cells Dev*. 2011 Dec;20(12):2093–102.
71. Handa K, Saito M, Yamauchi M, Kiyono T, Sato S, Teranaka T, et al. Cementum matrix formation in vivo by cultured dental follicle cells. *Bone*. 2002 Nov;31(5):606–11.
72. Shi S, Robey PG, Gronthos S. Comparison of human dental pulp and bone marrow stromal stem cells by cDNA microarray analysis. *Bone*. 2001 Dec;29(6):532–9.
73. Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 2003 Apr;18(4):696–704.
74. Király M, Kádár K, Horváthy DB, Nardai P, Rácz GZ, Lacza Z, et al. Integration of neuronally predifferentiated human dental pulp stem cells into rat brain in vivo. *Neurochem Int*. 2011 Sep;59(3):371–81.
75. Petridis X, Diamanti E, Trigas GC, Kalyvas D, Kitraki E. Bone regeneration in critical-size calvarial defects using human dental pulp cells in an extracellular matrix-based scaffold. *J Cranio-Maxillo-fac Surg Off Publ Eur Assoc Cranio-Maxillo-fac Surg*. 2015 May;43(4):483–90.
76. Dissanayaka WL, Zhan X, Zhang C, Hargreaves KM, Jin L, Tong EHY. Coculture of dental pulp stem cells with endothelial cells enhances osteo-/odontogenic and angiogenic potential in vitro. *J Endod*. 2012 Apr;38(4):454–63.
77. Alongi DJ, Yamaza T, Song Y, Fouad AF, Romberg EE, Shi S, et al. Stem/progenitor cells from inflamed human dental pulp retain tissue regeneration potential. *Regen Med*. 2010 Jul;5(4):617–31.
78. Chai Y, Jiang X, Ito Y, Bringas P, Han J, Rowitch DH, et al. Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. *Dev Camb Engl*. 2000 Apr;127(8):1671–9.
79. Nosrat IV, Widenfalk J, Olson L, Nosrat CA. Dental pulp cells produce neurotrophic factors, interact with trigeminal neurons in vitro, and rescue motoneurons after spinal cord injury. *Dev Biol*. 2001 Oct 1;238(1):120–32.
80. Beertsen W, McCulloch CA, Sodek J. The periodontal ligament: a unique, multifunctional connective tissue. *Periodontol 2000*. 1997 Feb;13:20–40.
81. Bartold PM, McCulloch CA, Narayanan AS, Pitaru S. Tissue engineering: a new paradigm for periodontal regeneration based on molecular and cell biology. *Periodontol 2000*. 2000 Oct;24:253–69.
82. Flores MG, Yashiro R, Washio K, Yamato M, Okano T, Ishikawa I. Periodontal ligament cell sheet promotes periodontal regeneration in athymic rats. *J Clin Periodontol*. 2008 Dec;35(12):1066–72.

83. Kim S-H, Kim K-H, Seo B-M, Koo K-T, Kim T-I, Seol Y-J, et al. Alveolar bone regeneration by transplantation of periodontal ligament stem cells and bone marrow stem cells in a canine peri-implant defect model: a pilot study. *J Periodontol*. 2009 Nov;80(11):1815–23.
84. Huang GT-J, Sonoyama W, Liu Y, Liu H, Wang S, Shi S. The Hidden Treasure in Apical Papilla: The Potential Role in Pulp/Dentin Regeneration and BioRoot Engineering. *J Endod*. 2008 Jun;34(6):645–51.
85. Smith AJ, Cassidy N, Perry H, Bègue-Kirn C, Ruch JV, Lesot H. Reactionary dentinogenesis. *Int J Dev Biol*. 1995 Feb;39(1):273–80.
86. Bakopoulou A, Leyhausen G, Volk J, Koidis P, Geurtsen W. Comparative characterization of STRO-1(neg)/CD146(pos) and STRO-1(pos)/CD146(pos) apical papilla stem cells enriched with flow cytometry. *Arch Oral Biol*. 2013 Oct;58(10):1556–68.
87. Ruparel NB, de Almeida JFA, Henry MA, Diogenes A. Characterization of a stem cell of apical papilla cell line: effect of passage on cellular phenotype. *J Endod*. 2013 Mar;39(3):357–63.
88. Chrepa V, Pitcher B, Henry MA, Diogenes A. Survival of the Apical Papilla and Its Resident Stem Cells in a Case of Advanced Pulpal Necrosis and Apical Periodontitis. *J Endod*. 2017 Apr;43(4):561–7.
89. Degistirici O, Jaquiere C, Schönebeck B, Siemonsmeier J, Götz W, Martin I, et al. Defining properties of neural crest-derived progenitor cells from the apex of human developing tooth. *Tissue Eng Part A*. 2008 Feb;14(2):317–30.
90. Gosau M, Götz W, Felthaus O, Ettl T, Jäger A, Morsczeck C. Comparison of the differentiation potential of neural crest derived progenitor cells from apical papilla (dNC-PCs) and stem cells from exfoliated deciduous teeth (SHED) into mineralising cells. *Arch Oral Biol*. 2013 Jun;58(6):699–706.
91. Prateetongkum E, Klingelhöffer C, Morsczeck C. The influence of the donor on dental apical papilla stem cell properties. *Tissue Cell*. 2015 Aug;47(4):382–8.
92. Vanacker J, Viswanath A, De Berdt P, Everard A, Cani PD, Bouzin C, et al. Hypoxia modulates the differentiation potential of stem cells of the apical papilla. *J Endod*. 2014 Sep;40(9):1410–8.
93. Watanabe T, Dave B, Heimann DG, Lethaby E, Kessinger A, Talmadge JE. GM-CSF-mobilized peripheral blood CD34+ cells differ from steady-state bone marrow CD34+ cells in adhesion molecule expression. *Bone Marrow Transplant*. 1997 Jun;19(12):1175–81.
94. Thomas J, Liu F, Link DC. Mechanisms of mobilization of hematopoietic progenitors with granulocyte colony-stimulating factor. *Curr Opin Hematol*. 2002 May;9(3):183–9.
95. Lin W, Xu L, Zwingenberger S, Gibon E, Goodman SB, Li G. Mesenchymal stem cells homing to improve bone healing. *J Orthop Transl*. 2017 Apr 1;9:19–27.

96. Eramo S, Natali A, Pinna R, Milia E. Dental pulp regeneration via cell homing. *Int Endod J*. 2017 Oct 19;
97. Liu J-Y, Chen X, Yue L, Huang GT-J, Zou X-Y. CXCR4 Chemokine Receptor 4 Is Expressed Paravascularly in Apical Papilla and Coordinates with Stromal Cell-derived Factor-1 α during Transmigration of Stem Cells from Apical Papilla. *J Endod*. 2015 Sep;41(9):1430–6.
98. Fayazi S, Takimoto K, Diogenes A. Comparative Evaluation of Chemotactic Factor Effect on Migration and Differentiation of Stem Cells of the Apical Papilla. *J Endod*. 2017 Aug;43(8):1288–93.
99. Grinnell F. Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices. *Trends Cell Biol*. 2003 May;13(5):264–9.
100. Kramer N, Walzl A, Unger C, Rosner M, Krupitza G, Hengstschläger M, et al. In vitro cell migration and invasion assays. *Mutat Res*. 2013 Mar;752(1):10–24.
101. Justus CR, Leffler N, Ruiz-Echevarria M, Yang LV. In vitro cell migration and invasion assays. *J Vis Exp JoVE*. 2014 Jun 1;(88).
102. Eccles SA, Box C, Court W. Cell migration/invasion assays and their application in cancer drug discovery. *Biotechnol Annu Rev*. 2005;11:391–421.
103. The Transwell Migration Assay | Protocol [Internet]. [cited 2018 Feb 26]. Available from: <https://www.jove.com/science-education/5644/the-transwell-migration-assay>
104. Simmons PJ, Torok-Storb B. CD34 expression by stromal precursors in normal human adult bone marrow. *Blood*. 1991 Dec 1;78(11):2848–53.
105. Qu C, Rilla K, Tammi R, Tammi M, Kröger H, Lammi MJ. Extensive CD44-dependent hyaluronan coats on human bone marrow-derived mesenchymal stem cells produced by hyaluronan synthases HAS1, HAS2 and HAS3. *Int J Biochem Cell Biol*. 2014 Mar;48:45–54.
106. Lv F-J, Tuan RS, Cheung KMC, Leung VYL. Concise review: the surface markers and identity of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dayt Ohio*. 2014 Jun;32(6):1408–19.
107. Wagner W, Wein F, Seckinger A, Frankhauser M, Wirkner U, Krause U, et al. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol*. 2005 Nov;33(11):1402–16.
108. Chuang C-K, Lin K-J, Lin C-Y, Chang Y-H, Yen T-C, Hwang S-M, et al. Xenotransplantation of human mesenchymal stem cells into immunocompetent rats for calvarial bone repair. *Tissue Eng Part A*. 2010 Feb;16(2):479–88.

ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Uso de células mobilizadas da papila apical (MSCAPs) na bioengenharia tecidual

Pesquisador: Marília Trieverler Martins

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 48114915.2.0000.0075

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Universidade de São Paulo

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.235.220

Apresentação do Projeto:

O projeto visa investigar células-tronco. Estas foram isoladas da polpa de dentes permanentes. Seu uso parece estar cada vez mais próximo da prática clínica, fato que vai revolucionar os tratamentos odontológicos como são hoje. Na Odontologia, a endodontia regenerativa se destaca por já se encontrar em fase de estudos clínicos em países como a China e Estados Unidos. As células-tronco também já são utilizadas para transplante autólogo em humanos, no tratamento de doenças hematológicas. Para tanto, a população celular precisa ser enriquecida por meio de marcadores, para potencializar suas propriedades. Quanto aos métodos de enriquecimento, há grandes divergências dentro da comunidade acadêmica a respeito da segurança no uso das células após o processo. Pouco se sabe sobre possíveis alterações celulares e moleculares que os métodos podem acarretar. Além disso, quando se trata de células-tronco mesenquimais, a ausência de um marcador específico cria dúvidas da eficiência do processo de enriquecimento. Desta forma, técnicas de enriquecimento baseadas em propriedades exclusivas das células-tronco, aliadas a um processamento com substâncias apropriadas para uso em humanos, parece ser uma melhor alternativa. Isso

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 1.235.220

posto, propõe-se um estudo pré-clínico de regeneração pulpar utilizando o enriquecimento de células-tronco de papila apical a partir da mobilização induzida pela quimiocina fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) — substância que possui aprovação para uso em humanos pela food and drug administration (FDA). As células mobilizadas da papila apical serão avaliadas in vitro quanto as suas propriedades cinéticas de diferenciação, proliferação e clonogenicidade. Já in vivo será avaliado seu uso para regeneração pulpar em modelo de bioengenharia.

Palavras-chave: Células-tronco, papila apical, bioengenharia pulpar.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar o potencial in vivo das células de papila apical mobilizadas, além de seu potencial para regenerar tecido pulpar em coroas descelularizadas. Isolar e caracterizar, in vitro, células mobilizadas da papila apical humana pelo fator estimulador de colônias de granulócitos, e comparar os achados com as já então descritas MDPSCs, SCAPs e DPSCs.
b) Avaliar características histológicas e imuno-histoquímicas das MSCAPs, in vivo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Benefícios: Esta pesquisa visa contribuir com o conhecimento sobre as células-tronco da papila apical, sem benefícios diretos para o doador.

• Riscos e desconfortos: A participação como doador de dentes para essa pesquisa representa um risco mínimo, sem implicação de ordem física ou psicológica. Depois de serem extraídos, pelo cirurgião-dentista, o(s) dente(s) serão armazenados e levados para o laboratório para que as células-tronco sejam retiradas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa investigatória, in vivo e in vitro, para aclarar potencial regenerativo de células na área de Endodontia. A proposta esta bem estruturada. O assunto é relevante.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados: Folha de Rosto, TCLE, Projeto Completo, Autorização do Laboratório e da Clínica Odontológica da FOUSP

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 1.235.220

Recomendações:

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final, utilizando-se da opção "Enviar Notificação" (descrita no Manual "Submeter Notificação", disponível na Central de Suporte - canto superior direito do site www.saude.gov.br/plataformabrasil).

Qualquer alteração no projeto original deve ser apresentada "emenda" a este CEP, de forma objetiva e com justificativas para nova apreciação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto Aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto completo.pdf	31/07/2015 17:52:16		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	31/07/2015 17:53:43		Aceito
Outros	Autorização uso clinica.pdf	10/08/2015 12:25:21		Aceito
Outros	Autorização uso laboratorio.pdf	10/08/2015 12:25:40		Aceito
Folha de Rosto	Folha de rosto.pdf	10/08/2015 12:24:08		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_561666.pdf	10/08/2015 12:26:04		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 1.235.220

SAO PAULO, 18 de Setembro de 2015

Assinado por:
Maria Gabriela Haye Biazevic
(Coordenador)

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br

ANEXO B - Aprovação no Comitê de Ética

Fundada em 1900
"Em constante busca da excelência"

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Comissão de Ética no Uso de Animais
Tel. (11) 3091 7842
ceuafo@usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Uso de células mobilizadas da papila apical (MSCAPs) na bioengenharia tecidual em camundongos", registrada com o nº 030/2015, sob a responsabilidade de Marília Trierveiler Martins e Cibele Pelissaria dos Santos, Adriana Fraga Costa Paris, Elisa dos Santos, Elisangela Chinen, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Odontologia da USP, em reunião de 20/02/2017.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	20/12/2017 A 20/02/2020
Espécie/linhagem/raça	Mus Musculus /heterogênico/Balb-c
Nº de animais	24
Peso/Idade	35g / 9-12 semanas
Sexo	Masculino/feminino
Origem	Biotério da Faculdade de Medicina da USP

São Paulo, 23 de fevereiro de 2017.

Prof. Dr. Victor Elias Arana-Chavez
Coordenador do CEUA-FOUSP

ANEXO C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Faculdade de Odontologia Universidade de São Paulo

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

- **Título do projeto:** Uso de células mobilizadas da papila apical (MSCAP) na bioengenharia de tecidos orais.
- **Pesquisadores:** Marília Triervieler Martins (Responsável) e Cibele Pelissari dos Santos
- **Instituição/Departamento:** Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo/ Departamento de Estomatologia/ Disciplina de Patologia oral e maxilofacial (Av. Prof. Lineu Prestes, 2227 - Cidade Universitária. São Paulo-SP)
- **Local do estudo:** Os dentes serão coletados no curso de Aperfeiçoamento em Cirurgia da Fundação para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico da Odontologia (FFO-FUNDECTO) e o processamento e armazenamento dos tecidos será feito no laboratório de Biologia Celular do Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
- **Convite:** a doação dos seus dentes para esse trabalho é **voluntária** e este consentimento poderá ser retirado a qualquer momento, sem prejuízos para você.
- **Objetivos do estudo:** Estudar o comportamento das células-tronco que são retiradas de tecidos dentais e compreender melhor seus mecanismos de ação tanto em laboratório quanto em animais.
- **Procedimentos:** Depois de serem coletados, os dentes lavados e a papila apical será removida para isolar as células-tronco. Durante o período da pesquisa as células serão armazenadas em nitrogênio líquido. Após o término as células serão descartadas.
- **Benefícios:** Esta pesquisa visa contribuir com o conhecimento sobre as células-tronco da papila apical, sem benefícios diretos pra você.
- **Riscos e desconfortos:** Sua participação como doador de dentes para essa pesquisa representa um risco mínimo, sem implicação de ordem física ou psicológica. Depois de serem extraídos pelo seu cirurgião-dentista, o(s) seu(s) dente(s) serão armazenados e levados para o laboratório para que as células-tronco sejam retiradas.
- **Tempo:** O tempo de coleta e preenchimento da carta de doação é em média 5 minutos.
- **Garantia de sigilo:** As informações fornecidas serão confidenciais e de conhecimento apenas dos pesquisadores responsáveis. Os sujeitos da pesquisa não serão identificados em nenhum momento, mesmo quando os resultados desta pesquisa forem divulgados em qualquer forma.
- **Direito de desistir:** você tem o direito de desistir de participar da pesquisa a qualquer momento, sem nenhuma penalidade para você.
- **Ajuda de Custo:** A doação dos dentes é voluntária, não havendo qualquer auxílio de ordem financeira.
- **Contato:** Em caso de esclarecimentos ou dúvidas entrar em contato pelo (11) 99829-4775 (Cibele Pelissari dos Santos), por e-mail no cibele.santos@usp.br ou (11) 30917902 (Profa. Dra. Marília Triervieler Martins), por email mariliam@usp.br

“Se houver dúvidas sobre a ética da pesquisa entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia (Av. Lineu Prestes 2227, 05508-000 São Paulo, telefone 30917960 ou pelo e-mail cepfo@usp.br)”.

Eu, _____ fui informado, recebi uma cópia desta carta e tive as minhas dúvidas devidamente esclarecidas pelos pesquisadores, portanto, **concordo voluntariamente em doar meus dentes** para serem utilizados nesta pesquisa.

Nome do Paciente: _____

Data de Nascimento: ____/____/____

nºRG _____

Data ____/____/____

Assinatura _____

Pesquisadora responsável:

Prof^ª. Dr^a. Marília Trierveiler Martins
RG 20.522.258-4

Pesquisadora executante:

Cibele Pelissari dos Santos
RG 33.688.075-3