CIBELE PELISSARI

Estudo da interação entre células-tronco transplantadas e células do hospedeiro na bioengenharia pulpar

São Paulo

2014

CIBELE PELISSARI

Estudo da interação entre células-tronco transplantadas e células do hospedeiro na bioengenharia pulpar

Versão Original

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Patologia e Estomatologia Básica e Aplicada.

Área de Concentração: Patologia Bucal

Orientador: Profa. Dra. Andrea Mantesso

São Paulo

2014

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

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

Pelissari, Cibele.
Estudo da interação entre células-tronco transplantadas e células do hospedeiro na bioengenharia pulpar / Cibele Pelissari; orientador Andrea Mantesso. -- São Paulo, 2014.
85 p. : il. : tab., fig. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Patologia e Estomatologia Básica e Aplicada. Área de Concentração: Patologia Bucal. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.
Versão original.

1. Células-tronco - Transplante. 2. Bioengenharia de tecidos. 3. Papila dentária. 4. Tecido conjuntivo. I. Mantesso, Andrea. II. Título.

Pelissari C. Estudo da interação entre células-tronco transplantadas e células do hospedeiro na bioengenharia pulpar. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Patologia e Estomatologia Básica e Aplicada.

Aprovado em: / /2014

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição: _____Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição: _____Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição: _____Julgamento: _____

Dedico essa obra a dois entes queridos, tio Osvaldo *(in memoriam)* e tia Maria (*in memoriam*). A ausência é sentida, mas vocês estarão sempre presentes na memória e no coração.

Dedico com amor e carinho aos meus pais João e Leonete, e à minha irmã Gisele, por sempre estarem ao meu lado em todos os momentos, por sempre apoiarem minhas decisões e pelo amor incondicional que sempre me deram.

Dedico aos meus amigos de patologia pela alegria de conviver com vocês. Vocês fizeram que momentos agradáveis fossem sempre melhores, e outros nem tão agradáveis, mais amenos.

Dedico à querida Marília, por ser um exemplo de profissional e de pessoa, ao qual eu admiro e me espelho.

Dedico com carinho a minhas queridas amigas Catharina, Aline, Gabriela, Fernanda e Carol, que mesmo longe sempre estiveram por perto.

Ao querido Franco, por estar lá, em todos os momentos, e ser o meu apoio e minha alegria.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Andrea Mantesso por ter sido mentora desse projeto, o qual eu tenho muito orgulho de ter feito, e por tudo que me ensinou durante esse processo. Foi, sem dúvida, uma jornada cheia de desafios, mas de fundamental importância no meu crescimento pessoal e profissional.

Ao Professor Fabio Daumas por ceder o espaço no Laboratório de Biologia Molecular para que eu pudesse realizar meus experimentos.

Aos queridos Adriana, Elisa e Juvani, por todo apoio e suporte que me deram, dentro e fora do laboratório. Não esquecendo das queridas Zildinha e Néia, que estão sempre dispostas a ajudar.

À Professora Marina Gallottini, que foi minha primeira orientadora, ainda na graduação, e que me abriu as portas da vida acadêmica.

Ao Felipe, pela paciência em me ajudar quando eu ainda era aluna de iniciação, me mostrando os caminhos para que eu pudesse andar com minhas próprias pernas.

Aos professores Décio, Suzana e Luciana, por toda ajuda e ensinamento que me proporcionaram.

"O que sabemos é uma gota; o que ignoramos é um oceano".

Isaac Newton

RESUMO

Pelissari C. Estudo da interação entre células-tronco transplantadas e células do hospedeiro na bioengenharia pulpar [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2013. Versão Original.

O uso de células tronco já é uma realidade em algumas áreas da Medicina, porém o mesmo não se aplica para a Odontologia, que segue utilizando materiais artificiais para substituir tecidos dentais perdidos. Desde 2000, quando Grothos e colaboradores identificaram células-tronco na polpa de dentes permanentes, os estudos avançaram para que, num futuro breve, essas células possam ser de fato aplicadas para regenerar tecidos dentais, com destaque para a endodontia, onde o uso dessas células parece ser mais iminente. Dessa forma, esse trabalho procurou analisar a co-participação de células humanas transplantadas e células do hospedeiro em um modelo de engenharia pulpar. Para tanto, células de papila apical, enriquecidas ou não para o marcador CD146, foram transplantadas em coroas vazias com colágeno. Dois modelos animais foram utilizados, sendo um modelo transgênico para o gene GFP e outro imunocomprometido pela aplasia do timo *(Nude).* Os resultados foram analisados nos dias 14 e 21 pós-transplante das amostras em cápsula renal. Nas amostras GFP realizou-se imunofluorescência para o marcador anti-GFP, com o objetivo de identificar as células do hospedeiro, enquanto nas amostras *Nude* utilizou-se o marcador lâmina A para identificar as células humanas transplantadas. Nas análises morfológicas de todas as coroas transplantadas houve a formação de um tecido conjuntivo frouxo de celularidade variável, porém com a presença de vasos bem formados com eritrócitos em seu interior, inclusive nas coroas que receberam somente colágeno. Somente as amostras que receberam células houve a formação de osteodentina no espaço pulpar, mas nos tempos experimentais analisados não foi possível visualizar as células humanas. Nas amostras *Nude*, o marcador lâmina A foi negativo para todos os grupos que receberam transplante de células. Nas amostras GFPs, o marcador anti-GFP foi positivo na totalidade das células em todas as amostras estudadas. A partir disso concluiu-se que as células-tronco humanas de papila apical transplantadas apesar de terem desempenhado alguma função fisiológica, não

foram identificadas após 14 e 21 dias e o tecido de polpa neoformado era proveniente do hospedeiro. Adicionalmente, concluímos que não é necessário o transplante de células para a formação de um tecido conjuntivo frouxo no interior da câmara pulpar.

Palavras-chave: Células-tronco. Bioengenharia de tecidos. Papila apical.

ABSTRACT

Pelissari C. Study of the interaction between transplanted stem cells and host cells in pulp bioengineering [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2013. Versão Original.

The use of stem cells is already a reality in some areas of Medicine, but the same does not apply for Dentistry, which keeps on using artificial materials to replace lost dental tissues. Since 2000, when Grothos and colegues identified stem cells in the pulp of permanent teeth, studies advanced so that, in the near future, these cells may actually be applied to regenerate dental tissues, especially in endodontics, in which the use of these cells seems to be more imminent. Thereby, this study sought to examine the co-participation of transplanted human cells and host cells in a model of pulp engineering. For this, apical papilla cells enriched or not to CD146 marker, were transplanted into empty crowns with collagen. Two animal models were used, a transgenic model for the GFP gene and an immunocompromised by thymus aplasia (Nude). The results were analyzed on days 14 and 21 after transplantation of samples into renal capsule. In the GFP samples immunofluorescence was performed for the anti-GFP marker in order to identify host cells, while in the Nude samples the lamina A marker was used to identify the transplanted human cells. In the morphological analysis of all transplanted crowns there was formation of a loose connective tissue of variable cellularity, but with the presence of well-formed vessels with erythrocytes inside, including in the crowns that received only collagen. Osteodentine was formed in the pulp chamber only in the samples that received cell, but after the wait time was not possible to visualize the human cells. In the Nude samples the Lamina A marker was negative for all groups transplanted with cells. In the GFPs samples, the anti-GFP marker was positive for all cells in this group. Based on this it was concluded that despite transplated human stem cells from apical papilla played some physiological function, after 14 and 21 days it was not identified. The pulp tissue was newly formed by the host. Additionally we found that was not necessary the use of cells to form a connective tissue inside the pulp chamber.

Keywords: Stem cells. Tissue engineering. Apical papilla

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ES	do inglês *Embrionic Stem Cells*
EG	do inglês *Embryonic Germ cells*
BMSSC	do inglês *Bone Marrow Stromal Stem Cell*
NK	do inglês *Natural Killer*
iPS	do inglês *induced Pluripotent Stem Cell*
DPSC	do inglês *Dental Pulp Stem Cell*
SHED	do inglês *Stem Cell from human exfoliated deciduous teeth*
PDLSC	do inglês *Periodontal Ligament stem cell*
IDPSC	do inglês *Immature Dental Pulp Stem Cell*
SCAP	do inglês *Stem Cells From Apical Papilla*
DFPC	do inglês *Dental Follicle Precursor Cell*
GFP	do inglês *Green Fluorescent Protein*
HE	coloração de hematoxilina e eosina
PBS	do inglês *Phosphate buffered saline*
MACS	do inglês *Magnetic Activated Cell Sorting*
EDTA	do inglês *Ethylenediaminetetraacetic acid*
RPM	rotações por minuto
DSPP	do inglês *Dentin Sialophosphoprotein*
DSP	do inglês *Dentin Sialo Protein*
DMP	do inglês *Dentin Matriz Protein*
BMP	do inglês *Bone Morphogenetic Protein*
SDF	do inglês *Stromal cell-derived fator*
MTA	do inglês *Mineral Trioxide Aggregate*
VGF	do inglês *Nerve Growth Factor Inducible*

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
ºC	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

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 13
2 REVISÃO DA LITERATURA 15
2.1 Células-tronco: Histórico, populações, definições e propriedades 15
2.2 Populações dentais e uso em Bioengenharia 20
2.3 Polpa dental: bases científicas, reparação e regeneração 29
3 PROPOSIÇÃO 34
4 MATERIAL E MÉTODOS 35
4.1 Modelos animais e desenho geral do estudo 35
4.2 Coleta da Coroas e descelularização 37
4.3 Cultura primária de células da papila apical 39
4.4 Separação de populações enriquecidas em células-tronco 41
4.5 Transplantes em cápsula renal 43
4.6 Processamento das amostras 46
5 RESULTADOS 49
5.1 Análise morfológica do germe dental de P6.5 transplantado intacto em camundongos *Nude* 49
5.2 Análise morfológica de coroas transplantadas preenchidas apenas com colágeno em camundongos *Nude* 50
5.3 Análise morfológica de coroas preenchidas com células de papila apical CD146+ e colágeno em camundongos *Nude* 52
5.4 Análise morfológica de coroas preenchidas com células de papila apical CD146- e colágeno em camundongos *Nude* 53
5.5 Identificação imunoistoquímica das células transplantadas e de células provenientes do receptor do transplante em camundongos *Nude* 54
5.6 Análise morfológica de coroas transplantadas preenchidas apenas com colágeno em camundongos GFP 56
5.7 Análise morfológica de coroas preenchidas com células de papila apical CD146+ e colágeno em camundongos GFP 57
5.8 Análise morfológica de coroas preenchidas com células de papila apical CD146- e colágeno em camundongos GFP 58
5.9 Identificação por imunofluorescência das células oriundas do hospedeiro e de células transplantadas camundongos *GFP* 59
6 DISCUSSÃO 62
7 CONCLUSÕES 68
REFERÊNCIAS 69
ANEXOS 81

1 INTRODUÇÃO

A primeira evidência experimental da existência das células-tronco ocorreu em 1951 (Jacobson et al., 1951). Em mais de meio século de estudos, essa evidência vem revolucionando a medicina e os tratamentos de diversas doenças. Para a Odontologia, os estudos nessa área vieram muito tempo depois, em 2000, quando Gronthos e colaboradores identificaram células-tronco na polpa de dentes permanentes. A partir de então, houve muito avanço no conhecimento nessa área e, especialmente, outras populações de células-tronco dentais foram identificadas e caracterizadas, como as da polpa de dentes decíduos (Miura et al., 2003), as do ligamento periodontal (Seo et al*.,* 2004) e as de papila apical (Sonoyama et al*.*, 2006). Essas descobertas trouxeram novas perspectivas para terapia celular e bioengenharia de tecidos dentais, abrindo um leque de novas possiblidades frente aos tratamentos convencionais.

Contudo, a Odontologia ainda permanece sob o mesmo paradigma há centenas de anos, visto que desde a antiguidade se baseia no uso de materiais artificiais para substituir um tecido ou órgão perdido. Esse panorama tende a mudar nos próximos anos, tendo em vista que as células-tronco se mostram promissoras para diferentes finalidades, com destaque para a Endodontia, onde esse uso além de promissor, também parece ser mais eminente para a prática clínica (Nakashima; Akamine, 2005; Nör, 2006).

A polpa dental é um tecido de arquitetura complexa, formado por diferentes tipos celulares, incluindo um tipo altamente especializado, o odontoblasto, além de uma rede de vasos e nervos. Esse tecido situa-se dentro de uma cavidade rígida formada pelas paredes da coroa e raiz e esse enclausuramento torna o tecido pulpar bastante peculiar em sua capacidade de resposta à agressão e de recuperação (Nakashima; Akime, 2005; Nör , 2006). Durante a agressão, a falta de mobilidade faz com que a pressão que o tecido sofre durante o processo inflamatório culmine em hipóxia tecidual seguida de necrose (Smith et al., 1995). Isso é amplificado ao final do desenvolvimento do dente, quando a rizogênese se completa e a abertura do ápice é reduzida, limitando o fluxo sanguíneo, prejudicando a vascularização (oxigenação) e consequentemente dificultando a reação tecidual. No entanto, sabe-

se que em dentes com o ápice ainda aberto, onde portanto, há mais vascularização e melhor capacidade de resposta, a polpa é capaz de se recuperar frente a um dano (Skoglund et al., 1978; Ding et al., 2009; Thibodeau et al., 2007; Wang et al*.,* 2010). Nesse contexto, fica claro que a fonte de suprimento sanguíneo é fundamental para qualquer processo reparativo e/ou regenerativo.

Sendo assim, células-tronco associadas a fonte de vascularização local e aos fatores de crescimento locais e sistêmicos formam a base para a bioengenharia tecidual pulpar (Langer; Vacanti, 1993).

Atualmente, ainda não foi possível recriar um tecido pulpar estruturalmente igual ao de um dente comum. Isso porque ainda é preciso fundamentar a funcionalidade de cada um desses elementos, além de entender como eles interagem entre si. Temos as peças, mas falta ainda saber como cada uma delas se comporta e funciona no complexo mecanismo da bioengenharia pulpar. Esse entendimento é essencial para que a engenharia tecidual passe a ser uma realidade na odontologia.

Nesse contexto, o presente trabalho pretende elucidar a participação das células-tronco mesenquimais quando transplantadas com o intuito de promover a regeneração pulpar, além de analisar a co-participação de células do hospedeiro receptor nesse processo.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Células-tronco: Histórico, populações, definições e propriedades

Por definição, as células-tronco são células clonogênicas, indiferenciadas e, que possuem capacidade de auto-renovação e diferenciação em múltiplas linhagens (Pittenger et al*.,* 1999; Weissman, 2000; Blau et al*.*, 2001; Mimeault; Batra, 2006; Alison; Islam, 2009).

O processo de divisão celular das células-tronco pode ocorrer de duas formas: simétrica e assimétrica. Na divisão simétrica temos ao final do ciclo de divisão duas células-filhas idênticas. Já a divisão assimétrica, gera uma célula-filha idêntica e outra célula amplificadora transiente (ou célula progenitora), que ainda é pouco diferenciada (Morrison; Kimble, 2006; Yamashita, 2009; Yamashita et al., 2010).

De acordo com sua plasticidade, ou capacidade de diferenciação, as células-tronco são classificadas como totipotentes, pela capacidade de se diferenciar em qualquer tipo de tecido, incluindo embrionários; pluripotentes pela capacidade de gerar tecidos embrionários derivados das três camadas germinativas, e multipotentes pela capacidade em gerar tecidos do mesmo folheto embrionário de origem (Bianco et al., 2001; Lovell-Badge, 2001; Martin-Rendon; Watt, 2003; Estrov, 2009)

A primeira evidência da existência experimental das células-tronco foi efetuada por Jacobson em 1951, quando células sanguíneas foram transplantadas em hospedeiro comprometido por doses de radiação e foi constatado o potencial regenerativo dessas células (Jacobson et al*.*, 1951). Till e McCulloch realizaram, em meado dos anos 60, a primeira experimentação das células-tronco em tecido sanguíneo (Till; McCulloch, 1961; Till et al*.,* 1964). Na década de 70, pesquisadores identificaram uma população de células da medula óssea que possuía um comportamento diferente das já então descritas células hematopoiéticas. Essas células tinham morfologia semelhante a fibroblastos e apresentavam capacidade de formar colônias a partir de uma única célula (Friedenstein, 1976).

Posteriormente, em 1998, Dr. James Thomson e equipe isolaram da camada interna do blastocisto a primeira linhagem de células-tronco pluripotentes

embrionárias humanas (ES do inglês *Embryonic Stem Cell*). Essas células proliferam extensivamente, mantendo-se indiferenciadas *in vitro*; podem se diferenciar em qualquer tipo celular dos três folhetos germinativos (Ectoderma, Endoderma e Mesoderma), além de formar teratomas quando transplantadas em animais imunocompetentes (Thomson et al., 1998). No mesmo ano, Shamblott e equipe, liderados pelo Dr. John Gearhart, isolaram células embrionárias germinativas humanas (EG, do inglês *Embryonic Germ Cells*), derivadas das células primordiais de fetos. Assim como as ES, elas tem o potencial de formar qualquer célula de um organismo vivo (Shamblott et al., 1998). Toda essa versatilidade mostra que essas células possuem um potencial terapêutico extraordinário, porém seu uso em pesquisas envolve aspectos éticos importantes (Wood, 2005; Hyun, 2010).

As células-tronco adultas ou multipotentes podem ser isoladas a partir das células somáticas de um indivíduo. Essas células são responsáveis pela manutenção da homeostasia nos tecidos. Como exemplo de células-tronco/progenitoras adultas temos as células tronco hematopoiéticas, células-tronco epiteliais e as células-tronco mesenquimais (Weissman, 2000; Wagners; Weissman, 2004; Alison; Islam, 2009; Yamashita et al., 2010).

Como acima citado, as células-tronco hematopoiéticas foram as primeiras células-tronco a serem identificadas e caracterizadas (Ford et al., 1956; Jacobson et al., 1951). Essas células têm capacidade clonogênica e de auto-renovação, além de se diferenciarem em qualquer tipo celular da linhagem hematopoiética (Becker et al. 1963; Till, McCulloch, 1961). São células raras, estimadas em 1 para cada 10^6 (Wang et al*.,* 1997), sendo isoladas a partir da medula óssea, do sangue periférico e do cordão umbilical. Se caracterizam pela expressão do marcador CD34, e já são amplamente usadas para transplante em pacientes com doenças de origem hematológica (Hao et al., 1995; Krause et al., 1996; Link et al., 1996; Nakamura et al., 1999; Kai; Hara, 2003)

O tecido epitelial humano é constituído por células poliédricas justapostas que se agrupam formando camadas. A camada mais inferior, conhecida como camada basal, possui células indiferenciadas, que proliferam e se diferenciam para compor as outras camadas. No epitélio, de modo geral, ocorre um processo de maturação fazendo com as células ao passo que se diferenciam, migrem para camadas superiores, chegando em estágio terminal de diferenciação, senescência e morte

(Gavrieli et al., 1992; Jones, 1997). Esse processo tende a ser dinâmico e contínuo, visto que o epitélio está sempre se renovando. As células-tronco correspondem a aproximadamente 10% da camada basal. Conhecidas pela capacidade clonogênica, elas possuem um ciclo de vida mais longo, se mantendo por mais tempo no epitélio. Hierarquicamente, elas dão origem às células amplificadoras transientes, ou progenitoras, que possuem grau intermediário de diferenciação, e são altamente proliferativas. Essas últimas irão se diferenciar para formar as outras camadas epiteliais (Potten; Moris, 1988; Jones, 1997; Clayton et al.,2007; Klein et al., 2010). *In vitro*, as células epiteliais são capazes de proliferar e formar colônias, quando cultivadas sobre *feeder layer* de fibroblastos, e se caracterizam por formar três tipos morfológicos diferentes de clones: os holoclones, meroclones e paraclones. Os holoclones, pelo potencial clonogênico e proliferativo, são considerados como sendo células-tronco de fato. (Barrandon; Green, 1987; Rheinwald, 1989; Calenic et al., 2010; Igarashi et al*.,* 2008).

A primeira população de células-tronco mesenquimais descrita foi isolada da medula óssea e foi chamada de BMSSCs (*bone marrow stromal stem cells*) (Friedenstein, 1976). Estudos subsequentes mostraram que essas células em condições especiais *in vitro,* possuíam a capacidade de diferenciação em múltiplas linhagens, sendo renomeadas por Caplan e colaboradores, em 1991, como células-tronco mesenquimais. Pittenger, em 1999 fez o primeiro ensaio *in vivo* comprovando que essas células possuíam a característica de auto-renovação (Pittenger et al., 1999).

Além da medula óssea, outros tecidos já são conhecidos como fontes de células-tronco mesenquimais, tais como sangue periférico (Zvaifler et al*.,* 2000), cordão umbilical (Erices et al., 2000), polpa dental (Gronthos et al., 2000 e 2002), tecido adiposo (Zuk et al., 2002) entre outros.

Interessantemente, populações de células-tronco mesenquimais de origens diferentes apresentam fenótipos heterogêneos e diferentes taxas de proliferação, porém se assemelham na capacidade de se diferenciar nas linhagens mesenquimais mais comuns (osteogênica, condrogênica e adipogênica), além de expressarem marcadores comuns entre si (Baksh et al., 2007; Augello, 2007)

Em 2005 e 2006 a Sociedade Internacional de Terapia Celular postulou os critérios mínimos para que uma população celular seja considerada como de

células-tronco mesenquimais. São eles: as células devem ser aderentes ao plástico; devem se diferenciar, quando estimuladas, em três tecidos distintos (cartilagem, gordura e osso); devem expressar os marcadores CD105, CD90 (Thy-1) e CD73, e não podem expressar os marcadores de células hematopoiéticas como CD34, CD45 e CD14 (Horwitz et al., 2005; Dominici et al., 2006). É importante salientar que esses critérios foram descritos para células-tronco da medula óssea.

Outros marcadores expressos pelas células-tronco mesenquimais, coincidem com marcadores moleculares de pericitos, como o 3GS, NG2, Sca-1, Stro-1, α-SMA, Thy-1, V-CAM e PDGFβ (Meirelles et al., 2008). Isso sugere uma possível origem perivascular dessas células. Contudo, não é possível identificar um marcador biológico específico, capaz de diferenciar as células-tronco das demais células do organismo (Bianco et al., 2008; Jones; McGonagle, 2008; Morikawa et al., 2009).

Quando nos tecidos, as células-tronco adultas, sob o estado de quiescência, localizam-se em uma região anatômica muito específica: o nicho. Este caracteriza-se como estrutura tridimensional, de componentes celulares heterogêneos permeados por matriz extracelular. Todos os componentes do nicho são responsáveis por regular e modular as funções dessas células. Esses componentes captam fatores externos, interagem entre si liberando sinalizadores que induzem a células-tronco para um estado de ativação, direcionando-a para proliferação, diferenciação, ou auto-renovação (Scadden, 2006; Jones; Wagners, 2008).

Geralmente, quando fora do microambiente do nicho, as células-tronco adquirem limitações funcionais, que alteram suas características originais (Scadden, 2006). Também podem sofrer rearranjo de fenótipo, perdendo expressão de certos marcadores e passando a expressar outros ao serem removidas dos tecidos e colocadas em ambientes *in vitro* (Jones et al., 2002). Além disso, diferente das células-tronco embrionárias, que em cultura se mantém em estado indiferenciado, as células-tronco mesenquimais tendem a mudar sua morfologia, além de perderem a capacidade de diferenciação quando expostas ao ambiente *in vitro* e ao longo das passagens (Takeda et al., 2008).

É certo que, entender a complexidade do nicho parece ser primordial para o entendimento das células-tronco e suas funções. Nesse sentido existe um fator complicador quando se observa que cada tecido possui especificidade de regulação da homeostase, resposta e regeneração. Temos, portanto, uma variação de

propriedades biológicas das células-tronco que depende da fonte da qual foi isolada (Moore; Lemischka, 2006; De Bari; Dell'accio, 2008).

Outra propriedade atribuída às células-tronco mesenquimais é a capacidade migratória. Um estudo clássico utilizou células de medula óssea transfectadas com marcadores fluorescentes que foram injetadas na corrente sanguínea de ratos com infarto do miocárdio. Essas células migraram da corrente sanguínea em direção ao coração ajudando na reparação local do tecido lesionado (Barbash et al., 2003). Estudos subsequentes mostraram que, quando injetadas no sistema circulatório, essas células transitam para áreas previamente lesionadas, como cérebro (Ji et al., 2004), musculatura esquelética (De Bari et al., 2003), rim (Morigi et al., 2004) entre outros tecidos. Acredita-se que essas células respondem à estímulos quimiotáticos de citocinas pró-inflamatórias. Isso foi observado por Xu e colaboradores, em 2007, onde eles utilizaram a Bliominicina, um fármaco quimioterápico conhecido por ser tóxico ao pulmão, concomitantemente com a aplicação intravenosa de células-tronco de medula óssea. Como esperado, as células transplantadas migraram para a região do pulmão evitando a formação de uma reação inflamatória aguda induzida pela droga, além modularem a resposta inflamatória local. Um achado interessante foi que, após um dia, as células transplantadas eram detectadas no local da lesão, porém não estavam presentes após 14 dias. Alguns estudos também sugerem que células transplantadas podem morrer rapidamente ou migrarem para fora do leito de transplante. Isso foi observado quando células com marcadores fluorescentes foram implantas, carreadas por hidroxiapatita, em região subcutânea de ratos isogênicos. Viu-se que o número de células transplantadas caia gradualmente, não sendo mais identificadas no quarto dia pós transplante (Zimmermann et al., 2011).

Todo esse mecanismo de quimiotaxia induzida por citocinas também é associado a mecanismos de imunossupressão. Em um estudo inicial, verificou-se que as BMSSCs quando co-cultivadas com linfócitos CD2+ eram capazes de inibir a proliferação dos linfócitos (Di Nicola et al., 2002). Posteriormente, em um estudo feito em babuínos, verificou-se que as BMSSCs injetadas previamente à colocação de enxerto alogênico de pele, prolongavam a viabilidade do enxerto através da inibição de resposta inflamatória mediada por linfócitos T (Bartholomew et al., 2002). Esses efeitos inibitórios não foram causados por promoção de vias apoptóticas, e sim por supressão de divisão celular. 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 (Wada et al., 2013).

Mais recentemente, Takahashi e colaboradores, liderados por Yamanaka, desenvolveram um método que possibilitou reprogramar uma célula somática, para o estado de pluripotência. Utilizando um lentivírus, quatro fatores de transcrição, sendo eles o c-Myc, o Sox2, Oct3/4 e o Klf4, foram incorporados ao DNA de células tronco mesenquimais, sob condições de cultura de ES. Essas células foram denominadas então iPS (do inglês *induced pluripotent stem cells)*, tendo um comportamento semelhante ao de ESs (crescimento extensivo, diferenciação em células dos três folhetos germinativos e formação de teratomas), além de expressar marcadores de ESs (Takahashi et al., 2007). Esse feito trouxe novas perspectivas para tratamentos de moléstias variadas utilizando células pluripotentes, sem que problemas éticos sejam envolvidos. Isso foi aclamado pela comunidade científica com o prêmio Nobel para Takahashi e Yamanaka no ano de 2012.

2.2 Populações dentais e uso em Bioengenharia

A primeira população de células-tronco de tecidos dentais descrita foi isolada da polpa de dente permanente, em 2000 por Gronthos e colaboradores. Essas células foram caracterizadas e comparadas com as já então conhecidas, células-tronco mesenquimais de medula óssea (Gronthos et al., 2000, 2002). A partir deste momento, outros tecidos dentais se mostraram como fontes para que essas células fossem isoladas. Na tabela 2.1 temos os tecidos dentais mais comuns:

Tabela 2.1 – Células-tronco de tecidos dentais

Tecido de origem	Sigla	Referência
Polpa de dente permanente	DPSCs *(dental pulp stem cells)*	Gronthos et al. (2000, 2002)
Polpa de dente decíduo	SHEDs *(stem cells from human exfoliated deciduous teeth)*	Miura et al. (2003)
Ligamento Periodontal	PDLSCs *(periodontal ligament stem cells)*	Seo et al. (2004)
Papila Apical	SCAPs *(stem cells from apical papilla)*	Sonoyama et al. (2006, 2008)
Folículo Dental	DFPCs *(dental follicle precursor cells)*	Handa et al. (2002)

A seguir, as principais populações dentais serão abordadas em seus pontos básicos:

a. Polpa dental:

O início da formação dental se dá a partir da interação do epitélio oral com o ectomesenquima, tecido que se forma pela migração de células da crista neural durante a embriogênese (Katchburian, Arana-Chavez, 1998; Nanci, 2007). Essa interação ocorre através de um sistema de regulação complexo e dinâmico, que inclui fatores de crescimento, fatores de transcrição e proteínas da matriz extracelular (Thesleff; Sharpe, 1997; Thesleff; Alberg, 1999). Essas interações ocorrem durante todo processo de formação dental. Na dentinogênese, fase de formação do complexo dentino-pulpar, as células da papila dental, são induzidas a se diferenciarem em odontoblastos, que secretarão a matriz para que se forme a dentina primária (Katchburian; Arana-Chavez, 1998; Sonoyama et al., 2008). Estes odontoblastos são o resultado da proliferação e diferenciação de células precursoras residentes em algum lugar da polpa dental. Apesar de extensivas pesquisas sobre o desenvolvimento dental e das inúmeras células especializadas encontradas no dente, pouco se sabia sobre as características e as propriedades das células precursoras dentais no organismo adulto (Lovell-Badge, 2001).

Em 2000, Gronthos e colaboradores identificaram uma população de células da polpa dental humana com um comportamento semelhante às ditas células-tronco de medula óssea. Essa células, *in vitro*, sob indução, tinham capacidade de diferenciação osteogênica, condrogênica e adipogênica. Além disso, tinham um aspecto peculiar: quando transplantadas *in vivo* com hidroxiapatita formavam um tecido semelhante ao dentino-pulpar, composto de matriz mineralizada tubular apresentando prolongamentos de odontoblastos, além de um tecido fibroso contendo vasos sanguíneos em arranjo similar ao encontrado no dente humano.

Por se tratar de um estudo inicial, essa população de células foi classificada como sendo de células progenitoras mesenquimais. Mesmo assim, quando comparada com células-tronco mesenquimais de medula óssea (BMSSCs) nas mesmas condições de cultivo, ambas apresentavam o mesmo perfil imunológico e mostravam o mesmo padrão de expressão para mais de 4.000 genes humanos

conhecidos (Shi; Gronthos, 2003). Outra semelhança encontrada é que tanto as DPSCs quanto as BMSSCs expressavam o marcador MUC-18 (CD146), conhecido por ser positivo para células endoteliais e pericitos (Gronthos et al., 2000).

Apesar das DPSCs e BMSSCs apresentarem semelhanças quando comparadas em relação à formação de colônias, proliferação e diferenciação, ainda era preciso provar que as DPSCs possuíam a capacidade de auto-renovarção (característica básica de uma célula-tronco). Por isso Gronthos e seus colaboradores, em 2002, transplantaram as DPSCs em camundongos e, após um período, células mesenquimais humanas foram re-isoladas desses transplantes, re-expandidas em laboratório e re-transplantadas em animais imunodeficientes, gerando um tecido similar ao complexo dentino pulpar que expressava DSPP (*dentin sialophosphoprotein*) sem prévia indução. Essas células ainda se mostraram capazes de se diferenciar em adipócitos e células neurais (Gronthos et al., 2002). Dessa forma, essa população derivada de polpa de dentes humanos foi considerada uma população de células-tronco mesenquimais.

Constatou-se que tanto as DPSCs quanto as BMSSCs expressam marcadores perivasculares, como o STRO-1 e o CD146. Essa análise foi realizada por meio de citometria de fluxo em células isoladas de tecidos frescos. Quando feita a marcação *in situ* notou-se que no tecido pulpar, ambos marcadores são expressos em região perivascular, sendo que o STRO-1 também era expresso em regiões perineurais. Populações de células de polpa enriquecidas para esses dois marcadores apresentavam maior potencial de formação de colônia, em comparação às populações não enriquecidas (Shi; Gronthos, 2003).

Baseando-se no potencial osteogênico das DPSCs, um grupo pioneiro na utilização dessas células pra uso em humanos, criou um modelo de transplante autólogo para reparação de defeitos ósseos. Para tanto, células de terceiros molares extraídos foram isoladas e cultivadas *in vitro*. Após serem expandidas de forma a haver quantidade suficiente para viabilizar o transplante, essas células foram posteriormente enxertadas no mesmo paciente, por meio de uma esponja de colágeno, que serviu como anteparo, sobre o defeito ósseo. Nos sete pacientes que passaram pelo procedimento houve a reparação do tecido com neoformação de osso lamelar (d’Aquino et al., 2009).

As DPSCs também mostraram capacidade de regenerar tecidos neurais, em um estudo feito em ratos. Após serem isoladas, elas passaram previamente por indução neurogênica *in vitro*. Quando transplantadas em meio ao líquido cefalorraquidiano, essas células migraram para região de lesão cortical, integrando o tecido e mostrando propriedades neuronais, como expressão de marcadores específicos e exibindo canais de voltagem dependentes de sódio e potássio (Király et al., 2011).

Além de ser encontradas em tecido pulpar sadio, as DPSCs também foram isoladas de tecido pulpar inflamado utilizando os marcadores STRO1 e CD146. Viu-se que as células do tecido inflamado possuem características semelhantes às células isoladas de tecido pulpar normal, mas possuem algumas de suas propriedades afetadas, como a capacidade de diferenciação. Apesar disso, elas mostraram possuir potencial de regeneração tecidual (Alongi et al., 2010).

Além das DPSCs, uma população mais imatura também já foi descrita a partir de tecido pulpar humano, as IDPSC (do inglês *Immature Dental Pulp Stem Cell*). Essas células, em comparação às DPSCs, caracterizam-se por serem mais indiferenciadas. Quando em cultura, apresentam alta taxa proliferativa, se mostrando estáveis a expansão em até 25 passagens, mantendo o cariótipo e expressão de marcadores. Além disso, expressam marcadores de células-tronco embrionárias como o Oct-4, Nanog, SSEA-3. SSEA-4, TRA-1-60 e TRA-1-81, expressando também marcadores comuns de células mesenquimais. Sob indução *in vitro* as IDPSCs possuem capacidade de diferenciação em musculatura lisa e esquelética, neurônios, cartilagem e osso. Quando transplantadas *in vivo* elas ainda são capazes de se incorporarem a vários tecidos (Kerkis et al., 2006).

Nesse contexto, quando se estuda as células de origem odontogênicas, sabe-se que a transição de dente decíduo para dente permanente é um processo único e dinâmico no qual o desenvolvimento e a erupção do dente permanente são coordenados simultaneamente com a reabsorção das raízes dos dentes decíduos. Esse processo pode levar cerca de sete anos nos humanos até a completa substituição dos dentes decíduos pelos dentes permanentes (Parner et al., 2002). Dessa forma, dentes decíduos esfoliados são uma fonte importante de tecido viável uma vez que tal tecido pode ser retirado sem ocasionar trauma ou morbidade ao paciente (Seo et al., 2008).

Assim sendo, em 2003, Miura e colaboradores encontraram na polpa de dentes decíduos uma população de células-tronco capaz de se diferenciar em uma variedade de tipos celulares incluindo células neurais, odontogênicas e adipócitos. As células-tronco encontradas nos dentes decíduos, as SHEDs (do inglês *stem cells from exfoliated deciduous teeth*) são diferentes de DPSCs em relação a sua maior taxa de proliferação, maior capacidade de formar colônias, capacidade de osteoindução *in vivo* e incapacidade de reconstituir o complexo dentino-pulpar maduro como as DPSCs. As SHEDs aparentemente representam uma população de células multipotentes que talvez sejam mais imaturas do que as células-tronco adultas (DPSCs) (Miura et al., 2003).

É notável que as SHED expressem marcadores de células neurais e gliais, que podem estar relacionados com origem em células da crista neural que formam a polpa dental (Chai et al., 2000). Células da crista neural possuem papel fundamental no desenvolvimento embrionário, dando origem a uma variedade de tipos celulares tais como células neuronais, pigmentares, de musculatura lisa, de cartilagem craniofacial e osso (LaBonne; Bronner-Fraser, 1999).

As células da polpa dental de dentes decíduos são capazes de produzir fatores neurotróficos e podem ainda resgatar neurônios motores após injúria da medula espinhal (Nosrat et al., 2001). Estas evidências suportam a ideia de que células-tronco de tecidos não neurais podem ser capazes de se diferenciar em células neurais oferecendo a possibilidade de tratamento para injúrias do tecido neural ou ainda doenças degenerativas (Miura et al., 2003).

b. Ligamento periodontal:

O ligamento periodontal é um tecido situado entre o osso alveolar e o cemento, tendo em sua estrutura 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. Tanto o cemento, quanto o osso alveolar e o ligamento periodontal são formados simultaneamente durante o desenvolvimento dental e formam o complexo periodontal. Esse complexo tem a função de sustentação, além de promover

resistência mecânica pela absorção das cargas mastigatórias. Promove também a nutrição, homeostase e reparação tecidual local (Bartold; McCulloch, 2000; Shimono et al., 2003).

Em 2004, um grupo de pesquisadores isolou uma população de células do ligamento periodontal com características de multipotência, as 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 imunocompotentes, as PDLSCs formavam um tecido semelhante ao complexo periodontal e também tinham capacidade de regenerar o tecido periodontal quando transplantadas em regiões previamente lesionadas (Seo et al., 2004).

A doença periodontal é uma doença crônica, multifatorial, que se caracteriza pela perda definitiva do tecido se sustentação do dente, podendo levar a perda dental (Pihlstrom et al., 2005). Dada essa característica, o uso das PDLSCs se apresenta como altamente promissor na pratica clínica, com a finalidade de promover regeneração dos tecidos periodontais perdidos pela doença. Para isso modelos de estudo foram desenvolvidos para elucidar melhor o comportamento dessas células (Han et al., 2013).

Em um estudo para avaliar o potencial regenerativo das PDLSCs *in vivo*, células humanas foram transplantadas em região de defeito ósseo de ratos atímicos. Para isso foi elaborado um construto de camadas de células cultivadas em meio de indução osteogência, que foi enxertado na região do defeito periodontal. Após 5 semanas, houve a regeneração do defeito, com a formação tecido semelhante a cemento além de fibras colágenas (Flores et al., 2008).

Com intuito de avaliar a capacidade osteogênica in vivo das PDLSCs em um estudo piloto, um grupo utilizou um modelo de defeito ósseo ao redor de implantes, em mandíbulas de cães, modelo esse já bem estabelecido na literatura para de regeneração óssea guiada. Para tanto, um construto de cerâmica porosa de hidroxiapatita contendo PDLSCs autólogas, foi enxertado na região do defeito ósseo. Passados os tempos de espera de 8 e 16 semanas, ocorreu neoformação óssea. A

ser comparado ao grupo controle (construto sem células), o tamanho no osso formado pelo grupo das PDLSCs era significativa maior (Kim et al., 2009).

Já em um estudo pré-clínico, foi explorado o potencial terapêutico do uso das PDLSCs autólogas na tentativa de regenerar defeitos periodontais em um modelo de periodontite em porcos. Para isso, uma lesão periodontal foi criada em região de primeiro molar, pela remoção cirúrgica de osso cervical. Após serem expandidas, as PDLSCs foram transplantadas na área do defeito periodontal, e se mostraram capazes de regenerar os tecidos periodontais perdidos (Liu et al., 2008).

c. Papila Apical

Um tecido de superfície macia formado no ápice de dentes não totalmente formados chamou a atenção de um grupo de pesquisadores. Denominada de papila apical, esse tecido mostrou-se não ser idêntico ao tecido pulpar. Morfologicamente em comparação à polpa, ele se apresentava menos celularizado e menos vascularizado. Também se notava uma região rica em células localizada entre a polpa imatura e a papila, dando a impressão deste estar ligeiramente separado da polpa. Isso se confirmava no exame macroscópico, visto que a papila era facilmente destacada da região apical (Sonoyama et al., 2008).

Durante a formação dental, a interação do epitélio oral com o ectomesenquima vai originar a papila dental. É a partir desta que se forma o complexo dentino pulpar radicular. Logo, há indícios de que a papila apical seja um resquício embriológico da papila dental (Nanci, 2007; Sonoyama et al., 2008).

As células da papila apical, as ditas SCAPs (do inglês *Stem Cells from the Apical Papilla*), parecem ser a fonte de odontoblastos primários que são responsáveis pela formação da dentina primária e secundária radicular, sendo as DPSCs fontes de substituição de odontoblastos responsáveis por secretar dentina terciária ou reparativa (Smith et al., 1995; Sonoyama et al., 2008). Dada essas características, Sonoyama e colaboradores decidiram isolar e caracterizar essas células, comparando-as com as DPSCs.

Quando em cultura utilizando Brdu (análogo sintético da timina, que se incorpora no DNA de células em proliferação), foi possível observar que as SCAPs proliferavam mais que as DPSCs. Ambas populações (SCAPs e DPSCs) tinham

potencial semelhante de diferenciação ostogênica e adipogênica. Na análise imunoistoquimica das células, as SCAPs apresentavam marcação positiva pra CD146 e STRO-1, assim como as DPSCs. Porém, diferente das DPSCs, também expressavam marcadores neurais como βIII tubulina, GAD, Neu N, neurofilamentos M e Nestin (Sonoyama et al., 2008). Quando feita a análise de expressão de marcadores através de citometria de fluxo, verificou-se que, em passagem 1 as SCAPs expressavam STRO-1 (18,12%) e CD146 (72,3%), além de outros marcadores de células-tronco mesenquimais como C90, CD73 e CD 105. Um dos achados foi o marcador CD24, que não é expresso nas DPSCs e nas BMSSCs, podendo ser um possível marcador específico para as SCAPs. Quando transplantadas em camundongos imunodeficientes, utilizando a hidroxiapatita como carreador, essas células formavam tecido semelhante a dentina (Sonoyama *et al*., 2006). Em virtude dessas características, a célula-tronco da papila apical vem sendo apontada como sendo uma excelente fonte para promover a regeneração pulpar. Mas, para que seu uso seja viável, ainda é preciso avaliar os efeitos que longos períodos em cultura têm sob essas células. O que foi observado é que, após 20 passagens essas células tiveram alteração no padrão de marcação, além de terem genes relacionados no processo de diferenciação suprimidos (Ruparel et al., 2013).

Com o intuito de caracterizar melhor as SCAPs, Bakopoulou e colaboradores, resolveram enriquecer populações de células da papila apical, assim como também realizar diferentes combinações baseando-se na expressão do CD146 e o STRO1. Para isso, células de cultura primária foram expandidas até sexta passagem, quando foi realizada a separação por meio de citometria de fluxo. O que foi observado é que as células CD46+/STRO-1+ tinham maior eficiência clonogênica, ou seja, formavam mais colônias, tinham maior potencial de diferenciação osteogênico e aumentam a expressão para alguns marcadores de células-tronco embrionárias (Bakapoulou et al., 2013).

Já em outra tentativa de avaliar o potencial regenerativo das SCAPs *in vivo*, elas foram co-transplantadas com células PDLSC usando hidroxiapatita como veículo carreador, evidenciando a formação de cemento com fibras colágenas ancoradas na superfície da hidroxiapatita. Posteriormente, as células SCAP foram plaqueadas no interior de um bloco de hidroxiapatita com formato de raiz contendo um canal para posterior acoplamento de uma coroa cerâmica. Externamente, essa

“raiz” de hidroxiapatita foi circundada por Gelfoam® contendo células PDLSCs e foi implantada na região incisiva de um minipig. Depois de 3 meses do implante no osso alveolar, o bloco de hidroxiapatita foi aberto e uma coroa de porcelana foi cimentada e colocada em função por 4 semanas. A análise histológica e por tomografia computadorizada confirmou que a raiz e o ligamento periodontal do animal estavam regenerados (Sonoyama et al., 2006).

Uma grande preocupação para o uso das células-tronco na pratica clínica se relaciona a possibilidade de rejeição do organismo receptor ao enxerto ou transplante. Assim como as BMSCs, as SCAPs apresentaram, em estudos *in vitro*, possuírem capacidade de imunomodulação. Ao serem co-cultivadas com linfócitos-T elas foram capazes de suprimir a proliferação dessas células através de mecanismos independentes de apoptose (Ding et al., 2010).

d. Folículo Dental:

O folículo dental é um tecido de desenvolvimento que envolve o dente não erupcionado. A presença desse tecido parece ser primordial para que ocorra a erupção dental (Cahill; Marks, 1980), podendo ser um possível regulador da osteogênese do osso alveolar (Wise; Yao, 2006; Morsczeck, 2006). Esses aspectos levaram a acreditar que esse tecido poderia ser uma fonte de células-tronco. Isso se iniciou quando Handa e colaboradores transplantaram células do folículo dental associadas a hidroxiapatita em animais imunodeficientes, e verificou que essas células formavam um tecido semelhante a cemento (Handa et al., 2002).

Em estudos subsequentes viu-se que essas células, quando isoladas do folículo de terceiros molares humanos tinham aspecto de fibroblastos e formam colônias quando em cultura. Elas ainda expressavam marcadores de células-tronco mesenquimais, como o Notch-1 e o Nestin. Quando transplantadas *in vivo* elas formavam um tecido semelhante a ligamento periodontal (Morsczeck et al., 2005). Acredita-se que esse tecido contém células-tronco e linhagens progenitoras de cementoblastos, células do ligamento periodontal e osteoblastos. *In vitro* essas células apresentavam capacidade de diferenciação osteogênica, adipogênica e neurogênica (Yao et al., 2008).

Estas diferentes populações de células-tronco dentais apresentam características peculiares. Desta forma, acredita-se que a determinação da população adequada a ser utilizada em cada área da odontologia será de suma importância. Assim sendo, para a aplicação terapêutica endodôntica/restauradora destas células ainda é necessário elucidar melhor seu comportamento.

2.3 Polpa dental: bases científicas, reparação e regeneração

O processo de formação do órgão dental é chamado odontogênese. Inicia-se como resultado da interação entre o epitélio oral e o ectomesênquima subjacente, originando a banda epitelial primária e em seguida a lâmina dentária (Katchburian; Arana-Chavez, 1998; Kollar; Mina, 1991). Trata-se de um complexo sistema de interações celulares que começa no início da embriogênese, na região do primeiro arco branquial (Orban; Balint, 1966; Thesleff; Sharpe, 1997)

A polpa dental é um tecido de origem ectomesenquimal que se desenvolve a partir da papila dental O desenvolvimento da polpa dental se dá nos estágios iniciais da vida embrionária (na oitava semana em serem humanos). A polpa dental se origina a partir da proliferação e condensação de elementos mesenquimais, (a papila dental), na base final do órgão dental. Durante a evolução do processo de odontogênese, ocorre a vascularização da papila dental, com penetração de ramos da artéria alveolar, e, a transição da papila em polpa, pela diminuição das células ectomesenquimais e o surgimento dos fibroblastos. Nesse período podemos observar o aumento das fibras colágenas na matriz extracelular (Orban; Balint, 1966; Katchburian; Arana-Chavez, 1998; Nanci, 2007).

A função primária da polpa é produzir dentina. Para tanto, ela é composta por uma rede vascular que inclui vários tipos celulares e na sua periferia se encontram células polarizadas altamente especializadas com prolongamentos conhecidas como odontoblastos. Essas células podem secretar dentina durante toda sua vida, mas, após um dano tecidual, a dentina formada é conhecida como terciária, e pode ser de dois tipos. Uma que se forma a partir de odontoblastos pré-existentes, que é a dentina reacional, e outra formada a partir de odontoblastos recém diferenciados conhecida como dentina reparativa ou osteodentina (Smith et al., 1995).

A polpa possui capacidade de responder a danos, como cárie, abrasão, erosão e à procedimentos restauradores. Nesses casos, a dentina tubular sinaliza para os odontoblastos, que promovem a deposição de dentina terciária local. Essa deposição invariavelmente tende a diminuir a permeabilidade da dentina, e consequentemente afeta essa sinalização. Na persistência do estímulo danoso, o odontoblasto pode entrar em processo de morte celular, induzindo a diferenciação de células progenitoras para repor a célula perdida. Apesar desse sistema de reparo, a polpa possui capacidade de resposta restrita, devido às características peculiares do tecido. Temos então que, frente à infecção bacteriana ou mesmo frente à traumas, neuropeptídios são liberados, aumentando a permeabilidade capilar, resultando em acúmulo de fluido extracelular. Esse acúmulo tende a estimular a sinalização de células inflamatórias, que se acumulam dentro da polpa liberando citocinas na tentativa de iniciar uma reparação tecidual. No caso de agudização da inflamação, o aumento da pressão pulpar pode levar a necrose do tecido (Tziafas et al., 2000). Mesmo com essas limitações, estudos mostram que dentes com rizogênese incompleta possuem capacidade de se regenerar, mesmo após necrose pulpar, formando um novo tecido pulpar vascularizado (Thibodeau et al., 2007).

Quando a polpa é irreversivelmente infectada, o tecido pulpar dental requer tratamento endodôntico que envolve a remoção do tecido inflamado/infectado, resultando em uma cavidade que será obturada com um material artificial e inerte. A consequência desse tratamento é a desvitalização da raiz, que passa a ser acelular e sem suprimento sanguíneo. Para alcançar uma alternativa desejável, não sacrificando o tecido pulpar inteiro, técnicas de regeneração baseadas em uso de células estão sendo desenvolvidas (Mooney et al., 1996; Huang, 2009; Demarco et al., 2011).

A concepção de engenharia de tecidos para substituir polpa doente, ausente ou traumatizada é conhecida como endodontia regenerativa (Nakashima, Akamine, 2005; Murray et al., 2007). Esta é uma nova área da Odontologia para regeneração dental, e os benefícios em potencial são enormes, tanto para pacientes quanto para profissionais. Com o objetivo de conseguir realizar a total revitalização pulpar, os estudos se baseiam em três alicerces principais: células-tronco, arcabouços (armações, molduras ou bases) e proteínas bioativas (Langer; Vacanti, 1993).

Os arcabouços possuem papel fundamental na terapia regenerativa, pois vão servir como apoio e/ou guia para que as células possam se desenvolver e se diferenciar. Para tanto, o arcabouço utilizado deve possuir certas características para que a regeneração do tecido seja bem sucedida, como apresentar porosidade suficiente que mimetize o ambiente extracelular natural da dentina e biocompatibilidade. Nesse contexto o uso do colágeno I parece ser desejável para a bioengenharia pulpar, visto que esse é um dos principais componentes da matriz orgânica da dentina, correspondendo a cerca de 80% dessa matriz. A importância dessa molécula se dá não só pelo seu papel estrutural, mas também pela sua maleabilidade tornando essa proteína um componente desejável de uma armação biocompatível (Miyata et al., 1992; Glowacki, Mizuno, 2008). Além disso, o colágeno I ajuda a acelerar a diferenciação odontogênica e a mineralização das células pulpares (Huang, 2009; Wang et al., 2011; Demarco et al., 2011).

Quanto ao componente celular, as células-tronco mesenquimais se apresentam como boas alternativas para promover a regeneração pulpar. No caso das DPSCs, em resposta a injúria como cárie ou atrito, sabe-se que elas podem se diferenciar em múltiplos tipos celulares como odontoblastos, células endoteliais e perivasculares e fibroblastos (Smith et al., 1995; Gronthos et al.,2000, 2002). Além disso, possuem a capacidade de gerar um tecido semelhante ao complexo dentino-pulpar, composto por matriz mineralizada, com formação tubular associada a odontoblastos acompanhada de um tecido fibroso contendo vasos sanguíneos, muito semelhante ao que ocorre no tecido dental normal (Gronthos et al.,2000; 2002). Já as SCAPs possuem a capacidade de formar dentina primária e são consideradas células derivadas de tecidos que podem ser facilmente acessados em dentes em formação (Sonoyama et al., 2006).

Ao promover a regeneração pulpar, espera-se que o tecido neoformado seja funcional. Para tanto, o tecido regenerado precisa ser vascularizado e inervado; precisa ter densidade celular adequada e arquitetura de uma polpa normal, além de formar odontoblastos que produzam dentina. Todo esse processo exige o uso de fatores de crescimento que induzam a angiogênese, como os VGFs e o PDGFs (Huang, 2009).

Tendo em vista a complexidade do tecido pulpar, modelos de estudo estão sendo desenvolvidos com a finalidade de elucidar mecanismos da regeneração

pulpar mediada por células-tronco, como também para servirem como estudos pré-clínicos visando aplicações futuras (Nör, 2006; Huang, 2009).

No ano de 2008, Cordeiro e colaboradores idealizaram um modelo de regeneração pulpar utilizando fatias de dentes preenchidas com células-tronco de dentes decíduos imersas em um anteparo sintético de poli-L ácido acético. Esse conjunto foi transplantado em dorso de camundongos imunocomprometidos. Dentro da câmara pulpar, passado o período de 4 semanas, houve a formação de um tecido semelhante a polpa, com vascularização e células semelhantes a odontoblastos que expressavam DSP (do inglês *Dentin Sialo Protein*).

Através do mesmo modelo, outro estudo da regeneração pulpar foi realizado. Dessa vez, porém, foram utilizadas as DPSCs como fonte celular, e o colágeno I gel como anteparo, além de utilizar DMP-1 (do inglês *Dentin Matriz Protein*) como fator de crescimento. Após 6 semanas notou-se a formação de um tecido semelhante a polpa, com vasos neoformados, contudo, células semelhantes a odontoblastos não estavam presentes. Nesse estudo relevou-se que o uso do colágeno promove a formação de tecido semelhante a polpa, porém, a apresentação deste em gel mostrou ser desfavorável, visto que a contração do material impediu a adesão do tecido à dentina (Prescott et al., 2008).

Essa peculiaridade pôde ser observada por Huang e colaboradores. Nesse estudo um construto foi elaborado a partir de um fragmento de raiz dental que foi instrumentado com a finalidade de alargar a porção pulpar. Dentro dessa raiz adicionou-se células-tronco de polpa dental imersas em colágeno gel. Um lado da raiz foi obturado com MTA. O outro lado ficou aberto para promover a vascularização. Esse construto foi então transplantado em dorso de camundongos imunocomprometidos e novamente viu-se a formação de tecido semelhante a polpa. Assim como no estudo de Prescott, houve formação de vasos, porém células semelhante a odontoblastos não estavam presentes. Nesse estudo a contração do colágeno em gel também pôde ser notada. Assim, utilizando esse mesmo modelo, células SCAPs foram transplantadas utilizando matriz sintética de poli-L ácido acético. Dessa vez houve a formação de um tecido vascularizado semelhante a polpa com deposição de uma camada uniforme de dentina neoformada (Huang et al., 2010).

Outro modelo proposto para estudo em regeneração pulpar foi realizado por Iohara e colaboradores em 2004. Nesse modelo, dentes de cães tiveram a polpa extirpada e o canal instrumentado com uso de limas endodônticas. O canal foi então preenchido com um *pellet* de células de polpa dental suplementado com BMP2. Após 28 dias verificou-se que no lugar da polpa houve a formação de grande quantidade de dentina reparativa. Já em 2009, a partir do mesmo modelo em cães, no lugar da polpa removida endodonticamente, foram transplantadas células-tronco de polpa dental imersas em colágeno utilizando SDF-1 como fator de crescimento. Após 28 dias houve a neoformação de um tecido vascular semelhante a polpa, e também ocorreu a neoformação de dentina (Iohara et al., 2004, 2009).

Tendo esses estudos como base, sabemos que a regeneração pulpar é possível, porém, ainda é preciso elucidar melhor o processo que leva a essa regeneração, visando sua promoção para futura prática clínica.

3 PROPOSIÇÃO

Analisar a co-participação de células transplantadas e de células do hospedeiro na bioengenharia pulpar quando coroas dentais descelularizadas (vazias) ou preenchidas por populações enriquecidas em células-tronco derivadas da papila apical humana são transplantadas em animais geneticamente modificados.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Modelos animais e desenho geral do estudo

Os experimentos que envolviam o uso de dentes humanos para obtenção de células foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa/CONEP sob o número 13275013.0.0000.075 (Anexo A). Os ensaios que envolviam manipulação de animais foram realizados sob aprovação prévia da Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA/ICB USP) sob o protocolo número 045, folha 127 do livro 2 (Anexo B).

Para que fosse possível avaliar a contribuição das células-tronco transplantadas na bioengenharia pulpar, combinamos tecidos humanos com os de camundongos *Nude* ou C57bl/6-GFP homozigóticos (do inglês GFP *Green Fluorescent Protein*).

Os camundongos *Nude* possuem uma mutação no gene FOXN1, que é responsável por defeitos na formação do folículo piloso (por isso eles possuem o fenótipo desnudo de pelos), além de causar aplasia congênita do timo, importante órgão linfoide responsável por promover a maturação dos linfócitos-T (Nehls et al., 1994). Dada essa característica, esses camundongos não são capazes de promover reação imunológica contra enxertos, já que essa reação é mediada pelos linfócitos T. Por isso, esse modelo animal tem sido extensivamente utilizado para estudos que utilizam tecidos ou células humanas em condições de transplante (Reth, 1995).

Os camundongos GFP homozigóticos que foram utilizados nessa pesquisa foram gentilmente cedidos pelo Dr. Sério Lira (Diretor do Instituto de Imunologia da Mount Sinai School of Medicine de Nova York), por intermédio da Prof.ª. Dr.ª Verônica Porto Carreiro de Vasconcelos Coelho, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Esses camundongos são geneticamente modificados pela incorporação em seu DNA da sequência que codifica a proteína GFP, conhecida por ser a expressa pela água viva (*Aequorea victoria)* e emitir fluorescência ao ser exposta sob espectro de luz azul. Essa modificação em homozigose faz com que todas as células do animal produzam a proteína, podendo esta ser evidenciada pela utilização de um marcador anti-GFP (Masahito et al., 1995; Takada et al., 1997).

Para os transplantes foram utilizadas coroas de primeiros molares de camundongos neonatos na idade de 6 dias de vida (P6.5) que foram coletadas e descularizadas de acordo com o discriminado abaixo. Posteriormente, essas coroas foram transplantadas sob cápsula renal dos camundongos *Nude ou GFP*, preenchidas somente com colágeno, ou com células-tronco humanas.

A cápsula renal é uma região conhecida por possuir vasta vascularização, por ser de fácil acesso e incitar uma baixa resposta imune do hospedeiro. Por isso, a cápsula renal têm se apresentado na literatura como sendo de escolha para estudos morfológicos e de engenharia de tecidos dentais (Feng et al., 2011; Volponi; Sharpe, 2013).

No modelo de camundongos *Nude*, através do marcador Lamina A, que possui especificidade para qualquer tipo celular humano, foi possível rastrear as células transplantadas presentes no tecido pulpar neoformado. Da mesma forma, no modelo de camundongos GFP, a expressão de GFP evidencia as células do animal receptor que participam ativamente da formação do tecido pulpar nas coroas transplantadas.

Os grupos de estudo foram divididos em controles (transplante de germes P6.5 sem manipulação e de coroas descelularizadas preenchidas somente com colágeno, ambos provenientes de animais CD1) e grupos experimentais que receberam as células da papila apical associadas a colágeno. Os grupos experimentais que receberam células foram ainda divididos em populações enriquecidas para o marcador CD146 (Papila CD146+) e população não enriquecida (Papila CD146-). Para cada grupo, houve dois tempos de espera: 14 e 21 dias após o transplante em cápsula renal.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata (3 coroas em cada rim) e para otimização de animais os dois rins foram utilizados. Para os grupos controles foi utilizado somente um animal receptor para cada tempo experimental, enquanto os grupos experimentais foram feitos em 2 diferentes animais. A divisão dos grupos está esquematizada nas tabelas a seguir (Tabela 4.1 e Tabela 4.2), e na sequência r descreveremos detalhadamente os experimentos realizados.

Tabela 4.1 - Grupos feitos em camundongos *Nude*

	14 dias RIM E	14 dias RIM D	21 dias RIM E	21 dias RIM D
GRUPOS	**Papila CD146+**	**Papila CD146-**	**Papila CD146+**	**Papila CD146-**
nude	2 animais 6 coroas	2 animais 6 coroas	2 animais 6 coroas	2 animais 6 coroas
CONTROLES	**Coroa desnuda com colágeno**	**Coroa p6.5 intacta**	**Coroa desnuda com colágeno**	**Coroa p6.5 intacta**
nude	1 animal 3 coroas	1 animal 3 coroas	1 animal 3 coroas	1 animal 3 coroas

Tabela 4.2 - Grupos feitos em camundongos GFP:

	14 dias RIM E	14 dias RIM D	21 dias RIM E	21 dias RIM D
GRUPOS	**Papila CD146+**	**Papila CD146-**	**Papila CD146+**	**Papila CD146-**
GFP	2 animais 6 coroas	2 animais 6 coroas	2 animais 6 coroas	2 animais 6 coroas
CONTROLES	**Coroa desnuda com colágeno**	**Coroa p6.5 intacta**	**Coroa desnuda com colágeno**	**Coroa p6.5 intacta**
GFP	1 animal 3 coroas	xxx xxx	1 animal 3 coroas	xxx xxx

4.2 Coleta da Coroas e descelularização

Germes dentais de primeiros molares de camundongos com idade pós-natal de 6 dias (P6.5) foram dissecadas das regiões mandibulares e maxilares (Figura 4.1 A, B). Cada unidade teve a polpa, papila e capuz retirados mecanicamente por meio do uso de pinças com ponta ultra fina e agulhas (Figura 4.1 C/D, E/F). As coroas desnudas foram então lavadas por 3 vezes com solução de PBS 1x acrescido de 2% de solução antibiótica/antimicótica composta de anfotericina, estreptomicina e penicilina 100x (Gibco # 15240-062). Para inviabilizar qualquer resto celular remanescente, as coroas permaneceram secas em estufa à 37ºC por 12 horas. Passado esse período, uma remoção química de qualquer remanescente foi efetuada por ação enzimática do TrypLE (Gibco #12604) por 3 horas, sob agitação. Para comprovar a eficácia do procedimento, as coroas passaram por processamento histológico para análise morfológica, em coloração de HE (Figura 4.1 G, H). Após o tratamento, as coroas descelularizadas foram mantidas em PBS a 2% de solução antibiótica/antimicótica à 4º C por pelo menos 2 dias antes de serem utilizadas.

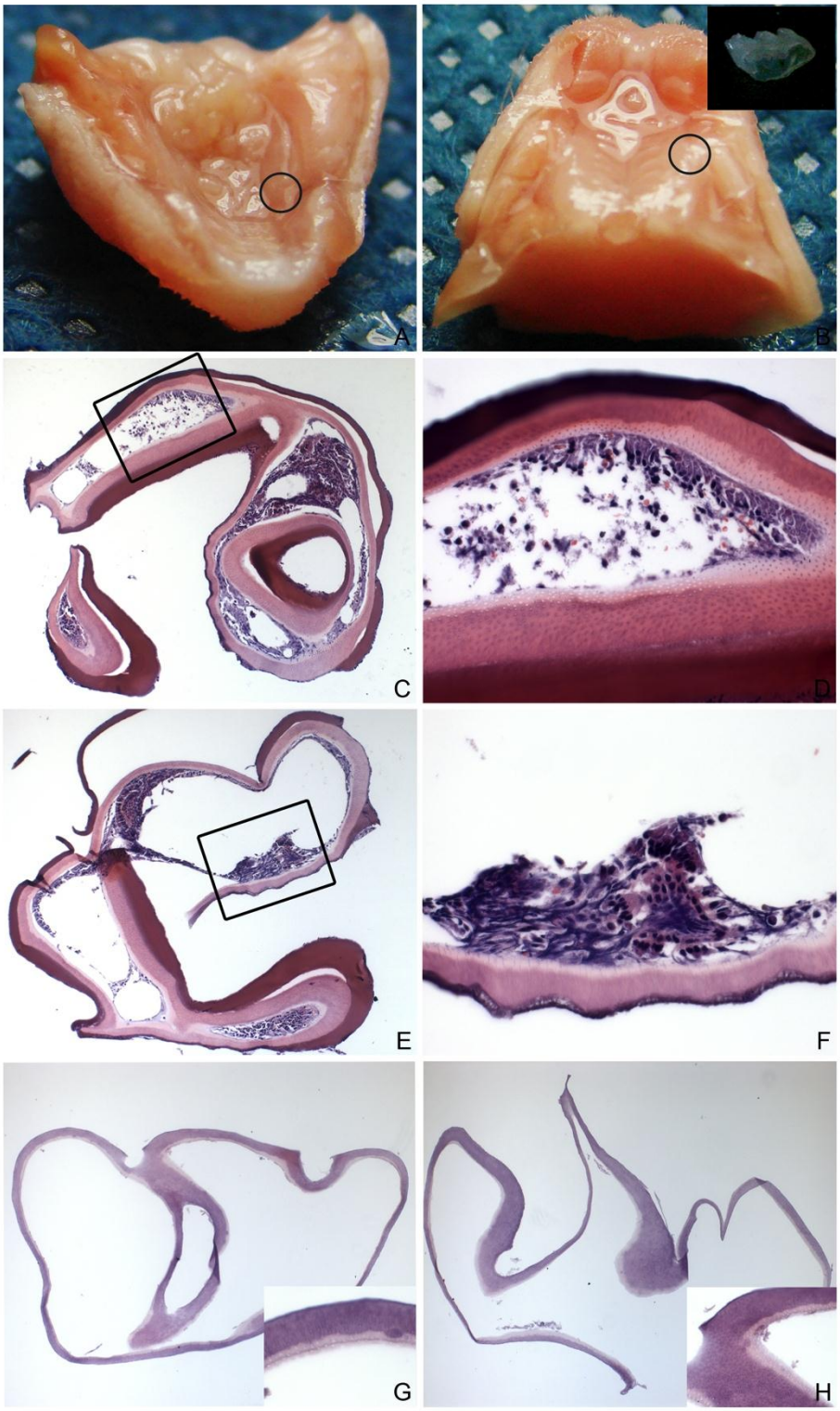

Figura 4.1 - As coroas dos primeiros molares (B') são dissecadas a partir de mandíbulas (A) e maxilas (B) de camundongos neonatos com 6 dias de vida (P6.5). Em destaque estão as regiões anatômicas em que se localizam os primeiros molares (A e B). Os tecidos moles (capuz e polpa) são então parcialmente removidos mecanicamente das coroas. Em C e E vê-se coroas após remoção mecânica da polpa evidenciando a incompleta remoção do tecido pulpar (HE aumento 10x); D e F: destaque em maior aumento (40x) mostrando células remanescentes em intimo contato com a parede dentinária; G e H :coroas P6.5 após serem tratadas com tripsina / EDTA 0,05%, evidenciando total remoção celular (HE em 10x); G' e H': destaque em maior aumento da parede dentinária exibindo ausência total de células.

4.3 Cultura primária de células da papila apical

Os dentes coletados foram fornecidos por pacientes com indicação de extração pelo cirurgião-dentista responsável pelo atendimento. A doação foi feita com o consentimento do paciente ou responsável legal e mediante assinatura da Carta de Doação (Anexo C). A coleta foi feita na clínica odontologia da FFO-FUNDECTO, no curso de Aperfeiçoamento em Cirurgia, sob coordenação do Prof. Dr. Waldyr Antonio Jorge.

Foram selecionados dois terceiros molares não erupcionados no máximo 2/3 de raiz, e que após a extração mantinham a papila apical intacta (quadro 4.1). Essas coletas resultaram em 2 populações mistas de células de papila apical: Papila 1 e Papila 2:

Quadro 4.1 – Populações celulares

Papila 1	**Papila 2**
sexo feminino	sexo feminino
17 anos	16 anos
1/3 raiz formada	2/3 raiz formada
Dente 28 hígido	Dente 38 hígido

Após a extração em condições de assepsia, o dente foi imediatamente armazenado em PBS 1x com 2% de antibióticos/antimicóticos.

Já em fluxo laminar a papila apical foi destaca do ápice dental com a ajuda de uma cureta e lavada 3 vezes em PBS 1X com 2% de antibióticos/antimicótico com trocas a cada 5 minutos. Em seguida, o tecido foi extensivamente cortado utilizando lâminas de bisturi nº 15 até que fragmentos menores de $1mm^2$ fossem obtidos. A seguir, foi feita uma suspenção de células através de digestão enzimática desses fragmentos com uso de colagenase tipo I (3mg/ml) e dispase (4mg/ml), a 37ºC por 45 minutos. Assim, células isoladas foram obtidas para cultivo.

Antes e após a separação das populações enriquecidas, as células (populações mistas) foram cultivadas em meio αMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium - α modification) com 1% de antibióticos/antimicótico, 20% de Soro fetal bovino (FBS), 100μM de ácido ascórbico e 2mM L-glutamina. Todos os procedimentos realizados, inclusive a separação, foram feitos em capela de fluxo

laminar, seguindo os protocolos para manutenção de esterilidade dos materiais, suplementos e meio de cultura utilizados.

Em todos os momentos as células foram mantidas em estufa a 37ºC, em atmosfera úmida, contendo 5% de CO_2. Após aderirem à placa, o meio de cultura foi trocado, de acordo com a necessidade do metabolismo celular. O monitoramento do crescimento das células foi feito através de microscópio invertido de fase e aspectos como vitalidade celular, coloração e aparência do meio foram analisados.

Após atingirem 80% de confluência na placa, as células foram sub-cultivadas de acordo com a necessidade de novas placas. Para tanto, a monocamada celular foi lavada com PBS, sem cálcio e magnésio pH 7,2 e as células eram separadas com 2mL de solução de Tripsina 0,05% EDTA (Gibco#25300-062) em temperatura de 37ºC. Meio de cultura era utilizado para diluir a solução de tripsina e a suspensão de células centrifugada a 1200 RPM por 5 minutos à temperatura ambiente. O precipitado de células era então ressuspenso em meio de cultura fresco para aquisição de alíquotas para novo crescimento celular ou congelamento.

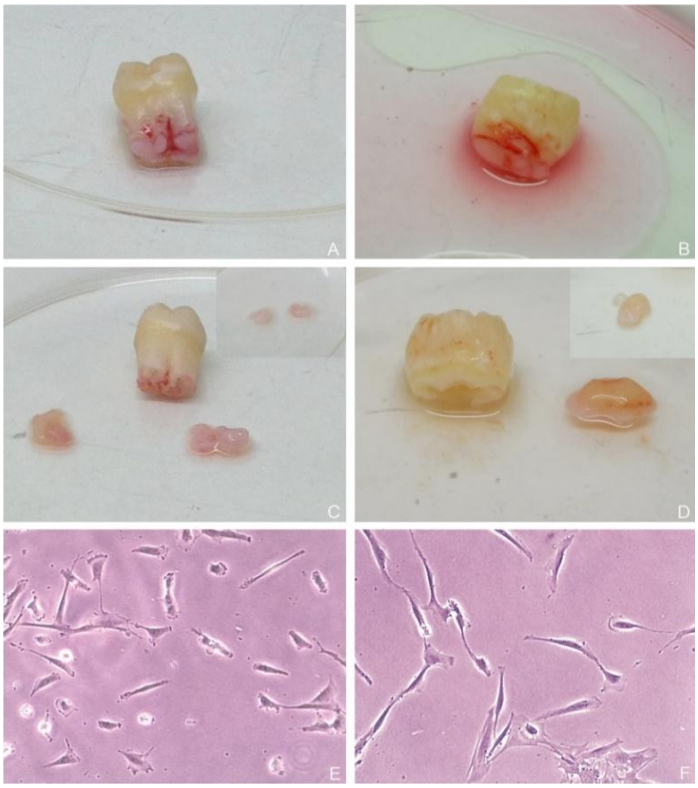

Figura 4.2 - Os terceiros molares logo após extração foram lavados em PBS 2% e imediatamente colocados em fluxo laminar, onde nota-se na porção apical a papila intacta dos dentes com 2/3 (A) e 1/3 (B) de raiz formadas. Em seguida as papilas apicais foram removidas dos dentes (C e D) com ajuda de uma espátula (em destaque em C' e D'). Os tecidos de papila apical passaram por digestão enzimática, e as células foram individualizadas e cultivadas. Em E e F, a morfologia das células de papila em passagem 1 por microscópio invertido de fases (aumento 10x).

4.4 Separação de populações enriquecidas em células-tronco

As populações enriquecidas em células-tronco utilizadas para os transplantes no interior das coroas previamente descelularizadas foram isoladas pela técnica de "*Magnetic Activated Cell Sorting"* (MACS) através da expressão de CD146 de acordo com o preconizado previamente pela literatura (Gronthos et al., 2000, 2002; Shi; Gronthos, 2003; Bakapoulou et al., 2013). A separação das populações enriquecidas foi realizada a partir de células da papila apical expandidas (populações mistas) na passagem 4.

Para o isolamento das populações CD146 positivas (e negativas), as células foram previamente tripsinizadas e centrifugadas a 1200 RPM durante 5 minutos. O sobrenadante foi aspirado e o *pellet* resuspenso em 1ml de solução tampão (2mM de EDTA, 0,5% de BSA e PBS 1X). Em seguida elas passam pelo *Cell Strainer* 70µm (BD #352650) afim de romper os agregados celulares. A quantidade aproximada de 10^7 (Papila 1) e $4,2x10^6$ (Papila 2) células foi então transferida para tubos falcon de 15 ml (BD# 352095), centrifugados a 1200 RPM durante 5 minutos. O sobrenadante foi aspirado para incubação do anticorpo CD146 *rabbit anti-human* (Epitomics #2505-1) na proporção 1:50 em BSA 1%, à 4ºC por 1 hora. Passado o tempo de incubação, as células foram lavadas 2x com solução tampão, seguida da incubação do anticorpo secundário biotinilado anti-*rabbit* IgG (Vector #BA1000) na proporção de 1:80 por 30 minutos à 4ºC. Após esse período as células foram novamente lavadas com solução tampão por 2x, seguido pela solução contendo os 20µl de *microbeads* (anti-biotin microbeads Miltenyi Biotec cat#130.090-485), 80µl de solução tampão por 15 minutos à 4ºC de acordo com as especificações do fabricante.

Essa solução contendo as células foi então passada pela coluna magnética MS Columns da Miltenyi Biotec (#130-042-201), que foi previamente umedecida com solução tampão. As células positivas para CD146 ficaram retidas pela força magnética, enquanto as negativas passaram pela coluna. Após a passagem de toda a solução contendo as células, a coluna foi lavada com 3 ml de solução tampão com a finalidade de liberar células aderidas mecanicamente durante o processo. Em seguida a coluna foi desmontada do magneto e lavada em outro tubo. Assim, as

células positivas que estavam aderidas no magneto foram então empurradas para esse outro tubo. Dessa forma, ao final do procedimento tínhamos uma população positiva para CD146 e uma população negativa para CD146.

Tanto as população positivas quanto as negativas foram plaqueadas e expandidas até a passagem 3, com a finalidade de obter quantidade suficiente para os experimentos *in vivo*.

Antes e após a separação as células foram contadas, através de câmara de Neubauer, para avaliar viabilidade celular (Gráficos 4.1 e 4.3), e verificar quantas células sobreviveram ao final do processo, visto que se trata de um procedimento longo e com muitas etapas. Também foi possível avaliar a porcentagem de células enriquecidas para o CD146 nas duas das populações mistas de papila apical, Papila1 e Papila 2, que foram utilizadas nos experimentos (Gráficos 4.2 e 4.4).

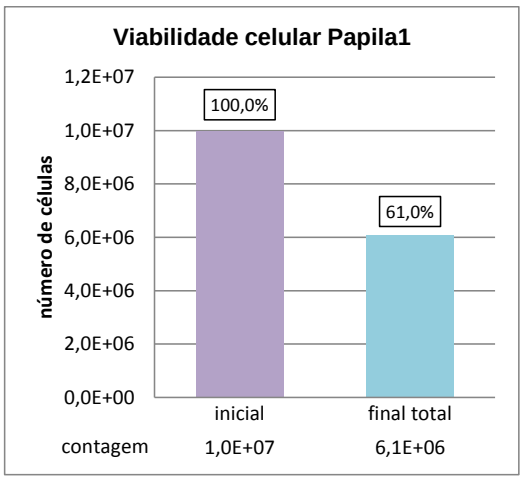

Gráfico 4.1 - É possível avaliar que no processo de separação houve uma perda de 39% de células viáveis na população de Papila 1.

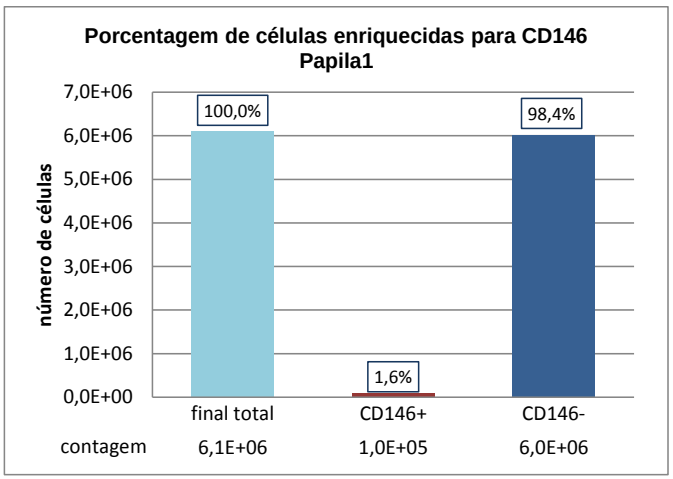

Gráfico 4.2 - Porcentagem feita a partir da contagem final de células, temos que 1,6% da população apresenta marcação positiva para o CD146.

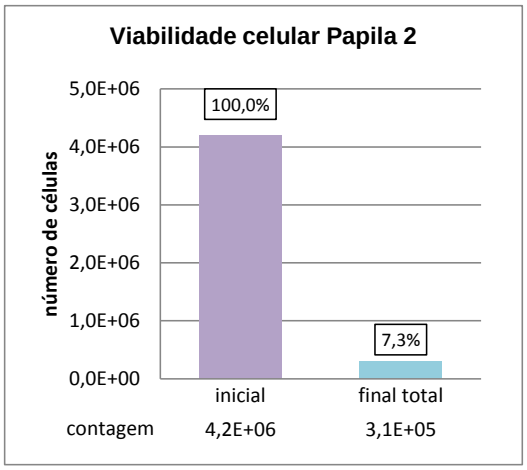

Gráfico 4.3 - É possível avaliar que no processo de separação houve uma perda de 92,7% de células viáveis na população de Papila 2.

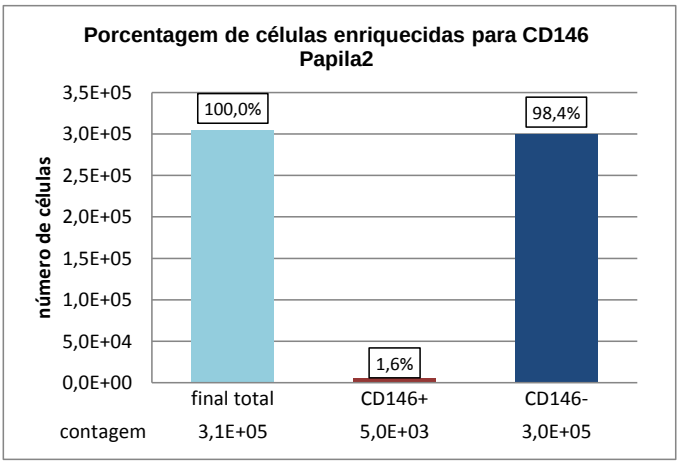

Gráfico 4.4 - Porcentagem feita a partir da contagem final é temos que 1,6% da população apresenta marcação positiva para o CD146.

4.5 Transplantes em cápsula renal

Previamente ao transplante, as coroas p6.5 tratadas foram retiradas do PBS 1x e armazenas em placa petri. As células da papila apical humana foram então tripsinizadas e contadas. Tendo em vista que as coroas possuem um volume de aproximadamente 1µl, as células foram diluídas em colágeno líquido de forma que em 1µl houvesse a quantidade de 10^4 células. O uso da escolha pelo colágeno líquido como carreador foi com o intuito de evitar alterações de tecido a ser reconstruído pela contração de geleificação do colágeno gel, como descrito anteriormente na literatura (Prescott et al., 2008; Huang et al., 2010).

Para a realização dessas cirurgias de transplante, os animais adultos receptores das coroas foram anestesiados por via intramuscular com solução do anestésico cloridrato de xilazina (Anasedan®) e de relaxante muscular a base de cloridrato de ketamina (Dopalen®), em solução com 100mg/kg do anestésico e 50mg/kg do relaxante muscular.

Para ter acesso aos rins, após decorrido o tempo de indução anestésica, o dorso dos animais foi tricotomizado com giletes (somente nos experimentos feitos com os camundongos GFPs) e desinfetado com solução anti-séptica (Polvidine). Uma incisão de 2 cm foi feita sob a linha mediana do dorso, em sentido sagital (Figura 4.3 A), seguida de divulsão dos tecidos (Figura 4.3 B). Na região de cada um

dos rins (a aproximadamente 6,5 cm para a posterior das orelhas do animal no sentido caudal) foi feita uma incisão de 1 cm na camada muscular utilizando-se tesoura cirúrgica (Figura 4.3 C) e, com a ajuda de instrumentos cirúrgicos estéreis, o rim foi acessado e colocado para fora do corpo do animal (Figura 4.3 D). A partir dessa etapa, todo procedimento foi realizado utilizando estereomicroscópio. A cápsula renal foi então perfurada com a ajuda de uma pinça com ponta ultrafina. Nesse momento a coroa era posiciona sobre o rim, e 1µl de colágeno, com ou sem células, de acordo com os grupos experimentais, era pipetado sobre a coroa (Figura 4.3 E). Com ajuda de pinças com ponta fina, a cápsula foi distendida, e a coroa delicadamente empurrada sob a cápsula, de forma a ficar totalmente coberta pelo tecido e distante da perfuração. Por fim, os rins foram reposicionados na cavidade abdominal. A camada muscular não foi suturada, afim de evitar a formação de fibrose provocada pelo fio. A pele foi então suturada utilizando-se fios de sutura nylon 3.0 com agulha de 20 mm (Procare®), de modo que as duas bordas se encostavam no mesmo nível, promovendo uma cicatrização por primeira intenção (Figura 4.3 F). O procedimento não impedia a mobilidade do animal.

Mesmo se tratando de um xenotransplante, não houve indução de imununossupressão nos animais GFPs.

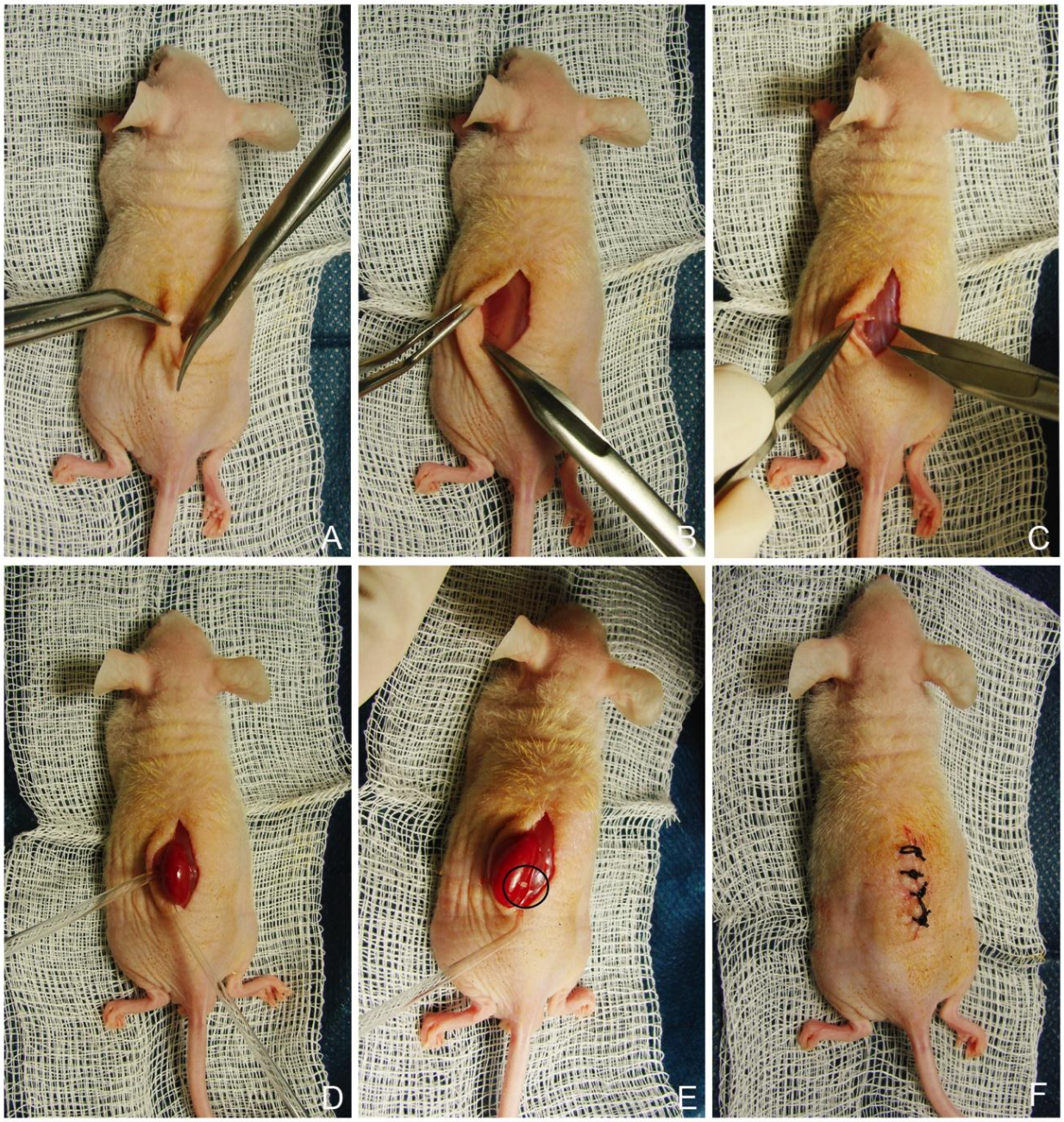

Figura 4.3 **-** Início do procedimento cirúrgico através de incisão mediana no dorso com tesoura de ponta fina (A), seguida pela divulsão da pele (B) e incisão da camada muscular para acessar a cavidade abdominal (C). Em seguida o rim é acessado sendo delicadamente retirado da cavidade abdominal para facilitar o acesso a capsula (D). Com o rim nessa posição as coroas são posicionadas sob a cápsula renal (E). O rim então é reposicionado na cavidade abdominal, seguido pela sutura da pele (F)

4.6 Processamento das amostras

Passados os tempos de espera (14 dias ou 21 dias para todos os grupos experimentais segundo o descrito na tabela acima), os camundongos transplantados foram eutanasiados em câmara de CO_2.

Em seguida as amostras foram dissecadas das cápsulas renais e fixadas em paraformaldeido 4% por 24 horas em temperatura ambiente. Após descalcificação em EDTA 0.5M com agitação por 3 dias em média, as amostras passaram pelo processamento histológico convencional: desidratação em cadeias crescentes em concentração de álcool, diafanização em xilol, inclusão em parafina.

Foram realizados cortes de 4µ, e coloração em HE, para realização de análise morfológica no tecido que se formou no interior das coroas transplantadas, seguida pela realização da técnica de imunoistoquímica utilizando anticorpo monoclonal rabbit anti-Lamina A (AbCam Ab108595) nas amostras *Nude* para evidenciação das células humanas, e pela técnica de imunofluorescência por intermédio do anticorpo rabbit anti-GFP (AbCam Ab290) na amostras GFPs. Assim, no tecido que se formava dentro da coroa, as células que foram transplantadas (de origem humana) puderam ser diferenciadas das células que eram provenientes do animal receptor.

Para a técnica de imunoistoquímica pela peroxidade, após a incubação das lâminas silanizadas contendo os cortes em estufa a 60º por 24 horas, para fixação do tecido, as lâminas passaram pela bateria de desparafinização e hidratação. Em seguida foi feita a recuperação antigênica com ácido cítrico PH 6,0 por 30 minutos à 95ºC. Após lavagem com Tris PH 7,6, realizou-se o bloqueio de sítios inespecíficos utilizando solução com 10% de soro fetal bovino, 1% de BSA e PBS por 2 horas. Terminada essa fase, o anticorpo primário Anti-Lamina A (Ab108595) foi incubado por 16 horas a 4ºC. Passado o período de incubação, as lâminas foram lavadas com Tris PH 7,6 por 10 minutos e feita a incubação do anticorpo secundário EnVision (sistema de amplificação de sinal livre de biotina) por 30 minutos. A reação foi evidenciada utilizando o cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB) e a contra-coloração foi realizada pela hematoxilina de Mayer.

As marcações foram analisadas em microscópio de luz. Para cada amostra três campos em aumento de 100x com imersão foram selecionados para analisar

marcação de membrana nuclear. As células marcadas, Lamina A positivas, foram consideradas como sendo as células transplantadas. As células com marcação negativa para o Lamina A foram consideras como sendo oriundas do hospedeiro.

Para técnica de imunofluorescência foram feitos cortes de 3µm em lâminas silanizadas. Estas foram mantidas em estufa a 60ºC por 24 horas para fixar o tecido à lâmina. Após esse processo os cortes passaram por banhos de xilol para desparafinização, em seguida por banhos de cadeias decrescentes de álcoois para hidratação. Logo após, os cortes passaram por recuperação antigênica com ácido cítrico PH 6 a 95ºC por 30 minutos. Posteriormente as lâminas foram lavadas duas vezes com PBS 1X 0,5% de triton, seguindo para bloqueio de sítios inespecíficos com solução de 1% de BSA e 10% soro de cabra, por 2 horas. Passado esse período o anticorpo *rabbit* anti-GFP (#ab290) foi encubado na concentração de 1:80 por 16 horas à 4ºC. Após o período se encubação as lâminas foram lavadas duas vezes com PBS 1X 0,05% de triton, seguindo para encubação do anticorpo secundário *goat* anti-*rabbit* FITC na proporção de 1:100 por 2 horas. Após serem lavadas duas vezes em PBS1x as lâminas foram montadas com em meio aquoso (Vectashid).

As marcações foram analisadas em microscópio de fluorescência com filtros para FITC (verde) e DAPI (marcação nuclear da cor azul). Para cada amostra (coroa) três campos foram selecionados e analisados em aumento de 100x com óleo de imersão, para detectar células que apresentavam somente marcação nuclear azul. Essas células GFP negativas, foram consideradas como sendo as células de papila humana transplantadas. As células GFP positivas foram consideras como sendo do hospedeiro, enquanto as células somente DAPI positivas (GFP negativas) eram as células transplantadas.

Na análise morfológica foram observados os seguintes parâmetros:

1. Manutenção ou não do arcabouço de dentina;
2. Presença ou não de células semelhantes a odontoblasto;
3. Vascularização;
4. Presença ou não de inflamação;
5. Morfologia tecidual (aspecto do tecido formado no espaço pulpar);
6. Morfologia celular;
7. Presença ou não e localização de osteodentina;

Foram consideradas células semelhante a odontoblastos as que concomitantemente apresentavam morfologia colunar alta e localização em contato com a dentina da coroa. Em relação à vascularização, foi observado se havia a presença de vasos e se os mesmos continham hemácias em seu interior. Em relação à morfologia tecidual, foi observado se o tecido formado era do tipo frouxo ou denso e por fim, em relação a morfologia celular foi observado se as células no interior da polpa formada após o transplante eram fibroblásticas, colunares altas, epitelióides ou uma mistura desses tipos celulares.

5 RESULTADOS

5.1 Análise morfológica do germe dental de P6.5 transplantado intacto em camundongos *Nude*

a. 14 dias de espera (Figura 5.1 D, E, F):

1. O arcabouço foi mantido em todas as amostras;
2. No interior da câmara pulpar os odontoblastos permaneciam, porém com perda de sua identidade morfológica de aspecto colunar alto (Figura 5.1 E);
3. Os vasos estavam preservados;
4. Não havia sinais de inflamação em nenhuma das amostras;
5. A polpa, após 14 dias ainda era formada por tecido conjuntivo frouxo bastante celularizado (Figura 5.1 E) em densidade semelhante a um tecido pulpar normal nessa idade de desenvolvimento (6,5+14 dias=20,5 dias);
6. No espaço pulpar houve o predomínio de células fibroblásticas, de núcleo alongando. Na região externa da coroa havia ameloblastos aparentemente viáveis (Figura 5.1 F);
7. Ocorreu a formação de dentina terciária no interior da câmara pulpar em região próxima ao corno pulpar (Figura 5.1 E seta vermelha).

b. 21 dias de espera (Figura 5.1 G, H, I)

1. O arcabouço de dentina foi preservado, porém é possível notar um processo descontrolado de mineralização que ocorre a partir da dentina e aparenta circundar a coroa (Figura 5.1 G);
2. Os odontoblastos ainda estão presentes, porém não apresentam sua morfologia característica (Figura 5.1 I seta vermelha);
3. Nota-se a presença de grandes vasos no interior da polpa, preenchidos com eritrócitos (Figura 5.1 I seta preta);
4. Não há sinais de inflamação;
5. O interior da coroa está preenchido por tecido conjuntivo frouxo de celularidade semelhante a de um tecido pulpar com 27,5 dias de idade;

6. As células pulpares apresentam aspecto fibroblástico com núcleo alongado. Na região externa da coroa ainda é possível identificar a presença de ameloblastos, porém os mesmos não parecem mais estar ativos;
7. Houve formação de osteodentina (Figura 5.1 H).

5.2 Análise morfológica de coroas transplantadas preenchidas apenas com colágeno em camundongos *Nude*

a. 14 dias de espera (Figura 5.1 J, K, L)

1. O arcabouço foi mantido em todas as amostras;
2. Não houve formação de células semelhante a odontoblastos;
3. Vasos de tamanhos variados e com eritrócitos em seu interior estão dispostos ao longo de todo o tecido formado (Figura 5.1 K);
4. Não nota-se presença de inflamação;
5. No espaço pulpar houve formação de tecido conjuntivo frouxo com baixa densidade celular, e o mesmo encontra-se em íntimo contato com o arcabouço mineral (Figura 5.1 L);
6. A porção pulpar estava preenchida por células fibroblásticas, de aspecto estrelário e núcleo alongado;
7. Não houve formação de osteodentina.

b. 21 dias de espera (Figura 5.1 M, N, O):

1. O arcabouço mineral foi preservado em todas as amostras;
2. Não foi notada a presença de células semelhante a odontoblastos;
3. Vasos de tamanhos variados e com hemácias em seu interior estavam dispostos ao longo do tecido (Figura 5.1 O);
4. Não havia sinais de inflamação;
5. O tecido formado no espaço pulpar era conjuntivo frouxo, porém com regiões de maior deposição de colágeno em comparação ao tempo de 14 dias;
6. O espaço pulpar era composto por células fibroblásticas, de núcleo alongado, dispostas homogeneamente por todo o tecido de forma similar ao encontrado após 14 dias de espera;

7. Não houve formação de osteodentina.

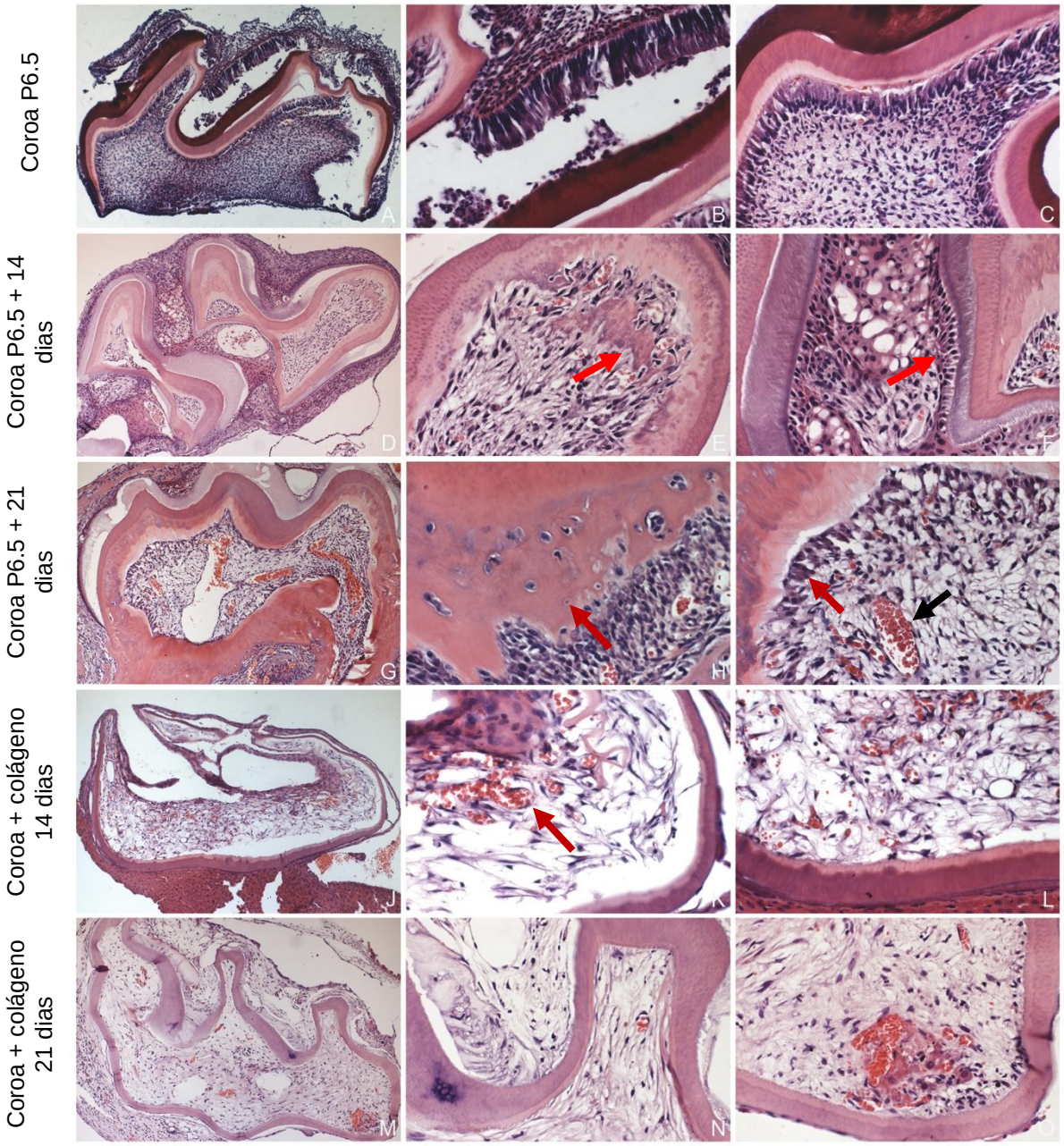

Figura 5.1 - Germe dental de camundongo P6.5 intacto em menor aumento (A). Em maior aumento é possível notar externamente a camada de ameloblastos, composta por células colunares (B) e internamente a camada de odontoblastos em íntimo contato com a dentina, além do tecido pulpar bem celularizado. A coroa transplantada, após 14 dias mostrou que o tecido se mantém viável, e bem celularizado (D em aumento de 10x). Os odontoblastos mudaram a morfologia e ocorreu deposição de osteodentina (E). Os ameloblastos também foram mantidos (F). Após 21 dias a coroa mantém a celularidade (G), assim como mantém os odontoblastos (I seta vermelha) e os vasos (I seta preta). Também ocorre formação descontrolada de osteodentina (H). As coroas transplantadas somente com colágeno, após 14 dias (J) formam um tecido conjuntivo frouxo no espaço pulpar (L), pouco celularizado, porém com vasos presentes (K). O mesmo ocorre com as coroas transplantadas somente com colágeno por 21 dias (M, N, O)

5.3 Análise morfológica de coroas preenchidas com células de papila apical CD146+ e colágeno em camundongos *Nude*

a. 14 dias de espera (Figura 5.2 A, B, C)

1. O arcabouço de dentina foi preservado em todas as amostras (Figura 5.2 A);
2. Células semelhante a odontoblastos não foram evidenciadas;
3. Foi possível notar a presença de vasos bem formados com hemácias em seu interior (Figura 5.2 C);
4. Não notou-se a presença de células inflamatórias;
5. Ocorreu a formação de tecido conjuntivo frouxo no espaço pulpar, pouco celularizado em comparação a uma polpa normal com 20 dias;
6. O tecido do espaço pulpar era composto por células fibroblásticas, por vezes de núcleo arredondado, por vezes com núcleo mais alongado (Figura 5.2 B);
7. Não houve formação de osteodentina;

b. 21 dias de espera (Figura 5.2 G, H, I)

1. O arcabouço de dentina estava mantido em todas as amostras (Figura 5.2 G);
2. Células semelhante a odontoblastos não estavam presentes;
3. Vasos bem formados estavam presentes ao longo do tecido (Figura 5.2 I);
4. Notou-se a presença de raras células inflamatórias, principalmente neutrófilos em duas amostras, não sendo considerado como predominante no grupo;
5. No espaço pulpar houve formação de tecido conjuntivo frouxo, pouco celularizado, porém com células dispostas de forma homogênea ao longo do tecido (Figura 5.2 H);
6. Assim como no tempo de 14 dias, o tecido era composto por células fibroblásticas, por vezes com núcleo mais arredondado ou mais alongado (Figura 5.2 H);
7. Houve a formação de osteodentina em uma das amostras em região periférica, próximo à dentina, não sendo esse achado predominante no grupo. Nessa região, células maiores, de citoplasma eosinofílico e de limites imprecisos estavam presentes.

5.4 Análise morfológica de coroas preenchidas com células de papila apical CD146- e colágeno em camundongos *Nude*

a.14 dias de espera (Figura 5.2 D, E, F)

1. O arcabouço foi mantido em todas as amostras (Figura 5.2 D);
2. Não houve a formação de células semelhante a odontoblastos;
3. Observou-se a formação de vasos de tamanhos variados com eritrócitos em seu interior, dispostos ao longo de todo o tecido;
4. Não havia sinais de inflamação;
5. O tecido formado no espaço pulpar era conjuntivo frouxo, pouco celularizado;
6. O tecido formado no interior da coroa era povoado por células fibroblásticas de núcleo alongado (Figura 5.2 F);
7. Osteodentina estava presente em apenas uma das coroas na porção mais central do tecido (Figura 5.2 E). Nessa região, células maiores, de citoplasma eosinofílico e de limites imprecisos estavam presentes.

b. 21 dias de espera (Figura5.2 J, K, L)

1. O arcabouço foi mantido em todas as amostras (Figura 5.2 J)
2. Células semelhante a odontoblastos estavam ausentes;
3. Em todas as amostras foi possível observar vasos bem formados, com a luz normalmente preenchidas por hemácias (Figura 5.2 K);
4. Raras células inflamatórias, normalmente neutrófilos, estavam presentes em 2 amostras, não sendo esse achado predominante no grupo.
5. O tecido formado no espaço pulpar era um conjuntivo frouxo, pouco celularizado (Figura 5.2 K)
6. O tecido pulpar era composto por células fibroblásticas de núcleo alongado (Figura 5.2 L);
7. Não houve a formação de osteodentina nas amostras.

5.5 Identificação imunoistoquímica das células transplantadas e de células provenientes do receptor do transplante em camundongos *Nude*

Para que fosse possível identificar as células humanas transplantadas em cápsula renal de camundongos *Nude*, tendo coroas vazias e colágeno líquido como arcabouço, utilizou-se o marcador Lamina A em todas as amostras. Esse marcador possui um padrão de marcação de membrana nuclear, que se caracteriza por formar um halo acastanhado em torno do núcleo (Figura 5.2 O).

Para garantir que a marcação no tecido processado seria fiel ao tipo celular utilizado nos transplantes, a padronização do anticorpo foi realizada com cortes de pellet de células de papila dental humana, que após inclusão em matriz gel, passou pelo processamento histológico convencional. Um caso de hiperplasia fibrosa inflamatória humana também foi utilizado como controle positivo das reações de Lamina A. O controle de pellet de células humanas e a hiperplasia fibrosa inflamatória apresentaram marcação no padrão esperado de membrana nuclear em todas as reações.

Todas lâminas foram analisadas em microscópio óptico de luz, nos aumentos de 10x (Figura 5.2 M), e 100x (Figura 5.2 N) sob imersão.

Após os tempo de espera, de 14 e 21 dias, não foi possível identificar a marcação para Lamina A em nenhuma das células localizadas no interior do espaço pulpar nas amostras analisadas. Assim, as células de papila apical humana transplantas não foram identificadas.

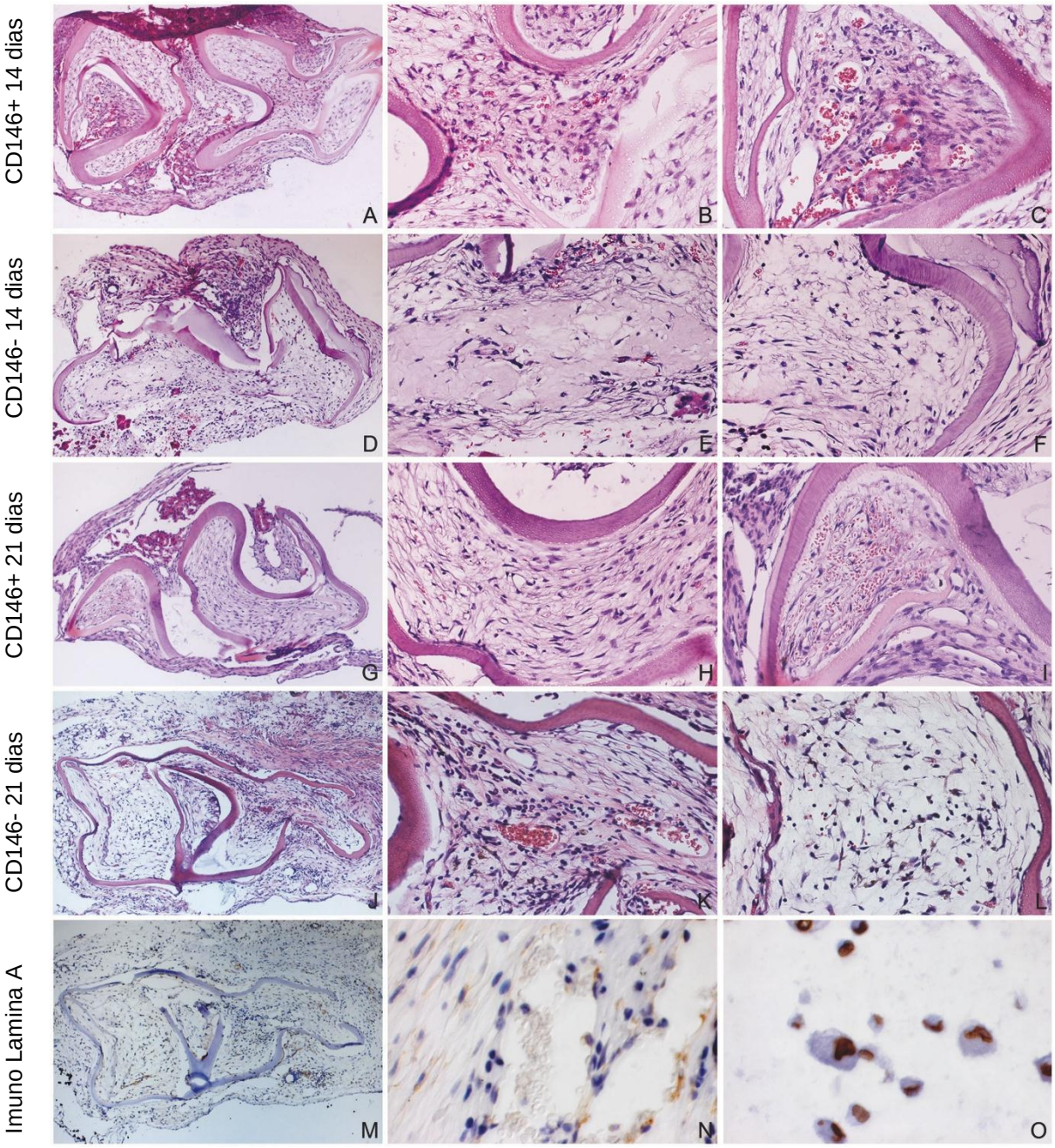

Figura 5.2 **-** A coroa vazia transplantada com células CD146+ após 14 dias, em menor aumento (10x) mostra o arcabouço de dentina com o espaço pulpar formado por tecido conjuntivo frouxo (A), contendo células fibroblásticas por vezes com núcleo mais arredondado (B), além da formação de vasos (C); No grupo de 14 dias transplantado com células CD146- (D) o tecido conjuntivo do espaço pulpar contém células fibroblásticas de núcleo mais alongado (F) e em uma das amostras formou osteodentina (E); Nas amostras de 21 dias (G), nas coroas contendo células CD146+ o tecido conjuntivo formado apresenta disposição celular mais homogênea de células fibroblásticas por vezes com núcleo mais arredondado (H) além da presença de vasos bem formados (I); Já nas coroas contendo células CD146- o tecido do espaço pulpar é de um conjuntivo frouxo, com formação de vasos (K) e contendo células fibroblásticas com núcleo alongado (L); Nas amostras *Nude*, em menor aumento (10x) mostrou-se negativo para o anticorpo Lamina A (M). Em maior aumento (100x) não apresentou marcação de membrana nuclear(N). O controle de células humanas de papila apical mostrou-se positivo para o Lamina A, com marcação nuclear (O)

5.6 Análise morfológica de coroas transplantadas preenchidas apenas com colágeno em camundongos GFP

a. 14 dias de espera (Figura 5.3 M, N, O)

1. O arcabouço de dentina foi mantido em todas as amostras (Figura 5.3 M);
2. Não houve a formação de células semelhante a odontoblastos;
3. Vasos bem formados com hemácias em seu interior foram encontrados por toda extensão do espaço pulpar (Figura 5.3 O);
4. Algumas células inflamatórias mononucleares estavam presentes, especialmente na parte exterior da coroa em todas as amostras;
5. No espaço pulpar houve a formação de um tecido conjuntivo frouxo pouco celularizado (Figura 5.3 N)
6. O tecido formado era composto por células fibroblásticas de núcleo alongado (Figura 5.3 N);
7. Não formou osteodentina;

b. 21 dias de espera (Figura 5.3 P, Q, R)

1. O arcabouço de dentina foi preservado em todas as amostras (Figura 5.3 P);
2. Células de padrão semelhante a odontoblasto não estavam presentes.
3. Ao longo do tecido formado foi possível notar a presença de vasos bem formados, com a luz preenchida por hemácias (Figura 5.3 R);
4. Nas amostras era possível observar a presença de um discreto infiltrado inflamatório mononuclear predominantemente na porção exterior das coroas (Figura 5.3 Q seta preta);
5. No espaço pulpar formou-se um tecido conjuntivo frouxo pouco celularizado (Figura 5.3 R);
6. Ao longo do tecido formado no espaço pulpar viu-se células fibroblásticas de núcleo alongado (Figura 5.3 R);
7. Não ocorreu a formação de osteodentina.

5.7 Análise morfológica de coroas preenchidas com células de papila apical CD146+ e colágeno em camundongos GFP

a. 14 dias de espera (Figura 5.3 A, B, C)

1. O arcabouço de dentina foi mantido em todas as amostras (Figura 5.3 A);
2. Não foi notada a presença de células semelhante a odontoblastos;
3. Vasos bem formados com hemácias em seu interior foram vistos em todas as amostras
4. Notou-se um infiltrado inflamatório discreto em todas as amostras, presente predominantemente na região externa das coroas, (Figura 5.3 B seta preta);
5. No espaço pulpar ocorreu a formação de tecido conjunto frouxo, pouco celularizado (Figura 5.3 C)
6. O tecido formado era composto por células fibroblásticas, por vezes com núcleo arredondado (Figura 5.3 B), por vezes com núcleo alongado (Figura 5.3 C); nota-se a presença de poucas células gigantes multinucleadas externas às coroas.
7. Não ocorreu a formação de osteodentina

b. 21 dias de espera (Figura 5.3 G, H, I)

1. O arcabouço de dentina se manteve intacto em todas as amostras (Figura 5.3 G);
2. Células semelhante a odontoblastos não estavam presente.
3. Vasos bem formados com hemácias em seu interior foram vistos em todas as amostras (Figura 5.3 H seta vermelha)
4. Um discreto infiltrado inflamatório estava presente em todas as amostras, predominantemente na porção exterior das coroas;
5. O tecido formado no interior da coroa era conjuntivo frouxo pouco celularizado (Figura 5.3 J);
6. O tecido era povoado por células de morfologia fibroblástica e núcleo alongado; raras células gigantes multinucleadas também foram observadas na região externa das coroas;
7. Ocorreu a formação de osteodentina, em região próxima ao corno pulpar em umas das amostras, não sendo esse achado predominante no grupo. Nessa

região, células maiores, de citoplasma eosinofílico e de limites imprecisos estavam presentes.

5.8 Análise morfológica de coroas preenchidas com células de papila apical CD146- e colágeno em camundongos GFP

a. 14 dias de espera (Figura 5.3 D, E, F)

1. O arcabouço de dentina foi preservado em todas as amostras (Figura 5.3 D)
2. Células semelhante a odontoblastos não estavam presentes na maioria das amostras, no entanto, em uma delas havia em região focal células colunares em intimo contato com a dentina (Figura 5.3 E seta vermelha);
3. Ao longo de todo o tecido observou-se a presença de vasos bem formados, com a luz preenchida por eritrócitos (Figura 5.3 F);
4. Um discreto infiltrado inflamatório misto foi observado predominantemente em região externa à coroa.
5. O tecido formado no interior da coroa era conjuntivo frouxo pouco celularizado (Figura 5.3 E)
6. As células que formavam o tecido pulpar eram se morfologia fibroblástica, ora de núcleo arredondado, ora de núcleo alongado;
7. Não ocorreu a formação de osteodentina

b. 21 dias de espera (Figura 5.3 J, K, L)

1. O arcabouço de dentina foi mantido em todas as amostras (Figura 5.3 J);
2. Não foi observada a presença de células com morfologia semelhante à odontoblastos;
3. Ao longo de todo tecido notou-se a presença de vasos com a luz preenchida por hemácias (Figura 5.3 L);
4. Notou-se um leve infiltrado inflamatório predominantemente em região externa às coroas;
5. No espaço pulpar houve a formação de tecido conjuntivo frouxo, pouco celularizado (Figura 5.3 K);
6. As células que compunham o tecido tinham formato fibroblastico e núcleo alongado;
7. Não houve formação de osteodentina;

5.9 Identificação por imunofluorescência das células oriundas do hospedeiro e de células transplantadas camundongos *GFP*

Com o intuito de analisar as células provenientes do animal receptor nas amostras transplantas com células de papila apical humana, realizou-se reação de imunofluorescência para o marcador anti-GPF. Todas as amostras foram positivas para este marcador.

As células com marcação positiva foram consideradas como sendo oriundas do hospedeiro, enquanto as células que apresentaram marcação negativa, sendo evidenciadas somente pela evidência nuclear do DAPI, foram consideradas como sendo as células de papila apical humana transplantadas.

O que se viu, nas amostras após 14 e 21 dias foi somente marcação positiva para o GFP (Figura 5.4 A, B e C).

O controle de coroas transplantadas somente com colágeno apresentou exclusividade de marcação positiva para GFP, como esperado (Figura 5.4 D).

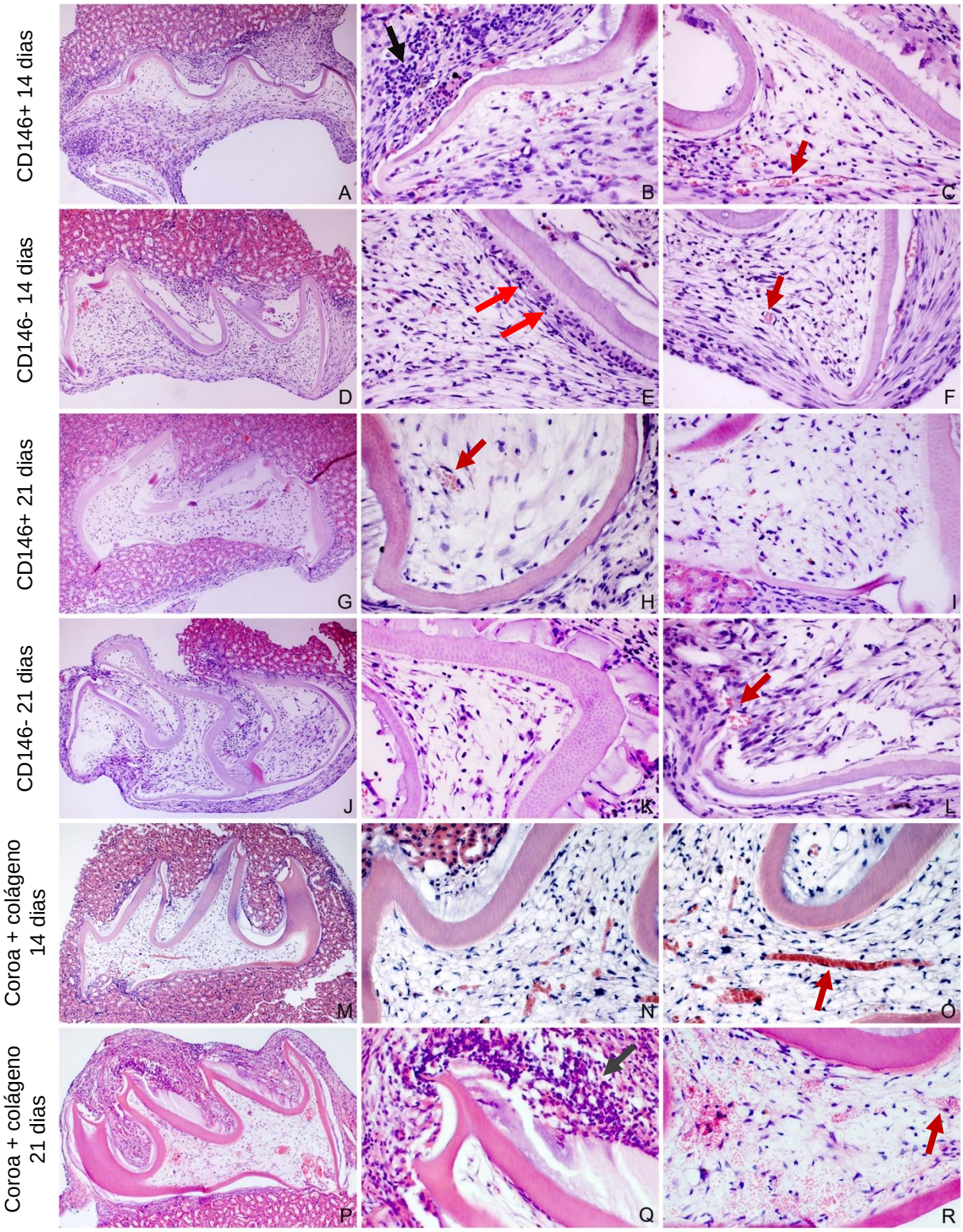

Figura 5.3 - Nas amostras feitas em GFP, nos grupos de 14 dias, seja com coroas preenchidas com células CD146+ (A), seja com células CD146- (D) houve formação de um tecido conjuntivo frouxo no espaço pulpar, com formação de vasos (C e F) povoado por células fibroblásticas de núcleo alongado (B e E). Em destaque, em uma das amostras CD146- formou uma fileira de células em íntimo contato com a dentina (E seta vermelha). Nos grupos de 21 dias, tanto nas amostras CD146+ (G) e CD146- (J) também viu-se que no espaço pulpar formou um tecido conjuntivo frouxo, pouco celularizado (I e K) mas com a presença de vasos bem formados, com eritrócitos em seu interior (H e L, seta vermelha). Nos grupos de coroas transplantadas somente com colágeno, independentemente do tempo de espera (M e P), o tecido formado foi semelhante aos grupos transplantados com células (N e R), com destaque para a formação de vasos ao longo do tecido (O e R, seta vermelha). Em todos os grupos foi notada a presença de discreto infiltrado inflamatório, predominante em região externa à coroa (B e Q, seta preta)

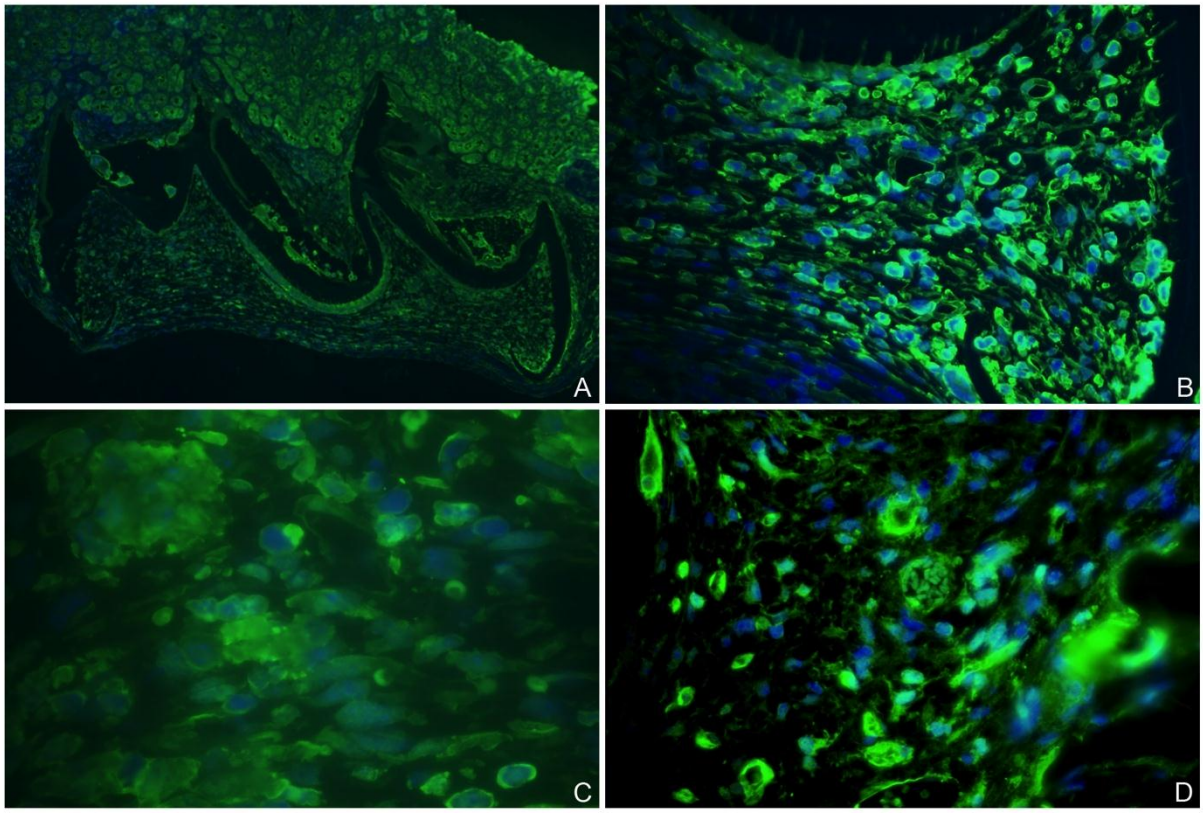

Figura 5.4 - (A). Amostra de coroa transplantada com células CD146- em animais GFP após 14 dias em menor aumento (10x), B em maior aumento (40x) e C em aumento de 100x sob imersão, evidenciando a marcação positiva para o marcador anti-GFP em todas as células (coloração FITC). D. Amostra controle de coroa transplantada somente com colágeno após 21 dias em aumento de 40x evidenciando marcação positiva para anti-GFP.

6 DISCUSSÃO

De maneira geral, nossos resultados mostraram que não é necessário o acréscimo de células para formar um tecido conjuntivo frouxo no interior do espaço pulpar, que somente amostras que receberam células formaram de osteodentina, e que mesmo utilizando animais imunocompetentes (GFPs), a inflamação não parece ser um problema para a formação tecidual no modelo utilizado. O tecido conjuntivo frouxo formado no espaço pulpar é menos celularizado do que se espera para uma polpa normal com a mesma idade de desenvolvimento, mas é vascularizado e mostra intimo contato com a parede dentinária em todas as amostras. Assim, podemos dizer que esse tecido é viável.

O arcabouço mineralizado estava sempre totalmente preservado e não mostrava sinais de reabsorção, mesmo nas amostras que apresentaram células gigantes multinucleadas. Curiosamente, quando presentes, essas se localizavam externamente.

O uso de diferentes modelos nos permitiram identificar, através da expressão de proteínas específicas, as células humanas que foram transplantadas e as células do animal receptor. Nos camundongos *Nude,* as células humanas puderam ser identificadas através da expressão da proteína Lamina A, enquanto nos camundongos GFP, as células do animal receptor puderam ser identificadas pela expressão de GFP. Nos dois modelos, as células negativas representavam a outra espécie. Assim, após a realização das reações para os respectivos marcadores, verificamos que os resultados obtidos eram complementares. Nas amostras *Nude*, o marcador anti-Lamina A foi considerado negativo em todas as amostras. Isso quer dizer que, após os tempos de espera, 14 e 21 dias, não foi possível identificar a presença de células humanas. Nossos resultados mostram que, o tecido formado era totalmente composto por células do receptor. Isso foi confirmado nas amostras GFPs, onde a marcação positiva para o marcador anti-GFP, era predominante no tecido neoformado, não sendo possível identificar as células transplantadas ou GFPs negativas.

A receita preconizada para regeneração tecidual com sucesso nos dias atuais pressupõe o uso de células, um arcabouço que as mantém, o acréscimo ou não de fatores de crescimento e uma fonte de suprimento sanguíneo. Dentre esses

componentes a fonte de nutrição é altamente relevante, pois garante a viabilidade do tecido que se pretende reconstruir. No presente trabalho, a cápsula renal foi o leito receptor escolhido para ser fonte de nutrição. Essa escolha se mostrou adequada, independente do modelo animal utilizado, visto que no interior das coroas transplantadas sempre ocorreu a formação de tecido biologicamente ativo (com presença de células e vascularizado), algo esperado na bioengenharia tecidual. Contudo, é importante ressaltar que, apesar do rim ser de fácil acesso em camundongos, a cápsula renal é fina e friável, podendo ser facilmente rompida se não for devidamente manipulada. Esses problemas, no entanto, não ocorreriam caso o transplante fosse feito em humanos pois nesse caso, seria utilizado o próprio dente do paciente com acesso a câmara pulpar pela boca. Nos camundongos, a limitação de abertura bucal, o difícil acesso à câmara pulpar em molares e a própria morfologia dental (com o forame apical reduzido e excesso de cemento) inviabilizou nossa escolha pela via bucal. O modelo escolhido de transplante em rim com uso de coroas ainda abertas nos garantiu, portanto, que o suprimento sanguíneo necessário para a formação e manutenção tecidual seria suficiente e que atingiria toda a extensão da coroa. De qualquer forma, em todas as amostras houve promoção de angiogênese, mesmo sem o uso fatores de crescimento como o VGF (Huang et al., 2010).

O tratamento feito com tripsina 0,05% EDTA se mostrou eficaz, sendo comprovado por análise histológica em cortes seriados. Esses achados mostram que pode ocorrer regeneração pulpar, tendo somente um bom aporte sanguíneo, e sem que células exógenas sejam introduzidas. Isso já é demonstrado em casos de dentes com risogênese incompleta, que conseguem promover a regeneração pulpar, mesmo perante necrose pulpar, através somente da circulação apical (Ding et al., 2009; Thibodeau et al., 2007, Wang et al., 2010). Mesmo assim, é importante ponderar que a qualidade desse tecido pode não ser a que espera, visto que a formação de odontoblastos é vital para a regeneração da dentina, e essa característica não foi por nós observada.

Em geral, o tecido formado nas amostras transplantadas com células de papila, tanto para as populações CD146+ quanto CD146- era frouxo, de celularidade variável dentre as amostras estudadas, porém bem menos celularizado quando comparado a uma polpa normal ou mesmo ao germe dental 6.5 transplantado

completo. O número reduzido de células e a variabilidade encontrada podem ser decorrência do uso do colágeno em apresentação líquida visto que é possível que em algumas amostras parte do conteúdo contendo células tenha extravasado durante ou após a colocação dos mesmos sob a cápsula renal. Outra possível causa é quantidade de células transplantadas. É provável que 10^4 células não sejam suficientes para promover a formação tecidual mais adequada e que números maiores de células transplantadas resultem em um tecido mais semelhante ao tecido pulpar biologicamente normal. Mesmo assim, é possível afirmar que, o uso do colágeno em apresentação líquida mostrou-se eficaz tendo em vista que em todas as amostras, o tecido neoformado manteve-se em íntimo contato com a dentina do arcabouço, não sendo visualizados os espaços que resultam da contração do colágeno em apresentação gel (Prescott et al., 2008; Huang et al., 2010). Em estudos futuros o número de células transplantadas será aumentado e também utilizaremos outros veículos como o matrigel e o ácido polilático.

Interessantemente, somente nos grupos que receberam células tanto CD146+ quanto CD146- houve a formação de osteodentina. No entanto, após 14 e 21 dias de análise, as células humanas não estavam presentes nos tecidos formados nos camundongos. Assim, podemos supor que as células desempenharam alguma função biológica como por exemplo a produção de fatores de crescimento ou indução da diferenciação de células locais para que as mesmas produzam tecido mineralizado. No entanto, essa função é transitória e isso nos leva a acreditar que as células, ao serem transplantadas, sinalizem para o hospedeiro, e em seguida, ou migrem para outros locais ou entrem em apoptose. Essa resposta é consistente com que é apresentado na literatura, como o estudo feito por Xu e colaboradores em 2007, onde as células transplantadas não eram identificadas após 14 dias, ou até mesmo o estudo feito por Zimmermann em 2011, onde após 4 dias as células transplantadas não foram identificadas no local do transplante. Os mecanismos envolvidos em como as células-tronco promovem a reparação/regeneração tecidual ao serem transplantadas *in vivo* ainda não estão esclarecidos, assim como o papel que exercem nesses eventos. Mais estudos são necessários para que se obtenha essas respostas.

A presença da osteodentina é questionável visto que não se sabe como controlar a extensão da área de mineralização. Em um dente que sofre o trauma

crônico causado pelo ácido produzido por bactérias que invade os canalículos dentinários, a resposta dos odontoblastos na forma de dentina terciária é desejada pois ocorre no local da agressão e de forma controlada. Se a dentina terciária formada obliterar a câmara pulpar, sua presença passa a ser indesejada prejudicando o processo reparação ou neoformação. Nesse sentido, em nossos resultados onde houve a formação de osteodentina, precisamos nos aprofundar nos estudos aumentando os tempos de análise para verificar se existe limite para esse fenômeno e também para entender como e porque as células de papila apical podem induzir ou modular esse processo.

É importante salientar que nos germes dentais p6.5 transplantados inteiros também houve a formação descontrolada de osteodentina. Nesse caso, esse processo era mais exuberante quando comparado com ao observado nas amostras de coroas vazias que receberam as populações CD146+ e CD146-.

A célula-tronco da papila apical (SCAPs) é uma população que foi caracterizada recentemente (Sonoyama et al., 2006; Sonoyama et al., 2008), porém seu uso para regeneração pulpar parece ser promissor. Estudos apontam que populações dessas células enriquecidas para o marcador CD146 apresentam maior capacidade de diferenciação (Bakapoulou et al., 2013). No presente estudo, porém, não pôde ser notada diferenças entre as amostras que receberam células CD146+ e CD164-. Isso pode estar relacionado, primeiramente pelo fato de, um marcador não ser exclusivo para caracterizar uma célula como sendo célula-tronco (Bianco et al., 2008; Jones; McGonagle, 2008; Morikawa et al., 2009). Temos então, que na população positiva para o CD146 exista sim células com propriedades tronco, assim como, é possível que na população negativa também, porém que expresse outros marcadores além do CD146.

Outro ponto importante é a passagem em que o experimento foi realizado. No momento em que a célula é retirada do tecido e exposta ao ambiente de cultura, por questões de adaptação, ela sofrerá alterações em sua estrutura normal. Essas alterações tendem a aumentar ao passar dos subcultivos (Ruparel et al., 2013), fazendo com que a célula *in vitro* seja diferente da célula em seu ambiente natural. Mudanças como alteração de marcadores de superfície são comuns (Jones et al., 2002). Portanto, é possível que em cultura o padrão de marcação para o CD146 se altere, mesmo após a separação. No nosso estudo, dado que a papila apical é um

tecido pequeno, portanto com limitações para extração de grande quantidade de células, após a cultura primária ser estabelecida, foi necessário expandir o cultivo até a passagem 4, quando foi realizada a separação. Como a quantidade de células positivas para o CD146 também era bastante restrita (cerca de 1,6%) após a separação, houve a necessidade de expandir as células novamente para viabilizar o transplante, que nesse caso foi realizado em terceira passagem após a separação. Portanto, é possível que o subcultivo possa ter alterado as populações tanto enriquecidas quanto não enriquecidas.

Há relatos na literatura que apontam em dentes com ápice aberto que sofreram traumas ainda tinham capacidade de terminar seu desenvolvimento completando a formação da raiz. Isso porque, além de um maior aporte vascular, restos celulares como da Bainha de Hers e da papila apical se mantinham. É possível que as células da bainha sinalizem para que as células da papila se diferenciem em odontoblastos que secretam matriz de dentina primária (Sonoyama et al., 2008). Então, o uso de células da papila apical parece ser lógico quando se espera regenerar tecidos funcionais semelhantes ao tecido pulpar normal.

O uso de dois modelos de animais trouxe respostas interessantes relacionadas à imunomodulação celular, apesar desse não ter sido objeto desse estudo. Quando analisamos comparativamente as amostras Nude e GFP o padrão de inflamação foi diferente, embora em nenhum dos modelos tenha havido algum prejuízo ao tecido formado em decorrência da inflamação.

Essa diferença se deve à característica imunológica de cada um dos modelos. O *Nude* é conhecido por possuir uma alteração gênica que promove aplasia congênita do timo, prejudicando a maturação de linfócitos T. Isso suprime a resposta inflamatória adaptativa mediada por células (Nehs et al., 1994), fazendo seu uso ideal pra estudos de células humanas (Reth, 1995). Já o C57bl6-GFP é imunorreativo, tendo respostas inflamatórias normais. O que podemos analisar é que, nas amostras *Nude* raras células inflamatórias estavam presentes, na sua maioria polomorfonucleares. Já em algumas amostras GFP era possível notar infiltrado inflamatório mononuclear, além da presença de células gigantes multinucledas. A presença dessas células caracteriza uma reação de corpo estranho, porém não é possível afirmar o que desencadeou essa resposta. O curioso foi que, essas células estavam restritas à parte externa da coroa, o que pode

estar relacionado a um trauma local incitado pela coroa, ou até mesmo, uma reação provocada pelo esmalte. O fato do infiltrado não estar presente na região da polpa onde as células foram transplantadas, nos leva a acreditar que, de fato, as células-tronco mesenquimais de papila apical possam ter capacidade imunomodulatória *in vivo*, como sugerido por Ding e colaboradores em 2010. Essa característica torna o uso dessas células favorável para a bioengenharia pulpar mas, não conhecemos mecanismos envolvidos, o que novamente faz com que mais estudos sejam necessários.

7 CONCLUSÕES

a. Em todas as condições testadas houve formação de tecido biologicamente ativo no espaço pulpar.
b. A totalidade desse tecido se originou do organismo receptor e não houve necessidade do uso de células para a sua formação.
c. Não houve diferenças morfológicas entre as amostras que receberam populações CD146+ e CD146- mas o uso de células ocasionalmente induziu a formação de osteodentina em algumas amostras.
d. A inflamação observada em algumas amostras não prejudicou a formação tecidual no espaço pulpar em nenhum dos modelos animais.

REFERÊNCIAS[1]

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

Alongi DJ, Yamaza T, Song Y, et al. Stem/progenitor cells from inflamed human dental pulp retain tissue regeneration potential. Regen Med. 2010 July; 5(4): 617-31.

Augello A, Tasso R, Negrini SM et al. Cell therapy using allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells prevents tissue damage in collagen-induced arthritis. Arthritis Rheum. 2007 Apr;56(4):1175-86.

Bakopoulou A, Leyhausen G, Volk J, et al. Comparative characterization of STRO-1 (-) /CD146(+) and STRO-1(+)/CD146(+) apical papilla stem cells enriched with flow cytometry. Arch Oral Biol. 2013 Oct;58(10):1556-68.

Baksh D, Yao R, Tuan RS. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. Stem Cells. 2007 Jun;25(6):1384-92. Epub 2007 Mar 1.

Barbash IM, Chouraqui P, Baron J, 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. Epub 2003 Aug 4.

Barrandon Y, Green H. Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. Proc Natl Acad Sci USA 1987, 84(8): 2302-06.

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

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

[1] De acordo com estilo Vancouver.

Becker AJ, McCulloch EA, Till JE. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. Nature. 1963 Feb 2;197:452-4.

Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology and potential applications. Stem Cells 2001;19(3):180-92.

Bianco P, Robey PG, Simmons PJ, Mesenchymal stem cells:Revisiting history, concepts and assays. Cell Stem Cell. 2008;2:313-19.

Blau HM, Brazelton TR, Weimann JM. The evolving concept of a stem cell: entity or function?. Cell 2001; 105:829-41.

Cahill DR, Marks SC Jr. Tooth eruption: evidence for the central role of the dental follicle. J Oral Pathol. 1980 Jul;9(4):189-00.

Calenic B, Ishkitiev N, Yaegaki K et al., 2010; Magnetic separation and characterization of keratinocyte stem cells from human gingiva. J Periodontal Res 2010;45 (6): 703-08.

Caplan AI. Mesenchymal stem cells. J Orthop Res. 1991 Sep;9(5):641-50.

Chai Y, Jiang X, Ito Y, et al., Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. Development. 2000;127(8):1671-79.

Clayton E, Doupé DP, Klein AM et al. A single type of progenitor cell maintains normal epidermis. Nature 2007; 446 (7132): 185-89.

Cordeiro MM, Dong Z, Kaneko T, et al. Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. J Endod 2008;34(8):962-69.

d’Aquino R, De Rosa A, Lanza V, et al. Human mandible bone defect repair by the grafting of dental pulp stem/progenitor cells and collagen sponge biocomplexes. Eur Cell Mater 2009;18:75–83

Meirelles L, Caplan AI, Nardi NB. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. Stem Cells. 2008 Sep;26(9):2287-99.

De Bari C, Dell'Accio F, Vandenabeele F, et al. Skeletal muscle repair by adult human mesenchymal stem cells from synovial membrane. J Cell Biol. 2003 Mar 17;160(6):909-18. Epub 2003 Mar 10.

De Bari C, Dell'accio F. Cell therapy: a challenge in modern medicine. Biomed Mater Eng. 2008;18(1 Suppl):S11-7.

Demarco FF, Conde MC, Cavalcanti BN, et al. Dental Pulp Tissue Engineering. Braz Dent J. 2011;22(1):3-13.

Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, 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.

Ding G, Liu Y, An Y, et al. Suppression of T cell proliferation by root apical papilla stem cells in vitro. Cells Tissues Organs. 2010;191(5):357-64

Ding RY, Cheung GS, Chen J, et al. Pulp revascularization of immature teeth with apical periodontitis:a clinical study. J Endod 2009;35:745–9.

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

Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. Br J Haematol. 2000 Apr;109(1):235-42.

Estrov Z. Stem cells and somatic cells: reprogramming and plasticity. Clin Lymphoma Myeloma 2009;9 Suppl 3:S319-28.

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

Flores MG, Yashiro R, Washio K, et al. Periodontal ligament cell sheet promotes periodontal regeneration in athymic rats. J Clin Periodontol. 2008 Dec;35(12):1066-72.

Ford CE, Hamerton JL, Barnes DW, Loutit JF. Cytological identification of radiation-chimaeras. Nature. 1956 Mar 10;177(4506):452-4.

Friedenstein AJ. Precursor cells of mechanocytes. Int Rev Cytol. 1976;47:327-59.

Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. J Cell Biol. 1992 Nov;119(3):493-501.

Glowacki, S. Mizuno. Collagen scaffolds for tissue engineering. Biopolymers. 2008;89:338-44.

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

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

Han J, Menicanin D, Gronthos S, Bartold P. Stem cells, Tissue engineering and periodontal regeneration. Aust Dent J. 2013 Sep 23. doi: 10.1111/adj.12100.

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

Hao QL, Shah AJ, Thiemann FT, et al. A functional comparison of CD34 + CD38- cells in cord blood and bone marrow. Blood. 1995 Nov 15;86(10):3745-53.

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

Huang G, Yamaza T, Shea LD, et al. Stem/progenitor Cell-Mediated De Novo Regeneration of Dental Pulp with Newly Deposited Continuous Layer of Dentin in an In Vivo Model. Tissue Eng Part A. 2010 Feb;16(2):605-15. doi: 10.1089/ten.

Huang G. Pulp and dentin tissue engineering and regeneration: current progress. Regen Med. 2009 September ; 4(5): 697–707.

Hyun I. The bioethics of stem cell research and therapy. J Clin Invest. 2010;120:71-5.

Igarashi T, Shimmura S, Yoshida S et al. Isolation of oral epithelial progenitors using collagen IV. Oral Dis 2008; 14(5): 413-8.

Iohara K, Nakashima M, Ito M, et al. Dentin regeneration by dental pulp stem cell therapy with recombinant human bone morphogenetic protein 2. J Dent Res 2004;83(8):590-5.

Iohara K, Zheng L, Ito M, et al. Regeneration of dental pulp after pulpotomy by transplantation of CD31(-)/CD146(-) side population cells from a canine tooth. Regen Med 2009;4(3):377-85.

Jacobson LO, Simmons EL, Marks EK, Eldredge JH. Recovery from radiation injury. Science 1951 May 4;113(2940):510-11.

Ji JF, He BP, Dheen ST, Tay SS. 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. 2004;22(3):415-27.

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.

Jones E, McGonagle D, Human bone marrow mesenchymal stem cells in vivo. Rheumatology, 2008 (47):126-31.

Jones EA, Kinsey SE, English A, et al. Isolation and characterization of bone marrow multipotentialmesenchymal progenitor cells. Arthritis Rheum. 2002 Dec;46(12):3349-60.

Jones PH. Epithelial stem cells. Bioessays. 1997 Aug;19(8):683-90.

Kai S, Hara H. Allogenic hematopoietic stem cell transplantation. Ther Apher Dial. 2003 Jun; 7(3):285-91.

Katchburian E, Arana-Chavez, V. Histologia e embriologia oral. São Paulo: Panamericana; 2004. 372 p.

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

Kim SH, Kim KH, Seo BM, 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.

Király M, Kádár K, Horváthy DB, et al. Integration of neuronally predifferentiated human dental pulp stem cells into rat brain in vivo. Neurochem Int. 2011 Sep;59(3):371-81.

Klein AM, Nakagawa T, Ichikawa R, et al. Mouse germ line stem cells undergo rapid and stochastic turnover. Cell Stem Cell. 2010; 7 (2): 214-24.

Kollar E, Mina M. Role of the early epithelium in the patterning of the teeth and Merckel's cartilage. J Craniofac Genet Dev Biol. 1991 Oct-Dec;11(4):223-8.

Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, May WS. CD34: structure, biology, and clinical utility. Blood.1996 Jan 1;87(1):1-13.

LaBonne C, Bronner-Fraser M, Molecular mechanisms of neural crest formation. Annu Res Cel Dev Biol. 1999; 15:81-112.

Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. Science.1993 May 14; 260 (5110):920-6.

Link H, Arseniev L, Bähre O, Kadar JG, Diedrich H, Poliwoda H. Transplantation of allogeneic CD34+ blood cells. Blood. 1996 Jun 1;87(11):4903-9.

Liu Y, Zheng Y, Ding G, et al. Periodontal ligament stem cell-mediated treatment for periodontitis in miniature swine. Stem Cells. 2008 Apr;26(4):1065-73.

Lovell-Badge R. The future for stem cell research. Nature. 2001;414:88-91.

Marks SC Jr, Cahill DR. Experimental study in the dog of the non-active role of the tooth in the eruptive process. Arch Oral Biol. 1984;29(4):311-22.

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

Masahito I, Katsuya K, Yasuhide Y, et al. Green fluorescent protein as a marker in transgenic mice. Develop. Growth Differ. 1995; 37:455-9.

Mimeault M, Batra SK. Concise review: recent advances on the significance of stem cells in tissue regeneration and cancer therapies. Stem Cells. 2006; 24:2319-45.

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

Miyata T, Taira T, Noishiki Y. Collagen engineering for biomaterial use. Clin Mater. 1992;9(3-4):139-48.

Mooney DJ, Powell C, Piana J, Rutherford B. Engineering dental pulp-like tissue in vitro. Biotechnol Prog 1996;12(6):865-68.

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

Morigi M, Imberti B, Zoja C et al. Mesenchymal stem cells are renotropic, helping to repair the kidney and improve function in acute renal failure. J Am Soc Nephrol. 2004 Jul;15(7):1794-804.

Morikawa S, Mabuchi Y, Kubota Y, et al., Prospective identification, isolation, and systemic transplantation of multipotent mesenchymal stem cells in murine bone marrow. J Exp Med. 2009 Oct 26;206(11):2483-96.

Morrison SJ, Kimble J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. Nature. 2006 Jun 29;441(7097):1068-74.

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

Morsczeck C. Gene expression of runx2, Osterix, c-fos, DLX-3, DLX-5, and MSX-2 in dental follicle cells during osteogenic differentiation in vitro. Calcif Tissue Int 2006;78(2):98-02.

Murray P, Garcia-Godoy F, Hargreaves K. Regenerative endodontics: a review of current status and a call for action. J Endod 2007;33(4):377-90.

Nakamura Y, Ando K, Chargui J, et al. Ex vivo generation of CD34(+) cells from CD34(-) hematopoietic cells. Blood. 1999 Dec 15;94(12):4053-9.

Nakashima M, Akamine A. The application of tissue engineering to regeneration of pulp and dentin in endodontics. J Endod. 2005 Oct;31(10):711-8.

Nanci A. Ten Cate's Oral Histology: Development, Structure, and Function. 7th ed. United States: Elsevier Health Sciences; 2007.

Nehls M, Pfeifer D, Schorpp M, et al. New member of the winged-helix protein family disrupted in mouse andrat nude mutations. Nature.1994 Nov 3;372(6501):103-7.

Nör JE. Tooth regeneration in operative dentistry. Oper Dent. 2006 Nov-Dec;31(6):633-42.

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. 238(1):120-32.

Orban B. Oral histology and embryology. Saint Louis: The C. V. Mosby Company.1966. p: 127-53.

Parner ET, Heidmann JM, Kjaer I, et al. Biological interpretation of the correlation of emergence times of permanent teeth. J Dent Res, 2002. 81(7):451-4.

Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. Lancet. 2005 Nov 19;366(9499):1809-20.

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

Potten CS, Morris RJ. Epithelial stem cells in vivo. J Cell Sci Suppl. 1988;10:45-62.

Prescott RS, Alsanea R, Fayad MI, et al. In vivo generation of dental pulp-like tissue by using dental pulp stem cells, a collagen scaffold, and dentin matrix protein 1 after subcutaneous transplantation in mice. J Endod. 2008 Apr;34(4):421-6.

Reth M. Immunodeficiency. Trapping the nude mouse gene. Curr Biol. 1995 Jan 1;5(1):18-20.

Rheinwald, R. Methods for clonal growth and serial cultivation of normal human epidermal keratinocytes and mesothelial cells. In Cell Growth and Division. A Practical Approach. Oxford: Bassega; 1989. p.81-94.

Ruparel NB, de Almeida JF, 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.

Scadden DT. The stem-cell niche as an entity of action. The stem-cell niche as an entity of action. Nature. 2006 Jun 29;441(7097):1075-9.

Seo BM, Miura M, Gronthos S, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. Lancet 2004;364(9429):149-55.

Seo BM, Sonoyama W, Yamaza T, Coppe C, et al. SHED repair critical-size calvarial defects in mice. Oral Diseases. 2008 Jul; 14(5): 428-34.

Shamblott MJ, Axelman J, Wang S, et al. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. Proc Natl Acad Sci U S A 1998;95(23):13726-31.

Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. J Bone Miner Res, 2003; 18(4):p.696-704.

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

Shimono M, Ishikawa T, Ishikawa H, et al. Regulatory mechanisms of periodontal regeneration. Microsc Res Tech. 2003 Apr 1;60(5):491-502.

Skoglund A, Tronstad L, Wallenius K. A microangiographic study of vascular changes in replanted and autotransplanted teeth of young dogs. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1978;45(1):17-28.

Smith AJ, Cassidy N, Perry H, et al. Reactionary dentinogenesis. Int J Dev Biol. 1995 Feb;39(1):273-80.

Sonoyama W, Liu Y, Fang D, et al. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in Swine. PLoS ONE 2006;1:e79.

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

Takada T, Iida K, Awaji T, et al. Selective production of transgenic mice using green fluorescent protein as a marker. Nat Biotechnol.1997 May;15(5):458-61.

Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell. 2007 Nov 30;131(5):861-72.

Takeda T, Tezuka Y, Horiuchi M, Characterization of dental pulp stem cells of human tooth germs. J Dent Res 2008: 87: 676–81.

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

Thesleff I, Aberg T. Molecular regulation of tooth development. Bone. 1999 Jul;25(1):123-5.

Thibodeau B, Teixeira F, Yamauchi M, et al. Pulp revascularization of immature dog teeth with apical periodontitis. J Endod 2007;33(6):680-9.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science 1998; 282(5391):1145-7.

Till JE, McCulloch EA, Siminovitch L. A stochastic model of stem cell proliferation, based on the growth of spleen colony-forming cells. Proc Natl Acad Sci USA 1964; 51(1): 29–36.

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

Tziafas D, Smith AJ, Lesot H. Designing new treatment strategies in vital pulp therapy. J Dent. 2000 Feb;28(2):77-92.

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

Wada N, Gronthos S, Bartold PM. Immunomodulatory effects of stem cells. Periodontol 2000. 2013 Oct;63(1):198-216.

Wagners AJ, Weissman IL.. Plasticity of adult stem cells. Cell. 2004 Mar 5;116(5):639-48.

Wang J, Ma H, Jin X, et al. The effect of scaffold architecture on odontogenic dfferentiation of humam dental pulp stem cells. Biotarerials, 2011 Nov;32(31):7822-30.

Wang JC, Doedens M, Dick JE. Primitive human hematopoietic cells are enriched in cord blood compared with adult bone marrow or mobilized peripheral blood as measured by the quantitative in vivo SCID-repopulating cell assay. Blood. 1997 Jun 1;89(11):3919-24.

Wang X, Thibodeau B, Trope M, et al. Histologic characterization of regenerated tissues in canal space after the revitalization/revascularization procedure of immature dog teeth with apical periodontitis. J Endod. 2010 Jan;36(1):56-63.

Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration and units in evolution. Cell 2000;100:157-68.

Wise GE, Yao S. Regional differences of expression of bone morphogenetic protein-2 and RANKL in the rat dental follicle. Eur J Oral Sci. 2006 Dec;114(6):512-6.

Wood A. Ethics and embryonic stem cell research.Stem Cell Rev. 2005 Dec;1(4):317-24.

Xu J, Woods CR, Mora AL, 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):L131-41. Epub 2007 Apr 6.

Yamashita Y. Asymetric stem cell division and pathology: insights from Drosophila stem cell system. J Pathol 2009; 217:181-5.

Yamashita YM, Yuan H, Cheng J, Hunt AJ. Polarity in stem cell division: asymmetric stem cell division in tissue homeostasis. Cold Spring Harb Perspect Biol 2010; 2(1):a001313.

Yao S, Pan F, Prpic V, Wise GE. Differentiation of stem cells in the dental follicle. J Dent Res. 2008 Aug;87(8):767-71.

Zimmermann CE, Gierloff M, Hedderich J, et al. Survival of transplanted rat bone marrow-derived osteogenic stem cells in vivo. Tissue Eng Part A 2011;17:1147–56.

Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. Mol Biol Cell. 2002 Dec;13(12):4279-95.

Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, et al. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. Arthritis Res. 2000;2(6):477-88. Epub 2000 Aug 31.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Contribuição de células provenientes do sistema circulatório e de células transplantadas na bioengenharia pulpar

Pesquisador: Andrea Mantesso Pobocik

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 13275013.0.0000.0075

Instituição Proponente: Universidade de Sao Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 224.083

Data da Relatoria: 20/03/2013

Apresentação do Projeto:

O estudo utilizará células humanas provenientes de terceiros molares que possuam indicação do cirurgião-dentista para serem extraídos. O pesquisador não terá contato direto com o paciente, somente com o dente extraído, que será processado em condições de assepsia, e o tecido pulpar será utilizado para obtenção de células de polpa dental.

Objetivo da Pesquisa:

Analisar a participação de populações celulares e co-participação de células que migram do sistema circulatório quando coroas dentais com células são transplantadas em animais geneticamente modificados.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Inerentes ao procedimento cirúrgico, não relacionados diretamente ao estudo

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa bem elaborada e não fere nenhum preceito ético

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatória estão apresentados e assinados

Recomendações:

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer

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

modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendencias

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

SAO PAULO, 20 de Março de 2013

Assinador 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 – Parecer da Comissão de Ética no uso de Animais

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **045** nas fls. **127** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Andrea Mantesso Pobocik**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa *"Contribuição do sistema circulatório na bioengenharia pulpar"* do qual participam o(s) **Pesquisadores Cibele Pelissari dos Santos, Marcia Pinto Alves Mayer,** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **17.04.2012, com validade de 4 anos**.

São Paulo, 18 de abril de 2012.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA – ICB/USP

ANEXO C – Declaração de Doação de dentes

Faculdade de Odontologia
Universidade de São Paulo

DECLARAÇÃO DE DOAÇÃO DE DENTES

- **Título do projeto:** Contribuição de células provenientes do sistema circulatório e de células transplantadas na bioengenharia pulpar
- **Pesquisadora responsável:** Andrea Mantesso Pobocik
- **Pesquisadora executante:** Cibele Pelissari dos Santos
- **Instituição/Departamento:** Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo/ Departamento de Estomatologia/ Disciplina de Patologia Bucal
- **Local do Estudo**: Os dentes serão coletados no curso de Aperfeiçoamento em Cirurgia da Fundação pra 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
- **Objetivo:** 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.
- **Procedimento:** Depois de serem coletados, os dentes serão abertos até chegar no canal. O tecido pulpar (o que está dentro do canal) do dente será removido no laboratório para separar as células-tronco. Após o término da pesquisa, as células serão armazenadas em nitrogênio líquido.
- **Benefícios:** Esta pesquisa visa contribuir com o conhecimento sobre as células-tronco de dentes, sem benefícios diretos pra você.
- **Riscos:** 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.
- **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.
- **Ajuda de Custo:** A doação dos dentes é voluntária, não havendo qualquer auxílio de ordem financeira.
- **Reutilização dos dados ou material biológico:** Você autoriza a utilização de seus dados e material biológico (tecidos dentais) em outras pesquisas?

( ) NÃO autorizo a utilização de dados ou material biológico (tecidos dentais) em outra pesquisa. Neste caso seu material será armazenado em embalagens para descarte de material biológico (saco plástico branco), seguindo para coleta e tratamento pelo serviço especializado para materiais biológicos e hospitalares.

( ) SIM autorizo a utilização de dados ou material biológico (tecidos dentais) em outra pesquisa

Caso autorize a utilização dos tecidos dentais coletados, você deseja ser consultado?

( ) NÃO quero ser consultado da utilização dos meus dados ou material biológico (tecidos dentais) em outra pesquisa, desde que a nova pesquisa seja aprovada pelo

Comitê de Ética em Pesquisa.
( ) SIM quero ser consultado da utilização dos meus dados ou material biológico (tecidos dentais) em outra pesquisa.

- **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. Andrea Mantesso Pobocik), por email mantesso@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:

_____
Profª. Drª. Andrea Mantesso Pobocik
RG 20.522.258-4

Pesquisadora executante:

_____
Cibele Pelissari dos Santos
RG 33.688.075-3