

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

STEPHANY PIMENTA CARVALHO

DISTRIBUIÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO ADULTA HUMANA EM DIFERENTES
FASES DO DESENVOLVIMENTO DENTÁRIO: UMA ANÁLISE METODOLÓGICA
DOS CONSTITUINTES HISTOLÓGICOS

GOIÂNIA
2019

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

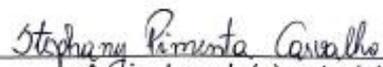
Nome completo do autor: *Stephany Rimenta Carvalho*

Título do trabalho: *"Distribuição de células - tronco adulta humana em diferentes fases do desenvolvimento embrionário: uma análise metodológica dos constituintes histológicos"*

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:


Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 17 / 12 / 2019

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

² A assinatura deve ser escaneada.

STEPHANY PIMENTA CARVALHO

DISTRIBUIÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO ADULTA HUMANA EM DIFERENTES
FASES DO DESENVOLVIMENTO DENTÁRIO: UMA ANÁLISE METODOLÓGICA
DOS CONSTITUINTES HISTOLÓGICOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás, como pré-requisito para obtenção do grau de Mestre em Odontologia, área de concentração Clínica Odontológica.

Orientadora: Prof. Dra. Eneida Franco Vêncio

GOIÂNIA

2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Carvalho, Stephany Pimenta

Distribuição de células-tronco adulta humana em diferentes fases do desenvolvimento dentário: uma análise metodológica dos constituintes histológicos [manuscrito] / Stephany Pimenta Carvalho. - 2019.

LV, 55 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Eneida Franco Vêncio. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Odontologia (FO), Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Goiânia, 2019.

Bibliografia.

Inclui siglas, abreviaturas, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Células-tronco adulta. 2. Polpa dentária. 3. Ligamento periodontal. 4. Folículo dentário. 5. Métodos. I. Vêncio, Eneida Franco, orient. II. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata nº 215 da sessão de Defesa de Dissertação de **Stephany Pimenta Carvalho**, que confere o título de Mestre em **Odontologia**, na área de concentração em **Clínica Odontológica**.

Aos **dez dias do mês de dezembro de 2019**, a partir das **09:00**, no **auditório** da **Faculdade de Odontologia**, realizou-se a sessão pública de Defesa de Dissertação intitulada **“Distribuição de células-tronco adulta humana em diferentes fases do desenvolvimento dentário: uma análise metodológica dos constituintes histológicos”**. Os trabalhos foram instalados pela Orientadora, Professora Doutora **Eneida Franco Vêncio (PPGO/UFG)** com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Professor Doutor **Carlos Estrela (PPGO/UFG)**, membro titular interno; Professor Doutor **Pedro Paulo Chaves de Souza (PPGO/UFG)**, membro titular interno. Durante a arguição os membros da banca **não fizeram** sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Dissertação, tendo sido a candidata **aprovada** pelos seus membros. Proclamados os resultados pela Professora Doutora **Eneida Franco Vêncio**, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos **dez dias do mês de dezembro de 2019**.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por **Eneida Franco Vencio, Professor do Magistério Superior**, em 10/12/2019, às 10:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Pedro Paulo Chaves De Souza, Professor do Magistério Superior**, em 10/12/2019, às 10:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carlos Estrela, Professor do Magistério Superior**, em 10/12/2019, às 10:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cláudio Rodrigues Leles, Vice-Coordenador de Pós-graduação**, em 10/12/2019, às 11:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luciane Ribeiro De Rezende Sucasas Da Costa, Professor do Magistério Superior**, em 10/12/2019, às 16:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

Documento assinado eletronicamente por **Nádia Do Lago Costa, Coordenadora de Pós-Graduação**,



em 11/12/2019, às 11:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1026061** e o código CRC **16820D69**.

Referência: Processo nº 23070.043068/2019-73

SEI nº 1026061

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

BANCA EXAMINADORA DE DEFESA

Aluna: Stephany Pimenta Carvalho

Orientadora: Profa. Dra. Eneida Franco Vêncio

MEMBROS:

Profa. Dra. Tessa de Lucena Botelho

Prof. Dr. Carlos Estrela

MEMBROS SUPLENTE:

Prof. Dr. Pedro Paulo Chaves de Souza

Profa. Dra. Lidia Andreu Guillo

DEDICATÓRIA

Dedico, primeiramente, a Deus por até aqui ter me dado a Energia Vital, por me fazer um ser persistente diante das dificuldades e grato por cada detalhe da vida.

Aos meus pais, por me gerar, cuidar, amar, permitir viver diversas oportunidades e por me falarem NÃO.

Ao meu irmão, por ser cúmplice nas batalhas e sempre terminar seu discurso com “a gente vai conseguir”.

A minha família, por ser abrigo, mães, pais e irmãos por todos os lugares que tive que passar durante a jornada.

Aos meus amigos e a todos, que inconscientemente, recarregaram minhas Energias sendo ombro, carinho, calma, ajuda e amor.

A minha orientadora, Eneida Franco Vêncio, por ser presente, detalhista, questionadora, e por ver em mim um potencial que eu mesma não via.

Dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Professora Dra. Eneida Franco Vêncio, pela paciência, amizade e ensinamentos tanto científicos, quanto de vida, durante esta jornada.

Ao Laboratório de Biologia Molecular e Patologia e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) por tornar esta pesquisa possível financeiramente.

Aos professores das Clínicas de Cirurgia Bucomaxilofacial e Infantil pela amizade e ajuda na coleta de material para a condução da pesquisa.

Aos pacientes, que consentiram em participar deste estudo.

Aos meus amigos e colegas integrantes da minha turma de Mestrado – Ana Carolina Serafim, Higor Almeida, Letícia Candine, Víctor Lobato e Vitória Magalhães – aos Doutorandos – Lívia Rodrigues e Ricardo Natã, que sempre foram apoio motivacional nos momentos difíceis de nossas respectivas pesquisas, por proporcionarem momentos alegres, carinhosos e de boa convivência na academia.

Aos meus amigos da graduação por ajudarem na coleta de material para o estudo e pela amável convivência.

E a todos os amigos e familiares que acompanharam este período intenso de grande crescimento e importância na minha formação.

Muito obrigada!

Die Mutter

*“Es gibt Menschen, die kämpfen einen Tag, und sie sind gut.
Es gibt andere, die kämpfen ein Jahr und sind besser.
Es gibt Menschen, die kämpfen viele Jahre und sind sehr gut.
Aber es gibt Menschen, die kämpfen ihr Leben lang:
Das sind die Unersetzlichen”.*

Bertolt Brecht

A Mãe

*“Há pessoas que lutam um dia e são boas.
Há outros que lutam um ano e são melhores
Há pessoas que lutam vários anos e são muito boas.
Mas, há aqueles que lutam sua vida inteira: estes são insubstituíveis”*

Bertold Brecht

RESUMO

A perda tecidual e o restabelecimento de sua função representam desafios na medicina regenerativa. Uma subpopulação celular, as células-tronco adulta, são fundamentais no reparo dos tecidos. Estas células possuem capacidade de autorrenovação e diferenciação, desempenhando função importante no processo regenerativo dos diversos tecidos do organismo. Estruturas dentárias tem se mostrado fontes promissoras dessas células pela facilidade de acesso. A distribuição de células-tronco adulta nas estruturas dentárias ainda é pouco conhecida. A remoção da polpa dentária para estudos laboratoriais ainda enfrenta impasses metodológicos pela falta de padronização de protocolos. O objetivo deste estudo foi localizar topograficamente células-tronco adulta pulpar e de estruturas associadas ao dente nas diversas fases de desenvolvimento e avaliar a eficácia de dois métodos de coleta tecidual. Células-tronco adulta pulpar e de estruturas associadas foram identificadas por imunomarcagem e expressão gênica em dentes decíduos e permanentes humano nas diversas fases do desenvolvimento. Para o estudo topográfico, foram obtidos 34 dentes, sendo 8 dentes decíduos, 11 dentes permanentes de ápice aberto, 5 dentes permanentes de ápice fechado e 10 folículos pericoronários. Após exodontia, os dentes foram descalcificados em solução de EDTA, pH 7.0 e recortados para análise imunistoquímica com anticorpos monoclonais CD10, CD44, CD90, Nanog e Oct-3/4. Para estudo da expressão gênica, foram obtidos tecidos à fresco seguido de sua remoção por digestão enzimática com 3 mg/ml de colagenase tipo IV. A análise da preservação tecidual foi realizada a partir de 3 dentes permanentes de ápice aberto seccionados na região amelocementária para remoção da polpa dentária por dois métodos: mecânico com lima endodôntica e digestão enzimática sem manipulação pulpar. Os resultados mostraram a presença diferencial de marcadores de células-tronco nos constituintes tecidual e topográfico. O CD44 foi expresso exclusivamente na camada odontoblástica da região radicular de dentes permanentes de ápice aberto. Vasos capilares e nervos periféricos pulpares e de tecidos associados expressaram CD90 como também em cementoblastos e fibra do ligamento periodontal. Apenas fibroblastos localizados da papila dentária mostraram-se positivos para CD10, confirmados pela RT-PCR. Nenhuma expressão foi observada por fatores transcricionais de pluripotência Nanog e Oct-3/4. A digestão enzimática do tecido sem manipulação mostrou-se mais eficaz na remoção dos constituintes celulares do tecido pulpar. A manutenção da camada odontoblástica mostrou-se comprometida pelo método mecânico. Este estudo evidenciou distribuição topográfica distinta de subpopulações de células-tronco adulta nas diversas fases de desenvolvimento dentário. O dente permanente com rizogênese incompleta parece ser uma fonte potencial de células-tronco adulta em estudos *in vitro*. A escolha de métodos adequados na remoção do tecido pulpar é essencial na preservação de subpopulações de células-tronco pulpares, sendo a digestão enzimática sem manipulação pulpar mais eficaz do que o método mecânico.

Palavras-chave: Células-tronco adulta. Polpa dentária. Ligamento periodontal. Folículo dentário. Imunoistoquímica. Métodos.

ABSTRACT

Tissue loss and the reestablishment of its function is challenging in regenerative medicine. A cellular subpopulation, called adult stem cells, is fundamental in tissue repair. These cells are capable of self-renewal and differentiation, playing an important role in tissues regenerative process in the whole organism. Dental structures are promising sources of these cells for easy access. The distribution of adult stem cells in dental structures is still poorly understood. Dental pulp removal for laboratory studies still faces methodological impasse due to the lack of protocol standardization. The aim of this study was to topographically locate adult pulp stem cells and from dental associated structures at various stages of dental development and to evaluate the effectiveness of tissue collection methods. Adult pulp and dental associated tissues stem cells were identified by immunostaining and gene expression in human deciduous and permanent teeth at various stages of development. For the topographic study, 35 teeth were obtained: 8 deciduous teeth, 12 open-apex permanent teeth, 5 closed-apex permanent teeth and 10 pericoronal follicles. After extraction, teeth were decalcified in pH 7.0 EDTA solution and cut out for immunohistochemical analysis with CD10, CD44, CD90, Nanog and Oct-3/4 monoclonal antibodies. For gene expression study, fresh tissues were obtained by enzymatic digestion with 3 mg/ml type IV collagenase. Tissue preservation analysis was performed in 3 open-apex permanent teeth sectioned in the cemento-enamel junction. To remove dental pulp, two methods were followed: mechanical removal with endodontic file or unhandled dental pulp enzymatic digestion. The results showed differential presence of stem cell markers in dental structures and topographic constituents. CD44 was expressed exclusively in odontoblastic layer of open-apex permanent teeth at root region. Pulp and dental associated tissue capillary vessels and peripheral nerves expressed CD90 as well as in cementoblasts and periodontal ligament fibers. Only fibroblasts from dental papilla were positive for CD10, confirmed by RT-PCR. No expression was observed by transcriptional pluripotency factors Nanog and Oct-3,4. unhandled dental pulp enzymatic digestion was more effective in removing cellular constituents from dental pulp. The maintenance of odontoblastic layer was compromised by mechanical method. This study showed distinct topographic distribution of adult stem cell subpopulations in various stages of dental development. Permanent teeth with incomplete rhizogenesis appear to be a potential source of adult stem cells in in vitro studies. Choosing appropriate methods for dental pulp removal is essential for preserving its stem cell subpopulations, and unhandled dental pulp enzymatic digestion is more effective than mechanical method.

Keywords: Adult stem cell. Dental pulp. Periodontal ligament. Dental follicle. Immunohistochemistry. Methods.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Fases da odontogênese.....	18
Figura 2 -	Constituintes da polpa dentária mostrando camada odontoblástica e tecido conjuntivo (paine direito). Aspectos histológicos destacando os odontoblastos, nervo periférico e vasos capilares (painel direito).....	20
Figura 3 -	Estruturas histológicas do ligamento periodontal mostrando os restos epiteliais de Malassez próximos ao cimento.....	22
Figura 4 -	Células-tronco mesenquimais de dentes e tecidos associados.....	23
Figura 5 -	Métodos de remoção do tecido pulpar mecânico e enzimático. Acesso pulpar por secção cervical na junção amelocementária. A, método mecânico com lima endodôntica do tipo Hedströen. Armazenamento da polpa dentária em RNA later a -80°C. B, Método de digestão enzimática sem manipulação pulpar: fragmentos dentários imersos em solução 3 mg/mL de colagenase tipo IV. Filtragem e centrifugação com remoção do sobrenadante e armazenamento em RNA later a -80°C.....	33
Figura 6 -	Remoção e armazenamento dos tecidos associados ao dente. A e B, Remoção e fragmentação com lâmina de bisturi n°15 do folículo pericoronário. C, Coleta do ligamento periodontal do terço médio da raiz com cureta de dentina.....	34
Figura 7 -	Expressão de marcadores de células-tronco CD10, CD44 e CD90 na polpa dentária e estruturas associadas ao dente. A, Expressão livre de CD10 entre as fibras colágenas da polpa dentária. B, Fibroblastos CD10-positivos da papila dentária (seta). C, Marcação diferencial de odontoblastos CD44-positivos na polpa dentária em desenvolvimento. Vasos capilares e nervo periférico CD90-positivos. E, Fibras colágenas do ligamento periodontal e cementoblastos CD90-positivos e ausência de marcação nos restos epiteliais de Malassez. F, Capilares de folículos pericoronários CD90-positivos.....	41
Figura 8 -	Padronização dos Primers de genes <i>CD44</i> , <i>MME</i> , <i>THY1</i> e <i>GAPDH</i> na linhagem SKmel 37.....	42
Figura 9 -	Expressão gênica do <i>CD44</i> , <i>MME</i> e <i>THY-1</i> de estruturas dentárias nas diferentes fases dos desenvolvimento.....	42
Figura 10 -	Expressão diferencial do gene <i>CD44</i> entre os métodos mecânico e enzimático de remoção pulpar.....	43
Figura 11 -	Remoção parcial de constituintes teciduais pelo método mecânico. A, Camada odontoblástica parcialmente removida (H&E). B, Odontoblastos CD44-positivos remanescentes (seta).....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Caracterização <i>in vitro</i> de células-tronco adulta em estruturas dentárias e associadas.....	24
Tabela 2 -	Distribuição dos grupos de estudo nos métodos utilizados.....	34
Tabela 3 -	Anticorpos primários monoclonais nos testes imunoistoquímicos.....	35
Tabela 4 -	Sequência de bases nitrogenadas em Primers desenhados.....	36
Tabela 5 -	Expressão dos marcadores de células-tronco pulpar e de tecidos associados.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μg	Micrograma
μL	Microlitro
BLAST	Ferramenta Básica de Busca de Alinhamento Local
DFPC	Células progenitoras do folículo pericoronário
DPSC	Células-tronco de polpa dentária
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EtBr	Brometo de etídio
<i>GAPDH</i>	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
H&E	Hematoxilina e eosina
IHC	Imunohistoquímica
iPS	Células-tronco de pluripotência adquirida
min	Minuto
<i>MME</i>	Metaloendopeptidase de membrana
PDLSC	Células-tronco do ligamento periodontal
RMPI	Meio de cultura Roswell Park Memorial Institute
rpm	Rotações por minuto
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase Trascriptase Reversa
SCAP	Células-tronco da papila dental
seg	Segundo
SHED	Células-tronco de dente decíduo
<i>THY-1</i>	Antígeno de superfície celular Thy-1
T _m	Temperatura de separação

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	13
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 Medicina regenerativa e engenharia tecidual.....	16
2.2 Células-tronco.....	16
2.3 Odontogênese.....	17
2.4 Rizólise.....	18
2.5 Histologia pulpar.....	19
2.6 Cimento.....	21
2.7 Ligamento periodontal.....	21
2.8 Células-tronco adulta de estruturas dentárias e associadas ao dente.....	22
2.8.1 Células-tronco pulpar.....	23
2.8.2 Células-tronco de estruturas associadas ao dente.....	24
2.9 Marcadores de células-tronco adulta.....	25
2.9.1 Proteínas de superfície celular.....	25
2.9.1.1 CD10.....	25
2.9.1.2 CD44.....	25
2.9.1.3 CD90.....	25
2.9.2 Fatores de transcrição de pluripotência.....	26
2.9.2.1 Nanog e Oct-3,4.....	26
2.10 Remoção tecidual e cultivo primário de células-tronco pulpar.....	26
3 OBJETIVOS.....	27
3.1 Objetivo geral.....	27
3.2 Objetivos específicos.....	27
4. ARTIGO.....	28
4.1 INTRODUÇÃO.....	30
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.2.1 Obtenção da amostra.....	32
4.2.1.1 Dados clínicos.....	32
4.2.1.2 Dentes.....	32
4.2.1.3 Tecidos à fresco.....	33
4.2.2 Imunoistoquímica.....	34

4.2.3 RT-PCR.....	35
4.2.3.1 Desenho dos Primers.....	35
4.2.3.2 Extração de RNA total.....	36
4.2.3.3 RT-PCR.....	37
4.2.3.4 Confecção do gel de agarose e eletroforese.....	37
4.3 RESULTADOS.....	39
4.3.1 Imunomarcção de células-tronco na polpa dentária e estruturas associadas.....	39
4.3.2 Expressão diferencial dos marcadores de células-tronco nas diversas fases do desenvolvimento dentário e estruturas periodontais.....	40
4.3.3 Eficiência do método de digestão enzimática sem manipulação pulpar.....	40
4 4 DISCUSSÃO.....	44
4 5 CONCLUSÃO.....	47
4.6 REFERÊNCIAS.....	48

1 INTRODUÇÃO GERAL

A reconstituição de tecidos e órgãos representa um desafio nas ciências da saúde. Fisiologicamente, a remodelação tecidual envolve a comunicação celular com seu microambiente composto por matriz extracelular, biomoléculas e células. Estes componentes são nutridos por vasos sanguíneos que permitem a troca de fluidos transcapilar e o trânsito de células no local (VAN HASSEL, 1971). Na perda tecidual, o reparo acontece com a proliferação celular, visando o restabelecimento da função do órgão e o retorno de seu estado de homeostase. A eficácia deste processo depende da capacidade regenerativa dos seus constituintes celulares e da preservação da matriz extracelular. A substituição por tecido fibroso muitas vezes compromete a função de órgãos (GUTNER *et al.*, 2008).

A utilização de células-tronco na regeneração de órgãos e tecidos surge como uma área promissora na biologia. Essas células apresentam capacidade de autorrenovação e diferenciação celular e são classificadas conforme sua pluripotência e seu tecido de origem (ALT *et al.*, 2019). As células-tronco embrionárias são totipotentes com capacidade para formar um organismo inteiro (THOMSON *et al.*, 1998). Uma outra fonte na regeneração de órgãos são as células-tronco de pluripotência adquirida (iPS) obtidas a partir da reprogramação de fibroblastos. Estas células apresentam capacidade de diferenciação nos três folhetos embrionários (TAKAHASHI & YAMANAKA, 2006). As células-tronco adulta são multipotentes diferenciando-se em células de seu microambiente tecidual (FRIEDENSTEIN *et al.*, 1976).

A aplicabilidade clínica de células-tronco ainda é limitada. Aspectos éticos e de rejeição imunológica são os principais fatores complicadores do uso de células-tronco embrionárias. Já no caso das células-tronco de pluripotência adquirida, suas limitações técnicas dificultam seu uso na medicina regenerativa (ALT *et al.*, 2019). As células-tronco embrionárias foram inicialmente identificadas em embriões de ratos e posteriormente, em humanos. relatadas em estudos utilizando ratos (EVANS & KAUFMAN, 1981; MARTIN, 1981; THOMSON *et al.*, 1998). Outra linhagem foi estabelecida em 2006 após a reprogramação de fibroblastos para o estado de pluripotência (TAKAHASHI & YAMANAKA, 2006). Este processo foi estabelecido a partir da inserção de genes de transcrição com fragmentos virais, resultando em células-tronco de pluripotência adquirida (iPS). A permanência de partículas virais impedem seu estudo clínico. Com isso, as células-tronco adulta surgem como um potencial biológico na substituição tecidual e de órgãos. Desde 1960, estudos com células-tronco da medula óssea mostram potencial de autorenovação celular em camudongos transplantados (MCCULLOCH & TILL,

1960). Desde então, estudos em humanos possibilitam o seu uso clínico em transplante de medula óssea, melhorando a sobrevivência de pacientes leucêmicos (THOMAS *et al.*, 1975). Estudos clínicos com células-tronco adulta encontram-se em andamento para tratamento de lesões cerebrais (NCT02767817, Clinical trials), renais (NCT02266394, Clinical trials), espinais (NCT01325103, Clinical trials) e de pele (NCT01751282, Clinical trials).

As células-tronco adulta são denominadas conforme seu tecido de origem, por exemplo, células-tronco adulta epitelial, mesenquimal ou do tecido adiposo. A capacidade de autorenovação e diferenciação destas células limita-se aos constituintes do seu microambiente (DULAK *et al.*, 2015). As de origem mesenquimal tem sido considerada como fonte promissora para substituição tecidual pela sua fácil obtenção. A definição de multipotência dessas células baseia-se na expressão de marcadores de superfície celular como CD105, CD73 e CD90, e a ausência de expressão de CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 α ou CD19 e HLA-DR e na capacidade de diferenciação em três linhagens: adipogênica, condrogênica e osteogênica (DOMINICI *et al.*, 2006).

Na odontologia, a presença de células-tronco adulta foi demonstrada em cultura primária derivadas do tecido dentário e em tecidos associados, mostrando serem fontes acessíveis dessas células (GRONTHOS *et al.*, 2000). Culturas primárias de tecido pulpar foram estabelecidas, destacando-se as células-tronco de dentes decíduos (SHED) (MIURA, *et al.* 2003), as células-tronco de polpa dental de dentes permanentes (DPSC) (GRONTHOS *et al.*, 2000) e as células-tronco da papila apical (SCAP) (SONOYAMA *et al.*, 2006). A DPSC foi a primeira linhagem celular estabelecida através do cultivo primário de polpa dentária obtida a partir de terceiros molares com rizogênese completa (GRONTHOS *et al.*, 2000). Células-tronco mesenquimal também foram identificadas em tecidos associados aos dentes como o ligamento periodontal (PDLSC) e o folículo pericoronário (DFPC) (SEO, *et al.*, 2004; MORSCZECK, *et al.*, 2005).

A medicina regenerativa e a bioengenharia surgem como uma alternativa biológica para a reestruturação de órgãos e tecidos (BERTHIAUME *et al.*, 2011). Arcabouços constituídos de material biocompatível funcionam como suporte para constituintes celulares, mimetizando estruturalmente o microambiente de órgãos e tecidos. Constituídos de biomaterial, os arcabouços oferecerem suporte e aderência para as células-tronco adulta facilitando a incorporação de biomoléculas da sinalização celular (MAHLA, 2016). Reproduzir condições locais no microambiente dessas células é um desafio e são fundamentais para o sucesso clínico.

Na clínica odontológica, o tratamento da perda de estruturas dentárias é pela substituição por material inerte ou enxertos. Na endodontia, a utilização desse material leva ao ressecamento

das estruturas dentárias remanescentes, aumentando o risco de fratura e complicações clínicas (ROBERTS *et al.*, 2017). A utilização clínica das células-tronco adulta para reconstituição tecidual na odontologia é promissora por apresentarem compatibilidade imunológica e obtenção não invasiva. Seu uso ainda é desafiador pela falta de padronização metodológica (ROSA, *et al.*, 2016; ALT *et al.* 2019). O estabelecimento de cultura primária de células-tronco adulta se depara com com desafios de sobreposição celular (YASUI *et al.*, 2017). Há poucos estudos clínicos em andamento utilizando células-tronco de origem dentária para regeneração tecidual (EL-SAYED *et al.*, 2019). Iwata *et al.*, (2018) mostra a redução na profundidade de bolsas periodontais e respectivo ganho clínico de inserção ósseo usando células-tronco do ligamento periodontal em arcabouços.

Embora, a reconstituição de estruturas dentárias com células-tronco pulpar e de estruturas associados seja promissora, faltam critérios metodológicos padronizados no estabelecimento do cultivo primário. O Comitê da Sociedade Internacional de Terapia Celular em 2006, (DOMINICI *et al.*, 2006) indicaram marcadores celulares para célula-tronco mesenquimal, porém faltam critérios para definir aquelas de origem dentária. Estabelecer linhagens de células-tronco mesenquimal por cultivo primário é desafiador, não apenas pela falta de padronização técnica na remoção tecidual, como também pela sobreposição de fibroblastos, prejudicando a reprodutibilidade e confiabilidade. Faltam estudos comparando os diferentes métodos de coleta da polpa dentária para o estabelecimento de linhagens de cultivo primário. Apesar dos inúmeros estudos com células-tronco de polpa dentária, a topografia e distribuição dessas células ainda é desconhecida. Com isso, a padronização técnica torna-se fundamental para estabelecer métodos eficazes na obtenção de células-tronco de origem dentária para o uso clínico.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Medicina regenerativa e engenharia tecidual

Medicina regenerativa é ciência que estuda células, biomateriais e os fatores inerentes dos tecidos determinantes no seu metabolismo, como fatores de crescimento. Assim, a esta ciência busca criar estruturas semelhantes aos tecidos vivos para possíveis substituições e reparos de órgãos lesionados. Já a engenharia tecidual aplica os princípios e métodos da engenharia nas ciências biológicas para compreender a relação estrutural e funcional dos tecidos, restaurando sua função. Ambos os termos são comumente utilizados como sinônimos e utilizam como principal base de estudo as células-tronco (BERTHIAUME *et al.*, 2011).

2.2 Células-tronco

A capacidade de auto-renovação e diferenciação das células-tronco tornou-se um campo importante para a compreensão da regeneração tecidual e o desenvolvimento da medicina regenerativa (ANITUA *et al.*, 2018). As células-tronco podem ser classificadas de acordo com sua capacidade de diferenciação e o tecido de origem. As células-tronco totipotentes são advindas da mórula, fase inicial da embriogênese, e são capazes de formar todos os tipos de tecidos do organismo. Já as pluripotentes diferenciam-se em tecidos derivados dos três folhetos embrionários (ectoderma, mesoderma e endoderma) e são encontradas na fase blastocística do desenvolvimento. As células-tronco multipotentes são fontes teciduais de células-tronco e são capazes de diferenciar-se no seu tecido de origem, sendo importante no processo de reparação tecidual. (ALT *et al.*, 2019).

Quanto ao tecido de origem, as células-tronco são classificadas em embrionárias, de pluripotência induzida e adultas. As células-tronco embrionárias são pluripotentes e originam todos os tipos de células somáticas do embrião e seus anexos (KHAN *et al.*, 2018). As células-tronco de pluripotência induzida são células pluripotentes geradas a partir da manipulação genética de células somáticas, retornando, assim, ao seu estágio de pluripotência (TAKAHASHI & YAMANAKA *et al.*, 2006). As células-tronco adultas são encontradas dos tecidos e são responsáveis pelo seu reparo e crescimento, podendo ser mesenquimais, epiteliais e hematopoiéticas (ALT *et al.*, 2019).

As células-tronco adulta variam quantitativamente segundo seu tecido de origem: em medula óssea, as células-tronco apresentam-se de 1/10.000 a 1/100.000 células (NASEF *et al.*, 2007). Em tecido muscular é encontrada uma pequena população abaixo da lamina basal (FARUP *et al.*, 2015), enquanto que no tecido adiposo pode-se encontrar centenas de milhares

de MSC por grama de tecido (BAER *et al.*, 2012). A partir dos inúmeros estudos acerca das células-tronco adulta mesenquimais, foram estabelecidos critérios para sua identificação e caracterização (DOMINICI *et al.*, 2006). Além de possuir a capacidade de diferenciação adipogênica, condrogênica e osteogênica *in vitro*, devem expressar os marcadores de superfície celular CD73, CD90 e CD105, e ausência de expressão de CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 α ou CD19 e HLA-DR. A dificuldade de acesso aos tecidos fez com que a busca por fontes alternativas de células-tronco mesenquimais fossem exploradas, levando ao estudo das células-tronco de origem dental e de suas estruturas associadas.

2.3 Odontogênese

Os dentes humanos são formados ainda no período embrionário a partir da proliferação do epitélio oral, que posteriormente formará a lâmina dentária (NANCI, 2019). A lâmina dentária desenvolve-se em botão dentário, formando projeções que se proliferam em direção ao ectomesenquima, formando em uma concavidade epitelial. Inicia-se então a fase de capuz (YEN & SHARPE, 2008). Células epiteliais externas formam o epitélio externo do órgão do esmalte, enquanto que as células internas à concavidade compõem o epitélio interno do órgão do esmalte. As células centrais adquirem morfologia estrelada são denominadas de retículo estrelado. No centro da concavidade, células ectomesenquimais aglomeram-se formando a papila dentária. A concavidade do órgão dental acentua-se iniciando a fase de campânula (GOVORKO *et al.*, 2010).

O estímulo no epitélio interno do órgão do esmalte pelas células da papila dentária induzem sua diferenciação em pré-odontoblastos. Os pré-odontoblastos induzem a diferenciação do epitélio externo em pré-ameloblastos. A lâmina dentária se fragmenta dissociando o órgão dentário do epitélio bucal deixando restos embrionários na região peridentária (restos de Serres) (NANCI, 2019). Na fase de formação da coroa, os pré-odontoblastos iniciam a produção de dentina do manto, sendo então, chamados de odontoblastos. Essa produção de dentina estimula os pré-ameloblastos a diferenciarem-se em ameloblastos e produzirem esmalte aprismático. O processo de Tomes é desenvolvido e os ameloblastos começam a produzir esmalte prismático. A deposição do esmalte acontece de forma centrífuga, enquanto da dentina, de forma centrípeta, sendo depositada dentina tubular. Finalizada a formação dos tecidos coronários, inicia-se a estruturação das raízes (GOVORKO *et al.*, 2010).

A fusão dos epitélios interno e externo do órgão do esmalte forma a bainha epitelial de Hertwig, que coordena a formação radicular. Do mesmo modo que na coroa, as células

ectomesenquimais da papila dentária diferenciam-se em odontoblastos e produzem dentina na região radicular, levando ao seu crescimento e ao rompimento da bainha de Hertwig. Seus fragmentos formam os restos epiteliais de Malassez e se distribuem ao longo do ligamento periodontal. A dentina exporta externamente e em contato com as células ectomesenquimais do folículo dentário estimula a diferenciação em cementoblastos, osteoblastos e fibroblastos para a formação dos constituintes do tecido periodontal. Ao término da formação dentária, os epitélios interno e externo do órgão do esmalte unem-se (epitélio reduzido do órgão do esmalte) e recobrem a coroa até a erupção do dente (OHSHIMA, 2008). A figura 1 ilustra as fases da odontogênese.

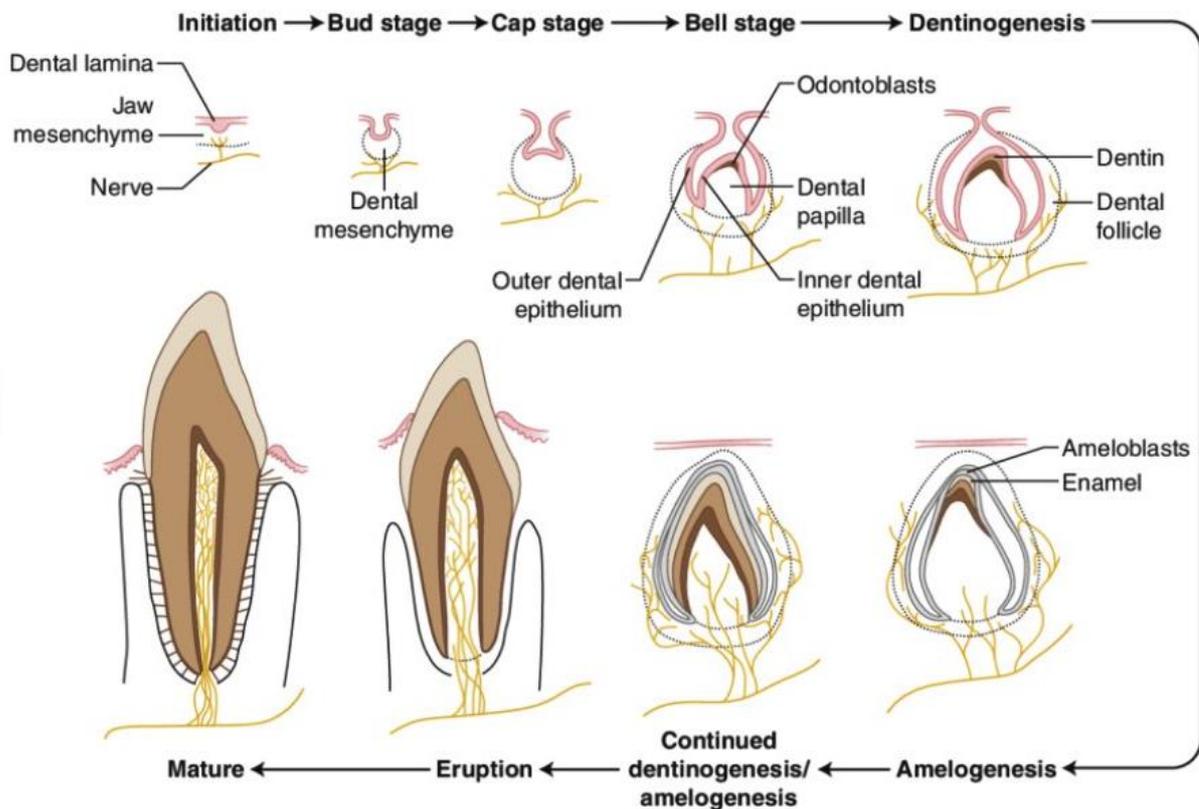


Figura 1 - Fases da odontogênese (FRIED & GIBBS, 2014).

2.4 Rizólise

A reabsorção fisiológica do dente decíduo é um fenômeno natural do desenvolvimento do sistema estomatognático que guia a erupção dos dentes permanentes. Inicia-se aproximadamente nos 3-6 anos de idade, sendo os incisivos centrais inferiores os primeiros dentes a exfoliarem (LOURENÇO & CONSOLARO, 1997). Todos os mecanismos e componentes atuantes na reabsorção dental fisiológica ainda não estão elucidados. Sabe-se que a pressão de erupção e as células do folículo dentário do dente permanente em formação, como

também, o processo inflamatório e a apoptose são eventos notados na rizólise (SAHARA, 2001; WANG *et al.*, 2019; DOMON *et al.*, 2008, RODRIGUES *et al.*, 2009).

A polpa do dente decíduo desempenha funções importantes tanto no processo de reabsorção quanto na mediação de monócitos e macrófagos para a formação de osteoclastos (YILDIRIM *et al.*, 2008). Alterações morfológicas e vasculares com a presença de mediadores inflamatórios e células multinucleadas osteoclásticas iniciam a reabsorção dos tecidos duros internamente e ao longo das raízes (ANGELOVA *et al.*, 2004; SAHARA, 2001; WANG *et al.*, 2019). O processo de reabsorção radicular tem sido comparado com a remodelação óssea e seus mediadores, como o receptor RANK (receptor-ativador do fator nuclear-B ligante) e os ligantes RANKL e OPG (osteoprotegerina) (LOSSDORFER *et al.*, 2002). Células-tronco do tecido pulpar de dentes decíduos, em estudo de Zhu *et al.* (2013), mostraram a expressão desse receptor quando estão em fase de exfoliação, podendo promover a osteoclastogênese e reabsorção dentária.

2.5 Histologia pulpar

A polpa dentária é um tecido conjuntivo frouxo que atribui a vitalidade, metabolismo e homeostase do dente. Apresenta-se cercada por tecidos mineralizados e, juntamente com a dentina, forma o complexo dentino-pulpar. Histologicamente, a polpa dentária é composta por células, incluindo fibroblasto, odontoblasto, célula-tronco mesenquimal (MSC) e célula imunocompetente, vasos sanguíneos e linfáticos, fibra neural e matriz extracelular. O tecido pulpar organiza-se em camada odontoblástica, zona acelular e camada rica em células (NANCI, 2019). Figura 2 mostra a histologia do complexo dentino-pulpar.

Uma das principais células do tecido pulpar são os odontoblastos, células responsáveis pela formação dentinária. Assim sendo, distribuem-se na periferia deste tecido e apresentam íntima relação com a dentina com seus processos odontoblásticos inseridos nos túbulos dentinários (GOVORKO *et al.*, 2010). Sua morfologia reflete sua atividade, podendo apresentar-se como uma célula ativa com característica alongada, núcleo basal e citoplasma basofílico. Já os fibroblastos são as células mais abundantes da polpa dentária, cuja função é produzir matriz extracelular constituída de colágeno e substância fundamental. As principais fibras presentes na polpa dentária são colágeno tipo I e III. Assim como os odontoblastos, os fibroblastos refletem sua atividade funcional morfológicamente, apresentando-se, em polpas jovens, com citoplasma amplo e uma matriz com menos colágeno. Em tecidos maduros, tornam-se fusiformes ou achatados (NANCI, 2019). As MSC participam do processo de reparo e renovação do tecido pulpar, podendo diferenciar-se em outros constituintes celulares (ALT *et*

al., 2019). Os macrófagos também constituem o tecido pulpar, auxiliando na remoção de células mortas e eliminação de antígenos. Morfologicamente, os macrófagos apresentam-se como células ovais ou alongadas com o núcleo evidente (NANCI, 2019).

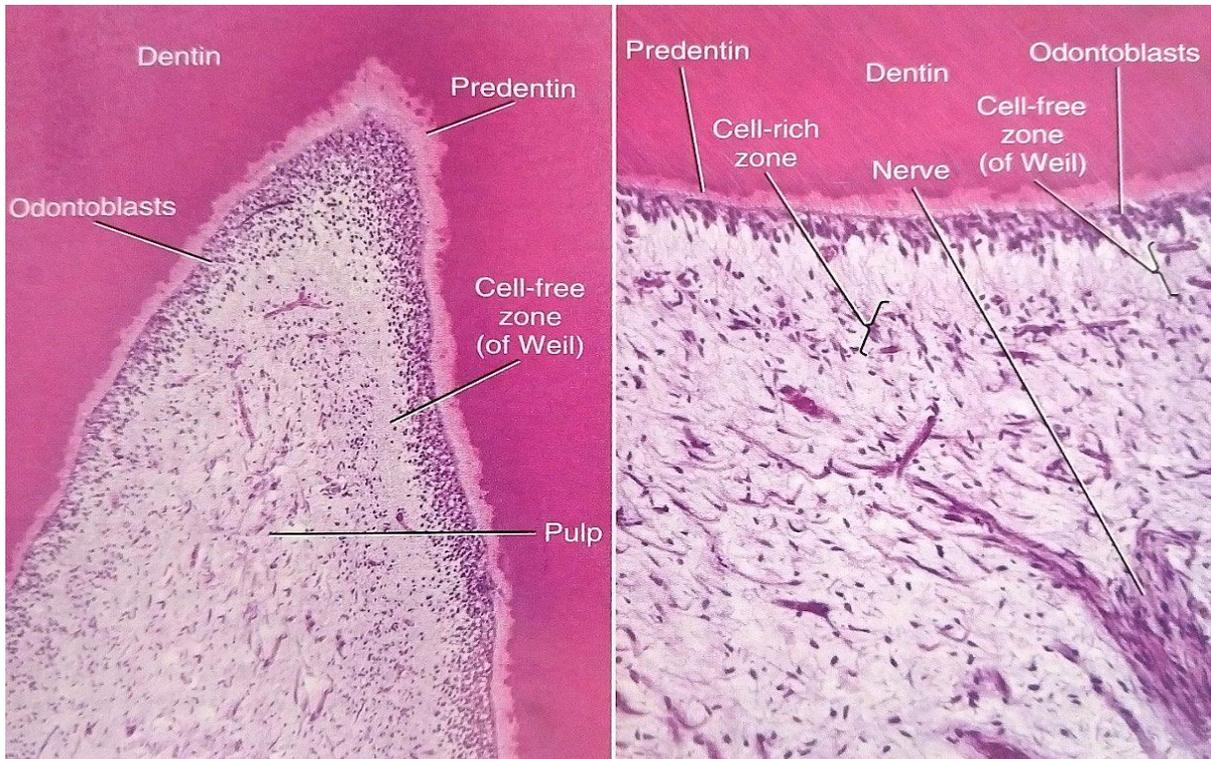


Figura 2 - Constituintes da polpa dentária mostrando camada odontoblástica e tecido conjuntivo (painel direito). Aspectos histológicos destacando os odontoblastos, nervo periférico e vasos capilares (painel direito) (NANCI *et al.*, 2019).

A vascularização e inervação do tecido pulpar acontece a partir do forame apical e forâneas acessórias, através de um feixe vâsculo-nervoso, que estende-se até a região coronária da polpa. Arteriolas encontram-se na região central da polpa e ramificam-se até a camada subodontoblástica, sendo o número de ramificações maior na região coronal. O sistema de vênulas possui diâmetro similar às arteriolas, diferenciando-se pela parede mais delgada de seus vasos (KATCHBURIAN & ARANA, 2017). Da mesma forma que o feixe vâsculo-nervoso, os vasos linfáticos adentram o tecido pulpar através do forame apical, apresentam-se com paredes descontínuas e lúmen ausente de células sanguíneas (NANCI, 2019). Juntamente com os vasos sanguíneos aferentes, os feixes nervosos distribuem-se por toda a polpa e ramificam-se até a camada subodontoblástica, chamada de Plexo de Raschkow, existente somente na região coronária. Na região radicular, ramos independentes saem dos feixes e inervam áreas adjacentes. A inervação pulpar é composta por fibras mielínicas e amielínicas

distribuída irregularmente, sendo as fibras mielínicas mais abundantes na porção radicular (NANCI, 2019).

2.6 Cimento

O cimento é um tecido mineralizado que recobre as raízes dos dentes e, juntamente com o ligamento periodontal e o osso alveolar, formam o periodonto. Apresenta-se como um tecido avascular que não passa por remodelação, sendo produzido pelo cementoblasto (YAMAMOTO *et al.*, 2016). Histologicamente, o cimento apresenta-se como acelular em sua deposição inicial e é formado antes das fibras do ligamento periodontal no processo eruptivo. Ele é chamado de acelular devido a disposição dos cementoblastos na superfície desde tecido em formação. Posteriormente, uma camada é depositada rapidamente e cementoblastos ficam aprisionados em seu interior. A partir disso, essas células são chamadas de cementócitos por terem atividade reduzida. Fibras do ligamento periodontal inserem no cimento e ancoram-se no osso alveolar formando as fibras de Sharpey (YAMAMOTO *et al.*, 2016; ROSS & PAWLINA, 2001).

2.7 Ligamento periodontal

O ligamento periodontal é uma das estruturas que compõe o tecido periodontal. Histologicamente, apresenta-se como um tecido fibroso que conecta o cimento ao osso alveolar promovendo fixação, suporte dentário, participa do processo de remodelação óssea e propriocepção. Constitui-se por células de origem óssea e do cimento, células epiteliais de Malassez, fibroblastos, células indiferenciadas, vasos sanguíneos e feixes nervosos (ROSS & PAWLINA, 2011; NANCI *et al.*, 2019; KATCHBURIAN & ARANA, 2017).

O fibroblasto, assim como na polpa dentária, tem como função a produção de fibras colágenas e de matriz extracelular. O principal tipo de fibra sintetizada é o colágeno tipo I, podendo encontrar também os tipos III e IV. Essas fibras organizam-se de forma oblíqua em sua formação, a partir do folículo dentário. Com o processo irruptivo do dente e a formação da crista do osso alveolar, o sentido das fibras do ligamento periodontal acompanham o dente até a junção amelocementária. Deste modo, grupos de fibras são classificadas em fibras da crista alveolar, oblíquas, fibras apicais, inter-radulares e horizontais (NANCI, 2019). No processo de formação radicular há o rompimento da bainha epitelial de Hertwig formando os restos epiteliais de Malassez (OHSHIMA, 2008). Essas células dispõem-se em grupos entre as fibras do ligamento periodontal e apresentam funções reparadoras do ligamento, como também parecem estar envolvidos em patologias como tumores e cistos (KEINAN & COHEN., 2013).

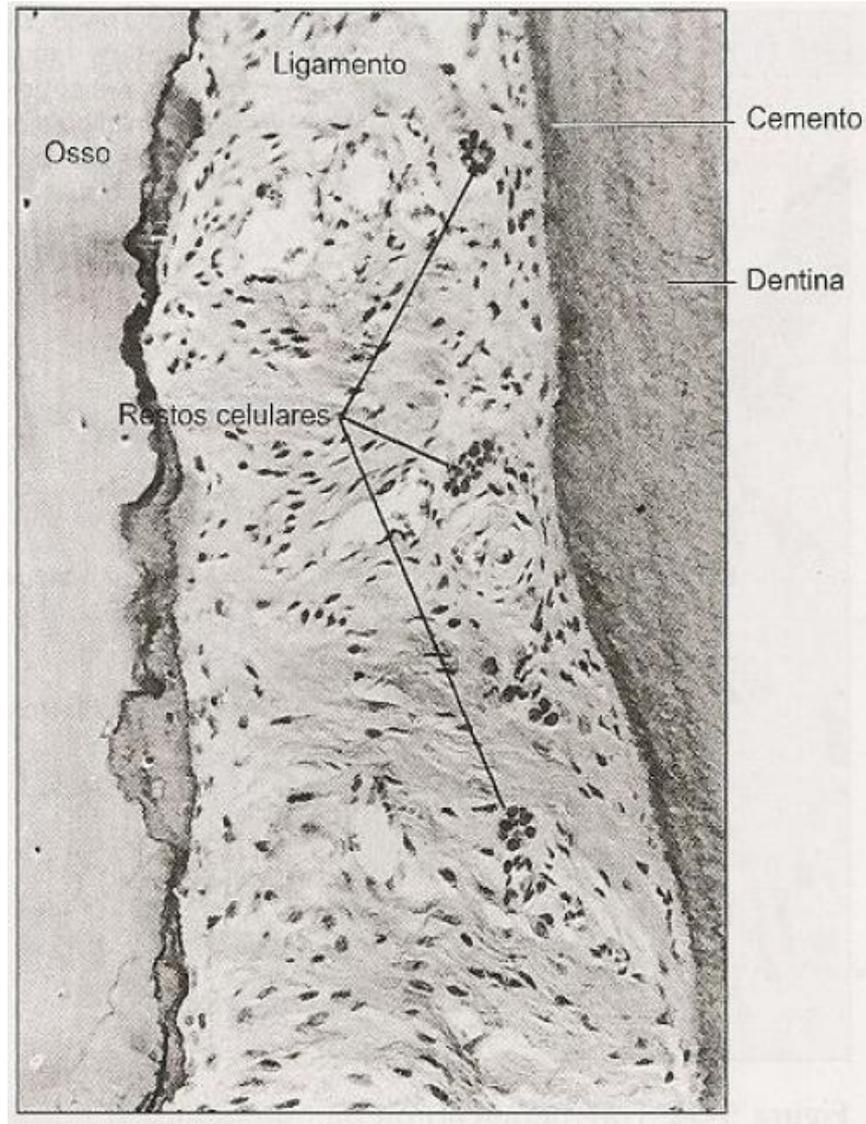


Figura 3 - Estruturas histológicas do ligamento periodontal mostrando os restos epiteliais de Malassez próximos ao cemento (NANCI *et al.*, 2008).

2.8 Células-tronco adulta de estruturas dentárias e associadas ao dente

A busca por possíveis fontes de células-tronco levou à descoberta de uma variedade de dessas células, dentre elas as células-tronco de origem pulpar, primeira identificada e isolada na cavidade bucal (GRONTHOS *et al.*, 2000). Desde então, os tecidos do sistema estomatognático tornaram-se alvo de estudos e isolamento como as células-tronco de dente decíduo (SHED) (MIURA *et al.*, 2003), ligamento periodontal (SEO *et al.*, 2004), folículo dentário (DFPC) (MORSCZECH ET *et al.*, 2005), papila dentária (SCAP) (SONOYAMA *et al.*, 2006), osso alveolar (ABMSC) (MATSUBARA *et al.*, 2005), gengiva (GMSC) (ZHANG *et al.*, 2009) e germe dentário (TGPC) (IKEDA *et al.*, 2008).

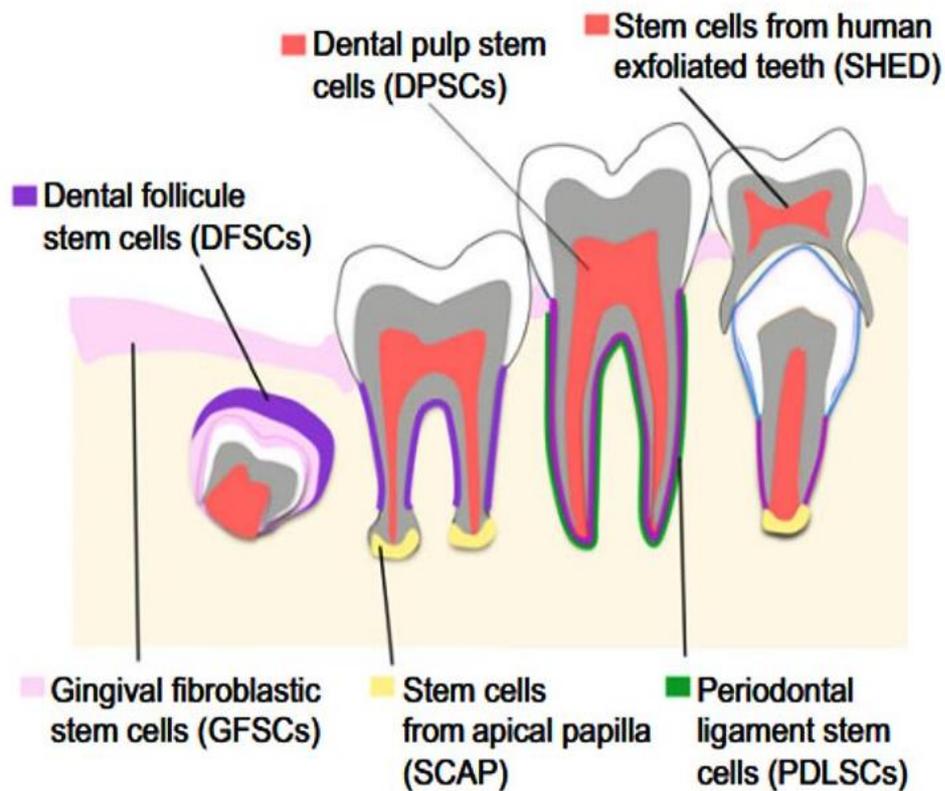


Figura 4 - Células-tronco mesenquimais de dentes e tecidos associados (SHARPE, 2016). Adaptada.

2.8.1 Células-tronco pulpar

As células-tronco pulpar e de tecidos associados representam populações com diferentes fenótipos e propriedades biológicas, como mostrado na Tabela 1. As células-tronco pulpar de dentes permanentes (DPSC) foram identificadas e isoladas por Gronthos *et al.*, (2000) em um estudo utilizando terceiros molares com rizogênese completa (DPSC). Estas células apresentaram alta capacidade clonogênica e de diferenciação em múltiplas linhagens, como osteogênica e neurogênica. Desde então, tem-se pesquisado seu potencial para regeneração do complexo dentinho-pulpar *in vitro* e *in vivo*, obtendo a produção de osteodentina similar a dentina de dentes humanos (GRONTHOS, *et al.*, 2002). Outra população identificada são as células-tronco de polpa de dente decíduo (SHED), isoladas por Miura *et al.* (2003), apresentaram potencial de formação de osteodentina mais imatura quando comparada com a formada pela DPSC, como também, diferenciação associada a tecidos neurais em transplantação *in vivo* dessas células em cérebros de rato. As células-tronco originadas da papila de dentes com formação radicular incompleta (SCAP) foram inicialmente isoladas por Sonoyama *et al.*, (2006). Neste estudo *in vitro* e *in vivo*, essas células formaram uma estrutura vascularizada e com células similares aos odontoblastos.

2.8.2 Células-tronco de de estruturas associadas ao dente

O folículo pericoronário é um tecido que circunda o dente no seu processo irruptivo. Morsczeck *et al* (2005) estudou o isolamento e cultivo de suas células precursoras que apresentaram capacidade proliferativa e de formação de tecido osteoide *in vitro* e *in vivo*. A expressão fenotípica de marcadores semelhantes a dos tecidos periodontais foi identificada, sugerindo relação com a formação de cementoblastos, células do ligamento periodontal e osteoblastos. As células-tronco do ligamento periodontal (PDLSC) participam do seu processo de seu reparo e manutenção. Seo *et al* (2004) estudou a expressão gênica destas células isoladas a partir de terceiros molares e sua capacidade de regeneração *in vivo* usando ratos. Foi observada a formação de tecido cementoide e estruturas semelhantes ao ligamento.

Tabela 1 - Caracterização *in vitro* de células-tronco adulta em estruturas dentárias e associadas

Marcação	DPSC	SHED	SCAP	PDLSC	DFPC
Positividade	CD9, CD10, CD13, CD29, CD44, CD56, CD59, CD71, CD73, CD90, CD105, CD106, CD117, CD146, CD166, CD271, Oct-3,4, Sox2, Nanog, c-Myc, KLF4, LIN28, STRO-1, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60.	CD10, CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD117, CD146, CD166, Oct-3,4, Sox2, Nanog, c-Myc, STRO-1, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60.	CD13, CD29, CD44, CD56, CD73, CD90, CD105, CD106, CD146, Oct-3,4, Sox2, c-Myc, KLF4, STRO-1, SSEA-4.	CD9, CD10, CD13, CD29, CD44, CD59, CD73, CD90, CD105, CD106, CD146, CD166, Oct-3,4, Sox2, Nanog, STRO-1, SSEA-4.	CD9, CD10, CD13, CD29, CD44, CD59, CD73, CD90, CD105, CD106, CD166, CD271, Oct-3,4, Sox2, Nanog, STRO-1.
Potencial de diferenciação celular	Adipo, neuro, odonto, osteo, mio, endo, condro, cardio, melano, hepato.	Adipo, neuro, odonto, osteo, mio, endo, condro.	Adipo, neuro, odonto, osteo, condro, hepato	Adipo, odonto, osteo, condro, cemento.	Adipo, neuro, odonto, osteo, condro, endo, hepato.

Adipo: adipogênico; cardio: cardiogênico; cemento: cementogênico; condro: condrogênico; endo: vascular; hepato: hepatogênico; melano: melanogênico; mio: miogênico; neuro: neurogênico; odonto: odontogênico; osteo: osteogênico (RODAS-JUNCO *et al.*, 2017). Adaptado.

2.9 Marcadores de células-tronco adulta

2.9.1 Proteínas de superfície celular

2.9.1.1 CD10

CD10 (Cluster of Differentiation, aglomerados de diferenciação) é uma glicoproteína transmembranar codificada pelo gene *MME* e estudada no diagnóstico de leucemia linfocítica. Expressa-se em linfócitos B, tecidos renal e nervoso, próstata, células gástricas e do colon. Apresenta-se também na forma secretada exercendo atividade enzimática regulando a ação fisiológica de peptídeos (MAGUER-SATTA *et al.*, 2011).

No estudo das células-tronco adulta, o CD10 tem sido usado como marcador de superfície celular em diversos tecidos. Na medula óssea e tecido adiposo (GALY *et al.*, 1998; BUHRING *et al.*, 2007), esta proteína atua na diferenciação celular, como também, na maturação de células do sistema imune. (BÉNÉ, 2005). Já sua ação enzimática mostrou envolvimento na manutenção das células-tronco do tecido mamário (BACHELARD-CASCALES *et al.*, 2010). Em tecido dentário, Ferro *et al.* (2012) mostrou expressão de CD10 após diferenciação de células-tronco de dente decíduo em cultura primária.

2.9.1.2 CD44

CD44 é uma glicoproteína transmembranar, codificada pelo gene *CD44*, expressa pela maioria dos tecidos do corpo. É uma molécula envolvida na interação intercelular, mecanismo de adesão e migração. Apresenta-se com receptor do ácido hialurônico, como também de osteopontina, colágeno e metaloproteinases. Nos tecidos normais, o CD44 participa da ativação linfocitária e liberação de citocinas. Em patologias, foi observada sua expressão em células-tronco tumorais em câncer de mama e sua relação com vasos sanguíneos e metástase (SENBANJO & CHELLAIAH, 2017). Em tecido pulpar, o CD44 mostra-se expresso em estudos *in vitro* (GRONTHOS *et al.*, 2000) e associado ao estado ativo de odontoblastos (CHEN *et al.*, 2013).

2.9.1.3 CD90

CD90 ou Thy-1 é uma glicoproteína de superfície celular codificada pelo gene *THY-1* que participa da adesão celular e na comunicação de vários tipos de células, como endoteliais, linfócitos T e células neurais. Dominici *et al.* (2006) estabelecem critérios de multipotência de células-tronco de origem mesenquimal a partir de marcadores de superfície, dentre eles está a expressão pelo CD90. Em tecido dentário, este marcador vem sendo utilizado em estudos de

caracterização fenotípica e imunoistoquímica de polpa de dentes permanentes (MACHADO *et al.*, 2016, BERNARDI *et al.*, 2011).

2.9.2 Fatores de transcrição de pluripotência

2.9.2.1 Nanog e Oct-3,4

Nanog é um fator de transcrição codificado pelo gene *NANOG* que participa do processo de proliferação e pluripotência de células-tronco embrionárias. Esta proteína pode interagir com o série de proteínas Oct e bloquear a diferenciação celular mantendo sua pluripotência (YU *et al.*, 2018). Oct-3,4 codificado pelo gene *POU5F1* regula as vias de diferenciação celular. É fundamental no desenvolvimento embrionário e na manutenção da pluripotência das células-tronco. Além disso, é uma molécula estudada em processos de reprogramação de células somáticas (BORTVIN *et al.*, 2003). Em tecidos dentários, estudos *in vitro* utilizando polpa de dentes de rato mostraram a ausência desses marcadores de pluripotência (NOZAKI & OHURA, 2011).

2.10 Remoção tecidual e cultivo primário de células-tronco pulpar

O primeiro cultivo primário de células-tronco pulpar foi feito por Gronthos *et al.*, (2000) após secção cervical de dentes, remoção e digestão enzimática do tecido pulpar. Desde então, os estudos *in vitro* das células-tronco de origem dentária mostram variação metodológica na obtenção dessas células podendo ser lima endodôntica ou cureta (FERRO *et al.*, 2014; TELLES *et al.*, 2016). O acesso ao tecido pulpar é por meio de disco de metal (KARAMZADEH *et al.*, 2012) ou brocas (ATARI *et al.*, 2012). A cultura primária é realizada pela digestão enzimática ou por esfregaço tecidual em placa de Petri com meio de cultura α -MEM e suplementação (FERRÚA *et al.*, 2017). O estabelecimento da cultura primária de células-tronco do tecido dentário e associados é desafiador diante do risco de sobreposição por outros tipos celulares como fibroblastos (IDRIS *et al.*, 2011).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral:

Localizar topograficamente e caracterizar células-tronco mesenquimais na polpa dentária em dentes decíduo e permanente nas diversas fases do desenvolvimento e tecidos associados.

3.2 Objetivos específicos:

Localizar topograficamente constituintes histológicos da polpa dentária e tecidos adjacentes, utilizando-se marcadores de superfície (CD10, CD44 e CD90) e de fatores de transcrição de pluripotência (Oct-3,4 e Nanog);

Analisar a presença de constituintes histológicos em diferentes métodos laboratoriais de coleta de polpa dentária.

4 ARTIGO

DISTRIBUIÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO ADULTA HUMANA EM DIFERENTES FASES DO DESENVOLVIMENTO DENTÁRIO: UMA ANÁLISE METODOLÓGICA DOS CONSTITUINTES HISTOLÓGICOS

RESUMO

A perda tecidual e o restabelecimento de sua função representam desafios na medicina regenerativa. Uma subpopulação celular, as células-tronco adulta, são fundamentais no reparo dos tecidos. Estas células possuem capacidade de autorrenovação e diferenciação, desempenhando função importante no processo regenerativo dos diversos tecidos do organismo. Estruturas dentárias tem se mostrado fontes promissoras dessas células pela facilidade de acesso. A distribuição de células-tronco adulta nas estruturas dentárias ainda é pouco conhecida. A remoção da polpa dentária para estudos laboratoriais ainda enfrenta impasses metodológicos pela falta de padronização de protocolos. O objetivo deste estudo foi localizar topograficamente células-tronco adulta pulpar e de estruturas associadas ao dente nas diversas fases de desenvolvimento e avaliar a eficácia de dois métodos de coleta tecidual. Células-tronco adulta pulpar e de estruturas associadas foram identificadas por imunomarcagem e expressão gênica em dentes decíduos e permanentes humano nas diversas fases do desenvolvimento. Para o estudo topográfico, foram obtidos 34 dentes, sendo 8 dentes decíduos, 11 dentes permanentes de ápice aberto, 5 dentes permanentes de ápice fechado e 10 folículos pericoronários. Após exodontia, os dentes foram descalcificados em solução de EDTA, pH 7.0 e recortados para análise imunistoquímica com anticorpos monoclonais CD10, CD44, CD90, Nanog e Oct-3/4. Para estudo da expressão gênica, foram obtidos tecidos à fresco seguido de sua remoção por digestão enzimática com 3 mg/ml de colagenase tipo IV. A análise da preservação tecidual foi realizada a partir de 3 dentes permanentes de ápice aberto seccionados na região amelocementária para remoção da polpa dentária por dois métodos: mecânico com lima endodôntica e digestão enzimática sem manipulação pulpar. Os resultados mostraram a presença diferencial de marcadores de células-tronco nos constituintes tecidual e topográfico. O CD44 foi expresso exclusivamente na camada odontoblástica da região radicular de dentes permanentes de ápice aberto. Vasos capilares e nervos periféricos pulpares e de tecidos associados expressaram CD90 como também em cementoblastos e fibra do ligamento periodontal. Apenas fibroblastos localizados da papila dentária mostraram-se positivos para CD10, confirmados pela RT-PCR. Nenhuma expressão foi observada por fatores transcricionais de pluripotência Nanog e Oct-3/4. A digestão enzimática do tecido sem manipulação mostrou-se mais eficaz na remoção dos constituintes celulares do tecido pulpar. A manutenção da camada odontoblástica mostrou-se comprometida pelo método mecânico. Este estudo evidenciou distribuição topográfica distinta de subpopulações de células-tronco adulta nas diversas fases de desenvolvimento dentário. O dente permanente com rizogênese incompleta parece ser uma fonte potencial de células-tronco adulta em estudos *in vitro*. A escolha de métodos adequados na remoção do tecido pulpar é essencial na preservação de subpopulações de células-tronco pulpares, sendo a digestão enzimática sem manipulação pulpar mais eficaz do que o método mecânico.

Palavras-chave: Células-tronco adulta. Polpa dentária. Ligamento periodontal. Folículo dentário. Imunistoquímica. Métodos.

ABSTRACT

Tissue loss and the reestablishment of its function is challenging in regenerative medicine. A cellular subpopulation, called adult stem cells, is fundamental in tissue repair. These cells are capable of self-renewal and differentiation, playing an important role in tissues regenerative process in the whole organism. Dental structures are promising sources of these cells for easy access. The distribution of adult stem cells in dental structures is still poorly understood. Dental pulp removal for laboratory studies still faces methodological impasse due to the lack of protocol standardization. The aim of this study was to topographically locate adult pulp stem cells and from dental associated structures at various stages of dental development and to evaluate the effectiveness of tissue collection methods. Adult pulp and dental associated tissues stem cells were identified by immunostaining and gene expression in human deciduous and permanent teeth at various stages of development. For the topographic study, 35 teeth were obtained: 8 deciduous teeth, 12 open-apex permanent teeth, 5 closed-apex permanent teeth and 10 pericoronal follicles. After extraction, teeth were decalcified in pH 7.0 EDTA solution and cut out for immunohistochemical analysis with CD10, CD44, CD90, Nanog and Oct-3/4 monoclonal antibodies. For gene expression study, fresh tissues were obtained by enzymatic digestion with 3 mg/ml type IV collagenase. Tissue preservation analysis was performed in 3 open-apex permanent teeth sectioned in the cemento-enamel junction. To remove dental pulp, two methods were followed: mechanical removal with endodontic file or unhandled dental pulp enzymatic digestion. The results showed differential presence of stem cell markers in dental structures and topographic constituents. CD44 was expressed exclusively in odontoblastic layer of open-apex permanent teeth at root region. Pulp and dental associated tissue capillary vessels and peripheral nerves expressed CD90 as well as in cementoblasts and periodontal ligament fibers. Only fibroblasts from dental papilla were positive for CD10, confirmed by RT-PCR. No expression was observed by transcriptional pluripotency factors Nanog and Oct-3,4. unhandled dental pulp enzymatic digestion was more effective in removing cellular constituents from dental pulp. The maintenance of odontoblastic layer was compromised by mechanical method. This study showed distinct topographic distribution of adult stem cell subpopulations in various stages of dental development. Permanent teeth with incomplete rhizogenesis appear to be a potential source of adult stem cells in *in vitro* studies. Choosing appropriate methods for dental pulp removal is essential for preserving its stem cell subpopulations, and unhandled dental pulp enzymatic digestion is more effective than mechanical method.

Keywords: Adult stem cell. Dental pulp. Periodontal ligament. Dental follicle. Immunohistochemistry. Methods.

4.1 INTRODUÇÃO

A perda tecidual representa um desafio fisiopatológico na reconstituição de órgãos e tecidos. Seu reparo ocorre pela produção de tecido conjuntivo fibroso, podendo comprometer a arquitetura tecidual e a função do órgão afetado (GUTNER *et al.*, 2008). A utilização de células-tronco adulta na medicina regenerativa surge como alternativa terapêutica na reconstituição tecidual (MIYAGAWA *et al.*, 2017; RAMÍREZ *et al.*, 2015).

Nas estruturas dentárias e associadas ao dente, a presença de células-tronco foi identificada na polpa de dentes permanentes (DPSC) e decíduos (SHED), ligamento periodontal (PDLSC), folículo pericoronário (DFPC) e papila dentária (SCAP) (GRONTHOS *et al.*, 2000; MIURA, *et al.* 2003; SEO, *et al.*, 2004.; MORSCZECK, *et al.*, 2005; SONOYAMA *et al.*, 2006). A distribuição topográfica das células-tronco nestas estruturas, assim como a sua presença nas diversas fases de desenvolvimento dentário ainda é pouco conhecida. Nichos de células-tronco adulta são localizados próximos a vasos sanguíneos e nervos na polpa dentária (MACHADO *et al.*, 2016), assim como na camada odontoblástica de dentes permanentes (CHEN *et al.*, 2013). Estudos *in vitro* mostram a expressão de marcadores de superfície celular, como CD10, CD44 e CD90, e também de proteínas transcricionais Oct-3,4 e Nanog após o cultivo para estudo de sua capacidade de diferenciação (DEL ANGEL-MOSQUEDA *et al.*, 2015; NIEHAGE *et al.*, 2016; LIMA *et al.*, 2017).

O potencial regenerativo dessas células tem sido analisado em estudos *in vitro*. Métodos padronizados para a remoção da polpa dentária ainda não são bem estabelecidos. Em dentes permanentes, o acesso ao tecido pulpar é feito pela secção cervical na junção amelocementária com broca (ATARI *et al.*, 2012) ou disco de metal (KARAMZADEH *et al.*, 2012). Métodos mecânicos usando instrumentos como lima endodôntica, pinça (ATARI *et al.*, 2012; FERRO *et al.*, 2014) ou cureta são utilizados para a remoção da polpa dentária em dentes decíduos (TELLES *et al.*, 2016). Estudos *in vitro* dessas células são estabelecidos a partir do cultivo de fragmentos pulpares e por digestão enzimática pulpar após sua remoção prévia do interior dos dentes (KARAMZADEH *et al.*, 2012; VIÑA-ALMUNIA *et al.*, 2016). A eficiência na coleta dos constituintes celulares da polpa dentária para o estabelecimento de cultura primária ainda é pouco explorada.

No presente estudo, as células-tronco adultas de origem dentária e de estruturas associadas serão identificadas topograficamente nas diversas fases do desenvolvimento, assim como sua expressão gênica em tecidos à fresco nos diferentes métodos de coleta. Determinar a localização dessas células e a fase de desenvolvimento dentário adequada para sua coleta poderá

contribuir com a elaboração de protocolos para estudos *in vitro* e aplicação na odontologia regenerativa.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Obtenção da amostra

4.2.1.1 Dados clínicos

Foram coletados quarenta e quatro dentes hígidos extraídos por indicação ortodôntica após aplicação do Consentimento Livre e Esclarecido e o Termo de Assentimento Livre e Esclarecido para pacientes e responsáveis nas Clínicas de Cirurgia Bucomaxilofacial e Infantil (Faculdade de Odontologia – UFG). Dentes com lesões de cárie, quebrados, restaurados ou associados a alguma patologia foram excluídos da amostra. Os dentes foram classificados em dentes decíduos, permanentes de ápice aberto, permanentes de ápice fechado, e folículo pericoronários. Nos dentes decíduos, a média etária dos pacientes foi 9,1 anos (8 a 10) e o sexo predominante foi o feminino representando 70,0%. Os dentes unirradiculares compõem 70% deste grupo. Nos dentes permanentes de ápice aberto, a média de idade foi de 17,6 anos, variando de 15 a 20 anos. O sexo feminino foi predominante representando 56,3% do grupo. No grupo de dentes permanentes de ápice fechado, a média etária foi de 20,25 anos (18 a 22) com predominância do sexo masculino (57,1%). Nos folículos pericoronários, a idade média foi de 17,8 anos (15 a 20), sendo removidos de participantes do sexo feminino. Todos os dentes permanentes e folículos pericoronários eram birradiculares.

4.2.1.2 Dentes

Trinta e cinco dentes humanos hígidos foram coletados nas Clínicas de Cirurgia Bucomaxilofacial e Infantil da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás. Previamente, foi aplicado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para os pacientes e responsáveis. Os dentes foram agrupados em dentes decíduos, permanentes de ápice aberto, permanentes de ápice fechado e folículo pericoronário. Trinta e quatro dentes foram fixados em formol a 10% por 24 horas, descalcificados em solução de EDTA, pH 7.0 por 6 meses em agitação magnética constante com trocas semanais da solução. Após a exodontia, um dente permanente de ápice aberto foi seccionado na região amelocementária para remoção do tecido pulpar com lima endodôntica do tipo Hedstroen e fixado em formol a 10% (DENTSPLY, EUA). Após este processo, os dentes foram emblocados em parafina e recortados para a análise imunoistoquímica e em hematoxilina e eosina.

4.2.1.3 Tecidos à fresco

A remoção tecidual foi feita em capela de fluxo laminar Classe II, utilizando materiais esterilizados. Nove dentes, imediatamente após a exodontia, foram seccionados na região amelocementária para acesso ao tecido pulpar. Um dos dentes permanentes de ápice aberto teve o tecido pulpar removido com lima endodôntia do tipo Hedstroen (DENTSPLY, EUA) e armazenado em 400 μ L de RNA later (AMBION, EUA) e mantido a -80°C . Tanto o fragmento coronário, quanto as raízes foram inseridas em solução de colagenase tipo IV a 3 mg/ml em meio de cultura RPMI 1640 (GIBCO, EUA) com 400 μ L de RNA later (AMBION, EUA) para digestão enzimática. A solução com o dente foi mantida em agitação constante por 3h a temperatura ambiente. Foi feita filtragem em filtro de 70 μ m (BD BIOSCIENCES, EUA) para tubo falcon (BD BIOSCIENCES, EUA), centrifugação a 2500 rpm por 15 min, aspiração do sobrenadante e acrescido 200 μ L de RNA later (AMBION, EUA), e mantido a -80°C para estudo da expressão gênica. Figura 5 resume a coleta do tecido pulpar.

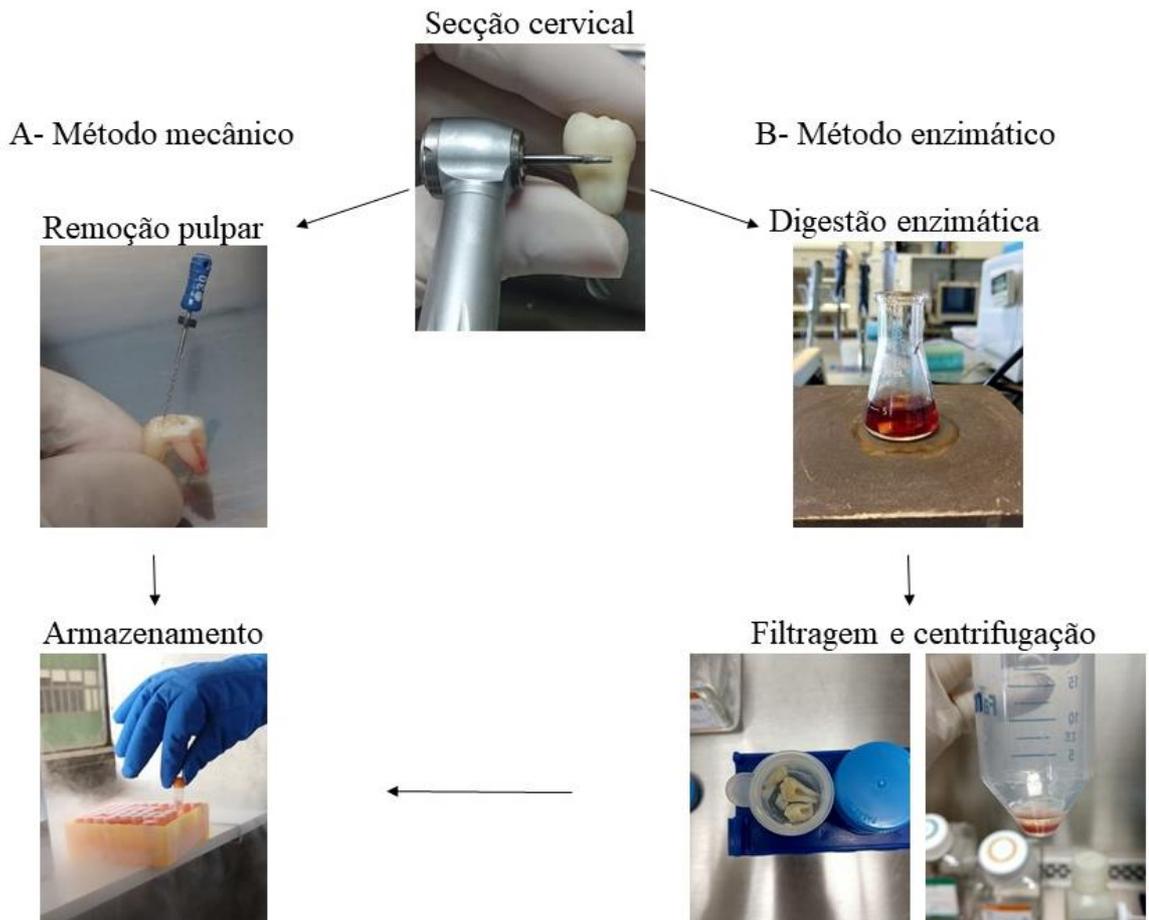


Figura 5 – Métodos de remoção do tecido pulpar mecânico e enzimático. Acesso pulpar por secção cervical na junção amelocementária. A, método mecânico com lima endodôntica do tipo Hedströen. Armazenamento da polpa dentária em RNA later a -80°C . B, Método de digestão enzimática sem manipulação pulpar: fragmentos dentários imersos em solução 3 mg/mL de colagenase tipo IV. Filtragem e centrifugação com remoção do sobrenadante e armazenamento em RNA later a -80°C .

A remoção do ligamento periodontal e do folículo pericoronário de um dente foi feita imediatamente após a exodontia, utilizando cureta de dentina raspando os dois terços apicais da raiz, e com lâmina de bisturi nº 15 para fragmentação do folículo pericoronário. Os tecidos removidos foram colocados separadamente em tubo 1,5 mL, imerso em RNA Later (AMBION, EUA) e armazenado a -80°C até o seu processamento para estudo da expressão gênica (Figura 6). Tabela 2 resume a distribuição dos dentes segundo grupos para etapas metodológicas.

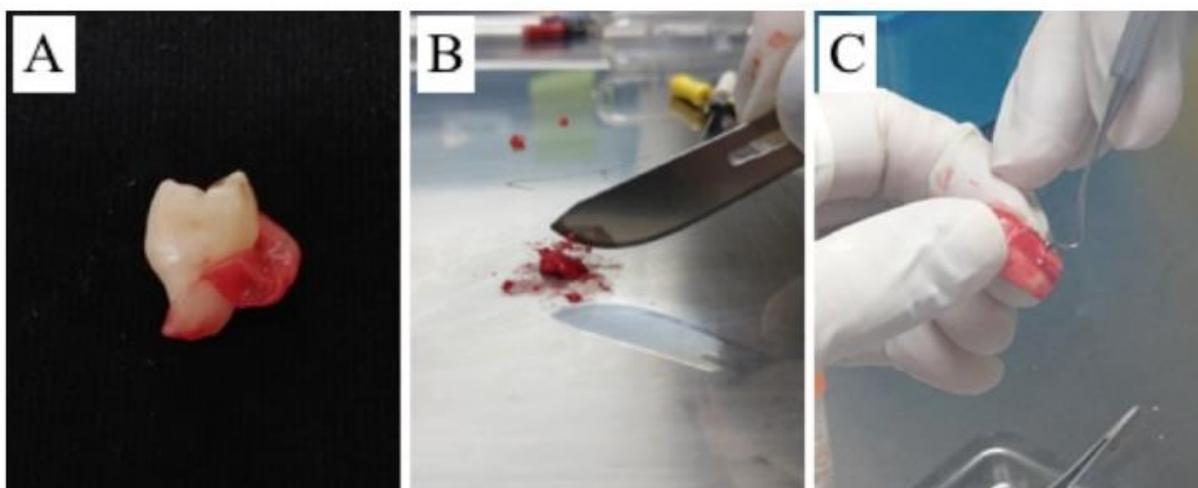


Figura 6 – Remoção e armazenamento dos tecidos associados ao dente. A e B, Remoção e fragmentação com lâmina de bisturi nº15 do folículo pericoronário. C, Coleta do ligamento periodontal do terço médio da raiz com cureta de dentina.

Tabela 2 – Distribuição dos grupos de estudo nos métodos utilizados

Grupos	Imunohistoquímica (n)	RT-PCR (n)
Total	35	9
Dente decíduo	8	2
Dentes permanente		
Ápice aberto	12	4
Ápice fechado	5	2
Folículo pericoronário	10	1

4.2.2 Imunoistoquímica

Os tecidos emblocados em parafina foram recortados com navalha de duplo corte (CL STURKEY INC, EUA) em micrótomo rotativo (LEICA, Alemanha) em espessura de $3\ \mu\text{m}$, dispostos em lâminas (SUPERFROST EXCELL, FISHERBRAND, EUA) e levados à estufa a 60°C por 20 min. Os cortes longitudinais foram desparafinados em banhos de xilol e reidratados

em álcoois absoluto, 80%, 70%, e 50%. A recuperação antigênica seguiu conforme as instruções do fabricante (Tabela 3). A peroxidase endógena foi inibida em solução H₂O₂ a 3% (FISCHER SCIENTIFIC, USA) em metanol por 30 min, e os cortes foram demarcados com caneta hidrofóbica (DAKO, EUA). A incubação *overnight*, em câmara úmida, a 8°C, dos anticorpos monoclonais primários (CD10, CD44, CD90, Nanog e Oct-3,4) seguiram as titulações e especificações do fabricante (Tabela 3) como seus respectivos controles negativos. Utilizou-se o sistema estreptavidina-biotina (BIOCARE MEDICAL, UK) para incubação do anticorpo secundário. A revelação foi feita com diaminobenzidina (BIOCARE MEDICAL, UK) e contra-coloração com hematoxilina.

A análise das marcações imunoistoquímicas das células foi feita conforme a proteína por meio do sistema analisador de imagens interativo (AXIONVISION 3.1 CARL ZEISS, Alemanha). A avaliação da distribuição dos marcadores foi realizada em toda a extensão do tecido, sendo que as células positivas apresentaram marcação na cor marrom. A análise histológica foi feita por dois observadores (S.P.C. e E.F.V.) sobre a localização das células positivas dentro dos tecidos pulpar e associados ao dente.

Tabela 3 - Anticorpos primários monoclonais nos testes imunoistoquímicos

Anticorpo primário	Tipo	Marca	Titulação
CD10	Monoclonal	BioCare Medical	1:200
CD44	Monoclonal	Cell Signaling	1:200
CD90	Monoclonal	Cell Signaling	1:200
Nanog	Monoclonal	Cell Signaling	1:100
Oct-3/4	Monoclonal	Santa Cruz	1:5

4.2.3 RT-PCR

4.2.3.1 Desenho dos Primers

Para estudo da expressão gênica, foram confeccionadas sequências de nucleotídeos para o gene *MME*. Inicialmente foi desenhado a sequência de nucleotídeo no Site da Pubmed na seção Gene. Pela sequência codificadora do gene foram encontradas a região entre dois exons, ou seja, ATG (5') e TAA (3'). O Primer deve conter entre 17 a 22 pares de bases, sendo de 50 a 60% composto por (G+C). O Primer 3' deve terminar em G ou C, ou CG ou GC. Devido à quebra das ligações entre os aminoácidos, deve-se calcular a temperatura para ter como referência de ponto ótimo de ativação da enzima Taq Polimerase (>69°C). Sendo: $T_m = [2$

(A+T) + 4(G+C)]-5, em °C. Foi verificada a presença de Hairpins (aminoácidos complementares) e Self-dimer (aminoácidos complementares 3'e 5'). Após a seleção das sequências, foi verificada a compatibilidade e exclusividade da sequência para o gene no BLAST, que deve ser próximo de 100%. O teste de alinhamento das sequências 3' e 5' no BLAST, manteve PLUS/PLUS na 5' e PLUS/MINUS na 3'. As sequências dos Primers 3' e 5' (Tabela 4) foram construídas pela firma iDT (EUA). A sequência de nucleotídeos dos genes *CD44* e *THY1* foram utilizadas de Liu *et al* (2000).

Tabela 4 - Sequência de bases nitrogenadas em Primers desenhados

Gene	Sequência de bases	Produto de PCR
<i>CD44</i>	5' CAGATCGATTTGAATATAACCTGCCGC	600
	3' AGGGATTCTGTCTGTGCTGTCGGTGAT	
<i>MME</i>	5' GTGCCCAGCAGTCCAACCTCATTGAAC	610
	3' CCCCATTTCTGTGGTGTGGCAAGTC	
<i>NANOG</i>	5' CTTCACCTATGCCTGTGATTTGTGGGC	701
	3'CTGCAGTCCTGATGCAGTTCCAGC	
<i>POU5F1</i>	5' GCTCCTGAAGCAGAAGAGGATCACC	457
	3' GAGGATTTTGAGGCTGCTGGGTCTC	
<i>THY1</i>	5' CTGAGATCCCAGAACCATGAACCTGGC	507
	3' CACCAGTCACAGGGACATGAAATCCG	
<i>GAPDH</i>	5' GGGGAAGGTGAAGGTCGGAGTCAAC	972
	3' GAATTTGGCTACAGCAACAGGGTGGTG	

4.2.3.2 Extração de RNA total

Foi utilizado o kit mirVana miRNA Isolation (INVITROGEN, EUA) para extração do RNA total, seguindo as orientações do fabricante. Os tecidos armazenados em RNA Later (AMBION, EUA) foram descongelados, removidos e colocados em 500 µL Tampão de lise e levados a agitação a 4°C até a total dissolução tecidual. Foram adicionados 50 µL de solução aditiva e agitado vigorosamente. A solução permaneceu por 10 min sobre o gelo. Foram acrescentados 500 µL de Ácido-fenol:Clorofórmio (INVITROGEN, EUA) e agitado vigorosamente em vortex por 1 min. O lisado foi centrifugado a 10.000 rpm por 5 min em temperatura ambiente. A fase aquosa foi transferida para um tubo novo e adicionado 1,25x

volume da amostra de etanol a 100%. 700 μ L da mistura foram pipetados em tubo coletor com filtro e centrifugado 15 seg a 10.000 rpm. O líquido foi descartado e o procedimento foi repetido até que toda a solução fosse filtrada. Foi acrescentado 700 μ L de solução 1 e centrifugado por 10 seg a 10.000 rpm. O líquido foi descartado e adicionados 500 μ L de solução de lavagem 2/3 foram adicionados e centrifugado por 10 seg a 10.000 rpm. Este último procedimento foi repetido e o líquido descartado. O tubo vazio foi centrifugado como anteriormente por 1 min e seu filtro foi transferido para um novo tubo coletor. O RNA total foi eluído em 100 μ L de solução à 95°C e centrifugado por 30 seg por 10.000 rpm. O RNA total extraído foi armazenado à -80°C.

4.2.3.3 RT-PCR

Os Primers desenhados foram padronizados (Figura 8), utilizando-se RNA total das linhagens celulares SKmel 37 (gentilmente cedida pela Profa Lúcia Andreu Guillo - ICBII/UFG) e NCCIT (ATCC, EUA). O *GAPDH* foi utilizado como gene constitutivo. Para a síntese de cDNA, foram utilizado 400 ng/ μ L de RNA total das linhagens Skmel 37 e NCCIT. Foi utilizado o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (APPLIED BIOSYSTEMS, EUA). O volume foi ajustado para 10 μ L com água nuclease-free e adicionado 10 μ L de buffer, totalizando 20 μ L/reação. Os tubos foram levados ao termociclador (AMPLITHERM, EUA) configurado 10 min a 25°C, 120 min a 37°C, 5 seg a 85°C. Para o PCR, foi utilizado o kit Fermentas (LIFE SCIENCE, EUA). 38 μ L de buffer, 10 μ L de cDNA, como descrito previamente, e 1 μ L de primer 3' e 5' foram adicionados em tubos Eppendorfs, totalizando 50 μ L/reação. No termociclador (AMPLITHERM, EUA) foram estabelecidos 2 min a 95°C, 30 seg a 95°C, função gradiente amplificando em 40 ciclos, 70°C em 1 min, 70°C a 5 min e hold em 4°C. A função gradiente do termociclador foi acessada pela adequar a diferença de temperatura da Taq Polimerase e de anelamento dos Primers de 60°C para o *CD44* e *GAPDH*, e 62°C para *MME* e *THY-1*.

4.2.3.4 Confeção do gel de agarose e eletroforese

A confecção gel de agarose seguiu-se em micro-ondas em potência máxima por 30 seg, agitando a cada 10 seg. Ao atingir 60°C, foi acrescentado 1,2 μ L de brometo de etídio (EtBr) e dispensado em suporte com pente de 12 dentes. Após 1h de condensação, os produtos de PCR foram separados em gel de agarose a 1,2%. Foram utilizados a marca de peso molecular (TrackIt 1Kb Plus DNA Ladder, INVITROGEN, EUA), solução de corrida (INVITROGEN, EUA), Tris-Borato-EDTA (TBE) a 1,0% e 15 μ L da amostra confeccionada no PCR. Cada amostra foi

dispensada no gel de agarose sob 130 V em uma cuba com tampão de Tris-Borato-EDTA a 1% por 30 min. A análise do gel foi por meio de sua exposição à luz ultravioleta no transiluminador e fotodocumentador (TRANSILLUMINATOR L-PIX EX, LOCCUS).

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Imunomarcção de células-tronco na polpa dentária e de estruturas associadas

A Tabela 5 mostra a expressão diferencial dos marcadores CD10, CD44, CD90, Nanog e Oct-3,4 nos componentes celulares da polpa dentária, ligamento periodontal e folículo pericoronário. A papila dentária e as fibras colágenas no tecido pulpar apresentaram expressão livre da proteína CD10. A presença de CD10 foi observada apenas no citoplasma de fibroblastos da papila dentária. A proteína CD44 foi expressa apenas na camada odontoblástica da região radicular. Estruturas vasculares, neurais, cementoblastos e fibras colágenas periodontais expressaram a proteína CD90 (Figura 7).

Tabela 5 - Expressão dos marcadores de células-tronco pulpar e de tecidos associados

	CD10	CD44	CD90
Odontoblasto	-	+*	-
Vasos sanguíneos	-	-	+
Fibras colágenas pulpares	+	-	-
Papila dentária	+	-	-
Nervos	-	-	+
Cementoblastos	-	-	+
Fibras colágenas periodontais	-	-	+

*camada odontoblástica radicular

4.3.2 Expressão diferencial dos marcadores de células-tronco nas diversas fases do desenvolvimento dentário e estruturas periodontais

O dente decíduo apresentou marcação de estruturas vasculares e neurais no interior do tecido pulpar pelo CD90 e marcação livre de CD10 no tecido pulpar. Nos dentes permanentes de ápice aberto observou-se a marcação livre do CD10 nos tecidos pulpar e conjuntivo da papila dentária. Células da camada odontoblástica radicular apresentaram positividade para o CD44. Vasos, nervos, cementoblastos e fibras colágenas do ligamento periodontal expressaram CD90. Os dentes permanentes de ápice fechado mostraram marcação livre do CD10 no tecido pulpar e expressão de CD90 em feixes vasculo-nervosos, cementoblastos e fibras do ligamento periodontal. O folículo pericoronário apresentou marcação vascular pelo CD90, confirmado pela análise da expressão gênica (Figuras 7 e 9).

4.3.3 Eficácia de método de digestão enzimática sem manipulação pulpar

A digestão enzimática apresentou superexpressão do gene *CD44* em comparação ao tecido pulpar removido com lima endodôntica (Figura 10). A remoção mecânica da polpa dentária proporcionou a coleta parcial dos constituintes celulares, como mostrado na figura 11. A marcação imunohistoquímica pelo CD44 mostra o remanescente celular da camada odontoblástica após a remoção tecidual (Figura 11).

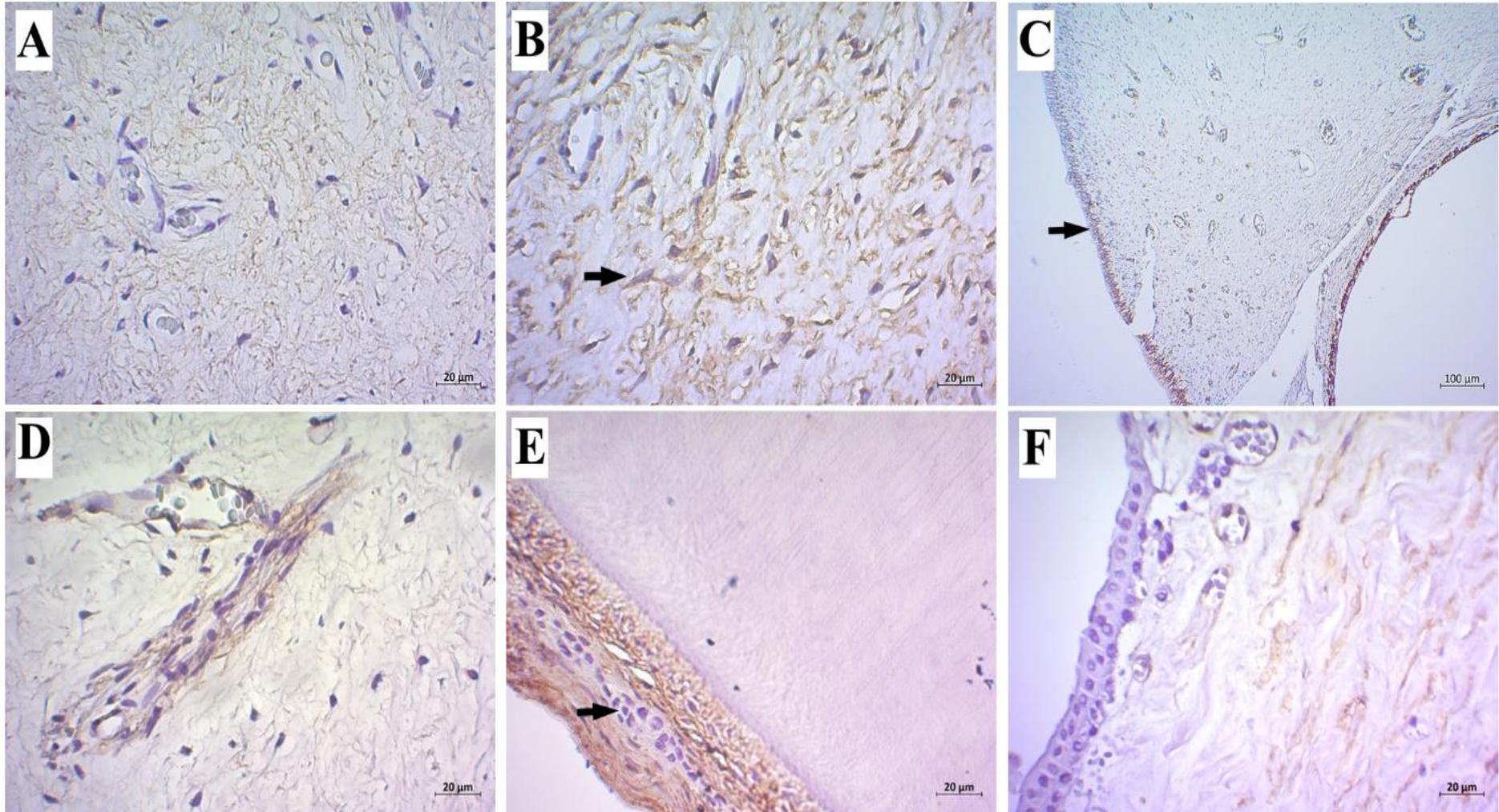


Figura 7 - Expressão de marcadores de células-tronco CD10, CD44 e CD90 na polpa dentária e estruturas associadas ao dente. A, Expressão livre de CD10 entre as fibras colágenas da polpa dentária. B, Fibroblastos CD10-positivos da papila dentária (seta). C, Marcação diferencial de odontoblastos CD44-positivos na polpa dentária em desenvolvimento. Vasos capilares e nervo periférico CD90-positivos. E, Fibras colágenas do ligamento periodontal e cementoblastos CD90-positivos e ausência de marcação nos restos epiteliais de Malassez. F, Capilares de folículos pericoronários CD90-positivos.

Skmel 37

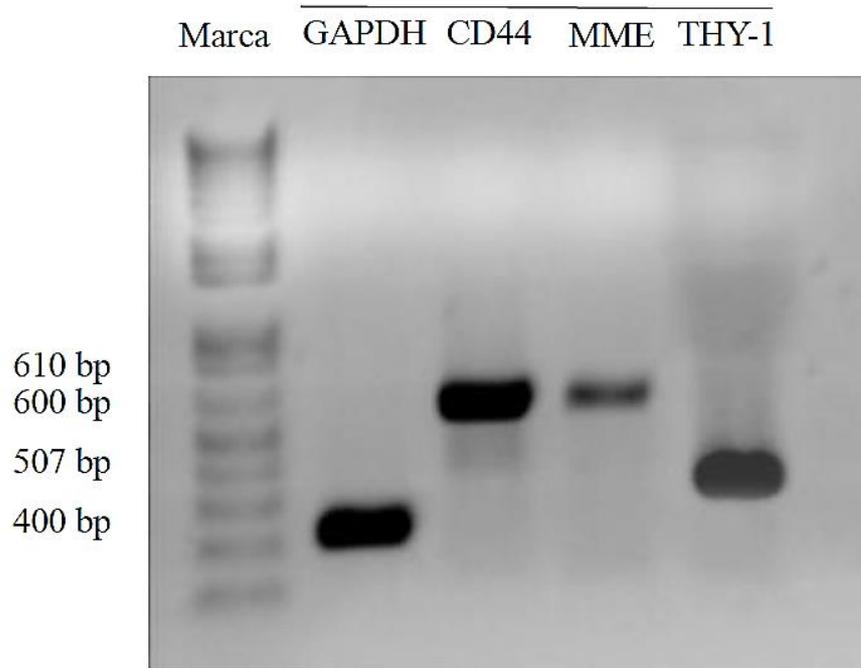


Figura 8 – Padronização dos Primers de genes *CD44*, *MME*, *THY1* e *GAPDH* na linhagem SKmel 37.

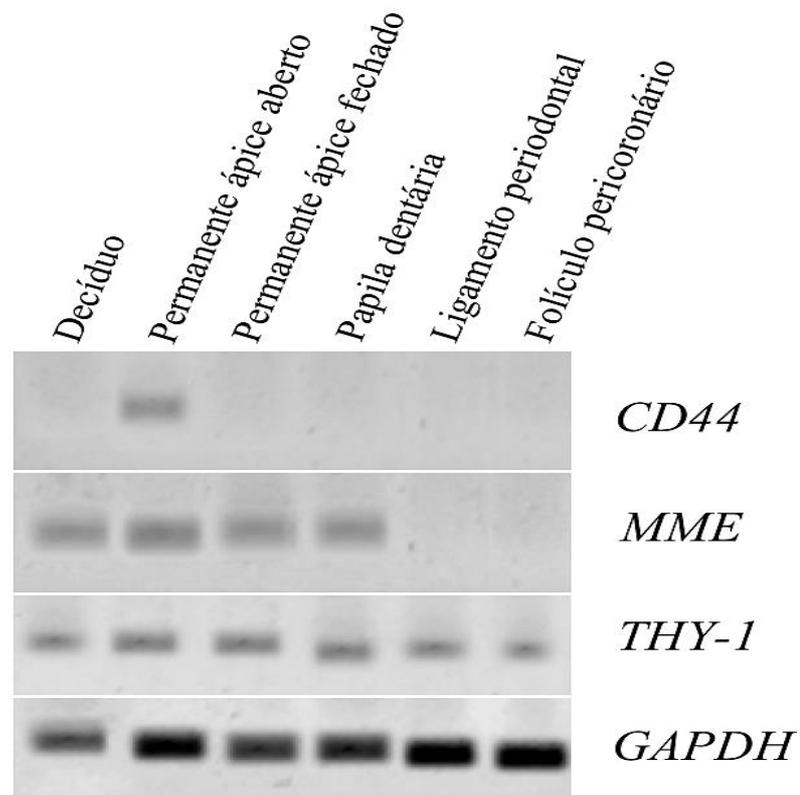


Figura 9 – Expressão gênica do *CD44*, *MME* e *THY-1* de estruturas dentárias nas diferentes fases dos desenvolvimento.

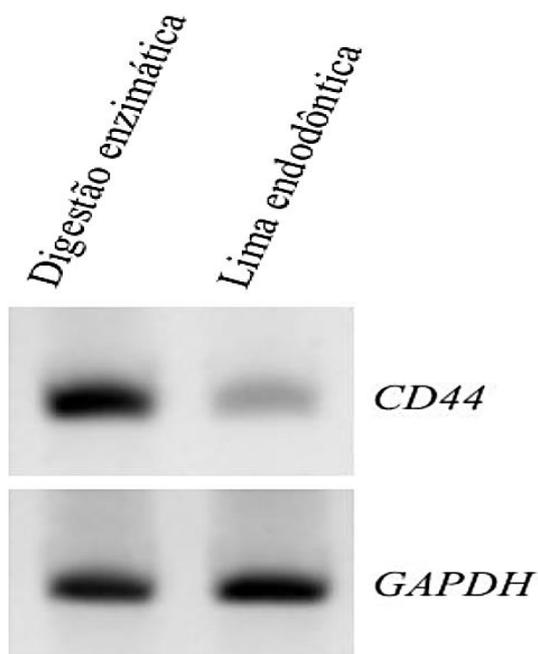


Figura 10 – Expressão diferencial do gene *CD44* entre os métodos mecânico e enzimático de remoção pulpar.

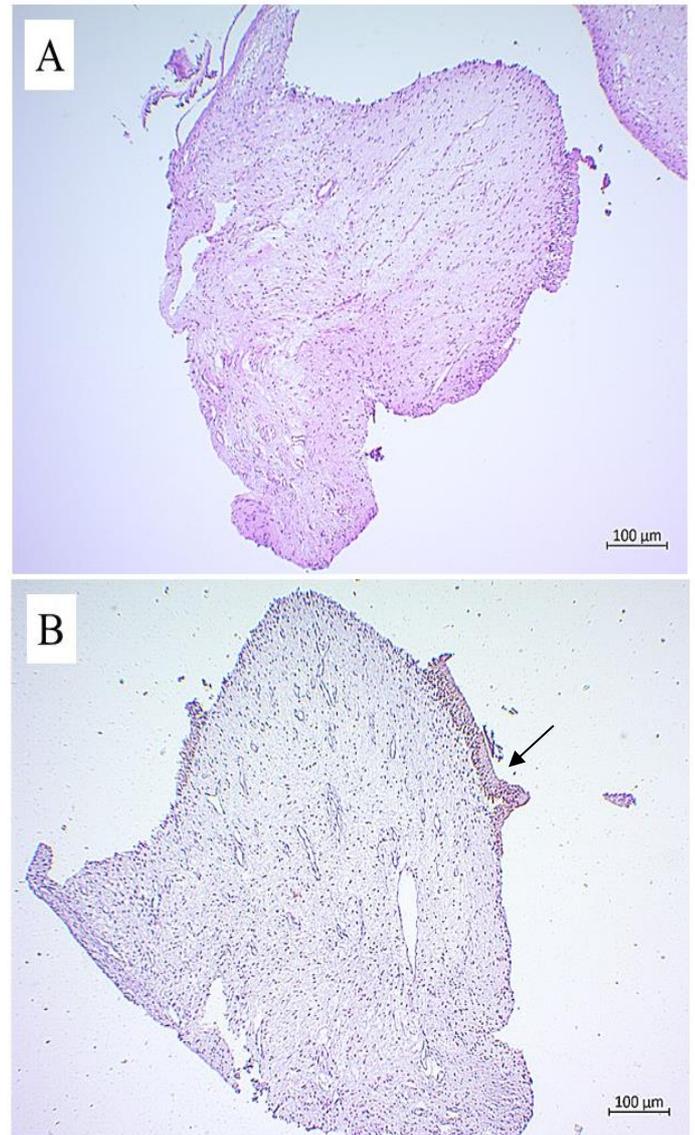


Figura 11 – Remoção parcial de constituintes teciduais pelo método mecânico. A, Camada odontoblástica parcialmente removida (H&E). B, Odontoblastos *CD44*-positivos remanescentes (seta)

4.4 DISCUSSÃO

Na odontologia, a utilização de células-tronco adulta derivadas de tecidos dentários é promissora na regeneração de regiões anatômicas e de estruturas dentárias. A escassez de informação sobre a distribuição histológica e a caracterização fenotípica dessas células dificulta sua aplicação em estudos *in vitro* e pré-clínicos. Este é um estudo pioneiro que identifica e mostra a distribuição topográfica diferencial e caracterização gênica de subpopulações de células-tronco adulta em tecidos dentários.

Neste estudo, diferentes subpopulações de células-tronco adulta foram identificadas e localizadas nos diversos constituintes dentários. O marcador de multipotência CD44 foi exclusivo de odontoblastos, distribuindo-se conforme sua fases do desenvolvimento e topografia. A expressão de CD44 foi observada apenas em odontoblastos de dentes com rizogênese incompleta na sua porção radicular, sugerindo participação neste processo de desenvolvimento. Estes resultados corroboram com o estudo imunohistoquímico de Chen *et al.* (2013). Interessantemente, no presente estudo, observou-se ausência de expressão do CD44 em odontoblastos da porção coronária, coincidindo com a região da junção amelocementária neste grupo de dentes. Do mesmo modo, nenhuma marcação desta proteína foi observada em odontoblastos localizados em dentes decíduos e permanentes de ápice fechado, sugerindo subexpressão desta proteína nas fases de esfoliação e final de desenvolvimento, respectivamente. Estes dados contrastam com os apresentados por Shetty *et al.* (2018), que encontraram expressão de CD44 em odontoblastos de dentes decíduos. Da mesma maneira, a ausência de CD44 foi notada em folículos pericoronários, divergindo dos resultados de Angiero *et al.* (2012). Sabe-se que processos patológicos iniciais em dentes impactados induzem a proliferação do epitélio reduzido do órgão do esmalte, formando o cisto dentífero (BILODEAU & COLLINS, 2017). Neste sentido, Srinath *et al.* (2014) mostraram a expressão deste marcador de multipotência no epitélio de revestimento de cistos dentíferos.

O CD44 é uma glicoproteína transmembranar envolvida nos processos de adesão e migração celular, como também no ciclo celular e metabolismo do ácido hialurônico na embriogênese (SPICER *et al.*, 2004). A sua expressão foi descrita nas diversas fases embrionárias da odontogênese desde a lâmina dentária, estrato intermediário e epitélio interno do órgão do esmalte, estando ausente nas células da papila dentária e folículo dentário de ratos (YU & TOOLE, 1997). No presente trabalho, a expressão diferencial do CD44 nos tecidos

dentários sugere origem epitelial de odontoblastos a partir de célula-tronco derivadas do epitélio interno do órgão do esmalte.

Neste estudo, o CD90 mostrou-se expresso em diversas estruturas do tecido dentário, incluindo vasos capilares, nervo periférico, fibras colágenas do ligamento periodontal e cementoblastos independente da fase do desenvolvimento. Machado *et al.* (2016) relatam resultados semelhantes em vasos e nervos da polpa dentária e parecem estar associados à nichos perivascularres de células-tronco adulta no tecido pulpar (SCADDEN *et al.*, 2006). Na odontogênese, estudos com embriões de ratos em desenvolvimento mostram positividade do CD90 na crista neural, indicando origem neuroectodérmica (TAKASHIMA *et al.*, 2007). Interessantemente, no presente trabalho, a positividade diferencial do CD90 nas fibras cológenas do ligamento periodontal e polpa dentária sugerem plasticidade tecidual nas zonas autorreguladoras na manutenção do espaço funcional da articulação (LIN *et al.*, 2017). Da mesma maneira, Torii *et al.* (2014), mostraram o potencial cementogênico *in vitro* de células CD90 positivas derivadas ligamento periodontal.

A atividade enzimática do CD10 durante o desenvolvimento tecidual tem sido descrita na organogênese e na produção de moléculas como neurotransmissores no sistema nervoso (FAA *et al.*, 2011; HELISAMI *et al.*, 2004). Na odontogênese, ainda não há estudos da sua participação no desenvolvimento dentário. O CD10 é uma glicoproteína transmembranar atuante nos mecanismos de proliferação e diferenciação celular em tecidos normais. Sua forma secretada é responsável pela ativação e inativação de diversos peptídeos importantes na regulação fisiológica do ambiente extracelular (MAGUER-SATTA *et al.*, 2011). No presente estudo, o CD10 mostrou-se expresso em sua forma livre na polpa dentária e no citoplasma de fibroblastos da papila dentária, sugerindo sua participação na manutenção tecidual e no desenvolvimento radicular. Da mesma maneira, a expressão do CD10 foi observada em células-tronco pulpar de dentes decíduos (FERRO *et al.*, 2012). Estudos futuros são necessários para elucidar o papel dessa proteína na multipotência de fibroblastos progenitores e na fisiologia pulpar.

A expressão dos fatores de transcrição de pluripotência Oct-3,4 e Nanog é essencial no processo de manutenção do estado indiferenciado de células-tronco. O presente estudo mostrou ausência da sua expressão nos tecidos dentários independente do estágio de desenvolvimento. A falta de expressão gênica desses marcadores foi também observada em estudos *in vitro* utilizando polpa dentária de ratos, concordando com o presente estudo (NOZAKI & OHURA, 2011).

A distribuição de subpopulações de células-tronco pulpar e em tecidos associados ainda é pouco explorada. Este é um estudo pioneiro na localização topográfica de células-tronco adulta da polpa dentária contrastando com dois métodos de coleta à fresco. O método de digestão enzimática mostrou-se mais eficaz na obtenção de subpopulações de células-tronco da polpa dentária que o método mecânico com lima endodôntica. Histologicamente, a manutenção da camada odontoblástica foi comprometida com o método mecânico, confirmado pela baixa expressão do gene *CD44*. Estudos *in vitro* mostraram maior capacidade proliferativa e de diferenciação de células-tronco pulpar obtidas por digestão enzimática (KARAMZADEH *et al.*, 2012; VIÑA-ALMUNIA *et al.*, 2016). Com isso, a definição de métodos adequados é fundamental na utilização células-tronco adulta pulpare e sua potencial aplicação clínica na odontologia regenerativa. Deste modo, a digestão enzimática do tecido pulpar sem remoção mecânica pode ser uma opção metodológica em estudos de subpopulações de células-tronco.

4.5 CONCLUSÃO

A identificação topográfica e a obtenção de células-tronco adulta em tecidos dentários ainda é pouco conhecida. No presente estudo, marcadores de multipotência identificaram subpopulações de células-tronco adulta distribuídas distintamente nos tecidos dentários nas diversas fases de desenvolvimento. O dente permanente com rizogênese incompleta parece ser uma fonte potencial de células-tronco adulta em estudos *in vitro*. A escolha de métodos adequados na remoção do tecido pulpar são essenciais na preservação de subpopulações de células-tronco pulpares, sendo a digestão enzimática a mais eficaz.

REFERÊNCIAS

- ALIPOUR, R. *et al.* Phenotypic characterizations and comparison of adult dental stem cells with adipose-derived stem cells. *International Journal of Preventive Medicine*. v. 1, n. 3, p. 164, 2010.
- ALT, E. U. *et al.* Fundamentals of stem cells: why and how patients' own adult stem cells are the next generation of medicine. *Preprints*. v. 4, n. 2, p. 1-34, 2019.
- ANGELOVA, A. *et al.* Immunocompetent cells in the pulp of human deciduous teeth. *Arch Oral Biol*. v. 49, n. 1, p. 29-36, 2004.
- ANGIERO, F. *et al.* Stromal phenotype of dental follicle stem cells. *Front Biosci (Elite Ed)*, v. 4, p. 1009-14, 2012.
- ANITUA, E.; TROYA, M.; ZALDUENDO, M. Progress in the use of dental pulp stem cells in regenerative medicine. *Cytotherapy*, v. 20, n. 4, p. 479-498, 2018.
- ATARI, M. *et al.* Dental pulp of the third molar: a new source of pluripotent-like stem cells. *J Cell Sci*. v. 125, n. Pt14, p. 3343-56, 2012.
- BACHELARD-CASCALES, E. *et al.* The CD10 enzyme is a key player to identify and regulate human mammary stem cells. *Stem Cells*. v. 28, n. 6, p. 1081-1088, 2010.
- BAER, P.C.; GEIGER, H. Adipose-derived mesenchymal stroma/stem cells: tissue location, characterization and heterogeneity. *Stem Cells Int*. v. 81, n. 26, p. 1-11, 2012.
- BALLINI, A. *et al.* A comparative study on different stemness gene expression between dental pulp stem cells vs. dental bud stem cells. *European review for medical and pharmacological sciences*. v. 23, p. 1626-1633, 2019.
- BÉNÉ, M. C. Immunophenotyping of acute leukaemias. *Immunology letters*. v. 98, n. 1, p. 9-21, 2005.
- BERNARDI, L. *et al.* The isolation of stem cells from human deciduous teeth pulp is related to the physiological process of resorption. *Journal of endodontics*. v. 37, n. 7, p. 973-979, 2011.
- BERTHIAUME, F.; MAGUIRE, T. J.; YARMUSH M. L. Tissue engineering and regenerative medicine: history, progress and challenges. *Annu Rev Chem Biomol Eng*. v. 2, p. 403-30, 2011.
- BILODEAU, E. A.; COLLINS, B. M. Odontogenic cysts and neoplasms. *Surgical pathology clinics*. v. 10, n. 1, p. 177-222, 2017.
- BORTVIN, A. *et al.* Incomplete reactivation of Oct4-related genes in mouse embryos cloned from somatic nuclei. *Development*. v. 130, n. 8, p. 1673-1680, 2003.
- BÜHRING, H. J. *et al.* Novel markers for the prospective isolation of human MSC. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1106, n. 1, p. 262-271, 2007.

- CHEN, K. L. *et al.* CD44 is involved in mineralization of dental pulp cells. *Journal of endodontics*. v. 39, n. 3, p. 351-356, 2013.
- DEL ANGEL-MOSQUEDA, C. *et al.* Epidermal growth factor enhances osteogenic differentiation of dental pulp stem cells in vitro. *Head & face medicine*. v. 11, n. 1, p. 29, 2015.
- DOMINICI, M. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. v. 8, n. 4, p. 315-17, 2006.
- DOMON, T. *et al.* Apoptosis of odontoclasts under physiological root resorption of human deciduous teeth. *Cell and tissue research*, v. 331, n. 2, p. 423-433, 2008.
- DULAK, J. *et al.* Adult stem cells: hopes and hypes of regenerative medicine. *Acta Biochim Pol.* v. 62, n. 3, p. 329-37, 2015.
- EL-SAYED, K. M. *et al.* Stem/progenitor cell mediated pulpal tissue regeneration: a systematic review and meta-analysis. *Int Endod J.* 2019.
- EVANS, M. J., KAUFMAN, M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. v. 292, n. 5819, p. 154-6, 1981.
- FAA, G. *et al.* CD10 in the developing human kidney: immunoreactivity and possible role in renal embryogenesis. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. v. 25, n. 7, p. 904-911, 2012.
- FARUP, J. *et al.* Interactions between muscle stem cells and mesenchymal-derived cells and immune cells in muscle homeostasis, regeneration and disease. *Cell Death & Disease*. v. 6, n. 7, p. e1830, 2015.
- FERRO, F. *et al.* Dental pulp stem cells differentiation reveals new insights in Oct4A dynamics. *PLoS One*. v. 7, n. 7, p. e41774, 2012.
- FERRO, F.; SPELAT, R.; BAHENEY, C. S. Dental pulp stem cell (DPSC) isolation, characterization, and differentiation. *Methods Mol Biol*. v. 1210, p. 91-115, 2014.
- FERRÚA, C. P. *et al.* How was dental pulp stem cells isolation been conducted? A scoping review. *Braz Oral Res*. v. 31, n. e87, p. 1-9, 2017.
- FRIED, K.; GIBBS, J. L. Pulp innervation. In: *The dental pulp: biology, pathology and regenerative therapies*. Goldber, M. Berlin: Springer. 2014.
- FRIEDENSTEIN, A. J.; GORSKAJA, J. F.; KULAGINA, N. N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*. v. 4, p. 267-274.
- GALY, A. *et al.* Hematopoietic progenitor cells of lymphocytes and dendritic cells. *Journal of immunotherapy*. v. 21, n. 2, p. 132-141, 1998.

- GOVORKO, D. K. *et al.* Spatial and temporal distribution of Ki-67 proliferation marker, Bcl-2 and Bax proteins in the developing human tooth. *Arch Oral Biol.* v. 55, n. 12, p. 1007-16, 2010.
- GRONTHOS, S. *et al.* Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci.* v. 97, n. 25, p. 13625-30, 2000.
- GUTNER, G. C. *et al.* Wound repair and regeneration. *Nature.* v. 453, n. 7193, p. 314-21, 2008.
- IDRIS, M. *et al.* Role of tumour necrosis factor in pathogenesis of radicular cyst. *Journal of Ayub Medical College Abbottabad.* v. 23, n. 2, p. 87-89, 2011.
- IKEDA, E. *et al.* Multipotent cells from the human third molar: feasibility of cell-based therapy for liver disease. *Differentiation.* v. 76, n. 5, p. 495-505, 2008.
- IWATA, T. *et al.* Peridontal regeneration with autologous periodontal ligament-derived cell sheets – A safety and efficacy study in ten patients. *Regen Ther.* v. 9, p. 38-44, 2018.
- KARAMZADEH, R. *et al.* Isolation, characterization and comparative differentiation of human dental pulp stem cells derived from permanent teeth by using two different methods. *J Vis Exp.* v. 69, p. 1-10, 2012.
- KATCHBURIAN, E. & ARANA, V. *Histologia e Embriologia Oral.* 4ª. Edição. Rio de Janeiro: Guanabara, 2017.
- KEINAN, D.; COHEN, R. E. The significance of epithelial rests of Malassez in the periodontal ligament. *J Endod.* v. 39, n. 5, p. 583-7, 2013.
- KHAN, F. A. *et al.* Isolation culture and functional characterization of human embryonic stem cells: current trends and challenges, *Stem Cells Int.* v. 2018. p. 1-8, 2018.
- KIKUCHI T. *et al.* Human iPS cell-derived dopaminergic neurons function in a primate Parkinson's disease model. *Nature.* v. 548, n. 7669, p. 592-596, 2017.
- LIMA, R. L. *et al.* Human dental follicle cells express embryonic, mesenchymal and neural stem cells markers. *Archives of oral biology.* v. 73, p. 121-128, 2017.
- LIU, A. Y.; LATRAY, L.; VAN DEN ENGH, G. Changes in cell surface molecules associated with in vitro culture of prostatic stromal cells. *The Prostate.* v. 44, n. 4, p. 303-312, 2000.
- LIN, J. D. *et al.* Periodontal ligament entheses and their adaptive role in the context of dentoalveolar joint function. *Dental Materials.* v. 33, n. 6, p. 650-666, 2017.
- LIU, L. *et al.* Stem cell regulatory gene expression in human adult dental pulp and periodontal ligament cells undergoing odontogenic/osteogenic differentiation. *Journal of Endodontics.* v. 35, n. 10, p. 1368-1376, 2009.

- LOSSDORFER, S.; GOTZ, W.; JAGER, A. Immunohistochemical localization of receptor activator of nuclear factor kappa B (RANK) and its ligand (RANKL) in human deciduous teeth. *Calcif Tissue Int.* v. 71, p. 45-52, 2002.
- LOURENÇO, S. Q. C.; CONSOLARO, A. Apoptosis in odontogenesis: dental lamina, Hertwig's epithelial sheath and reduced ameloblast. *J Dental Res.* v. 76, p. 120, 1997.
- MACHADO, C. V. *et al.* The dental pulp stem cell niche based on aldehyde dehydrogenase 1 expression. *Int Endod J.* v. 49, n. 8, p. 755-63, 2016.
- MAGUER-SATTA, V. *et al.* Concise review: neutral endopeptidase (CD10): a multifaceted environment actor in stem cells, physiological mechanisms, and cancer. *Stem Cells.* v. 29, n. 3, p. 389-396, 2011.
- MAHLA, R. S. Stem cells applications in regenerative medicine and disease therapeutics. *Int J Cell Biol.* v. 2016, p. 1-24, 2016.
- MARTIN, G. R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* v. 78, n. 12, p. 7634-7638, 1981.
- MATSUBARA, T. *et al.* Alveolar bone marrow as a cell source for regenerative medicine: differences between alveolar and iliac bone marrow stromal cells. *J Bone Miner Res.* v. 20, n. 3, p. 399-409, 2005.
- MCCULLOCH, E. A.; TILL, J. E. The radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells, determined by quantitative marrow transplantation into irradiated mice. *Radiat. Res.* v. 13, p. 115-125, 1960.
- MIURA, M. *et al.* SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci.* v. 100, n. 10, p. 5807-12, 2003.
- MIYAGAWA, S. *et al.* Phase I clinical trial of autologous stem cell-sheet transplantation therapy for treating cardiomyopathy. *Journal of the American Heart Association.* v. 6, n. 4, p. e003918, 2017.
- MORSCZECK, C. *et al.* Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol.* v. 24, n. 2, p. 155-65, 2005.
- NANCI, A. Ten Cate. Histologia oral. Desenvolvimento, estrutura e função. 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.
- NANCI, A. *Ten Cate's oral histology.* 9ª edição. Chicago: Elsevier, 2019.
- NASEF, A. *et al.* Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *The Libyan Journal of Medicine.* v. 2, n. 4, p. 190-201, 2007.

- NIEHAGE, C. *et al.* Cell surface proteome of dental pulp stem cells identified by label-free mass spectrometry. *PLoS One*. v. 11, n. 8, p. e0159824, 2016.
- NOZAKI, T.; OHURA, K. Gene expression profile of dental pulp cells during differentiation into an adipocyte lineage. *Journal of pharmacological sciences*. v. 115, n. 3, p. 354-363, 2011.
- OHSHIMA, H. Overview: developmental biology of Hertwig's epithelial root sheath (HERS) and tooth root formation. *J Oral Biosci*. v. 50, n. 3, p. 147-53, 2008.
- RAMÍREZ, B. E. *et al.* Stem cell therapy for corneal epithelium regeneration following good manufacturing and clinical procedures. *BioMed research international*. v. 2015, 2015.
- ROBERTS, H. W.; KIRKPATRICK, T. C.; BERGERON B. E. Thermal analysis and stability of commercially available endodontic obturation materials. *Clin Oral Investig*. v. 21, n. 8, p.2589-2602, 2017.
- RODAS-JUNCO, B. A. *et al.* Stem cells from dental pulp: what epidenetics can do with you tooth. *Front Physiol*.v. 8, n. 999, p. 1-20, 2017.
- RODRIGUES, L. V. *et al.* Apoptosis in pulp elimination during physiological root resorption in human primary teeth. *Braz Dent J*. v. 20, n. 3, p. 179-85, 2009.
- ROSA, V. *et al.* Pluripotency of stem cells from human exfoliated deciduous teeth for tissue engineering. *Stem Cells Int*. v. 2016, p. 1-7, 2016.
- ROSS, M. H.; PAWLINA, W. *Histology: a text and atlas*. 6ª edição. Baltimore: Wolters Kluwer, 2001.
- SAHARA, N. Cellular events at the onset of physiological root resorption in rabbit deciduous teeth. *Anat Rec*. v. 264, p. 387-396, 2001.
- SCADDEN, D. T. The stem-cell niche as an entity of action. *Nature*. 2006; 441:1075–9.
- SENBANJO, L. T., CHELLAIAH, M. A. CD44: a multifunctional cell surface adhesion receptor is a regulator of progression and metastasis of cancer cells. *Frontiers in cell and developmental biology*. v. 5, p. 18, 2017.
- SEO, B. *et al.* Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*. v. 364, n. 9429, p. 149-55, 2004.
- SHARPE, P.T. Dental mesenchymal stem cells. *Development*. v. 143, n. 13, p. 2273-2280, 2016.
- SHETTY, H. *et al.* Immunohistochemical characterization of stem cell and differentiation markers of the dental pulp of human natal teeth. *Futura Sci*. v. 4, n. 10, p. FSO342, 2018.
- SONOYAMA, W. *et al.* Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PLoS One*. v. 20, p. 1-e79, 2006.

- SPICER, A P.; TIEN, J. Y. L. Hyaluronan and morphogenesis. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*. v. 72, n. 1, p. 89-108, 2004.
- SRINATH, S. *et al.* CD 44 Expression in Dentigerous cyst, Radicular cyst and ameloblastoma, by immunohistochemical analysis. *IOSR Journal of Dental and Medical Sciences*. v. 13, p. 80-83, 2014.
- TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. v. 126,n. 4, p. 663-76, 2006.
- TAKASHIMA, Y. *et al.* Neuroepithelial cells supply an initial transient wave of MSC differentiation. *Cell*. v. 129, p. 1377–88, 2007.
- TELLES, C. *et al.* Isolation and characterization of dental pulp stem cells from permanente third molars. *Stomatos*. v. 22, n. 42, p. 1-10, 2016.
- THOMAS, E. D. *et al.* Bone marrow transplantation. *N Engl J Med*. v. 292, p. 832-43, 1975.
- THOMSON, J. A. *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. v. 282, p. 1145-47, 1998.
- TORII, D. *et al.* Cementogenic potential of multipotential mesenchymal stem cells purified from the human periodontal ligament. *Odontology*. v. 103, n. 1, p. 27-35, 2015.
- VAN HASSEL, H.J. Physiology of the human dental pulp. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. v. 32, n. 1, p. 126-34, 1971.
- VIÑA-ALMUNIA, J. *et al.* Influence of different types of pulp treatment during isolation in the obtention of human dental pulp stem cells. *Medicina oral, patologia oral y cirugía buccal*. v. 21, n. 3, p. e374, 2016.
- WANG, C. *et al.* Effect of tumor necrosis factor α on ability of SHED to promote osteoclastogenesis during physiological root resorption. *Biomed Pharmacother*. v. 114, p. 108803, 2019.
- WANG, P. *et al.* CRISPR/ Cas9-mediated heterozygous knockout of the autism gene CHD8 and characterization of its transcriptional networks in cerebral organoids derived from iPS cells. *Mol Autism*. v. 8, n. 11, p. 1-17, 2017.
- YAMAMOTO, T. *et al.* Histology of human cementum: its structure, function and development. *Jpn Dent Sci Rev*. v. 52, n. 3, p. 63-74, 2016.
- YASUI, T. *et al.* Isolation of dental pulp stem cells with high osteogenic potential. *Inflamm Regen*. v. 37, n. 39, p. 1-10, 2017.
- YEN, A. H.; SHARPE, P. T. Stem cells and tooth tissue engineering. *Cell Tissue Res*. v. 331, p. 359-72, 2008.

YILDIRIM, S. *et al.* The role of dental pulp cells in resorption of deciduous teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* v. 105, n. 1, p. 113-20, 2008.

YU, P. *et al.* Nanog induced intermediate state in regulating stem cell differentiation and reprogramming. *BMC systems biology.* v. 12, n. 1, p. 22, 2018.

YU, Q.; TOOLE, B. P. Common pattern of CD44 isoforms is expressed in morphogenetically active epithelia. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists.* v. 208, n. 1, p. 1-10, 1997.

ZHANG, Q. *et al.* Mesenchymal stem cells derived from human gingiva are capable of immunomodulatory functions and ameliorate inflammation-related tissue destruction in experimental colitis. *J Immunol.* v. 183, n. 12, p. 7787-98, 2009.

ZHU, Y. *et al.* Deciduous dental pulp stem cells are involved in osteoclastogenesis during physiologic root resorption. *J Cell Physiol.* v. 228, n. 1, p. 207-15, 2013.