

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA
ODONTOPEDIATRIA**

DISSERTAÇÃO

**Células-tronco da polpa de dentes decíduos
humanos -Isolamento relacionado
à rizólise dentária**

LISIANE BERNARDI

Porto Alegre, 2009.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA – ODONTOPEDIATRIA

Linha de Pesquisa

Biomateriais e Técnicas Terapêuticas em Odontologia

DISSERTAÇÃO

**Células-tronco da polpa de dentes decíduos humanos – Isolamento
relacionado à rizólise dentária**

LISIANE BERNARDI

Orientação:

Profa. Dra. Anna Christina Medeiros Fossati

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Nível Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como pré-requisito final para a obtenção do título de mestre em Clínica Odontológica - Odontopediatria

Porto Alegre, 2009.

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, **Verci** e **Ceanir**.
O incentivo e apoio de vocês é que tornou este projeto realidade.

Amo vocês e a nossa convivência diária!!!

Agradecimentos Especiais

À minha irmã **Giliane** e meu “irmão” **Andre**, agradeço por terem me mostrado a vida acadêmica e por terem “emprestado” o **João Vítor**... as risadas que ele me proporcionou durante a redação deste trabalho serão inesquecíveis!

Ao meu noivo, **Leonardo**... Todos que conviveram conosco neste período sabem o quanto você virou cientista, dedicando os seus finais de semana para me ajudar. Obrigada por estar sempre presente e compreender a minha ausência em alguns momentos...

À **família do Léo**... agradeço todo o carinho durante estes cinco anos que nos conhecemos. Às “**tias**”, agradeço por me aceitarem como sobrinha e pelos jantares divertidíssimos.

Agradecimentos Especiais

À professora **Patricia Pranke**, por ter me apresentado, lá em 2003, às células-tronco e ter, por meio de todo o seu empenho e trabalho, formado um grupo de pesquisa em células-tronco. Fruto disto é o Laboratório de Cultivo em Células-tronco, sem o qual esta pesquisa não teria se concretizado. Além de toda ciência, agradeço pelos conselhos, auxílios e pela extrema gentileza... Sempre!
Obrigada por aceitar a co-orientação desta dissertação

Ao professor **Fernando Borba de Araujo**, agradeço por permitir o meu convívio na Odontopediatria desde a época do Internato. As experiências vividas, certamente, colaboraram para o meu amadurecimento pessoal e profissional e solidificaram o meu amor pela vida acadêmica.

Palavras não são suficientes para expressar todo o carinho que tenho pela minha grande amiga e orientadora professora **Anna Fossati**... Desde os tempos de graduação, na Iniciação Científica, és inspiração e meu porto seguro dentro da Faculdade... Agradeço as risadas, os ensinamentos e as lágrimas compartilhadas... Muito obrigada!!!

Agradecimentos

À **Universidade Federal do Rio Grande do Sul** e ao **Programa de Pós-Graduação em Odontologia** desta Universidade pela excelência científica no ensino.

Aos colegas de mestrado em especial à **Adriana Jou** e **Fábio Vieira**, pelos momentos de descontração e de apoio e às minhas queridas colegas e amigas da Odontopediatria **Débora Dalpian**, **Giovana Dutra** e **Évelin Lucas**.

Meninas, muito obrigada pelos conselhos. Sempre me fizeram “ver luz” nas minhas “tragédias”.

À **Faculdade de Farmácia da UFRGS**, agradeço pelo espaço de trabalho, vinculado ao Laboratório de Hematologia e Células-tronco, representado pela **profa. Patricia Pranke**. A disponibilidade da sala de cultivo e dos reagentes possibilitaram a execução desta pesquisa. Aos queridos colegas de “Lab” **Alessandro, Daí, Dani, Felipe, Gean, Góia, Kerlin, Lauren, Rosane e Vanessa**, por me acolherem e muitas vezes aguentarem algumas manias...

Aos técnicos: **Carlos, Fernanda e Rosane...**

... quanta disponibilidade!

À **Lauren**, por toda a ajuda no desenvolvimento dos ensaios de crescimento e nas imunos. Agradeço também a amizade e pelo abstract!

Ao **Departamento de Bioquímica da UFRGS**, representado pela **profa. Carmem Gottfried**, a doutoranda **Marina Leite** e a técnica **Alessandra**.

Obrigada pelos primeiros ensinamentos em cultivo de células.

Agradecimentos

Ao **Laboratório de Imunogenética da UFRGS**, na figura do professor **José Arthur Bogo Chies** e do doutorando **Tiago Dalberto**. Obrigada por permitirem o uso do laboratório e por me ensinarem a técnica de RT-PCR. Ao **Tiago** pelo auxílio direto nas reações e por compartilhar a minha tristeza, quando nem tudo saía perfeito

Ao **Laboratório de Análises Clínicas do Grupo Hospitalar Conceição**, na pessoa da **Raquel Fernandes**. Querida, agradeço por todas as avaliações da Citometria, não importando o quão tarde da noite era...

Ao quinto andar...

Aos colegas do **Laboratório de Biologia dos Tecidos Bucais**, **Ana Rita**, **Henrique** e **Marcelo** e à nossa técnica **Alessandra**, sempre disponíveis em me auxiliar, seja na bancada ou em conversas amigas

Aos professores **Júlio Sanfelice**, **Esdras Escobar** e **Marcelo Lamers**, agradeço todas as palavras de incentivo durante meu estágio docente, à paciência ao responderem as minhas dúvidas e aos conselhos sinceros...

Ao entrar na porta da **Patologia** e da **Pós-graduação** sempre fui excessivamente bem tratada. Vocês sabem o carinho que tenho por todos vocês: **Isa**, **Cris**, **Adri**, **Cláudia** e **Leandro**.

À **Isabel Lauxen**... Isa! Vale dizer mais uma vez: conhecer a pessoa maravilhosa que você é foi, sem dúvida, uma das melhores realizações do mestrado. Admiro-te muito! Obrigada por tudo!

Agradecimentos

À Odontopediatria...

Aos professores, **Lizandra Ferrari**,
Ana Eliza Bressani, **Juliana Barata**, **Jorge Michel**,
Angelo Manfro, **Adriano Boza**, **Viviane Araujo**,
obrigada por todos os ensinamentos.

À minha eterna professora **Adriela Mariath**, gostaria de manifestar a minha enorme admiração. Adri, tu és meu exemplo de perfeição

À oportunidade de participar do **Curso de Urgência em Odontopediatria**.
Foi a realização de um sonho... Muito Obrigada!!!

As meninas do curso de **especialização 2007-2009**, sempre dispostas a me ajudar e a **Paulinha** e **Vica** pela amizade...tenho saudade!

Aos amigos que fiz na Odontopediatria **Letícia Mattuella**, **Letícia Bento**,
Renata Franzon, **Márcia Gomes**, **Sheila Sallé**, **Luciano Casagrande**,
Camila Magalhães, **Deise Damin** e **Gerson Acasigua**.

Às funcionárias **Ana Cláudia**, **Julcelaine** e **Gisa**. Obrigada por sempre ajudarem e pelas conversas, sejam elas com risadas ou lágrimas

Agradecimentos

A **CAPES**, pela bolsa de estudos durante o mestrado

À professora **Simone Luisi** por me transmitir todos os seus conhecimentos acerca das “células pulpares”, seja na bancada, me ensinando os meios e as culturas de tecido pulpar, bem como na avaliação desta pesquisa ainda quando projeto.

Ao professor **Manoel Sant’Ana Filho**, pelas considerações na defesa do projeto e por nos fazer pensar na investigação do tecido pulpar na rizólise.

Além da parte científica, agradeço pela pessoa que és e pelo incentivo.

Aos professores, **Mabel Cordeiro**, **Marcelo Lamers**, **Manoel Sant’Ana Filho** e **Simone Luisi**, por aceitarem participar da defesa deste trabalho.

E aos demais que contribuíram de alguma maneira com este trabalho, obrigada!

Sumário

Lista de Abreviaturas	11
Resumo	13
Abstract	14
1. Antecedentes e Justificativas	15
2. Objetivos	29
3. Artigo	30
4. Considerações Finais	54
5. Perspectivas	57
Referências Bibliográficas	58
Anexo	65
Apêndice	67

Lista de Abreviaturas

%	por cento
µg/mL	micrograma por mililitro
µg/ µmol	Micrograma por micromol
µL	Microlitro
µM	Micromolar
<	Menor
>	Maior
≥	maior ou igual
≤	Menor ou igual
cm ²	centímetro quadrado
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CSF	fator de célula-tronco
CTM	Célula-tronco mesenquimal
DMEM	meio de Eagle modificado por Dulbecco
DP	desvio padrão
DPSC	células-tronco humanas de polpa dental
DSPP	sialofosfoproteína de dentina
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
Fig	Figura
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
G	força que exerce a gravidade
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida
H	Hora
HEPES	n-2 hidroxietil piperazine- n'- 2 ácido sulfônico etano
hNDPs-SCs	células-tronco derivadas de polpa de dente natal humano
IDPSC	células-tronco humana imaturas de polpa de dente decíduos
iPS	células-tronco pluripotentes induzidas

Lista de Abreviaturas

ITS	Suplemento para meio de cultura contendo insulina e transferrina livre de ferro
M	Molar
MEC	matriz extracelular
mg/mL	miligrama por mililitro
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mmol/L	milimol por litro
MW	Peso molecular (do inglês <i>molecular weight</i>)
N	número de amostra
ng	Nanograma
nM	Nanomolar
°C	graus Celsius
OPG	Osteoprotegerina
PE	Ficoeritrina
RANKL	ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa β
RNA	ácido ribonucléico
RT-PCR	reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa
S	Segundo
SFB	soro fetal bovino
SHED	célula-tronco humana de polpa de dente decíduo exfoliado
TGF β 1	fator de crescimento transformador beta 1
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
7AAD	7-Amino Actinomicina D

Abstract

O objetivo deste estudo foi de tentar isolar e cultivar células da polpa de dentes decíduos humanos hígidos com diferentes graus de rizólise e avaliá-las após a expansão *in vitro* para parâmetros apresentados por células-tronco. Para tanto, o tecido pulpar foi obtido a partir de 30 dentes de crianças de 6 a 12 anos. A exodontia dos dentes foi indicada pelo cirurgião-dentista responsável pelo tratamento da criança. Os responsáveis pelos pacientes assinaram um termo de doação de material biológico aprovado pelo comitê de ética da UFRGS. Do total de dentes, 21 estavam em processo avançado de rizólise (grupo I), sendo que 17 possuíam raiz totalmente reabsorvida e 4 apresentavam cerca de de raiz residual. Os 9 dentes restantes não apresentavam reabsorção visível (grupo II). Todos os dentes extraídos foram imersos em meio de cultura para o transporte ao laboratório. Na capela de fluxo laminar, o tecido pulpar foi removido e incubado com colagenase tipo I e submetido a dissociação mecânica. A suspensão obtida foi semeada em placa de 12 poços e o meio de cultura trocado após 24 horas e após a cada 4 dias até a confluência de 90% ser atingida, quando eram realizadas as passagens. Na quinta e décima passagens, as células foram avaliadas pela citometria de fluxo quanto a seu fenótipo para CD29, CD34, CD44, CD45, CD90, CD117, CD133, CD146, CD184, STRO-1 e HLA-DR e para determinar a presença/ausência da expressão gênica de OCT4, por meio de RT-PCR. Nas mesmas passagens, as células foram submetidas a avaliação do seu crescimento *in vitro* e foram induzidas à diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica. O isolamento das células foi considerado com sucesso em 25 amostras nas quais células aderidas foram verificadas após 24h. Apenas 17 destas atingiram confluência de 90%. Não foi possível estabelecer cultura do grupo II (n=9). O estabelecimento das culturas e a capacidade de proliferação foram independentes da quantidade de tecido pulpar remanescente coletado. As células nas quinta e décima passagens foram positivas para CD29, CD44 e CD90 (>95%) e para a expressão gênica de OCT-4. Positividade moderada foi vista para CD117 e CD133 e expressão inferior a 3% para CD34, CD45, HLA-DR, CD184 e STRO-1 em todas as análises. Foi pequena também, a marcação de CD146. O CD146 está relacionado com as células-tronco localizadas nos pericitos, sendo descrito como possível nicho das células-tronco pulpares. Todas as culturas foram capazes de diferenciação nas 3 linhagens celulares citadas. Portanto, as células isoladas eram células-tronco, pois foram aderentes ao plástico, positivas para marcadores característicos de células-tronco mesenquimais e pluripotentes. Considerando os baixos níveis de expressão de CD146, nós podemos sugerir que o nicho perivascular não é o único provedor das células-tronco pulpares. A facilidade de obtenção das células parece estar ligada ao processo de rizólise, visto que as células do tecido pulpar do grupo I apresentaram-se capazes de proliferação *in vitro*, enquanto que no grupo II esta não foi suficiente para permitir o estabelecimento das culturas.

Palavras-chave: célula-tronco – dente decíduo – rizólise – polpa de dente decíduo

The aim of this study was to isolate and grow cells from the pulp of human sound deciduous teeth with different levels of resorption, and evaluate stem cell parameters after growing them *in vitro*. Pulp tissue was removed from 30 different patients, aged from 6 to 12. A free informed term of consent was signed by the patient's next of kin, approved by UFRGS's Ethical Committee. From all the teeth, 21 were in advanced levels of resorption (group I): 17 had completely reabsorbed roots and 4 had $\frac{1}{3}$ of residual roots. The 9 teeth left did not show any visible re-absorption (group II). The teeth were immersed in culture medium to be transported to the lab. In aseptic conditions, pulp tissue was removed, incubated with type I collagenase and mechanically dissociated. The suspension was seeded onto 12 well plates and the medium was changed every 4 days until the culture reached 90% confluence, when a passage was performed. The phenotype of the cells was analyzed on fifth and tenth passages, by flow cytometry for the following markers: CD29, CD34, CD44, CD45, CD90, CD117, CD133, CD146, CD184, STRO-1 and HLA-DR; and RT-PCR for OCT-4. On the same passages, cells were differentiated into adipocytes, osteoblasts and chondrocytes. Cell isolation was successful in 25 samples, where adherent cells were observed after 24h. Only 17 of these samples reached 90% confluence. It was not possible to establish cell culture from group II teeth (n=9). Cell growth and ability to proliferate *in vitro* were not dependent on the amount of pulp tissue that was collected. Cells on both fifth and tenth passages were positive for CD29, CD44 and CD90 (>95%) and also for the expression of OCT-4. Moderate labelling was observed for CD117 and CD133, while an expression lower than 3% for CD34, CD45, HLA-DR, CD 184 and STRO-1 was detected. Low amounts of CD146 were found in all analysis. CD146 is related to pericytes stem cells and therefore can be pulp stem cells niche. All cultures were able differentiate into all 3 cell types. According to these findings, the isolated pulp cells can be considered stem cells: they were adherent to plastic, positive for stem cell related markers and pluripotent. Considering the cells expressed low levels of CD146, we can infer that the perivascular niche isn't the only source of pulpar stem cells. The easiness to obtain cells seems to be related to the root resorption process, because the cells from group I were able to proliferate *in vitro*, while group II cells were not.

Key words: stem cells, deciduous teeth, resorption, deciduous tooth pulp.

1. Antecedentes e Justificativas

O avanço das pesquisas em biologia molecular tem trazido significantes mudanças no pensamento a respeito da regeneração de órgãos. A expectativa atual é de que com o uso da Engenharia de Tecidos seja possível regenerar tecidos injuriados por doenças como câncer, diabetes, doença periodontal e até mesmo

aqueles tecidos ausentes devido a problemas congênitos (MODINO; SHARPE, 2005; THESLEFF; TUMMERS, 2003). O foco principal para o estabelecimento dessa técnica é a aplicação do uso das células-tronco aliadas ao conhecimento da sua ligação com os agentes envolvidos no processo da formação dos órgãos, tais como genes e fatores de crescimento e a associação deste conjunto a matrizes biodegradáveis e biocompatíveis, os *scaffolds*.

Células-tronco

As células-tronco são definidas como aquelas células que têm a habilidade de perpetuar a si mesmas indefinidamente por meio de auto-renovação e gerar células maduras de um tecido em particular, quando convenientemente estimuladas, por meio de diferenciação, potencialidade esta preservada ao longo da vida adulta. São classificadas quanto a sua origem em embrionárias ou adultas. As células-tronco embrionárias são aquelas extraídas da massa celular interna do blastocisto e são capazes de dar origem aos 3 folhetos germinativos: endoderma, mesoderma e ectoderma. As células-tronco adultas são as que residem em todos os tecidos já formados, onde mantêm a homeostase e respondem aos estímulos nocivos (WALKER; PATEL; STAPPENBECK, 2009; FORBES *et al.*, 2002; HALL; WATT, 1999). As células-tronco adultas têm sido isoladas a partir de células de vários tecidos, sendo mais relatadas na literatura as provenientes da medula óssea, cordão umbilical e aquelas do tecido adiposo. O microambiente específico em que as células-tronco adultas residem, onde controlam a sua auto-renovação e produção de progenitores, é definido como nicho (WALKER; PATEL; STAPPENBECK, 2009; SPRADLING; DRUMMOND-BARBOSA; KAI, 2001). A localização destes nichos ainda não está bem determinada na literatura. A dúvida é se eles se encontram na matriz extracelular dos próprios tecidos ou se estão inseridos na região perivascular destes, restrito aos pericitos (SHI; GRONTHOS, 2003; MEIRELLES; CHAGASTELLES; NARDI, 2006).

Caracterização das Células-tronco Mesenquimais (CTMs)

Normalmente, as células possuem receptores e moléculas de superfície que as ligam entre si, possibilitando a sua comunicação e a execução das suas funções no organismo. Essas moléculas de superfície celular são usadas como marcadores celulares para identificação, por exemplo, de células-tronco (NIH, 2001). As células-tronco mesenquimais expressam um variado número de marcadores de superfície, sendo que não existe um marcador específico para defini-las. Nesse sentido, parâmetros têm sido estabelecidos para se poder considerar uma população de células como tronco, não dependendo apenas de um único marcador. Segundo Dominici e colaboradores (2006), é necessário que as células preencham pelo menos os 3 critérios seguintes: (1) aderência ao plástico; (2) possuir capacidade de diferenciação em osteoblastos, adipócitos e condroblastos, quando mantidas em cultura e submetidas aos específicos meios de diferenciação e, por fim; (3) apresentar expressão superior ou igual a 95% aos seguintes antígenos de superfície, considerados marcadores de CTMs, CD105, CD73 E CD90 e expressão inferior ou igual a 2% para CD34, CD45, HLA-DR, CD14, CD19, marcadores para progenitores hematopoéticos.

Nardi e Meirelles (2006) em sua revisão destacam os marcadores de CTMs CD29, CD44 e STRO-1. Completando, há na literatura a descrição de outros marcadores, tais como o CD117, CD133, CD146 e CD184 (PREFFER; DOMBKOWSKI, 2009; FRIEDRICH *et al.*, 2006; HANDGRETINGER *et al.*, 2003). Os marcadores OCT-4, Nanog e SOX2, entre outros que primeiramente foram identificados em células-tronco embrionárias, também têm sido alvo de estudos para caracterizar as CTMs (KERKIS *et al.*, 2006; HUANG *et al.*, 2008). Esses 3 marcadores juntos são capazes de manter a estabilidade da pluripotência, no entanto, a perda exclusiva de OCT-4 resulta em inapropriada diferenciação das células da massa celular interna em trofectoderma *in vivo* e das células-tronco embrionárias *in vitro* (JOHNSON; RATHJEN; RATHJEN, 2006).

A caracterização imunofenotípica das CTMs pode ser realizada pelas técnicas de Imunoistoquímica, RT-PCR, Western Blot e Citometria de Fluxo (KARAÖZ *et al.*, 2009; PATEL *et al.*, 2009). Geralmente é analisada por meio da citometria de fluxo, já que este recurso oferece a possibilidade de examinar rapidamente milhares de células marcadas com anticorpos monoclonais conjugados a marcadores

fluorescentes com resultados sensíveis e precisos. Neste processo, cada célula é individualmente avaliada para uma variedade de características, tais como tamanho e antigenicidade (PREFFER; DOMBKOWSKI, 2009).

Conforme definido por Dominici e colaboradores (2006), outro critério seria que as CTMs deveriam diferenciar-se pelo menos nas três linhagens anteriormente citadas. Protocolos variados de diferenciação são encontrados na literatura para atingir este objetivo (NARDI; MEIRELLES, 2006). Por outro lado, classicamente, o método para confirmar esta etapa de caracterização é a partir da coloração das células com corantes específicos. Ou seja, coloração com Alizarin Red ou Von Kossa, para a diferenciação osteogênica; coloração com Oil Red ou Sudan Black, para a adipogênica e coloração com Alcian Blue, para a diferenciação condrogênica (CHAMBERLAIN *et al.*, 2007; DOMINICI *et al.*, 2006). Além do descrito acima, a diferenciação pode ser confirmada pela expressão de proteínas específicas para estes tipos celulares, em geral com o uso de imunistoquímica ou por meio de RT-PCR ou ainda, para a diferenciação osteogênica pelos níveis de atividade da fosfatase alcalina (YANG *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2006; DOMINICI *et al.*, 2006).

Células-tronco e Odontologia

A primeira investigação a cerca da existência de um nicho de células-tronco envolvendo a estrutura dental humana foi descrita em 2000, por Gronthos e colaboradores. Em seu estudo, relataram uma população de células-tronco obtida a partir das células pulpares humanas provenientes de dentes permanentes retidos, as quais nomearam de DPSCs (*Dental Pulp Stem Cells*) (GRONTHOS *et al.*, 2000). Essas células demonstraram possuir maior potencial de proliferação e maior capacidade clonogênica quando comparadas àquelas encontradas nas células da medula óssea. Posteriormente, Miura e colaboradores, em 2003, isolaram uma população de células-tronco a partir do tecido pulpar de dentes incisivos decíduos humanos exfoliados de crianças de 7 a 8 anos de idade, e procederam a sua cultura *in vitro* seguindo o protocolo estabelecido para cultura de polpa de dentes permanentes (GRONTHOS *et al.*, 2000). Nomearam estas células de SHEDs (*Stem Cells from human exfoliated deciduous teeth*). Em sua pesquisa, atribuíram maior

potencialidade significativa de proliferação e clonogenicidade às SHEDs, quando comparadas às DPSCs e às células-tronco da medula óssea (MIURA *et al.*, 2003).

Estudos posteriores foram realizados para melhor caracterizar tanto as células-tronco pulpares provenientes de dentes permanentes quanto de dentes decíduos (PIVORIÜNAS *et al.*, 2009; KOYAMA *et al.*, 2009; SUCHANEK *et al.*, 2008; PERRY *et al.*, 2008; KERKIS *et al.*, 2006; LAINO *et al.* 2005) e de outras duas fontes distintas de células pulpares: uma DPSC proveniente de dente supranumerário retido e a outra população pulpar proveniente de dente natal, sendo descrita como hNDP – *Human Natal Dental Pulp* - (KARAÖZ *et al.*, 2009; HUANG *et al.*, 2008). Kerkis e equipe (2006), em sua pesquisa, caracterizaram células-tronco provenientes do tecido pulpar de dentes decíduos exfoliados naturalmente. Denominaram as células de seu estudo de IDPSCs (*Immature Dental Pulp Stem Cells*), já que estas foram isoladas de forma diferente das SHEDs e apresentaram características distintas das mesmas. Neste estudo, foram utilizados 10 dentes decíduos em estágio normal de exfoliação de crianças de 5 a 7 anos de idade. A polpa dentária depois de removida com um extirpa nervo, foi cultivada sem sofrer digestão, a partir de fragmentos do tecido e não em células separadas, como fez Miura e grupo (2003) por meio do uso da dispase e colagenase.

Ainda, no contexto da Odontologia, células-tronco foram isoladas em humanos a partir das células do ligamento periodontal (COURA *et al.*, 2008; SEO *et al.*, 2004), do folículo dentário (MORSECK *et al.*, 2005) e da papila apical de terceiros molares (ABE *et al.*, 2008, HUANG *et al.*, 2008; TETÈ *et al.*, 2008). Da mesma forma, estas células têm sido identificadas em roedores, nas células da alça cervical e polpa de dentes incisivos e molares (PATEL *et al.*, 2009; YANG *et al.*, 2007; YU *et al.*, 2006; THESLEFF;TUMMERS, 2003; HARADA *et al.*, 2002); em bovinos, nas células do folículo dental e da matriz de cimento (HANDA *et al.*, 2002) e nas células do ligamento periodontal de ovinos (GRONTHOS *et al.*, 2006). Células-tronco do tecido pulpar dental também foram isoladas de animais como macacos (HUANG *et al.*, 2008), coelhos (EL-BACKLY *et al.*, 2008) e suínos (AGATA *et al.*, 2008; ZENGH *et al.*, 2009).

Entre os nichos dentais e paradentais, as células-tronco isoladas da polpa dentária humana têm sido o principal alvo das pesquisas com estas células na odontologia. Os estudos relacionados a tal estrutura buscam investigar a

potencialidade das suas células de atuar na bioengenharia de tecidos, avaliando para isso, as suas habilidades de diferenciação em células de origens distintas, a sua capacidade de promover a formação de tecidos dentários e ósseos (CORDEIRO *et al.*, 2008; WEI *et al.*, 2007; LAINO *et al.*, 2006; BATOULI *et al.*, 2003; GRONTHOS *et al.*, 2002), a sua aplicabilidade no restabelecimento de funções fisiológicas lesadas por doenças degenerativas (DE MENDONÇA *et al.*, 2008; KERKIS *et al.*, 2008) e a possibilidade de sua criopreservação, para armazenamento em bancos de células-tronco, para utilização futura (PERRY *et al.*, 2008).

Células-tronco e Polpa Dentária Humana

Polpa Dentária de Dente Permanente (DPSCs)

As DPSCs, descritas pioneiramente por Gronthos e colaboradores (2000), demonstraram possuir taxa de proliferação e potencial de formar colônias maior do que os valores referentes às já consagradas célula-tronco da medula óssea. As células foram isoladas a partir da polpa de terceiros molares retidos. O tecido pulpar sofreu digestão enzimática com 4mg/ml de dispase e 3mg/ml de collagenase tipo I. Suspensões de células foram obtidas e semeadas em placas de seis poços e o cultivo foi mantido com alfa - MEM, suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB), ácido ascórbico, glutamina e antibióticos. Imunofenotipicamente, as células foram avaliadas por meio da técnica de imunistoquímica, sendo negativas para CD14, CD34 e CD45 e positivas para STRO-1, CD146 e alguns marcadores de osso e fibroblastos. A positividade foi variável nos subgrupos de células avaliados, demonstrando que a população descoberta era heterogênea. Morfologia e tamanhos celulares diferentes foram visualmente observados em células de uma mesma colônia (GRONTHOS *et al.*, 2000; SHI; GRONTHOS, 2003). Neste primeiro estudo as células se diferenciaram *in vitro* para uma linhagem osteogênica e falharam em formar adipócitos. Em estudo posterior, este mesmo grupo, em 2002, demonstrou a diferenciação adipogênica e neuronal *in vitro* e a formação de uma estrutura semelhante ao complexo dentino-pulpar, quando as DPSCs foram implantadas em camundongos imunossuprimidos e o tecido avaliado em 2, 4, 8 e 16 semanas.

Laino e colaboradores (2005) observaram por meio de citometria de fluxo, o tamanho e a granulosidade das DPSCs e notaram a presença de duas populações distintas para estas características. Avaliando individualmente o fenótipo destas populações, demonstraram que uma população era levemente positiva para CD34 (20,8%) e CD117 (18,6%) e a outra mostrou uma expressão inferior a 2% para estes marcadores. A população CD34⁺/CD117⁺ foi capaz de se diferenciar em adipócitos e osteoblastos, conseguindo, *in vitro*, formar uma estrutura semelhante a um tecido ósseo fibroso. Dentro desta população, 64,76% das células foram positivas para STRO-1 e na população total, este valor foi de 9,98% (PAPACCIO *et al.*, 2006; LAINO *et al.*, 2006).

Estudando aspectos metodológicos, Huang e equipe (2006) preocuparam-se em identificar se existiam diferenças entre as DPSCs isoladas com o auxílio de digestão enzimática ou quando o cultivo era feito por meio de *explant*¹. A caracterização molecular, vista por RT-PCR, demonstrou que as culturas foram similares para DSPP (dentinossialoproteína, uma proteína associada ao tecido dentinário) na primeira passagem, no entanto, na quinta passagem houve redução dos índices na cultura de *explant* pulpar e aumento na de digestão enzimática. Alteração entre as passagens e entre as diferentes culturas também foi observada para os níveis de colágeno I e de colágeno III, sendo que ambos decresceram na enzimática e aumentaram no *explant*. Preocupando-se com a etapa seguinte ao isolamento das células, ou seja, com a manutenção das células em cultura, Suchanek e grupo (2009) isolaram DPSCs de 16 terceiros molares humanos retidos e as cultivaram em meios de cultura com diferentes concentrações de soro fetal bovino. O objetivo de sua pesquisa foi estabelecer se seria possível utilizar concentrações menores de soro fetal bovino no meio de cultivo e manter as células com potencial proliferativo. Além disto, avaliações do imunofenótipo de cada população foram feitas na quinta passagem com um citômetro. Os autores conseguiram obter culturas com as 3 variações de meio (10% de SFB, 2% de SFB e 2% de SFB suplementado com ITS – *insulina/transferrina*). As análises realizadas demonstraram que o fenótipo variou conforme o meio de cultivo e que os valores para o meio com 10% de SFB foram de alta positividade para CD29 (98,8%), CD44 (99,6%), CD90 (99,1%), HLA I (99,8%) e baixa positividade para CD117 (37,8%).

¹ *Explant*: cultivo de fragmentos de um tecido, sem dissociação mecânica ou enzimática (FRESHNEY R. IAN. Culture of Animal Cells)

Marcação inferior a 10% foi encontrada para CD34 (2,3%), CD45 (0,3%), CD71 (6,9%) e HLA II (0,1%).

As condições de disponibilidade de oxigênio durante o cultivo de DPSCs e sua relação com as expressões de STRO-1 e CD133 foram avaliadas por citometria de fluxo por Sakdee e equipe (2009). DPSCs na sexta ou sétima passagens foram cultivadas por 2 semanas em condições de baixa concentração de oxigênio (hipóxia) e em níveis normais de oxigênio (normóxia). Em seus resultados a presença de STRO-1 foi maior em situações de hipóxia (10,32%) em relação ao cultivo em condições de normalidade (1,18%). Já a expressão de CD133 apresentou maiores índices de positividade para as situações de normóxia (6,09%) do que em hipóxia (0,8%).

A expressão, por meio de RT-PCR, para marcadores de células-tronco embrionárias, foi avaliada para DPSCs obtidas a partir de dente supranumerário retido (HUANG *et al.*, 2008). As células da terceira passagem apresentaram positividade para OCT-4, Nanog e Rex-1 e sofreram diferenciação osteogênica e adipogênica. Koyama e colaboradores (2009) e D'aquino e equipe (2007), complementam as avaliações anteriores, demonstrando que as DPSCs foram capazes de diferenciar-se em linhagem condrogênica, miogênica e neuronal além das osteoblástica e adipogênica.

As DPSCs também têm sido avaliadas quanto a parâmetros de criopreservação, visando o estabelecimento de bancos de células-tronco. Neste sentido, pesquisas têm sido feitas buscando definir quanto tempo pode decorrer entre a extração do dente e o isolamento das células, se as características das células são alteradas pelo congelamento e tipo de congelamento ou ainda, investigando a possibilidade de congelar um dente inteiro (WOODS *et al.*, 2009; PERRY *et al.*, 2008). Os resultados indicam pouca alteração quanto ao fenótipo e a viabilidade e demonstram a manutenção do potencial de diferenciação.

Polpa Dentária de Dente Decíduo (SHEDs e IDPSCs)

Miura e seu grupo de pesquisa (2003) isolaram uma distinta população de células do tecido pulpar remanescente de dentes decíduos exfoliados, a qual eles chamaram de SHEDs (*Stem Cells from human exfoliated deciduous teeth*). As células

foram isoladas e mantidas conforme o protocolo utilizado para as DPSCs (GRONTHOS *et al.*, 2000). Como já mencionado, encontraram índices de proliferação maiores dos que apresentados pelas DPSCs e células da medula óssea. Por meio de imunistoquímica, as SHEDs foram positivas para CD146 e STRO-1. Análise de STRO-1 também foi feita por citometria de fluxo (9,56%). As SHEDs demonstraram potencial de diferenciação adipogênica, neurogênica e osteogênica *in vitro*. A indução de mineralização aumentou os níveis de DSPP, indicando a diferenciação *in vitro*, das SHEDs em odontoblastos. Este fato foi verificado também *in vivo*, quando as SHEDs foram transplantadas em camundongos imunossuprimidos associadas ao pó de hidroxiapatita/tricálcio fosfato. Estas células diferenciadas foram capazes de formar uma estrutura semelhante à dentina, não sendo, no entanto, capazes de formar um complexo dentino-pulpar. SHEDs induzidas em meio neurogênico por 7 dias foram transplantadas em suspensão no cérebro de camundongo imunossuprimido. Após 10 dias, as SHEDs ainda sobreviviam no animal, expressando marcadores neuronais.

Após 3 anos da publicação dos achados de Miura e grupo de pesquisa (2003), as IDPSCs foram relatadas na literatura. Kerkis e equipe (2006) extraíram o tecido pulpar com o auxílio de um extirpa nervo. A polpa foi então transferida para uma placa de Petri sem sofrer digestão, com o mínimo de dano. O fragmento do tecido foi mantido assim por duas semanas, quando foi transferido para uma garrafa de cultura de 25cm². O meio em que as células foram mantidas foi composto por DMEM/Ham's F12, suplementado com 15% de SFB, glutamina, aminoácidos essenciais e antibióticos. As IDPSCs foram descritas até atingirem a 25^a passagem, quando apresentaram cariótipo normal e padrões de crescimento e aspectos morfológicos inalterados. Em seu estudo, utilizaram marcadores de células-tronco embrionárias diferentes daqueles utilizados por Miura e equipe (2003). Como resultado, a expressão de OCT-4 foi persistente ainda na 25^a passagem e outros marcadores embrionários estavam expressos ao longo do cultivo. A citometria de fluxo demonstrou positividade para os marcadores mesenquimais e o potencial de diferenciação foi evidente para um destino condrogênico, osteogênico, neuronal e miogênico *in vitro*. Em suas conclusões, os autores, sugeriram que as células obtidas com a metodologia por eles usada, podem não ser as mesmas de Miura e colaboradores (2003), posicionando-se quanto à necessidade de mais

investigações. No entanto, para Huang e colaboradores (2009), as células que o grupo de Kerkis isolou também são SHEDs e que pela análise das IDPSCs, confirmaram o potencial de diferenciação já descrito por Miura e equipe, complementando a caracterização por meio da avaliação dos marcadores embrionários.

Estudos recentes têm sido realizados com o objetivo de melhor caracterizar as células-tronco pulpares decíduas no sentido de determinar seu perfil proteômico (NAKAMURA *et al.*, 2009; PIVORIÜNAS *et al.*, 2009). Pivoriünas e colaboradores (2009), ao mesmo tempo em que buscavam definir este painel de expressão gênica, caracterizaram subpopulações (clones) das SHEDs, quanto ao perfil imunofenotípico. Para isso, SHEDs na segunda passagem foram cultivadas em baixa densidade para o estabelecimento de clones (Clones avaliados: C2 e F5). Nesta passagem, as SHEDs e dois clones foram selecionados para a análise no citômetro. As 3 culturas celulares apresentaram valores percentuais baixos para expressão de CD14, CD34, CD45 ($\leq 7\%$) e altos para CD73, CD90 e CD105 ($>96\%$). As marcações foram variáveis para CD146 entre as SHEDs (66,3%), o Clone C2 (27,1%) e o Clone F5 (37,8%). Os autores acreditam que esta variação confirma que as SHEDs apresentam uma população heterogênea dentro da cultura, como já descrito por Miura e equipe (2003). Apesar das SHEDs e dos clones terem satisfeito os critérios de positividade para os marcadores de CTMs, elas não foram capazes de se diferenciarem em um destino adipogênico dentro de três semanas. A diferenciação osteogênica foi confirmada após duas semanas de indução.

Além dos resultados já citados, SHEDs e IDPSCs foram utilizadas, com bons resultados, em estudos que investigaram a formação *in vivo* de tecidos ósseos e dentários, assim como naqueles estudos que avaliaram o potencial destas células em auxiliarem o reparo de lesões de córnea e o benefício se injetadas em animais com distrofia muscular. (MONTEIRO *et al.*, 2009; CORDEIRO *et al.*, 2008; SEO *et al.*, 2008; KERKIS *et al.*, 2008; COSTA *et al.*, 2008). Recentemente, as SHEDs, assim como as DPSCs, têm sido indicadas como uma possível fonte para a obtenção de células-tronco pluripotentes induzidas (IPs) (YAN *et al.*, 2009).

As células-tronco extraídas do tecido pulpar de dentes natais humanos (aqueles dentes que estão presentes ao nascimento da criança) foram recentemente relatadas na literatura (KARAOZ *et al.*, 2009). Estas células, denominadas de

hNDPs-SCs (*Stem Cells derived from human natal dental pulp*), diferenciaram-se em linhagem adipogênica, osteogênica, miogênica, condrogênica e neurogênica. Pela citometria de fluxo, apresentaram positividade para os marcadores CD13 (15,18%), CD44 (97,97%), CD90 (99,2%), CD146 (99,47%) e CD166 (97,57%). As células expressaram insignificante imunopositividade (< 1,03%) para CD3, CD8, CD14, CD15, CD19, CD33, CD34, CD45, CD117 e HLA-DR. Marcadores embrionários foram verificados com RT-PCR.

A grande vantagem apontada ao uso das células pulpares refere-se a sua obtenção, em especial a dos dentes decíduos, já que os dentes utilizados para tal iriam exfoliar naturalmente, não sendo necessário um processo invasivo como a extração das células da medula óssea ou remoção cirúrgica de um dente permanente. Um banco de células-tronco obtidas a partir destes dentes vem se tornando realidade (ARORA; ARORA; MUNSHI, 2009).

Além dos dentes exfoliados, talvez, os dentes decíduos que ainda não iniciaram o seu processo de rizólise também possam ser fonte de células-tronco. Muitas vezes, o planejamento ortodôntico na dentição mista envolve tratamentos com extrações seriadas, incluindo a exodontia dos dentes decíduos que ainda não sofreram reabsorção radicular. Mudanças espontâneas na dentição após esta conduta podem ser úteis nos tratamentos de correção ou redução de apinhamentos dentários na maioria dos pacientes com Classe I, ou seja, com oclusão normal (YOSHIHARA *et al.*, 2000).

A polpa dos dentes decíduos, no entanto, apresenta alterações com o decorrer da rizólise. Com isso, o tecido pulpar de um dente exfoliado naturalmente não é exatamente aquele em estágio de reabsorção incipiente, quando realizadas observações histológicas e imunoistoquímicas (RÖLLING, 1981; ARAUJO, 1982; SASAKI *et al.*, 1990; SAHARA *et al.*, 1992, 1993; ERONAT; ERONAT; AKTUG, 2002; ANGELOVA *et al.*, 2004; BOLAN; ROCHA, 2007; MONTEIRO *et al.*, 2009). Estas diferenças estruturais e moleculares ocorridas no processo, talvez modifiquem o comportamento das células da polpa *in vitro*, conforme o grau de reabsorção sofrido pelos tecidos dentários.

Rizólise Fisiológica do Dente Decíduo e os eventos na Polpa Dentária

Os dentes decíduos começam a erupcionar, no ser humano, em média aos 6 meses de idade pós-natal, sendo que a dentição decídua estará completa, em oclusão, aos 3 anos de idade. Após os 6 anos de idade, a dentição já é mista, com a presença dos primeiros dentes permanentes, mas ainda com a manutenção de todos os elementos dentários decíduos. No entanto, com o progresso do desenvolvimento facial, todos os dentes decíduos serão substituídos pelos seus sucessores permanentes (BERKOVITZ *et al.*, 2004; TOLEDO; LEAL, 2005).

As polpas dos dentes decíduos recém formados e a dos permanentes são similares em relação à estrutura histológica básica. Uma diferença entre estes dentes é que as raízes dos decíduos normalmente sofrem reabsorção, para que possa ocorrer a transição da dentição primária para a permanente. Este fenômeno, geneticamente programado, inicia-se a partir de um ambiente que leva à apoptose dos cementoblastos e que na seqüência, promove a osteoclastogênese (LOURENÇO, 1999). O processo é dinâmico, acompanhado por alterações graduais da polpa, principalmente em seus estágios mais avançados e por eventos intermitentes de reabsorção radicular do dente decíduo e neoformação dos tecidos alveolares adjacentes (CONSOLARO, 2007; FOSSATI; RUSCHEL, 2005).

Ao mesmo tempo em que ocorre a reabsorção dos tecidos mineralizados, alterações são evidentes no tecido pulpar, sendo que quando o dente decíduo apresenta sua raiz totalmente reabsorvida, o tecido pulpar não mais apresenta os mesmos componentes e proporção de estruturas, demonstrando, histologicamente, alteração vascular e celular, podendo ocorrer ausência dos odontoblastos e, em contrapartida, observa-se o aumento significativo nas células inflamatórias e das células clásticas, bem como de células mononucleares precursoras (RÖLLING, 1981; SASAKI *et al.*, 1990; SAHARA *et al.*, 1992, 1993; ERONAT; ERONAT; AKTUG, 2002; ANGELOVA *et al.*, 2004; BOLAN; ROCHA, 2007; MONTEIRO *et al.*, 2009).

Sahara e colaboradores (1992), entre outras análises, avaliaram a estrutura pulpar coronária, quanto à presença de odontoblastos e odontoclastos. Observaram que quando a coroa dentária ainda não se encontrava em processo reabsortivo ativo, a polpa apresentava estrutura normal, com a camada de odontoblastos preservada. Com a progressão do processo, quando a raiz apresentava-se quase totalmente reabsorvida, não foram mais observadas camadas de odontoblastos e

nesta fase, as células mais presentes eram os odontoclastos. No estágio final de reabsorção, os odontoclastos se afastam em direção à polpa central, e depois desaparecem. Na seqüência, a superfície de dentina reabsorvida é reparada por um tecido parecido com cimento ou é recoberta com tecido fibroso. Neste estágio, nenhuma atividade de odontoclastos poderia ser detectada na superfície da deposição de tecido similar a cimento (Figura 1).

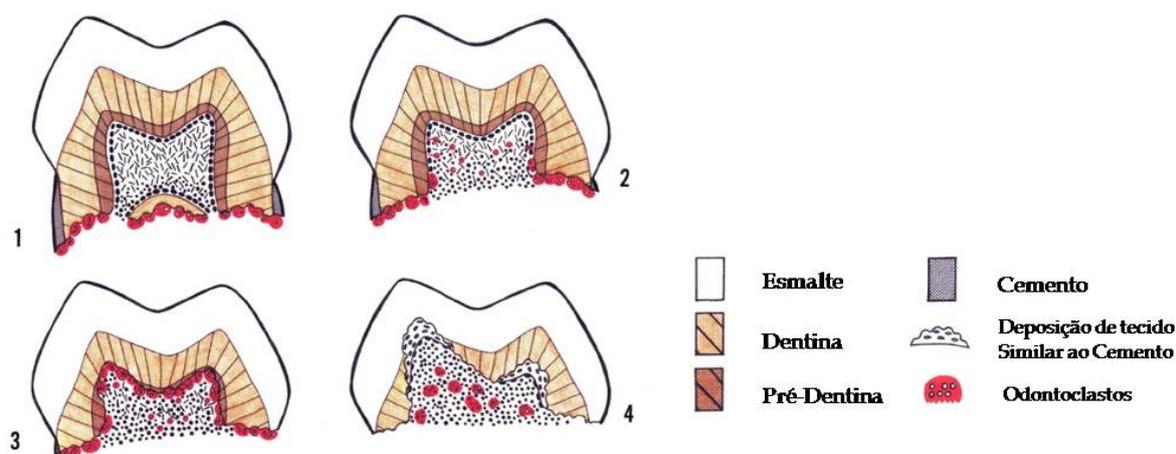


Figura 1. Esquema representando a seqüência de eventos da reabsorção da superfície da dentina coronária, ocorrendo no último estágio de esfoliação nos dentes decíduos humanos. 1) Estágio de Pré-reabsorção; 2) Estágio Inicial de Reabsorção; 3) Estágio Tardio de Reabsorção; 4) Estágio Final de Reabsorção. *Fonte: Sahara et al, 1992.*

Sasaki e colaboradores (1993) observaram que além dos odontoclastos, várias outras células mesenquimais tais como fibroblastos, cementoblastos e macrófagos estavam presentes na polpa, ativamente envolvidas na remoção celular dos tecidos duros dentais. Com a progressão da rizólise o número de células de infiltrado inflamatório crônico aumenta, estando presentes plasmócitos e linfócitos em parte da polpa coronária remanescente (ERONAT; ERONAT; AKTUG, 2002).

Neste sentido, Angelova e colaboradores (2004) estudaram a ocorrência de células imunocompetentes na polpa decídua em três estágios distintos de reabsorção fisiológica, comparando-os entre si e com um grupo sem reabsorção. Pela análise dos seus resultados, a densidade celular representada pelos macrófagos, células HLA-DR positivas e linfócitos T e B, demonstrou aumento conforme estágios mais avançados de rizólise.

Ao final da rizólise toda a superfície do tecido pulpar coronário remanescente encontra-se coberta por um epitélio escamoso estratificado, que também está presente recobrando toda a extensão do epitélio juncional gengival. Este tecido pulpar remanescente apresenta-se em maior quantidade nos dentes incisivos e caninos, visto que a reabsorção radicular, nestes dentes, ocorre na superfície lingual ao dente permanente em desenvolvimento (BERKOVITZ *et al.*, 2004).

O processo programado da reabsorção fisiológica do dente decíduo ainda não está bem esclarecido e, sendo assim, as pesquisas, atualmente, destinam-se a compreender os mecanismos moleculares envolvidos na ativação das células responsáveis tanto pelos eventos fisiológicos como patológicos, assim como obter maiores conhecimentos acerca do que acontece com as estruturas dentárias, em especial com o tecido pulpar (MONTEIRO *et al.*, 2009; BONECKER *et al.*, 2009; YILDIRIM *et al.*, 2008; BOLAN; ROCHA, 2008).

Os estudos referentes ao comportamento da polpa nestas condições classificam de maneiras diferentes os estágios de reabsorção fisiológica em relação ao comprimento de raiz que permanece. No entanto, nem sempre a divisão entre grupos é semelhante entre os artigos, dificultando comparações.

A atividade metabólica da polpa aumenta e proteínas e citocinas da matriz extracelular deste tecido também se alteram, demonstrando a sua ativa participação no processo de reabsorção (ERONAT; ERONAT; AKTUG, 2002). A matriz extracelular pulpar modifica-se ao longo deste processo. O colágeno tipo I, importante para o suporte estrutural do tecido pulpar diminui, assim como a expressão de tenascina e de osteonectina (BONECKER *et al.*, 2009). Ainda há recrutamento de precursores de clastos, bem como alteração na disponibilidade de moléculas envolvidas com a sua ativação, o RANKL (ativador - *Ligante do Receptor Ativador do fator Nuclear Kappa B*) e a OPG (inibidor- *Osteoprotegerina*) (YILDIRIM *et al.*, 2008). Yildirim e colaboradores (2008) investigaram se a presença destas moléculas chave para o desencadeamento de osteoclastogênese estaria alterada no tecido pulpar de dentes decíduos exfoliando ao compará-los com premolares permanentes jovens. Em seu estudo verificaram que os níveis de RANKL foram significativamente maiores na exfoliação.

Pelo fato de ainda haver dados a serem investigados, o presente estudo teve como objetivo estabelecer parâmetros quanto à possibilidade de obtenção de células indiferenciadas de polpa de dentes decíduos em estado de rizólise. A partir disto, tentar empregar esta metodologia para a obtenção de células-tronco da polpa de dentes decíduos sem reabsorção visível e com graus intermediários de reabsorção, extraídos por indicação ortodôntica.

2. Objetivos

Objetivo Geral

- Isolar e cultivar células provenientes do tecido pulpar de dentes decíduos humanos hígidos em processo de rizólise e avaliar, nestas células, após a expansão *in vitro* os parâmetros apresentados por células-tronco.

Objetivos Específicos

- Estabelecer uma metodologia de isolamento, o cultivo e a expansão das células da polpa de dentes decíduos humanos com diferentes graus de rizólise;
- Caracterizar tais células na quinta e décima passagens quanto a sua pluripotencialidade, por meio da sua indução *in vitro* para diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica.
- Caracterizar tais células na quinta e décima passagens quanto à expressão de marcadores de superfície de células-tronco mesenquimais pela técnica de citometria de fluxo;
- Caracterizar tais células na quinta e décima passagens quanto à expressão do fator de transcrição OCT-4, por meio da técnica de RT-PCR.

3. Artigo

A ser submetido ao periódico *“Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology & Endodontics”*

Cultivo de Células-Tronco Pulpares provenientes de dentes decíduos humanos em estágios diferentes de Rizólise – Análise da Pluripotência e Imunofenotipagem

Resumo

Objetivo(s). Estabelecer culturas de células provenientes da polpa de 30 dentes decíduos humanos hígidos em diferentes estágios de reabsorção fisiológica, avaliando-as quanto à imunofenotipagem e à pluripotência

Desenho do Estudo. Isolamento das células com posterior cultivo. Nas quinta e décimas passagens foram feitas as avaliações de crescimento, citometria de fluxo, RT-PCR e diferenciação destas células.

Resultados. Não foi possível estabelecer cultura a partir de dentes sem reabsorção radicular (n=9). As células foram positivas para CD29, CD44 e CD90 ao longo das passagens. Observou-se expressão moderada para os marcadores CD117 e CD133, enquanto que para CD34, CD45, HLA-DR CD184 e STRO-1 a expressão foi inferior a 3%. A expressão foi baixa para o marcador de células-tronco de pericitos, o CD146. Todas as culturas celulares diferenciaram-se em linhagem adipogênica, condrogênica e osteogênica e a expressão gênica de OCT-4 foi verificada ao longo das passagens.

Conclusão(s). A facilidade de obtenção de células-tronco a partir de dentes decíduos parece estar ligada aos fenômenos da rizólise. A baixa expressão de CD146 sugere que o nicho perivascular não é o único provedor das células-tronco pulpares.

Introdução

As células-tronco isoladas a partir de tecidos dentários têm sido caracterizadas e usadas em diversas pesquisas. Em humanos, elas têm sido isoladas da polpa de terceiros molares retidos e dentes decíduos exfoliados naturalmente¹⁻⁴. Recentemente, estas células foram isoladas também a partir de dente supranumerário retido e de dente natal^{5,6}. No entanto, no âmbito desta pesquisa, não foram encontrados dados na literatura em relação ao estabelecimento da cultura da polpa de dentes decíduos em diferentes graus de reabsorção.

As modificações morfológicas ocorridas no tecido pulpar ao longo do fenômeno da reabsorção fisiológica dos dentes decíduos têm sido descritas na literatura⁷⁻¹⁵. Este fenômeno, geneticamente programado, inicia-se a partir de um ambiente que leva à apoptose dos cementoblastos e que na seqüência, promove a osteoclastogênese¹⁶. O decorrer do processo altera as características do tecido pulpar, sendo que quando o dente decíduo apresenta sua raiz totalmente reabsorvida, o tecido pulpar não mais apresenta os mesmos componentes e proporção de estruturas, demonstrando, histologicamente, alteração vascular e celular, podendo ocorrer ausência dos odontoblastos e, em contrapartida, observa-se o aumento significativo nas células inflamatórias e das células clásticas, bem como de células mononucleares precursoras⁷⁻¹⁵. A atividade metabólica da polpa aumenta e proteínas e citocinas da matriz extracelular (MEC) deste tecido também se alteram, demonstrando a sua ativa participação no processo de reabsorção¹³⁻¹⁶. A partir do conhecimento da alteração pulpar, o objetivo deste trabalho foi tentar estabelecer parâmetros quanto à possibilidade de obtenção de células indiferenciadas de polpa de dentes decíduos em diferentes graus de rizólise, bem

como avaliar a imunofenotipagem e a pluripotência das células pulpares obtidas na quinta e décima passagens de cultivo celular.

Materiais e Métodos

Com o objetivo de isolar as células do tecido pulpar e tentar estabelecer a cultura destas, a polpa dentária foi removida a partir de 30 dentes decíduos incisivos, caninos e molares em diferentes estágios de rizólise. Do total de dentes, 21 estavam em processo avançado de rizólise (grupo I), sendo que 17 possuíam raiz totalmente reabsorvida e 4 apresentavam cerca de $\frac{1}{3}$ de raiz residual. Os 9 dentes restantes não apresentavam reabsorção visível (grupo II). Todos os dentes após a sua extração foram imersos em 1mL de meio de cultivo DMEM/Hepes (Sigma-Aldrich), 10% soro fetal bovino (Laborclin), 100U/mL de penicillina, 100µg/mL de estreptomicina (Gibco) e 0.45µg/mL de gentamicina (Gibco), em temperatura ambiente, para o transporte até o laboratório. Os responsáveis pelos pacientes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido aprovado pelo comitê de ética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, cadastrado sob nº296/08.

Remoção do Tecido Pulpar Dentário e Cultura de Células

A técnica utilizada para a remoção do tecido pulpar foi dependente do estágio de reabsorção do dente. Nos dentes extraídos que não apresentavam reabsorção de suas raízes, foi realizada a clivagem destes, para que fosse possível a exposição do tecido pulpar, permitindo assim, a sua posterior remoção. A preparação da clivagem foi realizada imediatamente após a extração do dente, na qual com o auxílio de uma

broca cilíndrica acoplada a uma caneta de alta rotação e sob refrigeração, foram confeccionadas 3 canaletas nestes dentes. A profundidade das canaletas foi determinada após a invasão no tecido dentinário em relação a proximidade com o tecido pulpar, a fim de evitar o corte e conseqüente dano ao tecido.

Os dentes eram apreendidos com auxílio de uma pinça porta-agulha na região da coroa e clivados com o auxílio de uma espátula de inserção de material odontológico. Após a clivagem, o dente foi recolocado no meio de transporte. A polpa foi separada cuidadosamente do tecido dentário com o auxílio de uma colher de dentina no fluxo laminar. Nos 17 dentes em que a câmara pulpar estava aberta, permitindo o acesso de instrumental, a remoção da polpa foi realizada com uma colher de dentina, e nos 4 dentes que apresentavam reabsorção intermediária, com o auxílio de um extirpa nervo. Na sequência, a manipulação do tecido pulpar removido foi realizada semelhante ao processamento descrito por Luisi e colaboradores (2007)¹⁷. A suspensão de células resultante foi semeada em 1 poço de uma placa de 12 poços. O meio de cultura foi trocado após 24 horas do plaqueamento inicial e após este momento, a cada 3 ou 4 dias. A cultura foi mantida nestas condições até atingir confluência de cerca de 90%, quando era então realizada a sua primeira passagem. Nos repiques, as células em cultura foram colhidas com solução de tripsina–EDTA 0,5% (Sigma-Aldrich) e transferidas para subculturas no respectivo meio de cultivo. A subcultura foi mantida em monocamada até ser necessário seu próximo repique.

Curva de Crescimento Celular

Para determinar a taxa de crescimento celular em diferentes densidades de células/cm², foram selecionadas células provenientes da cultura de dentes

exfoliados na quinta e décima passagens (n=4). Em cada um dos ensaios foram semeados 4 poços com 1mL de meio contendo $2,5 \times 10^3$ células/cm² e 4 poços com 10^4 células/cm² para as células da quinta e décima passagem. A cada 24 horas, um dos poços foi avaliado e suas células contadas em Câmara de Neubauer adicionando o Azul de Tripán 0,4% (1:1).

Citometria de Fluxo

A análise de citometria de fluxo foi realizada nas culturas provenientes de dentes exfoliados na quinta e décima passagem (respectivamente n=7 e n=5). Um total de 10^6 células foi incubado por 30 min a 4^oC com os seguintes anticorpos contra moléculas de superfície celular humana: CD29, CD34, CD44, CD45, CD90, CD117, CD133, CD184, HLA-DR (Pharmingen-BD Biosciences), CD146 e STRO-1 (SantaCruz), conjugados com FITC ou PE. A estratégia de *gate* foi realizada como descrito a seguir. Os controles isotípicos de IgG de camundongo conjugados com PE e FITC foram utilizados para a determinação da positividade das amostras. Apenas células vivas foram analisadas através da exclusão de células mortas a partir da utilização do 7AAD (7-Amino Actinomicina D- Invitrogen) em todas as análises. As células vivas foram avaliadas para dois marcadores de superfície celular simultaneamente, usando os anticorpos monoclonais contra os antígenos citados anteriormente. A aquisição dos dados foi realizada utilizando-se o citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences) e 10.000 eventos foram analisados com o auxílio do *software* CELLQuest (BD Biosciences).

RT-PCR

A análise da expressão de OCT-4 foi avaliada nas células obtidas das mesmas culturas analisadas pela citometria de fluxo. Nas quinta e décima passagens, 10^5 a 10^6 células foram colhidas, centrifugadas e ao pellet foi acrescentado 1mL de Trizol (Invitrogen) para a extração do RNA total. A quantidade obtida foi mensurada usando um espectrofotômetro (NanoDrop –N1000) e então 2 μ g deste RNA foram utilizados para fazer o cDNA (SuperScript III – Invitrogen) Para o controle positivo, foi utilizado o cDNA de células embrionárias humanas (linhagem de Harvard, HUES 7). Controle negativo foi constituído por todos os reagentes da reação de PCR exceto pelas amostras de cDNA . Os seguintes *primers* foram utilizados: *primer* direto 5'CTTCGGATTTCGCCTTCTCG3' (MW=6,027 μ g/ μ mol) e *primer* inverso 5'CCTTGGAAGCTTAGCCAGGTC3' ³ (MW=6,027 μ g/ μ mol). Primers e demais reagentes usados no RT-PCR foram provenientes da Invitrogen. As reações foram pré-incubadas para desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos e então submetidas a 40 ciclos a 94°C/(45s), 62°C/(45s) e 72°C/(45s), seguidos por uma extensão final por 3 minutos a 72°C. Depois da amplificação, 10 μ L de cada reação foi analisada em gel de agarose 1,5%, visualizada pela coloração com gel Red.

Diferenciação Celular *in vitro*

Para avaliar a capacidade de diferenciação, 10^4 células/cm² nas quinta e décima passagens foram semeadas em placas de 12 poços e cultivadas em apropriados meios de diferenciação após atingirem 70% de confluência (n=7). Os meios foram trocados a cada 4 dias, por um tempo de 2 a 4 semanas. Controle negativo foi obtido para cada ensaio de diferenciação com o cultivo das mesmas

células mantidas em meio de cultivo convencional. Para o meio de diferenciação osteogênica foi utilizado DMEM/Hepes suplementado com 10% de soro fetal bovino, 10% de β -glicerofosfato, 10mM, 1% de ácido ascórbico 2-fosfato 5mg/mL e 0,1% de dexametasona 10^{-5} M¹⁸. Para o meio de diferenciação adipogênica o meio base foi Iscove's (Gibco), suplementado com 20% de plasma humano, dexametasona 10^{-7} M, 2,5 μ g/mL insulina bovina, 5 μ M indometacina, 5 μ M rosiglitazona, 10 mM/mL de heparina sódica¹⁸. Para o meio de diferenciação condrogênica, HDMEM foi suplementado com ácido ascórbico 2-fosfato 50nM, 6,25 μ g/mL de insulina bovina e 10ng/mL de TGF β 1¹⁹ (Millipore, Japão e demais reagentes da Sigma-Aldrich). Após o período de diferenciação, as culturas foram lavadas com água deionizada e fixadas com paraformaldeído 4% durante 20 min a 1h. As células submetidas à diferenciação osteogênica foram coradas com *Alizarin Red*, à diferenciação adipogênica com *Oil Red* e à diferenciação condrogênica com *Alcian Blue*²⁰.

Análise Estatística

Para verificar se houve diferença entre a eficiência no estabelecimento das culturas entre o grupo I e II utilizou-se o teste exato de Fischer ($p \leq 0,01$). Para analisar se a expressão dos marcadores modificou-se entre a quinta e décima passagens utilizou-se o teste não paramétrico de Wilcoxon ($p \leq 0,05$).

Resultados

Estabelecimento e Crescimento das Culturas

O isolamento das células foi considerado com sucesso em 25 das 30 amostras estudadas, uma vez que após 24h, foi observada a presença de células aderidas, isoladas ou agrupadas em colônias (fig.1A-C e fig.1D). Em 5 culturas, não

foi verificada a presença de células neste mesmo período. Apesar da presença de células, das 25 culturas apenas 17 proliferaram até atingir a confluência de 90%, parâmetro considerado para o sucesso do estabelecimento da cultura. Tal confluência foi atingida de 5 a 21 dias (fig.1E). Em até 45 dias de observação, nenhuma amostra do grupo II conseguiu atingir tal confluência, diferentemente do grupo I ($p < 0,01$). O tempo decorrente entre a extração e o plaqueamento das células teve variação de 3,5 – 12 horas (Média = 5,03 - DP=2,84), no entanto este tempo não interferiu no estabelecimento das culturas, ou seja, foi possível estabelecer cultura nas amostras isoladas após 3,5h da exodontia, assim como 12h após. O estabelecimento da cultura e a capacidade de proliferação foram independentes da quantidade de tecido pulpar remanescente e do tipo de dente. A morfologia das células foi semelhante à de fibroblastos e a viabilidade das células na primeira passagem foi em média 77,9% (DP=13,4). No ensaio de crescimento celular, a razão entre o número de células colhidas e o número de células semeadas foi variável entre as amostras e entre as densidades (fig. 2).

Caracterização das Culturas de Células Pulpares Decíduas

Todas as amostras avaliadas pela citometria de fluxo foram provenientes das culturas isoladas a partir do tecido pulpar dos dentes exfoliados. As células em cultura mostraram presença superior a 95% para CD29, CD44 e CD90 e inferior a 3% para os antígenos CD34, CD45 e HLA-DR, CD184 na 5ª passagem. Quanto à expressão de CD117 e CD133, houve uma variação na expressão, tanto entre as amostras, quanto entre os dois diferentes momentos em que foram avaliados, ou seja, entre as passagens realizadas com as culturas celulares. A expressão de

CD44 e de CD146 alterou-se da quinta para a décima passagem ($p < 0,05$). A expressão de CD146 na maioria das amostras foi baixa ($\leq 5,36$), sendo que em apenas uma das amostras a positividade foi um pouco mais alta (20,19%). A expressão de STRO-1 foi baixa em todas as amostras ($\leq 2,14\%$), chegando a não apresentar marcação em algumas. Uma das amostras analisadas pela citometria de fluxo está representada na figura 3 e os valores das medianas representados na tabela 1. Em apenas uma amostra não se verificou a expressão gênica para o OCT-4 na quinta e décima passagem, porém, esta amostra foi capaz de se diferenciar nas 3 linhagens (osteogênica, adipogênica e condrogênica), assim como todas as demais amostras submetidas a tais meios indutores. As alterações na morfologia das células submetidas à diferenciação condrogênica foram visíveis nos primeiros 15 dias e foram coradas já neste período. Fotomicrografias de uma amostra representativa das culturas de células pulpares diferenciadas estão na figura 4. Gotículas de gordura foram visíveis na indução adipogênica após a primeira semana de indução e depósitos de matriz cálcica após 2 semanas, no meio osteogênico. As culturas em meio adipogênico e osteogênico foram mantidas durante 4 semanas até sua coloração.

Discussão

Estabelecimento da Cultura

Neste estudo, células-tronco mesenquimais (CTMs) foram isoladas a partir do tecido pulpar de dentes decíduos em diferentes graus de rizólise. O método utilizado permitiu verificar células aderentes após 24 horas em todos os grupos analisados, no entanto com variação de eficiência entre os grupos estudados. Isto pode ter sido

devido ao número de amostras diferentes nos grupos ou pode estar relacionado à situação particular do tecido pulpar no decorrer da rizólise.

As modificações peculiares ao tecido pulpar durante este processo talvez possam explicar a baixa proliferação celular encontrada nas células isoladas a partir do dente sem reabsorção visível, que apesar da presença de colônias e do aumento no número de células, não conseguiram atingir confluência nem de 50%, quando mantidas em cultura por até 45 dias. Acredita-se que este resultado não tenha sido devido à técnica, visto que cuidados de rápida manipulação e refrigeração ao realizar a clivagem foram observados para evitar dano celular. Além disso, tem se relatado sucesso no cultivo de células-tronco pulpares de dentes permanentes retidos, usando similar técnica¹. Assim, sugere-se que esta baixa proliferação possa estar relacionada com as condições biológicas do tecido *in vivo*. Assim que se completa a formação do dente decíduo, inicia-se a preparação dos seus tecidos dentários para a reabsorção de suas raízes, sendo que o desencadeador envolveria um ambiente propício à apoptose, que no transcorrer da rizólise irá deflagrar uma cascata de eventos¹⁶. Portanto, talvez as células-tronco da polpa dos dentes decíduos estejam quiescentes nos estágios iniciais da reabsorção fisiológica das suas raízes o que se alteraria com o decorrer do processo. Em fases mais adiantadas de reabsorção, células mononucleares vindas pela circulação começam a povoar a polpa e a sintetizar citocinas, que atuam autócrina e parácrinamente, modificando a MEC, que então atua acelerando o fenômeno, provocando *anoikia* e apoptose das células pulpares (odontoblastos entre elas) e tornando as células-tronco ativas^{21,22}. Estas últimas seriam as células responsáveis pela intermitência da reabsorção, ao diferenciarem-se atuando na produção de um tecido mineralizado, semelhante ao cimento dentário na dentina radicular e coronária^{7,10}. A formação

deste tecido resulta, no dente decíduo o comportamento variável entre fixo/móvel apresentado durante a sua reabsorção fisiológica⁸. Ao final do processo, atingindo a peça dentária sua exfoliação, quando ocorre reabsorção completa das raízes, o tecido que se encontra preenchendo a cavidade coronária é um tecido semelhante ao de granulação, com muitas células do processo inflamatório sintetizando mediadores químicos que atuam mantendo o nicho de células⁷⁻¹⁰.

A facilidade de proliferação das células do grupo I pode ser decorrente da exacerbação do processo de ativação das células-tronco durante o fenômeno reabsortivo. Talvez isto também explique o fato de células-tronco dos dentes decíduos exfoliados terem apresentado maior proliferação do que as de polpa de dentes permanentes, como descrito por Miura *et al.*²

Fenótipo e Pluripotência

Fenotipicamente, as CTMs são caracterizadas por expressarem um conjunto de marcadores de superfície celular e ausência de outros. Com isso, uma lista desses marcadores tem sido descrita para definir essa população. Dentre estes, encontra-se o STRO-1, cuja expressão por citometria de fluxo em células pulpares humanas apresenta-se variável em situações de normóxia (1,2% - 9,56%)^{1,2,23}. Neste estudo, a expressão do STRO-1 foi inferior a 2,2%. Este valor está dentro dos achados da literatura, no entanto, sugerimos que possa ser maior, visto que, quando células foram avaliadas por meio de imunofluorescência, a expressão positiva de STRO-1 foi observada na maioria das células em mesma passagem (dados não mostrados). Talvez o STRO-1 tenha sofrido uma possível internalização pela célula, já que outros marcadores de CTMs estavam presentes, como foi constatado, não

sendo necessária sua expressão na superfície membranosa ^{23,24,25}. No presente estudo, resultados mostraram a expressão moderada dos marcadores CD117 e CD133, os quais são receptores já descritos presentes em células-tronco pulpares e embrionárias ^{26,27}. O CD133 está envolvido na manutenção das propriedades tronco das células, atuando na supressão da diferenciação e especula-se estar envolvido na divisão assimétrica ^{23,28}. O CD117 é o receptor c-kit para o ligante SCF (*stem cell factor*), ligando-se as diferentes isoformas desta proteína, desencadeando diferentes vias de sinalização. As consequências destas vias de sinalização são efeitos biológicos diferentes. A ligação de ambos, receptor e ligante, influencia a sobrevivência, proliferação e diferenciação das células-tronco²⁹. Não podemos afirmar em com os dados desta pesquisa que a coexpressão esteja ocorrendo, porém, evidências obtidas *in vitro*, quanto ao crescimento celular e a presença fenotípica de marcadores característicos de CTMs (CD29, CD44, CD90), durante as passagens analisadas, nos faz crer que uma sinalização esteja sendo desencadeada. Corroborando com este fato, tanto o SCF como o c-kit são expressos por vários tipos celulares, quando estes são estimulados por vários tipos de citocinas²⁹. Lembramos que nos estágios sucessivos de reabsorção dentária, as células mononucleares crescentes produzem uma variedade ampla de citocinas que além de estarem influenciando a expressão destas duas moléculas, estão promovendo, juntamente com elas, o recrutamento de células progenitoras, outra função atribuída a este sistema, podendo estar atuando, desta forma, na clastogênese ^{13,30}.

Por outro lado, a expressão de CD146 foi moderada em apenas uma amostra (20,19%), e teve valores muito baixos em todas as outras análises ($\leq 5,36\%$) apresentando-se ausente na décima passagem na maioria das amostras. O CD146

está relacionado com as células-tronco localizadas nos pericitos, sendo descrito como possível mantedor das células-tronco pulpares³¹.

No entanto, apesar dos valores de CD146 terem sido inferiores aos demonstrados recentemente por Pivoriūnas *et al.* (2009)⁴, nesta pesquisa todas as culturas analisadas pela citometria e submetidas à diferenciação demonstraram pluripotencialidade ao diferenciarem-se nas 3 linhagens celulares citadas, enquanto que, mesmo apresentando altos índices de CD146, as células do estudo de Pivoriūnas *et al.* (2009) falharam ao se diferenciar em adipócitos. Além disso, corroborando com achados recentes, a expressão de OCT-4 nas células do presente estudo foi verificada ao longo das passagens³.

Portanto, as células estudadas neste trabalho, nas condições experimentais empregadas, satisfizeram os critérios para serem consideradas como células-tronco e o nicho perivascular parece não ser o seu único provedor. Ainda, pode-se dizer que aqueles dentes decíduos que apresentam certo grau de rizólise são uma importante fonte de células-tronco, constituindo um material disponível e de fácil acesso, não invasivo, com relativa facilidade no cultivo de suas células pulpares.

Agradecimentos

Ao CNPq que financiou o projeto e ao Centro de Estudos do Genoma Humano – USP por doar as células embrionárias usadas no controle positivo do RT-PCR.

Bibliografia

1. GRONTHOS S, MANKANI M, BRAHIM J, ROBEY PG, SHI S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.97, n.25, p.13625-30. Dec, 2000.
2. MIURA M, GRONTHOS S, ZHAO M, LU B, FISHER LW, ROBEY PG, SHI, S. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:5807-12.
3. KERKIS I, KERKIS A, DOZORTSEV D, STUKART-PARSONS GC, GOMES MASSIRONI SM *et al.* Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. *Cells Tissues Organs*, v.184, n.3-4, p.105-16. 2006
4. PIVORIŪNAS A, SUROVAS A, BORUTINSKAITĖ V, MATUZEVIČIUS D, TREIGYTĖ G, SAVICKIENĖ J *et al.* Proteomic analysis of stromal cells derived from the dental pulp of human exfoliated deciduous teeth. *Stem Cells Dev* 2009; [epud ahead of print]
5. HUANG AH, CHEN YK, LIN LM, SHIEH TY, CHAN AW. Isolation and characterization of dental pulp stem cells from a supernumerary tooth. *J Oral Pathol Med*, Mar. 2008.
6. KARAÖZ E, DOĞAN BN, AKSOY A, GACAR G, AKYÜZ S, AYHAN S *et al.* Isolation and in vitro characterisation of dental pulp stem cells from natal teeth. *Histochem Cell Biol* 2009; [epud ahead of print]
7. RÖLLING I. Histomorphometric analysis of primary teeth during the process of resorption and shedding. *Scand J Dent Res* 1981; 89:132-42.
8. SAHARA N, OKAFUJI N, TOYOKI A, SUZUKI Y, DEGUCHI T, SUZUKI K. Odontoclastic resorption at the pulpal surface of coronal dentin prior to the shedding of human deciduous teeth. *Arch Histol Cytol* 1992; 55:273-85.
9. SAHARA N, OKAFUJI N, TOYOKI A, ASHIZAWA Y, YAGASAKI T, DEGUCHI T, SUZUKI K. A histological study of the exfoliation of human deciduous teeth. *J Dent Res* 1993; 72(3):634-640.
10. SAHARA N, OZAWA H. Cementum-like tissue deposition on the resorbed enamel surface of human deciduous teeth prior to shedding. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*. 2004 Aug;279(2):779-91.
11. ANGELOVA A, TAKAGI Y, OKIJI T, KANEKO T, YAMASHITA Y. Immunocompetent cells in the pulp of human deciduous teeth. *Arch Oral Biol* 2004; 49: 29–36.
12. ERONAT C, ERONAT N, AKTUG M. Histological investigation of physiologically resorbing primary teeth using Ag-NOR staining method. *Int J Paediatr Dent* 2002; 12: 207–214.

13. YILDIRIM S, YAPAR M, SERMET U, SENER K, KUBAR A. The role of dental pulp cells in resorption of deciduous teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008; 105: 113-120.
14. MONTEIRO J, DAY P, DUGGAL M, MORGAN C, RODD H. Pulpal status of human primary teeth with physiological root resorption. *Int J Paediatr Dent*. 2009 Jan;19(1):16-25.
15. BONECKER M, MANTESSO A, ARAÚJO NS, ARAÚJO VC. Expression of proteins in the extracellular matrix of pulp tissue primary teeth during physiologic root resorption. *Quintessence Int*. 2009;40(7):553-8
16. LOURENÇO SQC. Teeth physiological resorption: the study of mechanisms (apoptosis) and trigger molecules (Bmp-4 and GelatinaseB) in feline deciduous teeth [doctoral thesis]. São Paulo (Brazil): University of São Paulo; 1999.
17. LUISI SB, BARBACHAN JJ, CHIES JA, FILHO MS. Behavior of human dental pulp cells exposed to transforming growth factor-beta1 and acidic fibroblast growth factor in culture *J Endod*. 2007;33(7):833-5
18. MEIRELLES LS, CHAGASTELLES, PC, NARDI NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci*. 2006 Jun 1;119(Pt 11):2204-13
19. DOMINICI M, LE BLANC K, MUELLER I, SLAPER-CORTENBACH I, MARINI F, KRAUSE D *et al*. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.
20. MOUISEDDINE M, FRANÇOIS S, SEMONT A, SACHE A, ALLENET B, MATHIEU N *et al*. Human mesenchymal stem cells home specifically to radiation-injured tissues in a non-obese diabetes/severe combined immunodeficiency mouse model. *Br J Radiol*. 2007 Sep;80 Spec No 1:S49-55.
21. MARASTONI S, LIGRESTI G, LORENZON E, COLOMBATTI A, MONGIAT M. Extracellular matrix: a matter of life and death. *Connect Tissue Res*. 2008;49(3):203-6.
22. STUPACK DG, CHERESH DA. Apoptotic cues from the extracellular matrix: regulators of angiogenesis *Oncogene*. 2003; 8;22(56):9022-9.
23. SAKDEE JB, WHITE RR, PAGONIS TC. Hypoxia-amplified proliferation of human dental pulp cells. *J Endod*. 2009; 35(6) 818-822.
24. SHI Y, MASSAGUÉ J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*. 2003 Jun 13;113(6):685-700
25. ZANDSTRA PW, LAUFFENBURGER DA, EAVES CJ. A ligand-receptor signaling threshold model of stem cell differentiation control: a biologically conserved mechanism applicable to hematopoiesis. *Blood*. 2000 Aug 15;96(4):1215-22

26. LAINO G, D'AQUINO R, GRAZIANO A, LANZA V, CARINCI F, NARO F *et al.* A new population of human adult dental pulp stem cells: a useful source of living autologous fibrous bone tissue (LAB). *J Bone Miner Res.* 2005;20(8):1394-402.
27. ZHAN X, DRAVID G, YE Z, HAMMOND H, SHAMBLOTT M, GEARHART J, CHENG L. Functional antigen-presenting leucocytes derived from human embryonic stem cells in vitro. *Lancet.* 2004; 10-16;364 (9429):163-71.
28. GENE BANK. PROM1- Prominin 1 Homo Sapiens. Acesso em: 15.11.2009
www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/8842?ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Gene.Gene_ResultsPanel.Gene_RVDocSum
29. GAGARI E, RAND MK, TAYARY L, VASTARDIS H, SHARMA P, HAUSCHKA PV *et al.* Expression of stem cell factor and its receptor, c-kit, in human oral mesenchymal cells. *Eur J Oral Sci* 2006; 114: 409-415
30. KORPOS E, WU C, SOROKIN L. Multiple roles of the extracellular matrix in inflammation. *Curr Pharm Des.* 2009;15(12):1349-57.
31. SHI S, GRONTHOS S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and pulp. *J Bone Miner Res.* 2003;18(4):696-704.

Figuras do Artigo

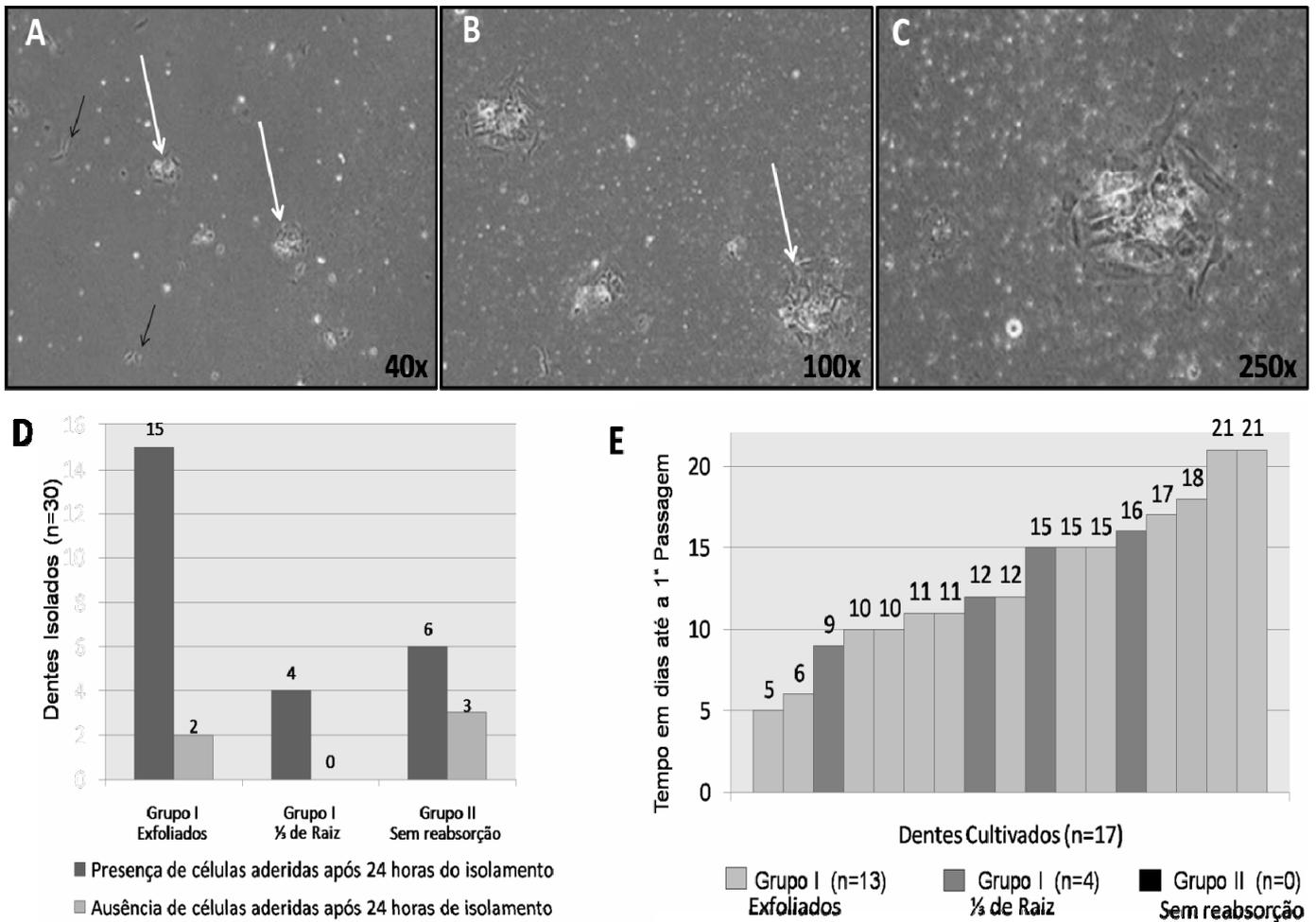


Figura 1: Comportamento das culturas do isolamento até a confluência de 90%. (A-C) imagens após 24 horas do isolamento. Nas setas brancas podem-se observar pequenas colônias e nas setas pretas a presença de células isoladas (40x – 250x). (D) presença de células após 24h do isolamento em relação aos grupos de dentes e graus de raiz residual. (E) Tempo, em dias, que as culturas levaram até atingir a confluência de 90% em relação aos grupos e aos graus de raiz residual.

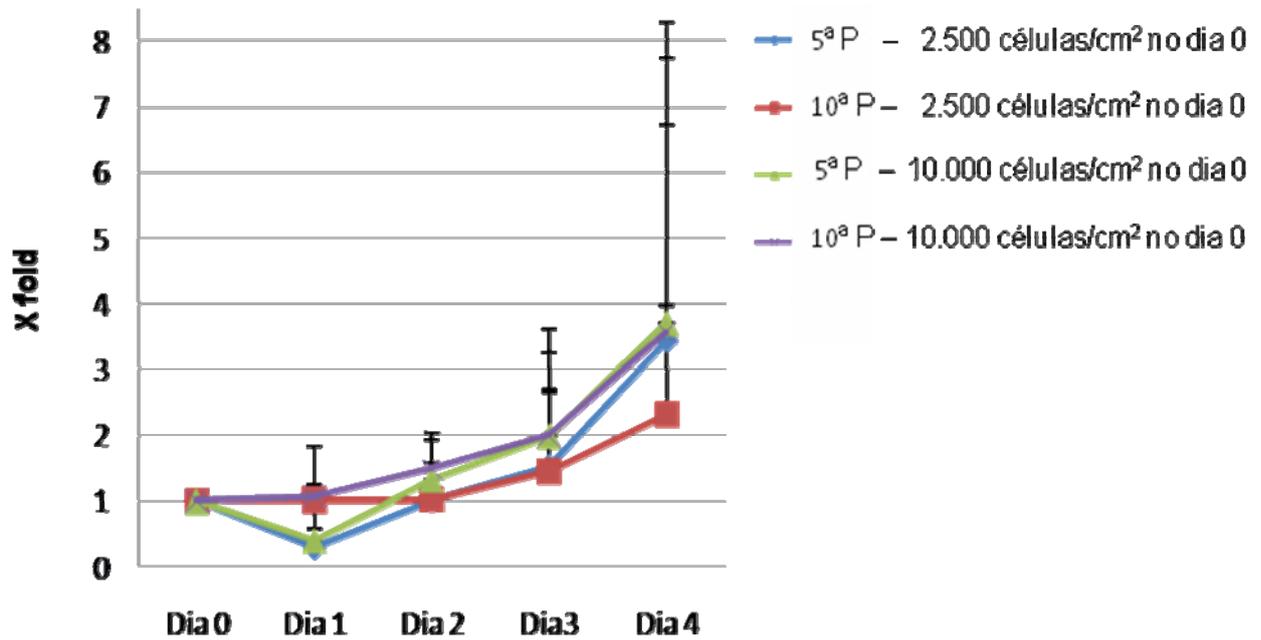


Figura 2: O gráfico apresenta a média e o desvio padrão do crescimento celular (n=4) quando as células da 5ª e 10ª passagens foram semeadas em diferentes densidades (2.500 células/cm² e 10.000 células/cm²) e avaliadas por 4 dias. *Fold* representa a razão entre o número de células colhidas e o número de células semeadas

Figura 3 A

A

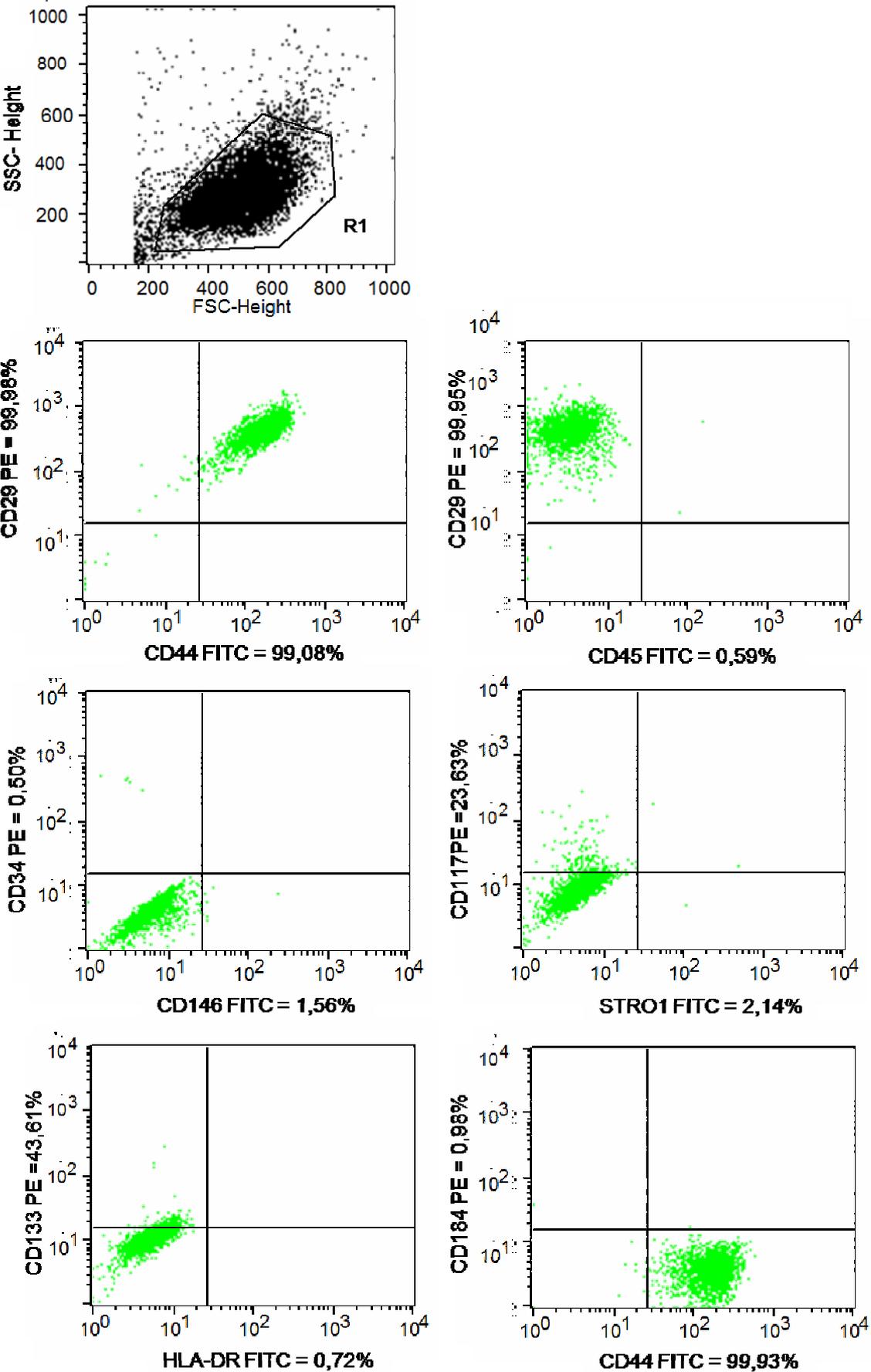
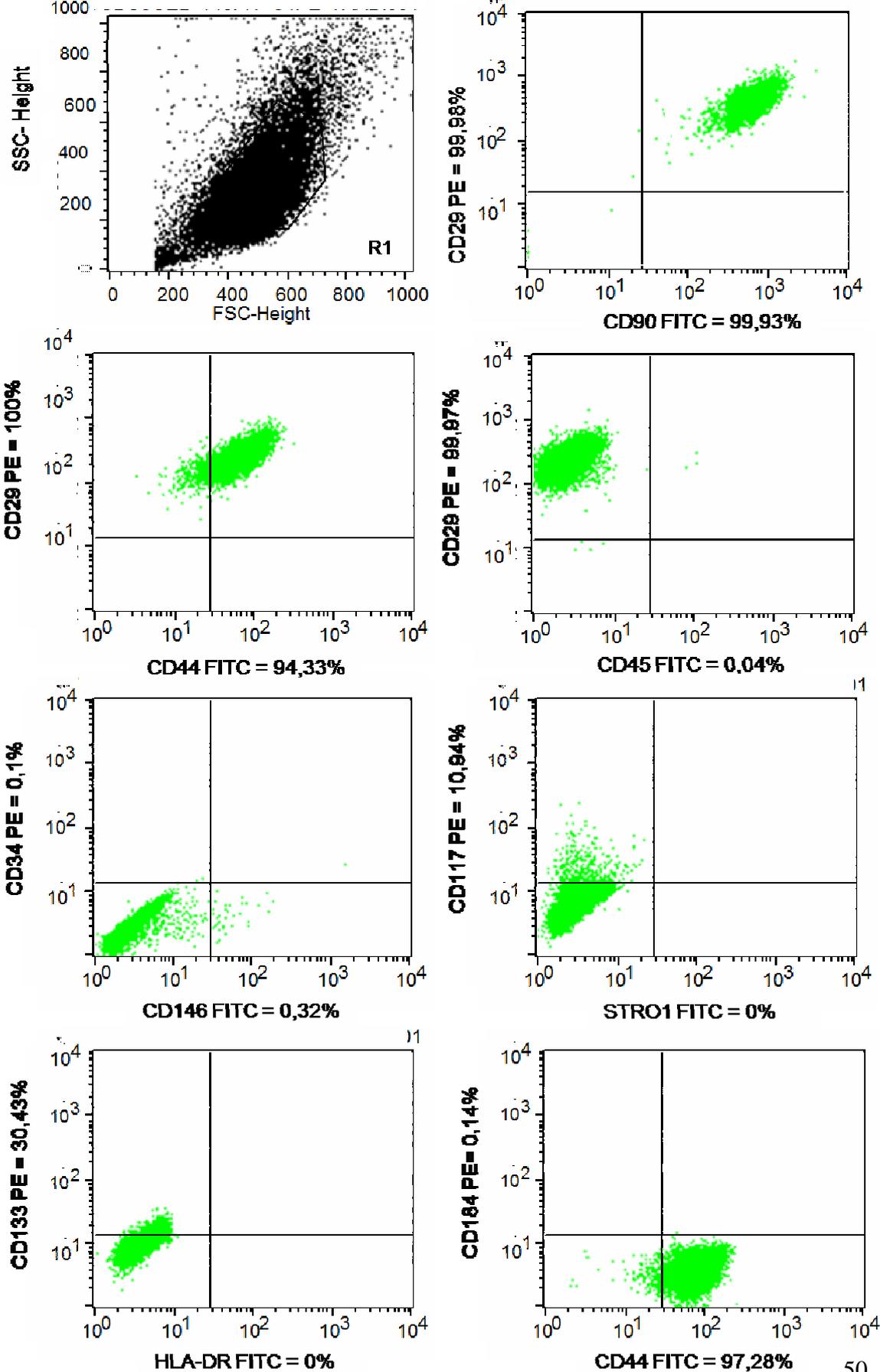


Figura 3 B

B



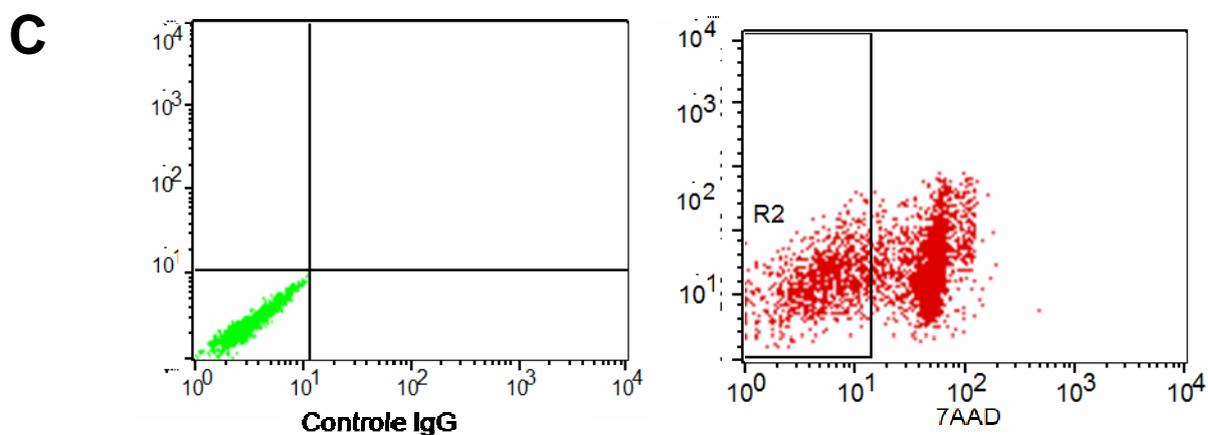


Figura3: Amostra representativa da análise de citometria de fluxo para marcadores de superfície das células pulpares avaliadas nas 5^a e 10^a passagens (Fig A e B). As células foram incubadas com os anticorpos contra CD29, CD34, CD44, CD45, CD90, CD 117, CD133, CD146, CD184, STRO-1 e HLA-DR (C) Demonstração do gráfico do controle isotípico (negativo) e do gráfico da marcação celular com 7AAD.

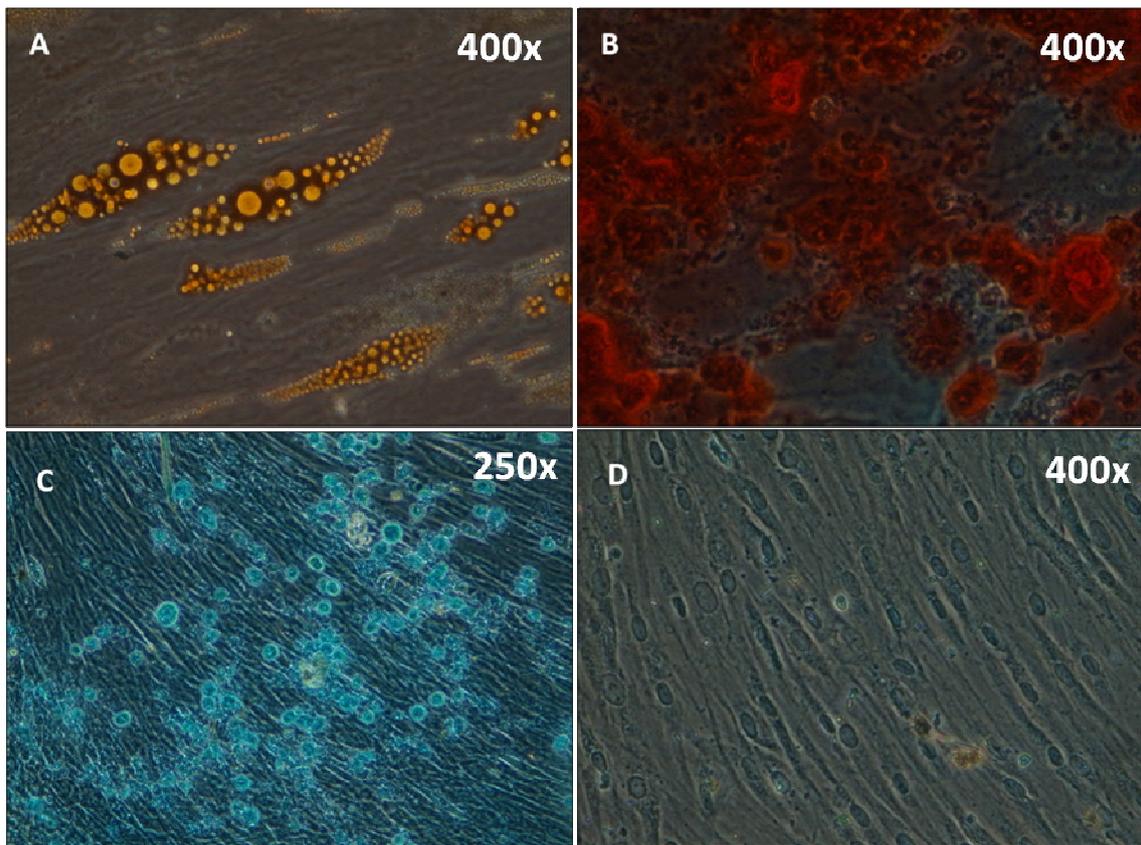


Figura 4: Culturas de células pulpare de dentes decíduos hígidos em processo de reabsorção foram testadas para a habilidade de diferenciação *in vitro*. (A) diferenciação adipogênica visualizada pela coloração de *Oil Red*, mostrando vacúolos de lipídeos corados. (B) diferenciação osteogênica visualizada pelos depósitos de cálcio corados com *Alizarin Red* (C) diferenciação condrogênica visualizada com a coloração por *Alcian Blue* dos depósitos de glicosaminoglicanas (D) células pulpare cultivadas sem indução de diferenciação para controle negativo.

Tabela 1 – Representação dos valores percentuais da Mediana (Percentil 25 e 75) obtida pela análise da expressão percentual dos marcadores por meio de citometria de fluxo para as amostras na 5ª e 10ª passagens. Teste de Wilcoxon ($p \leq 0,05$)*

	5ª PASSAGEM (n=7)		10ª PASSAGEM (n=5)		p
	MEDIANA (%)		MEDIANA (%)		
	(Percentil 25- Percentil 75)		(Percentil 25- Percentil 75)		
CD29	99,92	(99,36 – 99,99)	99,98	(88,08 - 100)	0,41
CD44	98,68	(98,21 -99,54)	94,86	(76,8 – 95,48)	0,04*
CD90	99,92	(99,87 – 99,96)	99,96	(99,44 – 99,99)	0,83
CD117	15,57	(7,56 – 28,71)	11,23	(6,8 – 13,36)	0,5
CD133	34,65	(8,78 – 64,77)	20,79	(5,77 – 44,3)	0,59
CD146	2,04	(1,6 – 5,3)	0,09	(0,02 – 1,06)	0,04*
CD184	0,95	(0,06 – 3,04)	0,19	(0,08 – 1,16)	0,68
STRO-1	0,56	(0,19 – 1,86)	0,02	(0 – 0,53)	0,13
CD34	0,5	(0,02 – 2,81)	0,1	(0,03 – 0,35)	0,46
CD45	0,15	(0,03 – 0,59)	0,04	(0,03 – 0,66)	0,5
HLA-DR	0,55	(0,07 – 1,51)	0	(0 – 0,8)	0,22

p= nível mínimo de significância do teste não paramétrico de Wilcoxon

4. Considerações Finais

Com a metodologia usada neste estudo, foi possível o isolamento e cultivo das células da polpa de dentes decíduos humanos com diferentes graus de rizólise. No entanto, o sucesso do cultivo foi verificado apenas a partir da polpa dos dentes em que o processo reabsortivo estava plenamente ocorrendo, ou seja, naqueles dentes que possuíam raiz totalmente reabsorvida e nos que apresentavam cerca de $\frac{1}{3}$ de raiz residual. Não foi possível estabelecer o cultivo a partir das células pulpares daqueles dentes sem reabsorção visível.

Assim, podemos sugerir que a rizólise parece influenciar a disponibilidade das células-tronco, de forma que ocorra a exacerbação do processo de ativação destas células durante a reabsorção das estruturas dentárias. Sugerimos que, talvez, este fenômeno peculiar aos dentes decíduos, explique o fato das células-tronco destes dentes terem apresentado maior proliferação do que as de polpa de dentes permanentes e do que as células extraídas a partir da medula-óssea, como descrito por Miura e equipe (2003).

As células analisadas no presente estudo, nas condições experimentais empregadas, satisfizeram os 3 critérios para serem consideradas como uma CTM descritos por Dominici e colaboradores (2006), ou seja: (1) demonstraram aderência ao plástico, no caso a placa de cultura, possibilitando o seu cultivo ao longo das passagens realizadas; (2) demonstraram pluripotencialidade ao se diferenciarem em um destino adipogênico, osteogênico e condrogênico, e ainda mantiveram a expressão de OCT-4 ao longo das passagens; e, por fim, (3) ao serem avaliadas por meio de citometria de fluxo, as células cultivadas demonstraram alta positividade, na quinta e décima passagens, na maioria das amostras para os marcadores presentes nas células-troncos mesenquimais (CD29, CD44 e CD90) e ausência ou baixa expressão para CD34, CD45 e HLA-DR, verificação que caracteriza estas células.

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram positividade moderada para CD117 e CD133, receptores já descritos como presentes em células-tronco pulpare e embrionárias (LAINO *et al.*, 2005; ZHAN *et al.*, 2004). Por outro lado, a expressão de STRO-1 foi baixa em todas as amostras ($\leq 2,14\%$), chegando a não apresentar marcação em algumas. Em experimento piloto, quando as células de uma amostra foram avaliadas por meio de imunofluorescência, a expressão de STRO-1 foi observada em mesma passagem daquela da citometria, na maioria dos campos analisados (apêndice 2). O STRO-1 pode ter sofrido a sua internalização pela célula, já que outros marcadores de CTMs estavam presentes, como foi constatado, não sendo necessária sua expressão na superfície membranosa.

Uma baixa expressão também foi vista para o antígeno CD146, um marcador conhecido por estar relacionado com as células-tronco localizadas nos pericitos, já tendo sido descrito como possível mantedor das células-tronco pulpare (SHI ; GRONTHOS, 2003). A expressão de CD146 foi moderada em apenas uma amostra (20,19%), e teve valores muito baixos em todas as outras análises ($\leq 5,36\%$), apresentando-se ausente na décima passagem na maioria das amostras. Assim, o nicho perivascular não deve ter sido o único provedor das células-tronco pulpare obtidas em nosso laboratório.

No entanto, apesar dos valores de CD146 terem sido inferiores aos demonstrados recentemente por Pivoriunas e colaboradores (2009), em nosso estudo todas as culturas analisadas pela citometria e submetidas à diferenciação demonstraram pluripotencialidade ao diferenciarem-se nas 3 linhagens celulares citadas, enquanto que mesmo apresentando altos índices de CD146 as células daquele estudo falharam ao se diferenciar em adipócitos. Além disso, em experimento piloto, para estabelecer parâmetros para a diferenciação neurogênica, as células em quinta passagem submetidas a este meio de diferenciação apresentaram morfologia semelhante àquela encontrada em cultura primária de células do sistema nervoso central após 10 dias (apêndice 3).

As diferenças particulares de cada laboratório, tais como protocolos utilizados no que se refere ao meio de cultura utilizado, concentrações e marcas de reagentes,

assim como àquelas relacionadas à manutenção da cultura, tais como forma de isolamento, taxa de confluência e repique e densidade de plaqueamento podem ser um fator influente no desfecho do tipo de população mantida em cultivo (SUCHANEK *et al.* 2009; SAKDEE *et al.* 2009; HUANG *et al.* 2006). Assim, é possível que as células obtidas no presente estudo não sejam exatamente iguais às primeiramente descritas para este tecido, as SHEDs (MIURA *et al.*, 2003). Kerkis e colaboradores fizeram o mesmo questionamento quanto às “suas células”, extraídas também a partir da polpa de dentes decíduos, as quais chamaram de IDPSCs. Os autores consideraram as IDPSCs distintas das SHEDs.

Comparações são difíceis de serem feitas. Por um lado em consequência das variáveis acima citadas quanto à manutenção das culturas e por outro, pela dificuldade de encontrar artigos que disponibilizem dados importantes para esta análise. É freqüente não ser citado o número de amostra e os valores percentuais da citometria, o que nos parece importante, visto a variação de dados encontrada em nosso estudo. Acreditamos ainda, que outro fator importante seria a situação biológica particular do tecido pulpar *in vivo* no momento da coleta. O tecido pulpar, provavelmente deva estar sendo modificado com o avanço do processo reabsortivo. Neste sentido, pouco se sabe hoje sobre as alterações ocorridas na matriz extracelular da polpa durante a reabsorção, assim como o envolvimento das células-tronco neste processo.

Considerando todos os aspectos abordados, é possível destacar como principal contribuição desta dissertação, no contexto da integração entre as áreas da Odontologia e da Terapia Celular, que os dentes decíduos que apresentam certo grau de rizólise são uma importante fonte de células-tronco, constituindo um material disponível e de fácil obtenção, com relativa facilidade no cultivo de suas células pulpareas.

5. Perspectivas

- Investigar o papel das células-tronco na rizólise, por meio da avaliação imunoistoquímica dos marcadores STRO-1 e CD146 no tecido pulpar de dentes decíduos em diferentes graus de rizólise, após estes serem submetidos ao processamento histológico;
- Investigar os aspectos de estabelecimento das culturas de acordo com os graus de reabsorção fisiológica;
- Caracterizar as células quanto ao potencial de diferenciação neurogênica;
- Utilizar as células obtidas com a metodologia deste estudo aliadas a *scaffolds* de *electrospinning* em pesquisas de regeneração tecidual;
- Estabelecer parâmetros para o congelamento destas células, avaliando aspectos imunofenotípicos e de pluripotência antes e após o congelamento.

Referências Bibliográficas

1. ABE S, *et al.* Hard tissue regeneration capacity of apical pulp derived cells (APDCs) from human teeth. **Biochem Biophys Res Commun.** San Diego, v. 371, no. 1, p. 90-93, Jun. 2008.
2. AGATA H, *et al.* Effect of ischemic culture conditions on the survival and differentiation of porcine pulp stem cells. **Differentiation.** London,;76(9):981-93, Nov, 2008.
3. ANGELOVA A, *et al.* Immunocompetent cells in the pulp of human deciduous teeth. **Arch Oral Biol.** London,;49(1):p.29-36. 2004.
4. ARAUJO, FB. **Estudo morfológico, histométrico e histoquímico da polpa de molares decíduos e de reabsorção radicular.** 1982. 126f. Dissertação (Mestrado em Odontopediatria) - Curso de pós-graduação em Odontopediatria - Faculdade de Odontologia - Universidade de São Paulo
5. ARORA V, ARORA P, MUNSHI AK. Banking Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth. **Future J Clin Pediatr Dent,** Birmingham, 33(4): 289–294, 2009
6. BATOULI S, *et al.* Comparison of stem-cell-mediated osteogenesis and dentinogenesis. **J Dent Res.** Dec, p.976-81. 2003
7. BERKOVITZ, B.K.B. *et al.* **Polpa Dentária.** In: _____. Anatomia, Embriologia e Histologia Bucal. Artmed; 2004. p. 149-167
8. BOLAN, M.; M. J. ROCHA. Histopathologic study of physiological and pathological resorptions in human deciduous teeth. **Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod,** St Louis, Apr 19. 2007.
9. BONECKER M, *et al.* Expression of proteins in the extracellular matrix of pulp tissue primary teeth during physiological resorption. **Quintessence Int.,** Berlin -,40(7):553-8, Jul- Aug, 2009
10. CHAMBERLAIN G, *et al.* Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, and potential for homing. **Stem Cells,** Basel,;25(11):2739-49, Nov, 2007
11. CONSOLARO A. **Reabsorção Dentária Fisiológica: a rizólise dos dentes decíduos.** In: _____. Reabsorção Dentária. In: _____. Especialidades Clínicas. Maringá: Dental Press, 2007. Cap. 10, p. 203-219
12. CORDEIRO MM, *et al.* Dental Pulp Tissue Engineering with Stem Cells from Exfoliated Deciduous Teeth. **J Dent Res.** Aug, 2008 34(8):962-9.
13. COURA *et al.* Human periodontal ligament: a niche of neural crest stem cells. **J Periodontal Res,** London,;39(6):p.6-11. 6, Jul, 2008
14. D'AQUINO R, *et al.* Human postnatal dental pulp cells co-differentiate into osteoblasts and endothelial cells. **J Dent Res.** London,;87(6):p.6-11. 6, Jun, 2008
15. DE MENDONÇA CA, *et al.* Reconstruction of large cranial defects in nonimmunosuppressed experimental animals using human dental pulp stem cells. **J Craniofac Surg.,** Burlington, v. 19, no 1, p. 204-210, Jan. 2008.
16. DOMINICI M, *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. **The International Society for Cellular Therapy Position Statement.** J Cell Physiol. 2007;189(4):572-80.

- Therapy position statement. **Cytotherapy**, Bimonthly,8(4):315-7, 2006
17. EL-BACKLY RM, *et al.*Regeneration of dentine/pulp-like tissue using a dental pulp stem cell/poly(lactide-co-glycolide) scaffold construct in New Zealand white rabbits. **Aust Endod J**, Melbourne, v. 34, no. 2, p. 52-67, 2008.
 18. ERONAT C, ERONAT N, AKTUG M. Histological investigation of physiologically resorbing primary teeth using a double immunofluorescence staining method. **Int J Paediatr Dent**, Birmingham,v.12, n.3, May, p.207-14. 2002.
 19. FORBES SJ, *et al.* Adult stem cell plasticity: new pathways of tissue regeneration become visible. **Stem Cells**, v.103, n.4, Oct, p.355-69. 2002.
 20. FOSSATI, A.C.M.; RUSCHEL, H.C. **Bases Biológicas**. In:_____ : KRAMER, P.F.; FELDENS, C. **Odontologia: Dentição Decídua: Prevenção, Diagnóstico e Tratamento**. São Paulo: Editora Santos, 2005. Cap. 10.
 21. FRESHNEY, R.I. **Primary Culture**. In:___Culture of Animal Cells. Hoboken, New Jersey :Wiley, 2006. p.198.
 22. FRIEDRICH EB, *et al.* CD34-/CD133+/VEGFR-2+ endothelial progenitor cell subpopulation with proangiogenic capacities. **Circ Res**. Baltimore 17;98(3):e20-5. Fev, 2006
 23. GAGARI E, RAND MK, TAYARY L, VASTARDIS H, SHARMA P, HAUSCHKA PV *et al.* Expression of stem cell markers and their receptor, c-kit, in human oral mesenchymal cells. **Eur J Oral Sci**, Copenhagen , 114: 409-415, 2006.
 24. GENE BANK. PROM1- Prominin 1 Homo Sapiens. Acesso em: 15.11.2009
www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/8842?ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Gene.GeneDocSum
 25. GRONTHOS S, *et al.* Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. **Proc Natl Acad Sci U S A**, Washington, v.97, n.25, p.13625-30.Dec, 2000.
 26. GRONTHOS S, *et al.* Stem cell properties of human dental pulp stem cells. **J Dent Res**, Chicago, v.81, n.1, p.9-15. 2002.
 27. GRONTHOS S, *et al.* Ovine periodontal ligament stem cells: isolation, characterization, and differentiation. **J Dent Res**, Chicago, v.85, n.11, p.1058-64. 2006.
 28. HALL, P. A.;WATT, F. M.. Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity. **Development**, London, v.126, n.4, p.619-33. Ago, 1999.
 29. HANDA K, *et al.* Cementum matrix formation in vivo by cultured dental follicle cells. **Bone**, New York, v.31, n.1, p.11-17. 2002.
 30. HANDGRETINGER R, *et al.* Biology and plasticity of CD133+ hematopoietic stem cells. **Ann N Y Acad Sci**, New York, v.996, p.141-51. Maio, 2003
 31. HARADA H, *et al.* FGF10 maintains stem cell compartment in developing mouse incisors. **Development**, London, v.129, n.6, Mar, p.1533-41. 2002.
 32. HUANG AH, *et al.* Isolation and characterization of dental pulp stem cells from a supernumerary tooth. **J Dent Res**, Copenhagen 37(9):571-4. Oct, 2008
 33. HUANG AH, *et al.* Putative Dental Pulp Derived Stem/Stromal Cells Promote Proliferation and Differentiation of Dental Pulp Cells. **J Dent Res**, Copenhagen 87(12):1177-84. Dec, 2008

- Neural Cells in the Hippocampus of Mice. **Stem Cells**, Basel, 26(10):2654-63. Oct, 2008
34. HUANG GT, *et al.* In vitro characterization of human dental pulp cells: various isolation methods and differentiation. **Cell Tissue Res**. Berlin 324(2):225-36. Maio, 2006
 35. HUANG GT, *et al.* The hidden treasure in apical papilla: the potential role in pulp/dentin regeneration and tissue engineering. **J Endod.**, Chicago, v. 34, no. 6, p. 645-651. Jun. 2008
 36. HUANG GT, GRONTHOS S, SHI S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from marrow: similarities and differences in biology and role in regenerative medicine. **J Dent Res.**, Chicago, 88(9):792-806. Set 2009
 37. JOHNSON BV, RATHJEN J, RATHJEN PD. Transcriptional control of pluripotency: decisions in embryonic stem cell differentiation. **Opin Genet Dev**. London, 16(5):447-54. Oct, 2006
 38. KARAÖZ E, *et al.* Isolation and in vitro characterisation of dental pulp stem cells from natal teeth. **J Dent Res**. Berlin, 2009 Oct 9. [Epub ahead of print]
 39. KERKIS I, *et al.* Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing stem cell markers and other embryonic stem cell markers. **Cells Tissues Organs**, Basel, v.184, n.3-4, p.105-16. 2006
 40. KERKIS I, *et al.* Early transplantation of human immature dental pulp stem cells from baby teeth to dystrophy (GRMD) dogs: Local or systemic? **J Transl Med**, London, no.3, p. 6:35. Jul 2008
 41. KORPOS E, WU C, SOROKIN L. Multiple roles of the extracellular matrix in inflammation. **Curr Opin Cell Biol**. Schiphol, 15(12):1349-57, 2009
 42. KOYAMA N, *et al.* Evaluation of pluripotency in human dental pulp cells. **J Oral Maxillofac Surg**. Mar, 2009
 43. LAINO G, *et al.* A new population of human adult dental pulp stem cells: a useful source of living bone tissue (LAB). **J Bone Miner Res**. New York, 20(8):1394-402. Aug, 2005
 44. LAINO G, *et al.* In vitro bone production using stem cells derived from human dental pulp. **J Craniofac Surg**. n.3, p.511-5. May, 2006.
 45. LOURENÇO SQC. **Reabsorção Dentária Fisiológica: Estudo dos mecanismos (apoptose e fatores desencadeadores (Bmp-4 e GelatinaseB) em dentes decíduos de gatos [tese de doutorado]**. Universidade de São Paulo; 1999. 121p
 46. LUISI SB, BARBACHAN JJ, CHIES JA, FILHO MS. Behavior of human dental pulp cells exposed to transforming growth factor-beta1 and acidic fibroblast growth factor in culture. **J Endod**, Chicago, 33(7):833-5, 2007
 47. MARASTONI S, LIGRESTI G, LORENZON E, COLOMBATTI A, MONGIAT M. Extracellular matrix degradation and cell death. **Connect Tissue Res**, New York, 49(3):203-6, 2008.
 48. MEIRELLES LS, CHAGASTELLES PC, NARDI NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all postnatal tissues. **J Cell Sci**. Cambridge, 1;119 (Pt 11):2204-13. Jun, 2006
 49. MIURA M, *et al.* SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **Proc Natl Acad Sci U S A**. n.10, May 13, p.5807-12. 2003.
 50. MODINO, S. A.; P. T. SHARPE. Tissue engineering of teeth using adult stem cells. **Arch Oral Biol**

- p.255-8. 2005.
51. MONTEIRO J, *et al.* Pulpal status of human primary teeth with physiological root resorption **Int J F** Birmingham;19(1):16-25, Jan, 2009
 52. MONTEIRO BG, *et al.* Human immature dental pulp stem cells share key characteristic features w **Prolif.** 42(5):587-94. Oct, 2009
 53. MORSCZECK C, *et al.* Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teet Amsterdam, v.24, n.2, Apr, p.155-65. 2005.
 54. MOUISEDDINE M, FRANÇOIS S, SEMONT A, SACHE A, ALLENET B, MATHIEU N *et a.* Human home specifically to radiation-injured tissues in a non-obese diabetes/severe combined immunode **J Radiol**, London, 80 Spec No 1:S49-55 Set, 2007.
 55. NAKAMURA S, *et al.* Stem cell proliferation pathways comparison between human exfoliated deci pulp stem cells by gene expression profile from promising dental pulp. **J Endod.**, Chicago 35(11):
 56. NARDI, N. B. e MEIRELLES, S.L. Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and chara **Pharmacol.** Berlin, (174):249-82, 2006
 57. NIH STEM CELLS: Scientific Progress and Future Research Directions <http://stemcells.nih.gov/NF> C73C-4842-ADE8-83A17CD7563B,frameless.htm?NRMODE=Published. Acesso em 08.11.2009
 58. PAPACCIO G, *et al.* Long-term cryopreservation of dental pulp stem cells (SBP-DPSCs) and their a cell source for tissue repair. **J Cell Physiol.** Philadelphia, 208(2):319-25. Aug, 2008
 59. PATEL M, *et al.* Phenotype and behaviour of dental pulp cells during expansion culture. **Arch Ora** 908. Oct, 2009
 60. PERRY BC, *et al.* Collection, cryopreservation, and characterization of human dental pulp-derived for banking and clinical use. **Tissue Eng Part C Methods**, New Rochelle v. 14, no. 2,p. 149-156,
 61. PIVORIŪNAS A, *et al.* Proteomic analysis of stromal cells derived from the dental pulp of human e **Stem Cells Dev.** Larchmont 2009 Oct 13. [Epub ahead of print]
 62. PREFFER F ; DOMBKOWSKI D. Advances in complex multiparameter flow cytometry technology research. **Cytometry B Clin Cytom.** Hoboken, 76(5):295-314.Sep, 2009
 63. RÖLLING I. Histomorphometric analysis of primary teeth during the process of resorption and she Copenhagen 1981; 89:132-42.
 64. SAHARA N, *et al.* Odontoclastic resorption at the pulpal surface of coronal dentin prior to the shee teeth. **Arch Histol Cytol** Niigata, v.55, n.3, p.273-85. Jul,1992
 65. SAHARA N, *et al.* A histological study of the exfoliation of human deciduous teeth. **J Dent Res**, Cl 40. Mar, 1993
 66. SAHARA N, OZAWA H. Cementum-like tissue deposition on the resorbed enamel surface of huma shedding. **Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol**, Hoboken, 279(2):779-91,Aug, 2004
 67. SAKDEE JB, *et al.* Hypoxia-amplified proliferation of human dental pulp cells. **J Endod.**Chicago 2

68. SASAKI T, *et al.* Cellular roles in physiological root resorption of deciduous teeth in the cat. **J Dent Res**. 69:67-74. Jan, 1990
69. SEO, B. M. *et al.*. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. **Nature**. n.9429, 10-16, p.149-55. Jul, 2004.
70. SEO BM, *et al.* SHED repair critical-size calvarial defects in mice. **Oral Dis**. Copenhagen;14(5):423-428. 2007.
71. SHI, S e GRONTHOS, S. Perivascular Niche of Postnatal Mesenchymal Stem Cells in Human Bone Marrow. **J Bone Miner Res**. New York, 18(4):696-704. Apr, 2003
72. SHI Y, MASSAGUÉ J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. **Curr Biol**. 13;113(6):685-700, Jun, 2003.
73. SPRADLING A, DRUMMOND-BARBOSA D, KAI T. Stem cells find their niche. **Nature**, London, v.414, p.100-104. 2001.
74. STUPACK DG, CHERESH DA. Apoptotic cues from the extracellular matrix: regulators of angiogenesis. **Cell**. Basingstoke, 8;22(56):9022-9, 2003.
75. SUCHÁNEK J, *et al.* Human dental pulp stem cells--isolation and long term cultivation. **Acta Medica (Hradec Králové)**;50(3):195-201, 2007
76. SUCHANEK J, *et al.* Dental pulp stem cells and their characterization. **Biomed Pap Med Fac Univ J. Czech Repub.** Prague 153(1):31-5. Mar, 2009
77. TETÈ S, *et al.* Changes in matrix extracellular phosphoglycoprotein expression before and during differentiation of human dental papilla mesenchymal cells. **Int J Immunopathol Pharmacol**. Silviu;12(3):309-318, Apr-Jun. 2008.
78. THESLEFF, I. ; TUMMERS, M. Root or crown: a developmental choice orchestrated by the differential expression of stem cell niche in the tooth of two rodent species. **Development**, Cambridge, v.130, n.6, p.1253-1262. 2003.
79. THESLEFF, I. ; TUMMERS, M. Stem cells and tissue engineering: prospects for regenerating tissues. **Princ Pract**, Basel, v.12 Suppl 1, p.43-50. 2003.
80. TOLEDO, O. A; LEAL, S. C. **Crescimento e Desenvolvimento**. In: _____. **Odontopediatria: Fundamentos e Prática Clínica**. 3. ed. São Paulo: Editorial Premier; 2005
81. WALKER MR, PATEL KK, STAPPENBECK TS. The Stem Cell Niche. **J Pathol**. London, 217(2):103-112. 2003.
82. WEI X, *et al.* Expression of mineralization markers in dental pulp cells. **J Endod**, , Chicago, v.33, n.12, p.1173-1176. 2007.
83. WOODS EJ, *et al.* Optimized cryopreservation method for human dental pulp-derived stem cells and its application to cell banking and clinical use. **Cryobiology**, New York , 59 (2):150-7. Oct, 2009
84. YAN X, *et al.* iPS cells reprogrammed from mesenchymal-like stem/progenitor cells of dental tissue. **PLoS One**. Larchmont, 2009 Oct 1. [Epub ahead of print]
85. YANG X, *et al.* The odontogenic potential of STRO-1 sorted rat dental pulp stem cells in vitro. **J Tissue Res Clin Exp**. Chichester, 1(1):66-73. Jan-Fev, 2007
86. YANG X, *et al.* Multilineage potential of STRO-1 sorted rat dental pulp stem cells in vitro. **J Tissue Res Clin Exp**. Chichester, 1(1):74-82. Jan-Fev, 2007

Chichester, 1(2):128-35. Mar-Apr, 2007

87. YILDIRIM S, *et al.* The role of dental pulp cells in resorption of deciduous teeth. **Oral Surg Oral Maxillofac Radiol Endod.** St Louis, 105(1):113-20. Jan, 2008
88. YOSHIHARA T, *et al.* Effect of serial extraction alone on crowding: spontaneous changes in dentition. **Am J Orthod Dentofacial Orthop.** St Louis, 118(6):611-6. Dec, 2000
89. YU J, *et al.* Odontogenic capability: bone marrow stromal stem cells versus dental pulp stem cells. **J Dent Res.** 99(8):465-74. Aug, 2007
90. ZANDSTRA PW, LAUFFENBURGER DA, EAVES CJ. A ligand-receptor signaling threshold model for hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation control: a biologically conserved mechanism applicable to hematopoiesis. **Blood.** 96(1):1-11. Aug, 2000.
91. ZHENG Y, *et al.* Stem cells from deciduous tooth repair mandibular defect in swine, **J Dent Res.** 88(3):315-21. Mar, 2009
92. ZHAN X, *et al.* Functional antigen-presenting leucocytes derived from human embryonic stem cells. **Cell.** 117(3):364:163–171. 2004

Anexo

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

RESOLUÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa e a Comissão de Pesquisas da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul analisaram o Projeto:

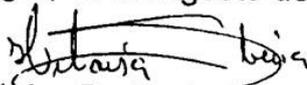
Número: 296/08

Título: EXPRESSÃO DE STRO-1 E OCT-4 NAS CÉLULAS PROVENIENTES DA POLPA DENTAL DE DENTES DECÍDUOS HÍGIDOS EM ESTÁGIO DE RIZÓLISE APÓS CULTIVO IN VITRO.

Investigador(es) principal(ais): Professora Anna Chistina Medeiros Fossatti e CD. Lisiane Bernardi.

O Projeto foi aprovado na reunião do dia 14/08/2008, Ata nº 08/08 do Comitê de Ética em Pesquisa e da Comissão de Pesquisas, da UFRGS, por estar adequado ética e metodologicamente de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

Porto Alegre, 15 de agosto de 2008.



Prof^a. Heloisa Emília Dias da Silveira
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisas



Prof^a. Deise Ponzoni
Coordenadora da Comissão de Pesquisas

Apêndice

Apêndice 1 – Termo de Doação de Material Biológico

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA – NÍVEL MESTRADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA ODONTOPEDIATRIA**

Termo de Doação de Material Biológico

Expressão de STRO-1 e OCT-4 nas células provenientes da polpa de dentes decíduos hígidos em estágio de rizólise após cultivo *in vitro*.

Pesquisas recentes têm indicado que existem células-tronco no nervo do dente de leite. A grande vantagem do uso do nervo do dente de leite para a obtenção destas células-tronco é que os dentes utilizados iriam cair naturalmente. Ainda são necessários mais estudos para compreender melhor as características dessas células e, sendo assim, o objetivo deste estudo é realizar o cultivo das células do nervo do dente de leite que já foi extraído e avaliar a existência de duas moléculas (STRO-1 e OCT-4) na superfície destas células.

Toda e qualquer dúvida será esclarecida pelos envolvidos nesta pesquisa. Fica, ainda, assegurada a liberdade dos responsáveis pelo paciente, recusarem-se a participar do estudo. Não haverá nenhuma alteração no tratamento da criança e não será necessária sua participação futura em nenhum momento da pesquisa.

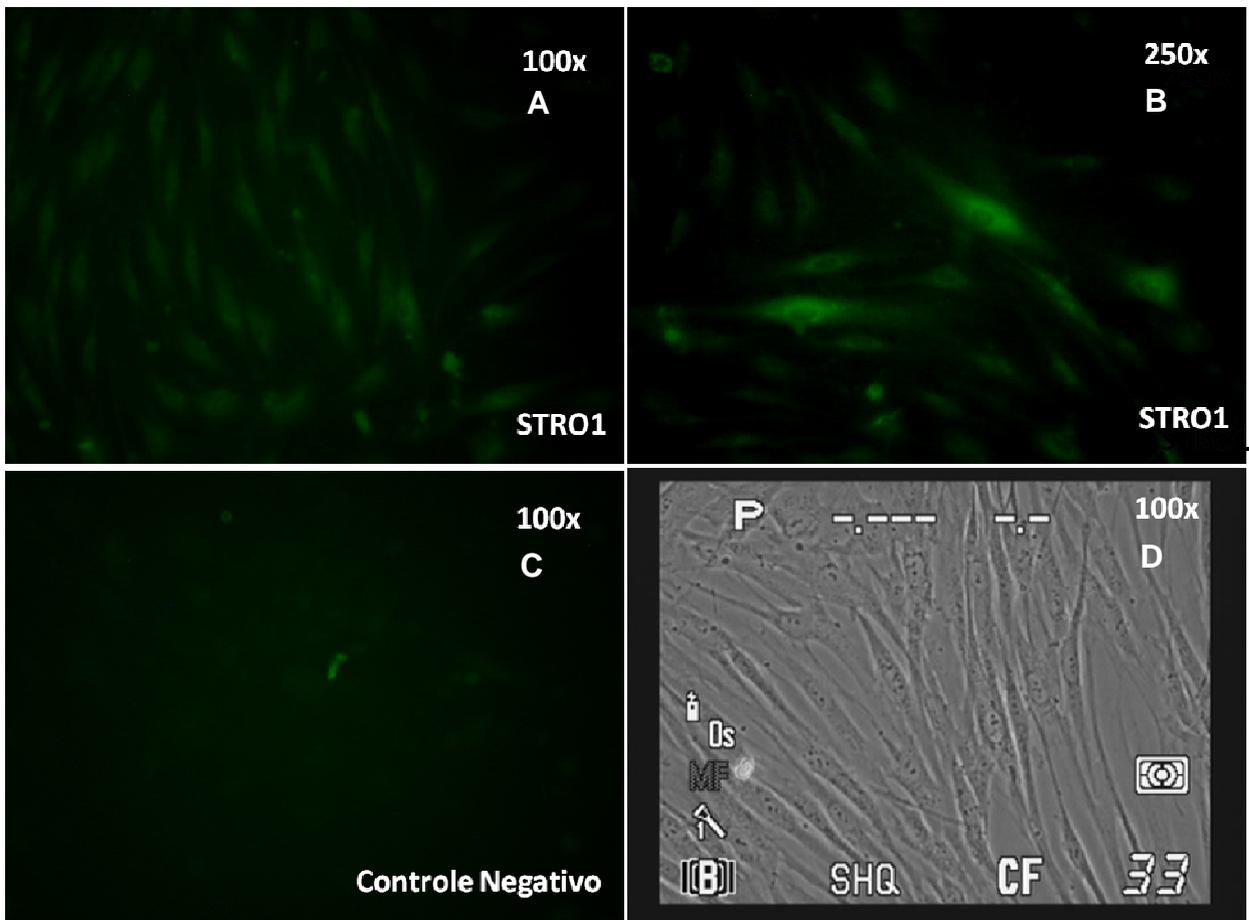
Eu, _____ como responsável pelo(a) menor _____, declaro que fui informado dos objetivos e procedimentos que serão realizados nesta pesquisa, tendo lido e compreendido integralmente as informações acima antes de assinar este termo, não restando dúvidas quanto ao conteúdo deste documento. E, dessa forma, autorizo meu (minha) filho (a) ou criança pela qual sou responsável a participar do estudo, estando disposto (a) a trazê-lo (a) nas consultas marcadas, assim como, doar seu dente de leite depois da extração.

Porto Alegre, ____ de _____ de 2008.

Responsável pelo Participante
RG: _____

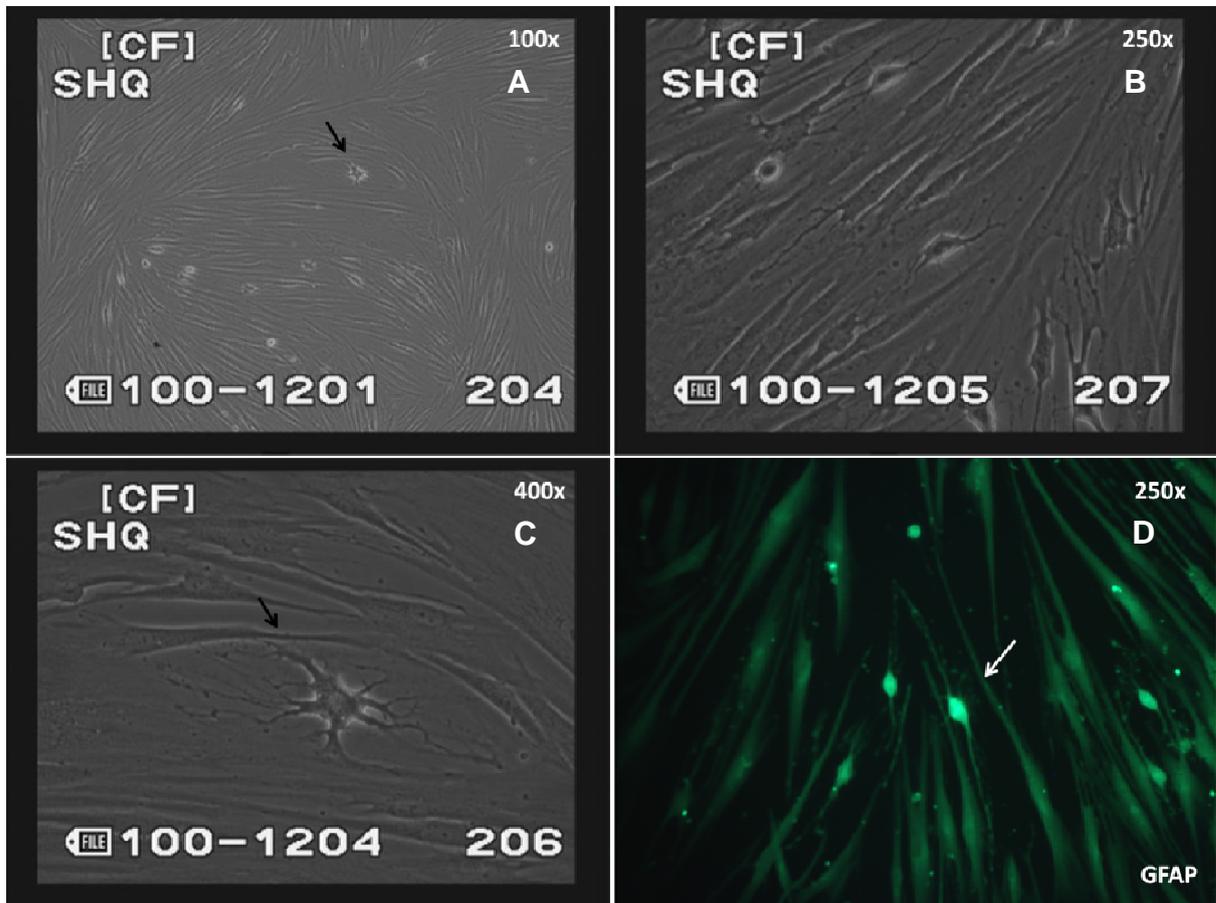
Pesquisador Responsável: Lisiane Bernardi
RG: 1072561051
Telefones de contato: (51)3308-5024
(51) 93279309

Apêndice 2 – Imunoistoquímica para STRO-1



Verificação (presença/ausência) da expressão de STRO-1 em culturas de células pulpares de dentes decíduos hígidos em processo de reabsorção na 10^a passagem. (A e B) imunofluorescência positiva para STRO-1 foi visualizada nas culturas submetidas à incubação com anticorpo primário feito em camundongo anti-STRO-1 humano (1:100) e anticorpo secundário com FITC feito em coelho anti camundongo (1:500) (C) células pulpares incubadas apenas com o anticorpo secundário com FITC feito em coelho anti camundongo (1:500) foram utilizadas para controle negativo. (D) morfologia semelhante a fibroblastos das células verificadas em microscópio invertido.

Apêndice 3 – População submetida à diferenciação neurogênica



Culturas de células pulpares de dentes decíduos hígidos em processo de reabsorção foram testadas na 5ª passagem para a habilidade de diferenciação neurogênica *in vitro*. (A-C) após a indução ao meio neurogênico por 10 dias, as células apresentaram morfologia semelhante àquela encontrada em cultura primária de células do sistema nervoso central. (D) imunofluorescência positiva foi verificada na cultura submetida a incubação com o anticorpo primário feito em camundongo anti-GFAP humano (1:500) e anticorpo secundário com FITC feito em coelho anti camundongo (1:1000). Na seta branca imunomarcagem de astrócito (alta positividade para GFAP).

Apêndice 4 – Soluções de Uso no Laboratório e Protocolos

Meio Base

Reagentes

- Pó de DMEM para 1L
- 2,5g de HEPES
- 3,7g de Bicarbonato de Sódio
- 1L de água milique autoclavada

Materiais ***

- Béquero de 2L
- 1 balão volumétrico de 1L
- 1 peixinho
- 1 agitador magnético
- 1 filtro para 1L (500ml x 2)
- 1 bomba de vácuo
- pHmetro
- 1 vidro de 500ml

*** todos os materiais devem estar estéreis

No laboratório, colocar no béquer sob agitação o DMEM + HEPES + Bicarbonato com aproximadamente 1000ml de água milique. Medir e ajustar o pH (deve estar por volta de 7.2). Na capela, completar para 1000ml com o balão volumétrico e depois filtrar. Armazenar na geladeira, identificando o nome da solução, a data, o pH e a que experimento pertence.

Solução Balanceada de Hank's 1x

Reagentes

- 100ml de Solução Balanceada de Hank's 10x
- 900ml de água milique autoclavada
- 3,7g de Bicarbonato de Sódio

Materiais ***

- Béquero de 2L
- 1 balão volumétrico de 1L
- 1 peixinho
- 1 agitador magnético
- 1 filtro para 1L (500ml x 2)
- 1 bomba de vácuo
- pHmetro
- 1 vidro de 500ml

*** todos os materiais devem estar estéreis

No laboratório, colocar no béquer sob agitação o Hank's 10x + Bicarbonato com aproximadamente 900ml de água milique. Medir e ajustar o pH (deve estar por volta de 7.2). Na capela, completar para 1000ml com o balão volumétrico e depois filtrar. Armazenar na geladeira, identificando o nome da solução, a data, o pH e a que experimento pertence.

Tripsina

Utilizar 1ml de Tripsina (alíquota congelada) com 19ml da solução preparada de Hank's 1x.

Meio de Cultivo Suplementado

Reagentes

- Meio de Cultivo Base
- Penicilina/Estreptomicina (100.000UI/ml e 10.000mg/ml)
- Gentamicina (80mg)
- Soro Fetal Bovino

Materiais ***

- Pipetas de 25ml
- Micropipetas de 1000 μ L
- 1 vidro estéril de acordo com o volume do meio a ser feito

*** todos os materiais devem estar estéreis

Na capela, misturar os reagentes conforme as proporções do quadro abaixo.

		Meio Base	Penicilina/ Estreptomicina	Gentamicina	Soro Fetal Bovino
Volume de Meio Final	50ml	44,5 ml	0,5ml	56,2 μ L	5ml
	100ml	89 ml	1ml	112,4 μ L	10ml
	200ml	178 ml	2ml	224,8 μ L	20ml
	300ml	267 ml	3ml	337,2 μ L	30ml
	400ml	356 ml	4ml	449,6 μ L	40ml
	500ml	445 ml	5ml	562,0 μ L	50ml

Observação: este meio também é usado para o transporte dos dentes.

Soluções Estoque para Meios de Diferenciação

MATERIAL	PM	SOLUÇÃO MÃE []	FORMULA	ALÍQUOTAS para 9ml de meio	[] NO MEIO	°C
Asap Osteogênica Acido Ascorbico 2-fosfato	289,5g		0,0500g + 10mL de Meio Base	10µL	1µL/mL	4°C
Asap Condrogênica Acido Ascorbico 2-fosfato	289,5g	100nM	1) 0,0029g + 100mL ⇨ 2) pegar 1mL da solução acima e completar qsp para 10mL	45µL/ml	5µL/mL	4°C
β-Glicerosfosfato	315,19g	.	0,6300g + 20mL de Meio Base	1mL	1mL/10mL	4°C
Dexametasona Osteogênica	392,47g	2,5x10 ⁻³ M	0,0012g + 1,223µL de Etanol	3x de 10µL	10µL/3mL 10 ⁻⁵ M	-20°C
Dexametasona Adipogênica	392,47g	10 ⁻⁵ M	Diluir 10µL da Solução de Dexametasona Osteogênica (acima) em 2,5mL de Meio Base	30µL/ml	10µL/3mL 10 ⁻⁷ M	-20°C
Insulina de Pâncreas Bovino ⇨ Adipogênica	5,734g	2,5mg/mL	0,0025g + 1mL de água miiique ⇨ Aceptar pH ≤ 3 com HCl	9µL	1µL/mL	-20°C
Insulina de Pâncreas Bovino ⇨ Condrogênica	5000U/0,25mL	5U/µL		22,5µL	2,5µL/mL	-20°C
Heparina Sódica	357,8g		Diluir com agua miiique qsp 1mL	18µL	10mM/mL 2µL/mL	15°C
Indometacina	357,44g (Base Livre)	3,5mM	0,0036g + 1mL de DMSO	45µL	5µL/mL	15°C
Rosiglitazona	357,44g (Base Livre)	3,5mM	0,0125g + 10mL de DMSO	13,5µL	1,5µL/mL	-20°C
Tgfb	2µg/mL	10ng/mL	Reconstituir com 200µL de água miiique ⇨ sempre 100µL de água das µg mL.	9µL	1µL/mL	-20°C

Tampão Colagenase – Parte 1

Parte 1				
MATERIAL	[]	PM	SOLUÇÃO MÃE (1 M) para 100ml	DILUIÇÃO P/ 100ml A partir da solução mãe
HEPES	25 mmol/L	260,3g	26g - 100ml	2,5mL - Sol. Mãe
Fosfato de sódio mono-básico (NaH_2PO_4)	10 mmol/L	137,99g	13,79g/100mL	1mL - Sol. Mãe
Cloreto de sódio (NaCl)	100mmol/L	58,44g	5,84g/100 mL	10mL - Sol. Mãe
Fosfato de potássio (KH_2PO_4)	3 mmol/L	136,09g	13,6g/100 mL	0,3mL - Sol. Mãe
Cloreto de cálcio (CaCl_2),	1 mmol/L	147,02g	14,7g/100 mL	0,1mL - Sol. Mãe
Cloreto de potássio (KCl)	24 mmol/L	74,56g	7,45g/100 mL	2,4mL - Sol. Mãe
Manitol	12 mmol/L	182,17g	18,21g/100 mL	1,2mL - Sol. Mãe

[] = Concentração

PM = Peso Molecular

Fazer a diluição em qsp 90 mL com água milique.

Todas as soluções foram autoclavadas (Soluções mãe e Solução Intermediária).

Ao fim, acrescentar para o uso a 11,25 μ L de gentamicina (80mg).

Identificar e armazenar na geladeira.

Tampão Colagenase – Parte2

Parte 2		
MATERIAL	CONCENTRAÇÃO	QUANTIDADE para 10ml
Glicose	0,5% (peso/volume)	0,05g
Albumina de soro bovino	0,2% (peso/volume)	0,02g ou 400 μ L
Colagenase bacteriana	0,2% (peso/volume)	0,02g

Completar com água milique autoclavada qsp 1ml.

Completar com 9ml da solução intermediária.

Filtrar com milipore adaptado a uma seringa.

Fazer alíquotas de 1ml.

Identificar e armazenar no freezer (- 20 °C).

Isolamento do Tecido Pulpar e Digestão

Material

- 1 descarte biológico
 - 1 falcon de 15ml
 - 1 placa de 12 poços
 - Lâmina de bisturi número 11
 - 1 laje de vidro
 - 1 colher de dentina pequena (17 ou menor)
 - 1 condensador bidigital
 - Gaze estéril
 - 1 eppendorf de tampão collagenase ***
 - Micropipeta de 1000 μ L e tips respectivos
 - Pipeta de Pauster
 - Meio de Cultura Suplementado pronto (temperatura ambiente)
- *** retirar do congelador cerca de 10 minutos antes e deixar em temperatura ambiente (não em banho-maria)

NA CAPELA

1. Transferir a collagenase do eppendorf para o falcon de 15ml (caso não tenha microcentrífuga para eppendorf).
2. Retirar o dente do meio de transporte e remover o tecido pulpar com o auxílio dos instrumentos odontológicos. Cuidar para ficar apenas tecido pulpar, sem lascas de dentina. Deixar o tecido na laje de vidro.
3. Cortar o tecido pulpar em vários fragmentos com a lâmina 11.
4. Colocar os fragmentos no tampão collagenase.
5. Limpar a capela e ligar a
6. UV da capela e da sala para a próxima etapa.

NO LABORATÓRIO

1. Colocar o falcon no banho-maria por 1 hora em 37⁰C.
2. Ligar a centrífuga ajustando a temperatura para 4⁰C e o tempo para 1 hora. A centrífuga irá demorar todo esse tempo para atingir os 4⁰C.
3. Terminado o tempo do banho-maria, estando adequada a temperatura da centrífuga, colocar o falcon na centrífuga por 10 minutos em 800g, para formar pellet.

NA CAPELA

1. Retirar o sobrenadante e manter o pellet. Cuidado!!!
2. Acrescentar 1ml do Meio de Cultivo Suplementado ao pellet e ressuspender até que o pellet esteja completamente dissolvido (ou o máximo possível). Precisa-se acrescentar mais 1 ml.
4. Transfira o Meio + Células do pellet para a placa de 12 poços e acrescente Meio até atingir o volume total final de 2,5ml.

**COMBINAÇÕES DE ANTICORPOS USADOS PARA A ANÁLISE
POR CITOMETRIA DE FLUXO**

CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

TUBOS	Amostra	FITC	PE	7AAD
01	Células			
02	Células	CD44		
03	Células		CD29	
04	Células			7AAD
05	Células	Controle IgG	Controle IgG	7AAD
06	Células	CD44	CD29	7AAD
07	Células	CD45	CD29	7AAD
08	Células	CD90	CD29	7AAD
09	Células	Mel CAM	CD34	7AAD
10	Células	STRO-1	CD117	7AAD
11	Células	HLA-DR	CD133	7AAD
12	Células	CD44	CD184	7AAD

PROTOCOLO DE CITOMETRIA DE FLUXO PARA CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

Materiais e Reagentes

- Pellet de Células (10^5 - 10^6)
- Tubos para citometria
- PBS
- Falcon de 15mL
- Anticorpos
- Pipetas
- 7AAD
- Micropipetas
- Estante
- Descarte

*** o pellet de células será transportado com 5mL de meio de cultura.

*** não esquecer-se do quadro de citometria com a relação dos anticorpos

*** número de células por tubo: ~100.000 (se houver, mas pode ser menos)

*** número de células para adquirir: ideal que o mínimo seja 10.000 eventos

Soluções

a) 7AAD

Solução Mãe	Solução de Uso [10x]	Solução Final
1mg/1000 μ L	10 μ g/1000 μ L	1 μ g/1000 μ L

SOLUÇÃO DE USO		
TUBOS	Solução Mãe	PBS
10	5 μ L	495 μ L
20	10 μ L	990 μ L
30	15 μ L	1485 μ L
40	20 μ L	1980 μ L

Solução de Células	Solução de Uso do 7AAD
450 μ L	50 μ L

*** 7AAD será 10% do volume final da solução de células + 7AAD

Células e Anticorpos

1. Ressuspender as células no meio de cultura
2. Remover o volume de meio com a [] desejada de células/ μL

Obs: o volume deve conter:

$$\begin{array}{c} \text{(Número de células desejado para cada tubo)} \\ \times \\ \text{(o número de tubos + 2)} \end{array}$$

3. Colocar este volume em um falcon de 15mL
4. Completar com PBS qsp 13mL
5. Centrifugar por 10' a 1500rpm (centrífuga do GHC)
6. Remover o volume de PBS suficiente para manter o volume com a [] desejada de células/ μL .
Obs: igual ao volume obtido no cálculo do item 2
7. Colocar 100 μL do volume de células em cada tubo
8. Acrescentar os anticorpos, sendo 5 μL de cada por tubo
9. Incubar por 30' à 4°C no escuro
10. Acrescentar 1000 μL de PBS nos tubos
11. Centrifugar por 10' a 1500rpm (centrífuga do GHC)
12. Remover 650 μL do PBS (cuidando para não tocar no fundo do tubo, onde estará o pellet de células). Assim, no tubo restará **450 μL** da **Solução de Células** (células marcadas com anticorpo + PBS)
13. Pelo menos 15 minutos antes da leitura, acrescentar **50 μL** da **Solução de Uso de 7AAD**
14. Sempre passar o tubo no vórtex antes da leitura no Citômetro

PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE RNA

Materiais

- Luvas
- Micropipetas
- Tips
- Estante
- Descarte
- Eppendorfs

Reagentes

- Trizol
- Clorofórmio
- Álcool Isopropílico
- Álcool Etílico 75%
- Água tratada (DEPC)

*** Usar sempre luvas, até para pegar os reagentes da geladeira;

*** Desligar o ar condicionado, para não levantar poeira;

*** Limpar a bancada com álcool 70°C;

*** Fazer todos os passos à temperatura ambiente (15-30°C);

*** Preparar o banho seco a 65°C

*** Tempo de Experimento: 1h30min - 2h

PROTOCOLO

1. Adicionar 1,0mL de Trizol (que deve estar à temperatura ambiente) para $5 \cdot 10^6$ a $1 \cdot 10^7$ células (em pellet) em um eppendorff de 1,5mL. Lisar as células agitando no vortex. (partimos do pressuposto que temos essa quantidade de células).

2. Poderemos manter a -20C nesta etapa. Se for por um período longo, o ideal é que se faça com a solução RNA Holder (Bioagency).

3. Incubar por 7' minutos (deixar parado à temperatura ambiente).
4. Adicionar 200 μ L de clorofórmio (para pipetar é difícil porque ele tem baixa tensão superficial e escorre com muita facilidade). Evitar inalar.
5. Agitar vigorosamente com a mão por 15" segundos (se formar uma espuma não tem problema, pois estamos removendo as gorduras).
6. Incubar 2-3' minutos (deixar parado na bancada por 2-3' à temp. ambiente). Centrifugar a não mais de 12.000g (~12.000 rpm na nossa centrífuga) por 15' minutos, 2-8°C.
7. Transferir a fase aquosa (incolor), de 100 em 100 μ L (pode ser até menos quando estiver chegando próximo da interfase) com o auxílio de pipetador, para novo eppendorff (1,5mL), evitando tocar ou perturbar a interfase. Se por acaso notar que se pipetou a "sujeira" de interfase, pode devolver e aproveitar só o que é incolor.
8. Adicionar 500 μ L de álcool isopropílico. Serve para remover os resíduos de clorofórmio. Vai ocorrer a precipitação do RNA. Tipo um novelo de lã branco (que não se enxerga).
9. Incubar por 10' minutos (deixar parado na bancada à temperatura ambiente) e centrifugar por não mais de 12.000g /10' minutos / 2-8°C (12.000 rpm na nossa centrífuga). CUIDAR a colocação do eppendorff na centrífuga. Colocá-lo com a alça para fora de tal forma que o pellet, se forme na parede oposta à alça, na porção inferior.

10. Desprezar o sobrenadante, cuidando a localização do pellet (que as vezes se enxerga e outras não). É só virar de cabeça para baixo, na pia, só uma vez.

11. Adicionar 1,0mL de álcool etílico 75%, para remover os resíduos de sal (CONGELAR AQUI, SEGUNDO O ANDRÉS É MELHOR a -20°C). Vortexizar e centrifugar a 7500g (10.000 rpm na nossa centrífuga)/ 5' minutos/ $2-8^{\circ}\text{C}$.

12. Remover o sobrenadante, cuidando a orientação do pellet. Deixar o eppendorff de cabeça para baixo sobre um papel filtro estéril ou papel toalha para secar ao ar por 10' minutos (pode ser na capela se não tiver sendo utilizada).
Obs. Depois de seco não enxergávamos mais o pellet. Dissolver em água tratada DEPC (20 μL) dando petelecos no tubo e incubar 10' minutos a 65°C (banho seco) e colocar imediatamente em gelo e após armazenar a -20°C freezer o que dura poucas semanas ou a -80°C que é mais indicado, mas mesmo assim se perde material. Só fazer esta etapa quando for continuar o trabalho em poucos dias porque o RNA se degrada em pouco tempo. O aquecimento serve para inativar qualquer enzima e o RNA aquecido se lienzará (fita simples). Se o pellet for pequeno só se coloca 10 μL de água DEPC.

SÍNTESE DE cDNA SuperScript III (Invitrogen)

1. Selecionar o programa no termociclador o programa cDNA e colocar as temperaturas descritas conforme o fabricante. No caso do SuperScript III seria:

Ciclo 1	65°C	5 minutos
Ciclo 2	50°C	50 minutos
Ciclo 3	85°C	5 minutos

2. Misturar brevemente na centrífuga os componentes antes usados.
3. Combiná-los:

a) 2µg de RNA total	n µL
b) OligodT	1µL
c) Tampão de anelamento	1µL
d) Água livre de RNase/DNase	q.s.p 8µL

4. Incubar no ciclo 1
5. Acabado o ciclo 1, colocar imediatamente no gelo por no mínimo 1 minuto
6. Colocar 10µL do Tampão do "Reaction Mix" e 2µL da "Enzyme Mix"
7. Passe no vórtex brevemente e centrifugue de igual maneira
8. Incubar no ciclo 2
9. Incubar no ciclo 3
10. Estocar a -20°C ou prossiga diretamente para o PCR.

PROTOCOLO PARA PCR do OCT4

1. Trabalhar com o ar condicionado desligado;
2. Até para pegar os reagentes, colocar as luvas;
3. Dar um speen em todos os reagentes antes de usá-los;
4. Usar sempre uma ponteira para cada reagente.
5. Colocar o número nos eppendorffs: 1 é o teste e normalmente o 2 é o controle negativo
6. Pipetar primeiro a água para se ter um volume maior e facilitar a colocação dos demais reagentes, de forma que eles não se perdam na parede do eppendorff (pequenininho de 500 μ L)
- 7.

Reagentes	Teste	Controle negativo
H ₂ O	17,3 μ L	18,3 μ L
Primer 1	1 μ L	1 μ L
Primer 2	1 μ L	1 μ L
dNTP 10mol/ μ L	1 μ L	1 μ L
Tampão 10X	2,5 μ L	2,5 μ L
MgCl ₂ 50mM	1 μ L	1 μ L
cDNA (tirar do freezer bem na hora de usar) É o penúltimo a ser pipetado	1 μ L	—
Taq 5U/ μ L (pipetar por último)	0,2 μ L	0,2 μ L
Total	25 μ L	25 μ L

8. Após a pipetagem dos reagentes, dar um speen.

	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação Inicial	94°C	3 minutos	-
	94°C	45 segundos	40 ciclos
	62°C	45 segundos	
	72°C	45 segundos	
Extensão Final	72°C	3 minutos	-

9. Correr o gel com os produtos finais do PCR

GEL DE AGAROSE

Materiais

- Balança
- Colher
- Rolopack
- Caixinha molde para o gel
- Pentes para a caixinha (poços)
- Erlemeyer
- Proveta
- Microondas
- Fita crepe

Reagentes

- Agarose Bioagency (tampa e rótulo amarelo)
- TBE 0,5x
- Brometo de Etídio (frasco com alumínio)

Protocolo - Gel a 1,5%

1. Vedar a caixinha molde nas laterais
2. Testar o pente, para ver se não encosta no fundo



3. Pesar 0,37g de agarose no erlemeyer
4. Medir 25mL de TBE 0,5x na proveta
Obs: para gel maior, deve ser 35mL e 0,52g de agarose
5. Misturar 1 e 2
6. Tampar com rolopack, fazendo furinhos e levar para o microondas
7. Deixar 30 segundos no microondas. Deve deixar até ferver.
Obs: quando fizemos, foram deixados 45 segundos no total
Obs': se geleificar, colocar no microondas novamente
8. Após sair no microondas adicionar 10 μ L de Brometo de Etídio (1 μ g/mL) no erlemeyer
9. Agitar pouco, para não dar bolhas
10. Dispenser na caixinha molde
11. Colocar o pente
12. Esperar cerca de 20 a 30 minutos para geleificar

Eletroforese

Materiais

- Gel de agarose
- Fonte

Reagentes

- DNA/RNA amplificado (Saiu do termociclador)
- Xileno de Cianol (migra mais lento)

Protocolo Eletroforese

1. Pólo vermelho = POSITIVO
2. Pólo preto = NEGATIVO
3. Coloco o gel no pólo negativo, pois o DNA é negativo
4. Pipetar no poço 20 μ L do que saiu do termociclador
5. Acrescento 2,5 μ L de Xileno Cianol (o total no poço e de 25 μ L)
6. Deixar o gel coberto de tampão
7. Ligar no botão vermelho e ajustar a voltagem em 100volts
Obs: se precisar sair, deixar < 100volts
8. Ao desligar: primeiro desliga a voltagem e depois desliga o botão vermelho