

DANIELA FERREIRA ARAÚJO

**ESTUDO DA VIABILIDADE E DO POTENCIAL DE UTILIZAÇÃO DA POLPA
DENTÁRIA COMO FONTE DE CÉLULAS-TRONCO**

**BRASÍLIA
2011**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

DANIELA FERREIRA ARAÚJO

**ESTUDO DA VIABILIDADE E DO POTENCIAL DE UTILIZAÇÃO DA POLPA
DENTÁRIA COMO FONTE DE CÉLULAS-TRONCO**

**Dissertação apresentada como requisito parcial
para a obtenção do Título de Mestre em Ciências
da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação
em Ciências da Saúde da Universidade de
Brasília.**

**Orientadora: Prof^a. Dr^a Ana Cristina Barreto Bezerra
Co-orientador: Prof Dr. Ricardo Bentes de Azevedo**

**BRASÍLIA
2011**

DANIELA FERREIRA ARAÚJO

**ESTUDO DA VIABILIDADE E DO POTENCIAL DE UTILIZAÇÃO DA POLPA
DENTÁRIA COMO FONTE DE CÉLULAS-TRONCO**

**Dissertação apresentada como requisito parcial
para a obtenção do Título de Mestre em Ciências
da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação
em Ciências da Saúde da Universidade de
Brasília.**

Aprovada em 04/02/2011

BANCA EXAMINADORA

**Ana Cristina Barreto Bezerra (presidente)
Universidade de Brasília**

**Jacy Ribeiro de Carvalho Júnior
Universidade de Brasília**

**Maria do Carmo Machado Guimarães
Universidade de Brasília**

**Suplente:
Soraya Coelho Leal
Universidade de Brasília**

*Dedico esse trabalho a meus pais
pelo amor incondicional.*

AGRADECIMENTOS

À Luciana Oliveira Pereira, pelo afeto e pelas brilhantes idéias e ensinamentos.

À minha irmã, Taciana, pelos exemplos de vida.

Ao Guilherme Morum, pela excelência no trabalho e pelo apoio imprescindível.

Ao meu noivo, Hercules, pelo amor, companheirismo, respeito e incentivo.

Aos meus pais, Tarcísio e Vera Lúcia, pelo carinho e dedicação à família.

À minha irmã, Fernanda, pela feliz convivência e amizade.

À minha orientadora, Prof. Dra. Ana Cristina Barreto Bezerra pela oportunidade, solicitude e pelos valiosos ensinamentos repassados desde a graduação.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Ricardo Bentes de Azevedo, pela oportunidade de integração interdisciplinar.

À bioestatística Dra. Izabel Cristina R da Silva, pelo empenho, prestatividade e disponibilidade.

Aos cirurgiões-dentistas, Marconi Tavares, Tiago Moura de Almeida, Durval Melo e Valéria Martins, pelo profissionalismo e pela colaboração.

A todos os meus colegas do laboratório pelos conhecimentos compartilhados.

Aos meus familiares por serem pessoas tão especiais.

À Universidade de Brasília e a todos os mestres pela minha formação acadêmica.

"A ciência nos traz conhecimento; a vida, sabedoria".

(Will Durant)

RESUMO

A polpa dentária, por ser fonte de células-tronco multipotentes, tem merecido inúmeras pesquisas para se conhecer melhor suas características. Este estudo teve como objetivo sistematizar os conhecimentos, avanços científicos, limitações e perspectivas relacionados à aplicação de células-tronco de tecido pulpar (Artigo 1: “Células-tronco da polpa dental- Atualidades e perspectivas”); e avaliar se os dentes extraídos e mantidos em temperatura e pressão ambientes por diferentes períodos de tempo ainda apresentavam suas células viáveis (Artigo 2: Cultura de células de polpa dental humana após diferentes períodos pós-exodontia). O Artigo 1 foi resultado de uma revisão da literatura que incluiu artigos que abordavam os tópicos relacionados ao desenvolvimento das possibilidades de utilização da polpa dentária para cultivo e viabilidade de células-tronco. No Artigo 2, foi realizado trabalho experimental com utilização de 21 dentes permanentes hígidos, divididos em 5 grupos de acordo com o tempo aguardado para colocação da polpa em meio de cultura após a exodontia. Os tempos testados foram: imediatamente; 30 minutos, 1 hora, 2 horas e 5 horas. Realizou-se análise morfológica, ensaio de MTT e contagem celular para efeito de comparação da viabilidade celular. O comportamento de todos os grupos foi semelhante. Concluiu-se que as possibilidades de uso e o potencial regenerativo das células do tecido pulpar são vastos, e por isso, é importante a atualização dos conhecimentos, avanços científicos, limitações e perspectivas relativos à sua aplicação (Artigo 1). Além disso, as conclusões sobre a viabilidade das células pulpares após a exodontia são que aguardar até 5 horas para remover o tecido pulpar e estabelecer a cultura não impede a proliferação celular (Artigo 2).

Palavras- chave: polpa dentária; células da polpa dental; viabilidade celular; cultura celular; excrecência.

ABSTRACT

Dental pulp, as a source of multipotent stem cells, has motivated numerous researches to better understand its characteristics. The study aimed to systematize knowledge, scientific advances, limitations and perspectives related to the application of stem cells from pulp tissue (Article 1: "Dental pulp stem cells- Update and perspectives"); and to evaluate whether the extracted teeth that were maintained in ambient temperature and pressure for different periods of time would still present their cells viable (Article 2: Culture of human dental pulp cells after different times post-extraction). Article 1 was the result of a review. In Article 2, the experimental research was performed with 21 permanent healthy teeth, which was divided into five groups according to the time projected for placing the pulp into the culture medium after the extraction. The experimental times were: immediately, 30 minutes, 1 hour, 2 hours and 5 hours. Morphological analysis, MTT assay and cell counting were evaluated. The behavior of all groups was similar. It was concluded that the possibilities of use and regenerative potential of dental pulp cells are vast, and therefore the update of knowledge, scientific advances, limitations and prospects for its implementation is important (Article 1). Moreover, conclusions about the viability of pulp cells after extraction is that to wait until 5 hours to remove the pulp tissue and establish a culture does not impair their proliferation (Article 2).

Keywords: dental pulp, dental pulp cells, cell viability, cell culture; outgrowth

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 4- Artigo Científico 2

- Figura 1-** Células pulpaes coradas com Giemsa _____ 36
- Figura 2-** Efeitos do tempo entre a exodontia e a passagem da polpa para o meio de cultura na viabilidade celular, avaliados pelo ensaio de MTT _____ 37
- Figura 3-** Efeito do tempo entre a extração do dente e a passagem da polpa para o meio de cultura na proliferação celular, avaliados pelo método de contagem _____ 38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
BMSC	Célula do estroma da medula óssea (<i>bone marrow stromal cell</i>)
BMSSC	Células-tronco do estroma da medula óssea (<i>bone marrow stromal stem cells</i>)
DMEM	Meio de cultura essencial mínimo modificado por Dulbecco (<i>Dulbecco's modified Eagle`s médium</i>)
DPSC	Células-tronco de polpa dental (<i>dental pulp stem cells</i>)
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
HA/TCP	Hidroxiapatita e B-trifosfato de Cálcio
hDPC	Células pulpares de dente humano (<i>Human dental pulp cells</i>)
IL	Interleucina
MTT	Brometo 3 (4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium
SHED	Células-tronco de dentes decíduos recém-esfoliados de humanos (<i>stem cells from human exfoliated deciduos teeth</i>)
TGF	Fator transformador de crescimento (Transforming growth factor)
TNF	Fator de necrose tumoral (<i>tumor necrotic fator</i>)
UFC	Unidade formadora de colônia

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	
INTRODUÇÃO GERAL _____	11
CAPÍTULO 2	
OBJETIVOS _____	15
2.1 OBJETIVO GERAL _____	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS _____	16
CAPÍTULO 3 - ARTIGO CIENTÍFICO 1	
(CÉLULAS-TRONCO DA POLPA DENTAL- ATUALIDADES E PERSPECTIVAS) _____	17
CAPÍTULO 4 - ARTIGO CIENTÍFICO 2	
(CULTURA DE CÉLULAS DE POLPA DENTAL HUMANA APÓS DIFERENTES PERÍODOS PÓS-EXODONTIA) _____	29
CAPÍTULO 5	
CONSIDERAÇÕES GERAIS _____	43
CAPÍTULO 6	
CONCLUSÕES GERAIS _____	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	49
APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido _____	52
APÊNDICE B - Artigo Científico 1 _____	54
ANEXO A - Documento de aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília _____	63

CAPÍTULO 1
INTRODUÇÃO GERAL

INTRODUÇÃO GERAL

A polpa dentária contém uma população heterogênea de células, dentre elas fibroblastos, células inflamatórias e do sistema imune, nervos, vasos, células perivasculares. É um tecido conjuntivo com capacidade de reagir às agressões dentárias com formação de dentina reparadora por novos odontoblastos. A partir desta constatação, estudos foram conduzidos para mostrar a presença de células indiferenciadas, as chamadas células-tronco (1).

Até o ano 2000, sabia-se que as células da polpa dentária, quando mantidas em cultura, poderiam desenvolver uma aparência de odontoblastos e formar nódulos mineralizados *in vitro*, o que era uma característica atribuída a culturas de osso ou de células de medula óssea, cujas características multipotentes eram conhecidas. As células de estroma de medula óssea (BMSC) apresentavam alta capacidade proliferativa, ao mesmo tempo em que mantinham seu potencial de se diferenciar em múltiplas linhagens de origem mesenquimal, como osteoblastos, condrócitos, adipócitos e, possivelmente, em tecidos muscular e nervoso. Por analogia, o tecido pulpar adulto também deveria conter células multipotentes (1).

As células-tronco provenientes da polpa dentária foram descritas pela primeira vez em 2000 e foram provenientes de terceiros molares humanos, extraídos por razão ortodôntica (1).

Em 2003, foram isoladas células-tronco multipotentes de remanescente pulpar de dentes decíduos naturalmente esfoliados (2).

As células-tronco isoladas, tanto de dente permanente quanto de decíduo, mostraram-se altamente proliferativas e com capacidade de se diferenciarem em uma variedade de tipos celulares (1, 2). Quando transplantadas em camundongos imunocomprometidos, as células-tronco de polpa dentária geraram uma estrutura semelhante à polpa e à dentina com odontoblastos (1); e as células-tronco de dentes decíduos humanos esfoliados se diferenciaram em adipócitos e odontoblastos, induziram formação de osso, de dentina e sobreviveram no cérebro desses animais, produzindo marcadores neurais (2).

As células pluripotentes ou multipotentes são capazes de se diferenciarem em diversos tecidos e, as de polpa, se mostram muito promissoras como ferramentas terapêuticas, pois exibem grande plasticidade e podem ser isoladas e manipuladas de modo reprodutível (1).

Os dentes, naturalmente, oferecem uma fonte de células-tronco em quantidade suficiente para potencial aplicação clínica (2). Para utilização em pesquisa, há a vantagem de as amostras serem acessíveis; diferentemente das células-tronco totipotentes, que são provenientes de células germinais embrionárias derivadas da prega genital do feto de 5 a 10 semanas e também por transferência de núcleo somático em adultos (3).

O estudo de células-tronco totipotentes (ou embrionárias) suscita muitas controvérsias e discussões em âmbito religioso, ético, moral, filosófico e jurídico. Vale ressaltar que, no Brasil, a nova Lei de Biossegurança (Lei nº 11.105, de 24/03/2005) foi publicada para regular as questões controvertidas (3). O fato é que, em 31 de maio de 2005, o Procurador-Geral da República ajuizou ação, no Supremo Tribunal Federal, requerendo a declaração de inconstitucionalidade do art. 5º da Lei nº 11.105/05. No referido processo, alegou-se que o uso de embriões para pesquisa configuraria – supostamente – violação ao direito à vida, protegido pela Constituição Federal. O julgamento contou com a participação intensa da sociedade, por meio da assistência de importantes entidades acadêmicas e religiosas, tais como: Instituto de Bioética, Direitos Humanos e Gênero; Confederação Nacional dos Bispos do Brasil etc. Após suscitar intenso debate na comunidade acadêmica, a discussão jurídica foi encerrada em 09 de agosto de 2010, momento em que transitou em julgado decisão que, por maioria de votos, entendeu constitucional o referido dispositivo normativo.

Com a publicação, em 28/03/2005, da Lei de Biossegurança, passou-se a permitir, no Brasil, para fins de pesquisa e terapia, a utilização de células-tronco embrionárias obtidas de embriões humanos produzidos por fertilização *in vitro* e não usados no respectivo procedimento, atendidas certas condições, tais como: que os embriões sejam inviáveis; ou que sejam embriões que tenham completado três anos de congelamento (cfr. art. 5º da Lei nº 11.105/05) (3); além disso, é proibida a clonagem, tanto terapêutica, quanto reprodutiva.

Muitos países ainda mantêm restrições semelhantes ao Brasil. Nos EUA, por exemplo, as pesquisas com células-tronco embrionárias são permitidas, mas é proibida aplicação de verbas federais em qualquer tipo de pesquisa com células-tronco (3).

Percebe-se que mesmo com todos os avanços jurídicos, as células-tronco totipotentes ainda suscitam dificuldades na prática da pesquisa; e por isso, o

incentivo a fontes de células-tronco pluripotentes ou multipotentes, como são as células de polpa, são justificáveis e importantes.

De fato, as células-tronco pulpares não motivam conflitos éticos ou religiosos sobre o seu uso e pesquisa, porque são utilizados dentes previamente indicados para exodontia, e que seriam descartados. Por isso, muitos cientistas estão sendo estimulados a trabalhar com células-tronco pluripotentes (4, 5).

As pesquisas sobre o assunto têm aumentado significativamente e as inúmeras descobertas ratificam o potencial regenerativo das células pulpares (5,6).

Com tantos conhecimentos produzidos cientificamente é fundamental que se sistematize as informações sobre o tema. Com essa finalidade, no Artigo 1: “Células-tronco da polpa dental- Atualidades e perspectivas” é apresentada uma revisão de literatura, ressaltando as principais pesquisas com células-tronco da polpa dental.

Os eventos biológicos envolvidos no processo de odontogênese devem ser parte do conhecimento geral do clínico, pois as novas biotecnologias são amparadas por esses entendimentos básicos (7).

O uso clínico das terapias com células-tronco somente poderá ser efetivado quando os procedimentos estiverem estabelecidos com eficiência, eficácia e segurança (8). Para isso, as pesquisas são fundamentais, nos seus vários estágios de testes. Sistematizar os conhecimentos e estabelecer protocolos de preservação celular são requisitos que precisam ser estabelecidos para se promover maior factibilidade e acessibilidade no seu uso.

Além disso, é necessário dominar todas as etapas do processo de coleta, armazenamento e diferenciação dessas células. Os trabalhos que relatam terem realizado cultura de células pulpares descrevem que, após a extração dos dentes, a polpa foi imediatamente imersa em meio de cultura (9); ou não mencionam quanto tempo foi levado para se iniciar o processamento do dente (1, 2, 10-12); sugerindo que foi feito imediatamente, como é encontrado na literatura.

E como, na literatura não há relatos das conseqüências imediatas da ruptura do feixe vasculonervoso, o Artigo 2: “Cultura de células de polpa dental humana após diferentes períodos pós-exodontia” descreve uma avaliação da viabilidade celular após diferentes tempos após a exodontia.

CAPÍTULO 2
OBJETIVOS

OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar as células do tecido pulpar, ampliando o conhecimento sobre as possibilidades de uso de seu potencial regenerativo, como fonte de células-tronco.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Sistematizar os conhecimentos, avanços científicos, limitações e perspectivas relativos à aplicação de células-tronco de polpa dentária.
2. Avaliar se dentes extraídos e mantidos em temperatura e pressão ambientes, por diferentes períodos de tempo, ainda apresentariam células pulpares viáveis.

CAPÍTULO 3

ARTIGO CIENTÍFICO 1

Artigo submetido à publicação no *International Endodontic Journal*

CÉLULAS-TRONCO DA POLPA DENTAL- ATUALIDADES E PERSPECTIVAS

D. F. Araújo; L. O. Pereira; R. B. de Azevedo; A. C. B. Bezerra
Universidade de Brasília, Brasil

RESUMO

O número de pesquisas sobre células-tronco da polpa dentária tem aumentado, visando o desenvolvimento de terapias para a regeneração funcional e estética dos tecidos bucais. Nesta revisão de literatura, objetivou-se relatar os avanços científicos e perspectivas na aplicação das células-tronco da polpa dentária. Foram utilizadas as bases de dados: Pubmed, Lilacs e BBO, no período de 2000 a 2010. Verificou-se que, atualmente, é possível isolar células da polpa dentária humana, multiplicá-las e induzir sua diferenciação em vários tecidos; por exemplo, em tecido ósseo, adipócitos, condrócitos, complexo dentino-pulpar, raízes funcionais, dente completo, hepatócitos, folículo piloso, músculo cardíaco, neurônios e até em córnea. No entanto, existem muitos limites que devem ser superados para a aplicação clínica desta biotecnologia que apresenta convidativas perspectivas.

Palavras-chave: células da polpa dental; polpa dental; célula-tronco; célula-tronco de polpa dental; revisão de literatura

INTRODUÇÃO

As células-tronco são muito promissoras na substituição de terapias convencionais por reabilitações mais fisiológicas, baseadas em regeneração e reconstrução tecidual das estruturas perdidas.

Os relatos da literatura mostram que já é possível isolar células-tronco da polpa de dentes permanentes e decíduos, propagá-las em cultura e induzir sua diferenciação em vários tecidos (Gronthos *et al.* 2000; Miura *et al.* 2003).

A primeira cultura com células-tronco de polpa dentária humana (DPSC- sigla do inglês: *dental pulp stem cells*) foi estabelecida em 2000 (Gronthos *et al.* 2000). Células-tronco de dentes decíduos esfoliados de seres humanos (SHED – sigla do inglês: *stem cells from human exfoliated deciduous teeth*) foram isoladas em 2003 (Miura *et al.* 2003).

As pesquisas de isolamento de DPSC não detectaram diferenças que pudessem ser atribuídas à idade ou ao sexo do doador (Laino *et al.* 2006). No entanto, há diferenças quando se comparam dentes decíduos a permanentes (Miura *et al.* 2003), se o dente estava ou não exposto ao meio bucal (Balic *et al.* 2010), as condições pulpares (Wang *et al.* 2010). Essas características podem resultar em diferentes tempos de migração, aderência e proliferação celular, tempos de duplicação distintos, presença de diferentes marcadores celulares (Souza *et al.* 2010). Além de apresentarem potenciais proliferativos e de diferenciação distintos (Nakao *et al.* 2007).

Apesar da grande divulgação de informações sobre as possibilidades de tratamentos baseados em células-tronco, o tema é relativamente novo e ainda requer muito esforço a ser empreendido pela comunidade científica.

Este estudo objetiva sistematizar os conhecimentos, avanços científicos, limitações e perspectivas relacionados à aplicação de células-tronco de polpa dentária.

POLPA DENTAL E CÉLULAS-TRONCO

A polpa dental contém uma população heterogênea de células com funções diferentes, incluindo pulpoblastos, linfócitos, células nervosas, vasculares e perivasculares, macrófagos e células indiferenciadas (células-tronco). A maioria dessas células mantém seu potencial mitótico em tecido adulto e se multiplicam conjuntamente quando cultivadas em cultura.

A separação das células-tronco dos outros tipos pode ser realizada por meio da marcação da superfície da célula com antígenos fluorescentes (Gronthos *et al.* 2003), por meio de análise imunohistoquímica (Mankani *et al.* 2000), por meio de separação magnética com anticorpos ligados às microesferas magnéticas (Yu *et al.*

2007) e por meio do corante fluorescente Hoechst 33342 (Pierdomenico *et al.* 2005; de Mendonça Costa *et al.* 2008).

As DPSC estão envolvidas em importantes respostas imunológicas. Foi demonstrado que, durante uma infecção da polpa dentária, o lipopolissacarídeo bacteriano bem como o fator de necrose tumoral (TNF) ativavam a transcrição do fator nuclear kappa B, que regula vários mediadores inflamatórios, incluindo TNF, IL-1, IL-6 e IL-8 (Chang *et al.* 2005).

No entanto, ficou provado que as células-tronco de polpa dental têm atividade imunomoduladora, sendo capazes de inibir a proliferação de células T (Pierdomenico *et al.* 2005); e também, de não causar rejeição, mesmo quando injetadas em indivíduos de espécies diferentes (de Mendonça Costa *et al.* 2008; Kerkis *et al.* 2008).

Após uma injúria do dente, proteínas da matriz extracelular, em particular, a laminina e promotores de quimiotaxia, como o sphingosine-1-phosphate e o TGF- β 1 (transforming growth factor beta-1) foram considerados sinalizadores para o desenvolvimento dos cabelos e das células T (Klopčic *et al.* 2007), além de serem importantes promotores de migração das DPSC (Howard *et al.* 2010).

A inflamação parece favorecer a mudança fenotípica das células e promover a transdiferenciação de células inflamatórias em progenitores semelhantes a odontoblastos e a osteoblastos. Durante o processo inflamatório, um aumento no número de células da polpa ocorre; porém, não se sabe se isso acontece por causa de uma migração em massa de células inflamatórias ou devido à proliferação de fibroblastos e células-tronco (Goldberg *et al.* 2008).

Em condições de hipóxia, com tensão de oxigênio igual a 3%, as células da polpa dentária proliferaram significativamente mais do que em condições de tensão de oxigênio a 20% (Sakdee *et al.* 2009). Além disso, a hipóxia induziu o fator de crescimento endotelial vascular, e células de respostas pró-angiogênicas para promover a revascularização da polpa dentária hipóxica (Aranha *et al.* 2010). No entanto, foi proposto que as condições de hipóxia poderiam ampliar o número de células progenitoras da polpa dentária humana, mas não favoreceriam a sua diferenciação (Sakdee *et al.* 2009).

As células-tronco foram detectadas em dentes com pulpíte irreversível, mas não se sabe se eles poderiam ser uma fonte endógena de células multipotentes na regeneração de tecidos (Wang *et al.* 2010).

ENGENHARIA DE TECIDOS

A diferenciação celular é uma importante etapa da engenharia de tecidos para se produzir a regeneração e a reconstrução de órgãos.

As células-tronco de polpa dentária já foram diferenciadas em odontoblastos (Gronthos *et al.* 2000; Zhang *et al.* 2006; Cordeiro *et al.* 2008); osteoblastos (Nakamura *et al.* 2005; Pierdomenico *et al.* 2005; Papaccio *et al.* 2006; Govindasamy *et al.* 2010); adipócitos, condrócitos, osteócitos (Miura *et al.* 2003; Balic *et al.* 2010; Govindasamy *et al.* 2010); células nervosas (Govindasamy *et al.* 2010) e hepatócitos (Ishkitiev *et al.* 2010).

In vitro, as células da polpa dentária de molares inclusos mostraram grande potencial osteogênico e dentinogênico e incapacidade de se diferenciar em condrócitos e adipócitos, enquanto as DPSC de molares irrompidos tiveram o potencial osteogênico e dentinogênico diminuídos e a capacidade de se diferenciar em odontoblastos, osteoblastos, adipócitos e condrócitos aumentada (Balic *et al.* 2010).

Materiais naturais e sintéticos foram testados para se criarem matrizes tridimensionais com a morfologia desejada e que promovessem a adesão celular e a difusão de oxigênio e de outros nutrientes. Nesse sentido, destacam-se as fibras colágenas (Huang *et al.* 2006; Zhang *et al.* 2006; Nakao *et al.* 2007; de Mendonça Costa *et al.* 2008), a superfície de dentina (Cordeiro *et al.* 2008; Demarco *et al.* 2010), o pó cerâmico de hidroxiapatita e trifosfato de cálcio (Gronthos *et al.* 2000; Zhang *et al.* 2006) e a malha de titânio fibroso (Zhang *et al.* 2006).

O pó cerâmico tem a vantagem de promover a mineralização devido à sua composição química. As estruturas poliméricas permitiram o crescimento de células com a forma desejada, o que poderia imitar a complexa morfologia dentária (Zhang *et al.* 2006).

Com o objetivo de estabelecer uma possível revitalização de dentes tratados endodonticamente, as DPSC foram cultivadas sobre discos de dentina. As células proliferaram menos que quando cultivadas em placa de cultura. No entanto, fatores relacionados com a dentina pareceram induzir a diferenciação odontoblástica, pois apenas o grupo experimental apresentou morfologia de odontoblastos e processos citoplasmáticos que se estendem para o interior dos túbulos dentinários (Huang *et al.* 2006;. Demarco *et al.* 2010).

Uma vez que a cultura tridimensional é estabelecida, o fornecimento de sangue e de outros fatores de crescimento pode ser obtido por meio da sua transposição para um modelo *in vivo*. Os locais mais utilizados para os transplantes foram a cápsula renal e o tecido subcutâneo de camundongos ou ratos imunodeprimidos (Gronthos *et al.* 2000; Yu *et al.* 2006; Otaki *et al.* 2007; Cordeiro *et al.* 2008).

Usando a engenharia de tecidos e DPSC, foi possível regenerar o complexo dentina-polpa (Yu *et al.* 2006), gerar raízes funcionais (Sonoyama *et al.* 2006) e até mesmo produzir um dente completo (Nakao *et al.* 2007). Além disso, as DPSC foram eficientes na regeneração de tecido ósseo (Nakamura *et al.* 2005; Otaki *et al.* 2007; de Mendonça Costa *et al.* 2008), folículo piloso (Reynolds & Jahoda 2004), músculo cardíaco (Gandia *et al.* 2008), células neuronais (Kadar *et al.* 2009) e epitélio da córnea (Gomes Geraldês *et al.* 2010).

As células mesenquimais foram isoladas da papila dental no final da fase de campânula de germes de incisivos de ratos e incubadas em tubos de polipropileno. Esse transplante foi realizado sob a cápsula renal. Foi produzido um complexo dentina-polpa com odontoblastos, túbulos dentinários e pré-dentina. Os autores sugeriram que, uma vez que não havia componentes epiteliais, na fase de campânula tardia, a interação de epitélio e mesênquima seria desnecessária. (Yu *et al.* 2006). No entanto, as células semelhantes às epiteliais foram isoladas e caracterizadas na polpa de dentes decíduos humanos. Eles apresentaram morfologia epitelial característica e expressaram marcadores epiteliais e genes relacionados a células-tronco epiteliais, tais como ABCG2, IMC-1, DNp63 e p75 (Nam & Lee 2009).

Um dente inteiro foi criado pela bioengenharia utilizando-se uma única dissociação celular derivada de um germe de incisivo de rato. Tecidos epiteliais e mesenquimais foram isolados; e suas células dissociadas e colocadas em alta densidade em gel de colágeno para cultura de órgãos. Em seguida, foi realizado o transplante sob a cápsula renal de rato imunodeprimido. Múltiplos incisivos foram formados *in vitro*. Odontoblastos, dentina, túbulos dentinários, ameloblastos, esmalte, polpa, raiz, vasos sanguíneos, osso alveolar e ligamento periodontal foram devidamente organizados. Ao se repetir a experiência com os germes de molares, foi obtido o mesmo resultado, mas os dentes apresentavam forma de molares. Quando os autores usaram células de um germe de dente na fase de campânula,

não foi possível formar um novo dente, sugerindo que o potencial de auto-organização celular é perdido durante a organogênese. Eles também conseguiram replicar a organogênese dentária quando fizeram um transplante em um alvéolo dentário *in vivo*; e foi gerado um dente estruturalmente completo, inclusive, com a penetração de vasos sanguíneos e fibras nervosas. Dessa forma, foi possível produzir diversos órgãos do esmalte de um único germe (Nakao *et al.* 2007).

A reconstrução de um dente completo sempre foi testada usando células-tronco adultas. Embora não seja discutido nos artigos citados, é possível sugerir que as células-tronco embrionárias precisam de um número maior de fatores para induzir sua diferenciação completa, porque eles estão em um estágio inicial de desenvolvimento.

As células-tronco de polpa dentária (DPSC) e as células-tronco do estroma da medula óssea (BMSSC) de ratos foram comparadas em sua capacidade de gerar tecidos dentais. Essas células foram co-cultivadas com células epiteliais da fase de botão de incisivos de ratos, fornecendo um microambiente favorável pela interação entre as células epiteliais e mesenquimais. Em seguida, foram transplantadas sob a cápsula renal. Verificou-se que a presença de células epiteliais induziu a diferenciação de odontoblastos em ambos os tipos de células-tronco. No entanto, apenas as DPSC foram capazes de induzir a diferenciação de células epiteliais em ameloblastos. Além disso, a mineralização observada em experimentos com DPSC era mais abundante e mais rápida do que com o BMSSC. Por conseguinte, DPSC foram consideradas melhores candidatas para a regeneração dentária (Yu *et al.* 2007).

DPSC isoladas por excrescência foram capazes de se diferenciarem em osteoblastos, quando misturadas com pó cerâmico de HA/ TCP e transplantadas em ratos imunodeficientes. Após 15 dias, um tecido ósseo lamelar foi formado. Logo, verifica-se que as células-tronco da polpa são uma fonte potencial de produção de osso *in vitro* (Otaki *et al.* 2007).

SHED foram isoladas e transplantadas em ratos imunocompetentes na reconstrução de defeitos do crânio. Após um mês, o osso formado era mais maduro que no grupo controle (de Mendonça Costa *et al.* 2008).

Considerando a capacidade das células-tronco pulparem em produzir tecido ósseo, o potencial das DPSC foi explorado para osseointegração. DPSC extraídas de incisivos de ratos foram cultivadas em três diferentes superfícies. As

células cultivadas sobre o titânio usinado e sobre o titânio tratado com ácido exibiram o fenótipo de osteoblastos e produziram tecidos calcificados com dureza 1,5 a 3 vezes maior, respectivamente, do que o formado na cultura sobre as placas de poliestireno. Foi observado que o titânio suprimiu a diferenciação de odontoblastos, promovendo um fenótipo osteogênico (Nakamura *et al.* 2005).

As semelhanças entre a morfogênese do dente e do folículo piloso estimularam a implantação de células pulpares humanas em ratos de diferentes idades dentro de folículos pilosos inativados. Células humanas e de ratos interagiram com o epitélio do folículo, regeneraram as raízes do cabelo e criaram várias fibras capilares diferenciadas. No entanto, em alguns casos, essas células também induziram mineralização e formação óssea (Reynolds & Jahoda, 2004).

Células-tronco da polpa dentária também foram utilizadas na regeneração cardíaca por uma cardiomioplastia celular (Chachques *et al.* 2005). Sete dias após a indução de infarto do miocárdio, as DPSC humanas cultivadas *in vitro* foram injetadas diretamente no coração de camundongos imunodeprimidos. Quatro semanas depois, foi observada uma melhora na função cardíaca e diminuição do tamanho do infarto. Novas células musculares foram formadas a partir de células-tronco injetadas (Marchionni *et al.* 2009).

As culturas de células-tronco tanto da polpa dentária quanto do ligamento periodontal foram diferenciadas em osteoblastos ou em células neuronais em resposta aos tratamentos farmacológicos apropriados (Kadar *et al.* 2009).

As células-tronco de polpa dentária também foram capazes de adquirir morfologia específica e características funcionais de hepatócitos, como a produção de uréia e de acúmulo de glicogênio. (Ishkitiev *et al.* 2010).

SHED também foram utilizadas para reconstruir a superfície ocular (epitélio da córnea) em coelho com deficiência total da borda da córnea e da esclerótica. A ceratectomia superficial foi realizada e o transplante foi realizado sobre a córnea que foi coberta pela membrana amniótica acelular humana. No grupo controle, a córnea desnuda foi coberta somente com membrana amniótica. Depois de três meses, a transparência da córnea foi observada nos olhos dos coelhos do grupo experimental, enquanto que no controle, as córneas desenvolveram conjuntivalização (reparação da superfície corneana por epitélio de fenótipo conjuntival) e opacificação. Esses resultados positivos foram confirmados por histologia, microscopia eletrônica, imunohistoquímica e pelos aspectos clínicos (Gomes Geraldês *et al.* 2010).

PERSPECTIVAS

A biomodelagem computacional da cavidade bucal e da estética dos dentes naturais do paciente será um passo importante no campo das biotecnologias. Outro passo será um banco de dados que contenha características dentárias armazenadas, tais como estética. Com essas informações, seriam confeccionadas matrizes para a formação tridimensional de tecido. Finalmente, o dente seria implantado cirurgicamente no paciente. Muito desta tecnologia já existe ou está perto de ser desenvolvida, mas ainda há muito a se conhecer para controlar todas as etapas deste processo (Murray & Garcia-Godoy 2006). Também é sugerido que esta terapia poderá ser usada para tratar a doença periodontal, malformações congênitas, traumas e câncer.

Estima-se que, na Odontologia, a regeneração da polpa dentária será uma das primeiras terapias envolvendo a engenharia de tecidos com células-tronco. Isto é devido à menor complexidade da reconstrução somente do tecido pulpar do que de um dente inteiro (Zhang & Yelick 2010). Embora os testes de regeneração da estrutura da polpa dentária já tenham sido realizados, ainda restam desafios importantes como promover uma nova inervação e vascularização de uma câmara pulpar química e mecanicamente preparada (Zhang & Yelick 2010) e desenvolver técnicas de controle de tamanho, forma e cor para a reconstrução completa de um dente.

Já foi provado que é possível criopreservar as células-tronco e as células da polpa diferenciadas sem perder suas propriedades mesmo após longos períodos (Papaccio *et al.* 2006). Além disso, sabendo da acessibilidade que as células da polpa possuem, infere-se que elas sejam promissoras fontes para banco de células-tronco (Tamaoki *et al.* 2010). Inclusive, já existindo bancos comerciais para o armazenamento de células dentárias.

Deve-se notar também que a quantidade de dentina e tecido pulpar formados em laboratório excede largamente o que seria gerado durante a vida inteira do indivíduo. Isso porque as células extraídas de um único dente podem gerar inúmeras células a serem utilizadas em terapias reconstrutivas e regenerativas.

As descobertas sobre células-tronco da polpa dentária nos levam a supor que essas células, provavelmente, contribuirão em muitas áreas da saúde no futuro.

CONCLUSÃO

Está claro que a célula-tronco da polpa dentária é uma fonte promissora de células pluripotentes. A presente revisão reforça o seu possível uso na regeneração não só de estruturas odontológicas, mas também de outros tecidos, como do osso, de adipócitos, condrócitos, hepatócitos, folículo piloso, músculo cardíaco, neurônios e epitélio córneo

Há ainda muitas limitações para se utilizar essas biotecnologias. Dessa forma, outros estudos são necessários para melhorar o entendimento do tema e desenvolver técnicas confiáveis e seguras, para que tornem práticas clínicas.

REFERÊNCIAS

- Aranha AM, Zhang Z, Neiva KG, Costa CA, Hebling J and Nor JE (2010). Hypoxia enhances the angiogenic potential of human dental pulp cells. *J Endod* **36**, 1633-1637.
- Balic A, Aguila HL, Caimano MJ, Francone VP and Mina M (2010). Characterization of stem and progenitor cells in the dental pulp of erupted and unerupted murine molars. *Bone* **46**, 1639-1651.
- Cai K, Lai M, Yang W et al. (2010). Surface engineering of titanium with potassium hydroxide and its effects on the growth behavior of mesenchymal stem cells. *Acta Biomater* **6**, 2314-2321.
- Chachques JC, Salanson-Lajos C, Lajos P, Shafy A, Alshamry A and Carpentier A (2005). Cellular cardiomyoplasty for myocardial regeneration. *Asian Cardiovasc Thorac Ann* **13**, 287-296.
- Chang J, Zhang C, Tani-Ishii N, Shi S and Wang CY (2005). NF-kappaB activation in human dental pulp stem cells by TNF and LPS. *J Dent Res* **84**, 994-998.
- Cordeiro MM, Dong Z, Kaneko T et al. (2008). Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. *J Endod* **34**, 962-969.
- de Mendonca Costa A, Bueno DF, Martins MT et al. (2008). Reconstruction of large cranial defects in nonimmunosuppressed experimental design with human dental pulp stem cells. *J Craniofac Surg* **19**, 204-210.
- Demarco FF, Casagrande L, Zhang Z et al. (2010). Effects of morphogen and scaffold porogen on the differentiation of dental pulp stem cells. *J Endod* **36**, 1805-1811.
- Gandia C, Arminan A, Garcia-Verdugo JM et al. (2008). Human dental pulp stem cells improve left ventricular function, induce angiogenesis, and reduce infarct size in rats with acute myocardial infarction. *Stem Cells* **26**, 638-645.
- Goldberg M, Farges JC, Lacerda-Pinheiro S et al. (2008). Inflammatory and immunological aspects of dental pulp repair. *Pharmacol Res* **58**, 137-147.

- Gomes JA, Geraldles Monteiro B, Melo GB et al. (2010). Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of human immature dental pulp stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **51**, 1408-1414.
- Govindasamy V, Abdullah AN, Ronald VS et al. (2010). Inherent differential propensity of dental pulp stem cells derived from human deciduous and permanent teeth. *J Endod* **36**, 1504-1515.
- Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG and Shi S (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 13625-13630.
- Howard C, Murray PE and Namerow KN (2010). Dental pulp stem cell migration. *J Endod* **36**, 1963-1966.
- Huang GT, Shagranova K and Chan SW (2006). Formation of odontoblast-like cells from cultured human dental pulp cells on dentin in vitro. *J Endod* **32**, 1066-1073.
- Huang GT, Sonoyama W, Chen J and Park SH (2006). In vitro characterization of human dental pulp cells: various isolation methods and culturing environments. *Cell Tissue Res* **324**, 225-236.
- Ishkitiev N, Yaegaki K, Calenic B et al. (2010). Deciduous and permanent dental pulp mesenchymal cells acquire hepatic morphologic and functional features in vitro. *J Endod* **36**, 469-474.
- Kadar K, Kiraly M, Porcsalmy B et al. (2009). Differentiation potential of stem cells from human dental origin - promise for tissue engineering. *J Physiol Pharmacol* **60 Suppl 7**, 167-175.
- Kerkis I, Ambrosio CE, Kerkis A et al. (2008). Early transplantation of human immature dental pulp stem cells from baby teeth to golden retriever muscular dystrophy (GRMD) dogs: Local or systemic? *J Transl Med* **6**, 35.
- Klopcic B, Maass T, Meyer E et al. (2007). TGF-beta superfamily signaling is essential for tooth and hair morphogenesis and differentiation. *Eur J Cell Biol* **86**, 781-799.
- Laino G, Carinci F, Graziano A et al. (2006). In vitro bone production using stem cells derived from human dental pulp. *J Craniofac Surg* **17**, 511-515.
- Liu H, Li W, Shi S, Habelitz S, Gao C and Denbesten P (2005). MEPE is downregulated as dental pulp stem cells differentiate. *Arch Oral Biol* **50**, 923-928.
- Ma D, Ma Z, Zhang X et al. (2009). Effect of age and extrinsic microenvironment on the proliferation and osteogenic differentiation of rat dental pulp stem cells in vitro. *J Endod* **35**, 1546-1553.
- Marchionni C, Bonsi L, Alviano F et al. (2009). Angiogenic potential of human dental pulp stromal (stem) cells. *Int J Immunopathol Pharmacol* **22**, 699-706.
- Miura M, Gronthos S, Zhao M et al. (2003). SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 5807-5812.
- Murray PE and Garcia-Godoy F (2006). The outlook for implants and endodontics: a review of the tissue engineering strategies to create replacement teeth for patients. *Dent Clin North Am* **50**, 299-315, x.
- Nakamura H, Saruwatari L, Aita H, Takeuchi K and Ogawa T (2005). Molecular and biomechanical characterization of mineralized tissue by dental pulp cells on titanium. *J Dent Res* **84**, 515-520.
- Nakao K, Morita R, Saji Y et al. (2007). The development of a bioengineered organ germ method. *Nat Methods* **4**, 227-230.

- Nam H and Lee G (2009). Identification of novel epithelial stem cell-like cells in human deciduous dental pulp. *Biochem Biophys Res Commun* **386**, 135-139.
- Otaki S, Ueshima S, Shiraishi K et al. (2007). Mesenchymal progenitor cells in adult human dental pulp and their ability to form bone when transplanted into immunocompromised mice. *Cell Biol Int* **31**, 1191-1197.
- Papaccio G, Graziano A, d'Aquino R et al. (2006). Long-term cryopreservation of dental pulp stem cells (SBP-DPSCs) and their differentiated osteoblasts: a cell source for tissue repair. *J Cell Physiol* **208**, 319-325.
- Pierdomenico L, Bonsi L, Calvitti M et al. (2005). Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. *Transplantation* **80**, 836-842.
- Reynolds AJ and Jahoda CA (2004). Cultured human and rat tooth papilla cells induce hair follicle regeneration and fiber growth. *Differentiation* **72**, 566-575.
- Sakdee JB, White RR, Pagonis TC and Hauschka PV (2009). Hypoxia-amplified proliferation of human dental pulp cells. *J Endod* **35**, 818-823.
- Sonoyama W, Liu Y, Fang D et al. (2006). Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PLoS One* **1**, e79.
- Tamaoki N, Takahashi K, Tanaka T et al. (2010). Dental pulp cells for induced pluripotent stem cell banking. *J Dent Res* **89**, 773-778.
- Wang Z, Pan J, Wright JT et al. (2010). Putative stem cells in human dental pulp with irreversible pulpitis: an exploratory study. *J Endod* **36**, 820-825.
- Yu J, Wang Y, Deng Z et al. (2007). Odontogenic capability: bone marrow stromal stem cells versus dental pulp stem cells. *Biol Cell* **99**, 465-474.
- Yu JH, Shi JN, Deng ZH et al. (2006). Cell pellets from dental papillae can reexhibit dental morphogenesis and dentinogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* **346**, 116-124.
- Zhang W, Walboomers XF, van Kuppevelt TH, Daamen WF, Bian Z and Jansen JA (2006). The performance of human dental pulp stem cells on different three-dimensional scaffold materials. *Biomaterials* **27**, 5658-5668.
- Zhang W and Yelick PC (2010). Vital pulp therapy-current progress of dental pulp regeneration and revascularization. *Int J Dent* **2010**, 856087.

CAPÍTULO 4

ARTIGO CIENTÍFICO 2

Este artigo será encaminhado à publicação no *Journal of Endodontics*

CULTURA DE CÉLULAS DE POLPA DENTAL HUMANA APÓS DIFERENTES PERÍODOS PÓS-EXODONTIA

Daniela Ferreira Araújo, DDS,
Luciana Oliveira Pereira, DDS, MS
Izabel Cristina R da Silva, DDS, MS, PhD
Ricardo Bentes de Azevedo, DDS, MS, PhD
Ana Cristina Barreto Bezerra, DDS, MS, PhD

RESUMO

As células da polpa dental têm mostrado grande potencial como fonte de células-tronco. Conhecer suas características e estabelecer protocolos para o seu cultivo são etapas fundamentais para sua utilização em futuras terapias baseadas na bioengenharia tecidual. O objetivo deste estudo foi investigar se os dentes extraídos e mantidos em temperatura e pressão ambientes por diferentes períodos de tempo apresentam células pulpares viáveis. Foram utilizados 21 dentes permanentes hígidos, divididos em 5 grupos de acordo com o tempo aguardado para o processamento após a exodontia. Os tempos testados foram: imediatamente; 30 minutos, 1 hora, 2 horas e 5 horas após a extração dentária. Analisou-se a morfologia das células por meio da microscopia óptica e a proliferação celular, por meio do ensaio de MTT e da contagem de células viáveis. Observou-se resultado semelhante em todos os grupos ($p < 0,05$). Concluiu-se que aguardar até 5 horas para processamento do dente para coleta do tecido não prejudica o estabelecimento da cultura de células de polpa dental, não afeta a morfologia destas células, nem reduz seu potencial proliferativo.

Palavras-chave: polpa dentária; células da polpa dental; viabilidade celular; cultura celular; excrescência.

INTRODUÇÃO

A polpa dentária como fonte de células-tronco foi uma grande descoberta. O potencial de utilização das células em reconstruções, regenerações e reparo tecidual têm motivado muitas pesquisas a seu respeito (1)

As células-tronco de polpa dental já foram diferenciadas em odontoblastos (2-6); osteoblastos (7, 8); adipócitos, condrócitos, osteócitos (9-11); células nervosas (10) e hepatócitos (12).

Além disso, a combinação do uso de engenharia tecidual e células-tronco de polpa dentária (DPSC- do inglês: *Dental Pulp Stem Cells*) possibilitou a regeneração de um complexo dentina-polpa (4), a geração de raízes funcionais (13), a produção de um dente completo (14), a regeneração de tecido ósseo (15-17); folículo piloso (18); músculo cardíaco (19, 20), células neuronais (21) e epitélio da córnea (22).

As múltiplas perspectivas na utilização das células pulpares, a acessibilidade e a possível criopreservação fazem delas promissoras fontes de células-tronco para banco de células (8, 23).

Na prática odontológica, muitos dentes com vitalidade pulpar são extraídos ou perdidos por várias razões (indicação ortodôntica, periodontal, avulsão, esfoliação). Estes dentes são comumente descartados, quando poderiam ainda ser fontes de células-tronco armazenáveis para diversas aplicações futuras (1).

Como os consultórios odontológicos frequentemente não estão preparados para executar os procedimentos de criopreservação, seria necessário que o dente fosse encaminhado a serviços laboratoriais especializados para posterior processamento. É muito importante que se conheçam as conseqüências da ruptura do feixe vasculonervoso para se formular um protocolo de preservação celular da polpa, assim como, promover maior factibilidade e acessibilidade no seu uso.

Contudo, não há registros, na literatura, a respeito do tempo que as células pulpares ainda permanecem viáveis após a exodontia.

Assim, o objetivo deste estudo foi investigar se é possível o isolamento de células viáveis da polpa dental mantida em condições de temperatura e pressão ambientes após diferentes períodos de tempo da exodontia.

MATERIAL E MÉTODOS

Cultura do tecido pulpar

Após a aprovação do Comitê de Ética da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (Brasil), foi obtido tecido pulpar de dentes permanentes hígidos extraídos (n = 21, 11 doadores com idades entre 13-36 anos) que foram provenientes de indivíduos saudáveis após obtenção do consentimento informado. Usando uma tabela de números aleatórios, os dentes foram distribuídos em 5 grupos (G1 a G5). Cada amostra recebeu um número aleatório e todos os testes foram feitos por observadores cegos.

O período de tempo entre a extração do dente e remoção da polpa foi registrado com um cronômetro. No primeiro grupo, a polpa foi imediatamente removida e imersa no meio de cultura (G1). O mesmo procedimento foi realizado após 30 minutos no grupo 2 (G2), 1 hora no grupo 3 (G3), 2 horas no grupo 4 (G4) e 5 horas no grupo 5 (G5).

Após o período de tempo definido, um sulco longitudinal foi realizado usando um disco diamantado flexível (KGSorensen, ref.7020, Zenith Dental ApS, Agerskov, Dinamarca) sem atingir o tecido pulpar e os dentes foram seccionados usando uma alavanca cirúrgica. O tecido pulpar foi cuidadosamente separado por uma cureta de dentina estéril (24).

O tecido pulpar foi transportado para o laboratório em microtubos de poliestireno (Corning Incorporated, New York, EUA) contendo o meio de cultura Dulbecco's modified Eagle's medium - DMEM (GIBCO™, Grand Island, Nova York, EUA, Catálogo nº12100-046) suplementado com 20% de soro fetal bovino (GIBCO™, Grand Island, Nova York, EUA. Catálogo nº12657-029) e antibiótico-antimicótico 1% (GIBCO™, Grand Island, Nova York, EUA. Catálogo nº15140).

A cultura das células da polpa foi estabelecida pelo método de isolamento *outgrowth* em placa de 6 poços (TPP, Switzerland). As células foram cultivadas em DMEM suplementado com soro fetal bovino 20% e antibiótico-antimicótico 1%, descrito para o transporte e mantidas a 37 ° C, em uma atmosfera umidificada a 80%, com 5% de CO₂. Os meios de cultura foram trocados a cada três dias. Depois de uma passagem, quando as culturas estavam 100% confluentes, as células eram congeladas a -80° C e, depois de um dia, transferidas para o nitrogênio líquido. O

meio de criopreservação foi de 5% dimetilsulfóxido- DMSO (Mallinckrodt Chemicals, St. Louis, MO, EUA) em soro fetal bovino.

Sete dias antes dos testes, as alíquotas de cada grupo foram descongeladas e ressuspensas em meio de cultura. Em seguida, foram centrifugadas a 1200 rpm por 3 min. O sobrenadante foi removido e meio de cultura fresco foi adicionado ao tubo. As células foram ressuspensas e passadas para garrafas de cultura de 25 cm² (TPP, Switzerland).

Análise morfológica

Para a análise morfológica por microscopia de luz, 10⁴ células de cada amostra foram transferidas para cada poço da placa de 24 poços (TPP, Switzerland). Após 48 horas, foram analisadas no microscópio invertido (Carl Zeiss Axiovert 100, Oberkochen, Alemanha) e fotografadas digitalmente (AxioCam MRC Göttingen, Alemanha). Após 96 horas, as células foram fixadas por 15 minutos com paraformaldeído a 4%, coradas com Giemsa (DOLES, Goiânia, GO, Brasil) por 10 minutos e analisadas novamente no mesmo microscópio.

Proliferação celular

Para testar se o tempo para se iniciar o processamento da polpa dental afetaria a viabilidade celular, a proliferação celular foi avaliada pela contagem de células em hemocitômetro e inferidas pelo ensaio de MTT (brometo 3 (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium- Introgen, Canadá, Catálogo nº M6494) Para executar os testes, 10³ células de cada amostra, em triplicata, foram transferidas por poço, contendo 200 µL do mesmo meio descrito para o transporte, somando oito placas de 96 poços. A análise foi realizada após os períodos de 24, 48, 72 e 96 horas.

O ensaio de MTT avalia a atividade celular mitocondrial e é baseada na habilidade das células viáveis em reduzir o MTT em formazan (25). O meio regular foi substituído por outro acrescido de 100 µg/ml de MTT (Invitrogen, EUA) e as placas foram incubadas por 3 horas a 37°C em atmosfera umidificada e 5% CO₂. O meio foi, então, removido e as células foram tratadas com 200 µL de DMSO

(Mallinckrodt Chemicals, St.Louis, MO, EUA) por 30 minutos. A densidade óptica dos cristais de formazan solubilizados pelo DMSO foi medida a 595 nm usando a leitora de microplacas (Spectramax M2, Molecular Devices, Califórnia, EUA). A viabilidade celular relativa foi calculada como percentuais das primeiras amostras analisadas (24h).

Para a contagem celular, após os períodos de tempo definidos, as células foram destacadas da placa utilizando tripsina-EDTA (Invitrogen, Canadá. Catálogo nº 25200072). As suspensões de células foram misturadas com 10 µL de azul de tripan 0,4% (GIBCO-BRL, EUA), na proporção de 1:1; e células vivas (não coradas) foram contadas utilizando um hemocítômetro. A viabilidade celular relativa foi calculada como percentuais das primeiras amostras analisadas (24h).

Análise estatística

Para análise dos resultados dos ensaios de MTT e contagem celular, os dados foram estatisticamente normalizados com base no tempo 24h de cada grupo experimental. Foram realizadas comparações intragrupo e intergrupos. Para a avaliação intergrupos, considerou-se a variação entre os valores do primeiro e o último tempo analisados. Para ambas, foi realizada uma ANOVA com pós-teste de Bonferroni. O nível de significância foi de 5%. O programa estatístico utilizado foi o SPSS versão 17.0 (SP, Brasil) e, para a construção dos gráficos, o GraphPrism versão 5.0.

RESULTADOS

Cultura do tecido pulpar

Independentemente do tempo entre a extração do dente e a imersão da polpa em meio de cultura, o estabelecimento da cultura foi semelhante em todos os grupos. A migração das células do fragmento de tecido para a placa ocorreu por volta do décimo dia. As células aderidas continuaram a se proliferar e monocamadas confluentes foram formadas (Figuras 1C e 1G).

Análise Morfológica

As culturas primárias de todos os grupos experimentais proliferaram com morfologia homogênea. As células apresentavam formato estrelado ou alongado; com contornos poligonais e extensões citoplasmáticas, exibindo uma morfologia parecida a fibroblastos e tamanho celular de aproximadamente 200 μ m (Figura 1). O citoplasma tinha aspecto relativamente homogêneo (Figuras 1A e 1E). Projeções citoplasmáticas ligavam uma célula a outra (Figuras 1B e 1F). O núcleo era esférico ou ovóide, com cromatina fina e ligeiramente granular; e com um ou mais nucléolos evidentes (Figuras 1A, 1B, 1E e 1F). As células apresentaram formas mais longas e mais finas quando havia confluência da cultura (Figuras 1C e 1G). As células apresentaram proliferação, mesmo quando a cultura já se apresentava confluenta, demonstrando menor inibição por contato que a comumente apresentada pelas células normais em cultura primária. Eram observadas unidades formadoras de colônia, que evidenciam o potencial proliferativo e a viabilidade das células estudadas de todos os grupos (Figuras 1D e 1H).

A morfologia celular após o descongelamento foi idêntica à observada antes do congelamento.

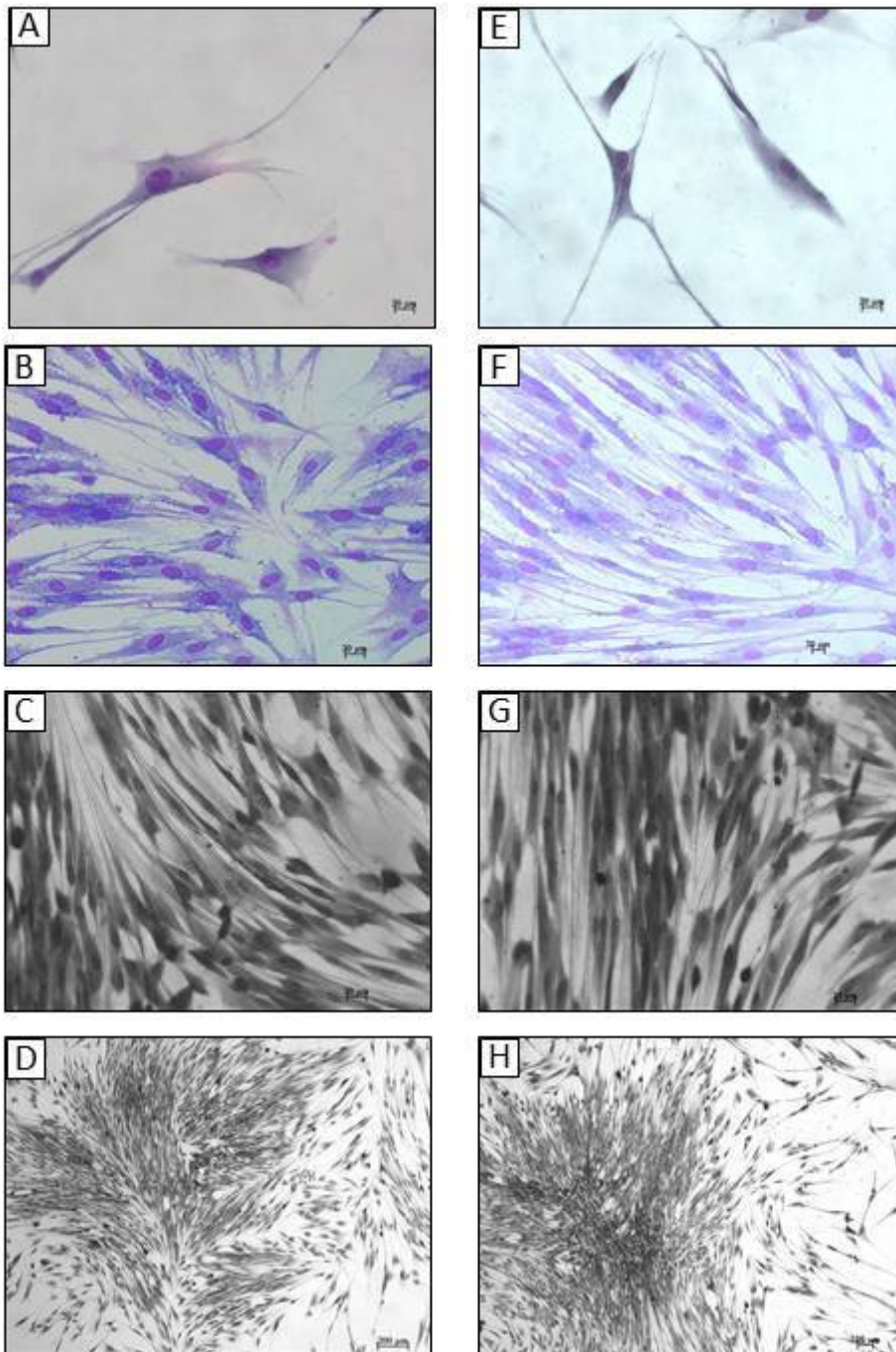


Figura 1: Células pulpare coradas com Giemsa. A, B, C, D: imediatamente cultivadas (G1); E, F, G, H: cultivadas após 5 horas da exodontia (G5); C e G: culturas confluentes; D, H: Unidades formadoras de colônia (UFC).

Viabilidade Celular

A viabilidade celular foi observada em todos os grupos O tempo aguardado de até 5 horas para remover o tecido pulpar para estabelecer a cultura não prejudicou a proliferação celular.

Na avaliação do ensaio de MTT, percebe-se que, em análise intragrupo, todos os grupos obtiveram aumento da população de células ao se comparar a viabilidade celular nos diferentes tempos de 24, 48, 72 e 96 horas.

Comparando-se os grupos quanto à variação de crescimento entre o primeiro e o último dia avaliado, observou-se diferença estatística entre os grupos, conforme apresentado na Figura 2. Ressalta-se, entretanto, que o grupo que mostrou maior variação foi o G5, evidenciando que nem o maior tempo decorrido após a extração prejudicou o potencial proliferativo das células pulpares (Figura 2).

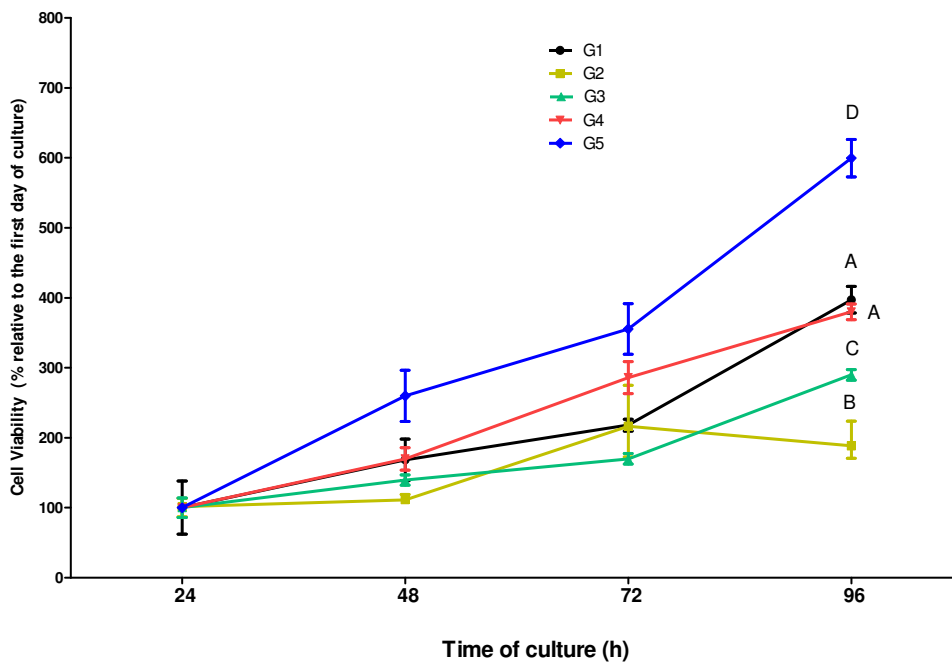


Figura 2: Efeitos do tempo entre a exodontia e a passagem da polpa para o meio de cultura na viabilidade celular, avaliados pelo ensaio de MTT. A polpa dental foi passada para o meio de cultura imediatamente após a exodontia no grupo 1 (G1), após 30 minutos no grupo 2 (G2), após 1 hora no grupo 3 (G2), após 2 horas no grupo 4 (G4), e após 5 horas no grupo 5 (G5). Os dados foram normalizados com o primeiro dia da cultura celular (24h) e expressos como média \pm erro padrão de dois experimentos independentes realizados em triplicata. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos quanto às variações de valores encontrados entre os tempos 24 e 96h. ($p < 0,05$, ANOVA two-way, Bonferroni's post test)

Na contagem de células com uso de corante de azul de tripan, a curva de crescimento foi realizada com dados obtidos da aferição do número de células vitais. Todos os grupos evidenciaram proliferação celular (Figura 3). Quanto à variação de crescimento entre o primeiro e o último dia avaliados, observou-se que não houve diferença estatística entre os grupos (Figura 3).

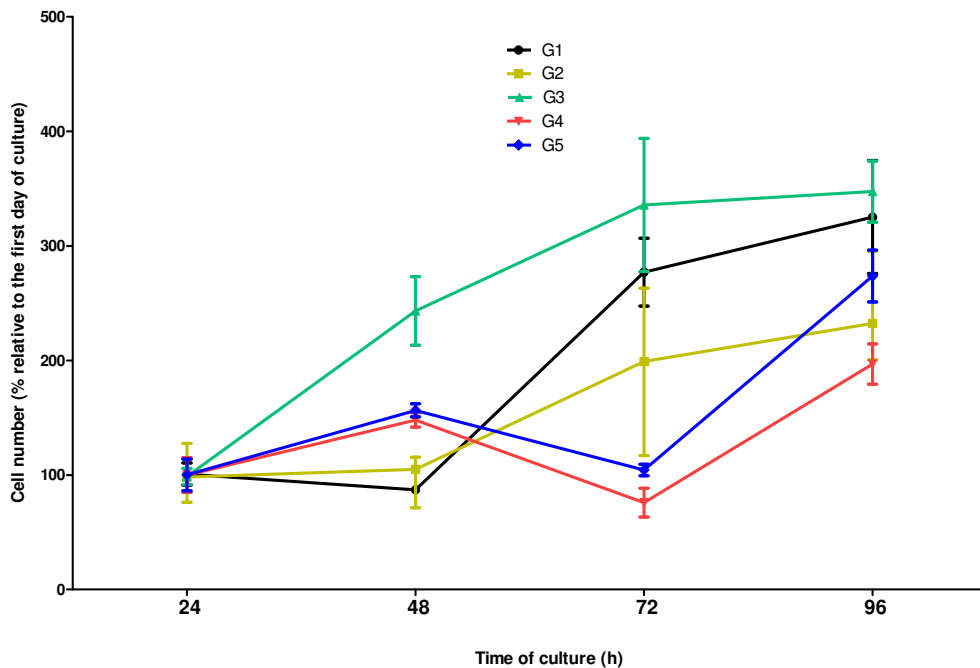


Figura 3: Efeitos do tempo entre a extração do dente e a passagem da polpa para o meio de cultura na proliferação celular, avaliados pelo método de contagem. A polpa dental foi passada para o meio de cultura imediatamente após a exodontia no grupo 1 (G1), após 30 minutos no grupo 2 (G2), após 1 hora no grupo 3 (G2), após 2 horas no grupo 4 (G4), e após 5 horas no grupo 5 (G5). Os dados foram normalizados com o primeiro dia da cultura celular (24h) e expressos como média \pm erro padrão de dois experimentos independentes realizados em triplicata. Não houve diferença estatística quanto à variação de crescimento entre o primeiro e o último dia avaliados. ($p < 0,05$, ANOVA two-way, Bonferroni's post test)

Após 96 horas de cultivo, todos os grupos apresentaram pelo menos o dobro do número de células do primeiro dia avaliado (Figura 2 e 3).

DISCUSSÃO

Como demonstrado amplamente em diversos estudos, o alto potencial proliferativo e a grande plasticidade das células-tronco da polpa dental tornam muito promissoras as perspectivas de utilizá-las em diferentes tratamentos regeneradores (1). Para tanto, é necessário dominar todas as etapas do processo de coleta, armazenamento e diferenciação dessas células.

A presente pesquisa foi desenhada para avaliar se aguardar até cinco horas no estabelecimento de uma cultura de células da polpa dental prejudicaria a viabilidade celular. Estudos anteriores apenas relatavam que, após a extração dos

dentes, as células da polpa foram imediatamente imersas em meio de cultura (26); ou não mencionam o tempo para se iniciar o processamento do dente após a exodontia (6, 7, 11, 27, 28).

Entretanto, este estudo revelou que as células da polpa sobreviveram pelo menos cinco horas sem o suprimento sanguíneo proveniente do feixe vasculonervoso nem a presença de meio de cultura nos lapsos temporais testados e sob temperatura e pressão ambiente (Figuras 2 e 3).

A morfologia celular observada foi semelhante em todos os grupos (Figura 1) e às relatadas na literatura (3, 7, 24). Nas culturas eram identificadas unidades formadoras de colônia (Figuras 1D e 1H), que evidenciam o potencial proliferativo das células. Esta característica é considerada pré-requisito para diferenciação celular em odontoblastos(8). Além disso, a criopreservação manteve as características fenotípicas descritas anteriormente (23, 29).

Os dois testes utilizados, nesta pesquisa, tem o mesmo propósito de avaliar e comparar a viabilidade celular e apresentam princípios distintos. O MTT avalia o metabolismo celular, por meio da atividade mitocondrial, pela medição da produção de formazam pelas células viáveis. A contagem celular com uso do corante azul de tripan, tem sua coloração em reação ocorrida no citoplasma das células vitais. O uso de mais de um método de avaliação, com diferentes mecanismos de medição de vitalidade celular é indicado para se minimizar as conclusões indevidas causadas pelos erros inerentes a cada metodologia (30).

As comparações intragrupos tanto do ensaio de MTT, quanto da contagem celular mostraram que houve proliferação celular em todos os grupos, comparando-se o valor relativo encontrado após 96 horas de cultura com o verificado após 24 horas. Em 96 horas de cultivo, havia pelo menos o dobro de células do que em 24 horas (Figuras 2 e 3).

No MTT, a comparação intergrupos das variações percentuais entre a medição de 24 e 96 horas de cultura, mostrou diferença estatística significativa entre alguns grupos. Curiosamente, o grupo que mostrou mais células viáveis metabolicamente com 96 horas foi o G5, mostrando que mesmo a espera de 5 horas para estabelecimento da cultura não reduziu o potencial proliferativo das células.

Os resultados da contagem celular não indicaram diferença estatística significativa entre as variações nos percentuais de crescimento entre o primeiro e

último dia de contagem. Isso também corrobora a observação de que aguardar até 5 horas não reduz o potencial proliferativo das células pulpares.

Com base nesses resultados, pode-se rever a necessidade de grande urgência no estabelecimento da cultura de células pulpares, sugerindo um maior tempo hábil para processamento.

Uma possível explicação para essa longa sobrevivência das células pulpares, mesmo após 5 horas da exodontia (grupo 5), pode ser a ocorrência de diferentes mecanismos de adaptação celular (31).

As células-tronco da polpa dental são capazes de organizar uma resposta rápida às mudanças de oxigênio provocadas experimentalmente e induzir células complexas e específicas para resposta pró-angiogênica (28).

Estudos com cultivo de tecido pulpar em ambiente de hipóxia mostrou-se mais adequado para o estabelecimento e manutenção de células pulpares de dente humano- hDPC (31). A hipóxia parece diminuir os danos causados pela oxidação no DNA e ampliar o número de células progenitoras da polpa dentária humana. No entanto, é importante determinar se as hDPCs reagem diferentemente às moléculas de sinalização, o que poderia alterar o seu potencial de diferenciação (32).

A hipóxia suprimiu a diferenciação osteogênica e odontogênica de *hDPCs in vitro* e aumentou o número de células que expressavam STRO-1, um marcador precoce de células-tronco mesenquimais (31)

Aplicando-se os resultados deste trabalho, os dentes extraídos poderão ser encaminhados ao laboratório, sem alteração de rotina do profissional dentista no atendimento ao paciente, nem necessidade de interrupção das normais etapas cirúrgicas ou pós-operatórias com intuito de preparar o dente para coletar a polpa. Assim, a coleta da polpa pós-exodontia poderá ser feita no laboratório de cultura de tecidos, porque haverá tempo para o transporte do dente ao local apropriado.

CONCLUSÃO

Conclui-se deste estudo, que aguardar até 5 horas para se iniciar o processamento do dente para coleta do tecido pulpar não prejudica o estabelecimento da cultura de células de polpa dental, não afeta a morfologia destas células, nem reduz seu potencial proliferativo.

REFERÊNCIAS

1. Volponi AA, Pang Y, Sharpe PT. Stem cell-based biological tooth repair and regeneration. *Trends Cell Biol.* 2010 Dec;20(12):715-22.
2. Liu H, Li W, Shi S, Habelitz S, Gao C, Denbesten P. MEPE is downregulated as dental pulp stem cells differentiate. *Arch Oral Biol.* 2005 Nov;50(11):923-8.
3. Huang GT, Shagramanova K, Chan SW. Formation of odontoblast-like cells from cultured human dental pulp cells on dentin in vitro. *J Endod.* 2006 Nov;32(11):1066-73.
4. Yu JH, Shi JN, Deng ZH, Zhuang H, Nie X, Wang RN, et al. Cell pellets from dental papillae can reexhibit dental morphogenesis and dentinogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Jul 21;346(1):116-24.
5. Zhang W, Walboomers XF, van Kuppevelt TH, Daamen WF, Bian Z, Jansen JA. The performance of human dental pulp stem cells on different three-dimensional scaffold materials. *Biomaterials.* 2006 Nov;27(33):5658-68.
6. Demarco FF, Casagrande L, Zhang Z, Dong Z, Tarquinio SB, Zeitlin BD, et al. Effects of morphogen and scaffold porogen on the differentiation of dental pulp stem cells. *J Endod.* 2010 Nov;36(11):1805-11.
7. 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.* 2000 Dec 5;97(25):13625-30.
8. Papaccio G, Graziano A, d'Aquino R, Graziano MF, Pirozzi G, Menditti D, et al. Long-term cryopreservation of dental pulp stem cells (SBP-DPSCs) and their differentiated osteoblasts: a cell source for tissue repair. *J Cell Physiol.* 2006 Aug;208(2):319-25.
9. Balic A, Aguila HL, Caimano MJ, Francone VP, Mina M. Characterization of stem and progenitor cells in the dental pulp of erupted and unerupted murine molars. *Bone.* 2010 Jun;46(6):1639-51.
10. Govindasamy V, Abdullah AN, Ronald VS, Musa S, Ab Aziz ZA, Zain RB, et al. Inherent differential propensity of dental pulp stem cells derived from human deciduous and permanent teeth. *J Endod.* 2010 Sep;36(9):1504-15.
11. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 May 13;100(10):5807-12.
12. Ishkitiev N, Yaegaki K, Calenic B, Nakahara T, Ishikawa H, Mitiev V, et al. Deciduous and permanent dental pulp mesenchymal cells acquire hepatic morphologic and functional features in vitro. *J Endod.* 2010 Mar;36(3):469-74.
13. Sonoyama W, Liu Y, Fang D, Yamaza T, Seo BM, Zhang C, et al. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PLoS One.* 2006;1:e79.
14. Nakao K, Morita R, Saji Y, Ishida K, Tomita Y, Ogawa M, et al. The development of a bioengineered organ germ method. *Nat Methods.* 2007 Mar;4(3):227-30.
15. Nakamura H, Saruwatari L, Aita H, Takeuchi K, Ogawa T. Molecular and biomechanical characterization of mineralized tissue by dental pulp cells on titanium. *J Dent Res.* 2005 Jun;84(6):515-20.
16. Otaki S, Ueshima S, Shiraishi K, Sugiyama K, Hamada S, Yorimoto M, et al. Mesenchymal progenitor cells in adult human dental pulp and their ability to form bone when transplanted into immunocompromised mice. *Cell Biol Int.* 2007 Oct;31(10):1191-7.
17. de Mendonca Costa A, Bueno DF, Martins MT, Kerkis I, Kerkis A, Fanganiello RD, et al. Reconstruction of large cranial defects in nonimmunosuppressed experimental design with human dental pulp stem cells. *J Craniofac Surg.* 2008 Jan;19(1):204-10.

18. Reynolds AJ, Jahoda CA. Cultured human and rat tooth papilla cells induce hair follicle regeneration and fiber growth. *Differentiation*. 2004 Dec;72(9-10):566-75.
19. Chachques JC, Salanson-Lajos C, Lajos P, Shafy A, Alshamry A, Carpentier A. Cellular cardiomyoplasty for myocardial regeneration. *Asian Cardiovasc Thorac Ann*. 2005 Sep;13(3):287-96.
20. Gandia C, Arminan A, Garcia-Verdugo JM, Lledo E, Ruiz A, Minana MD, et al. Human dental pulp stem cells improve left ventricular function, induce angiogenesis, and reduce infarct size in rats with acute myocardial infarction. *Stem Cells*. 2008 Mar;26(3):638-45.
21. Kadar K, Kiraly M, Porcsalmy B, Molnar B, Racz GZ, Blazsek J, et al. Differentiation potential of stem cells from human dental origin - promise for tissue engineering. *J Physiol Pharmacol*. 2009 Dec;60 Suppl 7:167-75.
22. Gomes JA, Geraldes Monteiro B, Melo GB, Smith RL, Cavenaghi Pereira da Silva M, Lizier NF, et al. Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of human immature dental pulp stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010 Mar;51(3):1408-14.
23. Tamaoki N, Takahashi K, Tanaka T, Ichisaka T, Aoki H, Takeda-Kawaguchi T, et al. Dental pulp cells for induced pluripotent stem cell banking. *J Dent Res*. 2010 Aug;89(8):773-8.
24. Souza LM, Bittar JD, Silva ICR, Toledo OA, Brígido MM, Poças-Fonseca MJ. Comparative isolation protocols and characterization of stem cells from human primary and permanent teeth pulp. *Brazilian Journal of Oral Sciences*. 2010;9(4):427-33.
25. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983 Dec 16;65(1-2):55-63.
26. Arminan A, Gandia C, Bartual M, Garcia-Verdugo JM, Lledo E, Mirabet V, et al. Cardiac differentiation is driven by NKX2.5 and GATA4 nuclear translocation in tissue-specific mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*. 2009 Jul-Aug;18(6):907-18.
27. Cordeiro MM, Dong Z, Kaneko T, Zhang Z, Miyazawa M, Shi S, et al. Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. *J Endod*. 2008 Aug;34(8):962-9.
28. Aranha AM, Zhang Z, Neiva KG, Costa CA, Hebling J, Nor JE. Hypoxia enhances the angiogenic potential of human dental pulp cells. *J Endod*. 2010 Oct;36(10):1633-7.
29. Woods EJ, Perry BC, Hockema JJ, Larson L, Zhou D, Goebel WS. Optimized cryopreservation method for human dental pulp-derived stem cells and their tissues of origin for banking and clinical use. *Cryobiology*. 2009 Oct;59(2):150-7.
30. Soenen SJ, De Cuyper M. Assessing cytotoxicity of (iron oxide-based) nanoparticles: an overview of different methods exemplified with cationic magnetoliposomes. *Contrast Media Mol Imaging*. 2009 Sep-Oct;4(5):207-19.
31. Iida K, Takeda-Kawaguchi T, Tezuka Y, Kunisada T, Shibata T, Tezuka K. Hypoxia enhances colony formation and proliferation but inhibits differentiation of human dental pulp cells. *Arch Oral Biol*. 2010 Sep;55(9):648-54.
32. Sakdee JB, White RR, Pagonis TC, Hauschka PV. Hypoxia-amplified proliferation of human dental pulp cells. *J Endod*. 2009 Jun;35(6):818-23.

CAPÍTULO 5
CONSIDERAÇÕES GERAIS

CONSIDERAÇÕES GERAIS

A busca por fontes teciduais de células-tronco constitui uma constante por parte dos pesquisadores.

O isolamento das células-tronco pulpare, primeiramente, foi realizado em indivíduos jovens, com até 29 anos de idade (1). Posteriormente, foi obtido sucesso no cultivo celular de pacientes com até 45 anos de idade(13). As pesquisas de isolamento de DPSC não detectaram diferenças que pudessem ser atribuídas à idade ou ao sexo do doador(14).

Ao se compararem as células-tronco de polpa dentária de ratos com 2 semanas com os de 4 meses, observou-se que não houve diferença morfológica entre as culturas, mas havia menor quantidade de vasos sanguíneos e mais células e unidades formadoras de colônia nos tecidos mais jovens. Além disso, células isoladas de ratos jovens proliferaram mais rapidamente e se revelaram menos capazes de diferenciação osteogênica (15). Estes autores extrapolaram a comparação realizada à dentição humana.

No entanto, vale ressaltar que ratos não possuem dentição decídua (16) e, provavelmente, a comparação entre murinos e humanos ficaria prejudicada.

Na literatura, há um consenso entre os autores, descrevendo a maior velocidade de proliferação celular e menor diferenciação das células de decíduos quando comparadas a de dentes permanentes humanos (2)

Sugere-se que a idade do paciente não seja fator decisivo para a proliferação das células pulpare humanas, e sim, se é decíduo ou permanente (2, 17), se o dente estava ou não exposto ao meio bucal (18), qual o estágio de formação dental (19), as condições pulpare (20). Essas características podem resultar em diferentes tempos de migração, aderência e proliferação celular, tempos de duplicação distintos, presença de diferentes marcadores celulares

Diante de tais considerações, neste trabalho, foram utilizados somente dentes permanentes.

Além disso, o meio de cultura utilizado foi o DMEM suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB) e antibiótico-antimicótico 1% (Metodologia do Artigo 2- página 33). Esse meio de cultura mostrou-se mais estimulante à proliferação celular que quando comparado ao DMEM com SFB 10%; ao HAM-F 12 com FBS 10% ou ao HAM-F 12 com SFB 20% (21).

Quanto ao congelamento, a velocidade de queda de temperatura durante este processo, interfere na sobrevivência celular. O congelamento rápido reduz a formação de cristais de gelo; porém o congelamento lento estimula a saída de água. O ideal, portanto, é que ele seja gradual para que se minimizem os danos às células, assim como foi feito no presente estudo.

A presença de crioprotetores é importante para redução da formação dos cristais de água. O DMSO, por ser um solvente polar (22), tem boa penetrabilidade na célula e é eficiente como tal.

Os resultados do uso de soro fetal bovino na preservação tecidual com o congelamento foram semelhantes àqueles obtidos com o meio comercial (Cryostor-CS-10) usado em banco de células. (Wood, 2009)

As células frescas e as que passaram pelo processo de congelamento/descongelamento apresentaram morfologia semelhante. (Figura 1) Esses resultados confirmam os relatos da literatura e reforçam a possível conservação do tecido pulpar para uso posterior, permitindo a expansão e viabilidade dos bancos de células (Wood 2009). Um próximo passo seria o estudo do congelamento tridimensional dos tecidos ou de matrizes infiltradas de células.

Os testes usados nesta pesquisa para medição da viabilidade celular e preconizados para elaboração de curvas de crescimento foram o ensaio de MTT e o teste de contagem celular com uso de corante de azul de tripan (Metodologia do Artigo 2- página 34) (15, 23).

O princípio do ensaio de MTT consiste na absorção deste sal pelas células, sendo reduzido pela enzima succinato desidrogenase no interior da mitocôndria a um produto chamado formazan. Estes cristais de formazan, acumulados dentro da célula são solubilizados por um solvente apropriado, como é o DMSO. Quanto mais células metabolicamente viáveis estão presentes, promovendo a reação descrita, mais roxa a solução se encontra. Por isso, essa medição é realizada por colorimetria. (24). As leitoras de placa são responsáveis pela medição da absorvância de cada amostra e os dados são apresentados digitalizados por um software específico e são encaminhados para avaliação estatística.

Por outro lado, o teste de exclusão do corante azul de tripan avalia a integridade e permeabilidade da membrana plasmática (25). As células são observadas em microscópio por suas alterações morfológicas e contadas em câmara de Neubauer (hemocitômetro). As células viáveis, que excluíram o corante,

possuem um aspecto translúcido e as células mortas apresentavam coloração arroxeada.

Este estudo é inovador por apresentar a constatação de viabilidade celular mantida até 5 horas após a exodontia. Sugere-se que outros estudos sejam realizados para se testar diferenciação e o limite de sobrevivência celular.

CAPÍTULO 6
CONCLUSÕES GERAIS

CONCLUSÕES GERAIS

Conclui-se deste estudo, que as possibilidades de uso e potencial regenerativo das células do tecido pulpar são vastas, e por isso, a atualização dos conhecimentos, avanços científicos, limitações e perspectivas relativos à sua aplicação é importante. Além disso, as conclusões sobre a viabilidade das células pulpares após a exodontia são que aguardar até 5 horas para remover o tecido pulpar e estabelecer a cultura não impede a proliferação celular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Dec 5;97(25):13625-30.
2. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 May 13;100(10):5807-12.
3. Greco A, editor. Células-tronco, uma revolução científica. São Paulo: Oirã; 2008.
4. Lako M, Trounson AO, Rainey Daher S. Law, Ethics, Religion, and Clinical Translation in the 21(st) Century - A Conversation with Cinzia Rota. *Stem Cells*. 2010 Nov 23.
5. Wadman M. Temporary reprieve for stem cells. *Nature*. 2010 Sep 16;467(7313):258-9.
6. Volponi AA, Pang Y, Sharpe PT. Stem cell-based biological tooth repair and regeneration. *Trends Cell Biol*. 2010 Dec;20(12):715-22.
7. Leal SC. Células-tronco derivadas de polpa dentária humana: propriedades e perspectivas. *R Dental Press Ortodon Ortop Facial* 18 Maringá, v 12, n 4, p 17-18, jul/ago 2007. 2007 jul/ago;12(4):17-8.
8. Gebhardt M, Murray PE, Namerow KN, Kuttler S, Garcia-Godoy F. Cell survival within pulp and periodontal constructs. *J Endod*. 2009 Jan;35(1):63-6.
9. Arminan A, Gandia C, Bartual M, Garcia-Verdugo JM, Lledo E, Mirabet V, et al. Cardiac differentiation is driven by NKX2.5 and GATA4 nuclear translocation in tissue-specific mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*. 2009 Jul-Aug;18(6):907-18.
10. Cordeiro MM, Dong Z, Kaneko T, Zhang Z, Miyazawa M, Shi S, et al. Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. *J Endod*. 2008 Aug;34(8):962-9.
11. Aranha AM, Zhang Z, Neiva KG, Costa CA, Hebling J, Nor JE. Hypoxia enhances the angiogenic potential of human dental pulp cells. *J Endod*. 2010 Oct;36(10):1633-7.
12. Demarco FF, Casagrande L, Zhang Z, Dong Z, Tarquinio SB, Zeitlin BD, et al. Effects of morphogen and scaffold porogen on the differentiation of dental pulp stem cells. *J Endod*. 2010 Nov;36(11):1805-11.

13. 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 Aug;20(8):1394-402.
14. Laino G, Graziano A, d'Aquino R, Pirozzi G, Lanza V, Valiante S, et al. An approachable human adult stem cell source for hard-tissue engineering. *J Cell Physiol*. 2006 Mar;206(3):693-701.
15. Ma D, Ma Z, Zhang X, Wang W, Yang Z, Zhang M, et al. Effect of age and extrinsic microenvironment on the proliferation and osteogenic differentiation of rat dental pulp stem cells in vitro. *J Endod*. 2009 Nov;35(11):1546-53.
16. Kuijpers MH, van de Kooij AJ, Slootweg PJ. Review article. The rat incisor in toxicologic pathology. *Toxicol Pathol*. 1996 May-Jun;24(3):346-60.
17. Govindasamy V, Abdullah AN, Ronald VS, Musa S, Ab Aziz ZA, Zain RB, et al. Inherent differential propensity of dental pulp stem cells derived from human deciduous and permanent teeth. *J Endod*. 2010 Sep;36(9):1504-15.
18. Balic A, Aguila HL, Caimano MJ, Francone VP, Mina M. Characterization of stem and progenitor cells in the dental pulp of erupted and unerupted murine molars. *Bone*. 2010 Jun;46(6):1639-51.
19. Nakao K, Morita R, Saji Y, Ishida K, Tomita Y, Ogawa M, et al. The development of a bioengineered organ germ method. *Nat Methods*. 2007 Mar;4(3):227-30.
20. Wang Z, Pan J, Wright JT, Bencharit S, Zhang S, Everett ET, et al. Putative stem cells in human dental pulp with irreversible pulpitis: an exploratory study. *J Endod*. 2010 May;36(5):820-5.
21. Souza LM, Bittar JD, Silva ICR, Toledo OA, Brígido MM, Poças-Fonseca MJ. Comparative isolation protocols and characterization of stem cells from human primary and permanent teeth pulp. *Brazilian Journal of Oral Sciences*. 2010;9(4):427-33.
22. Lovelock JE, Bishop MW. Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide. *Nature*. 1959 May 16;183(4672):1394-5.
23. Scadden DT. The stem-cell niche as an entity of action. *Nature*. 2006 Jun 29;441(7097):1075-9.
24. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983 Dec 16;65(1-2):55-63.
25. Barile FA, Dierickx PJ, Kristen U. In vitro cytotoxicity testing for prediction of acute human toxicity. *Cell Biol Toxicol*. 1994 Jun;10(3):155-62.

APÊNDICE A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

O(A) senhor(a) está sendo convidado(a) a participar da pesquisa “Viabilidade das células da polpa de dentes humanos após exodontia” que será desenvolvida pela pesquisadora Daniela Ferreira Araújo, cirurgiã-dentista e aluna de mestrado da Universidade de Brasília, pela Faculdade de Ciências da Saúde, sob orientação da professora Doutora Ana Cristina Barreto Bezerra.

A pesquisa tem por objetivo saber por quanto tempo o dente extraído permanece com suas células internas (polpa) vivas e viáveis. Após extração, o tecido interno do dente (polpa) é removido e sua vitalidade será testada em laboratório. Esse tecido contém células-tronco pulpares que, quando cultivadas e tratadas em laboratório, podem dar origem a diversos outros tipos de células. Os objetivos e perspectivas para o futuro com o uso dessas células são os de gerar benefícios como a reconstrução de dentes e de outros tecidos ou órgãos do corpo humano danificados por diversas doenças degenerativas e traumáticas.

Essa pesquisa não gera prejuízo à saúde geral e bucal, porque serão coletados dentes que, independentemente da pesquisa, têm indicação de extração diagnosticada e indicada por seu dentista, por estarem sem função, inclusos, retidos e/ou impactados, e *que seriam descartados* após a remoção cirúrgica. A extração será executada pelo seu dentista de escolha. A retirada do(s) dente(s) envolve(m) anestesia e o risco cirúrgico é baixo. Os controles antes e depois da cirurgia são da responsabilidade do dentista que o(a) senhor(a) escolheu para remoção do(s) dente(s). A pesquisadora apenas coletará o(s) nervo(s) do(s) dente(s) depois de removido(s).

A doação do(s) dentes(s) é um ato de livre, espontânea e consciente vontade; e sua participação não lhe acarretará nenhum ônus. O(a) senhor(a) poderá esclarecer suas dúvidas a qualquer tempo e tem a liberdade de se recusar a participar ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem nenhum prejuízo pessoal ou penalização. A pesquisadora poderá ser contatada pelos telefones: (61) 8423-3131 e (61) 3031-9145, e pelo e-mail: daniferreiraaraujo@hotmail.com. Igualmente, o(a) senhor(a) poderá entrar em contato com o Comitê de ética em pesquisa FS- UnB (e-mail: cepfs@unb.br, tel.: 3107-1947); e/ou com a orientadora da referida pesquisa (cel.: 9261-6915).

A pesquisadora compromete-se a garantir o sigilo e a privacidade da sua participação nesta pesquisa, não mencionando nenhum dado pertinente à sua ficha clínica e pessoal. Os resultados da pesquisa poderão ser usados para fins de estudo, em relatórios, apresentação em congressos, publicações em livros, revistas, reportagens e outras atividades científicas no país ou no exterior, respeitando a legislação vigente.

Este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido está redigido em duas vias de igual teor, sendo uma para o(a) senhor(a) e outra para a pesquisadora.

Brasília, ____/____/____

Nome do(a) paciente doador(a)

Assinatura do(a) paciente doador(a)

Assinatura da pesquisadora Daniela Ferreira Araújo

APÊNDICE B

ARTIGO CIENTÍFICO 1

Artigo submetido à publicação no *International Endodontic Journal*

DENTAL PULP STEM CELLS - UPDATE AND PERSPECTIVES

D. F. Araújo; L.O. Pereira; R.B. de Azevedo; A.C.B. Bezerra
Brasília University, Brazil

ABSTRACT

The researches about dental pulp stem cells have increased aiming the development of therapies for functional and esthetic regeneration of the oral tissues. Currently, it is possible to isolate cells from human dental pulp, to multiply them and to induce their differentiation into various tissues; for example, bone tissue, adipocytes, chondrocytes, dentin-pulp complex, functional roots, entire tooth, hepatocytes, hair follicle, heart muscle, neuronal cells and even cornea. Nevertheless, there are many limits that must be overcome for clinical application of this biotechnology. In this review, scientific advances and perspectives in the application of the dental pulp stem cells are reported.

INTRODUCTION

Stem cells are very promising to replace the conventional therapies with a more physiological rehabilitation, based on tissue regeneration and reconstruction of lost structures using the individual's own cells.

Current literature reports that it is already possible to isolate stem cells from dental pulp (from deciduous and permanent teeth), to propagate them in culture, and to induce their differentiation into various tissues. Although great information is divulged about the infinite possibilities of treatments based on stem cells, the issue is relatively new and it still requires much effort to be enterprised by the scientific community.

This literature review aim to bring into a system scientific advances and perspectives in the application of the dental pulp stem cells, as well as the limitations to overcome.

LITERATURE REVIEW/ DISCUSSION

The first human dental pulp stem cells (DPSC) culture was established in 2000 (Gronthos et al. 2000). Stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) were isolated in 2003 (Miura et al. 2003).

At first, there were no differences that could be attributable to age or gender of the donor in the isolation of DPSC (Laino et al. 2006). However, cells isolated from young patients proliferated faster and were less capable of osteogenic differentiation than those of older patients (Ma et al. 2009).

The dental pulp contains a heterogeneous cell population with different functions, including pulpoblasts, lymphocytes, dendritic, nervous, vascular and perivascular cells, macrophages and

undifferentiated cells (stem cells). Most of these cells retain mitotic potential in adult tissue and they multiply together in a culture. The separation of DPSC from the other cell types can be performed by fluorescence-activated cell sorting through cell surface antigens recognition (Miura et al. 2003), by immunohistochemical analysis (Gronthos et al. 2000), by magnetic separation of cells using antibodies linked to magnetic microspheres (Yu et al. 2007) and using the fluorescent dye Hoechst 33342 (Pierdomenico et al. 2005; de Mendonca Costa et al. 2008).

The DPSC are involved in important immune responses. It was demonstrated that, during the dental pulp infection, the bacterial lipopolysaccharide and the tumor necrosis factor (TNF) activated the transcription of the nuclear factor kappa B (NFκB), which regulates several inflammatory mediators, including TNF, IL-1, IL-6 and IL-8. Moreover, it was proved that DPSC has immunomodulatory activity, being capable of inhibiting T cell proliferation (Chang et al. 2005; Pierdomenico et al. 2005). Pulp stem cells have also demonstrated their immunomodulatory ability not causing the immunological reaction of rejection even when injected into individuals of different species (de Mendonca Costa et al. 2008; Kerkis Ambrosio et al. 2008).

After tooth injury, extracellular matrix proteins, particularly laminin, and chemotactants as S1P and TGF-β1 were found to be important promoters of DPSC migration (Howard et al. 2010). TGF-β superfamily signaling was also essential for development of hair, tooth and T-cells as well as for differentiation and proliferation control in adult tissues (Klopčič et al. 2007).

Inflammation seemed to favor cell phenotype reorientation and to promote the transdifferentiation of some inflammatory cells into odontoblast-like or osteoblast-like progenitors. During the inflammatory process, an increase in the number of pulp cells occurs, but it is not known if it happens because of a massive migration of inflammatory cells or due to the proliferation of fibroblasts and stem cells (Goldberg et al. 2008).

In hypoxic conditions (3% oxygen tension), the human dental pulp cells proliferated significantly more than in normoxic conditions (20% oxygen tension) (Sakdee et al. 2009). Moreover, hypoxia induced vascular endothelial growth factor, complex and cell type-specific pro-angiogenic responses to promote the revascularization of hypoxic dental pulps (Aranha et al. 2010).

Hypoxic conditions could be an effective treatment to amplify numbers of progenitor cells from human dental pulp, but not to promote their differentiation (Sakdee et al. 2009).

Stem cells were detected in teeth with irreversible pulpitis but it is unknown if they could be a source of endogenous multipotent cells in tissue regeneration (Wang et al. 2010).

TISSUE ENGINEERING

One of the first steps towards tissue engineering is the induction of differentiation to produce a functional tissue for organs regeneration / reconstruction of organs. DPSC has been differentiated into odontoblasts (Liu et al. 2005; Huang et al. 2006; Yu et al. 2006; Zhang et al. 2006; Cordeiro et al. 2008; Demarco et al. 2010), osteoblasts (Gronthos et al. 2000; Miura et al. 2003; Nakamura et al. 2005; Pierdomenico et al. 2005; Papaccio et al. 2006); adipocytes, chondrocytes, osteocytes (Miura et

al. 2003; Pierdomenico et al. 2005; Balic et al. 2010; Govindasamy et al. 2010) nerve cells (Govindasamy et al. 2010) and hepatocytes (Ishkitiev et al. 2010).

In vitro, dental pulp cells from unerupted molars displayed extensive osteo-dentinogenic potential and inability to differentiate into chondrocytes and adipocytes; while DPSC from erupted molars decreased the osteo-dentinogenic potential and they displayed an ability to differentiate into odontoblasts, osteoblasts, adipocytes and chondrocytes (Balic et al. 2010).

Natural and synthetic materials were tested to create three-dimensional scaffolds with desired morphology that promote cell adhesion and the diffusion of oxygen and other nutrients: collagen (Huang et al. 2006; Zhang et al. 2006; Nakao et al. 2007; de Mendonca Costa et al. 2008), dentin surface (Cordeiro et al. 2008; Demarco et al. 2010), ceramic powder of hydroxyapatite/ tricalcium phosphate (HA/ TCP) (Gronthos et al. 2000; Zhang et al. 2006) and fibrous titanium mesh (Zhang et al. 2006). The ceramic powder has the advantage of promoting mineralization due to its chemical composition. The polymeric scaffolds allowed cell growth with the desired shape, which could mimic the complex tooth morphology.

Aiming to simulate a possible revitalization of endodontically treated teeth, DPSC were cultivated on dentin discs. The cells proliferated less and on a small extent of these disks than those grown on the culture plate or on the scaffold porogen. However, dentin-related factors appeared to induce odontoblastic differentiation, because just the experimental group presented odontoblast morphology and cytoplasmic processes extending into the tubules (Huang et al. 2006; Demarco et al. 2010).

Once the three-dimensional culture is established, the blood supply and other growth factors can be obtained by transplanting it to a model *in vivo*. The most used site of transplants were the subrenal capsule and subcutaneous tissue of immunocompromised mice or rats (Gronthos et al. 2000; Miura et al. 2003; Laino et al. 2006; Yu et al. 2006; Otaki et al. 2007; Yu et al. 2007; Cordeiro et al. 2008)

Using tissue engineering and DPSC, it was possible to regenerate a dentin-pulp complex (Yu et al. 2006), to generate functional roots (Sonoyama et al. 2006) and even to produce a complete tooth (Nakao et al. 2007). Moreover, DPSC were effective in regenerating bone tissue (Nakamura et al. 2005; Otaki et al. 2007; de Mendonca Costa et al. 2008), hair follicle (Reynolds & Jahoda 2004), heart muscle (Chachques et al. 2005; Gandia et al. 2008), neuronal cells (Kadar et al. 2009) and corneal epithelium (Gomes et al. 2010).

Mesenchymal cells were isolated from dental papilla of tooth germs from rat incisors at terminal bell stage. The pellets were incubated in polypropylene tubes. This transplantation was performed under kidney capsules. A dentin-pulp complex containing odontoblasts, dentin tubules and pre-dentin was produced. The authors suggested that, since there were no epithelial components, in the late bell stage, the epithelium-mesenchyme interaction would be unnecessary. (Yu et al. 2006). However, epithelial-like cells from human deciduous dental pulp were isolated and characterized. They had characteristic epithelial morphology and they expressed epithelial markers. Moreover, they expressed epithelial stem cell-related genes such as ABCG2, Bmi-1, DNp63, and p75 (Nam & Lee 2009).

A whole tooth was bioengineered using dissociated single cells derived from a tooth germ of a mouse incisor. Epithelial and mesenchymal tissues were isolated and the cells were dissociated and placed in high density on a collagen gel drop for organ culture. Then, it was transplanted beneath a subrenal capsule. Multiple incisors were formed *in vitro*. Odontoblasts, dentin, dentinal tubules, ameloblasts, enamel, pulp, root, blood vessels, alveolar bone and periodontal ligament were arranged properly. Repeating the experiment with germs of molars, they obtained the same result, but the teeth had molar shapes. When the authors tried to use cells from a tooth germ at bell stage, it was not possible to form a new tooth, suggesting that the potential for self-cellular organization is lost during organogenesis. They also tested whether the cell culture would replicate tooth organogenesis when it was transplanted into a tooth cavity. It was observed that the germ has generated a structurally complete tooth when organ culture *in vitro* was transplanted into the oral cavity *in vivo*. It showed the penetration of blood vessels and nerve fibers. Thus, it was possible to produce several enamel organs from a single germ. (Nakao et al. 2007)

A complete tooth reconstruction was always tested using adult stem cells. Although it is not discussed in the articles cited, it is possible to infer that embryonic stem cells need a greater number of factors to induce their complete differentiation, because they are at an early stage of development.

DPSC and stem cells from bone marrow stroma (BMSSC) of rats were compared in their ability to generate dental tissue. These cells were co-cultured with epithelial cells of the apical bud of rat incisors, providing a favorable microenvironment through the interaction between epithelial and mesenchymal cells. Then, these pellets were transplanted under the renal capsule. It was found that the presence of epithelial cells induced the differentiation of odontoblasts in both cell types, but only the DPSC were able to induce the differentiation of epithelial cells into ameloblasts. Furthermore, the mineralization observed in experiments with DPSC was more abundant and faster than the observed with the BMSSC. Consequently, DPSC were considered better candidates for dental regeneration (Yu et al. 2007).

DPSC isolated by outgrowth were able to be differentiated into osteoblasts cells when they were mixed with ceramic powder of HA / TCP and transplanted into immunocompromised mice. After 15 days, a lamellar bone tissue was formed. Pulp stem cells are a potential source for production of bone *in vitro*. (Otaki et al. 2007).

SHED were isolated and transplanted in immunocompetent rats to reconstruct skull defects. After one month, the formed bone was more mature than in the control group (de Mendonca Costa et al. 2008).

Considering the ability of pulp stem cells to produce bone tissue, the potential of DPSC in the osseointegration was explored. DPSC extracted from rat incisors were cultured on 3 different surfaces. Cells cultured on the machined titanium and acid-treated titanium exhibited the phenotype of osteoblasts and produced calcified tissue with hardness 1.5 and 3 times higher, respectively, than the one formed on the polystyrene culture plates. It was observed that titanium suppressed the differentiation of odontoblasts, promoting an osteogenic phenotype (Nakamura et al. 2005) and induced MSCs to differentiate into osteoblasts (Cai et al. 2010).

The similarities between the morphogenesis of the tooth and the hair follicle stimulated the implantation of human pulp cells into mice of different ages within inactivated hair follicles. Murine and human cells interacted with the epithelium of the follicle, regenerated the hair roots and created multiple differentiated hair fibers. However, in some cases, these cells also induced mineralization and bone formation(Reynolds & Jahoda 2004).

Dental pulp stem cells were also used in cardiac regeneration by a cellular cardiomyoplasty (Chachques et al. 2005). Seven days after induction of myocardial infarction, human DPSC grown *in vitro* were injected directly into the heart of immunocompromised mice. Four weeks later, it was observed an improvement in cardiac function and the decrease of the infarct size. New muscle cells were formed from the injected stem cells (Marchionni et al. 2009).

Stem cell cultures of both human dental pulp and periodontal ligament origin were differentiated into either osteoblasts or neuronal cells in response to appropriate pharmacological treatments (Kadar et al. 2009).

DPSC were also able to acquire specific morphologic and functional characteristics of hepatocytes, as producing urea and accumulating glycogen. (Ishkitiev et al. 2010).

SHED was also used to reconstruct an ocular surface (corneal epithelium) in rabbit model of total limbal stem cell deficiency. A superficial keratectomy was performed and the SHED transplant was done onto the corneal bed which was covered with acellular human amniotic membrane. In control groups, the denuded cornea was covered with amniotic membrane only. After 3 months, cornea transparency was noted in the experimental rabbit eyes while the control corneas developed conjunctivalization and opacification. These successful results were confirmed by histology, electron microscopy, clinical aspect and immunohistochemistry (Gomes et al. 2010).

PROSPECTS

The computational biotemplating of the oral cavity and of the aesthetics of the patient's natural teeth will be one important step in biotechnologies. Other step will be a database that contains stored dental characteristics such as aesthetics. Then, by passing the cells to a scaffold, it would have the three-dimensional tissue formation. Finally, the tooth would be surgically implanted in the patient. Much of this technology already exists or is close to be developed, but there is much to know to control all the steps in this process(Murray & Garcia-Godoy 2006). It is also suggested that this therapy will be also used to treat periodontal disease, congenital malformations, trauma and cancer.

It is estimated that, in dentistry, dental pulp regeneration will be one of the first therapies involving tissue engineering with stem cells. This is due to lower complexity of the pulp tissue reconstruction then to regeneration of a whole tooth (Zhang & Yelick 2010). Although the tests of dental pulp structure regeneration had already succeeded, important challenges remain: to promote a tooth reinnervation and revascularization when the pulp chamber was chemical-mechanically prepared (Zhang & Yelick 2010); and to develop of techniques for controlling size, shape and color for the complete reconstruction of a tooth.

It has been proven that it is possible to cryopreserve stem cells and pulp cells differentiated without losing its properties even after long periods (Papaccio et al. 2006) and the accessibility of the pulp cells makes them a promising source for stem cell bank (Tamaoki et al. 2010).

There are already commercial banks for storage of dental cells for possible therapies that might be necessary. It should be noted also that the amount of dentin and pulp tissue formed in these laboratory tests far exceeds what would be generated during the life of the organism. Therefore, cells extracted from a single tooth can generate a lot of others to be used in the reconstruction of more than a body in regenerative therapies.

The findings about dental pulp stem cells lead us to suppose that these cells will probably contribute in many health areas in the future.

CONCLUSION

It is already clear that dental pulp stem cell is a promising source of pluripotent cell. The present review clarifies its possible use in regeneration of not only dental aspects, but also bone tissue, adipocytes, chondrocytes, hepatocytes, hair follicle, heart muscle, neuronal cells and corneal epithelium.

There are still many limitations to use these biotechnologies. Other studies are necessary to improve the understandings and to develop reliable and safe techniques, so that they could become clinical practices.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aranha AM, Zhang Z, Neiva KG, Costa CA, Hebling J and Nor JE (2010). Hypoxia enhances the angiogenic potential of human dental pulp cells. *J Endod* **36**, 1633-1637.
- Balic A, Aguila HL, Caimano MJ, Francone VP and Mina M (2010). Characterization of stem and progenitor cells in the dental pulp of erupted and unerupted murine molars. *Bone* **46**, 1639-1651.
- Cai K, Lai M, Yang W et al. (2010). Surface engineering of titanium with potassium hydroxide and its effects on the growth behavior of mesenchymal stem cells. *Acta Biomater* **6**, 2314-2321.
- Chachques JC, Salanson-Lajos C, Lajos P, Shafy A, Alshamry A and Carpentier A (2005). Cellular cardiomyoplasty for myocardial regeneration. *Asian Cardiovasc Thorac Ann* **13**, 287-296.
- Chang J, Zhang C, Tani-Ishii N, Shi S and Wang CY (2005). NF-kappaB activation in human dental pulp stem cells by TNF and LPS. *J Dent Res* **84**, 994-998.
- Cordeiro MM, Dong Z, Kaneko T et al. (2008). Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. *J Endod* **34**, 962-969.
- de Mendonca Costa A, Bueno DF, Martins MT et al. (2008). Reconstruction of large cranial defects in nonimmunosuppressed experimental design with human dental pulp stem cells. *J Craniofac Surg* **19**, 204-210.
- Demarco FF, Casagrande L, Zhang Z et al. (2010). Effects of morphogen and scaffold porogen on the differentiation of dental pulp stem cells. *J Endod* **36**, 1805-1811.
- Gandia C, Arminan A, Garcia-Verdugo JM et al. (2008). Human dental pulp stem cells improve left ventricular function, induce angiogenesis, and reduce infarct size in rats with acute myocardial infarction. *Stem Cells* **26**, 638-645.
- Goldberg M, Farges JC, Lacerda-Pinheiro S et al. (2008). Inflammatory and immunological aspects of dental pulp repair. *Pharmacol Res* **58**, 137-147.

- Gomes JA, Geraldes Monteiro B, Melo GB et al. (2010). Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of human immature dental pulp stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **51**, 1408-1414.
- Govindasamy V, Abdullah AN, Ronald VS et al. (2010). Inherent differential propensity of dental pulp stem cells derived from human deciduous and permanent teeth. *J Endod* **36**, 1504-1515.
- Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG and Shi S (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 13625-13630.
- Howard C, Murray PE and Namerow KN (2010). Dental pulp stem cell migration. *J Endod* **36**, 1963-1966.
- Huang GT, Shagrananova K and Chan SW (2006). Formation of odontoblast-like cells from cultured human dental pulp cells on dentin in vitro. *J Endod* **32**, 1066-1073.
- Huang GT, Sonoyama W, Chen J and Park SH (2006). In vitro characterization of human dental pulp cells: various isolation methods and culturing environments. *Cell Tissue Res* **324**, 225-236.
- Ishkitiev N, Yaegaki K, Calenic B et al. (2010). Deciduous and permanent dental pulp mesenchymal cells acquire hepatic morphologic and functional features in vitro. *J Endod* **36**, 469-474.
- Kadar K, Kiraly M, Porcsalmy B et al. (2009). Differentiation potential of stem cells from human dental origin - promise for tissue engineering. *J Physiol Pharmacol* **60 Suppl 7**, 167-175.
- Kerkis I, Ambrosio CE, Kerkis A et al. (2008). Early transplantation of human immature dental pulp stem cells from baby teeth to golden retriever muscular dystrophy (GRMD) dogs: Local or systemic? *J Transl Med* **6**, 35.
- Klopčič B, Maass T, Meyer E et al. (2007). TGF-beta superfamily signaling is essential for tooth and hair morphogenesis and differentiation. *Eur J Cell Biol* **86**, 781-799.
- Laino G, Carinci F, Graziano A et al. (2006). In vitro bone production using stem cells derived from human dental pulp. *J Craniofac Surg* **17**, 511-515.
- Liu H, Li W, Shi S, Habelitz S, Gao C and Denbesten P (2005). MEPE is downregulated as dental pulp stem cells differentiate. *Arch Oral Biol* **50**, 923-928.
- Ma D, Ma Z, Zhang X et al. (2009). Effect of age and extrinsic microenvironment on the proliferation and osteogenic differentiation of rat dental pulp stem cells in vitro. *J Endod* **35**, 1546-1553.
- Marchionni C, Bonsi L, Alviano F et al. (2009). Angiogenic potential of human dental pulp stromal (stem) cells. *Int J Immunopathol Pharmacol* **22**, 699-706.
- Miura M, Gronthos S, Zhao M et al. (2003). SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 5807-5812.
- Murray PE and Garcia-Godoy F (2006). The outlook for implants and endodontics: a review of the tissue engineering strategies to create replacement teeth for patients. *Dent Clin North Am* **50**, 299-315, x.
- Nakamura H, Saruwatari L, Aita H, Takeuchi K and Ogawa T (2005). Molecular and biomechanical characterization of mineralized tissue by dental pulp cells on titanium. *J Dent Res* **84**, 515-520.
- Nakao K, Morita R, Saji Y et al. (2007). The development of a bioengineered organ germ method. *Nat Methods* **4**, 227-230.
- Nam H and Lee G (2009). Identification of novel epithelial stem cell-like cells in human deciduous dental pulp. *Biochem Biophys Res Commun* **386**, 135-139.
- Otaki S, Ueshima S, Shiraishi K et al. (2007). Mesenchymal progenitor cells in adult human dental pulp and their ability to form bone when transplanted into immunocompromised mice. *Cell Biol Int* **31**, 1191-1197.
- Papaccio G, Graziano A, d'Aquino R et al. (2006). Long-term cryopreservation of dental pulp stem cells (SBP-DPSCs) and their differentiated osteoblasts: a cell source for tissue repair. *J Cell Physiol* **208**, 319-325.
- Pierdomenico L, Bonsi L, Calvitti M et al. (2005). Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. *Transplantation* **80**, 836-842.
- Reynolds AJ and Jahoda CA (2004). Cultured human and rat tooth papilla cells induce hair follicle regeneration and fiber growth. *Differentiation* **72**, 566-575.
- Sakdee JB, White RR, Pagonis TC and Hauschka PV (2009). Hypoxia-amplified proliferation of human dental pulp cells. *J Endod* **35**, 818-823.
- Sonoyama W, Liu Y, Fang D et al. (2006). Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PLoS One* **1**, e79.
- Tamaoki N, Takahashi K, Tanaka T et al. (2010). Dental pulp cells for induced pluripotent stem cell banking. *J Dent Res* **89**, 773-778.

- Wang Z, Pan J, Wright JT et al. (2010). Putative stem cells in human dental pulp with irreversible pulpitis: an exploratory study. *J Endod* **36**, 820-825.
- Yu J, Wang Y, Deng Z et al. (2007). Odontogenic capability: bone marrow stromal stem cells versus dental pulp stem cells. *Biol Cell* **99**, 465-474.
- Yu JH, Shi JN, Deng ZH et al. (2006). Cell pellets from dental papillae can reexhibit dental morphogenesis and dentinogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* **346**, 116-124.
- Zhang W, Walboomers XF, van Kuppevelt TH, Daamen WF, Bian Z and Jansen JA (2006). The performance of human dental pulp stem cells on different three-dimensional scaffold materials. *Biomaterials* **27**, 5658-5668.
- Zhang W and Yelick PC (2010). Vital pulp therapy-current progress of dental pulp regeneration and revascularization. *Int J Dent* **2010**, 856087.

ANEXO A

**DOCUMENTO DE APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA
EM PESQUISA DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**