

FACULDADE DE SETE LAGOAS (FACSETE)

ROBERTA DA SILVA BARBOSA

**POTENCIAL DE REGENERAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO PRESENTES EM
POLPA DENTÁRIA DE DENTES DECÍDUOS:
*REVISÃO DE LITERATURA***

SETE LAGOAS

2019

FACULDADE DE SETE LAGOAS (FACSETE)

ROBERTA DA SILVA BARBOSA

**POTENCIAL DE REGENERAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO PRESENTES EM
POLPA DENTÁRIA DE DENTES DECÍDUOS:
*REVISÃO DE LITERATURA.***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Sete Lagoas como requisito à obtenção título de bacharel em Odontologia.

Orientadora: Profa. Dra. Suzane Paixão Gonçalves

SETE LAGOAS

2019

Barbosa, Roberta
POTENCIAL DE REGENERAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO
PRESENTES EM POLPA DENTÁRIA DE DENTES DECÍDUOS:
REVISÃO DE LITERATURA. / Roberta Barbosa. -- Sete
Lagoas, 2019.
29 f. : il

Orientador: Suzane Paixão Gonçalves.
TCC (Graduação - Odontologia) - Faculdade de
Sete Lagoas, FACSETE, 2019.

1. Células-Tronco. 2. Dentes Decíduos. 3.
Engenharia Tecidual. 4. Bioengenharia. 5.
Odontologia. I. Paixão Gonçalves, Suzane. II. Título.

SIGLAS

bFGF	Fator básico de crescimento de fibroblastos
CEE	Células estaminais embrionárias
CD34	Cluster de diferenciação 34
CD44	Cluster de diferenciação 44
CD45	Cluster de diferenciação 45
CD73	Cluster de diferenciação 73
CD90	Cluster de diferenciação 90
CD105	Cluster de diferenciação 105
CD271	Cluster de diferenciação 271
CO2	Dióxido de carbono
CT	Células-tronco
CTH	Células-tronco hematopoiéticas
CTM	Células-tronco mesenquimais
CTP	Células-tronco pluripotentes
CTPD	Células-tronco da polpa dentária
CTS	Células tronco somáticas
DMEM/Ham's F-12	Meio de Eagle Modificado de Dulbecco (DME) e Mistura de Nutrientes F-12 de Ham
DMSO	Dimetilsulfóxido
iPSC	Células-tronco pluripotentes induzidas
MEC	Matriz extracelular
MMPs	Metaloproteinase da matriz
Nd:YAG	Granada de alumínio com ítrio dopada com neodímio
Oct-4	Fator de transcrição de ligação ao octâmero 4
pH	Potencial hidrogeniônico
RPMI	Meio Roswell Park Memorial Institute

SSEA-3	Antígeno embrionário específico do estágio 3
TGF-β	Fatores de crescimento
TRA-1-60	Podocalyxin
TRA1-81	Podocalyxin

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Representação esquemática de reprogramação.

Figura 2- Anatomia do dente.

Figura 3- Fases iniciais do desenvolvimento do germe dentário.

Figura 4- Células-tronco de tecido pulpar com capacidade de se diferenciar em diferentes tipos celulares.

Figura 5- Tratamento de canal utilizando células-tronco.

Figura 6- Fatores da bioengenharia odontológica com células-tronco.

Figura 7- Células-tronco com aparência de fibroblastos (escala 10 μm).

RESUMO

São utilizadas no mundo atual para as terapias de substituição dentes, algumas técnicas que não são biológicas, como por exemplo, os implantes dentários, as próteses, e as restaurações diretas. Mas com novas pesquisas essas técnicas estão sendo questionadas a respeito da longevidade e da eficácia. A falta dos dentes tem sido um impulso para a atuação de estudos que procura o crescimento das engenharia biológica na Odontologia. Nos dias de hoje, vários estudos estão concentrando no desdobramento de processos para manusear as células-tronco, planejando o crescimento dos recursos terapêuticos restauradores dos órgãos e tecidos do corpo humano. Os estudos em bioengenharia tem se aplicado na especificação de células osteoprogenitoras, para criar tecidos ósseos, e na criação de tecidos correspondente a polpa dentária, dentina e ligamento periodontal, criando um enorme evolução nos estudos com as células-tronco presentes em tecidos bucais, por ter um acesso fácil e de não serem órgãos vitais, sendo assim de grande interesse para testes da bioengenharia tecidual. Para que esta técnica seja eficiente, são essenciais três fatores, sendo eles as células-tronco, os fatores de crescimento e a matriz extracelular. Estas pesquisas e a aplicação das células-tronco pela engenharia tecidual, nos últimos anos, teve um grande avanço em relação a regeneração e a reparação das estruturas dentárias e ainda assim até na substituição de um dente completo.

Palavras-Chave: Células-tronco. Engenharia Tecidual. Odontologia.

ABSTRACT

Some techniques that are not biological, such as dental implants, prostheses, and direct restorations, are used in today's world for substitution therapies. But with new research these techniques are being questioned about longevity and efficacy. The lack of teeth has been an impetus for studies that seek the growth of biological engineering in dentistry. Nowadays, several studies are concentrating on the unfolding of processes to handle stem cells, planning the growth of therapeutic restorative resources of the organs and tissues of the human body. Bio-engineering studies have been applied to the specification of osteoprogenitor cells to create bone tissues and to create tissues corresponding to dental pulp, dentin and periodontal ligament, creating a huge evolution in the studies with the stem cells in oral tissues, because they have easy access and are not vital organs, and are therefore of great interest for tissue bioengineering tests. For this technique to be efficient, three factors are essential, being they the stem cells, the growth factors and the extracellular matrix. This research and the application of stem cells by tissue engineering in recent years has made a great advance in the regeneration and repair of dental structures and even in the substitution of a complete tooth.

Keywords: Stem cells. Tissue Engineering. Dentistry.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS.....	12
2.1 GERAL	12
2.2 ESPECÍFICO	12
3 METODOLOGIA	13
4 REVISÃO DE LITERATURA.....	14
4.1 CÉLULAS-TRONCO	14
4.3 CÉLULAS-TRONCO DENTÁRIA	16
5 DISCUSSÃO	20
5.1 EVOLUÇÃO DAS TÉCNICAS DE UTILIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO	20
5.2 SUGESTÃO DE PADRONIZAÇÃO	24
6 CONCLUSÃO	25
7 REFERÊNCIAS.....	26

1 INTRODUÇÃO

A evolução da biologia celular e molecular têm auxiliado para o crescimento de técnicas para a regeneração de tecidos e órgãos que foram prejudicados por deformidades congênitas, traumas e doenças. Os primeiros a descrever a definição de engenharia tecidual foram Langer e Vacanti (1993), sendo intitulado como um ‘campo interdisciplinar que visa aplicar os princípios da engenharia, biologia e ciências clínicas para o desenvolvimento de substitutos biológicos que possam manter, restaurar, ou melhorar a função de órgãos e tecidos, embasado na utilização de células-tronco.’

As células-tronco são indiferenciadas e possuem elevada capacidade de autorrenovação e produção celular especializado de pelo menos um tipo diferente. São segmentadas em duas maneiras: adultas e embrionárias. Diante desta situação a célula-tronco adulta tem vantagem de ser autogênica e a embrionária tem a propriedade de diferenciar e se proliferar em tipos celulares diferentes. Para os autores Chen *et al.* (2012), para o cirurgião-dentista, o uso das células-tronco foi usado pois a polpa de dentes permanentes e decíduos apresentam específicas características, altamente proliferativas, clonogênicas e de autorrenovação, gerando diferentes tecidos (RAI, KAUR e SAUR, 2013).

Tais células são encontradas no mesênquima, existentes em exclusividade nos dentes decíduos, folículo dental, papila apical, na polpa dental e ligamento periodontal. Apontam alta propriedade de ser regenerativa e proliferativa dos tecidos humanos, sejam não dentais ou dentais (DALTOÉ, MIGUITA e MANTESSO, 2010; ARAKAKI, GALLO, *et al.*, 2012; MATHUR, CHOPRA, *et al.*, 2014).

As células-tronco podem apresentar estados diferentes de potencialidade, como das células-tronco da epiderme, incluindo a totipotencialidade do zigoto, a pluripotencialidade de uma célula-tronco embrionária, a multipotencialidade de células-tronco fetais ou de tecido adulto e a unipotencialidade de um tecido celular específico (KRABBE, ZIMMER e MEYER, 2005; SERAKINCI e KEITH).

De acordo com CASAGRANDE *et al.* (2011) perante ao descobrimento de células-tronco presentes em dentes, juntamente com as evoluções recentes na área da biologia celular e molecular têm levado a novas habilidades terapêuticas que se propõem-se à regenerar os tecidos bucais que foram atingidos por doença ou trauma. Esclarece também que a engenharia tecidual é multidisciplinar, como biologia, engenharia e ensaios clínicos, com a meta de gerar novos tecidos e órgãos. Certificando

que atualmente, a Odontologia regenerativa tem investigado a potencialidade da aplicação das células-tronco e da bioengenharia na regeneração e reparo dos dentes. A visão que se tem é que a odontologia regenerativa tenha um lugar importante na rotina do cirurgião-dentista em sua prática clínica odontológica.

Diante destes entendimentos, vale ressaltar que a perda de dentes continua sendo uma circunstância para a ausência de qualidade de vida. Fatores como defeitos genéticos, anomalias congênitas, hábitos deletérios ou perda precoce de dentes por trauma, cárie dentária e doença periodontal, são fatores que auxiliam para tal condição. Neste caso, a primeira escolha do cirurgião-dentista é reabilitar os pacientes com técnicas não biológicas, como próteses dentárias e implantes (DUAILIBI, DUALIBI, *et al.*, 2004).

Na presença destes esclarecimentos, o estudo tem como objetivo avaliar a possibilidade em atingir um sucesso de tratamento com técnicas biológicas, como a utilização de células-tronco presentes em polpa de dentes decíduos, onde são altamente desejáveis para reposição dentária.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar através de uma revisão de literatura a eficácia das células-tronco presentes em polpa dentária em processo de resólise dos dentes decíduos para regeneração tecidual.

2.2 ESPECÍFICO

- Identificar as técnicas de manipulação das células-tronco, no intuito de bioengenharia tecidual.
- Avaliar as atuais tendências das pesquisas com células-tronco em polpa de dente hígidos e a evolução ao longo dos anos;
- Elaborar uma sugestão de padronização da técnica de remoção correta da polpa dentária.

3 METODOLOGIA

O método utilizado no trabalho foi por busca de artigos científicos em revistas, livros, bases PubMed, Scielo e Google Acadêmico, entre os anos 2000 e 2018, revisando a literatura, investigando as mais recentes pesquisas a respeito do potencial de regeneração dessas células. Foi utilizado como descritores para buscas os seguintes termos: “stem cells and dentistry” “células tronco e odontologia”. Como critério de inclusão foram adotados, os artigos escritos em inglês e português, aqueles que se enquadraram dentro do enfoque do trabalho, e os mais relevantes em termos de delineamento das informações desejadas, além da disponibilidade do texto integral do estudo investigado.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 CÉLULAS-TRONCO

As células-tronco (CT) possuem potencial de auto renovação e diferenciação de múltiplas linhagens, sendo que a diferenciação é um pré-requisito para a aplicação de células-tronco na medicina regenerativa e na terapia clínica. São utilizadas pois há a possibilidade de diferenciação controlada, que é utilizada principalmente em tratamentos clínicos. A modulação mecânica se dá pelo fato de que as CT se diferenciam *in vivo* e *in vitro* de acordo com a elasticidade e rigidez de seu microambiente em linhagens distintas. Os sinais mecânicos, que incluem proteínas integrinas, citoesqueleto de actina e núcleo são importantes para detectar e transmitir informações ao núcleo da célula (MAO, GAVARA e SONG, 2015).

O processo de auto renovação das CT fazem com que ocorra uma assimetria na divisão celular, no qual apenas uma das duas células filhas se diferencia. Dentre os mecanismos envolvidos, há fatores de transcrição, modificações epigenéticas e hormônios. As células CT podem ser de dois tipos: células estaminais embrionárias (CEE), presentes nos estágios iniciais de desenvolvimento somático, pluripotentes. As células tronco somáticas (CTS) são multipotentes e só podem se diferenciar em um tipo de célula, tecido ou órgão de onde são originadas. Há na literatura também a indicação de uma outra célula específica que está vinculada ao início do câncer, denominada como célula-tronco cancerosa (CTC) (MENS e CHANBARI, 2018).

As células-tronco hematopoiéticas (CTH) são células tronco adultas que estão sendo amplamente pesquisadas, sendo que na última década foram descritas em diversos tecidos e órgãos. As abordagens comparativas de sua biologia proporcionaram evidências de diversas convergências biológicas em tecidos adultos, denominadas como *Stemness*. Células tronco hematopoiéticas são definidas por sua capacidade clonal de restaurar a homeostase do sistema sanguíneo, porém, não há comprovação de que todas as células-tronco são capazes de realizar tais funções quando transplantadas (SCOTT, 2017).

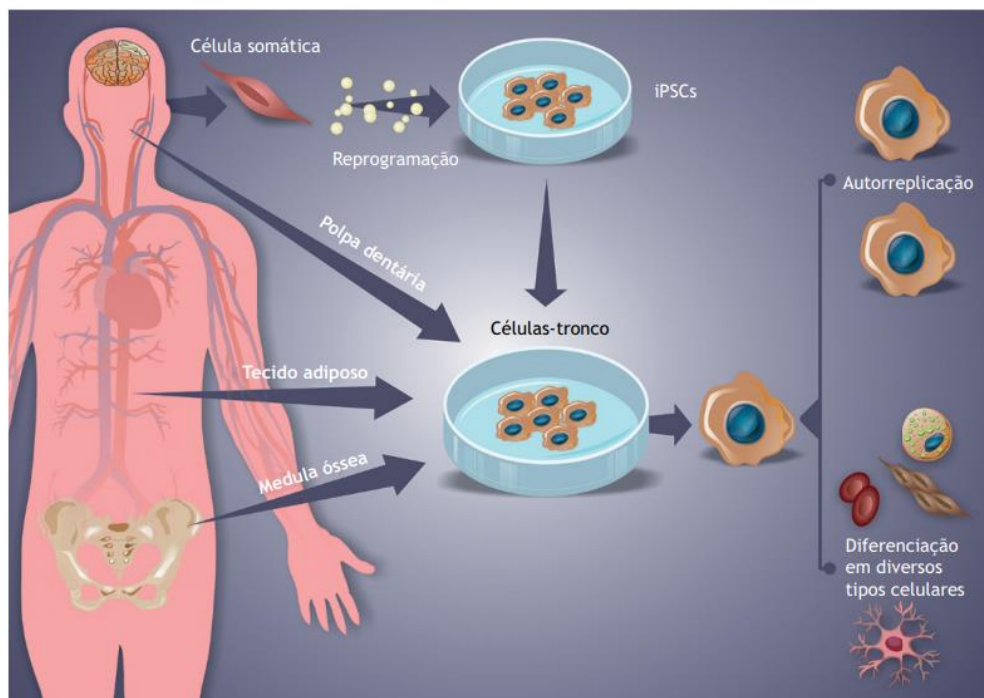
As células-tronco pluripotentes (CTP) podem ser localizadas em tecidos adultos e no sistema hematopoiético. Estas células estaminais podem ser potencialmente utilizadas no lugar de células embrionárias humanas, e assim serem utilizadas nas

terapias celulares e regenerativas. Podem ser localizadas em todo o tecido adulto e são mais numerosas em órgãos fetais (BHARTIYA, 2017).

As células-tronco mesenquimais (CTM) representam apenas 0,001% a 0,1% da população total de células nucleadas, que apresentam capacidade de aderência e elevado potencial proliferativo na presença de bFGF, e linhagens de cultura *in vitro* podem ser reproduzidas a fim de ser criada uma população clonal homogênea, e diferenciam-se em diversas linhagens, incluindo músculos, células da pele, neurônios e hepatócitos, e são positivas para os marcadores celulares CD44, CD73, CD90, CD105, CD271 e STRO-1, facilitando o seu reconhecimento, além de serem negativas para os marcadores de células hematopoiéticas como CD34 e CD45 (OHKOSHI, HARA, *et al.*, 2017).

Na representação esquemática da figura 1, é informado os principais tecidos que podem ser utilizados para a extração das células-tronco mesenquimais. A medula óssea, o tecido adiposo e a polpa dentária são as principais fontes. As células somáticas podem também ser reprogramadas para obter células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC). Ambas as fontes podem ser mantidas em cultivo e após autor replicações induzidas, se diferenciam para o tipo celular ao qual foi induzido (HORINOUCI, ABUD, *et al.*, 2018).

Figura 1- Representação esquemática de reprogramação.

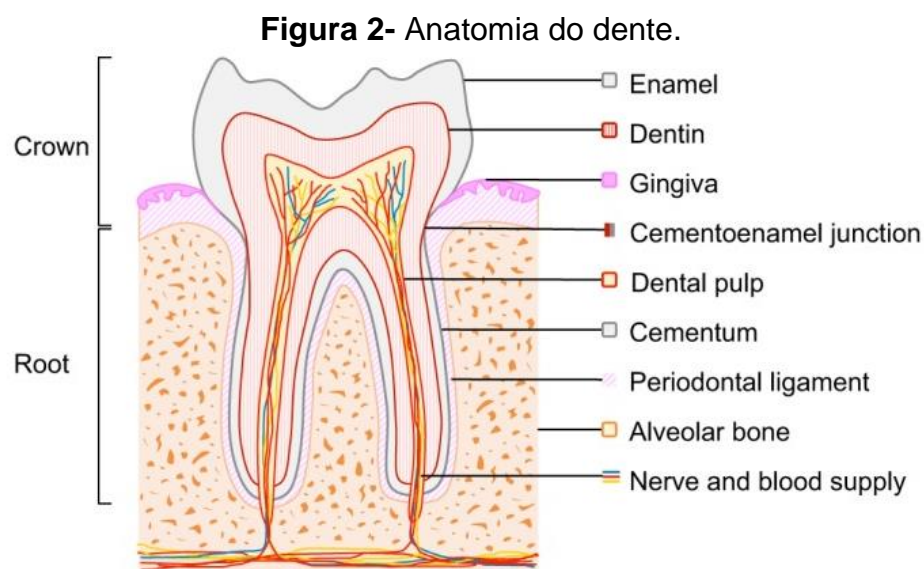


Fonte: Horinouchi, *et al.* (2018).

Na literatura, é discutido que as células-tronco mais efetivas na medicina regenerativa são as isoladas de tecidos pós-natais (RATAJCZAK, 2017). Normalmente, este tipo de terapia é utilizado para o tratamento de doenças malignas e não malignas hematológicas, hereditárias, entre outras. Há mais de meio século é abordado o transplante de CTH, porém, ainda é um desafio a aplicabilidade nas áreas de mobilidade celular, *homing* e enxerto, que com o aumento das pesquisas genéticas e desenvolvimento de outras ferramentas, não são mais inatingíveis pela ciência (PELUS, 2017).

4.3 CÉLULAS-TRONCO DENTÁRIA

Os dentes possuem em sua composição tecidual um elevado nível de minerais, por esse motivo são estruturas rígidas e resistentes. As camadas mais importantes são (figura 2): esmalte, dentina, câmara pulpar, canal radicular contendo a polpa, ligamento periodontal, canal acessório e forame apical. Os elementos externos e associados a essas camadas são a gengiva e o osso presente no maxilar. O esmalte é um revestimento exterior da coroa do dente, possuindo uma camada externa de aproximadamente 2 mm de espessura, já a dentina é formada por tecido conjuntivo mineralizado, que é coberto pelo esmalte ou cimento, é rígido como os ossos, mas também por possuir microtúbulos possui permeabilidade. A polpa dentária é vascularizada e innervada, constituída por tecido conjuntivo e é a parte que fica internamente ao dente (XAVIER, BOMFIM, *et al.*, 2016).

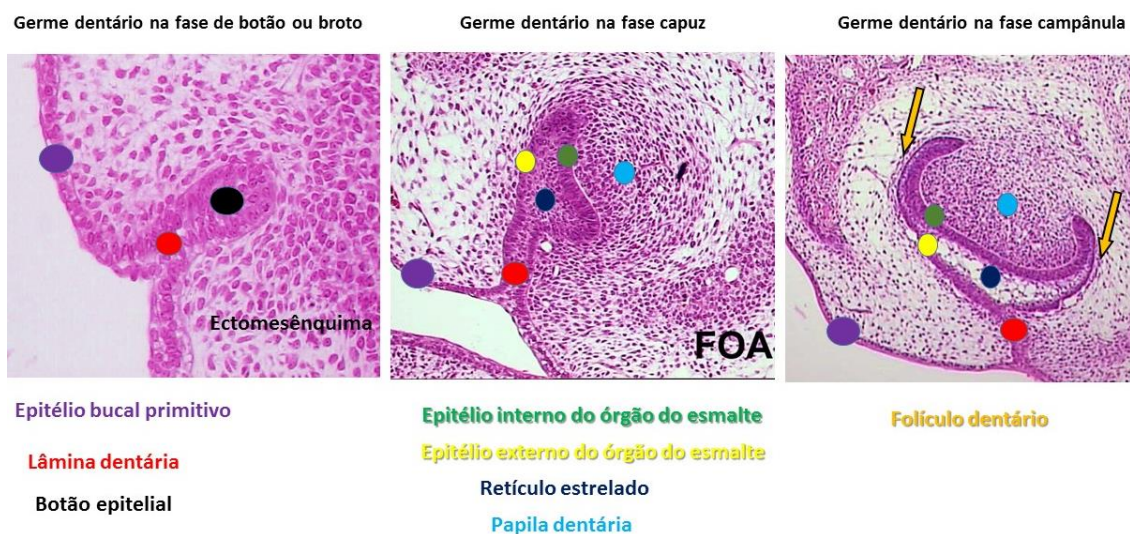


Fonte: Li *et al.* (2017).

Atualmente, há o crescimento na área de engenharia tecidual para o reparo e regeneração das estruturas dentais, que podem ser realizadas a partir de células-tronco presentes em dentes permanentes e dentes decíduos, que estão associadas com a utilização com fins terapêuticos, que podem reestabelecer a função mastigatória e estética dos pacientes utilizando uma abordagem de terapia biológica. Para isso, é necessário realizar técnicas que proporcionem um microambiente adequado para a adesão e migração celular, em que as características químicas, físicas e biológicas sejam favoráveis para este crescimento e diferenciação (CASAGRANDE, SILVALAUXEN e FERNANDES, 2009).

As células-tronco da polpa dentária (CTPD) possuem grande capacidade de utilização em terapias celular, havendo diferentes tipos, que possuem um potencial exclusivo de diferenciação celular. O papel de cada célula germinativa está associado com o desenvolvimento no arco mandibular do embrião, que logo após a iniciação do dente possui dois tecidos diferentes, o epitélio e mesoderme dentária. Estes dois tecidos possuem células indiferenciadas com a informação exata para o desenvolvimento normal de um dente, necessitando de ambos tecidos para gerar um dente inteiro. Durante este desenvolvimento, são derivados três tipos de tecidos do mesoderma dentário e do epitélio dental: folículo dental, papila dentária e órgão do esmalte (figura 3) (MORSCZECK e REICHERT, 2017).

Figura 3- Fases iniciais do desenvolvimento do germe dentário.

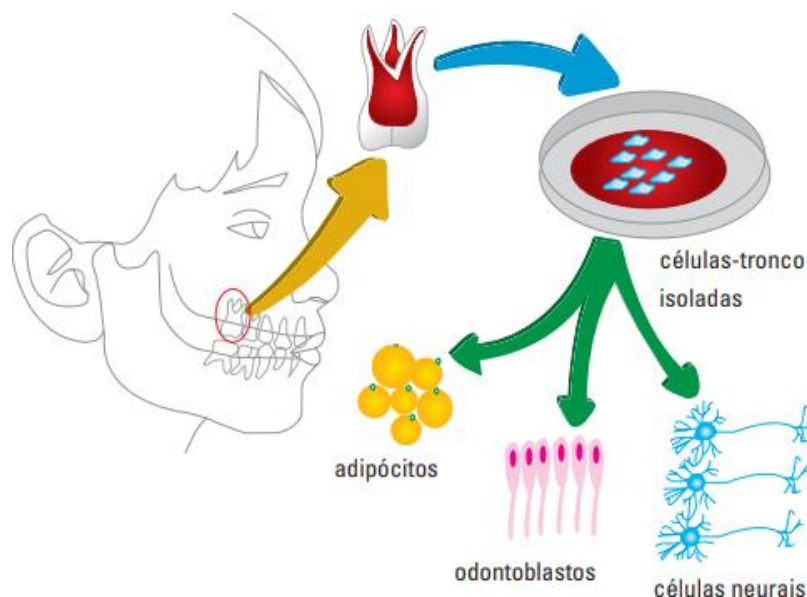


Fonte: Gonçalves (2015).

A polpa dentária, que é envolta pela dentina, se conecta por um espaço fechado com o forame apical, e possui elevada capacidade de reparação dos dentes desgastados ou cariados, sendo que há produção de tecido ósseo no processo de cicatrização da polpa dentária. Os pólipos de polpa dentária são então formados como tecidos do granuloma para cobrir nervos expostos, e por esses fatores expostos foram iniciados estudos com a polpa dentária, pois os resultados sugeriam que este tipo de célula poderia se diferenciar em células de diferentes linhagens (OHKOSHI, HARA, *et al.*, 2017).

Estas células possuem o potencial de se diferenciarem em odontoblastos, osteoblastos, miócitos, adipócitos, condrócitos e neurócitos (figura 4) *in vitro* e *in vivo*, que são um ponto importante na formação e reparação óssea, que com efeitos autócrinos e parácrinos, reestabelecem a função esquelética. As primeiras células-tronco mesenquimais (CTM) foram isoladas de dentes decíduos de humanos esfoliados (HU, LIU e WANG, 2017).

Figura 4- Células-tronco de tecido pulpar com capacidade de se diferenciar em diferentes tipos celulares.

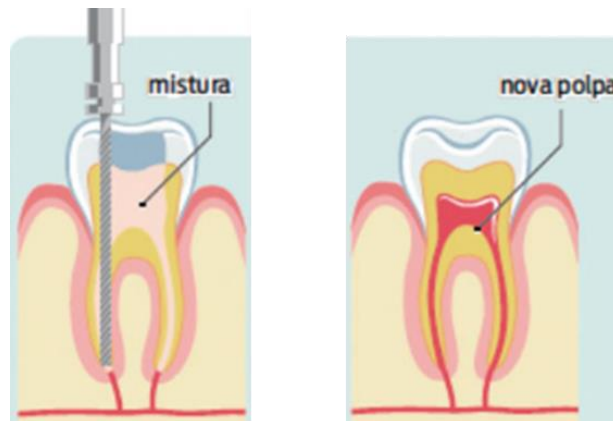


Fonte: Soares *et al.* (2007).

A coleta pode ser realizada de forma não invasiva, já que se trata de um material biológico descartável e o armazenamento das células pode ser realizado com técnicas de criofatura. As células de dentes decíduos não esfoliados são semelhantes às

células isoladas do cordão umbilical, e apresentam elevada taxa de proliferação, diferente das isoladas de dentes permanentes. Um exemplo de utilização da técnica é no tratamento de canal (figura 5), que ao invés de se realizar a retirada completa da polpa do paciente, devida a inflamação, é realizada a mistura de células-tronco que contém proteínas para a completa regeneração do dente (GARCIA, ROQUE e SILVA, 2017).

Figura 5- Tratamento de canal utilizando células-tronco.



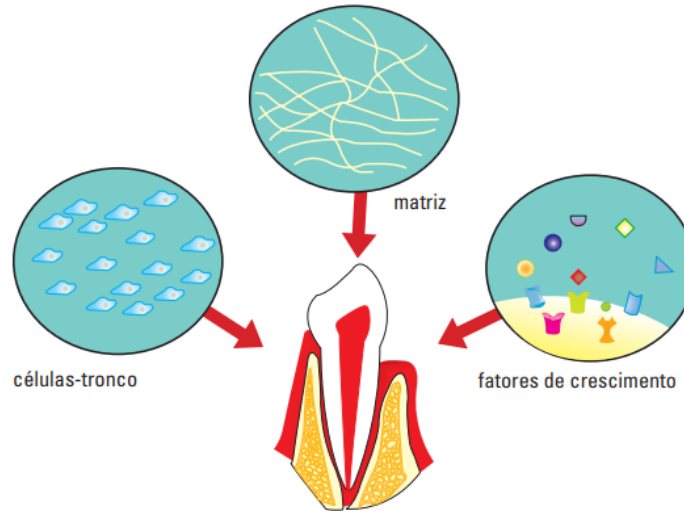
Fonte: Garcia *et al.* (2017).

Após o aparecimento das células-tronco, a comunidade científica passou a investigar como deveria ser o isolamento destas células e como deveriam ser cultivadas. A engenharia tecidual estuda um conceito denominado como tríade, que é baseada em três princípios básicos: células-tronco progenitoras, o *scaffold* e os fatores de crescimento. O *scaffold* é uma matriz extracelular que irá manter o delineamento dos tecidos e as substâncias que induz o crescimento e a diferenciação celular, pode ser de colágeno, minerais ósseos ou materiais sintéticos (SEGUNDO e VASCONCELOS, 2007; HAN, MENICANIN, *et al.*).

Estas estruturas tridimensionais que podem ser biológicas ou sintética, biodegradáveis ou permanentes, denominadas como *scaffolds* são utilizadas para dar suporte tridimensional que irá proporcionar o microambiente ideal para a adesão e migração celular, por apresentarem características físicas, químicas e biológicas. A microporosidade também é um fator importante para o crescimento e diferenciação destas células, em que a conectividade entre as células facilitam o transporte de nutrientes e eliminação de produtos do metabolismo celular. Além das células-tronco e a matriz (*scaffold*) é necessário a disponibilidade de proteínas sinalizadores que estão

associadas aos fatores de crescimento, que irão estimular a diferenciação celular (figura 6) (SOARES, KNOP, *et al.*, 2007; CASAGRANDE, SILVALAUXEN e FERNANDES, 2009).

Figura 6- Fatores da bioengenharia odontológica com células-tronco.



Fonte: Soares *et al.* (2007).

As CTM presentes na polpa dental são obtidas com facilidade e sem dor, diferente da coleta de células-tronco mesenquimais presentes na medula óssea, pois são coletadas de dentes do siso e de dentes decíduos. Estas células, como já informado anteriormente, possuem elevada capacidade proliferativa e mesmo após diversas passagens *in vitro*, não perdem as suas propriedades (OHKOSHI, HARA, *et al.*, 2017).

5 DISCUSSÃO

5.1 EVOLUÇÃO DAS TÉCNICAS DE UTILIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO DE DENTES DECÍDUOS

Em 1999 as células-tronco foram eleitas como o avanço científico do ano pela revista Science. Os artigos publicados sobre células-tronco associadas a odontologia só iniciam por volta de 2001, sendo que em 2007 já há diversos artigos disponíveis em variados periódicos. Os temas mais abordados eram sobre a possibilidade de as células-tronco presentes na polpa dentária realizar a regeneração óssea por mediação de moléculas sinalizadoras, que são os fatores de crescimento (TGF- β) (ZHANG,

CHEN, *et al.*, 2005; LASAKOSVITSCH e LASAKOSVITSCH, 2007; PEREIRA, 2008; NEDEL, ANDRÉ, *et al.*, 2009).

Um dos primeiros artigos publicados sobre células-tronco de dentes decíduos esfoliados, foi publicado em 2003 por Miura *et al.* e até o presente momento possui 2552 citações. Um trabalho anterior, publicado por Gronthos *et al.* (2000) havia relatado como se dá a cultura de dentes permanentes de adultos entre 19 e 29 anos. Durante o trabalho de Miura, os autores relatam a extração de células-tronco de "alta qualidade" de crianças entre 7 e 8 anos de idade. O seguinte protocolo foi utilizado para os dois trabalhos: a polpa foi separada da coroa remanescente e depois foi digerida com a solução de 3mg/mL de colagenase type I e 4 mg/mL de dispase, durante 1h a 37 °C. Para a cultura foi realizada a suspensão de uma única célula em meio de cultura. As suspensões da polpa dentária unicelulares eram salpicadas em placas de 6 poços, com Meio de Cultura *Eagle* e suplementadas com 20% de soro fetal bovino, 100 mM de iodo L-ascbico 2-fosfato, 2mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina, 100 mg/mL de estreptomicina e incubadas a 37 °C em 5% de CO₂.

No trabalho de Zhang *et al.* (2005), os autores discorrem sobre a importância das Proteínas Morfogenéticas Ósseas e fatores de crescimento de fibroblastos. Além disso, os autores analisam o potencial gênico, pois alterando alguns genes, há a sugestão de alterar até mesmo o formato dos dentes.

O trabalho de Miyagi (2008) realizou a análise em processo *in vitro* das proteínas da matriz extracelular (MEC) e da metaloproteinase da matriz (MMPs) em células-tronco de polpa de dente humano. Durante a tese, foram utilizadas polpas de dentes decíduos de crianças entre 5 e 7 anos de idade. O material foi previamente congelado em nitrogênio líquido e crioprotetida com DMSO (dimetilsulfóxido). A cultura celular de DMEM/Ham's F-12 foi suplementada com 15% de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de streptomycina, 2 mM de L-glutamina e 2 mM de aminoácidos não essenciais. A área de cultivo utilizada foi de 70% do frasco, e acompanhado por microscopia de fase invertido, trocando o meio de cultura a cada 2 ou 3 dias.

A primeira publicação localizada sobre células-tronco da polpa dentária foi em 2007, publicado por Kerkis *et al.* No trabalho, os autores informam que foi realizada o isolamento de uma população de células-tronco imaturas, mas que expressavam os marcadores moleculares Oct-4, Nanog, SSEA-3, TRA-1-60 e TRA1-81. Os autores também relataram que após 25 passagens as células ainda mantinham a expressão

destes marcadores assim como a população clonal. Estas células foram diferenciadas para células esqueléticas, neurônios e cartilagens.

Em 2009 foi publicado por Coppe *et al.* um trabalho sobre a caracterização de dentes decíduos em relação a polpa dentária. O isolamento foi realizado de dentes recém extraídos e digeridos com 4 mg/mL de colagenase/dispase para que a coroa e raiz do dente fosse liberada da polpa dentária, e meio de cultura *Eagle* com adição de 10% de soro fetal bovino.

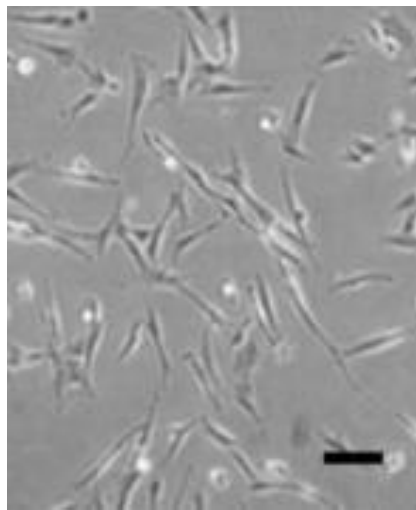
No trabalho publicado por Koyama *et al.* (2009), foi realizada uma pequena modificação na separação da raiz e coroa da polpa do dente, em que ao invés de 3 mg/mL de colagenase do tipo I, foi utilizado 3 mg/mL. O resto do protocolo foi realizado como descrito anteriormente.

Já no trabalho publicado por Miyagi (2010), houve diferença na concentração de soro fetal bovino (20%). O trabalho publicado por Nam e Lee (2009) explica com mais detalhes como era realizada a extração da polpa, em que o dente decíduo era armazenado em uma solução salina *Hank*, e suplementada com antibióticos à 4 °C para evitar a contaminação. Os tecidos da polpa dentária eram extraídos com uma pinça fina, e picada em 1 mg/mL de colagenase do tipo I e 2,4 mg/mL de dispase - vale salientar que as concentrações de colagenase tipo I e dispase são alteradas em quase todos os protocolos.

Em 2012, um estudo publicado por Gioventù *et al.* propõe um novo método para armazenar as células-tronco de polpa dentária, que normalmente é realizada com congelamento em nitrogênio líquido posterior a lavagens de células com DMSO. Os dentes, logo após a extração dentária foram perfurados com laser Nd:YAG no comprimento de onda 1064-10600 nm e 27-90 mJ de energia de pulso, para obter micro canais através do esmalte, assim alcançando a polpa do dente se a danificar. Nos dentes caninos foram realizados até 2 buracos e nos molares ou incisivos até 4 buracos, os dois com diâmetro entre 0,07 a 0,3 mm. Outro fator diferente neste ensaio foi o meio de cultura utilizado, o RPMI 1640, em que os dentes foram colocados em um frasco contendo este meio com temperatura controlada entre 4 e 2 °C. Para a criopreservação, os dentes perfurados foram processados em 24 horas após a extração e transferidos para meio de cultura RPMI contendo 10% de albumina humana e 10% de DMSO. Referente ao isolamento das culturas, os dentes decíduos foram digeridos apenas com 1 mg/mL de colagenase A, e o restante do protocolo não possui alteração com os anteriormente citados.

Lizier *et al.* (2012) propuseram uma nova forma de se realizar a extração da polpa, sem utilizar tratamento enzimático. Os autores informam que as primeiras células que crescem possuem aparência de fibroblastos (figura 7), e que após 3 ou 4 dias, as células recém extraídas apresentam número elevado de multiplicação, e isso gera uma enorme capacidade de produção de células-tronco. Os autores sugerem que não houve diferença significativa dos fenótipos esperados mesmo após 6 meses de cultura.

Figura 7- Células-tronco com aparência de fibroblastos (escala 10 μm).



Fonte: Lizier *et al.* (2012).

A preparação de um scaffold foi apresentada por Coyac *et al.* (2013), com protocolos de extração de polpa e de expansão de células já citados anteriormente neste trabalho. Para a preparação do material *scaffold*, foram utilizados géis de colágeno plasticamente comprimidos. 3,6 mL de colágeno estéril do tipo I (*rat-tail collagen*) com concentração de proteína de 2,01 mg/mL em 0,6% de ácido acético foi misturada com 0,9 mL de meio *Eagle* modificado DMEM (10 vezes) e neutralizado por adição de gota de NaOH (5 M), até atingir pH 7,4. As células foram incorporadas na solução de colágeno a uma densidade de células de aproximadamente 150.000 / mL e em seguida 0,9 mL / poço foi pipetada em uma placa de 4 poços e transferida para incubação durante 30 min a 37 °C. Depois da polimerização, os hidrogéis foram colocados em uma pilha contendo papel absorvente, malha inoxidável e nylon e após, uma compressão de 1 kPa durante 5 minutos. Após este procedimento os *scaffolds* foram transferidos para placas de 6 poços com meio de cultura DMEM.

Wen *et al.* (2016) verificaram se o plasma modificado rico em plaquetas auxiliaria na proliferação e diferenciação das células-tronco da polpa dentária de dentes decíduos. A polpa foi removida de dentes não cariados de crianças entre 6 e 10 anos e semeados em cultura conforme os dados já existentes na literatura. Os autores sugerem que o plasma pode ser utilizado em alternativa para o soro fetal bovino, e que 2% de plasma modificado rico em plaquetas pode ser um ótimo substituinte para 10% de soro fetal bovino.

Werle *et al.* (2017) realizaram ensaios para observar se a hipóxia teria alguma relação com a expressão de marcadores de pluripotência em células-tronco de dente decíduo. O tratamento dos dentes foi realizado com a enzima colagenase tipo I, 0,2% durante 60 minutos a 37 °C, as células foram transferidas para meio modificado *Eagle* com 10% de soro fetal bovino e suplementado com antibióticos. A indução de hipóxia foi realizada em uma câmara selada, com mistura de O₂ a 3%, CO₂ 5% e N₂ a 92% a 20 L/min durante 4 minutos a 37 °C, para acompanhar possíveis alterações de pH. Não houve alteração do pH ao longo de 24 horas. Os resultados indicam que há diferença significativa ($p < 0,01$) nos genes relacionados à pluripotência quando comparado com o controle negativo sem hipóxia.

5.2 SUGESTÃO DE PADRONIZAÇÃO

Foi possível observar que existem muitos tipos de trabalhos relacionados à extração da polpa de dentes decíduos para ser possível obter células-tronco, porém não há tantos trabalhos em que os protocolos sejam claros e precisos. Por este motivo, o presente trabalho definiu como um dos objetivos específicos a sugestão de um protocolo passo a passo para a extração correta da polpa dentária:

- Deve ser realizado em crianças entre os 5 e 12 anos de idade, que estão em período de troca dentária;
- A extração da polpa deve ser realizada de forma asséptica por um dentista;
- Tratamento da polpa dentária com 0,2% de colagenase em meio RPMI 1640 durante 1 hora a 37 °C;
- Centrifugação das células, seguida de transferência para o meio modificado *Eagle* contendo 10% de soro fetal bovino, suplementado com 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de streptomina, 2 mM de L-glutamina e 2 mM de aminoácidos não essenciais;

- Plaqueamento inicial em placas de cultura de 4 poços, sendo repicados a cada 3 ou 4 dias a 37 °C, observando o aumento de multiplicação;
- Após, plaqueamento em placas de 6 poços a 37 °C;
- Em caso de realizar o congelamento, as células devem ser lavadas com meio RPMI 1640 2x e ressuspender com meio modificado *Eagle* contendo 10% de DMSO.

6 CONCLUSÃO

A ciência e tecnologia sempre caminharam juntas ao longo da civilização da humanidade. Quando novas descobertas são realizadas, é necessário também produzir novos equipamentos para acompanhá-las. A descrição das células-tronco e suas capacidades terapêuticas foram um dos maiores avanços científicos deste século, que nos proporcionou e ainda vai nos proporcionar muitas novas descobertas.

No campo da odontologia, este tipo de abordagem terapêutica pode ser utilizado para tratamentos odontológicos quanto clínicos, pois as células-tronco presentes na polpa dentária podem ser utilizadas em diversos locais do corpo humano. Outro aspecto importante é que, com a utilização de dentes decíduos, não há necessidade de proporcionar dor ao paciente, pois são dentes que são substituídos naturalmente na troca de dentição.

O presente trabalho visou informar ao leitor os aspectos importantes sobre as células-tronco e anatomia dentária, para que fosse possível compreender a importância médica das células-tronco dentárias. Além disso, os dados na literatura a cerca deste assunto são volumosos, então um dos objetivos específicos foi informar também como se deu a evolução dos métodos de extração e cultivo destas células.

Por fim, foi observado que mesmo com tantos dados na literatura a cerca deste assunto, não havia um protocolo exato de como deve ser realizada a extração e manutenção destas células, sendo assim elaborado uma sugestão de extração correta da polpa dentária.

7 REFERÊNCIAS

ARAKAKI, N. et al. Extranodal rosai-dorfman disease presenting as a solitary mass with human herpesvirus 6 detection in a pediatric patient. **Pediatr Dev Pathol**, v. 15, n. 4, p. 324-8, 2012.

BHARTIYA, D. Pluripotent Stem Cells in Adult Tissues: Struggling To Be Acknowledged Over Two Decades. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 13, n. 6, p. 713–724, 2017.

CASAGRANDE, L.; SILVALAUXEN, I.; FERNANDES, M. I. O Emprego da Engenharia Tecidual na Odontologia. **Rev. Fac. Odontol**, v. 1, p. 20-23, 2009.

CHEN, G. Y. et al. A graphene-based platform for induced pluripotent stem cells culture and differentiation. **Biomaterials**, v. 33, n. 2, p. 418-27, 2012.

COPPE, C.; ZHANG, Y.; DEN BESTEN, P. K. Characterization of primary dental pulp cells in vitro. **Pediatr Dent**, v. 31, n. 7, p. 467-71, 2009.

COYAC, B. R. et al. Mineralization of Dense Collagen Hydrogel Scaffolds by Human Pulp Cells. **Journal of Dental Research**, v. 92, n. 7, p. 648–654, 2013.

DALTOÉ, F. P.; MIGUITA, L.; MANTESSO, A. Terceira dentição: uma visão geral. **Rev Gaúcha Odontol**, v. 58, n. 3, p. 387-392, 2010.

DUAILIBI, M. T. et al. Bioengineered teeth from cultured rat tooth bud cells. **J Dent Res**, v. 83, n. 7, p. 523-8, 2004.

GARCIA, T.; ROQUE, J. S.; SILVA, D. F. CÉLULAS-TRONCO: BIOENGENHARIA APLICADA À ODONTOLOGIA. **Nanocell News**, v. 4, n. 6, 2017.

GIOVENTÙ, S. et al. A novel method for banking dental pulp stem cells. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 47, n. 2, p. 199–206, 2012.

GONÇALVES, A. **Fases iniciais do desenvolvimento do germe dentário**. Araçatuba: Unesp, 2015. Disponível em: <http://www.foa.unesp.br/#!/departamentos/ciencias_basicas/histologia/atlas-de-histologia-buco-dentaria/>.

GRONTHOS, S. et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 25, p. 13625-30, 2000.

HAN, J. et al. Stem cells, tissue engineering and periodontal regeneration. **Australian Dental Journal**, v. 59, p. 117–130.

HORINOUCI, C. S. et al. Perspectivas e desafios regulatórios no uso de célulastronco em métodos alternativos ao uso de animais. **Vigil. sanit. debate**, v. 6, n. 2, p. 92-105, 2018.

HU, L.; LIU, Y.; WANG, S. Stem cell-based tooth and periodontal regeneration. **Oral Diseases**, v. 24, n. 5, p. 696–705, 2017.

KERKIS, I. et al. Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. **Cells Tissues Organs**, v. 184, n. 3-4, p. 105-16, 2006.

KOYAMA, N. et al. Evaluation of pluripotency in human dental pulp cells. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 67, n. 3, p. 501-6, 2009.

KRABBE, C.; ZIMMER, J.; MEYER, M. Neural transdifferentiation of mesenchymal stem cells--a critical review. **APMIS**, v. 113, n. 11-12, p. 831-44, 2005.

LANGER, R.; VACANTI, J. P. Tissue engineering. **Science**, v. 260, n. 5110, p. 920-6, 1993.

LASAKOSVITSCH, C. K.; LASAKOSVITSCH, F. C. Células-tronco e a odontologia. **ConScientiae Saúde**, v. 6, n. 1, p. 165-171, 2007.

LI, J.; PARADA, C.; CHAI, Y. Cellular and molecular mechanisms of tooth root development. **Development**, v. 144, n. 3, p. 74-384, 2017.

LIZIER, N. F. et al. Scaling-up of dental pulp stem cells isolated from multiple niches. **PLoS One**, v. 7, n. 6, p. e39885, 2012.

MAO, X.; GAVARA, N.; SONG, G. Nuclear Mechanics and Stem Cell Differentiation. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 11, n. 6, p. 804–812, 2015.

MATHUR, S. et al. Stem cell research: applicability in dentistry. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 29, n. 2, p. e210-9, 2014.

MENS, M. J.; CHANBARI, M. Cell Cycle Regulation of Stem Cells by MicroRNAs. **Stem Cell Rev**, v. 14, n. 3, p. 309-322, 2018.

MIURA, M. et al. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 10, p. 5807–5812, 2003.

MIYAGI, S. H. **análise in vitro da expressão de proteínas da matriz extracelular (MEC) e da metaloproteinase da matriz (MMPs) em células-tronco de polpa dentária humana.** [S.l.]: Faculdade de odontologia da Universidade de São Paulo, 2008. 128 p.

MIYAGI, S. P. et al. Expression of Extracellular Matrix Proteins in Human Dental Pulp Stem Cells Depends on the Donor Tooth Conditions. **Journal of Endodontics**, v. 36, n. 5, p. 826–831, 2010.

MORSCZECK, C.; REICHERT, T. E. Dental stem cells in tooth regeneration and repair in the future. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 18, n. 2, p. 187–196, 2017.

NAM, H.; LEE, G. Identification of novel epithelial stem cell-like cells in human deciduous dental pulp. **iochemical and Biophysical Research Communications**, v. 386, n. 1, p. 135–139, 2009.

NEDEL, F. et al. Stem cells: therapeutic potential in dentistry. **J Contemp Dent Pract**, v. 10, n. 4, p. 90-6, 2009.

OHKOSHI, S. et al. Regenerative medicine using dental pulp stem cells for liver. **World J Gastrointest Pharmacol Ther**, v. 8, n. 1, p. 1-6, 2017.

PELUS, L. M. Stem Cell Reviews and Reports: Cell Trafficking, Stem Cell Mobilization and Homing, and Hematopoiesis Section. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 13, n. 1, p. 5–5, 2017.

PEREIRA, L. V. A importância do uso das células tronco para a saúde pública. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 13, n. 1, p. 7-14, 2008.

RAI, S.; KAUR, M.; SAUR, S. Applications of Stem Cells in Interdisciplinary Dentistry and Beyond: An Overview. **Ann Med Health Sci Res**, v. 3, n. 2, p. 245–254, 2013.

RATAJCZAK, M. Z. Looking Back at the Past Year of Stem Cell Reviews and Reports. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 13, n. 6, p. 703–704, 2017.

SCOTT, E. W. Stem Cell Reviews and Reports: Adult Stem Cells and Tissue Regeneration Section. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 13, n. 1, p. 2–2, 2017.

SEGUNDO, A. L.; VASCONCELOS, B. E. Células-tronco e engenharia tecidual: perspectivas de aplicação em odontologia. **Rev. Ciênc. Méd**, v. 16, n. 1, p. 23-30, 2007.

SERAKINCI, N.; KEITH, W. N. Therapeutic potential of adult stem cells. **Eur J Cancer**, 2006, v. 42, n. 9, p. 1243-6.

SOARES, A. P. et al. Células-tronco em Odontologia. **R Dental Press Ortodon Ortop Facial**, v. 12, n. 1, p. 33-40, 2007.

WEN, J. et al. Investigation of modified platelet-rich plasma (mPRP) in promoting the proliferation and differentiation of dental pulp stem cells from deciduous teeth. **Braz J Med Biol Res**, v. 49, n. 10, p. e5373, 2016.

WERLE, S. B. et al. Hypoxia upregulates the expression of the pluripotency markers in the stem cells from human deciduous teeth. **Clinical Oral Investigations**, v. 23, n. 1, p. 199-207, 2019.

XAVIER, A. C. et al. **estudo do processo de clareamento dentário utilizando diferentes cremes dentais**. [s.l.]: instituto federal de educação, ciência e tecnologia de santa catarina, 2016. 31 p.

ZHANG, Y. D. et al. Making a tooth: growth factors, transcription factors, and stem cells. **Cell Res**, v. 15, n. 5, p. 301-16, 2005.