

MOIRA PEDROSO LEÃO

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO
HUMANAS DO SACO PERICORONÁRIO DE DENTES
PERMANENTES SUBJACENTES AOS DECÍDUOS ESFOLIADOS -
SUED

Trabalho apresentado como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Odontologia - Área de Concentração Implantodontia, do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientadora: Mabel Mariela Rodríguez Cordeiro

FLORIANÓPOLIS - SC

2012

Catálogo Biblioteca da UFSC

MOIRA PEDROSO LEÃO

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO
HUMANAS DO SACO PERICORONÁRIO DE DENTES
PERMANENTES SUBJACENTES AOS DECÍDUOS ESFOLIADOS -
SUED

Esta Tese foi julgada adequada para a obtenção do Título de Doutor, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Florianópolis, 13 de fevereiro de 2012.

Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini
Coordenador do Programa de Pós-Graduação

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Mabel Mariela Rodríguez Cordeiro
Universidade Federal de Santa Catarina
Presidente (Orientadora)

Prof. Dr. Jacques Eduardo Nör
University of Michigan

Prof. Dr. Ricardo Ribeiro dos Santos
Monte Tabor Centro Ítalo Brasileiro de Prom.Sanitária – BA

Profa. Dra. Andréa Gonçalves Trentin
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini
Universidade Federal de Santa Catarina

“Pintou estrelas no muro,
e teve o céu ao alcance das mãos”

Helena Kolody

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Regina Emília e Areonaldo Carlos Pedroso,
meus exemplos de perseverança,
são por merecimento os avós das células-tronco desta pesquisa.

Aos meus irmãos, Magalí e Marcel Pedroso,
eternos incentivadores e admiradores de todas as conquistas.

À minha filha Laís Rocha Leão
pelo auxílio contínuo na administração do tempo e das tarefas.

Ao meu marido Roberto da Rocha Leão Neto,
pelas longas conversas, pelos cálculos, pelas perguntas, por me ouvir,
por me inspirar.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Força Maior
que nos guia e impulsiona todos os dias em busca da verdade e
que muitos chamam de DEUS mas também podemos chamar simplesmente
de FÉ.

AGRADECIMENTOS

À Direção e aos Pesquisadores do Instituto Carlos Chagas/Fiocruz-Paraná, em especial: Dr. Samuel Goldenberg, diretor, e aos pesquisadores Dr. Bruno Dallagiovanna Muniz, Alejandro Correa Dominguez, Alessandra Melo de Aguiar, Patrícia Shigunov, Andressa Vaz Schittini, Marcos Augusto Stimamiglio, Jaiesa Zych, Ana Paula Ressetti Abud, Ana Carolina Origa Alves e da minha professora particular de cultivo celular, a perfeccionista Criscielle Kuligovki. Sem a ajuda de TODAS estas pessoas supervisionando a realização da pesquisa e do apoio da Instituição no empréstimo do espaço físico do Laboratório de Biologia Celular seria impossível a realização da parte prática deste trabalho.

Aos coordenadores do curso de Odontologia da Universidade Positivo (UP), Profa Maria da Graça Kfoury Lopes e o Prof. Flares Baratto Filho, pelo apoio e compreensão.

Aos meus colegas de trabalho e amigos na UP e na UFPR, pelo suporte durante as minhas ausências, em especial à equipe de professores: Marcio José Fraxino Bindo, Sávio Moreira da Silva, Eduardo C.C. de Moraes, Rogério Goulart e Bárbara Pick.

Aos amigos João César Zielak, Caroline Leal Radoski e Alan Giovanini pelas discussões técnicas e metodológicas da tese.

Aos meus amigos Neto e Ariadne Cruz, mais do que amizade a Ariadne compartilhou cada momento da minha pesquisa, foi minha segunda orientadora.

Aos meus colegas de doutorado André Ricardo Buitendorf, Luiz Boff, Elisa Oderich e Rodrigo Granato e os contemporâneos de CEPID Armando Lopes Pereira, Daniel Kfoury Lopes, Ernesto Barqueiro, Gustavo Sella, Newton Lucchiari e em especial, à Pâmela C.A.R. Andrade, que além de compartilhar os estudos acabou se tornando minha irmã mais nova.

Ao Professor Mark Breyer no preparo das aulas em inglês e auxílio nas traduções durante todo o período do doutorado.

À Professora Eliane Maria Goldfeder pela ajuda nas colorações.

Às funcionárias Ana Maria Frandolozo, Gisela Menegaz, Mirian Faria, Nilcéia Arruda e Dolores Rossi, exemplo de dedicação e apoio aos alunos.

Aos professores Antonio Carlos Cardoso e Marco Aurélio Bianchini, pela condução do aprendizado da docência e da pesquisa.

Ao meu sempre orientador e/ou motivador Ricardo de Souza Magini, pela confiança no meu trabalho.

À minha orientadora Mabel Mariela Rodriguez Cordeiro, mais que uma orientadora, uma obstinada pela perfeição, pela ciência, pelo progresso. Exemplo de Mestre a ser lembrado e seguido por toda uma vida e por muitas gerações.

Aos ilustres integrantes da banca por dedicarem seu tempo para contribuírem com este trabalho que simboliza o início da apaixonante linha de pesquisa com células-tronco humanas derivadas de tecidos odontológicos, na Instituição de Ensino Superior onde trabalho - Universidade Positivo.

Aos pacientes e seus responsáveis pela doação das amostras que alimentaram esta pesquisa.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Proliferação Celular por Dias das Passagens____	p.111
Tabela 2 -	Área obtida a cada passagem_____	p.113
Tabela 3 -	Média da Área obtida a cada passagem por Grupo	p.113
Tabela 4 -	Proliferação celular avaliada pelo número de células_____	p.115
Tabela 5 -	Controle IgG sem marcação (%)_____	p.129
Tabela 6 -	Painel Fenotípico Completo_____	p.130
Tabela 7 -	Médias das amostras P e SP (%)_____	p.134
Tabela 8 -	Média das amostras com SHEDs (%)_____	p.136
Tabela 9 -	Média das amostras com SUEDs (%)_____	p.137
Tabela 10 -	Desvio Padrão entre SUED e SHED_____	p.138
Tabela 11 -	Análise Estatística Média (%)_____	p.139

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Relação de Anticorpos_____ p.42

Quadro 2 - Cor dos Fluoróforos - Marcadores dos Anticorpos
_____ p.118

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** - Média em dias entre as passagens das células SHEDs e SUEDEs ($P_0 - P_5$)_____ p.112
- Gráfico 2** - Crescimento celular medido pela área de cultivo_____ p.114
- Gráfico 3** - Proliferação celular entre P_3 e P_4 a partir da fórmula logarítmica_____ p.115
- Gráfico 4** - Análise da complexidade celular (Side Scatter - SSC-A)_____ p.116
- Gráfico 5** - Análise do volume celular (Forward Scatter - SSC-A)_____ p.116

LISTA DE FIGURAS

Figura I -	Desenvolvimento dentário_____	p.24
Figura II	Dente decíduo com raiz íntegra, dente decíduo com rizólise	
-	avançada e saco pericoronário	
	subjacente_____	p.25
Figura 1 -	Morfologia das células em cultura_____	p.44
Figura 2 -	Características da proliferação celular_____	p.45
Figura 3 -	Imunofenotipagem_____	p.47
Figura 4 -	Diferenciação Celular_____	p.48
Figure 1 –	Morphology of the cells in culture_____	p.75
Figure 2 –	Proliferation characteristics _____	p.76
Figure 3–	Immunophenotyping_____	p.78
Figure 4–	Cell differentiation_____	p.79

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

% - porcentagem

APC – Alofococianina

BSA – *Bovine Serum Albumin*

BMMSC – *Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells*

Ca⁺ - íon cálcio

cm – centímetro(s)

cm² – centímetro(s) quadrado(s)

CO₂ - gás carbônico

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

FITC - Isotiocinato de fluoresceína

IgG – Imunoglobulina G

Mg²⁺ - íon magnésio

mm – milímetro(s)

mM - miliMolar

MSCs – *Mesenchymal Stem Cells*

°C - graus Celsius

p - nível de significância

PBS - *Phosphate Buffered Saline*

PE - Ficoeritrina

PE-Cy7 - Ficoeritrina-P/cianina

pH - potencial hidrogeniônico

SFB - Soro Fetal Bovino

SHED – *Stem Cell from Human Exfoliated Deciduous Teeth*

SUED – *Stem Cell from Human Pericoronar Bag Under Exfoliated
Deciduous Teeth*

μl – microlitro(s)

μm – micrometro(s)

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

Resumo _____ p.xvii

Abstract _____ p.xix

CAPÍTULO II

Introdução e Revisão da Literatura _____ p.22

CAPÍTULO III

Artigo para publicação em português _____ p.33

Artigo para publicação em inglês _____ p.64

CAPÍTULO IV

Referências Bibliográficas da Tese _____ p.96

CAPÍTULO V

Apêndice I - Dados da Proliferação Celular _____ p.111

Apêndice II - Dados da Imunofenotipagem _____ p.117

Apêndice III - Dados Complementares da Diferenciação Celular _____ p.140

Apêndice IV - Parecer Comitê de Ética _____ p.143

Apêndice V - Termo de Consentimento livre e esclarecido _____ p.144

CAPÍTULO I

Leão, Moira Pedroso. Isolamento e caracterização de células-tronco humanas obtidas do saco pericoronário de dentes permanentes subjacentes aos decíduos esfoliados - SUED. 2012. Tese (Doutorado em Odontologia - área de concentração: Odontologia) - Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

RESUMO

A descoberta da presença de células-tronco em tecidos odontológicos abre uma nova frente de trabalho e de estudo aos cirurgiões-dentistas, uma vez que tecidos antes descartados poderão servir de base para a pesquisa científica e futura utilização clínica. Os avanços no conhecimento sobre células-tronco e na engenharia de tecidos têm aberto oportunidades para o estudo de novas estratégias para a regeneração de tecidos lesados ou perdidos na cavidade bucal. OBJETIVOS: Este trabalho teve como objetivos verificar a presença de células-tronco no saco pericoronário de dentes permanentes humanos subjacentes a dentes decíduos em fase final de rizólise e esfoliação, bem como isolar, expandir e caracterizar estas células-tronco. MATERIAL E MÉTODOS: O tecido da região central do saco pericoronário recobrimdo a coroa do dente permanente, abaixo do decíduo em esfoliação, foi coletado com o auxílio de uma lâmina de bisturi. Também foi coletada a polpa do dente decíduo correspondente para o isolamento de células-tronco de polpa de dentes decíduos em esfoliação (SHED). As amostras do tecido pulpar e do saco pericoronário coletados foram colocados em cultura e as células-tronco isoladas pela técnica do *explant*. As células isoladas foram expandidas e submetidas à análise fenotípica por citometria de fluxo. Posteriormente, as mesmas foram avaliadas quanto ao potencial de

diferenciação osteogênica, condrogênica e adipogênica. RESULTADOS: Os resultados das análises realizadas confirmaram que foi possível a obtenção de células-tronco a partir do saco pericoronário. As células-tronco do saco pericoronário do dente permanente subjacente ao decíduo em esfoliação (SUED) proliferaram em condições de cultura padrão e foram capazes de se diferenciarem em células de linhagem adipogênica, condrogênica e osteogênica. As células SUEds e SHEDs tiveram marcação fenotípica semelhante e condizente com as marcações esperadas para células-tronco mesenquimais (MSCs). Foi necessário um tempo menor de cultura entre P₀ e P₁, nas amostras de saco pericoronário, em relação às amostras de polpa, talvez por permitir um volume tecidual inicial maior. CONCLUSÃO: Pode-se concluir que o saco pericoronário de dentes permanentes subjacentes aos decíduos em esfoliação possuem células-tronco mesenquimais indiferenciadas com capacidade de diferenciação em diversos tecidos, sendo mais uma fonte viável para a obtenção de células-tronco mesenquimais com mínima morbidade.

Palavras-chave: célula-tronco, dente permanente, saco pericoronário, dente decíduo, tecido pulpar.

Leão, Moira Pedroso. **Isolation and in vitro characterization of human stem cells from the pericoronal bag of permanent teeth underlying exfoliated deciduous teeth - SUED**. 2012. Thesis (PhD in Dentistry - Graduate Program in Dentistry - Implantology) - Graduate Program in Dentistry, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

ABSTRACT

The discovery of stem cells in dental and oral tissues widens the possibility of work and study for dental surgeons, as tissues that were usually discharged can now be used as basis of scientific research and for future use in clinics. Advances in the knowledge of stem cells and tissue engineering represent opportunities for the study of new strategies to regenerate damaged or missing tissues of the oral cavity. **AIMS:** to evaluate the presence of stem cells in the pericoronal bag tissue of human permanent teeth underlying deciduous teeth at their final stage of root resorption and exfoliation, as well as to isolate, expand and characterize these stem cells. **MATERIAL AND METHODS:** Tissue from the central region of the pericoronal bag covering the crown of permanent teeth, underneath exfoliating deciduous teeth, was collected with the aid of a scalpel. Additionally, pulps of the corresponding deciduous teeth were collected for isolation of stem cells from exfoliated deciduous teeth (SHED). Samples of pulp and pericoronal bag tissues were separately put in culture medium and stem cells were isolated through the *explant* technique. The isolated cells were expanded and underwent both phenotypical and differentiation analyses. **RESULTS:** It was possible to obtain stem cells from the pericoronal bag of permanent teeth underlying exfoliated deciduous teeth (SUED), which proliferated in standard culture

conditions and were able to differentiate in adipogenic, chondrogenic and osteogenic cell types. SUED and SHED cells showed similar phenotypic profiles that matched the expected features of mesenchymal stem cells (MSCs). A shorter time of culture between P₀ and P₁ was required in samples of pericoronal bag when compared with pulp samples, perhaps because it allows for a larger initial tissue volume. **CONCLUSION:** It can be concluded that the pericoronal bag of permanent teeth underlying deciduous teeth in exfoliation hold undifferentiated mesenchymal stem cells in various tissues. Therefore, it is another viable source of mesenchymal stem cells with minimum morbidity.

Keywords: stem cell, permanent tooth, pericoronal bag, deciduous tooth, pulp tissue.

CAPÍTULO II

INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

A versatilidade e a previsibilidade dos implantes dentários colocaram esta modalidade terapêutica entre as que possuem as mais altas taxas de sucesso da Odontologia (ALBREKTSSON, 1983; ALBREKTSSON et al., 1986; TRIPLETT et al., 2000). Entretanto, quando um elemento dentário é perdido, o tecido ósseo que provia sustentação ao órgão é comumente reabsorvido (MARX e GARG, 1998), dificultando sobremaneira a reabilitação integral do paciente (TARNOW et al 2003). A fisiologia do tecido ósseo tem sido amplamente estudada nas últimas décadas (WOZNEY 1989, 1992; WOZNEY et al., 1988, 1990; URIST et al., 2003), pois, além de comprometer a estabilidade necessária para a fixação de implantes osseointegráveis de titânio para substituir elementos dentários ausentes, a perda do osso alveolar também compromete a estética dos pacientes (SCHROPP et al, 2003). Responsável pela sustentação dos tecidos moles presentes ao redor dos dentes, a subsequente reabsorção do osso alveolar após a perda dentária também contribui para a perda de sustentação dos lábios e músculos da face e impossibilita a manutenção da posição fisiológica dos tecidos moles. As modificações resultantes da perda desta estrutura se apresentam na forma de alterações das atividades funcionais da fala, da mastigação e da deglutição, modificando hábitos e a dieta do paciente. Tão importante quanto os aspectos físicos que a “invalidez oral” deflagra, estão as alterações psicossociais. Nos trabalhos que avaliam a satisfação dos pacientes após a reabilitação com implantes osseointegráveis se evidencia claramente a melhora na autoestima dos pacientes reabilitados (STELLONGSMA et al., 2003; LEÃO et al., 2009, EMAMI et al., 2009).

Vários grupos ao redor do mundo estudam a obtenção do órgão dentário por meio da engenharia tecidual (YAO et al., 2008; YEN e SHARPE, 2008; HUANG, 2009; YAN et al., 2011). Promover a formação de um dente em laboratório é realmente algo que merece elevado reconhecimento científico devido à complexidade de sua estrutura. A organização celular que forma três tecidos duros distintos, esmalte, dentina e cimento, interligados ao osso pelo ligamento periodontal e recebendo nutrição por um delicado tecido interno, a polpa dentária, faz deste órgão um dos mais complexos do organismo (MANGKORNKARN et al., 1991). Do ponto de vista embriológico, os dentes são classificados como sendo de origem ectodermal, pois o esmalte dentário é formado graças a uma sequência recíproca de interações entre as células do epitélio oral (ectoderma) e células mesenquimais derivadas da crista neural. As células epiteliais dão origem aos ameloblastos que formam o esmalte, porção mais externa do dente, e as células mesenquimais formam todas as outras células diferenciadas (tecido pulpar, odontoblastos que irão formar a dentina, ligamento periodontal e cementoblastos que irão formar o cimento) (Figura I) (VOLPONI et al, 2010).

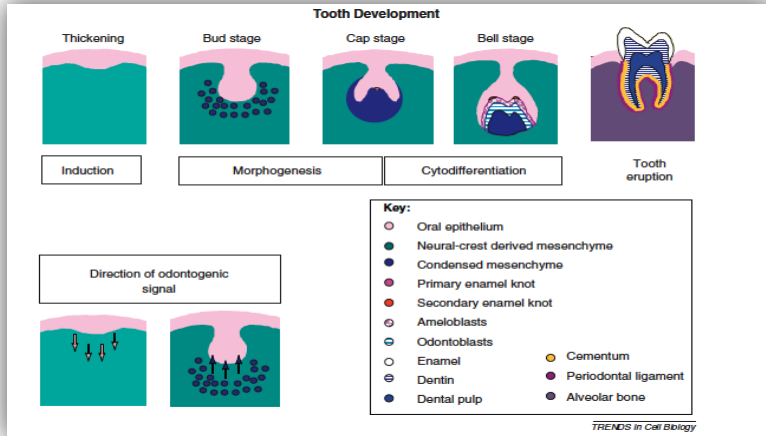


Figura I - Desenvolvimento dentário – (Reproduzido de VOLPONI, A.A.; PANG, Y.; SHARPE, P.T. Stem cell-bases biological tooth repair and regeneration. Trends in Cell Biology. 2010. 20(12):715-722).

O saco pericoronário é o remanescente dos tecidos que participaram da formação dental (odontogênese) e permanecem circunjacentes à coroa de um dente que ainda não irrompeu à cavidade oral (DAMANTE, 1987). Cahill e Marks, em 1980, demonstraram a importância do saco pericoronário no processo de erupção após observarem, em estudos com cães, que este tecido foi a única estrutura imprescindível para a formação do caminho irruptivo desde a base da cripta óssea até a margem gengival (Figura II).

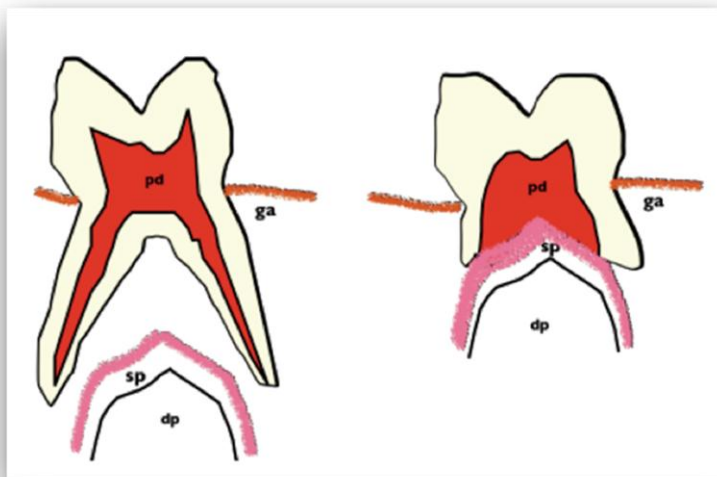


Figura II - Dente decíduo com raiz íntegra, dente decíduo com rizólise avançada e saco pericoronário subjacente. pd: polpa dentária; ga: gengiva adjacente; sp: saco pericoronário; dp: dente permanente.

Apesar de existirem inúmeros fatores coexistentes na formação de osso e dentes, a formação do dente por meio de bio-engenharia independe da presença do osso (YOUNG et al., 2005). Por esta razão, obter um dente em laboratório não significa que os problemas encontrados na clínica odontológica para reabilitar os nossos pacientes serão resolvidos, pois a situação da falta do tecido ósseo para sustentar o novo dente continuará a ser uma questão fundamental para manter estável o elemento substituído aloplástico, como são os implantes de titânio, ou biológicos como os bio-dentes. Além disto, o longo período necessário para a reorganização celular e mineralização durante a formação dos tecidos dentários (VOLPONI et al., 2010) pode ser um transtorno de difícil administração quando se trata de pacientes adultos.

Situações como estas têm sido o mote da busca por múltiplas abordagens terapêuticas para a preservação ou reparação dos tecidos duros e moles da cavidade oral (ZOLLNER et al., 2008; ITO et al., 2006).

A descoberta das células-tronco e a possibilidade de sua utilização na regeneração de tecidos perdidos trouxe um novo ânimo à Odontologia (MAO et al., 2006; HUANG et al., 2009; CORDEIRO et al., 2008; SAKAI et al., 2010; CASAGRANDE et al., 2010, 2011; HONDA et al., 2011). Trabalhos como os de Yamada et al. (2011), que utilizam células-tronco de medula óssea (BMMSCs) conjuntamente com implantes osseointegráveis em cirurgias de enxerto de seio maxilar em humanos, constituem uma esperança para a utilização clínica da engenharia de tecidos (MUSCHLER et al., 2004), que busca regenerar o tecido com células de mesma linhagem, em especial na recuperação de tecido ósseo ausente ou perdido devido a perdas dentárias, doenças degenerativas, traumas, neoplasias ou mesmo alterações congênitas (ASSEL, 2003; CONRAD e HUSS, 2005; XU et al., 2010). Caplan, em 1991, utilizou o termo célula-tronco mesenquimal (MSC) para nomear as células com capacidade de diferenciação em múltiplas linhagens encontradas nos tecidos. Entretanto, há mais de 40 anos, Friedenstein et al. (1968) demonstraram a presença de células na medula óssea, com capacidade de diferenciarem-se in vitro em osso, cartilagem, tecido adiposo, tendão e músculo, demonstrando a chamada multipotencialidade, característica peculiar a estas células.

O tempo de estudo das BMMSCs colocam estas células em grande vantagem quando se quer previsibilidade e segurança quanto aos protocolos de obtenção e manejo. Porém, uma coleta tradicional, por meio da aspiração da medula óssea do osso íliaco, não faz parte da área de atuação do cirurgião-dentista, dificultando a acessibilidade a estas células para a

pesquisa e uma futura utilização em engenharia de tecidos na Odontologia. A descoberta da presença de MSCs em tecidos odontológicos abre uma nova frente de estudo, e também de trabalho, aos cirurgiões-dentistas, uma vez que tecidos antes descartados poderão servir de base para a pesquisa científica e futura utilização clínica na regeneração de tecidos lesados, quer seja apenas por meio da administração direta destas células ou preparadas em arcabouços que possam prover suporte e ambiente adequados a elas (AQUINO et al., 2009; SAKAI et al., 2011). Zheng et al., em 2009, demonstraram que células de polpa de dentes decíduos foram capazes de reparar defeitos ósseos críticos de 2,5 x 1,5 x 1,5 cm³ em mandíbulas de mini-pigs. Mendonça Costa et al. (2008) provaram que células humanas de polpa de dentes decíduos em esfoliação foram capazes de se diferenciarem em osteoblastos e reparar lesões cranianas extensas em ratos imunocompetentes.

A atividade imunomoduladora das células de origem odontológica também tem sido objeto de investigações (PIERDOMENICO et al., 2005). Yamaza et al. publicaram um trabalho em 2010 onde reconhecem um potencial fortíssimo para a utilização em terapia celular das células-tronco encontradas na polpa de dentes decíduos em esfoliação. Neste estudo, tais células humanas foram isoladas, expandidas, caracterizadas e usadas por meio de perfusão venosa, onde foram capazes de reverter a atividade do lúpus eritematoso em camundongos.

Além disto, células-tronco coletadas a partir de diferentes tecidos dentários poderão se mostrar adequadas para uso em sítios distantes da face, fornecendo aos pesquisadores e médicos um material de fácil acesso para inúmeras patologias. Sakai et al., 2012, demonstraram que células-tronco oriundas de polpa dentária foram mais eficazes na regeneração de lesões

agudas de medula espinhal, em ratos, quando comparadas às BMMSCs. Os autores ponderam que a origem embrionária múltipla do órgão dental pode predispor a mecanismos celulares os quais provocaram resultados animadores, como a inibição da apoptose de neurônios, astrócitos e oligodendrócitos, enquanto também promoveram a regeneração dos axônios seccionados devido à atividade parácrina destas células. Neste mesmo estudo, as células-tronco da polpa foram capazes de substituir as células perdidas diferenciando-se em oligodendrócitos maduros e tiveram uma extraordinária taxa de sobrevivência de 30%, depois de diferenciadas. Por originarem-se a partir da crista neural, as células-tronco presentes na polpa expressam marcadores para células-tronco mesenquimais (MSCs) e também células-tronco neuroectodérmicas como demonstrado nos trabalhos de Gronthos et al. (2000) e Miura et al. (2003).

Gandia et al., (2008), também usaram células de origem odontológica para melhorar a função ventricular esquerda, induzir a angiogênese e reduzir a área lesada em infarto agudo do miocárdio de ratos. Os autores acreditam que os múltiplos fatores pró-angiogênicos e anti-apoptóticos secretados pelas células-tronco de polpa dentária usadas no estudo foram fundamentais para a obtenção dos resultados satisfatórios. Com resultados semelhantes aos obtidos com as BMMSCs, os autores reconhecem na polpa dentária uma nova fonte de obtenção de células-tronco com potencial para o tratamento do infarto agudo do miocárdio.

Foram identificadas até agora diferentes células-tronco mesenquimais de origem odontológica. São elas: células-tronco de polpa dental (DPSCs) (GRONTHOS et al., 2000), células-tronco de polpa de dentes decíduos esfoliados (SHED) (MIURA et al., 2003), células-tronco de ligamento periodontal (PDLSCs) (SEO et al., 2004), células-tronco precursoras do

folículo dental (PCs) (MORSCZECK et al.; 2005), células-tronco de queratinócitos orais (IZUMI et al, 2007), células-tronco de medula óssea mandibular (MBMSC) (JO et al., 2007), células-tronco da papila apical (SONOYAMA et al., 2008), células-tronco de polpa de dente supranumerário (HUANG et al., 2008), células-tronco de polpa de germes dentários humanos (TAKEDA, et al., 2008), células-tronco da polpa de dente natal humano (hNDPs) (KARAÖZ et al., 2010), células-tronco da mucosa oral humana (hOMSC) (MARYNKA-KALMANI et al., 2010) e células-tronco de gengiva hiperplasiada (TANG et al., 2011).

Na prática clínica odontológica são raros os casos onde dentes e/ou mucosa saudáveis são removidos, em geral, intervenções mais invasivas são realizadas quando alguma patologia já está instalada. Entretanto, todo ser humano saudável troca os dentes decíduos (dentes-de-leite) por correspondentes permanentes entre os cinco e 12 anos de idade. Esta troca costuma ser muito bem aceita pelas crianças e pelas sociedades em geral. Assim, diferentemente de outras fontes de obtenção de células-tronco (CHANDA et al., 2010; ZUK et al., 2011), as SHEDs são consideradas hoje como sendo uma promissora fonte de captação de células-tronco (KADAR et al., 2009) e têm sido usadas para a regeneração tecidual em diferentes modelos animais e em diferentes sítios lesados (KERKIS et al., 2008; ZHENG et al, 2009).

O fácil acesso, a inexistência de conflitos éticos e, principalmente, a potencialidade de uso sistemático destas células em engenharia tecidual tem levado uma legião de pesquisadores a entender melhor como estas células funcionam e por que elas apresentam peculiaridades diferentes em relação às células encontradas em outras fontes (HUANG et al., 2009).

Entretanto, o potencial regenerador destas células demonstrado nos diversos trabalhos citados é conflitante com a clínica diária. Todo dentista sabe que uma lesão cariosa próxima à polpa em um dente decíduo que esteja em processo de reabsorção da raiz (rizólise) avançada, levará fatalmente a uma degeneração da polpa, ou seja, esta polpa perderá a sua capacidade de recuperação. A descoberta da presença de células-tronco na polpa dos dentes decíduos e a indicação de que estas células estão em maior número no momento da esfoliação do que quando a raiz está completa (BERNARDI et al., 2011), nos traz mais dúvidas do que respostas. Estariam estas células de algum modo se proliferando em maior intensidade para mediar os processos decorrentes à troca dos dentes decíduos pelos permanentes? A atividade anti-inflamatória seria tão intensa que inativariam os odontoblastos inibindo o reparo da dentina com a obliteração dos túbulos dentinários e formação de dentina reparadora? Qual a atuação das células mesenquimais presentes no mecanismo de esfoliação dos dentes decíduos? Elas estão quiescentes ou têm participação ativa nos processos de reabsorção radicular e aposição do tecido ósseo? Quais são os fatores moleculares que são ativados e/ou inativados, qual a sua ordem e quantidade necessária para que os eventos de reabsorção radicular, deposição óssea e erupção do dente sucessor sejam realizados? Será que as SHEDs, tão amplamente divulgadas e depositárias de tantas esperanças pela comunidade científica, estão presentes o tempo todo no interior do dente ou migraram para a polpa vindas do sangue periférico, dos pericitos adjacentes ou mesmo do saco pericoronário que recobre a porção da coroa do dente permanente subjacente?

A ciência ainda não é capaz de responder a todas estas perguntas, mas a curiosidade e a inquietação diante das dúvidas é o que movimenta as pesquisas. Isolar células-tronco do saco pericoronário dos dentes

permanentes subjacentes aos decíduos em esfoliação e estudá-las comparativamente às SHEDs pode ser o primeiro passo para elucidar estas questões.

O propósito deste trabalho foi investigar se o saco pericoronário dos dentes permanentes poderia ser uma fonte viável de células mesenquimais indiferenciadas com capacidade de diferenciação ampliando as possibilidades de obtenção de células-tronco mesenquimais com potencial de uso futuro em Terapias Celulares ou em Engenharia de Tecidos. Portanto, este trabalho teve como:

Objetivo geral:

- verificar a presença de células-tronco no saco periocoronário do dente permanente subjacente ao decíduo em esfoliação.

Objetivos Específicos:

- Isolar células-tronco mesenquimais do saco pericoronário do dente permanente subjacente ao decíduo em esfoliação e da polpa do decíduo correspondente (SHEDs) expandí-las e compará-las entre si quanto à sua capacidade de proliferação, características fenotípicas e potencial de diferenciação.

DISCUSSÃO

A possibilidade de se obter células-tronco mesenquimais com alto poder de multiplicação e diferenciação, que possam levar à regeneração de tecidos e órgãos lesados a partir de fontes de fácil acesso, mobiliza a comunidade científica nos últimos anos (Mendonça Costa et al, 2008; Gandia et al., 2008; Zheng et al., 2009; Sakai et al., 2012). Os tecidos odontológicos intra ou extradentários são hoje mais uma fonte comprovadamente conhecida de origem destas células. A natureza fisiológica da esfoliação dos dentes decíduos e o momento da vida em que isto acontece tornam esta fonte doadora especialmente interessante para se coletar um material que seria originariamente um descarte biológico. Muito embora Miura et al. (2003), já tenham descrito a presença de células-tronco de polpa de dentes decíduos esfoliados (SHEDs) e Cordeiro et al. (2008) e Sakai et al. (2010) tenham comprovado o seu potencial de neoformação endotelial, Bernardi et al. (2011) demonstraram que tais células estão em maior número e em maior quantidade no momento da esfoliação e não quando a rizólise está incompleta.

Esta situação pode sugerir que estas células não estavam originariamente na polpa do dente decíduo, mas podem ter migrado do saco pericoronário do dente permanente subjacente, de outros tecidos adjacentes ou do sangue periférico. Potencialmente, o saco pericoronário, por ter sua origem a partir de células da crista neural, poderia conter células indiferenciadas que, por natureza, também possuiriam a desejada multipotencialidade quanto à sua capacidade de diferenciação (Volponi et al., 2010), fornecendo uma quantidade adicional de células-tronco no momento da esfoliação do decíduo.

Na análise morfológica das amostras desta pesquisa, SHEDs apresentaram aspecto semelhante à descrita por Guimarães et al. (2011), ou seja, aspecto polimórfico, predominante estrelado, além de células fusiformes, enquanto SUEds apresentaram-se predominantemente fusiformes. Quanto à proliferação das células em cultura, neste trabalho foram feitas 3 medições distintas: dias de cultura, área de proliferação e contagem do número de células. Apesar de apresentarem diferença em valores numéricos, os testes aplicados (t-Student) não demonstraram diferença estatística significativa ($p > 0,05$). Dias de proliferação pode ser um dado importante quando se pretende prever o tempo necessário para se obter a quantidade de células-tronco desejada. Eslaminejad et al. (2010) compararam a velocidade de proliferação entre células de incisivos decíduos em relação às células-tronco de polpa de molares permanentes, após isolamento por digestão enzimática, e observaram que as SHEDs de incisivos tiveram uma velocidade de proliferação menor do que as células obtidas dos molares permanentes. Estes dados, conflitantes ao trabalho de Miura et al. (2003), que obteve resultados contrários da proliferação das SHEDs em relação às células de polpa adulta, corroboram a possibilidade de que o volume inicial da amostra, assim como o local da coleta e o grau de reabsorção radicular (Bernardi et al., 2011) podem influenciar na composição da população selecionada. Neste contexto, o saco pericoronário poderia fornecer uma quantidade de tecido maior que o remanescente pulpar, o que pode significar um início mais rápido no estabelecimento de uma cultura de MSCs.

Pierdomenico et al. (2005) isolaram células-tronco usando a técnica do *explant*, assim como foi feito nesta pesquisa. Os autores descreveram que os fragmentos de polpa de molares permanentes deixados em cultura

precisaram de 15 a 20 dias para estabelecer uma cultura inicial. Por outro lado, trabalhos que utilizam a técnica de digestão enzimática, em geral colagenase (3mg/ml) e/ou dispase (4mg/ml) por 30min por 01 hora a 37°C (Miura et al., 2003; Sonoyama, et al. 2008), têm como vantagem o desprendimento das células-tronco do interior do tecido com maior rapidez. Entretanto, é preciso estar ciente de que a utilização destas enzimas para liberar as células-tronco da matriz extracelular pode alterar a seleção da população celular obtida. Bakopoulou, A., et al. (2011a) demonstraram que a técnica de digestão enzimática consegue liberar uma população CD34 em maior quantidade do que quando comparada à técnica do *explant*. Esta informação é especialmente importante quando se deseja controlar a quantidade de células precursoras hematopoiéticas nas populações de MSCs.

Quanto à complexidade celular (presença de organelas citoplasmáticas) e o volume celular, foi possível observar uma diferença na análise comparativa entre os histogramas gerados a partir da comparação entre as amostras de SUEds e SHEDs correspondentes, entretanto, esta diferença também está presente entre os sítios coletados, o que indica que o grupo dentário ao qual a célula pertence pode influenciar no comportamento celular. Não encontramos na literatura outro trabalho que tenha captado células-tronco de grupamentos dentários distintos obtidos de maxila e mandíbula, portanto, não foi possível comparar os nossos achados com os de outros autores.

Neste trabalho, optou-se por utilizar um painel preconizado por Dominici et al., 2006 que relaciona os critérios mínimos para a determinação de MSCs. Na marcação fenotípica realizada por citometria de fluxo, a média obtida entre a soma das amostras de cada grupo teve resultados acima do esperado para marcações com CD34 negativo para MSCs nas amostras

SUEDs, entretanto, apenas uma amostra foi responsável pela marcação maior (incisivo inferior esquerdo), o que enfatiza que pode haver variação conforme o local de coleta e/ou o indivíduo doador. Quanto ao CD90 positivo, este foi o que demonstrou a maior variação quanto aos valores percentuais esperados. Em nosso estudo o traçado da gate, que marca a porcentagem de células marcadas pelo anticorpo estudado, foi realizada com um critério de 1% sobre a marcação controle IgG, que marca a fluorescência natural da célula (Fig. 3A).

Quanto à diferenciação celular, neste trabalho as células SUEDs e SHEDs mantiveram o padrão de cinco semanas de indução para a diferenciação adipogênica encontrado para as SHEDs por Miura et al. (2003). Por outro lado, na diferenciação osteogênica, os precipitados minerais formaram-se muito precocemente, já na primeira semana de indução, igualmente para SHEDs e SUEDs. A diferenciação condrogênica seguiu sem modificações ao indicado pelo fabricante do meio de diferenciação, com formação de esferas que mantiveram-se aderidas à placa para SHEDs e SUEDs, porém, as trocas de meios foram realizadas sempre com muito cuidado para evitar a aspiração do grupamento celular/colágeno (Fig.4A-F). As culturas controles da diferenciação adipogênica, condrogênica e osteogênica do nosso estudo foram mantidas apenas com meio de cultivo e não apresentaram diferenciação espontânea em adipócitos, condrócitos ou osteócitos durante os 21 e 35 dias de cultivo. Diferenças entre o tempo e o potencial de diferenciação celular entre fontes celulares diferentes é esperado. Rebelatto et al. (2008) compararam células-tronco derivadas de medula óssea, de sangue de cordão umbilical e de tecido adiposo e demonstraram que cada uma destas fontes apresentaram características próprias, porém, todos os grupos mostraram potencial

semelhante entre si para a diferenciação em osteoblastos e condroblastos; entretanto, houve diferença quanto à capacidade de diferenciação em adipócitos, sendo as células derivadas de medula óssea e de tecido adiposo capazes de gerar adipócitos mais maduros e melhor desenvolvidos em menor tempo, em comparação às células oriundas do cordão umbilical, que precisaram de um tempo superior a 40 dias.

Morsczek et al. (2005), caracterizou células-tronco precursoras do folículo dental (PCs) utilizando para isto a porção coronária do saco pericoronário de 3^{os} molares. Em nossa pesquisa foram coletadas pequenas porções de tecido presente na área central subjacente ao dente decíduo com rizólise avançada que correspondem ao saco pericoronário do dente permanente sucessor. Diferentemente dos molares permanentes que não possuem dentes decíduos antecessores, os dentes permanentes subjacentes aos decíduos são originados a partir da projeção da lâmina lateral da lâmina dentária que deu origem aos dentes decíduos. Enquanto os dentes decíduos ainda estão na fase de capuz, presos à lâmina dentária se formam os “botões dentais” que darão origem aos dentes permanentes. A coleta de amostras de regiões diferentes nos permitiu avaliar a possibilidade da existência de variáveis como o potencial de expansão e de diferenciação entre os pacientes e sítios coletados. Os resultados obtidos nos mostraram que esta variação existe e o registro sistemático das condições de coleta e locais específicos da obtenção das amostras poderão, no futuro, direcionar na escolha da melhor categoria celular a ser utilizada para determinada patologia e/ou uso clínico.

Este estudo abre uma nova frente de pesquisa e demonstra que fragmentos teciduais potencialmente descartados como o saco pericoronário dos dentes permanentes subjacentes aos decíduos em esfoliação e os tecidos

pulpaes podem ser coletados e armazenados como fonte de células-tronco mesenquimais para uso futuro em pesquisas e terapias.

Em resumo, pode-se concluir que o saco pericoronário dos dentes permanentes subjacentes aos decíduos em esfoliação possui células indiferenciadas com características imunofenóticas e capacidade de diferenciação que permitem a sua classificação como células-tronco mesenquimais. As células-tronco obtidas a partir das amostras de saco pericoronário demonstraram ter uma velocidade de proliferação inicial maior do que as SHEDs, porém, o volume inicial do material coletado pode ter influenciado na obtenção de uma cultura primária precoce em relação às SHEDs. A partir da P₃ foi possível observar uma elevada taxa de proliferação das SHEDs. O aspecto morfológico e as características imunofenóticas e a capacidade de diferenciação celular das SHEDs e SUEDs demonstram que ambas possuem um comportamento compatível com MSCs, entretanto, mais estudos devem ser realizados a fim de se determinar se estas células podem ser usadas em conjunto ou separadamente para fins de Terapia Celular e Engenharia de Tecidos. O grupo dentário a que o tecido pertence, assim como características pessoais do doador podem influenciar no número inicial de células-tronco obtidas, bem como em sua capacidade de multiplicação e de diferenciação.

AGRADECIMENTOS

À Direção e aos Pesquisadores do Instituto Carlos Chagas/Fundação
Oswaldo Cruz - Paraná, Laboratório de Biologia Celular.

CAPÍTULO IV

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA TESE

AQUINO, R.; ROSA, A.; LANZA, V. TIRINO, V.; LAINO, L.; GRAZIANO, A.; DESIDERIO, V.; LAINO, G.; PAPACCIO, G. **Human mandible bone defect repair by the grafting of dental pulp stem/progenitor cells and collagen sponge biocomplexes.** Eur Cell Mater. 2009. 18:75-83.

ALBREKTSSON, T. **Direct bone anchorage of dental implants.** J Prosthet Dent. 1983. 50(2):255-261.

ALBREKTSSON, T.; ZARB, G.; WORTHINGTON, P.; ERIKSSON, R.A. **The long-term efficacy of currently used dental implants: a review and proposed criteria of success.** Int J Oral Maxillofac Implants. 1986. 1:11-25.

ASSEL, LA. **The promise os tissue engineering.** Journal of Oral and Maxillofacial Surgery. 2003. 61:155-156.

BERNARDI, L.; LUISI, S.B.; FERNANDES, R.; DALBERTO, T.P.; VALENTIM, L.; CHIES, J.A.B.; FOSSATI, A.C.M. **The isolation of stem cells from human deciduous teeth pulp is related to the physiological process of resorption.** J Endod. 2011. 37(7)973-979.

BAKOPOULOU, A.; LEYHAUSEN, G.; VOLK, J.; TSIFTSOGLU, A.; GAREFIS, P.; KOIDIS, P.; GEURTSSEN, W. **Comparative analysis of in vitro osteo/odontogenic differentiation potential of human dental pulp**

stem cells (DPSCs) and stem cells from the apical papilla (SCAP). Arch Oral Biol. 2011. 56(7):709-21.

BAKOPOULOU, A.; LEYHAUSEN, G.; VOLK, J.; TSIFTSOGLU, A.; GAREFIS, P.; KOIDIS, P.; GEURTSSEN, W. **Assessment of the impact of two different isolation methods on the osteo/odontogenic differentiation potential of human dental stem cells derived from deciduous teeth.** Calcif Tissue Int. 2011. 88(2):130-41.

BIANCO, P.; ROBEY, P.G.; SIMMONS. **Mesenchymal Stem Cells: Revisiting History, Concepts, and Assays.** Cell Stem Cells. 2008. 10;2(4):313-319

CAHILL, D.R., MARKS, S.C. **Tooth eruption:** evidence for the central role of the dental follicle. J Oral Pathol. 1980. 9(4):189-200.

CAPLAN, A.I. **Mesenchymal stem cells.** J Orthop Res. 1991. 9, 641-50.

CASAGRANDE, L.; DEMARCO, F.F.; ZHANG, Z.; ARAUJO, F.B.; SHI, S. NÖR, J.E. **Dentin-derived BMP-2 and odontoblast differentiation.** 2010. J Dent Res 89:603-8.

CASAGRANDE, L.; CORDEIRO, M.M.; NÖR, S.; NÖR, J. **Dental pulp stem cells in regenerative dentistry.** Odontology. 2011. 99(1):1-7.

CHANDA, D.; KUMAR, S.; PONNAZHAGAN, S. **Therapeutic potential of adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells in diseases of the skeleton.** J Cell Biochem. 2010. 111(2):249-257.

CONRAD, C.; HUSS, R. **Adult stem cell lines in regenerative medicine and reconstructive surgery.** J Surg Res. 2005. 124(2):201-208.

COURA, G.S.; GARCEZ, R.C.; de AGUIAR, C.B.; ALVAREZ-SILVA, M.; MAGINI, R.S.; TRENTIN, A.G. **Human periodontal ligament: a niche of neural crest stem cells.** J Periodontal Res. 2008. 43(5):531-536.

CORDEIRO, M. M.; DONG, Z.; KANEKO, T.; ZHANG, Z.; MIYAZAWA, M.; SHI, S.; SMITH, A. J.; NOR, J. E. **Dental Pulp Tissue Engeneering with Stem Cells from Exfoliated Deciduous Teeth.** J. Endod. 2008. 34(8):962-969.

DAMANTE, J.H. **Estudo dos folículos pericoronários de dentes não irrompidos e parcialmente irrompidos. Inter-relação clínica, radiológica e microscópica.** 1987. 258f. Dissertação (Livre Docência). Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 1987.

DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I; SLAPER-CORTENBACH, I; MARINI, F.C; KRAUSE, D. S.; DEANS, R. J.; KEATING, A.; PROCKOP, D. J. HORWITZ, E. M. **Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The Internacional Society for Cellular Therapy position statement Cytotherapy.** 2006. Vol. 8, No. 4, 315-317.

EMAMI, E.; HEYDECKE, G. ROMPRE, P.H.; GRANDMONT, P.; FEINE, J.S. **Impact of implant support for mandibular dentures on satisfaction, oral and general health-related quality of life: a meta-analysis of randomized-controlled trials.** Clin Oral Implants Res. 2009. 20(6):533-544.

ESLAMINEJAD, B.; VAHABI, S.; SHARIATI, M.; NAZARIAN, H. **In vitro growth and characterization of stem cells from human dental pulp of deciduous versus permanent teeth.** J Dent. 2010. 7(4):185-95.

FRIEDENSTEIN A.J., PETRAKOVA, K.V., KUROLESOVA, A.I., FROLOVA, G.P. **Heterotropic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues.** Transplantation. 1968. 6:230-247.

GANDIA, C.; ARMIÑAN, A.; GARCIA-VERDUGO, J.M.; LLEDÓ, E.; RUIZ, A.; MIÑANA, M.D.; SANCHEZ-TORRIJOS, J.; PAYÁ, R.; MIRABET, V.; CARNONELL-UBEROS, F.; LLOP, M. MONTEIRO, J.A.; SEPÚLVEDA, P. **Human dental pulp stem cells improve left ventricular function, induce angiogenesis, and reduce infarct size in rats with acute myocardial infarction.** Stem Cells. 2008. 26:638-645.

GUIMARÃES, E.T.; CRUZ, G.S.; de JESUS, A.A.; LACERDA DE CARVALHO, A.F.; ROGATTO, S.R.; PEREIRA, L.V.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R. SOARES, M.B. **Mesenchymal and embryonic characteristics of stem cells obtained from mouse dental pulp.** Arch Oral Biol. 2011. 56(11):1247-55.

GRONTHOS, S.; MANKANI, M.; BRAHIM, J.; ROBEY, P. G.; SHI, S. **Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo.** Proc Natl Acad Sci USA. 2000. 97(25):13625-13630.

HONDA, M.J. IMAIZUMI, M. SUZUKI, S.; OHSHIMA, S.; TSUCHIYA, S.; SAROMURA, K. **Stem cells isolated from human dental follicles have osteogenic potential.** 2011. 111(6):700-708.

HUANG, A.H.; CHEN, Y.K.; LIN, L.M.; SHIEH, T.Y.; CHAN, A.W. **Isolation and characterization of dental pulp stem cells from a supernumerary tooth.** J Oral Pathol Med. 2008. 37:571-574.

HUANG, G. **Pulp and dentin tissue engineering and regeneration: current progress.** Regen Med. 2009. 4(5):697-707.

HUANG, J.; GRONTHOS, S.; SHI, S. **Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine.** 2009. 88(9):792-806.

ITO, K.; YOICHI, Y.; NAIKI, T.; UEDA, M. **Simultaneous implant placement and bone regeneration around dental implants using tissue-engineered bone with fibrin glue, mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma.** Clin Oral Impl Res. 2006. 17:579-86.

IZUMI, K.; TOBITA, T.; FEINBERG, S.E. **Isolation of Human Oral Keratinocyte Progenitor/Stem Cells.** J Dent Res. 2007. 86(4):341-346.

JO, Y.Y.; LEE, H.J.; KOOK, S.Y.; CHOUNG, H.W.; PARK, J.Y. CHUNG, J.H.; CHOUNG, Y.H.; KIM, E.S. YANG, H.C.; CHOUNG, P.H. **Isolation and characterization of postnatal stem cells from human dental tissues.** Tissue Eng 2007. 13:767-773.

KADAR, K.; KIRALY, M.; PORCSALMY, B.; MOLNAR, B.; RACZ, G.Z.; BLAZSEK, J. KALLO, K.; SZABO, E.L.; GERA, I.; GERBER, G. VARGA, G. **Differenentiation potential of stem cells from human dental origen - promise for tissue engineering.** J Physiol Pharmacol. 2009. Suppl 7:167-175.

KARAÖZ, E.; DOGAN, B.N.; AKSOY, A.; GACAR, G.; AKYÜZ, S.; AYHAN, S.; GENÇ, Z.; YÜRÜKER, S.; DURUKSU, G.; DEMIRCAN, P.Ç. SARIBOYACI, A.E. **Isolation and in vitro characterisation of dental pulp stem cells from natal teeth.** Histochem Cell Biol. 2010. 133:95-112.

KERKIS, I. AMBROSIO, C.E.; KERKIS, A.; MARTINS, D.S.; ZUCCONI, E.; FONSECA, S.A.S.; CABRAL, R.M.; MARANDUBA, C.M.C.; GAIAD, T.P.; MORINI, A.C.; VIEIRA, N.M.; BROLIO, M.P.; SANT'ANNA, O.A.; MIGLINO, M.; ZATZ, M. **Early transplantation of human immature dental pulp stem cells from baby teeth to golden retriever muscular dystrophy (GRMD) dogs: Local or systemic?** J Translational Medicine. 2008. 3(6):35-48.

LEÃO, M.P.; GRANATO, R.; ODERICH, E.; BOFF, L.L.; BUTTENDORF, A.R.; BIANCHINI, M.A. **Evaluation of patients**

satisfaction treated by osseointegrated implants. *ImplantNews.* 2009. 6:417-421.

MANGKORNKARN, C.; STEINER, J.; BOHMAN, R.; LINDEMANN, R.A. **Flow cytometric analysis of human dental pulp tissue.** *J Endod,* Chicago. 1991. 17(2):49-53.

MAO, J.J.; GIANNOBILE, W.V.; HELMS, J.A.; HOLLISTER, S.J.; KREBSBACH, P.H; LONGAKER, M.T.; SHI, S. **Craniofacial tissue engineering by stem cells.** *J Dent Res.* 2006. 85(11):966-979.

MARX, R. E.; GARG, A. K. **Bone structure, metabolism, and physiology: its impact on dental implantology,** *Implant Dent.*1998. 7(4):267-276.

MARYNKA-KALMANI, K.; TREVES, S.; YAFEE, M.; RACHIMA, H.; GAFNI, Y.; COHEN, M.A.; PITARU, S. **The lamina propria of adult human oral mucosa harbors a novel stem cell population.** *Stem Cells.* 2010. 28:984-995.

MEIRELLES, L.; CAPLAN, A.I.; NARDI, N.B.; **In Search of the In Vivo Identity of Mesenchymal Stem Cells.** *Stem Cells.* 2008. 26:2287-2299.

MENDONÇA COSTA, A.M.; BUENO, D.; MARTINS, M.; KERKIS, I; KERKIS, A.; FANGANIELLO, R.; CERRUTI, H.; NIVALDO, A. PASSOS-BUENO, M.R. **Reconstruction of large cranial defects in nonimmunosuppressed experimental design with human dental pulp stem cells** *J Cranio F Surgery.* 2008.19(1):204-210.

MIURA, M. GRONTHOS, S. ZHAO, M.; LU, B.; FISHER, L W.; ROBEY, P. G.; SHI, S. **SHED**: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003. 100(10):5807-5812.

MORSCZECK, C.; GÖTZ, W.; SCHIERHOLZ, J.; ZEILHOFER, F. KÜHN, U.; MÖHL, C.; SIPPEL, C.; HOFFMANN, K.H. **Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth**. *Matrix Biol*. 2005. 24(2):155-165.

MORSCZECK, C. VÖLLNER, F.; SAUGSPIER, M. BRANDL, C.; REICHERT, T.E.; DRIEMEL, O.; SCHMALZ, G. **Comparison of human dental follicle cells (DFCs) and stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) after neural differentiation in vitro**. *Clin Oral Invest*. 2010. 14(4):433-440.

MUSCHLER, G.F.; NAKAMOTO, C.; GRIFFITH, L. G. **Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering**. *J Bone Joint Surg*. 2004. 86-A:1541-1558.

NARDI, N.B.; MEIRELLES, S.L. **Mesenchymal stem cells**: isolation, in vitro expansion and characterization. *Handb Exp Pharmacol*. Berlin. 2006. (174):249-282.

PAYÃO, S.L.M.; SEGATO, R.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R. **Controle genético das células-tronco humanas cultivadas**. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 2009. 31:15-18.

PIERDOMENICO, L.; BONSI, L.; CALVITTI, M.; RONDELLI, D.; ARPINATI, M.; CHIRUMBOLO, G.; BECCHETTI, E. MARCHIONNI, C.; ALVIANO, F.; FOSSATI, V.; STAFFOLANI, N.; FRANCHINA, M.; GROSSI, A.; BAGNARA, G.P. **Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp.** Transplantation. 2005. 80(6):836-842.

REBELATTO, C.K.; AGUIAR, A.M.; MORETÃO, M.P.; SENEGAGLIA, A.C.; HANSEN, P.; BARCHIKI, F.; OLIVEIRA, J.; MARTINS, J.; KULIGOVSKI, C.; MANSUR, F.; CHRISTOFIS, A.; AMARAL, V.F.; BROFMAN, P.S.; GOLDENBERG, S.; NAKAO, L.S.; CORREA, A. **Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue.** Exp Biol Med. 2008. 233:901-13.

ROBEY, P. G.; BIANCO, P. **The use of adult stem cells in rebuilding the human face.** J Am Dent Assoc. 2006. 137(7):961-972.

SAKAI, V.T, CORDEIRO, M.M.; DONG, Z.; ZHANG, Z. ZEITLIN, B.D.; NÖR, J.E. **Tooth Slice/Scaffold Model of Dental Pulp Tissue Engineering.** Adv Dent Res. 2011. 23(3):325-32.

SAKAI, V.T.; ZHANG, Z.; DONG, Z.; NEIVA K.G.; MACHADO, M.A. SHI, S.; SANTOS, C.F.; NÖR, J.E. **SHED:** differentiate into functional odontoblasts and endothelium. J Dent Res. 2010. 89:791-6.

SAKAI, K.; YAMAMOTO, A.; MATSUBARA, K.; NAKAMURA, S.; NARUSE, M.; YAMAGATA, M. SAKAMOTO, K; TAUCHI, R.; WAKAO, N.; IMAGAMA, S.; HIBI, H.; KADOMATSU, K.; ISHIGURO, N. UEDA, M. **Human dental pulp-derived stem cells promote locomotor recovery after complete transection of the rat spinal cord by multiple neuro-regenerative mechanisms.** J Clin Invest. 2012. 3; 122(1):80-90

SCHROPP, L.; KOSTOPOULOS, L.; WENZEL, A. **Bone healing following immediate versus delayed placement of titanium implants into extraction sockets: a prospective clinical study.** Int J Oral Maxillofac Implants. 2003. 18(2): 189-199.

SEO, B. M.; MIURA, M.; GRONTHOS, S.; BARTOLD, P. M.; BATOULI, S.; BRAHIM, J.; YOUNG, M.; ROBEY, P. G.; WANG, C. Y.; SHI, S. **Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament.** Lancet 2004. 364(9429):149-155.

SONG, L.; WEBB, N. E.; SONG, Y.; TUAN, R. S. **Identification and functional analysis of candidate genes regulating mesenchymal stem cell self-renewal and multipotency.** Stem Cells. 2006. 24(7):1707-1718.

SONOYAMA, W.; LIU, Y. FANG, D.; YAMAZA, T.; SEO, B. M.; ZHANG, C.; LIU, H.; GRONTHOS, S.; WANG, C. Y.; SHI, S.; WANG, S. **Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine.** 2006. PLoS ONE 1(e79):1-8

SONOYAMA, W.; LIU, Y.; YAMAZA, T.; TUAN, R. S.; WANG, S.; SHI, S.; HUANG, G. T. **Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study.** J Endod. 2008. 34(2):166-171.

STELLINGSMA, K.; BOUMA, J.; STEGENGA, B.; MEIJER, H.J.A.; RAGHOEBAR, G.M. **Satisfaction and psychosocial aspects of patients with an extremely resobed mandible treated with implan-retained overdentures.** A prospective, comparative study. Clin Oral Impl Res. 2003. I(4):166-172.

TAKEDA, T.; TEZUKA, Y.; HORIUCHI, M.; HOSONO, K.; LIDA, K.; HATAKEYAMA, D. MIYAKI, S.; KUNISADA, T.; SHIBATA, T.; TEZUKA, K. **Characterization of dental pulp stem cells of human tooth germs.** J Dent Res. 2008. 87(7):676-681.

TANG, L.; LI, N.; XIE, H; JIN, Y. **Characterization of mesenchymal stem cells from human normal and hyperplastic gingiva.** J Cell Physiol. 2011. 226 (3):832-842.

TARNOW, D.; ELIAN, N.; FLETCHER, P.; FROUM, S.; MAGNER, A.; CHO, S.; SALAMA, M.; SALAMA, H.; GARBER, D.A. **Vertical distance from teh crest of bone to the height of the interproximal papilla between adjacent implants.** J Periodontol. 2003. 74(12):1785-1788.

TRIPLETT, G.; SCHOW, S. R.; LASKIN, D. M. **Oral and maxillofacial surgery advances in implant dentistry.** The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants 2000. 15(1)47-55.

URIST, M. R.; DELANGE, R. J.; FINERMAN, G. A. M. **Bone Cell Differentiation and Growth Factors.** Science. 1983. 220: 680-685.

VOLPONI, A.A.; PANG, Y.; SHARPE, P.T. **Stem cell-bases biological tooth repair and regeneration.** Trends in Cell Biology. 2010. 20(12):715-722.

WEI, X.; LING, J.; WU, L.; LIU, L.; XIAO, Y. **Expression of mineralization markers in dental pulp cells.** J Endod. 2007. 33:703-708.

WOZNEY, J. M. **Bone morphogenetic proteins.** Prog Growth Factor Res. 1989. 1(4):268-280.

WOZNEY, J.M. **The bone morphogenetic protein family and osteogenesis.** Mol Reprod. 1992. 32(2):160-7.

WOZNEY, J. M.; ROSEN, V.; CELESTE, A.J. MITSOCK, L.M.; WHITTERS, M.J.; KRIZ, R.W.; WANG, E.A. **Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities.** Science. 1988. 16;242(4885):1528-34.

WOZNEY, J.M.; ROSEN, V.; BYRNE, M.; CELESTE, A.J.; MOUTSATSOS, I.; WANG, E.A. **Growth factors influencing bone development.** J Cell Sci Suppl. 1990. 13:149-56.

XU, H.H.K.; ZHAO, L.; WEIR, M.D. **Stem cell-calcium phosphate constructs for bone engineering.** J Dent Res. 2010. 89(12):1482-1488.

YAMAZA, T.; KENTARO, A.; CHEN, C.; LIU, Y.; SHI, Y.; GRONTHOS, S.; WANG, S.; SHI, S. **Immunomodulatory properties of stem cells from human exfoliated deciduous teeth.** Stem Cell Res Ther. 2010. 1:5.

YAMADA, Y.; NAKAMURA, S.; UEDA, M.; ITO, K. **Osteotome technique with injectable tissue-engineered bone and simultaneous implant placement by cell therapy.** Clin Oral Implants Res. 2011. Article first published online: 12DEC 2011. DOI: 10.1111/j.1600-0501.2011.02353.x

YAN, M.; YU, Y.; ZHANG, G.; TANG, C.; YU, J. **A journey from dental pulp stem cells to a Bio-tooth.** Stem Cell Rev and Rep. 2011. 7(1):161:171.

YAO, S.; PAN, F.; PRPIC, V. WISE, G.E. **Differentiation of stem cells in the dental follicle.** J Dent Res. 2008. 87(8):767-771.

YEN, A.H.H.; SHARPE, P.T. **Stem cells and tooth tissue engineering.** Cell Tissue Res. 2008. 331(1):359-372.

YOUNG, C.S.; ABUKAWA, H.; ASRICAN, R.; RAVENS, M. TROULIS, M.J.; KABAN, L.B.; VACANTI, J.P.; YELICK, P.C. **Tissue-engineered hybrid tooth and bone.** Tissue Eng. 2005. 11(9/10):1599-610.

ZHENG, Y.; LIU, C.M.; ZHANG, H.Y.; LI, W.H.; SHI, S. LE, A.D.; WANG, S.L. **Stem Cells from Deciduous Tooth Repair Mandibular Defect in Swine.** J Dent Res. 2009. 88(3):249-254.

ZOLLNER, A.; GANELES, J.; KOROSTOFF, J.; GUERRA, F.; KRAFFT, T. BRAGGER, U. **Immediate and early non-occlusal loading of Straumann implants with a chemically modified surface (SLActive) in the posterior mandible and maxilla: interim results from a prospective multicenter randomized-controlled study.** Clin Oral Implants Res. 2008. 19(5):442-450