



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA E GENÉTICA

LABORATÓRIO DE CÉLULAS TRONCO E REGENERAÇÃO TECIDUAL

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS DA POLPA
DENTÁRIA DE HUMANOS**

BEATRIZ DAL PONT DUARTE

FLORIANÓPOLIS

2010



Universidade Federal de Santa Catarina

Centro de Ciências Biológicas

Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética

Laboratório de Células Tronco e Terapia Celular

Avaliação do potencial de diferenciação das células da polpa dentária de humanos

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Ciências Biológicas
referente a disciplina TCC II – BIO 7011

Orientador: Prof. Dra. Andréa Gonçalves Trentin

Florianópolis

2010

BEATRIZ DAL PONT DUARTE

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS DA POLPA
DENTÁRIA DE HUMANOS**

Trabalho apresentado como requisito parcial para obtenção do grau em Bacharel em
Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Santa Catarina

Banca Examinadora:

Prof. Dr^a Michelle Tillmann Biz

Departamento de Ciências Morfológicas/CCB/UFSC

Prof. Dr. Ricardo Castilho Garcez

Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética/CCB/UFSC

Mestre Talita Jeremias da Silva

Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética/CCB/UFSC

Florianópolis

2010

*“Se o conhecimento pode criar problemas, não é
através da ignorância que podemos solucioná-los”*

Isaac Asimov

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dr.^a Andréa Gonçalves Trentin, por todo tempo dedicação e incentivo, por acreditar em mim, e ser um exemplo de profissional.

À Dr.^a Michelle Tillmann Biz pelo apoio na realização deste trabalho e pela aula maravilhosa sobre odontogênese. Aos Doutores Giordano, Márcio e Ricardo por toda ajuda e ensinamento.

A minha amada “tuti” Tânia. Obrigada por tudo!

As minhas amigas, companheiras de faculdade Laise, Renata, Elisa, Bianca (minha eterna duplinha!), Raquel e Carol. Pelos cafezinhos, desabafos, pelo apoio e carinho.

As meninas do laboratório. A Bianca essa pessoinha incrível, exemplo de caráter, dedicação e amizade. A Meline, pelo otimismo, por entender as minhas loucuras, e por ter paciência em me ensinar a fazer cultura quando eu não sabia nem o que era uma pipeta! A Bruna, essa pessoa querida e dedicada. A Vivi minha parceira de trabalho. A Bibiane essa menina incrível, companheira de stress durante a prova de mestrado, e que me ajudou durante as últimas coletas. Apesar do pouco tempo de convívio já te considero uma amiga muito especial. A Fernanda, Mari, Sarah Diana, Adelli, Camila, Maiara, Rafa e Ana por todas os momentos de apoio, conversas e risos.

A Talita por nunca ter gritado comigo quando eu fazia a décima pergunta do dia! Obrigado pelos ensinamentos e por sempre me fazer rir (viu um parágrafo só seu!).

A Denise, a nossa querida vovó, por sempre ter paciência quando eu pedia a sua ajuda e por ter passado uma tarde inteira me ajudando a corrigir este trabalho! A Silvia sempre disposta a ajudar. Obrigada pelas aulas de BioMol e pela ajuda neste trabalho.

Ao Diego por sempre TENTAR nos fazer rir com suas piadinhas. Ao Raul, nosso pequeno gênio, obrigada pela paciência em me ensinar a fazer PCR. Ao Aloísio este exemplo de pessoa, obrigada por todos os conselhos e conversas. Ao meu cunhado New, pelas conversas e pelo meu primeiro tour pelo laboratório. Ainda estou esperando meu pesto!

As pessoas que não estão mais no laboratório, mas que são muito especiais para mim. A Suelen, Bianka, e a minha irmãzinha Zucco por todos cafezinhos, conversas e risos. Ao Ricardinho por ter sido meu exemplo no início da faculdade. Ao Bruno por todos os conselhos.

Aos meus pais, Américo e Salete, por todo amor e apoio. Todas as minhas conquistas também são de vocês. As minhas irmãs, Rosiani e Giseli, minhas amigas. A vida fica mais fácil sabendo que vocês sempre estarão ao meu lado.

Ao meu grande amor Jakson, meu marido, companheiro e amigo, por ficar ao meu lado em todas as horas, sempre me dando apoio e carinho.

RESUMO

O desenvolvimento dentário ocorre através de interações sequenciais entre o epitélio oral e o mesênquima. O epitélio oral dá origem aos ameloblastos que secretam o esmalte dentário, enquanto a formação da polpa dentária é derivada das células mesenquimais. Acredita-se que o tecido mesenquimal seja originado a partir das células da crista neural (CN). A CN compreende uma população de células altamente pluripotente que possuem propriedades migratórias dando origem a uma grande variedade de tipos celulares. Células tronco com característica da CN vem sendo encontradas em vários tecidos adultos como na polpa dentária humana de dentes permanentes. Devido a capacidade das células derivadas da CN de se diferenciarem em tipos celulares derivados, as células tronco encontradas na polpa dentária podem potencialmente ser utilizadas para fins terapêuticos em diversas áreas médicas. Neste trabalho avaliamos o potencial das células da polpa dentária de originar células com características de células tronco embrionárias e com características de células neuronais através da utilização de diferentes meios de cultivo indutivos. As células da polpa dentária foram obtidas de terceiros molares de indivíduos adultos humanos. As culturas celulares foram mantidas em passagens baixas e altas em meio de cultura padrão (α - MEM acrescido de SFB a 10%) e meios indutivos para fenótipo neural e para células tronco embrionárias. As análises foram realizadas através de imunocitoquímica, marcação por BrdU (proliferação celular) e pela presença de unidades formadoras de colônias (UFCs). A análise de imunocitoquímica foi realizada para marcadores característicos de células indiferenciadas (Nanog, Sox 2 e Oct-4), marcadores celulares para progenitor neural (Nestina e β - tubulina III), para células gliais (P0), células características de CN (p75) e para actina de músculo liso (α -SMA). Nossos resultados demonstraram presença de células positivas para Nanog, Sox 2, Oct-4, Nestina e β - tubulina III em todas as condições analisadas em cerca de 95% das células, sem diferenças significativas entre elas sugerindo a presença de células tronco/progenitoras. O marcador α -SMA apresentou redução em passagens baixas e altas quando cultivados no meio de células tronco neurais (CTN). Apesar de não termos encontrado diferenças entre a expressão fenotípicas, observamos diferenças morfológicas celulares entre os diferentes meios. As células mantidas em meio para CTN apresentaram prolongamentos citoplasmáticos maiores quando comparado aos outros meios, e há uma tendência desses prolongamentos aumentarem com as passagens. Observamos ainda diminuição da proliferação celular e de UFCs em passagens altas neste meio. Em conjunto estes dados sugerem um possível processo de diferenciação celular neuronal quando as células são cultivadas por cerca de 10 passagens em CTN.

ABSTRACT

Teeth development occurs through sequential interactions between oral epithelium and mesenchyme. The oral epithelium gives rise to ameloblasts that secrete enamel, whereas dental pulp cells are derived from mesenchyme. It is believed that the mesenchymal tissue is originated from neural crest cells (NC). The NC comprises a population of pluripotent cells with highly migratory properties, which can give rise to a wide variety of cell types. Stem cells with NC characteristics have been found in various adult tissues such as the human dental pulp of permanent teeth. Due to the ability of NC-derived cells to differentiate into multiple cell lineages, stem cells found in the dental pulp can potentially be used for therapeutic purposes in various medical fields. In this study we analyzed the potentiality of dental pulp cells to give rise to cells with characteristics of embryonic and neural stem cells through the use of different commercial inductive culture media. Dental pulp cells were obtained from third molars of human's adult. Cell cultures were maintained at low and high passages either in control medium (α -MEM plus 10% FCS) or inductive medium for neural stem cells (NSC) or embryonic stem cells inductive medium (ESC). Analyses were performed by immunocytochemistry for BrdU labeling and the formation of Colony Forming Units (CFUs). Immunocytochemistry analyses were performed in order to detect the protein levels of Nanog, Sox 2 and Oct-4 (markers characteristic of undifferentiated cells), Nestin and β -tubulin III (neural progenitor cells), P0 (glial cells), p75 (characteristics of CN) and smooth muscle actin (α -SMA). Our results showed that the protein expression levels for Nanog, Sox 2, Oct-4, Nestin and β -tubulin III were higher in all samples and they were kept constant among the three different conditions tested. However, morphological differences were observed among groups: cells maintained in NSC medium showed longer cytoplasmatic process when compared to other treatments. Also we observed a tendency to increase these processes when the passages number increase. The analysis of the cells proliferation and CFU also showed a decrease in high passages in medium for NSC. These data together with the morphological differences found suggest the occurrence of a process of cellular differentiation that is for neural cells, and that was caused by the exposure of cell to the inductive medium used. Statistical differences between the control and ESC medium were not found.

LISTA DE ABREVIATURAS

α-MEM	<i>α-Modified Minimum Essential</i>
DMEMF12	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium an Hans F12</i>
ANOVA	Análise de Variância
BMP	Proteína Morfogenética de Osso
CN	Crista Neural
DAPI	4'-6-diamino-2-fenilindol
EGF	Fator de Crescimento Epidermal
FGF	Fator de Crescimento de Fibroblasto
FGF2	Fator de Crescimento de Fibroblasto tipo 2
MEC	Matriz Extracelular
PBS	Tampão Fosfato Salina
SBF	Soro Bovino Fetal
α-SMA	Anti-Actina de Músculo Liso
CTA	Células tronco adultas
UFC	Unidade Formadora de Colônia
CTN	Células Tronco Neurais
CTE	Células Tronco Embrionárias

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenvolvimento dentário	2
Figura 2. Formação do broto do dente permanente	4
Figura 3. Figura esquemática demonstrando os derivados da CN	5
Figura 4. Figura demonstrando a origem embrionárias das estruturas dentárias.....	6
Figura 5. Fotografia demonstrando as UFCs em diferentes meios.....	16
Figura 6. Porcentagem de UFCs em passagens baixas.....	17
Figura 7. Porcentagem de UFCs em passagens altas.....	17
Figura 8. Gráfico comparativo de UFCs em meio CTN.....	17
Figura 9. Porcentagem de células com marcação para BrdU em passagens baixas..	18
Figura 10. Porcentagem de células com marcação para BrdU em passagens altas...	19
Figura 11. Gráfico comparativo de marcação para BrdU de células em meio CTN.	19
Figura 12. Fotografia demonstrando a expressão dos marcadores celulares.....	20
Figura 13. Morfologias apresentada pelas células nos diferentes meios.....	21
Figura 14. Análise do fenótipo α -SMA em passagens baixas	22
Figura 15. Análise do fenótipo α -SMA em passagens altas	22

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 A CRISTA NEURAL (CN)	4
1.2 CÉLULAS TRONCO.....	6
2. JUSTIFICATIVA	8
3. OBJETIVOS	9
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	9
4. MATERIAIS E MÉTODOS	10
4.1 ISOLAMENTO E CULTURA DAS CÉLULAS DERIVADAS DA POLPA DENTÁRIA.....	10
4.2. MEIOS INDUTIVOS	11
4.2.1. <i>Meio de células tronco embrionário (CTE)</i>	11
4.2.2. <i>Meio para células tronco neurais humanas (CTN)</i>	11
4.3. ENSAIO CLONOGÊNICO	12
4.4. ANÁLISE FENOTÍPICA.....	12
4.4.1. <i>Imunocitoquímica</i>	12
4.5. ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	14
4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	14
5. RESULTADOS	15
5.1 APERFEIÇOAMENTO DO MÉTODO DE CULTURA E CULTIVO	15
5.2 ANÁLISE DA CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE COLÔNIAS.....	15
5.4. ANÁLISE FENOTÍPICA.....	19
6. DISCUSSÃO	24
7. CONCLUSÕES	28
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29

1. Introdução

A formação dentária se inicia nas primeiras semanas de vida intra-uterina a partir do primeiro arco branquial, resultante de interações entre as células do tecido ectodermal e mesenquimal da mucosa oral (Linde e Goldberg, 1993) (Fig. 1). O primeiro sinal da formação do órgão dentário é um espessamento do epitélio oral formando a lâmina dental, que posteriormente invagina para o mesênquima adjacente. As células mesenquimais, posteriormente, condensam-se em torno do broto de células epiteliais e durante as fases seguintes o epitélio sofre morfogênese resultando no estabelecimento da forma da coroa dentária. Numerosos fatores de transcrição, fatores de crescimento, assim como elementos da matriz extracelular (MEC), foram descritos como reguladores das fases do desenvolvimento dentário (Thesleff e Sharpe, 1997).

A odontogênese é tradicionalmente dividida em quatro estágios de acordo com as alterações morfológicas que ocorrem durante o desenvolvimento dentário (Fig. 1). O primeiro deles é denominado fase de botão, seguido das fases de capuz, campânula e raiz (Miletich e Sarpe, 2004). Na fase de botão a lâmina dentária cresce invadindo o mesênquima formando os brotos epiteliais. Durante esse processo, as células mesenquimais se acumulam ao redor do broto. Após a fase de botão, o compartimento epitelial sofre dobraduras específicas dando início à fase de capuz (Peters e Balling, 1999). Durante essa fase, o mesênquima fica cercado pelo epitélio dental formando a papila dentária que dará origem à polpa do dente. As células epiteliais, que desenvolverão o esmalte do dente, formam uma estrutura denominada órgão do esmalte. As células mais periféricas do mesênquima condensado se estendem ao redor do epitélio, formando o folículo dentário (Jernvall e Thesleff, 1999). Durante essa fase podemos observar a alça cervical que constitui o ponto de convergência entre o

epitélio externo e o interno. Essa estrutura dará origem à raiz do dente (Thomas, 1995).

A fase em que ocorre o surgimento da morfologia definitiva da coroa do dente é a etapa de campânula. Nessa fase as células que secretam os tecidos duros do dente diferenciam-se na região de interface entre o epitélio e o mesênquima. Na face epitelial ocorre a diferenciação das células denominadas ameloblastos, que secretam o esmalte dentário (Thesleff, 2003). Já na face mesenquimal, ocorre a diferenciação dos odontoblastos, que secretam a dentina e são necessários para a diferenciação de ameloblastos (Karcher-Djuricic *et al.*, 1985). A secreção da matriz do esmalte pelos ameloblastos somente inicia quando a matriz da dentina começa a mineralizar (Boukari e Ruch, 1981).

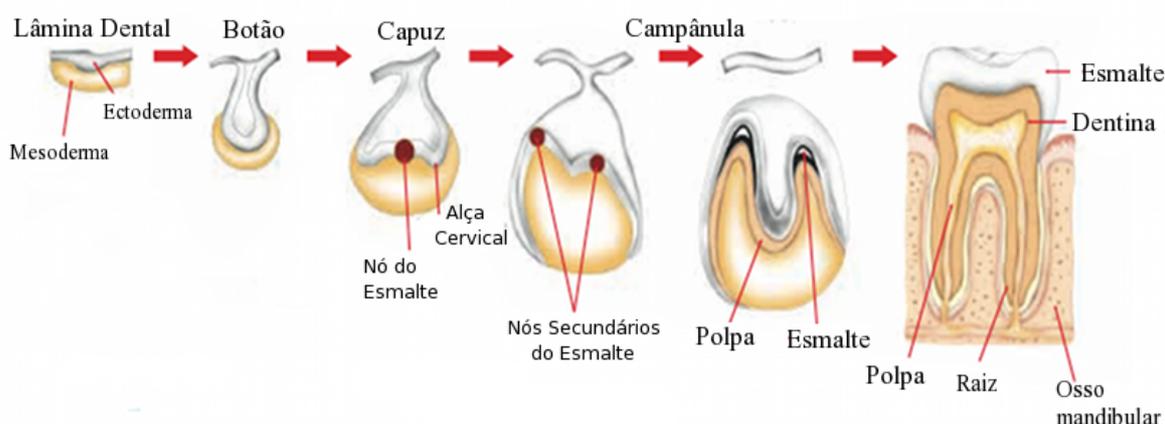


Figura 1. Ilustração do desenvolvimento dentário nas suas diferentes fases. Durante o desenvolvimento dentário podemos observar a formação da lâmina dentária, seguida das fases de botão, capuz e campânula. Adaptado de Thesleff (2003).

Durante o processo de odontogênese surgem na face epitelial, centros de sinalizações transitórios (Fig.1). Esses centros são formados por células não migratórias que expressam várias moléculas sinalizadoras, como o Fator de Crescimento de Fibroblasto (FGF) e a Proteína Morfogênica Óssea (BMP). O primeiro centro sinalizador surge com a proliferação do epitélio. Durante a fase de

capuz surge o centro denominado nó do esmalte. Este centro está envolvido na formação morfológica da coroa e no surgimento de outros centros sinalizadores, como os nós secundários do esmalte, que participam da regulação do padrão multicúspides dos molares (Vaathokari *et al.*, 1996).

Após a formação da dentina e do esmalte dentário, inicia-se a fase de raiz. Durante essa fase, o cemento e o ligamento periodontal são formados a partir do folículo dental, originado durante a fase de capuz. Essas estruturas começam a se formar quando a dentina radicular recém formada é exposta às células do folículo dentário. Após o final da fase de raiz, todas as estruturas envolvidas na sustentação do dente estão formadas (Ten Cate, 1995).

Os seres humanos têm dois conjuntos de dentes, um decíduo (popularmente conhecido como dentes de leite) e outro permanente. Os dentes permanentes formam-se de modo semelhante aos dentes decíduos. Os brotos dos dentes permanentes, que tem correspondente decíduo, originam-se de extensões profundas da lâmina dentária durante a fase de campânula dos dentes decíduos. Estes se formam em posição lingual aos brotos dos dentes decíduos (Fig. 2). Com o crescimento dos dentes permanentes, a raiz do dente decíduo correspondente é gradualmente reabsorvida por osteoclastos. Usualmente, os dentes permanentes começam a irromper durante o sexto ano de vida e continuam a aparecer até o início da idade adulta (Moore e Persaud, 2008).

No final da odontogênese podemos diferenciar as estruturas dentárias pela sua origem epidermal ou mesenquimal (Fig. 3). O epitélio oral dá origem aos ameloblastos que secretam o esmalte dentário, enquanto à formação da dentina mineralizada é derivada das células mesenquimais (odontoblastos). Acredita-se que o tecido mesenquimal seja originado a partir das células da crista neural (CN) (Gronthos *et al.*, 2000).

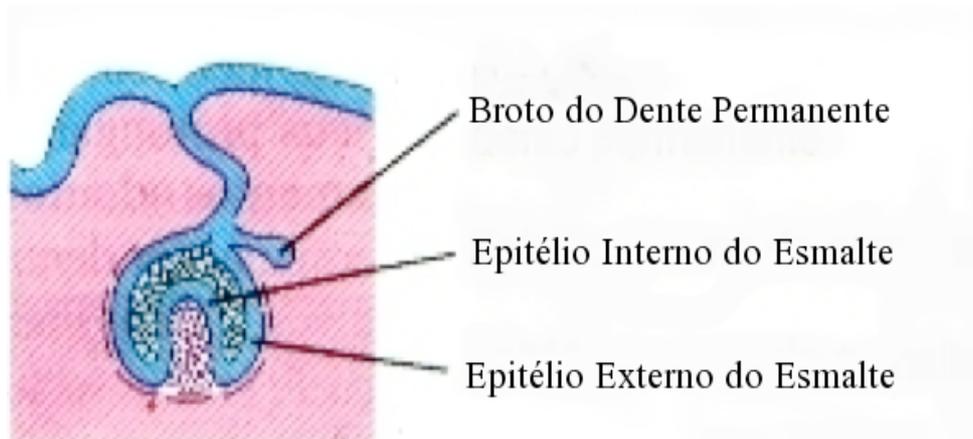


Figura 2. Esquema demonstrando a posição da formação do broto do dente permanente. Após a formação do broto o desenvolvimento do dente permanente segue o mesmo processo dos dentes decíduos. Adaptado de (Moore e Persaud, 2004).

1.1 A Crista Neural (CN)

A CN é uma estrutura embrionária transitória formada por uma população de células progenitoras multipotentes, que tem a capacidade de originar vários tipos celulares. A CN é originada durante o processo de neurulação. Neste processo as pregas da placa neural dobram-se uma em direção a outra formando o tubo neural. No momento do fechamento do tubo neural, as células das bordas da placa neural sofrem uma transição epitélio-mesenquimal (ectomesenquimal) tornando-se móveis, migrando para vários órgãos e tecidos em desenvolvimento. A CN origina (Fig. 4) musculatura lisa, ossos e cartilagens da região crânio-facial, células melanocíticas, neurônios de vários tipos, células gliais e células endócrinas (Le Douarin e Kalcheim, 1999).

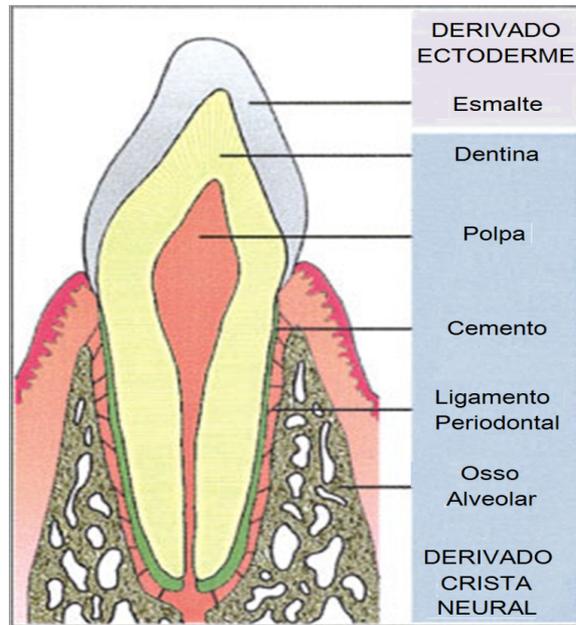


Figura 3 - O esmalte dentário tem origem ectodermal, enquanto as outras estruturas dentárias são derivadas do mesoderma. Adaptado de Miletich e Sharpe (2008).

Durante o processo de desenvolvimento craniofacial, as células da CN cefálica migram para a região dos arcos faríngeos e para os processos frontonasais. Estas regiões por sua vez darão origem a estruturas da face, como o palato e as estruturas dentárias (Gilbert, 2006). Acredita-se que as células da CN contribuam com a formação das células mesenquimais, que dão sustentação para o desenvolvimento dentário. Essas células além de dar origem à maioria dos tecidos dentais (polpa dentária, cemento, osso alveolar, ligamento periodontal), originam também o periodonto que compreende os tecidos envolvidos na fixação do dente ao osso (Miletich e Sharpe, 2004). Vários estudos vêm demonstrando a existência de células multipotentes com características da CN em tecidos dentários adultos (Techawattanawisal *et al.*, 2007; Widera *et al.*, 2007 e Coura *et al.*, 2008).

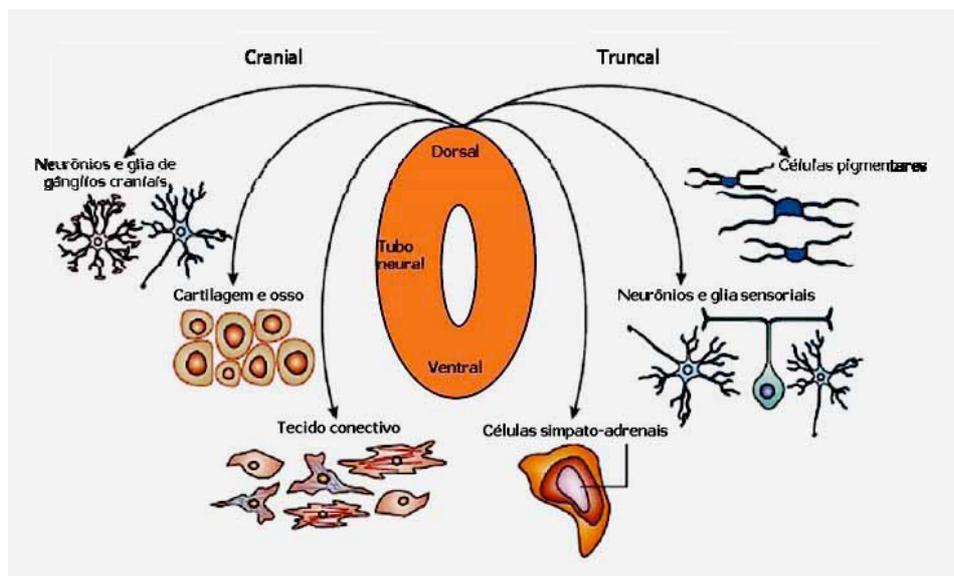


Figura 4. Derivados da CN. As células da CN migram para vários órgãos e tecidos e se diferenciam em muitos tipos celulares. Adaptado de Knecht e Bronner-Fraser (2002).

1.2 Células Tronco

Células tronco são células com capacidade de auto-renovação indefinida e com potencial para gerar células especializadas (Gilbert, 2006). As células tronco são encontradas em vários tecidos humanos adultos, em células dos anexos embrionários e em embriões. Devido ao seu grande potencial para fins terapêuticos as células tronco vêm sendo razão de intensas pesquisas (Mendez-Otero *et al.*, 2002).

As células tronco de adultos (CTA) são encontradas em tecidos diferenciados. Acredita-se que elas possam permanecer quiescentes até serem ativadas por algum tipo de lesão tecidual. As CTA vêm sendo consideradas importantes fontes de células tronco para fins terapêuticos, pois podem ser obtidas do próprio paciente eliminando a possibilidade de rejeição, além de não envolverem tantas questões éticas como as embrionárias (Morsczech *et al.*, 2003). As CTA tem sido isoladas de uma grande variedade de tecidos, incluindo o sangue periférico (Rocheffort *et al.*, 2004), a pele (Fernades *et al.*, 2004) e o cérebro (Quinones-Hinojosa *et al.*, 2006).

A identificação de nichos de células tronco nos tecidos dentários vem motivando estudos para caracterização dessas linhagens e avaliação da potencialidade dessas células para eventuais usos terapêuticos. Estudos com camundongos já demonstraram a capacidade dessas células de reconstituírem a dentina *in vivo*, após serem realizadas lesões no dente (Prescott *et al.*, 2008).

Pesquisas com células da polpa dentária de humanos demonstraram que esta apresenta uma população de células tronco mesenquimais com alta capacidade proliferativa e um grande potencial de auto-renovação. Além disso, essas células demonstraram habilidade de se diferenciar em odontoblastos (Gronthos *et al.*, 2000).

Estudos confirmaram que células com potencial para diferenciação neuronal foram identificadas em polpas dentárias humanas de dentes permanentes e decíduos (Gronthos *et al.*, 2002 e Miura *et al.*, 2003). Pesquisas posteriores identificaram em ligamentos periodontais de ratos e humanos células adultas multipotentes capazes de se diferenciar em progenitores neurais e mesodermis, indicando que o ligamento periodontal possui células tronco com características da CN (Techawattanawisal *et al.*, 2007 e Widera *et al.*, 2007).

2. Justificativa

A investigação de células tronco é um campo promissor para tratamentos na medicina regenerativa. Desde a descoberta e caracterização de células-tronco mesenquimais da medula óssea, populações de CTAs em outros tecidos, como pele e dente, vêm sendo descobertos (Karaoz *et al.*, 2009).

A aplicação de CTA em terapias celulares apresenta vantagens quando comparadas as células tronco embrionárias, devido ao fato de elas serem autólogas. Além disso, as CTA podem ser obtidas na maior parte da vida dos pacientes e em tecidos de fácil acesso, como nos dentários. No entanto, ainda há dificuldade para isolá-las e cultivá-las *in vitro*, além de se apresentarem em baixa densidade nos tecidos (Pelacho *et al.*, 2008).

Devido a capacidade das células derivadas da CN de se diferenciarem em tipos celulares derivados tanto do ectoderma como do mesoderma (Le Dourain *et al.*, 2004), as células tronco encontradas na polpa dentária e no ligamento periodontal podem potencialmente ser utilizadas para fins terapêuticos em outras áreas médicas, e não apenas para tratamento de periodontites.

A possibilidade de aplicação das células tronco provindas de tecidos dentários em terapias celulares são promissoras. Para utilizar este potencial, é necessário obter mais conhecimentos sobre as características das células-tronco pós-natal de origem dentária examinando o seu potencial de desenvolvimento *in vitro* e *in vivo*, definindo meios onde o crescimento é adequado e a indução para o fenótipo desejado é obtido.

3. Objetivos

O objetivo deste projeto foi avaliar a polpa dentária de humanos como possível nicho de células tronco, em cultura de células mantidas em meios comerciais e indicados para o crescimento de células tronco embrionários ou de células tronco neurais.

3.1. Objetivos Específicos:

- *Aperfeiçoamento do método de cultura;*
- *Analisar a capacidade clonogênica das células da polpa dentária;*
- *Avaliar a capacidade proliferativa das células da polpa dentária;*
- *Investigar a expressão de marcadores de células tronco embrionárias;*
- *Analisar a expressão de marcadores característicos de células progenitoras da crista neural;*
- *Avaliar o potencial de diferenciação neural e outros fenótipos derivados da crista neural.*

4. Materiais e Métodos

4.1 Isolamento e cultura das células derivadas da polpa dentária

As células utilizadas foram extraídas da polpa dentária de indivíduos saudáveis, não fumantes. Este projeto foi aprovado pelo comitê de ética com pesquisa em seres humanos (CEP) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), protocolo nº 625/10.

As células da polpa dentária foram extraídas e mantidas como descrito anteriormente para ligamento periodontal (Coura *et al.*, 2008). Brevemente, após as exodontias, os dentes foram lavados com solução fisiológica estéril e armazenados em tubos de polipropileno com meio de cultura α -*Modified Minimum Essential* (α -MEM, Invitrogen) acrescido de 20% soro fetal bovino (SFB, Cultilab) e antibióticos (100U/mL de penicilina e 100 μ g/mL de estreptomicina). A polpa dentária foi removida e imersa em solução de digestão enzimática contendo colagenase tipo I (Invitrogen) e dispase (BD) por 1 hora. A digestão enzimática foi paralisada em meio de cultura descrito acima. Após centrifugação (500g por 10 minutos), os *pellets* celulares foram ressuspensos em 4mL do meio de cultura descrito anteriormente. A suspensão celular obtida foi transferida para garrafas e esta correspondeu a passagem 0 (P0).

Após a total confluência, as células foram tripsinizadas com solução de tripsina a 0,25% (Sigma) e ácido etilenodiamino tetra-acético a 0,02% (EDTA, Vetec). O bloqueio se deu através de meio contendo 10% de SFB seguido de centrifugação (500g por 10 minutos). As células, então, foram ressuspensas e transferidas para garrafas de cultura de 25cm² (Corning) ou para placas de cultura de 24 poços (Corning). As garrafas eram mantidas até a confluência para manutenção

das passagens. Já as culturas mantidas nas placas de 24 poços eram cultivadas por 6 dias para realização dos experimentos na presença do meio básico ou dos meios indutivos. As placas e as garrafas de cultura foram revestidas com colágeno tipo I a 50 µg/mL. As placas de cultura também foram revestidos, em um momento inicial, com fibronectina a 20 µg/mL. O meio de cultura foi trocado a cada 4 dias. As células foram mantidas à 37°C, 5% CO₂ e 95% de umidade. As análises foram realizadas em passagens baixas (P1 a P3) e altas (P8 a P10).

4.2. Meios indutivos

4.2.1. Meio de células tronco embrionário (CTE)

Foi utilizado o meio comercial para crescimento e proliferação de células tronco embrionárias humanas StemPro hESC SFM Growth Supplemente (Invitrogen), segundo orientações do fabricante. O meio consiste do meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium and Hans F12* (DMEM/F-12) acrescido de GlutaMAX (454 mL para 500 mL), albumina sérica bovina a 1.8%, Fator de Crescimento de Fibroblasto 2 (FGF2 a 8 ng/mL) e 2-βmercaptoetanol (55 mM). As células foram ressuspensas no meio acima e plaqueadas na densidade de 1x10⁴ células/cm², e mantidas a 37°C, 5% CO₂ e 95% de umidade.

4.2.2. Meio para células tronco neurais humanas (CTN)

Foi utilizado o meio comercial para crescimento e a proliferação de células tronco neurais humanas StemPro NSC SFM (Invitrogen), segundo instruções do fabricante. Brevemente, para a preparação de 500 mL de meio total, foram acrescido 485 mL de knockout™ DMEM-F12, 10 µg de FGF, 10 µg de Fator de Crescimento Epidermal (EGF) e 5 mL de Glutamina 200mM. As células foram ressuspensas no

meio acima e plaqueadas na densidade de 1×10^4 células/cm², e mantidas a 37°C, 5% CO₂ e 95% de umidade.

4.3. Ensaio Clonogênico

Para a análise da capacidade de formação de colônias e multipotencialidade foram realizados ensaios clonogênicos. As células foram cultivadas em densidade clonal (30 células por placa) em placa de 35mm (Corning) na presença do meio padrão ou dos meios indutivos descritos acima. A capacidade clonogênica foi calculada pelo número de unidades formadoras de colônias (UFCs) e a capacidade proliferativa foi estimada pela quantificação do número de células por colônia (Bianco e Robey, 2000). A potencialidade da célula fundadora da colônia foi avaliada pelos fenótipos presentes nas colônias através de imunocitoquímica como descrito abaixo.

4.4. Análise fenotípica

4.4.1. Imunocitoquímica

A análise fenotípica foi feita através de reação imunocitoquímica. As células foram fixadas com paraformaldeído (4%) por 30 minutos e após lavadas com solução de salina tamponada de fosfato (PBS). Para a análise de marcadores citoplasmáticos, as células, após a fixação, foram permeabilizadas com solução de PBS-Triton (Sigma) a 0,25% por 30 minutos. Os sítios inespecíficos foram bloqueados incubando as células por 40 minutos com SFB diluído a 10% em PBS. Os anticorpos primários (Tabela 1) foram incubados por 1 hora à temperatura ambiente. As células foram então lavadas com PBS contendo Tween 20 a 0,05% em PBS (PBS/Tween, Sigma) e subsequentemente incubadas por 1 hora à temperatura ambiente com os anticorpos secundários conjugados à fluorocromos (Tabela 2). Os núcleos foram corados com

DAPI (Sigma) e através da sua contagem obteve-se o número total de células. As marcações fluorescentes foram visualizadas em microscópio de epifluorescente Olympus IX71 e fotografadas com câmara Olympus DP71.

Tabela 1 - Anticorpos primários utilizados.

Anticorpo Primário	Imonoglobulina	Produzido em:	Diluição	Fabricante
Anti- β tubulinaIII	IgG1	Camundongo	1:600	Promega
Anti-Proteína 0 (P0)	IgG	Coelho	1:100	Santa Cruz
Anti-alfa actina de músculo liso (α -SMA)	IgG2a	Camundongo	1:800	Sigma
Anti-Nestina	IgG	Coelho	1:100	Abcam
Anti-Oct4	IgG	Coelho	1:300	Chemicon
Anti-Proteína 75 (p75)	IgG1	Camundongo	1:100	Santa Cruz
Anti-Sox 2	IgG2b	Camundongo	1:200	Chemicon
Anti-Nanog	IgG	Coelho	1:100	Chemicon

Tabela 2 - Anticorpos secundários utilizados.

Anticorpo Secundário	Produzido em:	Fabricante	Diluição
Anti-IgG1 de camundongo FITC	Cabra	SouthernBiotech	1:100
Anti-IgG de coelho Alexa Fluor® 488	Cabra	Invitrogen	1:75
Anti IgG2a de camundongo Texas Red	Cabra	Southern Biotech	1:100
Anti-IgG2b de camundongo FITC	Cabra	Chemicon	1:100
Anti-BrdU	Camundongo	Calbiochem	1:100

4.5. Análise da proliferação celular

A proliferação celular foi avaliada através da incorporação com BrdU (5-bromo-2-dioxiuridina), um análogo da timidina que quando acrescido ao meio, serve como um substituto da timidina em células que estão em divisão celular (Costa Silva, 2008). Foi acrescentado 1µg/mL de BrdU aos diferentes meios e mantido durante 24 horas de cultura. As células foram então fixadas com paraformaldeído (4%) conforme descrito acima para a imunocitoquímica. As culturas foram lavadas 3 vezes com PBS e 2 vezes com água destilada. Após foram incubadas com HCL a 37% por 15 minutos. Em seguida, as culturas foram lavadas novamente com água destilada e mais 4 vezes com PBS. A cultura foi então incubada com o anticorpo anti-BrdU por 1 hora e visualizadas em microscópio de epifluorescente Olympus IX71 e fotografadas com câmara Olympus DP71.

4.6. Análise Estatística

A análise estatística foi avaliada por ANOVA de uma via, seguido do teste de Tukey, ou pelo teste T, quando apropriado, através do software estatístico GraphPad Prism 5[®]. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

5. Resultados

5.1 Aperfeiçoamento do método de cultura e cultivo

O primeiro objetivo deste trabalho foi estabelecer um método de cultivo para as células da polpa dental aperfeiçoando o protocolo anteriormente descrito por Coura e colaboradores para o ligamento periodontal (2008). Durante a realização das culturas primárias, as células foram plaqueadas diretamente sobre plástico da placa de cultura como descrito anteriormente (Coura *et al.*, 2008) e mantidas na presença dos meios padrão, CTE e CTN. Nesta condições as células mantidas no meio CTN perderam totalmente a sua capacidade de adesão ao plástico e entraram em morte celular. Com o objetivo de obter culturas de longa duração, mesmo com as células cultivadas em CTN, as placas de cultura foram então recobertas com os substratos de fibronectina ou colágeno tipo I e analisada a proliferação e a morte celular pela presença de núcleos picnóticos.

Observamos que o colágeno tipo I foi eficiente em promover a proliferação celular e em promover maior sobrevivência. Não observamos diferenças significativas entre os diferentes substratos quanto à proliferação celular e expressão fenotípica. Desse modo, os experimentos seguintes foram realizados em placas de cultura revestidas com colágeno tipo I.

5.2 Análise da capacidade de formação de colônias

A capacidade de formação de colônias é um indicativo da presença de células tronco ou progenitoras (Bianco e Robey, 2000). Dessa forma as culturas foram analisadas para a capacidade de formar colônias em ensaios clonogênicos. Apenas as colônias que apresentavam agrupamentos de três ou mais células foram consideradas (Fig. 5).

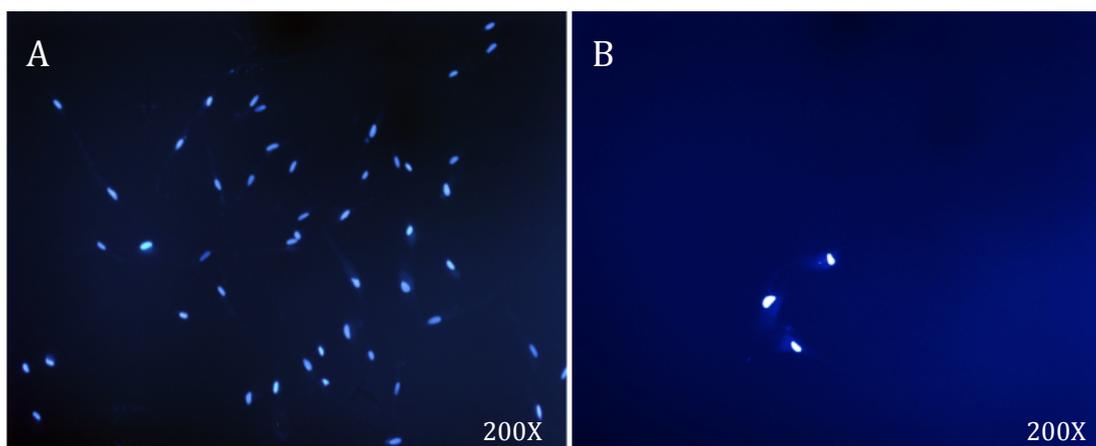


Figura 5. Fotografias demonstrando as UFCs. Em A UFC formada em meio controle. Em B UFC formada em células tratadas com meio Neural. Em azul DAPI.

As análises realizadas em passagens baixas (P1 a P3) revelaram uma proporção de aproximadamente 70% de unidades formadoras de colônias (UFCs) em relação ao total das células plaqueadas em todas as condições de culturas analisadas, não havendo diferenças significativas entre elas (Fig. 6). Essa proporção foi semelhante em culturas mantidas no meio padrão e meio de CTE mesmo em passagens altas (P8 a P10). No entanto, observamos apenas 9% de UFCs nas culturas mantidas em meio CTN analisadas em passagens altas (Fig.7), o que corresponde a aproximadamente uma redução de 7 vezes em relação às outras duas condições de cultivo (meio padrão e meio CTE) e de 8,4 vezes em relação a análise em passagens baixas do mesmo meio (Fig. 8). Além disso, encontramos marcação para Nestina, β -Tubulina III e α -SMA nas colônias tratadas.

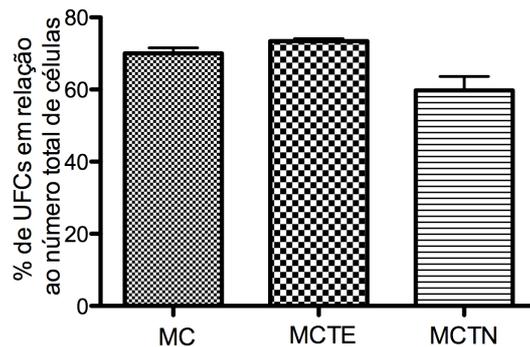


Figura 6. Porcentagem de UFCs em passagens baixas (P1 a P3). MC: Meio Controle; MCTE: Meio para células Tronco Embrionárias; MCTN: Meio Indutivo para Células Tronco Neurais. Os valores foram obtidos por ANOVA de uma via seguida de teste de TuKey. Os resultados apresentam a média \pm erro padrão. Não houve diferenças significativas.

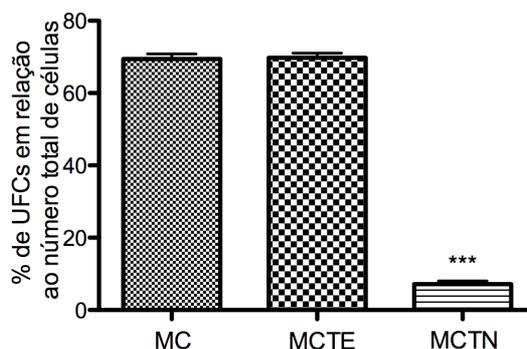


Figura 7. Porcentagem de UFCs em passagens altas (P8 a P10). MC: Meio Controle; MCTE: Meio para células Tronco Embrionárias; MCTN: Meio Indutivo para Células Tronco Neurais. Os valores foram obtidos por ANOVA de uma via seguida de teste de TuKey. O valor de significância (***) foi de $p \leq 0,0001$.

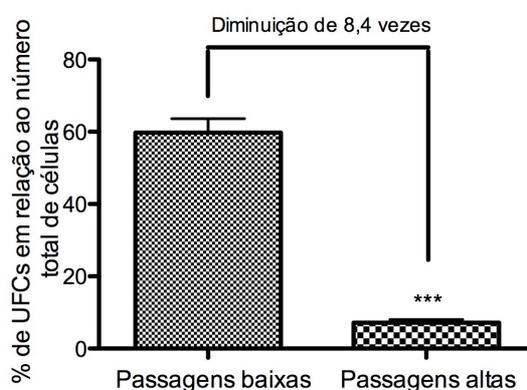


Figura 8. Gráfico comparativo da análise de UFCs entre passagens baixas e passagens altas quando estas eram cultivadas no meio para células tronco neurais. Os resultados são expressos como a média \pm erro padrão *** $p \leq 0,001$ pelo teste T.

5.3 Análise da capacidade proliferativa

Investigamos no presente estudo a proliferação celular através do ensaio de incorporação de BrdU. As análises realizadas em passagens baixas revelaram uma taxa de proliferação celular de 17,2%, 14,6% e 13,5% nos meios padrão, CTE e CTN, respectivamente. A análise estatística não revelou diferenças significativas entre eles (Fig. 9). No entanto, quando as análises foram realizadas em passagens altas, observamos uma taxa de proliferação celular de 16,3% para o meio padrão, 12,13% para o meio CTE e de 5,4% para o meio CTN. Isso demonstra uma diminuição significativa nas culturas mantidas em meio CTN de aproximadamente 3,8 vezes em relação ao meio padrão e 2,7 vezes em relação ao CTE (Fig. 10). Além disso, observamos uma redução de 2,14 vezes ao compararmos a taxa de proliferação celular das células mantidas em CTN em passagens baixas em relação às passagens altas, neste mesmo meio (Fig. 11).

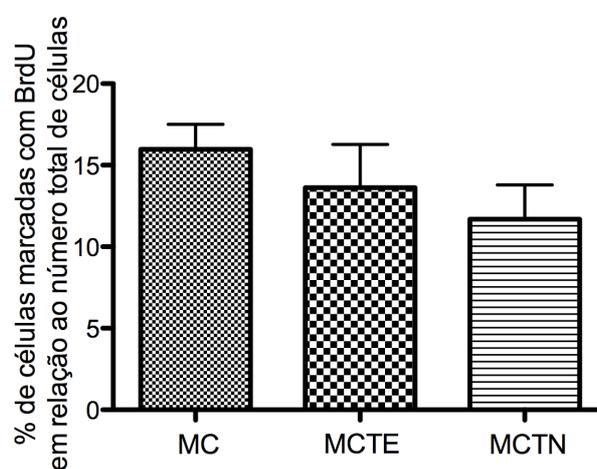


Figura 9. Análise da proliferação celular por incorporação das células com BrdU em passagem baixa. MC: Meio Controle (padrão); MCTE: Meio para Células Tronco Embrionárias; MCTN: Meio para Células Tronco Neurais. Os resultados são expressos como a média \pm erro padrão.

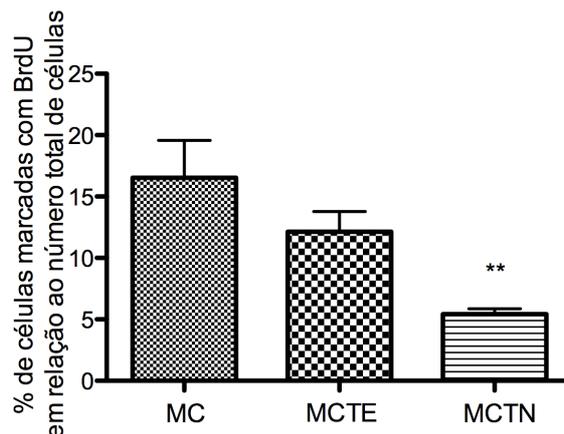


Figura 10. Análise da proliferação celular por incorporação das células com BrdU em passagens altas. MC: Meio Controle (padrão); MCTE: Meio para Células Tronco Embrionárias; MCTN: Meio para Células Tronco Neurais. Os resultados são expressos como a média \pm erro padrão. ** $p \leq 0,01$ por ANOVA de uma via seguida de teste de TuKey vs. MC e MCTE.

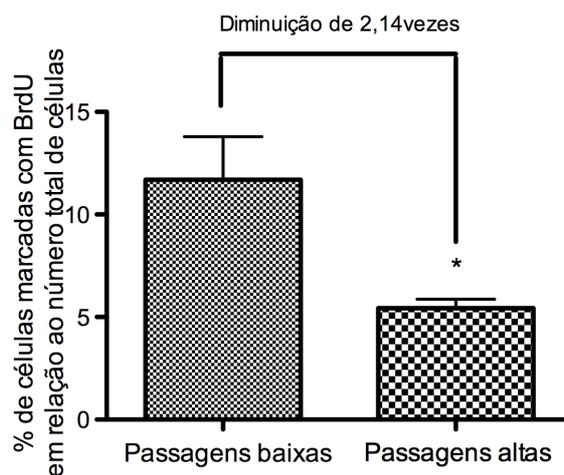


Figura 11. Análise da proliferação celular por incorporação das células com BrdU comparando o meio CTN em passagens baixas em relação a passagens altas. Os resultados são expressos como a média \pm erro padrão. O valor de significância (*) foi de $p \leq 0,05$ pelo teste T.

5.4. Análise fenotípica

A expressão de marcadores de diferenciação celular foi avaliada pela presença de células positivas para os marcadores de células tronco embrionárias (Nanog, Sox 2 e Oct-4), de progenitores neurais (Nestina e β - tubulina III), de células da CN (Nestina e p75), de células gliais (P0) e de células de músculo liso (α -SMA). Os

resultados mostraram que mais de 90% das células foram positivas para Nanog, Sox 2, Oct-4, Nestina (Fig. 12) e β -Tubulina III, nas três condições de cultivo analisadas tanto em passagens baixas quanto em passagens altas. Não foi encontrado marcação para P0 e p75.

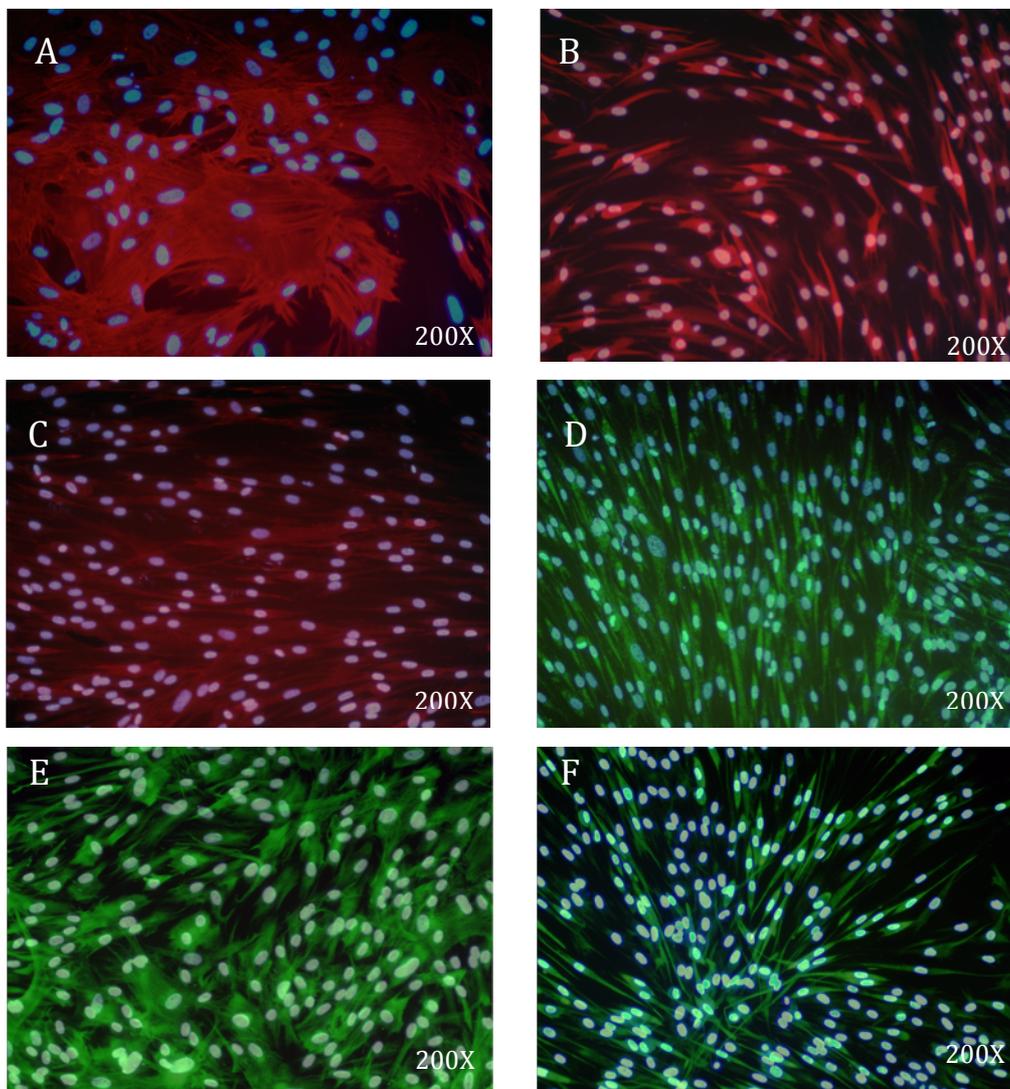


Figura 12. Fotografias representativas da expressão fenotípica de α -SMA (A), Nanog (B), Sox2 (C), Oct-4 (D) e Nestina (E e F). Em B, D e F as células foram mantidas em meio para células tronco neurais. Em A, C e E em meio controle (padrão). Núcleos em azul marcados com DAPI.

Apesar de não haver diferenças significativas nas expressões da maioria dos marcadores celulares, observamos algumas mudanças morfológicas quando comparamos os diferentes meios de tratamento. Como podemos visualizar na figura

13, através da marcação para β -Tubulina, as células tratadas no meio controle e no meio CTE apresentaram um formato fibroblastoide, enquanto as células tratadas no meio CTN são mais alongadas e com prolongamentos citoplasmáticos maiores, sendo que estes aumentam de tamanho com o decorrer das passagens. Estas mudanças foram progressivas e observadas desde as primeiras passagens.

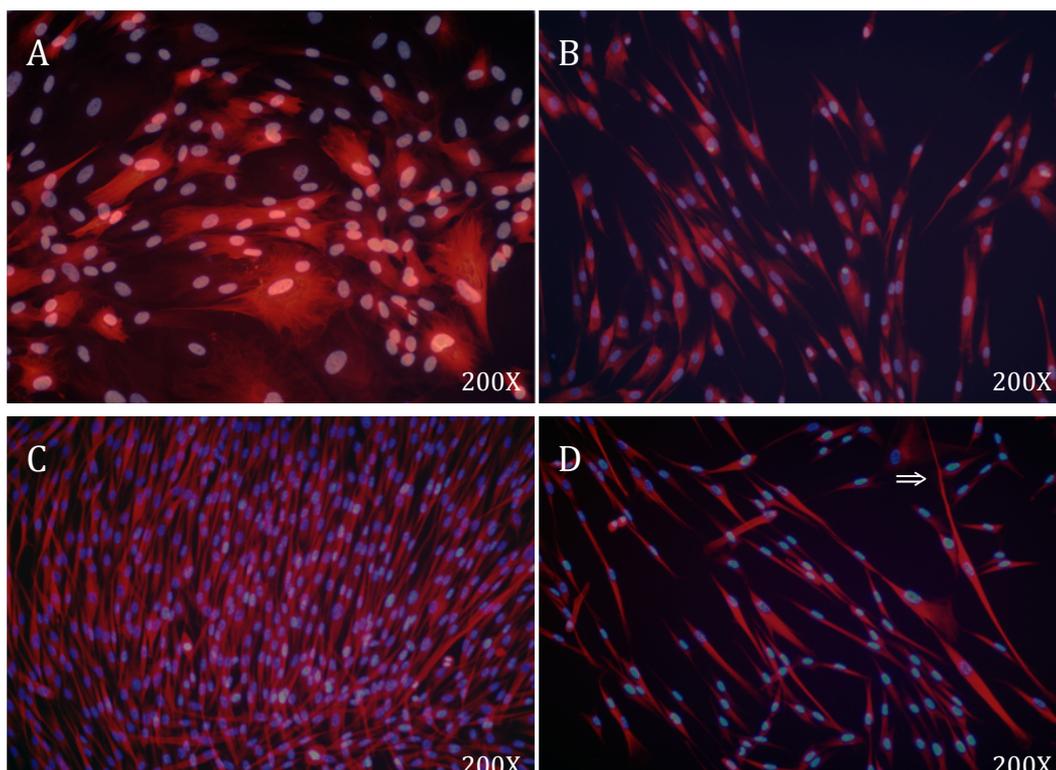


Figura 13. Fotografias demonstrando a morfologia celular encontrada nos diferentes meios. Em A morfologia celular encontrada no meio controle e no meio para células tronco embrionárias. Em B morfologia celular em meio acrescido de EGF e FGF2. Em C e D morfologia encontrada no meio neural. Podemos notar que as células mantidas em meio neural apresentam prolongamentos celulares maiores (\Rightarrow). Em vermelho β -Tubulina, em azul DAPI.

Ao avaliarmos a proporção de células positivas para α -SMA também notamos diferenças significativas no meio CTN quando comparados com os meios controle e CTE (Fig. 14). Estas células apresentam morfologia achatada e poligonal, característica de células de músculo liso em cultura (Costa-Silva *et al.*, 2009). Os resultados demonstraram que cerca de 62,9% da expressão de α -SMA ocorreu na

condição controle e 61,3% no meio CTE. Por outro lado, houve uma redução de 6,8 e 6,5 vezes na proporção de células positivas para α -SMA, no meio CTN em comparação com o controle e o CTE, respectivamente (Fig. 15).

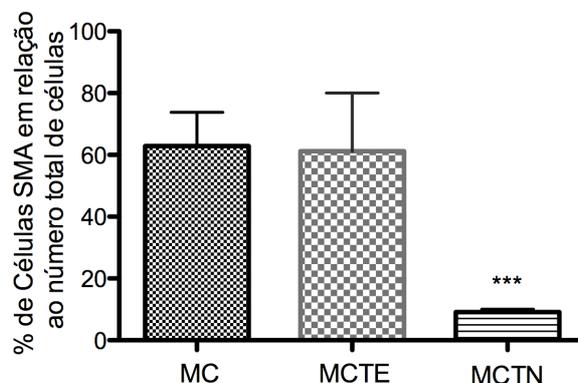


Figura 14. Análise da proporção de células positivas para o marcador celular α -SMA em baixa passagem. Não foi observado diferenças significativa entre os meios controle e CTE. MC: Meio Controle (padrão); MCTE: Meio para Células Tronco Embrionárias; MCTN: Meio para Células Tronco Neurais. Os resultados são expressos como a média \pm erro padrão. O valor de significância (***) foi de $p \leq 0,001$ por ANOVA de uma via seguida de teste de TuKey vs. MC e MCTE.

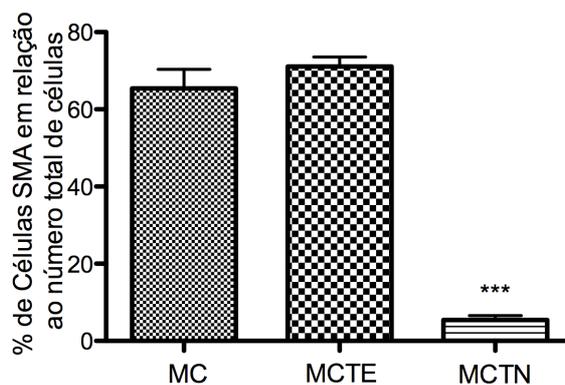


Figura 15. Análise da proporção de células positivas para o marcador celular α -SMA em alta passagem. Não foi observado diferenças significativa entre os meios controle e CTE. MC: Meio Controle (padrão); MCTE: Meio para Células Tronco Embrionárias; MCTN: Meio para Células Tronco Neurais. Os resultados são expressos como a média \pm erro padrão. O valor de significância (***) foi de $p \leq 0,001$ por ANOVA de uma via seguida de teste de TuKey vs. MC e MCTE.

Em seguida avaliamos se os efeitos promovidos pelo meio CTN poderiam ter sido promovidos pela presença dos fatores EGF e/ou FGF2 adicionado ao meio

(ambos numa concentração final de 20ng/mL, conforme orientação do fabricante). Para isso, realizamos culturas de células em meio controle acrescido de EGF e FGF2, nas mesmas concentrações encontradas no meio CTN. Durante as 3 primeiras passagens observamos uma mudança morfológica nas células quando estas foram mantidas em EGF e FGF2, mas estas mudanças não apresentaram as mesmas grandezas do que as tratadas no meio neural (Fig. 13).

6. Discussão

Durante a embriogênese as células da polpa dentária consistem em um grupo de células originadas da papila dentária que é originada pelo mesênquima oral (Moore e Persaud, 2008). Devido à similaridade com outras células tronco mesenquimais, e por serem relativamente fáceis de serem obtidas e propagadas, as células mesenquimais da polpa dentária têm sido extensivamente estudadas (Karaöz *et al.*, 2009).

As células tronco são geralmente definidas como células clonogênicas capazes de se auto-renovarem e formarem linhagens de células diferenciadas (Harada *et al.*, 1999; Bianco *et al.*, 2001). Para analisar estas características nas células da polpa dentária realizamos ensaios de UFCs. Estes ensaios demonstraram que as células da polpa dentária apresentam um alto potencial de clonogenicidade, característicos de células indiferenciadas (Fig. 6 e Fig. 7). Nossos resultados apresentam uma porcentagem maior que outros estudos descritos na literatura (Gronthos *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2008). Estes fatos podem ter se dado devido a diferenças de metodologias, como por exemplo o uso do colágeno tipo I nas placas.

Devido às características celulares apresentadas nestes ensaios resolvemos avaliar os marcadores fenotípicos de células indiferenciadas e de células diferenciadas em culturas de massa. Para isso, utilizamos o meio comercial CTE, que tem como função manter as células indiferenciadas, com característica de células embrionárias, através das passagens. Os resultados das imunocitoquímicas demonstraram que as células da polpa dentária apresentaram os marcadores Sox2, Oct-4, Nanog, Nestina, β -Tubulina e α -SMA. Também realizamos experimentos através de marcação de BrdU e de UFCs.

Os marcadores OCT- 4 e Sox2 são fatores de transcrição que estão envolvidos na manutenção de células pluripotentes (Nichols *et al.*, 1998; Avilion *et al.*, 2003) por estarem envolvidos na expressão de vários genes que participam da manutenção da pluripotencialidade da célula, como o Nanog (Rodda *et. al.*, 2005). O marcador Nanog é um fator de transcrição homeobox. A sua super-expressão é capaz de manter a pluripotencialidade e auto-renovação características de células tronco embrionárias (Mitsui *et al.*, 2003).

Nos experimentos realizados esses marcadores foram encontrados na grande maioria das células (acima de 90%) e em todas as passagens analisadas. Estes dados demonstram que as células da polpa dentária apresentam células com marcadores característicos de células tronco embrionários em alta porcentagem. Além disso, esses marcadores foram encontrados desde a primeira passagem no meio CTE e na mesma razão que no meio usado como controle, não podendo portanto ter sido expresso apenas por alguma influência do meio CTE. Os outros marcadores analisados também não apresentaram diferenças entre os dois meios. Esse resultado sugere a presença de células tronco/progenitoras nas nossas condições de cultivo em baixas passagens e independente do meio utilizado.

Além desses, avaliamos outros marcadores celulares como Nestina, β -Tubulina e α -SMA. O marcador Nestina e β -Tubulina são descritos na literatura como marcadores característicos de células neurais (Stemple *et al.*, 1992; Lobo *et al.*, 2004).

Apesar disso, não observamos diferenças consideráveis na expressão desses marcadores quando comparamos o meio para CTN com o meio controle e o meio para CTE. No entanto, houveram diferenças morfológicas significativas. As células mantidas em CTN passaram a apresentar prolongamentos citoplasmáticos mais

longos, de modo progressivo com as passagens. As alterações morfológicas estão relacionadas com mudança na expressão protéica das células, o que pode estar relacionado a um processo de diferenciação celular (Wolpert, 2008). Adicionalmente a estes resultados, a presença de células positivas para o marcador α -SMA foi altamente reduzida após cultivo no meio CTN no decorrer das passagens (Fig. 14 e Fig. 15), quando comparado as outras duas condições (meio controle e CTE). Apesar das mudanças observadas não obtivemos células com uma morfologia tipicamente neuronal. Isso pode ser explicado pelo efeito do FGF2. Em trabalhos anteriores de Bittencourt e colaboradores (2007) foi observado que o tratamento de FGF2 promove um aumento significativo no número de células negativas para fenótipos diferenciados da CN de aves sugerindo que as células da CN possam se manter indiferenciada pela influência do FGF2 (Bittencourt, 2007). Portanto, para resultados mais precisos sobre a capacidade de diferenciação das células da polpa dentária em derivados neurais, uma possibilidade seria realizar tratamentos mais longos na presença do meio CTN e/ou após substituí-lo por meio indutivo que promova a diferenciação neural.

Como a maioria dos marcadores não apresentou diferença na sua expressão entre as diferentes condições, resolvemos avaliar se estes meios influenciavam a proliferação e a capacidade clonogênica dessas células, através de marcação para BrdU e pela formação de UFCs. Os resultados demonstraram que a capacidade clonogênica e a taxa de proliferação celular das células mantidas em meio controle e meio CTE foram bastante similares. Por outro lado, quando analisamos o meio CTN notamos que as células diminuem significativamente a sua proliferação celular e a capacidade de formar colônias quando comparamos com as outras condições. Estes resultados, juntamente com as alterações morfológicas observadas, indicam que o

meio CTN possa estar levando a um processo de diferenciação celular possivelmente para o fenótipo neural. Esse processo pode estar ocorrendo através da indução de diferenciação de progenitores mais indiferenciados para progenitores neurais, ou por processo de seleção desses progenitores.

Ao realizarmos imunocitoquímica nos ensaios de UFCs, notamos colônias que apresentavam simultaneamente marcadores para células neurais (Nestina e β -Tubulina III) e para músculo liso (α -SMA). Esses resultados podem sugerir a presença de uma população de células com características de células da CN. Estudos de Coura e colaboradores demonstraram que as células do ligamento periodontal humano, que apresentam a mesma origem embrionária que a polpa dentária, apresentam um grupo de células característicos da CN (Coura *et al.*, 2008). Embora o presente trabalho tenha mostrado a presença de alguns marcadores indiferenciados e diferenciados da CN, outro marcador de células da CN encontrado em embriões de aves e mamíferos, descrito na literatura, o receptor p75, não foi detectado (Vincent e Thiery, 1984; Stemple *et al.*, 1992).

7. Conclusões

- As células da polpa dentária apresentam uma alta população de células com marcadores característicos de células tronco embrionários, não necessitando de meios indutivos para tal. Isso demonstra que essas células podem ser uma boa alternativa para futuras terapias.

- As células da polpa dentária demonstram um provável potencial neural quando cultivadas em meio indutivo apropriado.

- Células com características de células da CN foram encontradas na polpa dentária. Porém estudos aprofundados, utilizando meios característicos para essas células, assim como a realização de clonagens são necessárias para a confirmação da origem embrionária das mesmas.

8. Referências Bibliográficas

- AVILION, A. A.; NICOLIS, S. K.; PEVNY, L.; PEREZ, L.; VIVIAN, N.; LOVELL-BADGE, R. (2003). Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev.* 17:126-40.
- BIANCO, R.; ROBEY, P. G. (2000). Marrow stromal stem cells. *J. of Clinical Investigation* 105: 1663-668.
- BIANCO, P.; RIMINUCCI, M.; GRONTHOS, S.; ROBEY, P. G. (2001). Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 19: 180-92.
- BITTENCOURT, D. (2007). Efeito do FGF2 na diferenciação de células da crista neural truncal de codornas *in vitro*. Dissertação de mestrado-UFSC.
- BOUKARI, A.; RUCH, J. V. (1981). Behavior of embryonic mouse teeth in vitro: preservation of the crow pattern and mineralization. *J. Biologi Buccale* 9: 349-61.
- TEN CATE, A. R. (1995). The development of the periodontium – a largely ectomesenchymally derived unit. *Periodontology* 13: 9-19.
- CHENG, P. H.; SNYDER, B.; FILLOS, D.; IBEGBU, C. C.; HUANG, A. H.; CHAN, A. W. (2008). Postnatal stem/progenitor cells derived from the dental pulp of adult chimpanzee. *BMC Cell Biol.* 9: 1-11.
- COURA, G. S.; GARCEZ, R. C.; AGUIAR, C. B. N. M.; ALVAREZ-SILVA, M.A.; MAGINI, R. S.; TRENTIN, A.G. (2008). Periodontal Ligament: A Potential Niche of Neural Crest Stem Cells. *J Dent Res.* 43: 531–36.
- COSTA-SILVA, B.; COSTA, M. C.; MELO, F. R.; NEVES, C. M.; ALVAREZ-SILVA, M.; CALLONI, G. W.; TRENTIN, A. G. (2009). Fibronectin promotes differentiation of neural crest progenitors endowed with smooth muscle cell potential. *Exp. Cell Res.* 315: 955-67.
- FERNANDES, K. J. L.; MCKENZIE, I. A.; MILL, P.; SMITH, K. M.; AKHAVAN, M.; BARNABE-HEIDER, F.; BIERNASKIE, J.; JUNEK, A.; KOBAYASHI, N. R.; TOMA, J. G.; KAPLAN, D. R.; LABOSKY, P. A.; RAFUSE, V.; HUI, C.; MILLER, F. D. (2004). A dermal niche for multipotent adult skin-derived precursor cells. *Nature Cell Biology* 6: 1082-93
- GILBERT, S.F. (2006). *Developmental Biology*, 8^a ed., Sinauer Associates, 817p.
- GRONTHOS, S.; MANKANI, M.; BRAHIM, J.; ROBEY, P.G.; SHI, S. (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 13625–630.
- GRONTHOS, S.; SIMMONS, P. J.; GRAVES, SE.; ROBEY, P.G. (2001) Integrin-mediated interactions between human bone marrow stromal precursor cells and the extracellular matrix. *Bone* 28:174-81.

GRONTHOS, S.; BRAHIM, J.; LI, L.; FISHER, L.W.; CHERMAN, N.; BOYDE, A.; DENBESTEN, P.; ROBEY, P. G.; SHI, S. (2002). Stem cells properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res* 81: 531-35.

HARADA, H.; KETTUNEM, P.; JUNG, H. S.; MUSTONEN, T.; WANG, Y. A.; THESLEFF, I. (1999). Localization of putative stem cells in dental epithelium and their association with Notch and FGF signaling. *J. Cell Biol.* 147:105-20.

JERNVALL, J.; THESLEFF, I. (1999). Reiterative signaling and patterning during mammalian tooth morphogenesis. *Mechanisms of Development* 92: 19-29.

KARAÖZ, E.; DOGAN, B. N.; AKSOY, A.; GACAR, G.; AKYÜZ, S.; AYHAN, S.; GENÇ, Z. S.; YÜRÜKER, S.; DURUKSU, G.; DEMIRCAN, P. C.; SARIBOYACI, A. E. (2009). Isolation and in vitro characterisation of dental pulp stem cells from natal teeth *Histochem. Cell Biol.* 133: 95-112.

KNECHT, A. K.; BRONNER-FRASER, M. (2002). Induction of the neural crest: a multigene process. *Nat. Rev. Genet.* 3: 453-61.

LE DOUARIN, N.; KALCHEIM, C. (1999). *The Neural Crest*. 2^a ed. Cambridge: Cambridge University Press,. 445p.

LE DOUARIN, N. M.; CREUZET, S.; COULY, G.; DUPIN, E. (2004). Neural crest cell plasticity and its limits. *Development* 131: 4637-650.

LINDE, A.; GOLDBERG, M. (1993). Dentinogenesis. *Crit. Rev. In Oral Biology and Medicine* 4: 679-728.

LOBO, M. V. T.; ARENAS, M. I.; ALONSO, F. J. M.; GÓMEZ, G.; BAZAN, E.; PAINO, C. L.; FERNANDEZ, E.; FRAILE, B.; PANIAGUA, R.; MOYANO, A.; CASO, E. (2004). Nestin, a neuroectodermal stem cell molecule, is expressed in Leydig cells of human testis and in some specific cell types from human testicular tumors. *Cell Tissue Res* 316: 369-76.

MENDEZ-OTERO, R.; FREITAS, G. R.; ANDRÉ, C.; MENDONÇA, M. L.; FRIEDRICH, M.; OLIVEIRA-FILHO, J. (2007). Potential roles of bone marrow stem cells in stroke therapy. *Regenerative medicine* 2: 417-23.

MILETICH, I.; SHARPE, P.T. (2004). Neural crest contribution to mammalian tooth formation. *Birth Defects Research* 72: 200–12.

MITSUI, K.; TOKUZAWA, Y.; ITOH, H.; SEGAWA, K.; MURAKAMI, M.; TAKAHASHI, K.; MARUYAMA, M.; MAEDA, M.; YAMANAKA, S. (2003). The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 113: 631–42.

MIURA, M.; GRONTHOS, S.; ZHAO, M.; LU, B.; FISHER, L. W.; ROBEY, P. G.; SHI, S. (2003). SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 100: 5807-812.

MOORE, K.; PERSAUD, T. (2008). *Embriologia Humana Básica*, 8^a ed.,

MORSCZECK, C.; SCHMALZ, G.; REICHERT, T. E., VÖLLNER, F.; GALLER, K.; DRIEMEL, O. (2003). Somatic stem cells for regenerative dentistry. *Clinical Oral Investigations* 12: 113-18.

NICHOLS, J.; ZEVNIK, B.; ANASTASSIADIS, K.; NIWA, H.; MUKARAMI, M.; TAKAHASHI, K.; MARUYAMA, M.; MAEDA, M.; YAMANAKA, D. (2003). The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *CELL* 113: 631-42.

PELACHO, B.; MAZO, M.; GAVIRA, J. J.; PRÓSPER, F. Adult Stem Cells: From new cell sources to changes in methodology. (2010). *J Cardiovasc. Transl. Res.*

PRESCOTT, R.; ALSANEA, R.; FAYAD, M.; JOHNSON, B.; WENCKUS, C.; HAO, J.; JOHN, A.; GEORGE, A. (2008). In-vivo generation of dental pulp-like tissue using human pulpal stem cells, a collagen scaffold and dentin matrix protein 1 following subcutaneous transplantation in Mice. *J Endod.* 34: 421–26.

PETERS, H.; BALLING, R. (1999). Teeth: where and how to make them. *Tooth Development* 15: 59-85.

QUINONES-HINOJOSA, A.; SANAI, N.; SORIANO-NAVARRO, M.; GONZALEZ-PEREZ, O.; MIRZADEH, Z.; GIL-PEROTIN, S.; ROMERO-RODRIGUEZ, R.; BERGER, M. S.; GARCIA-VERDUGO, J. M.; ALVAREZ-BUYLLA, A. (2006). Cellular composition and cytoarchitecture of the adult human subventricular zone: a niche of neural stem cells. *J. Comp. Neurol.* 494: 415-34.

ROCHEFORT, G. Y.; DELORME, B.; LOPEZ, A.; HÉRAULT, O.; BONNET, P.; CHARBORD, P.; EDER, V.; DOMENECH, J. (2006). Multipotential mesenchymal stem cells are mobilized into peripheral blood by hypoxia. *Stem Cells* 24: 2202-208.

RODDA, D. J.; CHEW, J. L.; LIM, L. H.; LOH, Y. H.; WANG, B.; ROBSON, P. (2005). Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2. *J. Biol. Chem.* 280: 24731-737.

STEMPLE, D. L.; ANDERSON, D. J. (1992). Isolation of a stem cell for neurons and glia from the mammalian neural crest. *Cell* 71: 973-85.

TECHAWATTANAWISAL, W.; NAKAHAMA, K.; KOMAKI, M.; ABE, M.; TAKAGI, Y.; MORITA, I. (2007). Isolation of multipotent stem cells from adult rat periodontal ligament by neurosphere-forming culture system. *Biochem Biophys Res Comm.* 357: 917-23.

THESLEFF, I. (2003). Epithelial-mesenchymal signalling regulation tooth morphogenesis. *J. of Cell Science* 116: 1647-648.

THESLEFF, I.; SHARPE, P. (1997). Signalling networks regulating dental development. *Mechanisms of Development* 67: 111-23.

THOMAS, H. F. (1995). Root formation. *J. Development Biology* 39: 231-37.

VAAHTOKARI, A.; ABERG, T.; JERNVALL, J.; KERÄNEN, S.; THESLEFF, I. (1995). The enamel knot as a signaling center in the developing mouse tooth. *Mech. Dev.* 54: 39-43.

VINCENT, M.; THIERY, J. P. (1984). A cell surface marker for neural crest and placodal cells: further evolution in peripheral and central nervous system. *Development Biology* 103: 468-81.

WIDERA, D.; GRIMM, W.D.; MOEBIUS, J.M.; MIKENBERG, I.; PIECHACZEK, C.; GASSMANN, G., Wolff, N. A.; THÉVENOD, F.; KALTSCHMIDT, C.; KALTSCHMIDT, B. (2007). Highly efficient neural differentiation of human somatic stem cells, isolated by minimally invasive periodontal surgery. *Stem Cells Development* 16: 447-60.

WOLPERT, L. (2008). *Biologia do desenvolvimento* 3^a ed. Artmed, 576p.